Rôles des voies de signalisation à di-GMP cyclique chez Legionella pneumophila

Julie Allombert

▶ **To cite this version:**

Julie Allombert. Rôles des voies de signalisation à di-GMP cyclique chez Legionella pneumophila. Bactériologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2014. Français. NNT : 2014LYO10161 . tel-01591489

HAL Id: tel-01591489
https://theses.hal.science/tel-01591489

Submitted on 21 Sep 2017

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.

Université Claude Bernard Lyon 1

N° d'ordre

Centre International de Recherche en Infectiologie

UNIVERSITÉ DE LYON

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON
délivrée par
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON I

DIPLÔME DE DOCTORAT

présentée et soutenue publiquement le
15 Septembre 2014

Par **Julie ALLOMBERT**

Rôles des voies de signalisation à di-GMP cyclique chez *Legionella pneumophila*

Directrice de thèse : **Patricia DOUBLET**

Co-encadrante : **Anne VIANNEY**

JURY :

Alain FILLOUX, Imperial College of London, rapporteur
Yann HECHARD, Université de Poitiers, rapporteur
Howard SHUMAN, University of Chicago, examinateur
Anne VIANNEY, Université Lyon 1, co-encadrante
Patricia DOUBLET, Université Lyon 1, directrice de thèse

Ecole doctorale : Evolution, Ecosystèmes, Microbiologie, Modélisation

Unité de recherche : CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie
UMR5308, U1111, ENS Lyon, Université Lyon 1

Equipe : Pathogénèse des légionelles

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. François-Noël GILLY**
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe LALLE
Vice-président du Conseil Scientifique	M. le Professeur Germain GILLET
Directeur Général des Services	M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. le Professeur F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. FLEURY
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme Caroline FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. Georges TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. Jean-Claude PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y.VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. P. FOURNIER
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier M. Howard Shuman, M. Alain Filloux et M. Yann Héchard pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Vous avez toute ma gratitude car malgré des emplois du temps chargés et malgré la distance, vous avez accepté de faire partie de mon jury de thèse. J'espère donc que ce manuscrit sera à la hauteur de vos attentes…

Je remercie ensuite tout particulièrement Anne, ma directrice de thèse « officieuse » pour son soutien, sa disponibilité, sa bonne humeur quotidienne… et les heures (ou plutôt les jours !) de discussions scientifiques ou non que nous avons partagées… Tu m'as aidé à « grandir » scientifiquement et à prendre confiance pendant ces trois ans (surtout après mon arrivée en thèse pleine de suspense !)… Je te laisse sur mon bureau tout le courage et la motivation nécessaires à l'écriture de ton HDR pour devenir une Directrice de Thèse Officielle ! A bon entendeur, je laisserais aussi, bien cachés, quelques dossiers pour préparer le pot qui suivra…

Je tiens aussi à adresser un grand merci à Patricia, ma directrice de thèse officielle, pour sa disponibilité (malgré un emploi du temps méga chargé parfois !) et sa gentillesse… Merci aussi pour ton optimiste à presque toute épreuve… Courage pour le papier LegK2 n°2… Ayant entrainé mon esprit machiavélique avec Fabien, je reste à disposition pour la traque d'un quelconque reviewer ou éditeur…

Ma gratitude aussi à Claire, mon assistance manip 24/24 ! Pour ton dynamisme et tes doigts de fée qui ont réalisé pour moi des centaines (ou des milliers ?) de minipreps et de surproduction de protéines ! Sans toi, ce projet n'aurait certainement pas avancé aussi bien ni aussi vite !

Un grand merci également à Xavier pour son expertise et ses nombreux conseils qui ont directement contribué à la publication de mes travaux… Et pour ta disponibilité et ta curiosité scientifique…Ton arrivée à l'étage m'a également permis d'entretenir mes compétences en peinture murale et en montage de meubles Ikea, ce qui devrait s'avérer utile d'ici peu…

Mes remerciements aussi à Christophe, le MacGyver du laboratoire, pour ses réparations et ses conseils techniques qui ont sans doute sauvé un certain nombre de mes manips… Pour ta gentillesse et ton humour… Ton interprétation de M dans « Claire Bond 007 » restera longtemps dans mes souvenirs, flottant entre deux volutes de café concentré 100X…

Ma reconnaissance également à Danièle… Pour avoir accepté de me prendre dans l'équipe… Pour ton dynamisme à toute épreuve… Et surtout tes séances de motivation qui ont certainement contribué à ma réussite au concours de l'Ecole Doctorale…

TEAM
LEGIO

Mes remerciements aussi à Elisabeth, notre « nouvelle », pour sa bonne humeur qui participe au sentiment de« bon vivre » dans notre bureau… Ainsi qu'à Sophie, Christophe, Annelise, Ghislaine, Marine et Florence, la moitié de notre équipe à Laennec, pour leurs conseils lors des nombreuses réunions d'équipes !

Maintenant, passons aux « petits » du labo…

Un méga-super-merci à Céline… Ma grande rencontre de cette thèse ! Pour toutes nos discussions scientifiques ou non autour d'une tasse de thé, d'une bière ou de tes muffins multicolores (voir ci-contre)… Pour nos soirées ciné (sans compter les soirées Harry Potter pour Fabien) et notre Road Trip de mai qui m'ont permis de m'aérer l'esprit dès que nécessaire ! Pour ta complicité et par-dessus tout pour ton amitié… Si tu pouvais faire en sorte de trouver un post-doc sur la même partie du globe que moi…

Un coucou également à notre SuperGeek et Maitre des Imprimantes, Fabien… Un merci particulier pour les nombreux sauvetages de mon ordi… ainsi que pour l'entretien de mon esprit machiavélique dans le but d'éliminer Lady Voldemort et Mrs Ombrage… Je suis aussi très fière d'avoir participé à ton processus de sociabilisation et j'espère que tous nos efforts de s'envoleront pas pendant ton vol jusqu'à Baltimore !

Toute ma reconnaissance à notre Grande Prêtresse Iséroise, Nathalie, pour les nombreux talismans de marabout et sacrifices de moutons noirs qui ont contribué directement à la réussite de ce travail… Pour ta gentillesse et ton humour… et tes gâteaux Hello Kitty aussi !

Un coucou spécial aux garçons des Compétents, Pierre-Alexandre et Romain… Pour les nombreuses imitations de Cyril Lignac (entre autres) de Pierre-Alex et son humour qui suffisent à mes yeux à « compenser » son adoration dévorante pour Cloclo… Et Rominou, pour nous motiver régulièrement à aller boire une bonne bière, histoire de décompresser !! Grâce à vous, notre soirée de gala du Sympolégio 2013 restera absolument inoubliable (photo à l'appui)!!

Un merci aussi à notre Agent Bond 008, Valérie… Pour les discussions scientifiques éloignées de la sphère Legio (c'est tellement rafraichissant parfois !)… Pour ta bonne humeur… Et les pauses thé aussi qui permettent de décrocher de la science quelques minutes…

Merci aussi aux autres membres des équipes qui participent ou ont participé à la si bonne ambiance de l'étage… Aïda, Marie-Laure, Laëtitia, Virginie, Arthur, Josy, Elise, Daniel, Mélanie, Stéphanie, Eva et Loreleï… Et à Marie-Jo pour ses petits coucous hebdomadaires !

Enfin, un merci spécial à Erwan, l'infiltré du R+2… Pour son entrain et ses milliers de projets scientifiques passionnants… Et surtout pour sa bonne humeur : et oui, je t'entend rire de mon bureau quand tu es dans le tien !

Merci enfin à mon entourage...

A mes parents et mon frère pour leur soutien sans faille et leurs encouragements qui m'ont permis d'arriver jusque là… J'ai atteint mon objectif de scientifique maintenant que vous savez que Legionnella pneumophila *et* Escherichia coli *sont des bactéries…et que le diGMPc existe !*

A Wook, ma moitié, qui me supporte et réconforte au quotidien… Surtout pendant cette phase difficile et intensive de rédaction de ma thèse… Pour ta patience et ton soutien… Et ton amour… Tu devrais exiger de co-signer ma thèse…

Au reste de ma famille… Mes grands-parents, mes oncles et tantes, mes parrain et marraine, mes « beaux-parents », mes cousins… Pour leurs encouragements tout au long de ces années…

A mes amis aussi… Laurie, Audrey, Bertrand, Gaëtan, Fred… Pour ne pas m'en vouloir d'avoir un emploi du temps infernal… et un humour de scientifique ! Et pour savoir, si bien, me changer les idées quand c'est nécessaire !

Sommaire

1 Introduction 20

2 Contexte bibliographique 22

2.1 Legionella pneumophila 22

2.1.1 L'agent de la légionellose 22
2.1.2 Le génome de *L. pneumophila* 23
2.1.3 Le cycle infectieux de *L. pneumophila* 25
2.1.3.1 Le système de sécrétion de type IV Dot/Icm 26
2.1.3.2 L'entrée dans la cellule-hôte 30
2.1.3.3 La biogénèse de la vacuole de réplication 32
2.1.3.4 La perturbation de la maturation du phagosome par la voie endosomale 37
2.1.3.5 La transition entre les phases de réplication et de transmission 39
2.1.3.6 La sortie de la cellule-hôte 44
2.1.4 La formation de biofilms par *L. pneumophila* 47
2.1.4.1 Les facteurs endogènes de *L. pneumophila* impliqués dans la formation de biofilms 48
2.1.4.2 Déterminants physicochimiques de la formation/colonisation de biofilms 50
2.1.4.3 Influence de la présence de protozoaires et d'autres espèces bactériennes dans les biofilms 52

2.2 Le messager secondaire diGMPc 54

2.2.1 Les messagers secondaires nucléotidiques 54
2.2.2 Les diguanylates cyclases et phosphodiestérases 56
2.2.2.1 Distribution des protéines DGC et PDE 57
2.2.2.2 Architectures des DGC et PDE 58
2.2.2.3 Le casse-tête (« conundrum ») des protéines à double domaines GGDEF et EAL 64
2.2.3 Les effecteurs du diGMPc 66
2.2.3.1 Les effecteurs à domaine PilZ 66
2.2.3.2 Les protéines de type CLP 68
2.2.3.3 Les protéines GGDEF/EAL 68
2.2.3.4 Autres protéines effectrices fixant le diGMPc 70
2.2.3.5 Les effecteurs de type nucléique : les riboswitchs 71
2.2.4 Rôles des voies de signalisation impliquant le diGMPc 73
2.2.4.1 Interconnexion des voies à diGMPc avec d'autres voies de signalisation 73
2.2.4.2 Diversité des fonctions contrôlées par le diGMPc 74
2.2.5 Fonctionnement des voies de signalisation à diGMPc 94
2.2.5.1 Fonctionnement via un contrôle de la concentration intracellulaire globale en diGMPc 95
2.2.5.2 Fonctionnement via le contrôle de concentrations intracellulaires locales en diGMPc 97

3 Objectifs 100

4 Résultats et Discussion 102

4.1 Etude du rôle des protéines GGDEF/EAL dans le contrôle de la virulence 102

4.1.1 Article n°1 102
4.1.2 Résultats complémentaires 113
4.1.2.1 Validation de la méthode de suivi de la sécrétion des effecteurs en cinétique 113
4.1.2.2 Lpl0780, Lpl0922 et Lpl1118 semblent participer à l'orchestration de la sécrétion des effecteurs 116
4.1.3 Discussion 118

4.2 Etude du rôle des protéines GGDEF/EAL dans la régulation de la formation de biofilms 122
4.2.1 Lpl0075, Lpl0329, Lpl1054, Lpl1176 et Lpl1559 participent au contrôle de la formation de biofilms de *L. pneumophila* 122
4.2.1.1 La densité de la population bactérienne des biofilms formés par les souches Δ*lpl0075*, Δ*lpl0329*, Δ*lpl1054*, Δ*lpl1176* et Δ*lpl1559* est affectée. 122
4.2.1.2 Les protéines Lpl0075, Lpl0329, Lpl1054, Lpl1176 et Lpl1559 participent au contrôle de l'architecture des biofilms 124
4.2.1.3 Les 5 protéines identifiées pourraient être associées à des activités enzymatiques antagonistes. 125
4.2.1.4 La concentration intracellulaire en diGMPc dans les 5 souches mutantes sélectionnées n'est pas corrélée à leurs capacités à former des biofilms 127
4.2.2 Lpl1054 est impliquée dans la formation de biofilm en réponse à la présence d'oxyde nitrique 128
4.2.3 Discussion 130

5 Conclusion et Perspectives 136

6 Fiches techniques 140

6.1 Fiche technique 1 : Souches 140

6.2 Fiche technique 2 : Plasmides 145

6.3 Fiche technique 3 : Amorces 149

6.4 Fiche technique 4 : Milieux de culture et conditions de croissance des bactéries 151
6.4.1 Conditions de cultures 151
6.4.1.1 Escherichia coli 151
6.4.1.2 *Legionella pneumophila* 151
6.4.2 Stérilisation 152
6.4.3 Conservation 152

6.5 Fiche technique 5 : Milieux de culture et conditions de culture des cellules hôtes 153
6.5.1 Milieux de culture 153
6.5.1.1 Acanthamoeba castellanii 153
6.5.1.2 Dictyostelium discoideum 153
6.5.1.3 Macrophages 153
6.5.2 Conditions de culture 154

6.6 Fiche technique 6 : Techniques de manipulation de l'ADN 155
6.6.1 Extraction et purification de l'ADN plasmidique 155
6.6.2 Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction 155
6.6.3 Extraction de l'ADN chromosomique chez *L. pneumophila* 155
6.6.4 Analyse électrophorétique de l'ADN sur gel d'agarose 156
6.6.5 Purification des fragments d'ADN 156
6.6.6 Ligature de fragments d'ADN 156
6.6.7 Amplification d'ADN chromosomique par PCR 156
6.6.7.1 Amplification des séquences à cloner 157

6.7 Fiche technique 7 : Transformation des bactéries 158
6.7.1 Transformation d'*E. coli* 158
6.7.1.1 Préparation de cellules compétentes 158
6.7.1.2 Transformation 158
6.7.2 Transformation de *L. pneumophila* 158

6.7.2.1 Préparation des cellules électrocompétentes 158
6.7.2.2 Electroporation 158
6.7.2.3 Analyse des transformants 158

6.8 Fiche technique 8 : Invalidation de gènes chromosomiques chez L. pneumophila 159
6.8.1 Inactivation de gènes chez la souche *L. pneumophila* Paris 159
6.8.2 Transformation par compétence naturelle chez *L. pneumophila* Paris 159

6.9 Fiche technique 9 : Infection des cellules eucaryotes 160
6.9.1 Infections en plaque 96 puits 160
6.9.1.1 Infection d'amibes 160
6.9.1.2 Infection de macrophages 160
6.9.2 Quantification de l'infection par fluorescence 161

6.10 Fiche technique 10 : Caractérisation des phénotypes d'altération de la virulence 162
6.10.1 Test de transition de phase 162
6.10.1.1 Production de pigment 162
6.10.1.2 Sensibilité au sodium 162
6.10.2 Effet cytotoxique de *L. pneumophila* vis-à-vis des cellules hôtes 162
6.10.3 Test de survie précoce des *L. pneumophila* après entrée dans l'hôte 162
6.10.4 Test d'entrée dans l'hôte 163
6.10.5 Test de sécrétion d'effecteurs par le système de sécrétion de type 4 163
6.10.6 Cinétique de sécrétion d'effecteurs par le système de sécrétion de type 4 164
6.10.7 Suivi du recrutement du réticulum endoplasmique sur la vacuole de réplication 164
6.10.8 Suivi de l'échappement à la voie endosomale 164

6.11 Fiche technique 11 : Caractérisation des phénotypes de formation de biofilms 166
6.11.1 Suivi de la croissance planctonique 166
6.11.2 Création d'un biofilm mono-espèce de *L. pneumophila* en plaque 6 puits 166
6.11.2.1 En aérobiose 166
6.11.2.2 En présence d'oxyde nitrique (NO) 166
6.11.3 Quantification des bactéries du biobilm par PCR quantitatives 166
6.11.3.1 Extraction des ADN génomiques 166
6.11.3.2 Traitement à l'éthidium monoazide 166
6.11.3.3 PCR quantitative 167
6.11.4 Observation de l'architecture du biofilm par microscopie confocale 167

6.12 Fiche technique 12 : Techniques biochimiques 168
6.12.1 Surproduction et purification de protéine possédant une étiquette His_6 168
6.12.1.1 Production des protéines et extraction 168
6.12.1.2 Purification des protéines 168
6.12.2 Analyse des protéines 169
6.12.2.1 Dosage des protéines 169
6.12.2.2 Electrophorèse en gel de polyacrylamide SDS-PAGE 169
6.12.2.3 Transfert des protéines sur membrane 169
6.12.2.4 Immunorévélation de protéines sur membrane 170
6.12.3 Test d'activité diguanylate cyclase ou phosphodiestérase *in vitro* des protéines purifiées 170
6.12.4 Dosage de la concentration intracellulaire en diGMPc par UPLC 171
6.12.4.1 Extraction du diGMPc 171
6.12.4.2 Dosage du diGMPc par chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse 171

7 Références 173

8 Annexes 209

8.1 Revue 209

8.2 Article n°2 214

Liste des figures

Figure 1 : Nombre de cas et ratio du nombre de cas/millions d'habitants de légionellose déclarés dans 29 pays de l'Union Européenne entre 1995 et 2011. (Amato-Gauci *et al.*, 2013)

Figure 2 : Gènes partagés et gènes souche-spécifiques de 7 génomes de *L. pneumophila* (Gomez-Valero *et al.,* 2013).

Figure 3 : Représentation schématique du cycle infectieux intracellulaire de *L. pneumophila*. (Allombert *et al.*, 2013)

Figure 4 : Structure du système de sécrétion de type IV Dot/Icm de *L. pneumophila* (van Schaik *et al.*, 2013)

Figure 5 : Alignement de séquences protéiques de 14 effecteurs connus de *L. pneumophila* ((Kubori *et al.*, 2008), supplemental data).

Figure 6 : Pili de type IV de *L. pneumophila* observés par microscopie électronique (Stone *et al.*, 1998)

Figure 7 : Phagocytose de *L. pneumophila* et *Streptococcus pneumoniae* par un monocyte humain. (Horwitz, 1984)

Figure 8 : Formation de macropinosomes par *L. pneumophila* (Watarai *et al.,* 2001)

Figure 9 : Effet de l'inhibition de la PI3K par traitement avec du LY294002 sur l'entrée de *L. pneumophila* et d'*E. coli* chez *Dictyostelium discoideum* (d'après (Peracino *et al.*, 2010))

Figure 10 : Remodelage des lipides de la LCV par les effecteurs de *L. pneumophila*.

Figure 11 : Machinerie de prénylation des organismes eucaryotes (d'après (Hannoush *et al.*, 2010))

Figure 12 : Contrôle temporel de la protéine SidH dans le cytoplasme de l'hôte par le métaeffecteur LubX (d'après (Kubori *et al.*, 2010))

Figure 13 : Cycle d'activation et d'inactivation des petites GTPases

Figure 14 : Détournement des petites GTPases RAB1 et ARF1 de l'hôte par *L. pneumophila*

Figure 15 : Perturbation des différentes étapes de la maturation du phagosome par les effecteurs de *L. pneumophila*.

Figure 16 : Cycle de vie biphasique de *L. pneumophila*, entre phase de réplication et phase de transmission (d'après (Allombert *et al.*, 2013)).

Figure 17 : Modèle de la hiérarchie de la régulation transcriptionnelle des gènes de biosynthèse du flagelle chez *L. pneumophila* (d'après (Brüggemann *et al.*, 2006)).

Figure 18 : Modèle du réseau de régulation mis en place pendant la transition de phase.

Figure 19 : Modèle du système de quorum sensing de *L. pneumophila*

Figure 20 : Types de mort cellulaire (d'après (Fink *et al.*, 2005)).

Figure 21 : Modèle de sortie par lyse de la cellule-hôte par *L. pneumophila*. (d'après (Molmeret *et al.*, 2002a, Molmeret *et al.*, 2002c, Molmeret *et al.*, 2010)).

Figure 22 : Localisation cellulaire de l'adhésine Lcl de *L. pneumophila* (d'après (Mallegol *et al.*, 2012)).

Figure 23 : Le système Lqs contrôle la formation de filaments extracellulaires (d'après (Tiaden *et al.*, 2010)).

Figure 24 : Modèle de fonctionnement du système Hnox1-Lpg1057 de *L. pneumophila* (d'après (Carlson *et al.*, 2010)).

Figure 25 : Modèle de fonctionnement du système Lap de *Pseudomonas fluorescens.*

Figure 26 : Structure de biofilms de *L. pneumophila* formés à 25°C et 37°C. (Piao *et al.*, 2006).

Figure 27 : Différentes voies de signalisation utilisant les messagers secondaires nucléotidiques chez les organismes procaryotes (γ-protéobactéries).

Figure 28 : Voie de signalisation utilisant le messager secondaire GMP-AMPc chez les organismes eucaryotes.

Figure 29 : Nombre de publications concernant le diGMPc en fonction des années.

Figure 30 : Synthèse et dégradation du diGMPc par les diguanylate cyclases et les phosphodiestérases**.**

Figure 31 : Distribution du domaine GGDEF parmi les espèces. (d'après (Finn *et al.*, 2014))

Figure 32 : Distribution du domaine EAL parmi les espèces (d'après (Finn *et al.*, 2014))

Figure 33 : Conservation de la séquence du domaine GGDEF.

Figure 34 : Structure de PleD de *Caulobacter crescentus* déduite par analyse cristallographique (Chan *et al.*, 2004)

Figure 35 : Structure de la DGC PleD de *C. crescentus* en présence d'un dimère de diGMPc fixé sur le site I (Christen *et al.*, 2006)

Figure 36 : Conservation de la séquence du domaine EAL.

Figure 37 : Structure de la PDE à domaine EAL TDB1265 de *Thiobacillus denitrificans* (Tchigvintsev *et al.,* 2010)

Figure 38 : Conservation de la séquence du domaine HD-GYP (d'après (Römling *et al.*, 2013)).

Figure 39 : Comparaison des structures des PDE à domaine HD-GYP PmGH de *Persephonella marina* (Bellini et *al.,* 2014) et Bd1817 de *Bdellovibrio bacteriovorus* (Lovering *et al.*, 2011).

Figure 40 : Modèle du mécanisme d'inhibition de DgcZ d'*E. coli* par le zinc (Zähringer *et al.*, 2013)

Figure 41 : Modèle de contrôle de la double activité de Lpl0329 par l'histidine kinase Lpl0330 chez *L. pneumophila* (Levet-Paulo *et al.*, 2011)

Figure 42 : Modèle de mécanisme d'activation des fonctions DGC de la protéine PDE BphG1 de *Rhodobacter sphaeroides* (Tarutina *et al.*, 2006)

Figure 43 : Modèle de mécanisme de régulation de CC3396 de *Caulobacter crescentus* par le GTP (Christen *et al.*, 2005)

Figure 44 : Conservation de la séquence du domaine PilZ.

Figure 45 : Structure de la protéine PA4608 de *Pseudomonas aeruginosa* en complexe ou non avec le diGMPc (Habazettl *et al.*, 2011)

Figure 46 : Distribution du domaine PilZ parmi les espèces. (d'après (Finn *et al.*, 2014))

Figure 47 : Modèle de fonctionnement de la CRP d'*E. coli* et de la CLP de *X. campestris* (d'après (Chou, 2011))

Figure 48 : Comparaison des structures d'une DGC active, PleD, et d'une DGC inactive, PopA, chez *Caulobacter crescentus* (d'après (Duerig *et al.*, 2009))

Figure 49 : Comparaison des structures de PelD de *P. aeruginosa* liée ou non au diGMPc (d'après (Whitney *et al.*, 2012))

Figure 50 : Modèle structural de FimX de *P. aeruginosa* (d'après (Qi *et al.*, 2011)).

Figure 51 : Modèle de régulation de l'expression des gènes *pel* par l'effecteur du diGMPc FleQ chez *P. aeruginosa* (d'après (Baraquet *et al.*, 2012)).

Figure 52 : Structure de FlrA de *Vibrio cholerae* (d'après (Srivastava *et al.*, 2013)).

Figure 53 : Structures des riboswitchs de classe I et II (d'après (Smith *et al.*, 2009, Smith *et al.*, 2011)).

Figure 54 : Structure des pseudoknots (Serganov *et al.*, 2013)

Figure 55 : Modèle du mécanisme de contrôle de l'activité ribozyme par le diGMPc du riboswitch de classe II porté par l'ARNm de *CD3246* de *Clostridium difficile* (d'après (Lee *et al.*, 2010)).

Figure 56 : Modèle d'interconnexion entre le QS de *V. cholerae* et la signalisation à diGMPc (d'après (Srivastava *et al.*, 2012)).

Figure 57 : Modèle d'interconnexion entre les deux systèmes de QS de *B. cenocepacia* via la signalisation à diGMPc (d'après (Deng *et al.*, 2013)).

Figure 58 : Cycle de vie de *Caulobacter crescentus* (d'après (Curtis *et al.*, 2010)).

Figure 59 : Contrôle de la différenciation cellulaire et de la progression du cycle cellulaire de *Caulobacter crescentus* par les voies de signalisation à diGMPc (d'après (Römling *et al.*, 2013)).

Figure 60 : Cycle de vie de *Bdellovibrio bacteriovorus* (d'après (Sockett *et al.*, 2004)).

Figure 61 : Rôles des voies de signalisation à diGMPc dans le contrôle de la croissance axénique et de la prédation de *Bdellovibrio bacteriovorus* (d'après (Hobley *et al.*, 2012)).

Figure 62 : La protéine All2874 est nécessaire au développement d'hétérocystes par *Anabaena sp.* en condition de carence en azote (d'après (Neunuebel *et al.*, 2008)).

Figure 63 : Différenciation morphologique complexe de *Stretomyces coelicolor* (d'après (Flärdh *et al.*, 2009)).

Figure 64 : Réseau de contrôle de l'expression des gènes flagellaires et de la matrice extracellulaire impliquant le diGMPc chez *Vibrio cholerae*.

Figure 65: Structure du corps basal du flagelle (d'après (Minamino *et al.*, 2008)).

Figure 66 : Modèle du contrôle du sens de rotation du flagelle par YcgR chez *E. coli* et *S. Typhimurium* (d'après (Paul *et al.*, 2010)).

Figure 67 : Modèle du contrôle de la vitesse de rotation du flagelle par YcgR chez *E. coli* (d'après (Boehm *et al.*, 2010)).

Figure 68 : Modèle de contrôle de la mobilité par swarming par le diGMPc chez *Pseudomonas aeruginosa* (d'après (Kuchma *et al.*, 2007, Merritt *et al.*, 2007, Kuchma *et al.*, 2010, Kuchma *et al.*, 2012)).

Figure 69 : Modèle de contrôle de la mobilité par twitching par le diGMPc chez *Xanthomonas campestris* (d'après (Ryan, 2013)).

Figure 70 : Structure et activation de Cph2 de *Synechocystis sp.*

Figure 71 : Modèle de contrôle de la mobilité liée à l'aérotaxie par Tlp1 chez *Azospirillum brasilense* (d'après (Russell *et al.*, 2013)).

Figure 72 : Les étapes de la formation de biofilms par les bactéries.

Figure 73 : Le contrôle de la synthèse de PNAG et de cellulose par les voies à diGMPc chez *E. coli*

Figure 74 : Contrôle de la production de fimbriae de type III par le diGMPc chez *K. pneumoniae*.

Figure 75 : Structure et rôle de la protéine CdrA de *P. aeruginosa* dans l'architecture des biofilms (d'après (Borlee *et al.*, 2010)).

Figure 76 : La PDE DipA est essentielle à la dispersion du biofilm de *P. aeruginosa* (d'après (Roy *et al.*, 2012)).

Figure 77 : Structure des différents systèmes de sécrétion des bactéries Gram négatives (d'après (Tseng *et al.*, 2009)).

Figure 78 : Modèle de régulation par les voies de signalisation à diGMPc de l'expression de la toxine cholérique et de son système de sécrétion, le SST2 Eps, chez *V. cholerae*.

Figure 79 : Modèle de régulation de la transition entre les modes de vie planctonique et sessile de *P. aeruginosa* (d'après (Moscoso *et al.*, 2011)).

Figure 80 : Conséquence de l'absence de la DGC PGN_1932 sur la production des longs fimbriae chez *Porphyromonas gingivalis* (Chaudhuri *et al.*, 2014)

Figure 81 : Structure de la morula formée par *Ehrlichia chaffeensis* en présence ou non du compétiteur du diGMPc CDGA (d'après (Kumagai *et al.*, 2011)).

Figure 82 : Implication de la PDE Rv1357c dans la virulence de *Mycobacterium tuberculosis* (d'après (Hong *et al.*, 2013)).

Figure 83 : Implication de la PDE YjcC dans la résistance aux ROS de *Klebsiella pneumoniae* (d'après (Huang *et al.*, 2013)).

Figure 84 : Différences d'affinités vis-à-vis du diGMPc des protéines à domaine PilZ YcgR et BcsA de *S. Typhimurium* (d'après (Pultz *et al.*, 2012)).

Figure 85 : Indépendance de l'activité de VpsT de *V. cholerae* vis-à-vis d'une DGC spécifique (d'après (Shikuma *et al.*, 2012)).

Figure 86 : Modèle de fonctionnement du complexe ribonucléoprotéique contenant DosC et DosP chez *E. coli* (d'après (Tuckerman *et al.*, 2011)).

Figure 87 : La complémentation des phénotypes d'une souche de *C. crescentus* sans diGMPc par une DGC d'*E. coli* nécessite des concentrations intracellulaires en diGMPc supérieures à celle de la souche sauvage (d'après (Abel *et al.*, 2013)).

Figure 88 : Corrélation entre le niveau d'expression de DGC spécifiques et la formation de biofilms ou l'expression du gène *aphA* induite par le diGMPc (Massie *et al.*, 2012)

Figure 89 : Principe du test de sécrétion classique des effecteurs de *L. pneumophila* via le DDT4 Dot/Icm .

Figure 90 : L'ajout de CCCP au cours de l'infection permet de suivre la cinétique de sécrétion de la protéine fusion β-lactamase-LepA

Figure 91 : Les profils de cinétique de séccrétion varient en fonction des différentes protéines fusions

Figure 92 : La sécrétion des protéines fusions peut être précoce ou tardive en fonction des effecteurs concernés.

Figure 93 : Les effecteurs agissant séquentiellement sur la biogénèse de la LCV sont sécrétées successivement.

Figure 94 : Les souches Δ*lpl0780*, Δ*lpl0922* et Δ*lpl1118* sont affectées dans l'orchestration de la sécrétion de la fusion β-lactamase-LepA.

Figure 95 : La souche Δ*lpl1118* est altérée dans la sécrétion de la fusion β-lactamase-LegK2.

Figure 96 : La souche Δ*lpl0780* est altérée dans la sécrétion de la fusion β-lactamase-LegK4.

Figure 97 : A l'exception de la souche Δ*lpl0219,* les souches portant des délétions de gènes codant les protéines à domaines GGDEF et/ou EAL ne présentent pas de défaut de multiplication planctonique.

Figure 98 : La population bactérienne des biofilms, quantifiée par qPCR et vPCR, est affectée pour 10 souches inactivées.

Figure 99 : Seuls les phénotypes de 5 souches inactivées sur les 10 sélectionnées sont complémentées par l'apport du gène sauvage correspondant sur un plasmide.

Figure 100 : Les délétions Δ*lpl0075*, Δ*lpl1559* et Δ*lpl1054* ont un impact négatif spécifique sur l'architecture des biofilms de *L. pneumophila.*

Figure 101 : Les délétions Δ*lpl0329* et Δ*lpl1176* affectent postivement et spécifiquement l'architecture des biofilms de *L. pneumophila*.

Figure 102 : Lpl1559 est une phosphodiestérase

Figure 103 : Relation entre la concentration en diGMPc et l'aire sous le pic des chromatogrammes obtenus par LC-MS

Figure 104 : La concentration intracellulaire en diGMPc mesurée par LC-MS n'est pas corrélée aux capacités de formation de biofilms des souches inactivées.

Figure 105 : Gamme étalon de l'absorbance à 490nm en fonction de la concentration en nitrites dans les milieux SBB et AYE

Figure 106 : Dosage de la concentration en nitrites dans les milieux SBB et AYE après ajout quotidien de SNP.

Figure 107 : Cinétique de cytotoxicité du NO sur la souche *L. pneumophila* Lens

Figure 108 : Lpl1054 est requise pour le contrôle de la formation de biofilms denses en réponse à la présence de NO.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Répartition par sérogroupe des isolats cliniques de *L. pneumophila* en Europe en 2011. . (d'après(Amato-Gauci *et al.*, 2013)).

Tableau 2 : Répartition par espèce des isolats cliniques de *Legionella* en Europe en 2011. (d'après(Amato-Gauci *et al.*, 2013)).

Tableau 3 : Principales caractéristiques des génomes séquencés des souches épidémiques et endémiques de *L. pneumophila* Sg1. (d'après (Gomez-Valero *et al.*, 2011, Gomez-Valero *et al.*, 2013))

Tableau 4 : Répertoire des protéines de signalisation intracellulaire dont les protéines GGDEF/EAL chez différentes bactéries.

Tableau 5 : Effecteurs du SST4 Dot/Icm dont la dépendance aux complexes chaperons IcmS/IcmW ou IcmS/LvgA a été testé expérimentalement.

Tableau 6 : Les protéines GGDEF/EAL et leur niveau d'expression entre les phases de réplication/ transmission et les phases exponentielle/stationnaire de croissance des souches de *L. pneumophila* Paris et Lens. ((Brüggemann *et al.*, 2006) tableau S7, S8 et S9).

Tableau 7 : Occurrence des signaux de localisation spatiale et des domaines associés aux domaines GGDEF et/ou EAL (d'après(Seshasayee *et al.*, 2010))

Tableau 8 : Les 5 protéines identifiées sont associées à des structures diverses.

Liste des abréviations

ABC : ATP-binding cassette transporter
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADP : Adénosine di-phosphate
Ag^{2+} : Cation divalent Argent
AI-2 : Autoinducer 2
AIF : Apoptosis-inducing factor
AMP : Adénosine mono-phosphate
AMPc : AMP cyclique
ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : ARN messager
ARNnc : ARN non codant
ATP : Adénosine tri-phosphate
AYE : ACES Yeast Extract
BCYE : Buffered charcoal yeast extract medium
BDSF : *Burkholderia* diffusible signaling factor
BLUF : Blue-light using FAD
C8HSL : N-octanoyl-homosérine lactone
Ca^{2+} : cation divalent calcium
CAI-1 : Cholera Autoinducer 1
CCCP : Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone
CCW : counterclockwise, sens inverse des aiguilles d'une montre
CDD : Conserved domain database
CDGA : 2-*O*-di(*tert*-butyldimethysilyl)-diGMPc
CFP : Cyan fluorescent protein
CLP : CRP-like protein
CRP : cAMP receptor protein
Cup : Chaperon-usher pathway
CO : monoxyde de carbone
Co^{2+} : Cation divalent Cobalt
ConA-TAMRA : Concanavaline A conjuguée à un ester de rhodamine
CryoMEB : Microscopie Electronique à Balayage avec préparation des échantillons par congélation
Cu^{2+} : Cation divalent Cuivre
Cup : Chaperon-usher pathway
CW : clockwise, sens des aiguilles d'une montre
CZB : Chemoreceptor zinc binding
DAG : Diacylglycérol
DGC : Diguanylate cyclase
diAMPc : Diadénylate cyclique
diGMPc : Diguanylate cyclique
Dot : Defect in Organelle Trafficking
DMSO : Dimethyl sulfoxide
DO : densité optique
DSF : Diffusible signaling factor
EAL : Glutamate-Alanine-Leucine
EEA1 : Early endosome antigen 1
EMA : Ethidium monoazide

EPS : Exopolysaccharide
FAD : flavin adenine dinucleotide
Fe^{2+} : Cation divalent Fer
Fe^{3+} : Cation trivalent Fer
FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer
GAF : cGMP-specific phosphodiesterases, adenylyl cyclases and FhlA
GAP : GTPase-activating protein
GDI : Guanine nucleotide dissociation inhibitor
GDF : GDI-dissocation factor
GDP : Guanosine di-phosphate
GEF : Guanine nucleotide exchange factor
GEMM : Genes for Environment, Membranes and Motility
GFP : Green fluoresence protein
GGDEF : Glycine-Glycine-Aspartate-Glutamate-Phenylalanine
GMP : Guanosine mono-phosphate
GMPc : GMP cyclique
GpG : guanylyl-guanosine
GST : Glutathione-S-transférase
GTP : Guanosine tri-phosphate
h : heure
HAMP : Histidine kinases, adenylate cyclases, methyl accepting proteins and phosphatases
HD : Histidine-Aspartate
HD-GYP : Histidine-Aspartate –Glycine-Tyrosine-Proline
HDOD : Histidine-Aspartate-Pyrrolysine-Aspartate
His_6 : 6 histidines
HK : Histidine kinase
HNOB : Heme NO binding
HRP : Horseradish peroxydase
HSL : Homosérine lactone
HTH : Hélice-tour-hélice
Icm : Intracellular multiplication
IHF : Integration host factor
IgG : Immuniglobuline G
IL : Interleukine
IMAP-1 : Inositol-monophosphatase 1
IRF3 : Interferon regulatory transcription factor
ISRE : Interferon-sensitive response element
kb : Kilo paires de bases
K_d : Constante de dissociation
LAI-1 : *Legionella* autoinducer 1
LAMP : Lysosomal-associated membrane protein
LC-MS : Liquid chromatography mass spectrometry
LCV : *Legionella*-containing vacuole
LGM : *Legionella* growth medium
Mb : Mega paires de bases
MCP : methyl-accepting chemotaxis protein
mg : milligramme
Mg^{2+} : Cation divalent Magnésium
min : minute
mM : millimolaire

Mn^{2+} : Cation divalent Manganèse
MOI : Multiplicity of infection
MRP : Multi repeat protein
NaCl : Chlorure de sodium
NCBI : National center for biotechnology information
NF-κB : Nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells
Ni^{2+} : Cation divalent Nickel
NLR : Nod-like Receptor
nm : nanomètre
nM : Nanomolaire
NO : oxyde nitrique
NO_2^- : Ion nitrite
ORF : Open reading frame
PAC : PAS C-terminal motif
PAMP : Pathogen-associated molecular pattern
PAS : Per -Arnt-Sim
pb : Paire de bases
PCR : Polymerase chain reaction
PDE : Phosphodiestérase
pGpG : Phosphoguanylyl-guanosine
pH : Potentiel hydrogène
PHY : Phytochrome
pi : Post-infection
PI : Phosphoinositide
PI3K : Phosphoinositides-3- kinase
PI3P : Phosphatidylinositol-3-phosphate
$PI3,4,5P_3$: Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PI4P : Phosphatidylinositol-4-phosphate
$PI4,5P_2$: Phophatidylinositol-4,5-bisphosphate
PKC : Protéine kinase C
PKD : Protéine kinase D
PNAG : poly-*N*-acetylglucosamine
PNPase : polynucleotide phosphorylase
pM : Picomolaire
(p)ppGpp : Guanosine penta- ou tetra-phosphate
PQ : Paraquat
PSM : Poste de Sécurité Microbiologique
qPCR : PCR quantitative
QS : Quorum sensing
RANBP1 : RAN binding protein 1
RBS : ribosome binding site
RE : Réticulum endoplasmique
REC : phosphoreceveur
RF : Facteur de rétention
Rib : Release intracellular bacteria
RILP : Rab-interacting lysosomal protein
RNase : Ribonucléase
RNAseq : Séquençage des ARN
ROS : Reactive oxygen species
RR : Régulateur de réponse

RSCV : Rugose small colony variant
RT-qPCR : Reversion transcriptioin quantitative polymerase chain reaction
s : seconde
SBB : Supplemented biofilm broth
Sg : Sérogroupe
Site A : Site actif
Site I : Site inhibiteur
SNARE : Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein REceptor
SNP : Nitroprussiate de sodium
SST1 : Système de sécrétion de type I
SST2 : Système de sécrétion de type II
SST3 : Système de sécrétion de type III
SST4 : Système de sécrétion de type IV
SST4A : Système de sécrétion de type IVA
SST4B : Système de sécrétion de type IVB
SST5 : système de sécrétion de type V
SST6 : Système de sécrétion de type VI
STING : Stimulator of interferon genes
T4CP : Type IV coupling proteins
TCP : Toxin-coregulated pilus
TNF : Tumor necrosis factor
UDP : Uridine diphosphate
UFC : Unité formant colonie
UG : Unité génomique
UPEC : uropathogénic *E. coli*
UPLC : Ultra performance liquid chromatography
v-ATPases : ATPases vacuolaires
VDAC : Voltage-Dependent Anion Channel
vPCR : qPCR sur des bactéries viables
vps : *Vibrio* polysaccharides
YFP : Yellow fluorescent protein
Zn^{2+} : Cation divalent Zinc
µm : micromètre
µM : Micromolaire

1 Introduction

Les bactéries doivent sans cesse réagir aux changements qui surviennent dans leur environnement. Pour cela, elles utilisent des voies de transduction du signal qui leur permettent de moduler rapidement des fonctions biologiques importantes telles que le métabolisme, la mobilité, leur mode de vie, planctonique ou sessile, ou encore la virulence pour les bactéries pathogènes.

Au sein de ces voies de signalisation, les signaux peuvent être transduits par une grande variété de systèmes : le quorum sensing, qui fonctionne par synthèse de petites molécules diffusibles, les autoinducteurs, permettant la détection de la densité de la population bactérienne, les systèmes à deux composants, qui transduisent les signaux par transfert de groupement phosphate, le chimiotactisme ou encore les systèmes qui utilisent des petites molécules appelées messagers secondaires. Parmi ces molécules, on compte le diguanylate cyclique, ou diGMPc, un messager secondaire fortement impliqué dans les mécanismes de transition entre les modes de vie mobile et sessile et dont l'importance, longtemps ignorée, a réellement émergé ces 10 dernères années.

Les voies de signalisation qui utilisent le diGMPc sont particulièrement complexes car elles impliquent de multiples acteurs au sein d'une même cellule : de nombreuses protéines de synthèse et/ou de dégradation de ce messager secondaire et diverses protéines ou acides nucléiques capables de le fixer. De plus, ces voies de signalisation peuvent agir au niveau de la transcription ou de la traduction de gènes cibles, directement sur les activités de certaines enzymes ou encore sur la modulation d'interactions protéiques. Elles sont interconnectées avec d'autres voies de signalisation comme le quorum sensing ou les voies utilisant d'autres messagers secondaires comme l'AMP cyclique ou le GMP cyclique. Enfin, ces voies à diGMPc sont plus particulièrement impliquées dans les changements du mode de vie bactérien, ce qui implique qu'elles influent sur différentes fonctions cellulaires au même moment, comme la mobilité bactérienne et la production des exopolysaccharides des biofilms, l'expression de facteurs de virulence ou le contrôle de la différenciation cellulaire.

Legionella pneumophila est une bactérie aquatique capable d'infecter diverses amibes, dont *Acanthamoeba castellanii*, qui se nourrissent habituellement de bactéries. Une fois internalisée, elle est capable de détourner la machinerie cellulaire de ces amibes permettant ainsi la création d'une vacuole spécifique dans laquelle elle se multiplie exponentiellement. L'Homme, chez qui l'inhalation de goutelettes d'eau contaminée par cette bactérie peut provoquer une pneumonie sévère appelée légionellose, constitue un hôte accidentel du fait de la conservation entre les cellules mammifères et amibiennes des mécanismes cellulaires que *L. pneumophila* utilise à son avantage.

Que ce soit dans son environnement aquatique, ou à l'intérieur de ses cellules hôtes, *L. pneumophila* doit faire face et s'adapter à des conditions très variables. Cependant, cette bactérie possède un répertoire relativement faible de protéines impliquées dans la signalisation intracellulaire en comparaison à d'autres espèces bactériennes. Une famille de protéines de signalisation est toutefois particulièrement préservée : les protéines de synthèse et de dégradation du diGMPc, suggérant que ces voies de signalisation assument des rôles importants dans l'acclimatation de la bactérie à son environnement aquatique ou à sa cellule-hôte.

Dans le chapitre bibliographique de ce manuscrit, une première partie décrit notre modèle d'étude, *L. pneumophila*. Elle présente plus particulièrement les étapes de son cycle infectieux et sa survie dans l'environnement, notamment sous la forme de biofilms. Puis, une seconde partie est consacrée au diGMPc. Elle détaille le métabolisme de ce messager secondaire, l'organisation, le fonctionnement, et la complexité des voies de signalisation dans lesquelles il est impliqué, ainsi que les processus cellulaires qu'il contrôle.

Sérogroupe	Nombre de cas confirmés par culture	
	Nombre de cas	Pourcentage
1	507	88,2%
2	6	1,0%
3	12	2,1%
4	3	0,5%
5	3	0,5%
6	8	1,4%
7	3	0,5%
8	2	0,3%
9	1	0,2%
10	4	0,7%
12	1	0,2%
14	1	0,2%
Mélange	1	0,2%
Inconnu	23	4,0%
Total	575	100,0%

Tableau 1 : Répartition par sérogroupe des isolats cliniques de *L. pneumophila* en Europe en 2011. (d'après Amato-Gauci *et al.*, 2013).
Les cas comptabilisés ont été liés à la présence de *L. pneumophila* par des techniques de culture, d'immunofluorescence ou de typage moléculaire (SBT).

Espèce de Légionelles	Nombre de cas	Pourcentage
Legionella pneumophila	575	95,8%
Legionella longbeachae	2	0,3%
Legionella bozemanii	6	1,0%
Legionella micdadei	3	0,5%
Autres espèces	14	2,3%
Total	600	100,0%

Tableau 2 : Répartition par espèce des isolats cliniques de *Legionella* en Europe en 2011. (d'après Amato-Gauci *et al.*, 2013).
Chaque cas de légionellose comptabilisé pour cette étude a été confirmé par culture.

2 Contexte bibliographique

2.1 *Legionella pneumophila*

Legionella pneumophila est un bacille aérobie à coloration de Gram négative qui mesure 0,5 µm de largeur pour 2 µm de longueur (Winn, 1988). Cette bactérie est mobile avec un ou plusieurs flagelles en position polaire ou latérale (Ott *et al.*, 1991). Elle est ubiquitairement présente dans les biotopes aquatiques (Fliermans *et al.*, 1981). Elle prolifère dans les systèmes hydriques anthropisés lorsque les conditions sont optimales pour son développement, en particulier à une température comprise entre 25 et 45°C (Fields *et al.*, 2002).

Cette bactérie est capable de se multiplier à l'intérieur d'une vingtaine d'espèces d'amibes aquatiques tels qu'*Acanthamoeba castellanii* ou *Hartmanella vermiformis,* de 2 espèces de protozoaires ciliés et d'un myxomycète (Lau *et al.*, 2009). Les mécanismes qu'elle a développé pour échapper à la digestion par ces cellules bactériophages lui permettent également d'infecter d'autres hôtes accidentels comme les macrophages alvéolaires et les pneumocytes humains (Rowbotham, 1980, Harb *et al.*, 2000). La colonisation et la multiplication à l'intérieur de ces cellules pulmonaires provoque une pneumonie sévère appelée légionellose ou maladie du Légionnaire.

2.1.1 L'agent de la légionellose

L. pneumophila a été découverte à la suite d'une épidémie de pneumonie atypique lors du 58ème congrès de la Légion Américaine qui a eu lieu à Philadelphie en juillet 1976, d'où le nom de Maladie du Légionnaire. Cette infection avait alors touché 182 des 4500 participants, causant le décès de 29 d'entre eux. Cependant ce n'est qu'en janvier 1977 que l'agent infectieux, *L. pneumophila*, a été isolé (McDade *et al.*, 1977). Puis, des analyses phénotypiques et génotypiques ont conduit à la création du genre *Legionella* (Brenner *et al.*, 1979, Fumarola, 1979). Aujourd'hui, ce genre regroupe 62 espèces et sous-espèces (DSMZDatabase) et 70 sérogroupes (Sg), dont 16 sont associés à *L. pneumophila*. On estime qu'en Europe 90% des légionelloses sont liées à *L. pneumophila* et qu'en moyenne 85% sont exclusivement dues au Sg1 de cette espèce (Tableaux 1 et 2) (Fields *et al.*, 2002, Helbig *et al.*, 2002, Yu *et al.*, 2002, Beauté *et al.*, 2013). En Europe, les autres espèces du genre *Legionella* les plus souvent isolées chez les patients sont *L. bozemanii* (1%), *L. micdadei* (0,5%) et *L. longbeachae* (0,3%) suivies par *L. dumoffi*, *L. wadsworthii* et *L. anisa* (2,3% combinées) (Tableau 2) (Amato-Gauci *et al.*, 2013). Etonnamment, l'épidémiologie est différente en Australie et Nouvelle-Zélande : *L. longbeachae* (30.4%) et *L. pneumophila* (45.7%) sont toutes les deux prévalentes dans les cas de légionellose, contrairement au reste du monde où *L. pneumophila* Sg1 prévaut (Yu *et al.*, 2002, Gomez-Valero *et al.*, 2013).

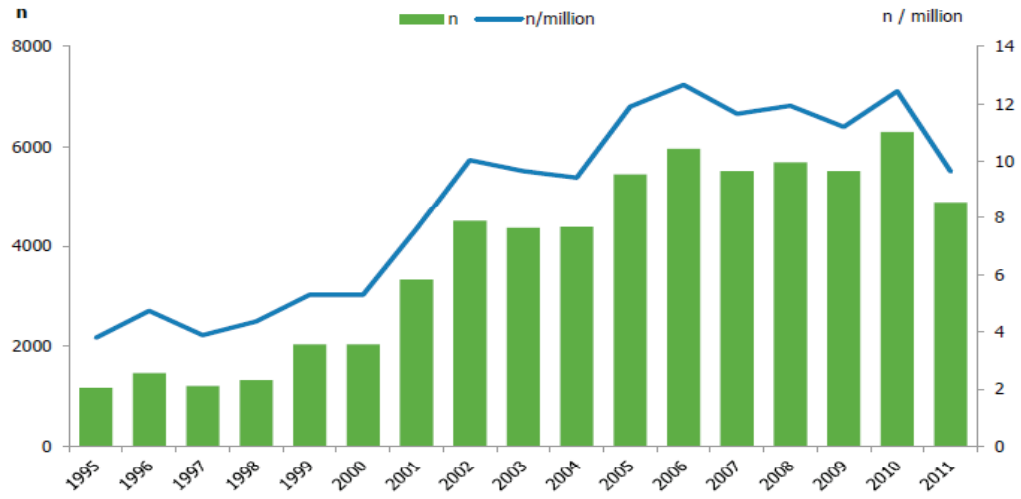


Figure 1 : Nombre de cas et ratio du nombre de cas/millions d'habitants de légionellose déclarés dans 29 pays de l'Union Européenne entre 1995 et 2011. (Amato-Gauci *et al.*, 2013).

Le développement de cette infection dans les poumons est rendue possible par l'inhalation de gouttelettes d'eau contaminée aérosolisées par des installations telles que les tours aéro-réfrigérantes, les bains à remous, les climatisations, etc. Actuellement, aucun cas de transmission interhumaine n'a été mis en évidence et l'acquisition depuis l'environnement est considérée comme le principal mode de contamination. La période d'incubation s'étend de 2 à 10 jours, avant l'apparition des premiers symptômes.

La légionellose affecte essentiellement les adultes et majoritairement des personnes présentant certains facteurs de risques tels que l'âge avancé, les maladies respiratoires chroniques, les diabètes, les maladies immuno-dépressives, les traitements immuno-suppresseurs ou encore le tabagisme (Den Boer *et al.*, 2006, Campese *et al.*, 2011). Cette infection se traduit tout d'abord par un état grippal fébrile. Cet état fiévreux peut s'améliorer spontanément sans atteinte pulmonaire, on parle alors d'une fièvre de Pontiac. Cependant, cet état peut s'aggraver en légionellose et laisser place à une pneumopathie sévère nécessitant une hospitalisation. Dans la majorité des cas, un traitement antibiotique (macrolides ou fluoroquinolones) permet une évolution favorable, d'autant plus lorsqu'il est rapidement mis en place. Toutefois, les conséquences de cette maladie du Légionnaire peuvent être sévères : 9% des personnes atteintes en Europe en 2009 sont décédées des suites de cette infection malgré une prise en charge thérapeutique adaptée (Amato-Gauci *et al.*, 2013). Cette infection cause environ 6000 cas par an en Europe (Figure 1). La déclaration obligatoire de cette maladie en France permet de comptabiliser environ 1300 cas par an (1206 cas en 2009, 1540 cas en 2010 et 1170 cas en 2011) (Beauté *et al.*, 2013, Amato-Gauci *et al.*, 2013). En France, l'épidémie de légionellose la plus importante a eu lieu entre 2003 et 2004 dans la région de Lens, causant 86 cas dont 17 décès (Cazalet *et al.*, 2004). Malgré des mesures de prévention efficaces pour l'entretien des systèmes d'eau, ce taux reste constant depuis 2005 en Europe (Figure 1) et en France (Campese *et al.*, 2011). La légionellose reste donc un véritable problème de santé publique.

2.1.2 Le génome de *L. pneumophila*

A ce jour, la communauté scientifique dispose de 11 génomes de *L. pneumophila* entièrement séquencés (Philadelphia (Sg1) (Chien *et al.*, 2004), Paris (Sg1) (Cazalet *et al.*, 2004), Corby (Sg1) (Glöckner *et al.*, 2008), Alcoy2300/99 (Sg1) (D'Auria *et al.*, 2010), Lens (Sg1) (Cazalet *et al.*, 2004), Lorraine (Sg1) (Gomez-Valero *et al.*, 2011), HL06041035 (Sg1) (Gomez-Valero *et al.*, 2011), 130b (Sg1) (Schroeder *et al.*, 2010), ATCC43290 (Sg12) (Amaro *et al.*, 2012), LPE509 (Ma *et al.*, 2013) et Thunder Bay (Sg6) (Khan *et al.*, 2013)). Alors que quatre de ces souches sont épidémiques (Philadelphia, Alcoy, Corby et Lens), la souche Paris est la seule souche endémique connue en France et en Europe (Aurell *et al.*, 2005).

	Paris	Lens	Philadelphia	Corby	Alcoy	130b	Lorraine	HL06041035
Taille du chromosome (Mb)	3.5	3.3	3.4	3.6	3.5	3.5	3.5	3.5
Proportion en G et C (%)	38	38	38	38	38	38	38	38
Nombre de gènes	3123	2980	3031	3237	3197	3288	3117	3132
Nombre de gènes codant des protéines	3078	2921	2999	3193	3097	3141	3080	3079
Densité en séquence codante (%)	88	88	90	87	86	88	87	87
Plasmide	1	1	0	0	0	0	1	0

Tableau 3 : Principales caractéristiques des génomes séquencés des souches épidémiques et endémiques de *L. pneumophila* Sg1. (d'après Gomez-Valero *et al.*, 2011; Gomez-Valero *et al.*, 2013)

Les génomes de ces souches sont accessibles sur le serveur du NCBI (NCBIDatabase, National Center for Biotechnology Information).

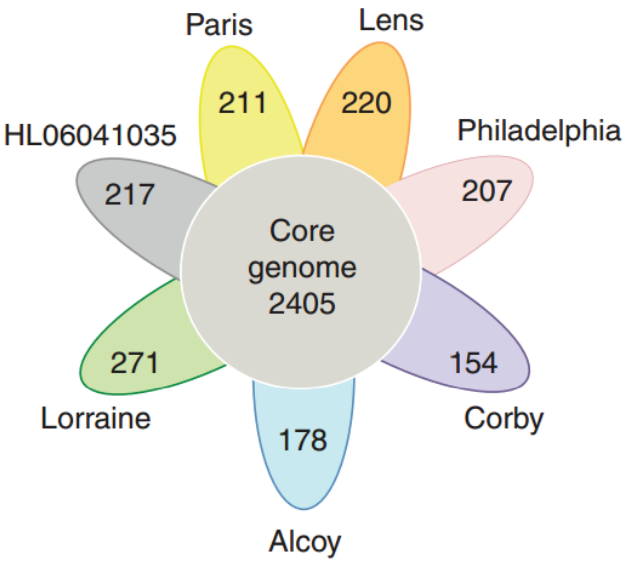


Figure 2 : **Gènes partagés et gènes souche-spécifiques de 7 génomes de *L. pneumophila* (Gomez-Valero *et al.*, 2013).**

Chaque pétale de couleur représente le génome d'une des souches de *L. pneumophila*. Le nombre au centre du diagramme représente l'ensemble des gènes orthologues partagé par tous les génomes. Le nombre à l'intérieur de chaque pétale individuel correspond au nombre de gènes spécifiques n'ayant aucun othologues dans les autres génomes. Les groupes d'orthologue ont été définis en utilisant le programme PanOCT (Fouts *et al.*, 2012) avec un pourcentage d'identité de 35% sur une longueur de 75pb.

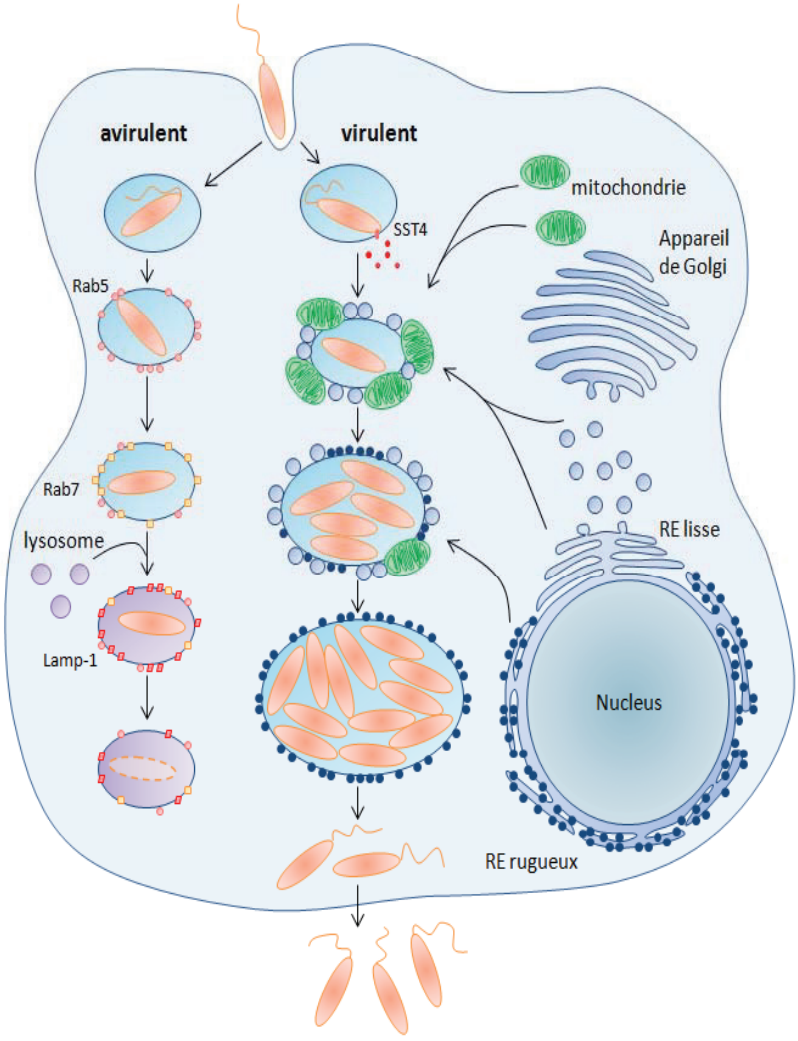
L'analyse et la comparaison de ces génomes mettent en évidence une grande diversité et plasticité des génomes de *L. pneumophila* (Tableau 3) (NCBIDatabase, Cazalet *et al.*, 2008, Gomez-Valero *et al.*, 2013). Le chromosome circulaire de *L. pneumophila* mesure en moyenne 3,5 Mb avec une proportion en GC d'environ 38%. On estime à 86% la part des séquences codantes (environ 3000 gènes), parmi lesquelles environ 40% paraissent spécifiques de l'espèce ou du genre *Legionella* (Steinert *et al.*, 2007). Les souches Paris, Lorraine et Lens possèdent un plasmide naturel de 130 kb, 150 kb et 60 kb respectivement. De plus, les souches de *L. pneumophila* contiennent des régions chromosomiques qui peuvent être excisées et maintenues sous forme plasmidique (Cazalet *et al.*, 2004, Chien *et al.*, 2004, Doléans-Jordheim *et al.*, 2006, Glöckner *et al.*, 2008, D'Auria *et al.*, 2010, Lautner *et al.*, 2013). Le « core genome » comprend 2405 gènes et chaque souche présente en moyenne 200 gènes spécifiques (Figure 2). Les génomes de ces souches contiennent au moins trois grandes régions favorisant la plasticité par échanges horizontaux : la région portant le système de conjugaison/sécrétion de type IVA (SST4A) Lvh (Segal *et al.*, 1999a, Cazalet *et al.*, 2004, Chien *et al.*, 2004, Doléans-Jordheim *et al.*, 2006), l'îlot de pathogénicité LpPI-1 de 65 kb (Brassinga *et al.*, 2003) et une région de 100 kb contenant plusieurs gènes codant des transporteurs pour l'efflux de métaux lourds et d'autres substances toxiques (Chien *et al.*, 2004).

La plasticité du génome de *Legionella pneumophila* provient de l'acquisition d'éléments génétiques mobiles et de transferts horizontaux, entre les différentes souches de *L. pneumophila* mais aussi avec d'autres espèces de *Legionella*, et, de façon plus étonnante, avec leurs hôtes eucaryotes (Albert-Weissenberger *et al.*, 2007, Degtyar *et al.*, 2009, Franco *et al.*, 2009). En effet, l'une des particularités du génome de *L. pneumophila* réside dans le fait qu'il code pour environ 75 protéines dites « de type eucaryote » car elles possèdent des domaines retrouvés principalement dans les protéines des organismes eucaryotes (Cazalet *et al.*, 2004, de Felipe *et al.*, 2005). Ces protéines portent plus particulièrement des domaines impliqués dans les interactions inter-protéiques (domaines à répétition d'ankyrines, régions riches en leucine ou domaine superhélice « coil-coiled ») ou associées à des activités enzymatiques (Serine/Thréonine kinases, ubiquitine ligase, phospholipases, acétyltransférases,…) (Cazalet *et al.*, 2004, Chien *et al.*, 2004, Glöckner *et al.*, 2008). Cette particularité n'est pas restreinte à *L. pneumophila* et elle est observée chez de nombreuses bactéries capables de se développer à l'intérieur d'un hôte eucaryote (Schmitz-Esser *et al.*, 2010). Cependant, *L. pneumophila* est un cas remarquable puisqu'elle possède la plus grande variété de protéines de type eucaryote en comparaison à d'autres bactéries pathogènes intracellulaires comme *Rickettsia* ou *Wolbachia* (Ogata *et al.*, 2006, Walker *et al.*, 2007, Gomez-Valero *et al.*, 2013). On estime que les gènes codant ces protéines représentent 3,5% du génome de *L. pneumophila* et que la moitié de ces gènes sont retrouvés dans les génomes des 6 souches de *L. pneumophila* Sg1

Espèces	Protéines GGDEF/EAL	Protéines liant l'ADN	Protéines liant les petites molécules	Régulateurs réponses	Proportion des protéines GGDEF/EAL
Pseudomonas aeruginosa	39	450	240	91	4.76%
Legionella pneumophila	**22**	**87**	**37**	**17**	**13.50%**
Escherichia coli	29	295	111	36	6.16%
Vibrio cholerae	51	204	131	63	11.36%
Vibrio parahaemolyticus	59	288	170	73	10.00%
Salmonella Typhimurium	21	287	114	40	4.55%
Listeria monocytogenes	7	204	45	16	2.57%
Coxiella burnetii	2	32	9	12	3.6%
Rickettsia bellii	2	21	0	5	7.1%
Wolbachia	1	15	2	3	4.7%

Tableau 4 : Répertoire des protéines de signalisation intracellulaire dont les protéines GGDEF/EAL chez différentes bactéries.
Les données ont été compilées à partir de la base de données MiST2.2 (Ulrich *et al.,* 2010). La souche de *Wolbachia* utilisée est l'endosymbiote de *Culex quiquefasciatus*, un moustique.

Figure 3 : Représentation schématique du cycle infectieux intracellulaire de *Legionella pneumophila*. (Allombert *et al.*, 2013)



Partie gauche : Devenir d'une bactérie avirulente. Le phagosome contenant la bactérie acquiert succes-sivement différents marqueurs (Rab5, Rab7) reflétant sa maturation. La fusion du phagosome mature avec les lysosomes conduit à la destruction de la bactérie.

Partie droite : Devenir de *L. pneumophila*. Dès l'entrée, la mise en place d'un système de sécrétion de type IV permet l'injection de protéines bactériennes directement dans l'hôte. Ces protéines permettent le détournement du trafic vésiculaire qui se traduit par un recrutement rapide de mitochondries, de vésicules dérivées du réticulum endoplasmique (RE) et de ribosomes sur le phagosome. Les bactéries se multiplient alors activement dans cette vacuole (LCV) puis sont libérées dans l'environnement.

séquencées (Gomez-Valero *et al.*, 2011). La présence de tels gènes soulignent la co-évolution de *L. pneumophila* avec ses hôtes eucaryotes environnementaux.

Le répertoire de protéines dédiées à la signalisation intracellulaire est relativement faible chez les légionelles. En effet, les différentes catégories de protéines de signalisation indiquées dans la Tableau 4 sont sous-représentées chez *L. pneumophila* (163 protéines) en comparaison à d'autres organismes bactériens, que ce soit d'autres γ-protéobactéries comme *Pseudomonas aeruginosa* (820 protéines) ou *Vibrio cholerae* (449 protéines) ou d'autres pathogènes intracellulaires facultatifs tels que *Listeria monocytogenes* (272 protéines) ou *Salmonella Typhimurium* (462 protéines) (Ulrich *et al.*, 2010). Seules les bactéries intracellulaires obligatoires, comme *Rickettsia bellii* (28 protéines) ou *Wolbachia* (21 protéines), sont encore moins pourvues en protéines de signalisation que *L. pneumophila*, probablement du fait de la réduction de leur génome due à leur mode de vie parasitaire obligatoire. Il est cependant à noter qu'une famille de protéines de signalisation est particulièrement maintenue chez *L pneumophila* en comparaison de toutes ces espèces bactériennes : les protéines à domaines GGDEF et/ou EAL, impliquées dans la signalisation via le di-GMP cyclique. Il semblerait donc que *L. pneumophila* ait favorisé ce type de signalisation au cours de son évolution, suggérant que celle-ci joue un rôle central dans le cycle de vie de cette bactérie.

2.1.3 Le cycle infectieux de *L. pneumophila*

Le cycle de vie de cette bactérie est biphasique, alternant entre une phase de réplication intracellulaire et une phase de transmission extracellulaire. Brièvement, le cycle infectieux de *L. pneumophila* débute par l'internalisation de la bactérie par la cellule-hôte via des mécanismes de phagocytose ou de macropinocytose (Figure 3). Puis, grâce à un important arsenal de protéines qu'elle injecte directement dans le cytosol de l'hôte via son système de sécrétion de type IVB (SST4B) Dot/Icm, la bactérie échappe à la destruction par la voie endosomale et module la machinerie de trafic vésiculaire pour créer une vacuole de réplication. Elle se multiplie exponentiellement dans cette vacuole de réplication appelée aussi « *Legionella*-containing vacuole » (LCV) et est finalement libérée dans le cytosol de l'hôte puis dans l'environnement extérieur, jusqu'à l'infection d'un nouvel hôte (Allombert *et al.*, 2013).

Les amibes et les macrophages sont les modèles d'étude de la virulence de *L. pneumophila* les plus répandus bien qu'il existe d'autres types de modèles tels que les souris permissives A/J et les lignées cellulaires qui en dérivent (Horwitz *et al.*, 1980, Brieland *et al.*, 1994), le nématode *Caenorhabditis elegans* (Brassinga *et al.*, 2010), la fausse teigne de la cire *Galleria melonella* (Harding *et al.*, 2012) ou la drosophile *Drosophila melanogaster* (Sun *et al.*, 2013).

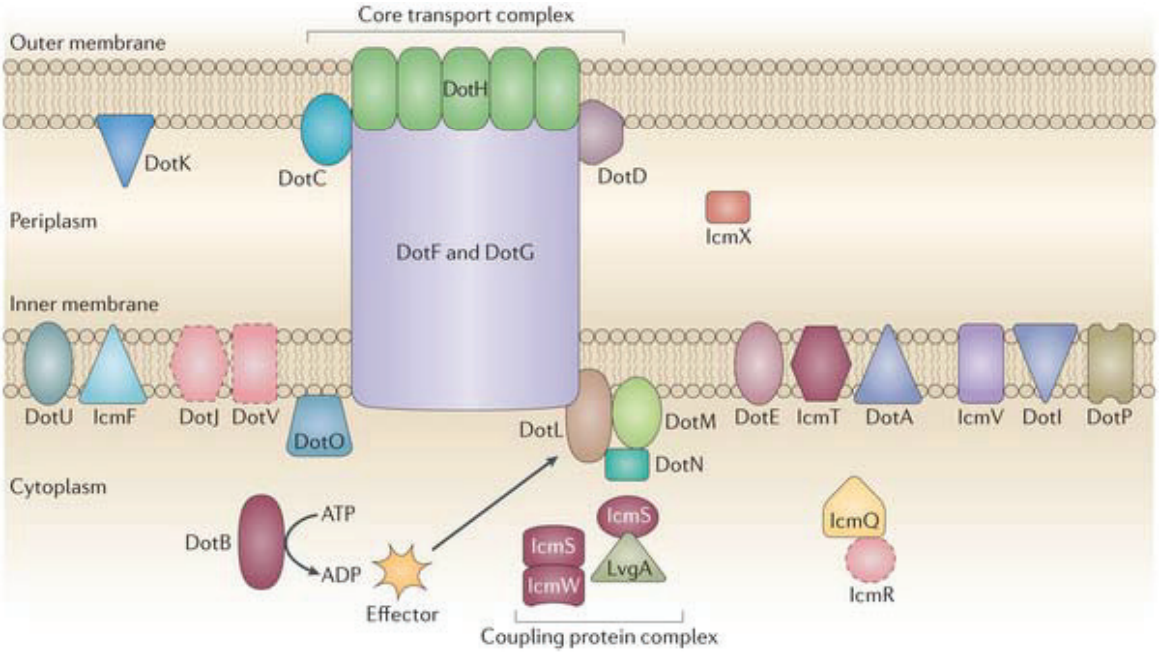


Figure 4 : Structure du système de sécrétion de type IV Dot/Icm de *L. pneumophila* (van Schaik *et al.,* 2013).

	Effecteurs	Références
Dépendants de IcmS/W ou IcmS/LvgA	SdeA	(Bardill *et al.*, 2005)
	SidG, WipA, WipB, SidH	(Ninio et al., 2005)
	SidA, SidB, SidC, SidD, SidE, SidG, SidH	(Cambronne *et al.,* 2007)
	PieA, PieB, PieC, PieD, PieE, PieF, PieG, PpgA, PpeA, PpeB	(Ninio *et al.,* 2009)
	AnkD, AnkG, AnkJ	(Habyarimana *et al.,* 2010)
	LegA10, Ceg5, Lem4, Lpg1692, RavZ, Lem16, Lem21, Lem23, Lem25, LegC8	(Lifshitz *et al.,* 2013)
	VipA, SdeA	(Vincent et al., 2012)
	MavU	(Amyot *et al.,* 2013)
Indépendants de IcmS/W ou IcmS/LvgA	RalF	(Ninio *et al.,* 2005)
	RalF, SidF	(Cambronne *et al.,* 2007)
	LepA, LepB	(Chen *et al.,* 2007)
	AnkH, AnkI, AnkK, AnkN	(Habyarimana *et al.,* 2010)
	RalF, LidA	(Vincent et al., 2012)
	CegC3, Lem8	(Lifshitz *et al.,* 2013)

Tableau 5 : Effecteurs du SST4 Dot/Icm dont la dépendance aux complexes chaperons IcmS/IcmW ou IcmS/LvgA a été testé expérimentalement.

La capacité de *L. pneumophila* à se multiplier dans des cellules phagocytaires très différentes du point de vue de l'évolution (des protistes unicellulaires aux macrophages de mammifères) est révélateur de l'aptitude de cette bactérie à cibler des voies conservées de l'hôte eucaryote (Segal *et al.*, 1999b). Cette bactérie est donc un modèle idéal d'étude des mécanismes d'échappement aux défenses des hôtes et de contrôle de son destin intracellulaire.

2.1.3.1 Le système de sécrétion de type IV Dot/Icm

Le système de sécrétion de type IVB Dot/Icm est un facteur essentiel pour la virulence de *L. pneumophila*. Il permet de sécréter directement dans le cytoplasme de la cellule-hôte plus de 300 protéines bactériennes, appelées substrats du SST4 ou effecteurs, grâce à la présence d'un signal nucléotidique de sécrétion porté sur leur extrémité carboxyle. Le SST4 est codé par 25 gènes *dot/icm* dont les délétions provoquent des défauts dramatiques de réplication intracellulaire, d'échappement à la dégradation par la voie endosomale ainsi que de biogénèse de la vacuole de réplication, d'où leurs noms : Defect in Organelle Trafficking / IntraCellular Multiplication (Marra *et al.*, 1992, Berger *et al.*, 1994, Brand *et al.*, 1994, Segal *et al.*, 1997, Vogel *et al.*, 1998). Bien que les fonctions des protéines Dot/Icm soient actuellement encore peu connues, elles peuvent être regroupées en 6 catégories.

- *Les complexes chaperons IcmS/IcmW et IcmS/LvgA*

Les complexes IcmS-IcmW et IcmS-LvgA forment des hétérodimères requis pour la sécrétion d'une partie des effecteurs nécessaires à la virulence de *L. pneumophila* (Figure 4) (Coers *et al.*, 2000, Vincent *et al.*, 2006b). Ils sont définis comme des adaptateurs du SST4 (Bardill *et al.*, 2005, Ninio *et al.*, 2005), similaires aux chaperonnes des systèmes de sécrétion de type III (SST3). Ils présenteraient certains substrats à la machinerie Dot/Icm (Tableau 5) via des interactions avec les composants membranaires de ce système DotN/DotL/DotM (Sutherland *et al.*, 2012, Vincent *et al.*, 2012). Ces complexes pourraient assurer un contrôle quantitatif et/ou temporel de l'export des protéines bactériennes dans le cytoplasme de leur hôte. Cette hypothèse est d'autant plus séduisante dans le cas de *L. pneumophila* que cette bactérie ne semble pas exercer un contrôle sur la synthèse des effecteurs en réponse à la présence de l'hôte. En effet, ceux-ci sont produits avant même le contact avec la cellule-hôte (Charpentier *et al.*, 2009). Ces complexes chaperons ne sont apparemment pas en charge de la reconnaissance du signal de sécrétion porté dans la partie C-terminale des protéines sécrétées mais pourraient permettre une meilleure présentation de celui-ci à la machinerie Dot/Icm (Cambronne *et al.*, 2007). Ces complexes pourraient également entrer en compétition avec des protéines inhibitrices de la sécrétion agissant par la séquestration de certains substrats (Cambronne *et al.*, 2007).

❖ *Les composants cytoplasmiques essentiels IcmR et IcmQ*

Au contraire des complexes cytoplasmiques IcmS/IcmW ou IcmS/LvgA qui ne sont que partiellement nécessaires à la sécrétion d'effecteurs, IcmR et IcmQ sont absolument essentielles (Coers *et al.*, 2000). Ces deux protéines interagissent (Coers *et al.*, 2000) et se comportent comme un complexe chaperon (IcmR) /substrat (IcmQ) (Duménil *et al.*, 2004). IcmQ, qui fixe le NAD+ (Farelli *et al.*, 2013), s'insère sous forme d'oligomères dans les membranes lipidiques, formant des pores de 13 à 26 Å (Duménil *et al.*, 2004). La fixation de IcmR sur IcmQ prévient cette oligomérisation (Duménil *et al.*, 2001) et permet donc de contrôler la perméabilisation de la membrane en bloquant partiellement l'association d'IcmQ avec la membrane (Raychaudhury *et al.*, 2009). Cependant, la fonction biologique assurée par ce complexe reste encore obscure.

❖ *Le complexe à activité ATPasique DotN/DotL/DotM*

La protéine de membrane interne DotL porte un domaine de fixation de nucléotide et présente des similarités avec une famille d'ATPases, les protéines couplées au SST4 (T4CP) dont fait partie la protéine VirD4 d'*Agrobacterium tumefasciens* (de Paz *et al.*, 2005). Ce type de protéines est indispensable pour la sécrétion des substrats par le SST4. Il a été proposé qu'elles fonctionnent comme des pompes moléculaires utilisant l'hydrolyse d'ATP comme source d'énergie (Gomis-Rüth *et al.*, 2004). De telles ATPases s'organiseraient en anneau hexamèrique formant un canal par lequel les substrats transiteraient pendant leur export. L'ouverture et la fermeture de ce canal seraient contrôlées par la fixation d'ATP et la libération d'ADP, respectivement (Yeo *et al.*, 2000). La protéine DotL interagit avec les protéines DotM et DotN directement au niveau de la membrane interne de la bactérie (Figure 4). Ce complexe DotL/M/N interagit également avec les complexes adaptateurs IcmS/W et IcmS/LvgA (Sutherland *et al.*, 2012). Cette interaction avec ces complexes chaperons permet la stabilisation de la protéine DotL, empêchant sa dégradation dépendante du système de réponse au stress ClpAP qui pourrait être induite par la fixation aberrante de substrats dont la sécrétion nécessite IcmS/W ou IcmS/LvgA (Vincent *et al.*, 2012).

❖ *Le complexe central membranaire DotF/DotG/DotC/DotD/DotH*

Ce complexe central est composé de cinq protéines : DotF et DotG ancrées dans la membrane interne et DotC, DotD et DotH associées à la membrane externe (Figure 4) (Vincent et al., 2006a). Ces cinq composants interagissent fortement pour relier les membranes externe et interne et constituer le noyau du complexe de sécrétion. La protéine DotH compose probablement le pore de la membrane externe du SST4 (Vincent *et al.*, 2006a). DotC et DotD sont des lipoprotéines qui assisteraient la localisation de DotH (Vincent *et al.*, 2006a). Sur la base de son homologie avec VirB10 d'*A. tumefasciens*, il a été proposé que DotG soit impliquée dans le transfert d'énergie depuis la membrane interne, via l'ATPase DotL, vers DotH (Vincent *et al.*, 2006a). DotF aurait un rôle de

récepteur cytoplasmique des substrats à exporter (Luo *et al.*, 2004). Cependant, une étude récente est revenue sur le rôle de DotF et a mis en évidence que cette protéine n'interagit réellement qu'avec certains substrats, que cette interaction ne se fait ni au niveau des séquences signal de sécrétion des substrats, ni au niveau de la partie cytoplasmique de DotF (Sutherland *et al.*, 2013). Il est donc envisagé actuellement que le rôle de récepteur des substrats soit assumé par DotL puisqu'elle fait partie des T4CP et que plusieurs de ces protéines assurent cette fonction de récepteur dans d'autres SST4 (Fronzes *et al.*, 2009).

❖ *Les facteurs accessoires de la membrane interne DotU/IcmF/IcmH*

Les protéines DotU, IcmF et IcmH sont requises pour une réplication intracellulaire optimale ainsi que pour la sécrétion efficace des substrats (VanRheenen *et al.*, 2004, Zusman *et al.*, 2004). L'absence des protéines DotU et IcmF entraine l'instabilité de composants du complexe Dot/Icm, notamment DotH, DotG et DotF, au moment de la transition entre la phase exponentielle de croissance et la phase stationnaire (Sexton *et al.*, 2004a, VanRheenen *et al.*, 2004). Plusieurs rôles peuvent être envisagés pour ces protéines accessoires : l'aide à l'assemblage d'un complexe Dot/Icm fonctionnel, le maintien du complexe assemblé sous une forme stable et active, le contrôle de l'état actif ou inactif du complexe Dot/Icm en réponse à la croissance bactérienne ou encore le recyclage des composants du SST4.

❖ *Composants de fonction inconnue IcmX/IcmT/DotB/DotA*

Toutes les autres protéines Dot/Icm sont généralement essentielles pour la biogénèse de la vacuole de réplication et la croissance intracellulaire. Leurs fonctions demeurent toutefois inconnues ainsi que leurs relations avec les autres composants du système Dot/Icm. Cependant, quelques données sont aujourd'hui disponibles. La protéine IcmX est localisée dans le périplasme de *L. pneumophila* (Matthews *et al.*, 2000) et de façon étonnante, elle n'a aucun orthologue connu parmi les protéines des SST4 d'autres bactéries. La protéine de la membrane interne IcmT, et plus particulièrement sa région C-terminale, jouerait, quant à elle, un rôle dans la formation tardive de pores membranaires permettant la libération des bactéries (Molmeret *et al.*, 2002b, Molmeret *et al.*, 2002c, Bitar *et al.*, 2005). La protéine DotB est similaire aux ATPases de la famille PilT qui contrôlent la rétractation du pilus de type IV (Wall *et al.*, 1999). Son activité ATPasique est fonctionnelle (Sexton *et al.*, 2005) et est nécessaire à la fonction de DotB ainsi qu'à sa localisation dans la membrane interne (Sexton *et al.*, 2004b). La protéine DotA est nécessaire pour la réplication intracellulaire de *L. pneumophila* (Roy *et al.*, 1998). Elle semble être sécrétée dans les surnageants de culture d'une manière dépendante du SST4 Dot/Icm (Nagai *et al.*, 2001). Un mutant Δ*dotA* est défectueux pour tous les mécanismes de virulence qui impliquent le SST4 Dot/Icm. Il est donc couramment utilisé dans les expériences d'infection de cellules-hôtes en tant que témoin avirulent.

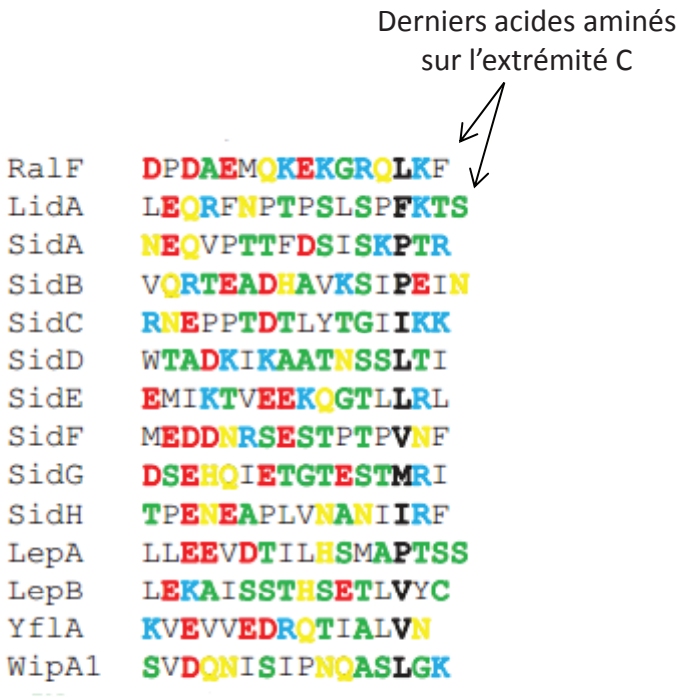


Figure 5 : Alignement de séquences protéiques de 14 effecteurs connus de *L. pneumophila* (Kubori *et al.,* 2008, supplemental data).

L'alignement de ces 14 séquences protéiques d'effecteurs permet de collecter quelques données concernant la séquence signal de sécrétion potentielle portée par ces protéines. L'acide aminés en position -3 ou -4 (en noir) est préférentiellement une Leucine (L), une proline (P) ou une valine (V). Les acides aminés indiqués en vert sont les acides aminés de petite taille : Alanine (A), Glycine, (G), Sérine (S) ou Thréonine (T). Les acides aminés indiqués en bleu sont les acides aminés chargés négativement (Lysine (K) et Arginine (R)) alors que ceux en rouge sont chargés positivement (Aspartate (D) et Glutamate (E)). Enfin, les acides aminés en jaune sont les acides aminés polaires : Histidine (H), Asparagine (N) et Glutamine (Q).

❖ *Substrats du SST4 Dot/Icm*

Etant donné le rôle clé du SST4 Dot/Icm dans la virulence de *L. pneumophila*, de nombreux travaux ont été réalisés pour identifier les substrats de ce système en utilisant différentes approches. Certains effecteurs ont été identifiés par homologie de séquence avec des domaines eucaryotes, la présence dans leurs gènes de marqueurs de transferts horizontaux, la mise en évidence de signaux de sécrétion malgré l'absence d'une séquence consensus clairement établie (Figure 5) ou l'identification d'un contrôle de leur synthèse par des éléments régulateurs tels que CpxR, PmrA ou LetA (Nagai *et al.*, 2002, Chen *et al.*, 2004, de Felipe *et al.*, 2005, Zusman *et al.*, 2007, Altman *et al.*, 2008, de Felipe *et al.*, 2008, Kubori *et al.*, 2008, Pan *et al.*, 2008, Zusman *et al.*, 2008, Burstein *et al.*, 2009). D'autres ont été mis en évidence du fait de leurs interactions avec les composants du SST4 Dot/Icm (Ninio *et al.*, 2005) ou de leur interférence avec le trafic sécrétoire de la levure lorsqu'ils sont exprimés de façon ectopique dans cet organisme eucaryote (Campodonico *et al.*, 2005, Shohdy *et al.*, 2005, Heidtman *et al.*, 2009). Souvent, ces études s'accompagnent d'une validation expérimentale de la sécrétion des protéines identifiées par des tests de transfert entre bactéries (Luo *et al.*, 2004) ou grâce à des systèmes rapporteurs de la sécrétion dans la cellule-hôte utilisant les activités β-lactamase ou adénylate cyclase (de Felipe *et al.*, 2008, Burstein *et al.*, 2009). En 2011, une approche basée sur ces tests utilisant l'activité rapportrice β-lactamase a été appliquée à toutes les ORF de *L. pneumophila* et a permis de confirmer la sécrétion de nombreux effecteurs déjà décrits, mais également d'en identifier de nouveaux (Zhu *et al.*, 2011). Ensemble, ces études ont permis l'identification d'environ 300 effecteurs du SST4 Dot/Icm.

La fonction cellulaire d'environ 85% de ces effecteurs demeure cependant inconnue, et pour la majorité d'entre eux, l'invalidation du gène correspondant ne conduit pas à une altération de la réplication intracellulaire (Chien *et al.*, 2004, de Felipe *et al.*, 2005, Ninio *et al.*, 2005, Shohdy *et al.*, 2005, Zusman *et al.*, 2008, O'Connor *et al.*, 2011). De même, dans certains cas, la déplétion simultanée de plusieurs effecteurs ne produit pas non plus de défaut de croissance intracellulaire (Luo *et al.*, 2004, Bardill *et al.*, 2005). Ces observations suggèrent l'existence de fortes redondances fonctionnelles parmi les effecteurs du SST4 Dot/Icm.

La régulation des gènes d'effecteurs est décrite de plus en plus précisément. Elle implique trois systèmes connus : (i) le système à deux composants PmrAB qui active directement l'expression de 40 gènes codant des effecteurs (Zusman *et al.*, 2007, Al-Khodor *et al.*, 2009) ; (ii) le système à deux composants CpxRA qui active ou réprime l'expression de plusieurs gènes d'effecteurs ainsi que les gènes *dot* et *icm* (Gal-Mor *et al.*, 2003, Altman *et al.*, 2008) ; (iii) la cascade de régulation LetAS-RsmXYZ-CsrA qui permet un contrôle post-transcriptionnel de plusieurs gènes codant des effecteurs (Hammer *et al.*, 2002, Rasis *et al.*, 2009, Sahr *et al.*, 2009). Cependant, peu de choses sont connues

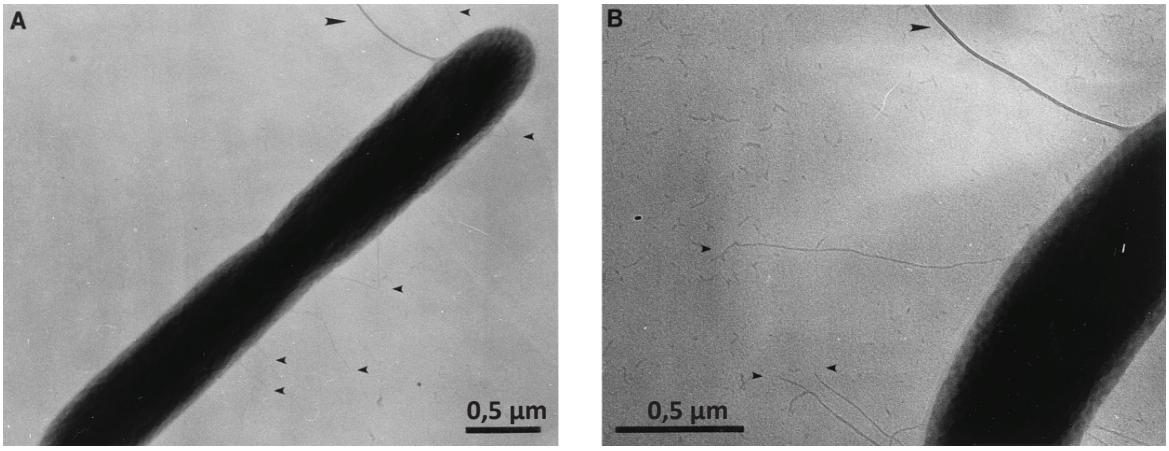


Figure 6 : Pili de type IV de *L. pneumophila* observés par microscopie électronique (Stone *et al*., 1998)

Clichés de microscopie électronique à transmission montrant le flagelle (grande flèche) et des pili (petites flèches) courts (0.1 à 0.6µm) (A) et longs (0.8 à 1.5µm) (B) de *L. pneumophila*. Les différences de longueur observées pourraient être liées à l'utilisation de différentes pilines pour la mise en place du pili de type IV ($PilE_L$ pour les pili longs et peut-être FimT pour les pili courts).

concernant les signaux et les mécanismes de signalisation qui déclenchent cette sécrétion d'effecteurs. Il est démontré que le système Dot/Icm est constitutivement synthétisé (Gal-Mor *et al.*, 2002) et que les effecteurs sont produits avant même le contact avec la cellule-hôte (Charpentier *et al.*, 2009). Cependant, l'injection des effecteurs en elle-même nécessite un contact étroit avec l'hôte juste avant ou pendant l'entrée de la bactérie dans la cellule (Charpentier *et al.*, 2009). Le contrôle temporel de la sécrétion des substrats du SST4 Dot/Icm est probablement soumis à une régulation du trafic de ces substrats vers le translocon par les complexes adaptateurs IcmS/W ou IcmS/LvgA, à un contrôle de leur stabilité et/ou à des régulations fines de l'activité du système Dot/Icm.

2.1.3.2 L'entrée dans la cellule-hôte

L'adhérence des bactéries à la cellule-hôte, puis son internalisation dans celle-ci constituent l'étape d'entrée de *L. pneumophila* dans son hôte.

Peu de choses sont connues sur l'adhérence initiale de *L. pneumophila* à la cellule-hôte. Plusieurs structures et protéines bactériennes ont cependant été reliées à ce phénomène d'adhésion : la protéine Lcl localisée dans la membrane externe de la bactérie (Vandersmissen *et al.*, 2010, Abdel-Nour *et al.*, 2014), la protéine RtxA (Cirillo *et al.*, 2000, Cirillo *et al.*, 2001, Cirillo *et al.*, 2002), la protéine EnhC (Cirillo *et al.*, 2000), une protéine de type lectine de la membrane externe (Gibson *et al.*, 1994), le pilus de type IV (Figure 6) (Stone *et al.*, 1998) ou l'adénylate cyclase putative LadC (Newton *et al.*, 2008). Cependant, les mécanismes moléculaires fins auxquels participent ces structures et protéines restent encore obscurs. De même, très peu de structures cellulaires des différents hôtes ont été mises en évidence dans ce processus à l'exception du récepteur du complément C1q pour l'entrée dans les macrophages U937 et les cellules épithéliales pulmonaires A549 (Vandersmissen *et al.*, 2010), le récepteur liant la protéine Hsp60 pour l'entrée dans les cellules épithéliales HeLa (Garduño *et al.*, 1998) ainsi qu'une lectine membranaire similaire à un intégrine β2 pour l'internalisation par *Hartmanella vermiformis* (Venkataraman *et al.*, 1997). Il manque cependant encore de nombreuses données pour comprendre précisément comment se déroule cette adhésion cellule/bactérie.

Concernant les mécanismes d'internalisation, plusieurs travaux ont mis en évidence le rôle du cytosquelette dans l'entrée de *L. pneumophila*. En effet, l'entrée de la bactérie peut être bloquée avec des inhibiteurs de la polymérisation de l'actine (cytochalasines A, B ou D) ou de la kinase ciblant la chaine légère de la myosine (Myosin Light-Chain Kinase) nécessaire au déplacement de la myosine sur le cytosquelette d'actine (Elliott *et al.*, 1986, Hilbi *et al.*, 2001, Peracino *et al.*, 2010, Harada *et al.*, 2012). De plus, une corrélation entre la polymérisation de l'actine et l'entrée dans l'hôte a été mise

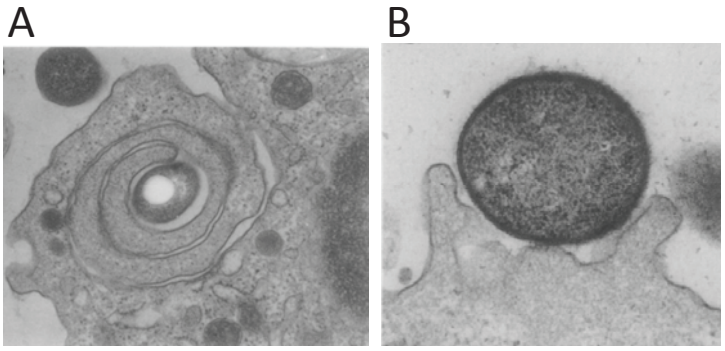


Figure 7 : Phagocytose de *L. pneumophila* et *Streptococcus pneumoniae* par un monocyte humain. (Horwitz *et al*., 1984)
Clichés de microscopie électronique à transmission montrant que (A) *L. pneumophila* est internalisée par phagocytose par enroulement alors que (B) *Streptococcus pneumoniae* est phagocyté de manière conventionnelle.
Grossissements: (A) x 28 500 et (B) x 44 000

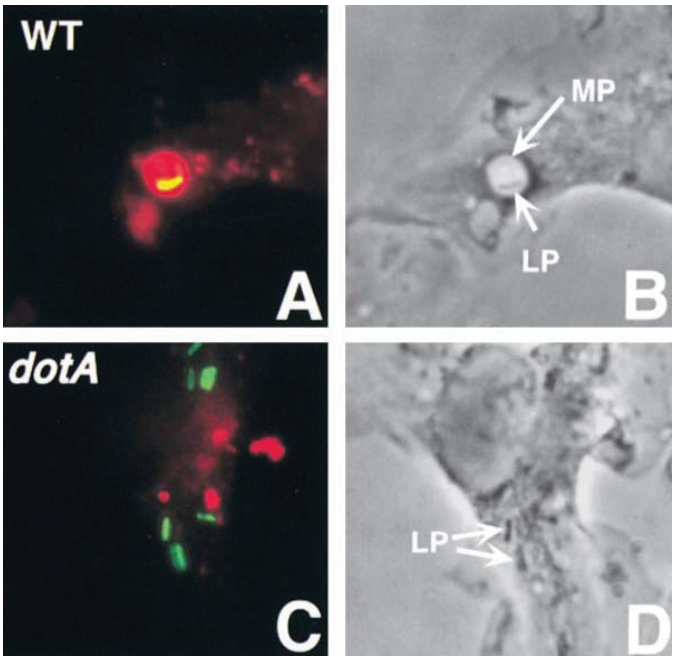


Figure 8 : Formation de macropinosomes par *L. pneumophila* (Watarai *et al.,* 2001)
Des macrophages murins sont mis en présence du marqueur de phase fluide TRITC-Dextran et de *L. pneumophila* produisant la GFP pendant 10 min. Ensuite, les infections sont fixées et observées par microscopie optique ou à fluorescence.
(A à D) Macrophage dérivé de souris A/J infecté avec *L. pneumophila* sauvage (A & B) ou *L. pneumophila ΔdotA* (SST4 non fonctionnel, témoin avirulent).
LP, *L. pneumophila;* MP, macropinosome.

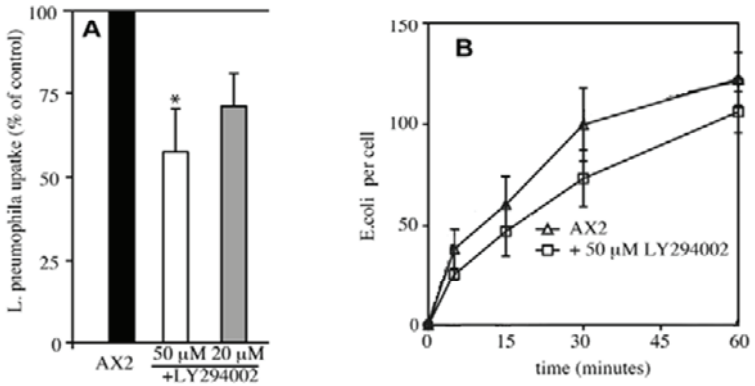


Figure 9 : Effet de l'inhibition de la PI3K par traitement avec du LY294002 sur l'entrée de *L. pneumophila* et d'*E.coli* chez *Dictyostelium discoideum* (d'après Peracino *et al.,* 2010)
Entrée de *L. pneumophila* (A) ou *E. coli* (B) dans des cellules de *D. discoideum* AX2. Les cellules de *D. discoideum* sont infectées avec une MOI de 10 (10 bactéries pour 1 cellule) avec *L. pneumophila* pendant 1h20 puis les bactéries qui n'ont pas été internalisées sont détruites par un traitement antibiotique (gentamycine). Ensuite, les bactéries viables sont dénombrées. Pour *E.coli*, les bactéries sont marquées à la fluorescéine (FITC) et sont mises en présence des cellules à un ratio de 1000 bactéries pour 1 cellule. Après agitation pendant 30min, la phagocytose est stoppée, les cellules sont lysées et les bactéries sont quantifiées grâce à l'émission de fluorescence par la FITC.

en évidence dans les travaux de Coxon *et al.* via la quantification de l'actine autour des bactéries après marquage à la phalloïdine (Coxon *et al.*, 1998).

Historiquement, les premières observations réalisées en microscopie électronique à transmission ont laissé penser que l'entrée de *Legionella pneumophila* se déroulait via des mécanismes de phagocytose par enroulement (ou « coiling phagocytosis ») (Horwitz, 1984). Ce type de phagocytose est reconnaissable au long pseudopode de la cellule qui s'enroule autour de la bactérie pour permettre son internalisation, alors que la phagocytose classique consiste à encercler la bactérie entre deux pseudopodes (Figure 7). Des travaux postérieurs ont remis en cause ces résultats en mettant en évidence que la fréquence de phagocytose par enroulement de *L. pneumophila* est très dépendante des conditions de culture de la bactérie (Cirillo *et al.*, 1999). En effet, dans les travaux de Horwitz *et al.*, les cultures étaient réalisées sur embryons d'œuf de poule alors qu'actuellement les cultures sont le plus souvent réalisées en milieu BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract) (Edelstein, 1981). Or, dans les travaux de Cirillo *et al.*, la fréquence de la phagocytose par enroulement après culture sur BCYE est inférieure à 40% alors qu'elle est très proche de 100% dans les travaux de Horwitz *et al*..

A ce jour, les travaux les plus récents suggèrent une entrée de *L. pneumophila* via les mécanismes de macropinocytose. Dans les travaux de Watarai *et al*., des observations en microscopie confocale permettent de localiser les bactéries dans de larges vacuoles concentriques dont la morphologie et la composition sont similaires aux macropinosomes (Figure 8) (Watarai *et al.*, 2001). Cette étude a également pu relier la résistance de certaines lignées murines à l'infection par *L. pneumophila*, comme les souris C57BL/6J, à leur incapacité à réaliser la macropinocytose en raison de l'absence d'un locus génétique précis, Lgn1, localisé sur le chromosome 13. Cette hypothèse est également soutenue par les travaux plus récents de Peracino *et al*., montrant que l'amibe *Dictyostelium discoideum* internalise également cette bactérie par macropinocytose (Peracino *et al.*, 2010). De plus, l'implication de la macropinocytose dans ce processus d'entrée permettrait d'expliquer pourquoi l'internalisation de *L. pneumophila* est partiellement sensible aux traitements avec des inhibiteurs de la phospho-inositide-3-kinase (PI3K) tels que la Wortmannin ou le LY294002. En effet, l'entrée de *L. pneumophila* par macropinocytose dans les cellules est partiellement inhibée par ces molécules, au contraire de la phagocytose d'*E. coli,* qui y est complètement insensible (Figure 9) (Khelef *et al.*, 2001, Peracino *et al.*, 2010).

Enfin, l'internalisation dans la cellule hôte serait un processus dépendant de la présence du système de sécrétion de type IV Dot/Icm. En effet, des souches délétées pour des gènes *dot* ou *icm* présentent des défauts de pénétration dans les cellules hôtes macrophagiques (Hilbi *et al.*, 2001,

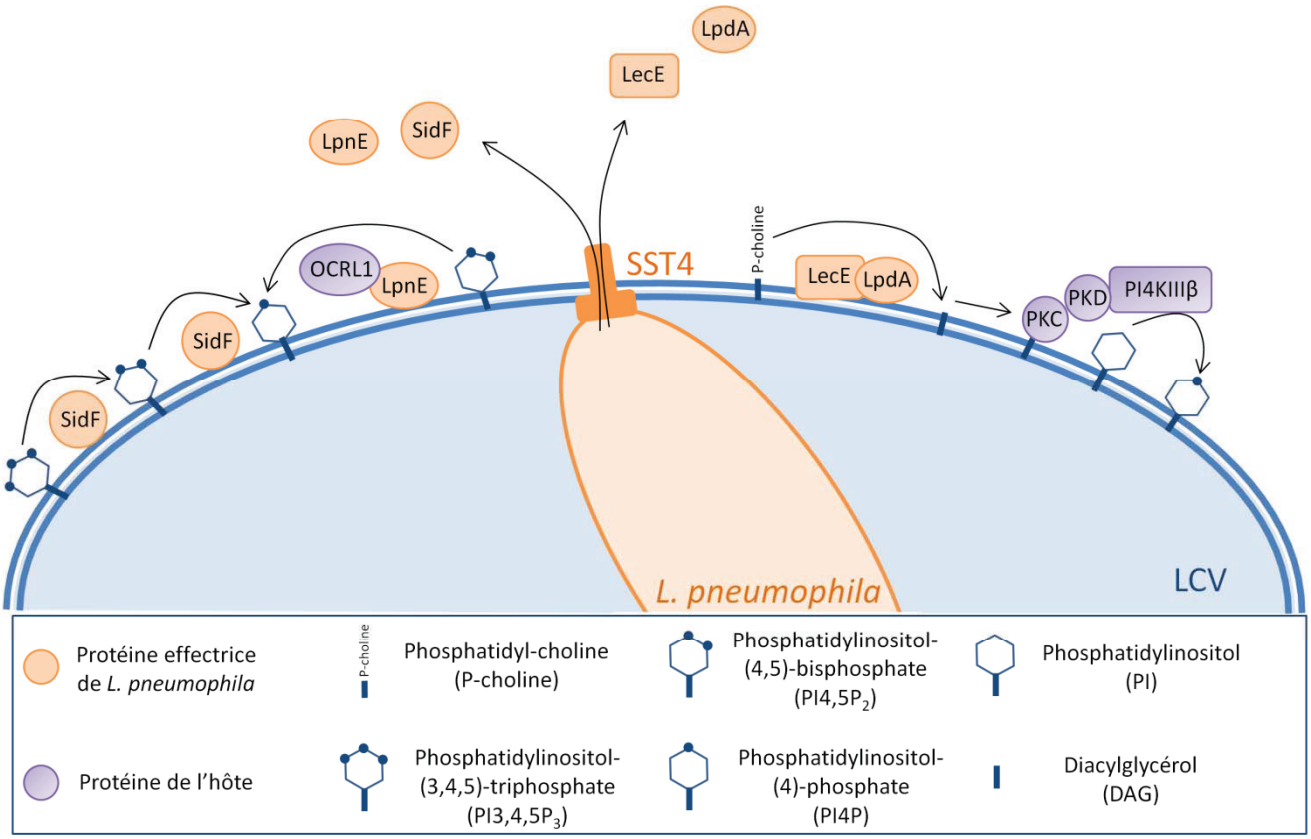


Figure 10 : Remodelage des lipides de la LCV par les effecteurs de *L. pneumophila*.
L. pneumophila injecte plusieurs protéines effectrices capables de modifier la composition en lipides de sa LCV via son système de sécrétion de type IV (SST4) Dot/Icm. Certains effecteurs modifient directement les phosphoinositides (SidF, LecE, LpdA) alors que d'autres permettent de recruter directement ou indirectement des protéines de l'hôte pour réaliser ce remodelage (LpnE et vraisemblablement LecE et LpdA). Ces modifications de la composition en lipides mènent à l'enrichissement de la membrane de la LCV en PI4P, qui permet notamment l'ancrage d'autres effecteurs de *L. pneumophila* sur la vacuole de réplication.

Watarai *et al.*, 2001). Cependant, il semblerait que la présence du SST4 n'influe pas sur la voie d'entrée de *L. pneumophila* (macropinocytose ou phagocytose) puisque les souches sauvages et mutantes pour les gènes *dot* ou *icm* sont en compétition pour les mêmes récepteurs des macrophages humains (Hilbi *et al.*, 2001). Il est donc proposé actuellement que dès le contact entre *L. pneumophila* et l'hôte, la bactérie injecterait une ou plusieurs protéines via son SST4 Dot/Icm qui stimuleraient son entrée dans l'hôte (Hilbi *et al.*, 2001). Actuellement, le seul effecteur du système Dot/Icm qui pourrait être impliqué dans l'entrée dans la cellule-hôte est la protéine SdeA/LaiA, similaire à une intégrine de *Saccharomyces cerevisiae* (Bardill *et al.*, 2005, Chang *et al.*, 2005). En effet, une souche mutante Δ*laiA* présente une capacité d'adhésion altérée aux cellules A549 (pneumocytes humains) (Chang *et al.*, 2005). Toutefois, le mécanisme exact par lequel cette protéine agit reste encore énigmatique.

2.1.3.3 La biogénèse de la vacuole de réplication

La création de la vacuole de réplication permet à *L. pneumophila* d'une part de créer un environnement propice à sa multiplication et d'autre part d'échapper à la dégradation par la voie endosomale en modifiant la composition de la membrane de son phagosome de sorte que la cellule ne reconnaisse plus ce compartiment comme un phagosome. Cette biogenèse de la LCV se caractérise par (i) l'enrichissement de la membrane du phagosome en phophatidylinositol-4-phosphate (PI4P), (ii) le recrutement d'effecteurs du système Dot/Icm à la surface du phagosome permettant en autres ce remodelage des lipides et (iii) le recrutement et l'activation de protéines de l'hôte comme les petites GTPases. Tous ces mécanismes permettent de promouvoir la fusion du phagosome avec des vésicules dérivées du réticulum endosplasmique (RE).

❖ *Le remodelage des lipides à la surface de la LCV : enrichissement en PI4P*

Les phosphoinositides (PI) jouent le rôle de marqueurs des différents compartiments cellulaires. La membrane plasmique contient majoritairement du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PI4,5P_2). Le phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) est abondant sur les membranes des endosomes précoces et l'appareil de Golgi est particulièrement enrichi en phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P) (Allombert *et al.*, 2013).

Du fait de son origine plasmique, la membrane de la LCV est particulièrement riche en PI4,5P_2 mais différents effecteurs de *L. pneumophila* vont conduire à son enrichissement en PI4P. L'effecteur SidF porte une activité de phosphatase qui permet la déphosphorylation du phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PI3,4,5P_3) et du PI4,5P_2, produisant du PI4,5P_2 et du PI4P (Figure 10) (Hsu *et al.*, 2012). SidF coexiste sur la membrane de la LCV avec la phosphatase de PI de l'hôte, OCRL1, recrutée sur la LCV par l'intermédiaire de l'effecteur LpnE (Figure 10) (Weber *et al.*,

2009). OCRL1 déphosphoryle le PI3,4,5P_3 et le PI4,5P_2 (Weber *et al.*, 2009). OCRL1 et SidF agissent de façon synergique, ce qui augmente le taux en PI4P de la membrane de la LCV.

Une autre enzyme contribue à l'enrichissement de la membrane de la LCV en PI4P, la protéine de l'hôte PI4KIIIβ. Elle catalyse l'ajout d'un groupement phosphate en position 4 sur le phosphatidylinositol, créant ainsi une molécule de PI4P (Figure 10). En effet, l'absence de PI4KIIIβ diminue la quantité de PI4P accumulée sur la membrane de la LCV (Brombacher *et al.*, 2009). Le mécanisme de recrutement de cette protéine sur la LCV ainsi que l'implication du système Dot/Icm dans ce processus ne sont pas encore clairement établis. Cependant, il semble que deux effecteurs, LecE et LpdA, pourraient jouer indirectement un rôle dans le recrutement de PI4KIIIβ. En effet, LecE et LpdA sont localisées au niveau de la membrane de la LCV et agissent en synergie pour produire du diacylglycérol (DAG) à partir de phosphatidylcholine (Figure 10) (Viner *et al.*, 2012). L'enrichissement de la membrane en DAG pourrait permettre le recrutement de la protéine kinase C (PKC) et par conséquent l'activation de la protéine kinase D (PKD) (Rozengurt *et al.*, 2005), connue pour recruter la protéine PI4KIIIβ sur la membrane cible (Figure 10) (Hausser *et al.*, 2005). Etonnamment, le PI3P est également retrouvé dans la membrane de la LCV. Cependant, l'impact de cette présence sur la maturation du phagosome ou la biogénèse de la LCV reste à éclaircir.

Cet enrichissement en PI4P de la LCV, qui dérive initialement de la membrane plasmique, mime le compartiment de l'appareil de Golgi, favorisant ainsi la fusion avec des vésicules dérivées du RE. De plus, le PI4P est requis pour le recrutement et l'ancrage sur la LCV de certains autres effecteurs de *L. pneumophila*.

- *Le recrutement des effecteurs sur la LCV*

De nombreux effecteurs sont présents sur la surface de la LCV. *L. pneumophila* utilise le PI4P pour ancrer certains d'entre eux sur la face externe de la LCV. L'effecteur SidC s'ancre sur la LCV par interaction entre le PI4P et sa région C-terminale (Ragaz *et al.*, 2008). Cet ancrage est nécessaire pour le recrutement du RE bien que le mécanisme moléculaire mis en œuvre soit encore inconnu. Un second effecteur, SidM, appelé aussi DrrA, est recruté sur la LCV via une interaction forte avec le PI4P (Brombacher *et al.*, 2009, Schoebel *et al.*, 2010). Cette protéine présente trois activités enzymatiques différentes : une activité GEF (guanine nucleotide-exchange factor), une activité GDF (GDI-displacement factor) et une activité d'AMPylation (Machner *et al.*, 2006, Müller *et al.*, 2010). Ces activités, explicitées dans la partie suivante, permettent le recrutement et le contrôle de la petite GTPase RAB1 de l'hôte (Murata *et al.*, 2006, Müller *et al.*, 2010) et par conséquent le recrutement de RE sur la LCV. L'effecteur LidA est ancré sur la LCV majoritairement par interaction avec le PI3P, et avec le PI4P avec une affinité plus faible (Brombacher *et al.*, 2009).

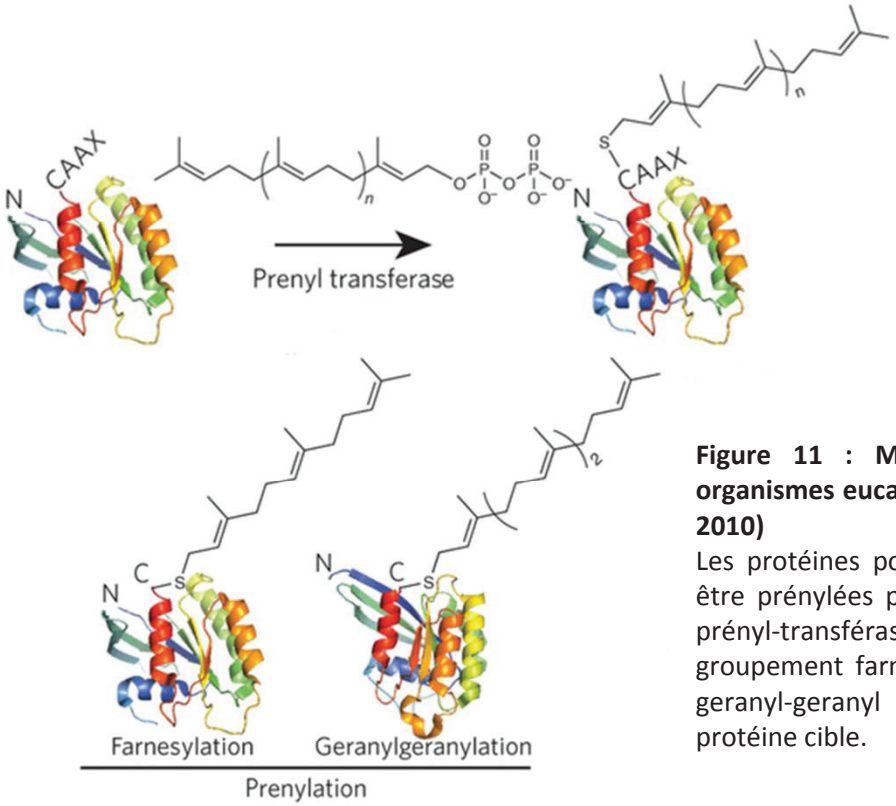


Figure 11 : Machinerie de prénylation des organismes eucaryotes (d'après Hannoush *et al.*, 2010)

Les protéines portant des motifs CAAX peuvent être prénylées par des enzymes spécifiques, les prényl-transférases. Elles catalysent la greffe d'un groupement farnesyl (n=1) ou d'un groupement geranyl-geranyl (n=2) sur le motif CAAX de la protéine cible.

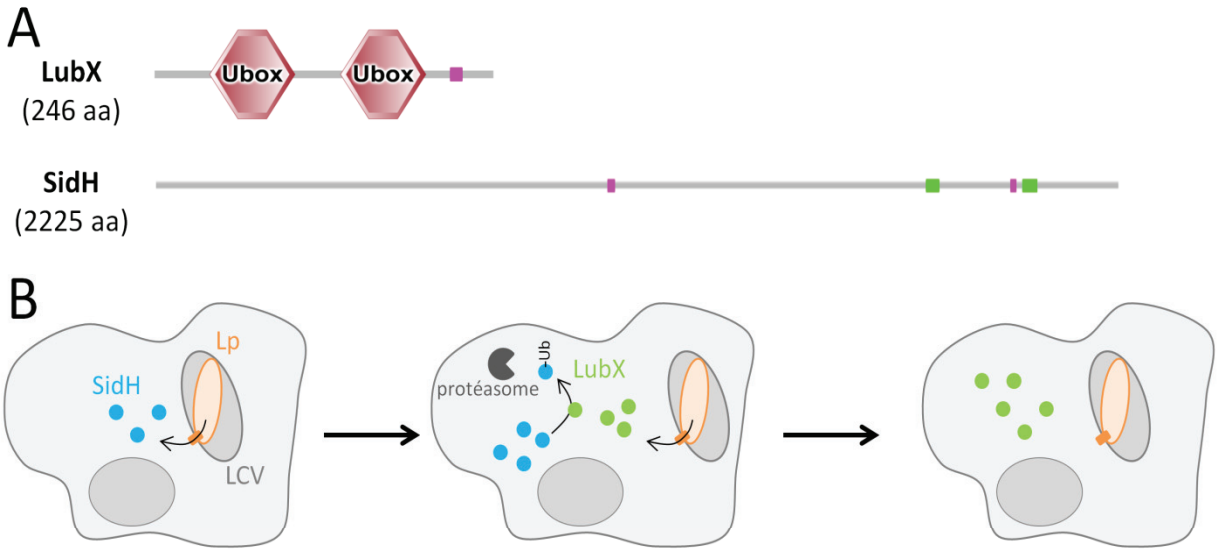


Figure 12 : Contrôle temporel de la protéine SidH dans le cytoplasme de l'hôte par le métaeffecteur LubX (d'après Kubori *et al.*, 2010)

(A) Représentations schématiques des protéines LubX et SidH. LubX contient deux domaines U-box, une région de faible complexité (rose) ainsi qu'un signal de sécrétion en C-terminal. SidH possède deux régions de faible complexité (rose) et deux régions coiled-coil (vert). Aucun de ces domaines ne permet la prédiction de la fonction de cette protéine. (B) Régulation temporelle de SidH par LubX. La sécrétion plus tardive de l'ubiquitine ligase LubX (vert) par le système Dot/Icm entraine la dégradation de SidH (bleu) par le protéasome de l'hôte (gris foncé) lors des étapes tardives de l'infection.

Lp : *L. pneumophila* ; Ub : Ubiquitine

L. pneumophila peut également ancrer ses effecteurs sur la LCV via le détournement de la machinerie de prenylation de sa cellule-hôte. La prenylation est une modification lipidique post-traductionnelle qui consiste à greffer un acide gras, un groupement farnesyl ou geranyl-geranyl, sur une protéine portant un domaine CAAX conservé (Figure 11) (Hannoush *et al.*, 2010). Cette modification permet l'ancrage d'une protéine hydrophile dans les membranes lipidiques ou leur association avec des protéines hydrophobes (Wright *et al.*, 2006). L'analyse *in silico* des génomes de *L. pneumophila* a révélé la présence de 11 gènes codant des protéines à motifs CAAX. Lorsque ces protéines sont exprimées de façon ectopique dans des cellules eucaryotes, elles sont prises en charge par la machinerie de prenylation de la cellule et se localisent dans les membranes (Ivanov *et al.*, 2010). Les effecteurs LegG1 et AnkB contiennent un de ces motifs CAAX. Au cours de l'infection, AnkB est modifié par la machinerie de farnesylation de l'hôte, recrutée d'une façon dépendante du système Dot/Icm (Price *et al.*, 2009, Price *et al.*, 2010, Al-Quadan *et al.*, 2011), ce qui permet l'ancrage de AnkB dans la membrane de la LCV. Cet effecteur interagirait avec SKP1 de l'hôte appartenant au complexe ubiquitine ligase SCF1, générant une présence massive de protéine poly-ubiquitinylées sur la LCV (Bruckert *et al.*, 2014). AnkB promeut ainsi la création dépendante du protéasome d'acides aminés libres que la bactérie peut utiliser comme source d'énergie ou de carbone (Price *et al.*, 2011, Bruckert *et al.*, 2014). Bien que AnkB ne soit pas directement impliquée dans la biogénèse de la LCV et malgré des résultats controversés concernant sa nécessité et sa fonction biologique au cours de l'infection (Price *et al.*, 2009, Ensminger *et al.*, 2010, Lomma *et al.*, 2010), AnkB influence directement la composition de la membrane de la LCV via le stockage de protéines poly-ubiquitinylées (Dorer *et al.*, 2006).

S'il existe un contrôle spatial de certains effecteurs (localisation sur la LCV), un contrôle temporel est également envisagé. En effet, des effecteurs tels que LubX, LegU1 ou LegAU13 présentent des domaines F-box ou U-box, impliqués dans l'ubiquitinylation de protéines (Cazalet *et al.*, 2004, Chien *et al.*, 2004, de Felipe *et al.*, 2005, Kubori *et al.*, 2008, Ensminger *et al.*, 2010). Ces données suggèrent que *L. pneumophila* injecterait des protéines bactériennes capables de manipuler le protéasome de l'hôte afin de contrôler la présence temporelle d'autres effecteurs. Le seul exemple connu à ce jour mettant en évidence ce type de mécanisme est le métaeffecteur LubX. Cette protéine possède deux motifs U-box (Figure 12), qui lui permettent de contrôler la poly-ubiquitinylation de SidH, ce qui entraine sa dégradation par le protéasome (Figure 12) (Kubori *et al.*, 2010). LubX exerce donc un contrôle négatif sur la présence de SidH au cours de l'infection. Par ailleurs, LubX cible également la protéine kinase de l'hôte CLK1. Toutefois, les conséquences de cette modification post-traductionnelle sont inconnues (Kubori *et al.*, 2008).

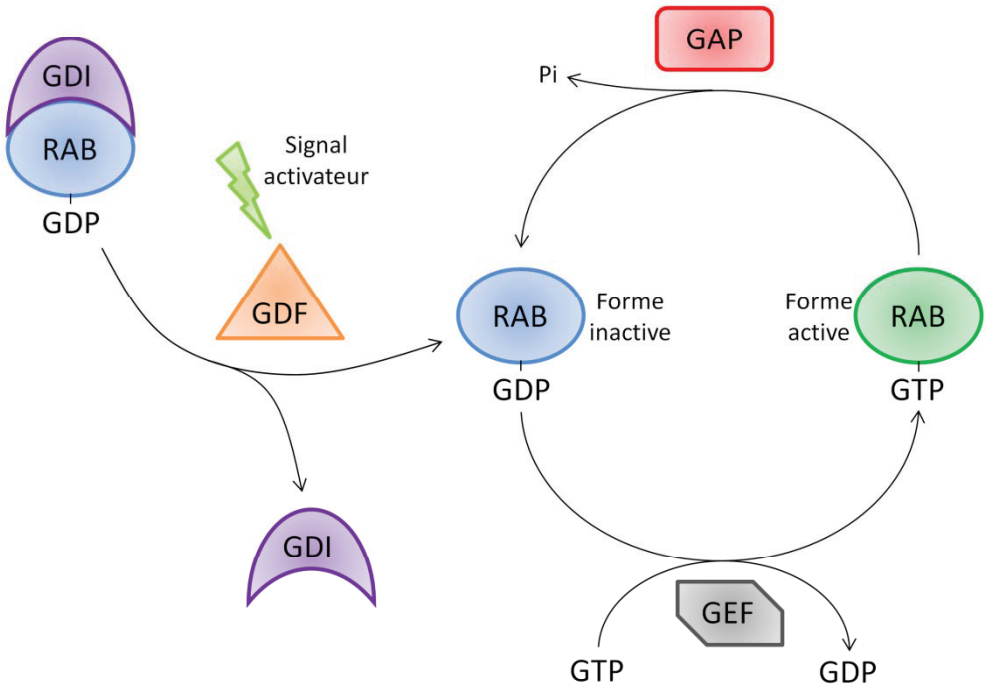


Figure 13 : Cycle d'activation et d'inactivation des petites GTPases
GEF : Guanosine Exchange Factor, GAP : GTPase Activating Protein, GDI : Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor, GDF : GDI Displacement Factor

Ces mécanismes semblent contrôler finement et spécifiquement la présence et/ou la localisation des effecteurs au cours de l'infection. Cependant, les données disponibles ne permettent probablement qu'une compréhension partielle de cette régulation spatiotemporelle.

❖ *Le détournement des petites GTPases de l'hôte*

Les petites GTPases de l'hôte existent dans les organismes eucaryotes sous deux états fonctionnels et conformationnels : un état actif, correspondant à une forme liée au GTP et associée aux membranes et un état inactif cytoplasmique correspondant à la forme liée au GDP. La transition de l'état actif à celui inactif dépend de l'activité GTPase intrinsèque de ces protéines. Elle est également finement contrôlée par différentes familles de protéines régulatrices, les GAP (GTPase-Activating Proteins), les GEF (Guanine nucleotide-Exchange Factors), les GDI (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors) et les GDF (GDI Displacement Factors) (Figure 13). Les GAP stimulent l'hydrolyse du GTP par la GTPase elle-même, induisant par conséquent son inactivation. Les GEF promeuvent l'échange de GDP en GTP, activant ainsi les GTPases. En absence d'un signal activateur, les GTPases cytosoliques inactives sont séquestrées par les GDI qui les maintiennent dans une conformation inactive. En présence du signal activateur, les GDF libèrent les GTPases des GDI et leur confèrent une conformation qui permet leur ancrage dans la membrane du compartiment cellulaire approprié.

Des GTPases de l'hôte, essentielles au contrôle du trafic vésiculaire entre le RE et l'appareil de Golgi comme RAB1 ou ARF1, ou encore impliquées dans le contrôle des microtubules comme la GTPase RAN, sont les cibles de certains effecteurs de *L. pneumophila*.

Ainsi, l'effecteur SidM, ancré sur la LCV, est associé à des activités GDF et GEF qui lui permettent de libérer la GTPase RAB1 de ses GDI et de l'activer (Figure 14A) (Machner *et al.*, 2006, Murata *et al.*, 2006, Ingmundson *et al.*, 2007, Schoebel *et al.*, 2009, Suh *et al.*, 2010, Zhu *et al.*, 2010). La région N-terminale de cette protéine porte une activité AMPylase capable de modifier la tyrosine en position 77 de RAB1 par addition d'un groupement AMP (Müller *et al.*, 2010). Cette modification post-traductionnelle inhibe l'activité GTPase de RAB1 de même que ses interactions avec les GDI, bloquant ainsi RAB1 dans un état activé (Figure 14A) (Oesterlin *et al.*, 2012). L'activation de la GTPase RAB1 promeut l'attachement de vésicules du RE à la surface de la LCV. De plus, le domaine C-terminal de SidM peut interagir directement avec les synthexines de la membrane plasmique telles que SXT3 (Arasaki *et al.*, 2012). La présence de ces synthexines permettrait la formation d'un complexe SNARE fonctionnel par association avec SEC22b porté par les vésicules du RE, activant par conséquent la fusion des membranes des vésicules de RE avec la LCV (Arasaki *et al.*, 2012).

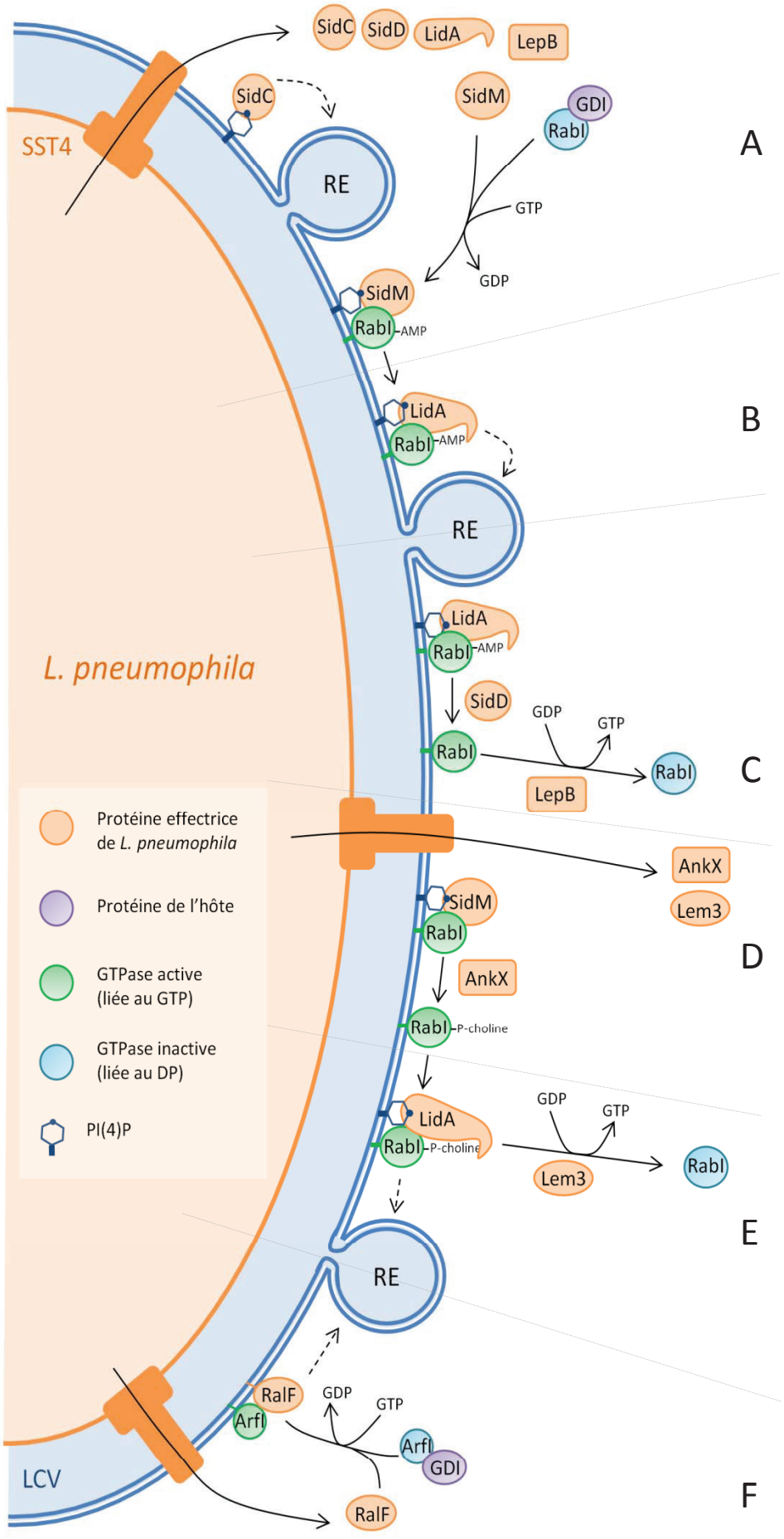


Figure 14 : Détournement des petites GTPases RAB1 et ARF1 de l'hôte par *L. pneumophila*

L. pneumophila injecte plusieurs effecteurs qui permettent de détourner les petites GTPases de l'hôte. Ce détournement promeut le recrutement de vésicules du reticulum endoplasmique (RE) à la surface de la LCV. Ces effecteurs portent différentes activités enzymatiques : GEF (SidM et RalF), GAP (LepB), AMPylase (SidM), déAMPylase (SidD), phosphocholinase (AnkX) ou déphosphocholinase (Lem3). GDI : inhibiteur de dissociation.

L'effecteur LidA, ancré sur la membrane de la LCV, est capable de lier la GTPase RAB1 inactive (liée au GDP) (Conover *et al.*, 2003, Cheng *et al.*, 2012). Cette interaction mime la conformation active de RAB1 (liée au GTP) indépendamment du nucléotide fixé (Cheng *et al.*, 2012). LidA assure également un rôle de protection de RAB1 contre les protéines à activités GAP ou GEF en masquant une grande partie de RAB1 (Figure 14B) (Schoebel *et al.*, 2011, Neunuebel *et al.*, 2012). Elle bloque aussi les processus de déAMPylation par SidD et de déphosphocholination par Lem3 (voir ci-après) (Neunuebel *et al.*, 2012).

L'activation de RAB1 par SidM peut être neutralisée par deux autres effecteurs de *L. pneumophila*, SidD et LepB. SidD est associé à une activité déAMPylase, spécifique des RAB GTPases, qui permet l'enlèvement du groupement AMP greffé par SidM (Figure 14C) (Neunuebel *et al.*, 2011, Tan *et al.*, 2011, Chen *et al.*, 2013b). Cette déAMPylation de RAB1 la rend accessible pour LepB. LepB possède une activité GAP qui active l'hydrolyse de GTP et par conséquent l'inactivation de RAB1 et son décrochage de la LCV (Figure 14C) (Ingmundson *et al.*, 2007, Mihai Gazdag *et al.*, 2013, Mishra *et al.*, 2013). Il est à noter que les effets séquentiels et antagonistes de SidM et SidD/LepB sur RAB1 sont soutenus par la proximité de leurs trois gènes dans le génome (*lpg2464*, *lpg2465* et *lpg2490*, respectivement) ainsi que par leur production séquentielle (le niveau de production de SidD et LepB augmente lorsque celui de SidM diminue) (Ingmundson *et al.*, 2007).

Trois effecteurs supplémentaires ciblent la GTPase RAB1 et participent au contrôle temporel de son activation au cours du cycle infectieux. L'effecteur AnkX possède une activité de modification post-traductionnelle, la phosphocholination, qui permet le transfert d'un groupement phosphocholine sur la sérine en position 76 de RAB1 (Figure 14D) (Mukherjee *et al.*, 2011). Cette modification provoque un effet similaire à l'AMPylation par SidM, c'est-à-dire le blocage de RAB1 sous sa forme active ainsi que l'inhibition de l'interaction entre RAB1 et les GDI (Oesterlin *et al.*, 2012). De même que l'AMPylation, la phosphocholination est réversible et la déphosphocholination est assurée par l'effecteur Lem3 (Figure 14E) (Goody *et al.*, 2012).

L'effecteur RalF présente une activité GEF envers ARF1 lui permettant d'activer cette petite GTPases sur la LCV (Figure 14F) (Nagai *et al.*, 2002). Le domaine C-terminal de RalF, qui module son activité GEF, pourrait lier les PI sans spécificité particulière et ainsi ancrer RalF sur la LCV (Alix *et al.*, 2012). Le rôle de ARF1 est essentiel dans la biogénèse de la LCV (Dorer *et al.*, 2006). Cependant, l'invalidation du gène *ralF* n'affecte pas la croissance intracellulaire de *L. pneumophila* suggérant que d'autres effecteurs participent au contrôle de ARF1 (Nagai *et al.*, 2002).

La GTPase RAN de l'hôte est également détournée par *L. pneumophila* au cours de son cycle infectieux. Ce détournement est permis par l'effecteur LegG1, ancré sur la LCV par prénylation (ajout

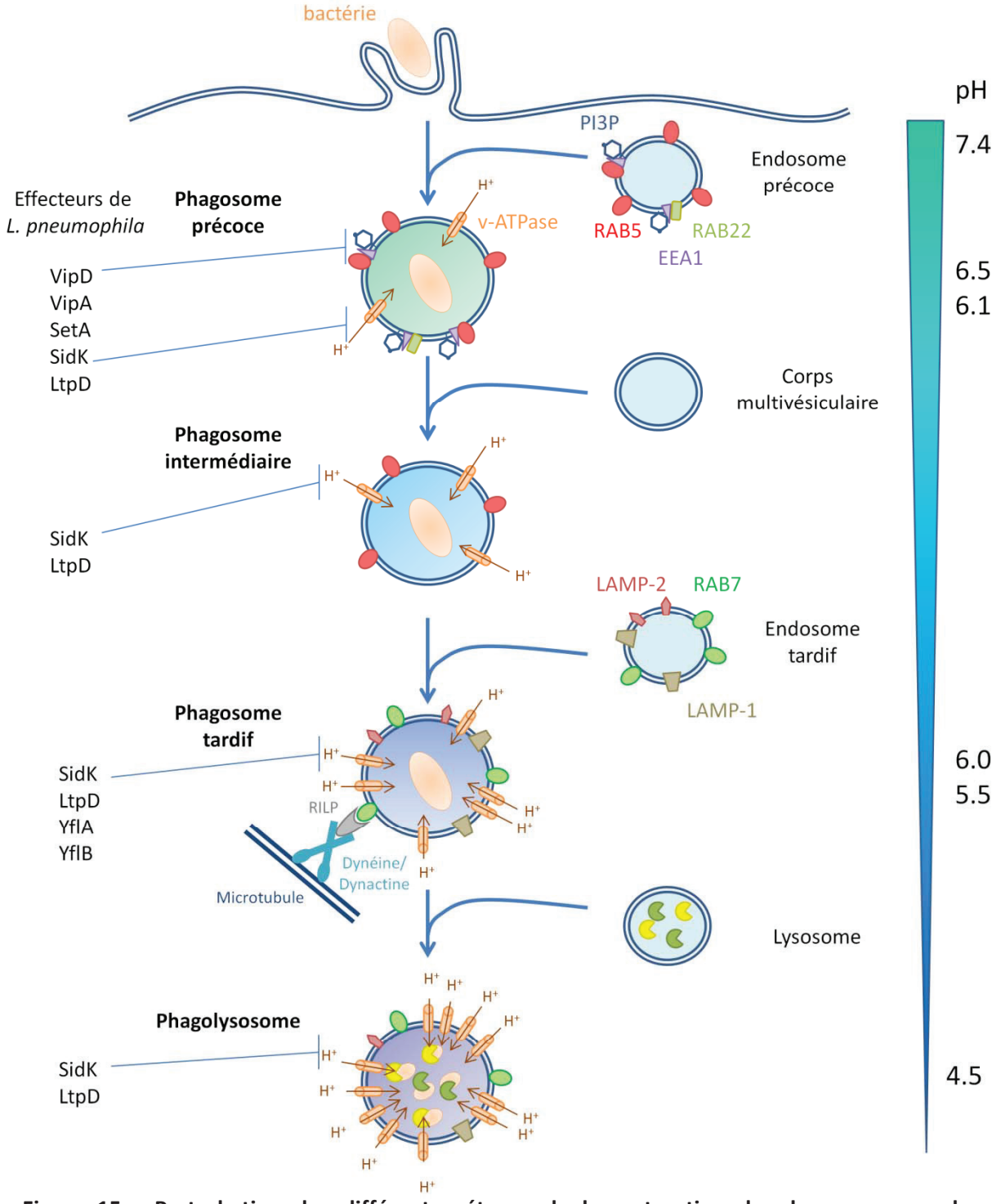


Figure 15 : Perturbation des différentes étapes de la maturation du phagosome par les effecteurs de *L. pneumophila*.

Après l'entrée de la bactérie, le phagosome subit une série de transformation résultant d'interactions séquentielles avec les sous-compartiments de la voie endosomale. On distingue plusieurs stades de maturation : le phagosome précoce, le phagosome intermédiaire, le phagosome tardif et le phagolysosome. Au cours de la maturation, le phagosome s'acidifie progressivement par pompage des protons par la v-ATPase. Les effecteurs de *L. pneumophila* qui interfèrent avec ce processus de maturation sont indiqués ainsi que leurs effets lorsqu'ils sont connus.

EEA1 : antigène 1 de l'endosome précoce; early endosomal antigen 1. LAMP : protéine membranaire associée au lysosome, lysosomal-associated membrane protein. RILP : protéine lysosomale interagissant avec les protéines Rab, Rab-interacting lysosomal protein.

d'un geranyl-geranyl) (Ivanov *et al.*, 2010, Rothmeier *et al.*, 2013). LegG1 n'est pas impliquée dans le recrutement de RAN sur la LCV mais dans l'accumulation de la protéine RANBP1 (« RAN-binding protein 1 ») qui assiste les protéines RAN-GAP pour l'activation de RAN (Rothmeier *et al.*, 2013). Ces trois protéines, RAN, RANBP1 et LegG1, sont nécessaires à la stabilisation/polymérisation des microtubules dans les phagocytes infectés et au déplacement de la LCV sur le réseau de microtubules au sein de la cellule. Cette utilisation du cytosquelette de microtubules pourrait permettre l'éloignement de la LCV des membranes cellulaires et/ou le rapprochement de celle-ci de compartiments cellulaires cibles tels que le RE. Le détournement du cytosquelette de tubuline par ces protéines est d'envergure car il impacte directement des capacités de migration des cellules infectées (Simon *et al.*, 2014). Enfin, il est aussi envisagé que LegG1 puisse jouer sur l'activation de la GTPase RAN à distance, puisque celle-ci est aussi requise pour les mécanismes de translocation nucléaire (Moore *et al.*, 1993). LegG1 pourrait peut-être participer au détournement de ce mécanisme afin de permettre l'entrée d'autres effecteurs tels que RomA dans le noyau de l'hôte, permettant ainsi indirectement à *L. pneumophila* de moduler l'expression génétique de son hôte (Rolando *et al.*, 2013).

L. pneumophila est capable de détourner au moins trois petites GTPases différentes. De plus, la GTPase RAB1 est la cible d'au moins six effecteurs du SST4 Dot/Icm. Cependant, l'inactivation des six gènes correspondants n'induit pas de défaut marqué de réplication intracellulaire (O'Connor *et al.*, 2011), ce qui suggère que d'autres mécanismes sont nécessaires à la biogénèse de la LCV. Il peut être envisagé que *L. pneumophila* puisse détourner d'autres GTPases, comme RAB6, qui parait nécessaire pour une réplication intracellulaire optimale (Chen *et al.*, 2013a), ou encore RAB3, RAB8, RAB10 et RAB35 (Hoffmann *et al.*, 2013, Mihai Gazdag *et al.*, 2013). Il semble également que la GTPase SAR1 participe à la création de la LCV. En effet, des expériences d'extinction de gènes par interférence ARN et d'expression de variants de SAR1 ont mis en évidence un rôle de cette GTPase dans l'établissement de la vacuole de réplication de *L. pneumophila* (Kagan *et al.*, 2002). Il est également connu que d'autres effecteurs Dot/Icm comme LegK2 ou SidJ sont nécessaires pour la biogénèse de la LCV (Liu *et al.*, 2007, Hervet *et al.*, 2011) bien que les mécanismes précis par lesquels ces protéines agissent ne soient pas encore décrits.

2.1.3.4 La perturbation de la maturation du phagosome par la voie endosomale

La voie endocytique (ou endosomale) est composée de compartiments vésiculaires générés par des échanges entre les endosomes précoces, les endosomes tardifs et les lysosomes par des processus de fusion et de fission de ces organelles. Lors de la phagocytose d'une bactérie, la maturation du phagosome résulte d'interactions successives et strictement orchestrées avec les organelles de la voie endocytique (Figure 15) (Desjardins *et al.*, 1994). Ce processus implique

différentes protéines de l'hôte comme les RAB GTPases RAB5 ou RAB7 et s'accompagne d'un transport le long du cytosquelette de microtubules (Toyohara *et al.*, 1989, Harrison *et al.*, 2003). Cette maturation consiste principalement en un remodelage de la membrane du phagosome ainsi que par un changement de la composition de son contenu qui devient très acide, très oxydatif et donc propice à la dégradation du micro-organisme internalisé.

Dans un premier temps, le phagosome acquiert rapidement les propriétés des endosomes précoces par fusion avec ceux-ci. Cela se traduit par un enrichissement de la membrane du phagosome en phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) et en protéines RAB5 et EEA1 (early endosomal antigen 1) (Figure 15). EEA1, ancré sur la membrane du phagosome par interaction avec le PI3P, est capable d'interagir directement avec RAB5 ce qui permet probablement l'attachement du phagosome précoce aux autres vésicules comme les corps multivésiculaires ou l'endosome tardif (Lawe *et al.*, 2000). EEA1 interagit également avec la syntaxine 13 de la famille des protéines SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein REceptor) requises pour les mécanismes de fusion de membranes (McBride *et al.*, 1999).

Le phagosome tardif est caractérisé par un pH acide (de 5,5 à 6,0) dû à l'acquisition de nombreuses pompes à proton, les v-ATPases (ATPases vacuolaires). Les v-ATPases sont des complexes protéiques qui hydrolysent l'ATP et utilisent l'énergie qui en résulte pour importer les protons (H^+) à travers la membrane du phagosome (Beyenbach *et al.*, 2006). Le phagosome s'enrichit également en protéines LAMP (lysosomal-associated membrane proteins) acquises par fusion avec l'endosome tardif ainsi qu'en protéines RAB7 (Figure 15). RAB7 est d'ailleurs un marqueur spécifique de cet organelle et est connu pour contrôler le trafic entre les phagosomes tardifs et les lysosomes (Bucci *et al.*, 2000). RAB7 recrute plusieurs protéines sur la membrane du phagosome tardif. L'une d'elles est la protéine RILP (RAB-interacting lysosomal protein) qui promeut le mouvement centripète du phagosome tardif en pontant leurs membranes à des moteurs moléculaires des microtubules, les complexes dynéine/dynactine (Figure 15) (Harrison *et al.*, 2003).

Les phagolysosomes sont générés par la fusion dépendante de RAB7 du phagosome tardif avec les lysosomes (Figure 15). L'acquisition de nombreuses pompes à protons supplémentaires augmente encore l'acidification inhibant la croissance des micro-organismes (Huynh *et al.*, 2007). En effet, elle a un impact négatif direct sur le métabolisme de nombreuses bactéries et permet en parallèle de favoriser l'activité de nombreuses enzymes hydrolytiques amenées par les lysosomes (Figure 15) (Flannagan *et al.*, 2009).

La plupart des effecteurs du SST4 Dot/Icm de *L. pneumophila* impliqués dans l'échappement à la dégradation endosomale a été identifiée par des cribles réalisés sur des levures en recherchant

des altérations de leur trafic vésiculaire (Campodonico *et al.*, 2005, Shohdy *et al.*, 2005, de Felipe *et al.*, 2008). Cette technique a notamment permis d'identifier les protéines YflA et YflB (Campodonico *et al.*, 2005, de Felipe *et al.*, 2008). Bien que leur mécanisme d'action reste énigmatique, ces deux protéines ont été localisées à la surface des endosomes des levures (de Felipe *et al.*, 2008). Les effecteurs VipA et VipD ont également été identifiés ainsi (Shohdy *et al.*, 2005). VipA est présente sur les endosomes précoces des macrophages THP-1 car elle est colocalisée avec le marqueur EEA1 (Figure 15) (Franco *et al.*, 2012). Le rôle de VipA dans l'échappement à la voie endosomale n'est pas très clair bien qu'il nécessite son activité nucléatrice de l'actine (Franco *et al.*, 2012). L'implication de VipD dans ce processus est nettement plus détaillée : cette protéine, localisée au niveau des endosomes précoces, est capable d'interagir avec les GTPases RAB5 et RAB22 (Ku *et al.*, 2012). Cette interaction empêche RAB5 et RAB22 d'interagir avec leurs partenaires protéiques habituels, la rabaptine et EEA1, bloquant ainsi la maturation du phagosome (Figure 15) (Ku *et al.*, 2012). L'effecteur SetA est aussi impliqué dans la perturbation de la maturation du phagosome. Cette protéine est une glycosyltransférase putative susceptible de transférer un groupement monosaccharidique sur une cible lipidique ou protéique. Une fois sécrétée par *L. pneumophila*, SetA colocalise avec la GTPase RAB5 en s'ancrant sur le PI3P de la membrane des endosomes précoces (Figure 15) (Jank *et al.*, 2012). Bien que cette protéine semble être un substrat de la machinerie d'ubiquitinylation de l'hôte associée aux endosomes tardifs (Babst, 2005, Piper *et al.*, 2007, Heidtman *et al.*, 2009), son rôle précis n'est pas encore déterminé. Une étude réalisée sur *Dictyostelium discoideum* a permis l'identification de l'effecteur, SidK, capable d'inhiber l'acidification des phagosomes (Xu *et al.*, 2010). En effet, SidK interagit avec la sous-unité VatA de la v-ATPase de *D. discoideum* bloquant ainsi l'hydrolyse de l'ATP et par conséquent l'importation de protons dans le phagosome (Figure 15) (Xu *et al.*, 2010). Enfin, l'effecteur LtpD est également retrouvé sur les endosomes, du fait de sa colocalisation avec les marqueurs RAB5, RAB7 et LAMP-2 (Harding *et al.*, 2013). Cette protéine est capable d'interagir avec la protéine IMAP-1 (inositol-monophosphatase 1), responsable de la déphosphorylation de l'inositol monophosphate, générant de l'inositol nécessaire pour la synthèse de phosphatidylinositides comme le PI3P. Cette interaction ne semble cependant pas jouer sur l'activité enzymatique d'IMAP-1 mais pourrait faciliter son interaction avec d'autres protéines pour moduler le métabolisme des lipides de l'hôte (Harding *et al.*, 2013).

2.1.3.5 La transition entre les phases de réplication et de transmission

Comme d'autres pathogènes intracellulaires, tels que *Coxiella burnetii*, le cycle de vie de *L. pneumophila* est composé de deux phases : une phase de réplication intracellulaire et une phase de transmission (Swanson *et al.*, 2002). Après multiplication dans la LCV et en réponse à un ou plusieurs signaux de carence nutritive, la bactérie se différencie et acquiert les caractéristiques de la phase de

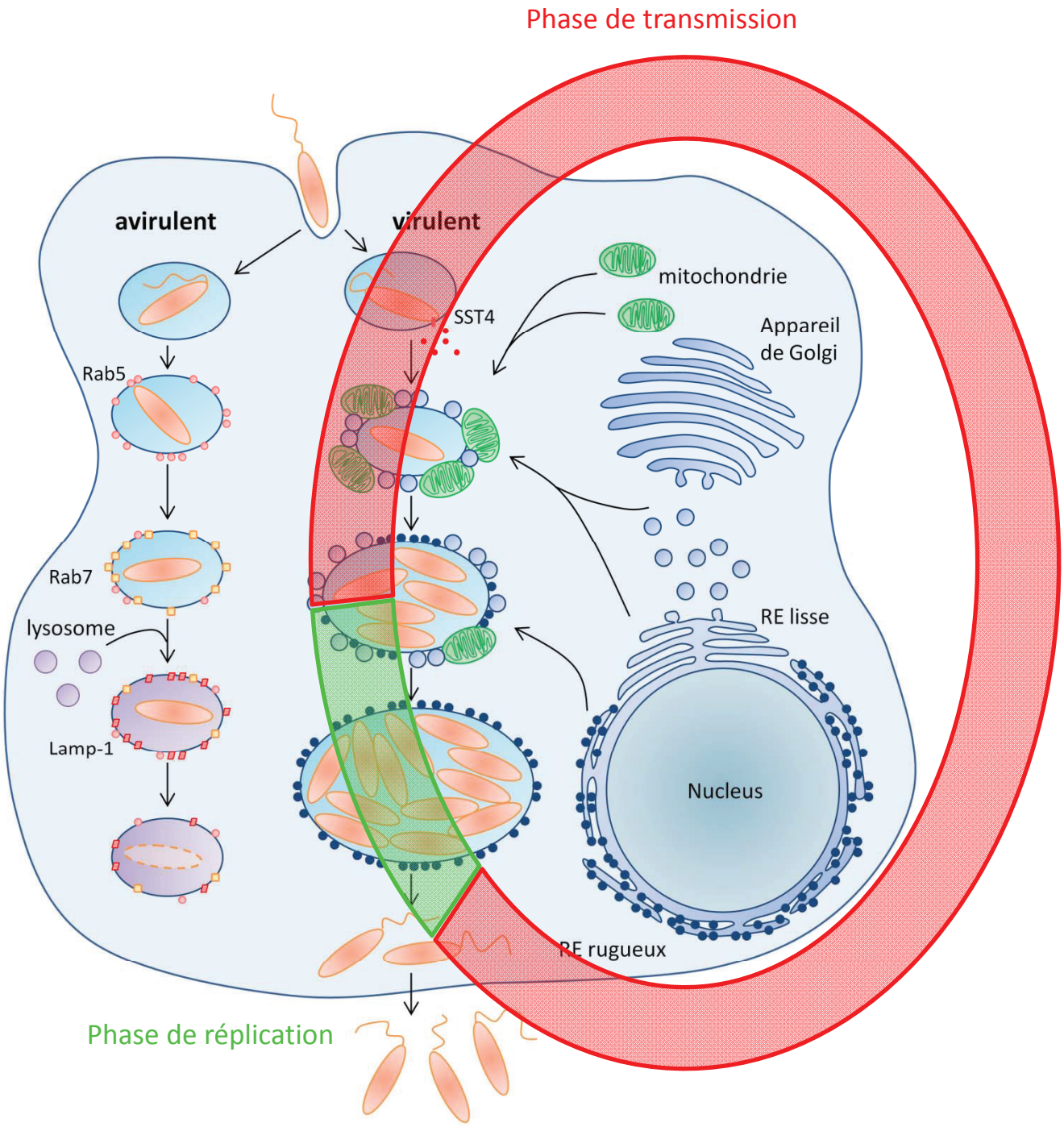


Figure 16 : Cycle de vie biphasique de *L. pneumophila*, entre phase de réplication et phase de transmission (d'après Allombert *et al.*, 2013).
Le cycle de vie de *L. pneumophila* est composé de deux phases : la phase de réplication et la phase de transmission. Ces deux phases sont mutuellement exclusives. La phase de réplication correspond à la multiplication intracellulaire de la bactérie. La phase de transmission correspond à l'étape de sortie de la cellule-hôte, à la survie dans l'environnement extracellulaire et aux premières étapes de l'infection jusqu'à ce que la bactérie ait formé sa LCV.

transmission : elle stoppe sa réplication et exprime un grand nombre de traits lui permettant de s'échapper de son hôte, de survivre dans l'environnement sous forme planctonique puis d'infecter une nouvelle cellule. Cette phase de transmission est phénotypiquement caractérisée par la production de pigment et l'acquisition d'une sensibilité accrue au sodium (Byrne *et al.*, 1998, Hales *et al.*, 1999, Bachman *et al.*, 2004, Sahr *et al.*, 2009). Ces deux phases sont mutuellement exclusives, c'est-à-dire que lorsque les conditions sont favorables à la réplication, les caractères qui promeuvent la transmission ne sont pas exprimés et la bactérie se réplique dans son hôte. Ce phénomène est mis en évidence par le fait que lorsque les bactéries sont bloquées génétiquement dans une forme transmissive, celles-ci sont capables d'entrer dans l'hôte, de créer une vacuole de réplication et d'y persister pendant plusieurs jours sans toutefois s'y multiplier (Molofsky *et al.*, 2003). Et, au contraire, lorsque des macrophages sont infectés avec des bactéries en cours de réplication, celles-ci sont directement prises en charge par la voie endosomale et sont lysées (Byrne *et al.*, 1998, Joshi *et al.*, 2001, Molofsky *et al.*, 2003). Le caractère mutuellement exclusif des traits transmissifs et réplicatifs permet aux pathogènes intracellulaires de limiter les dépenses énergétiques. Lorsque les nutriments sont abondants dans la LCV, les traits de transmission/virulence ne sont plus requis, et au contraire, lorsque les conditions ne sont plus favorables à la réplication (carence en nutriments) l'expression des caractères promouvant la réplication seraient superflus.

❖ *Les phases réplicatives et transmissives*

La phase de réplication correspond à l'étape de multiplication intracellulaire de *L. pneumophila* à l'intérieur de la LCV (Figure 16). La phase de transmission regroupe l'étape de sortie des bactéries de la cellule-hôte, leur survie dans l'environnement extracellulaire ainsi que les premières étapes de l'infection jusqu'à la formation de la LCV (Figure 16). Pour mieux comprendre les mécanismes de cette différenciation, un suivi de l'expression globale des gènes de *L. pneumophila* entre les phases réplicative et transmissive a été réalisé (Brüggemann *et al.*, 2006). Cette analyse transcriptomique a permis de mettre en évidence une importante reprogrammation de l'expression génétique entre les deux phases (Brüggemann *et al.*, 2006). En effet, 405 gènes particulièrement induits au cours de la phase réplicative de *L. pneumophila* Paris lors de l'infection de l'amibe *A. castellanii* ont été identifiés ainsi que 393 gènes spécifiquement exprimés pendant la phase de transmission (Brüggemann *et al.*, 2006).

~ La phase réplicative intracellulaire

De nombreux gènes induits pendant la multiplication intracellulaire sont impliqués dans le métabolisme nutritionnel de la bactérie. En effet, plusieurs de ces gènes sont liés au transport et au catabolisme des acides aminés dont notamment ceux de la sérine, la thréonine ou encore l'histidine

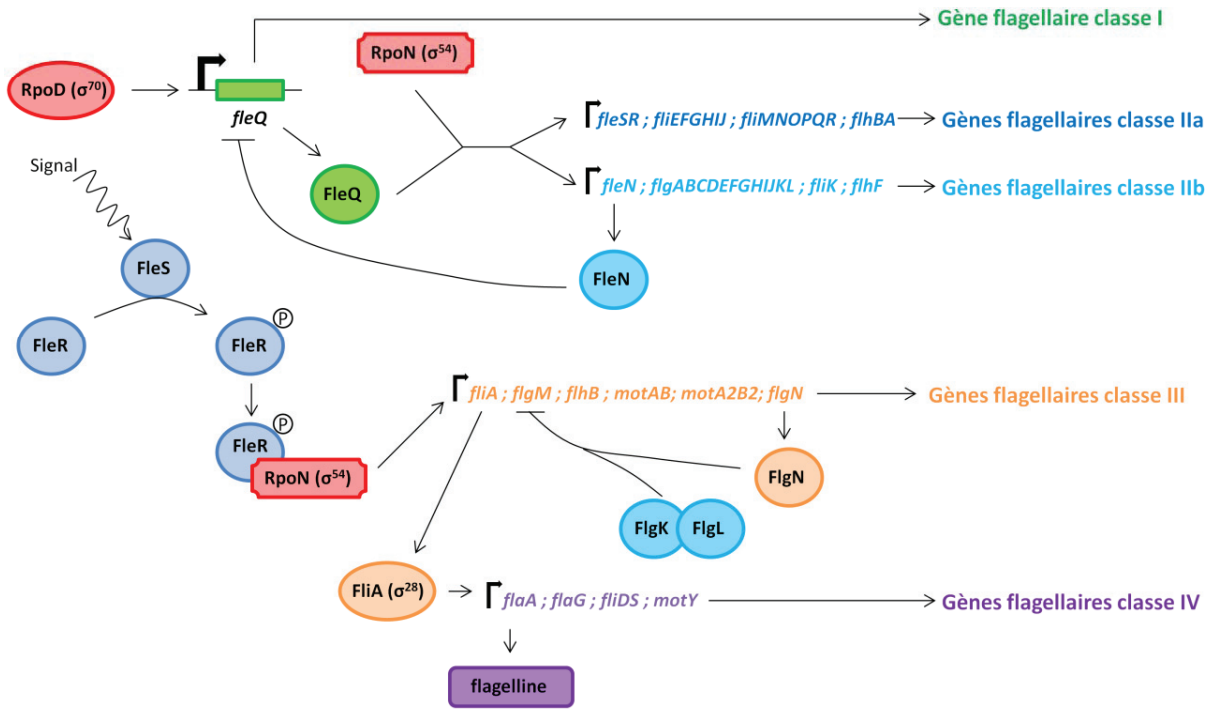


Figure 17 : Modèle de la hiérarchie de la régulation transcriptionnelle des gènes de biosynthèse du flagelle chez *L. pneumophila* (d'après Brüggemann *et al.*, 2006).
RpoD (σ^{70}) contrôle l'expression de *fleQ,* gène flagellaire de classe I (vert), codant un régulateur des gènes flagellaires de classe II (bleu) qui agit en association avec RpoN (σ^{54}). Le gène de classe II *fleN* code un répresseur de *fleQ* et les gènes *fleSR* un système à 2 composants. En réponse à un signal inconnu, la kinase FleS phosphoryle FleR, permettant à celui-ci d'interagir avec RpoN (σ^{54}) et d'activer l'expression des gènes de classe III (orange). Ces gènes de classe III codent FliA (σ^{28}) ainsi que son antagoniste, FlgM. L'expression de FlgM peut être inhibée par la chaperonne FlgN en association avec FlgK et FlgL impliquées dans un mécanisme de détection de l'avancement de l'assemblage du flagelle. Le facteur FliA active à son tour l'expression des gènes de classe IV (violet), dont *flaA* qui code pour la flagelline.

(Brüggemann *et al.*, 2006). Ces données sont en accord avec les travaux de Sauer *et al.* qui montrent que la croissance de *L. pneumophila* dans les macrophages nécessite la présence de thréonine (Sauer *et al.*, 2005). *L. pneumophila* utiliserait donc particulièrement ces acides aminés comme source d'énergie. Cette hypothèse est également supportée par la production de protéinases et d'aminopeptidases pendant cette phase, ce qui suggère que *L. pneumophila* pourrait également dégrader les protéines pour la production d'acides aminés.

Les données transcriptomiques ont également révélé une induction de gènes codant pour des enzymes du cycle d'Entner-Dodouroff (*lpp0483-lpp0485-lpp0487*), une glucokinase putative (*lpp0486*), un transporteur de sucres (*lpp0488*), une glucoamylase de type eucaryote (*lpp0489*) et 4 gènes codant des protéines impliquées dans le catabolisme du myo-inositol au cours de la phase réplicative (*lpp1620-lpp1621-lpp1622-lpp1623*) (Brüggemann *et al.*, 2006). Ces observations suggèrent que *L. pneumophila* pourrait aussi utiliser les carbohydrates comme source d'énergie. Le cycle d'Entner Dodouroff est l'une des trois voies permettant la dégradation de glucose en pyruvate, avec la glycolyse et la voie des pentoses phosphates. Il est également induit chez *Salmonella enterica*, un autre pathogène intracellulaire, pendant sa croissance dans les macrophages (Eriksson *et al.*, 2003). *L. pneumophila* exprime aussi des gènes permettant l'utilisation d'amidon ou de glycogène, deux carbohydrates qui sont naturellement stockés par les hôtes amibiens de la bactérie (Williamson *et al.*, 1996).

~ La phase de transmission

Parmi les gènes induits pendant la phase de transmission, on retrouve des gènes codant des facteurs de virulence : certains effecteurs du SST4 Dot/Icm (RalF, SidC, VipD, SidF, LidA, etc) mais aussi des facteurs de virulence indépendants du système Dot/Icm (EnhABC, LidL, RtxA, etc.). Le SST4 Dot/Icm semble particulièrement requis pendant les étapes précoces du cycle infectieux (Roy *et al.*, 1998, Coers *et al.*, 1999). En effet, une expression transitoire d'un gène *dotA* plasmidique en début du cycle infectieux permet à une souche Δ*dotA* de *L. pneumophila* de se répliquer efficacement dans la cellule-hôte (Roy *et al.*, 1998). Cette expression corrige les défauts d'échappement à la voie endosomale et de biogénèse de la LCV de ce mutant.

Les gènes impliqués dans la biosynthèse du flagelle sont également induits pendant cette phase. Ils appartiennent aux différentes classes des gènes flagellaires (Figure 17) : ce sont entre autres les gènes de classe II *flhB*, de classe III *motA* et *motB2* et de classe IV *fliS* et *motY*. Toutefois, le gène flagellaire le plus fortement induit est le gène de classe IV *flaA*, codant la flagelline, qui est 43 fois plus exprimé en phase de transmission par rapport à la phase réplicative de *L. pneumophila* Paris (Brüggemann *et al.*, 2006).

Nom du gène		Fold change *in vivo*		Fold change *in vitro*	Domaines	TM
Paris	Lens	Paris	Lens	Paris		
lpp0029	***lpl0030***	**3,36**	**5,43**	**1,32**	**3PAS/GGDEF/EAL**	**0**
lpp0087	***lpl0075***	**2,5**	**4,11**	**1,3**	**GGDEF/EAL**	**2**
lpp0127	-	-1,43		-1,7	EAL/COG1639	0
lpp0219	*lpl0219*	1,33	1,7	2,1	PAS/GGDEF	0
lpp0220	***lpl0220***	**8,22**	**11,61**	**2,58**	**EAL**	**1**
lpp0299	***lpl0283***	**8,34**	**6,12**	**1,15**	**CHASE3/GAF/GGDEF**	**1**
lpp0351	-	3,46		7,41	EAL	0
lpp0352	***lpl0329***	**13,74**	**11,96**	**3,63**	**REC/PAS/GGDEF**	**0**
lpp0440	***lpl0416***	**4,79**	**5,03**	**1,23**	**GGDEF**	**5**
lpp0809	*lpl0780*	2,19	7,93	5,24	GGDEF	0
lpp0891	*lpl0860*	-2,45	-1,34	-1,07	GGDEF/EAL/HAMP	3
lpp0942	***lpl0912***	**13,55**	**13,9**	**2,89**	**GGDEF**	**5**
lpp0952	*lpl0922*	7,73	18,09	7,73	2PAS/GGDEF/EAL	0
lpp1114	*lpl1118*	2,48	-1,1	-1,01	PAS/GGDEF/EAL	0
lpp1170	*lpl1176*	3,23	11,37	8,63	GGDEF/EAL	9
lpp1311	***lpl1308***	**5,46**	**3,79**	**1,58**	**PAS/GGDEF/EAL**	**7**
lpp1425	*lpl1559*	1,39	1,85	1,28	EAL	2
lpp1475	*lpl1508*	5,39	1,46	1,92	PAS/GGDEF/EAL	13
lpp2071	***lpl2061***	**11,79**	**7,6**	**1,05**	**GGDEF/EAL**	**9**
lpp2324	*lpl1054*	-1,27	2,35	-1,2	GGDEF/EAL	4
lpp2355	-	6,19		3,63	GGDEF	5
lpp2477	**-**	**10,41**		**1,06**	**GGDEF**	**1**
lpp2695	*lpl2567b*	4,29	1,2	1,25	2PAS/GAF/GGDEF/EAL	0
lpp2708	***lpl2581***	**8,94**	**10,82**	**2,45**	**GGDEF**	**6**

Tableau 6 : Les protéines GGDEF/EAL et leur niveau d'expression entre les phases de réplication/ transmission et les phases exponentielle/stationnaire de croissance des souches de *L. pneumophila* Paris et Lens. (Brüggemann *et al*., 2006, tableaux S7, S8 et S9).

Fold change *in vivo :* Les valeurs positives représentent une surexpression des gènes en phase transmissive (14h post-infection d'*A. castellanii*) en comparaison à leur expression en phase réplicative (8h post-infection).
Fold change *in vitro* : Les valeurs positives représentent une surexpression des gènes en phase stationnaire (DO_{600nm}=3.9) en comparaison à leur expression en la phase exponentielle de croissance (DO_{600nm}=1.5) .
Les gènes indiqués **en gras** sont les gènes dont l'expression est plus spécifiquement induite *in vivo*.

La synthèse de nombreuses protéines régulatrices est aussi augmentée pendant cette phase (Brüggemann *et al.*, 2006) : l'activateur des traits de transmission LetE, le facteur σ^{28} FliA impliqué dans le contrôle de gènes flagellaires (Figure 17), 4 systèmes à deux composants (PilS/PilR, ShkA/Lpp2523, PmrB/PmrA et StuC/Lpp2083), 10 régulateurs transcriptionnels dont CpxR , 2 sous-unités du complexe histone-like IHF (HimA et HimD) et de la chaperonne d'ARN Hfq (Brüggemann *et al.*, 2006). Une famille spécifique de régulateurs est particulièrement produite pendant la phase de transmission : les protéines à domaines GGDEF et/ou EAL, impliquées dans le métabolisme d'un messager secondaire, le diguanylate cyclique (diGMPc). En effet, 18 des 24 gènes de *L. pneumophila* Paris codant ces protéines sont induits pendant la phase de transmission, et 7 d'entre eux sont très fortement exprimés, avec une hausse supérieure à un facteur 8 entre les phases de réplication et de transmission (Tableau 6). L'induction d'autres gènes liés au métabolisme de messagers secondaires a également été observée : celle de gènes codant notamment 5 adénylate cyclases ou encore 3 protéines liant l'AMP cyclique ou le GMP cyclique (Brüggemann *et al.*, 2006).

- *Les signaux induisant la transition de phase*

Les signaux qui régissent le passage entre ces deux phases sont principalement de nature nutritionnelle. En effet, il a été montré que la transition de phase semble être déclenchée lorsque la bactérie se retrouve en état de carence en acides aminés et/ou acides gras (Byrne *et al.*, 1998, Dalebroux *et al.*, 2009). Le mécanisme enclenché par la perception de ces signaux impliquerait la réponse stringente et la synthèse de l'alarmone (p)ppGpp. En effet, dans les milieux de culture, en phase stationnaire de croissance, *L. pneumophila* accumule le (p)ppGpp (Hammer *et al.*, 1999). La bactérie arrête alors de se multiplier et passe à un état similaire à l'état de transmission (profil d'expression de gènes comparable) (Hammer *et al.*, 2002). Par analogie avec la réponse stringente d'*E. coli*, quand *L. pneumophila* a épuisé ses ressources en acides aminés, l'enzyme RelA serait activée : en réponse à la quantité d'ARNt non chargés d'acides aminés, RelA convertirait le GTP en (p)ppGpp. Ce messager secondaire semble être également produit par la protéine SpoT de *L. pneumophila* lorsque la bactérie est en état de carence en acides gras (Dalebroux *et al.*, 2009, Edwards *et al.*, 2009). Le (p)ppGpp coordonnerait donc l'entrée en phase stationnaire ainsi que l'expression des traits transmissifs (Hammer *et al.*, 2002).

Il a été mis en évidence que lorsque la maturation et l'acidification tardive de la LCV sont bloquées, la multiplication de *L. pneumophila* est inhibée (Sturgill-Koszycki *et al.*, 2000). Bien que l'acidification de la LCV semble promouvoir la réplication intracellulaire, il est envisagé qu'un autre signal que le pH acide soit à l'origine du déblocage de la multiplication. En effet, la fusion tardive de la LCV avec les lysosomes pourrait apporter dans la LCV des nutriments, résidus de l'activité dégradative de ces vésicules. La bactérie serait alors dans un compartiment favorable à sa

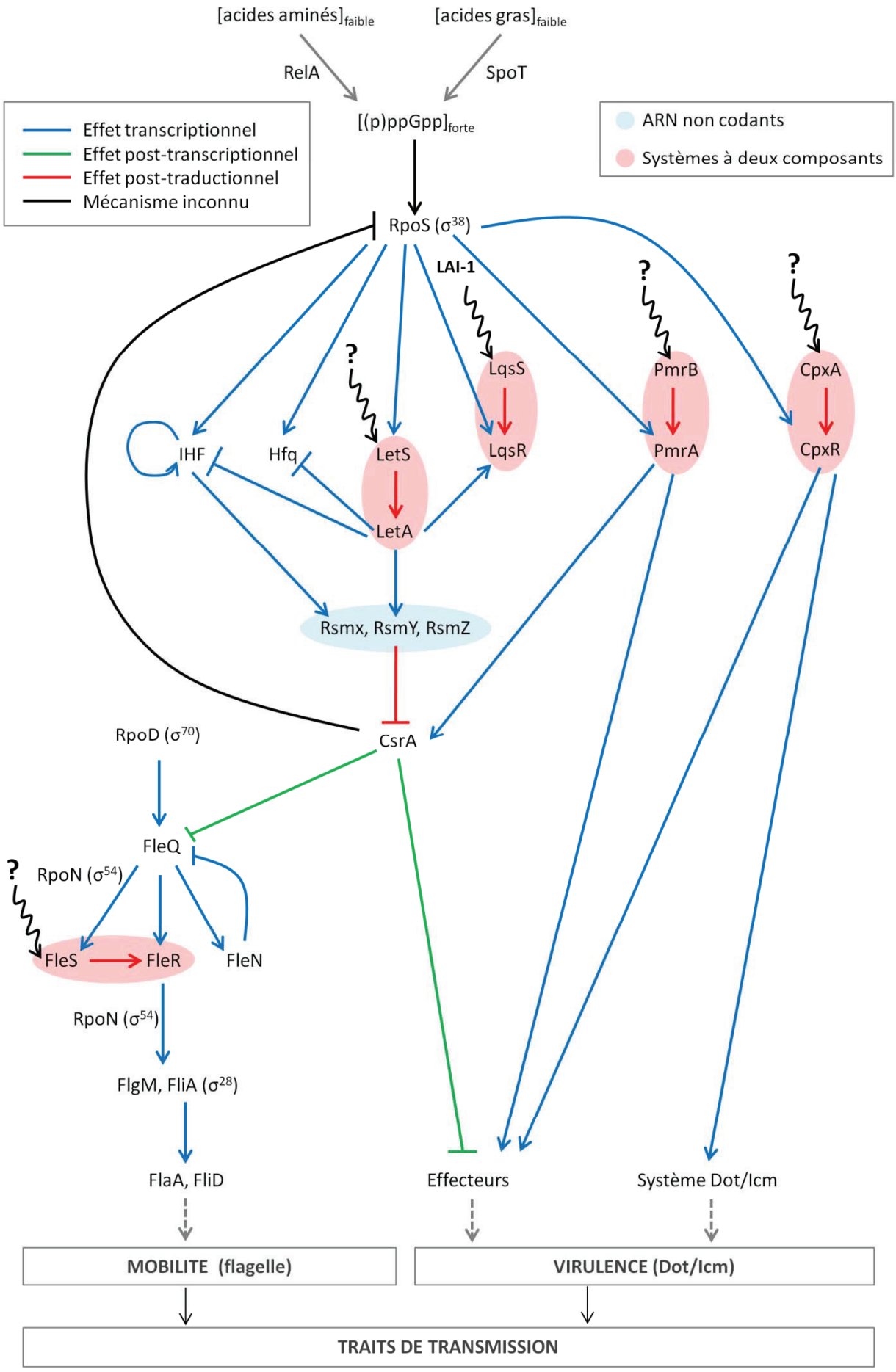


Figure 18 : Modèle du réseau de régulation mis en place pendant la transition de phase.
Ce réseau de régulation est décrit précisément dans le texte.
LAI-1 : auto inducteur du quorum sensing, 3-hydroxypentadecan-4-one.

multiplication. Ces données appuient l'idée que la différenciation de *L. pneumophila,* que ce soit pendant le passage de l'état réplicatif à l'état transmissif ou *vice versa*, s'effectue en réponse à l'environnement nutritionnel de la bactérie.

❖ *Les systèmes de régulation de la transition de phase*

Mis à part une analyse transcriptomique réalisée *in vivo* (Brüggemann *et al.,* 2006), les études concernant les systèmes de régulation mis en place pendant cette phase de transmission ont été accomplies *in vitro*, en s'appuyant sur la forte similarité de phénotype et de profil d'expression génétique de *L. pneumophila* pendant sa phase stationnaire de croissance en milieu liquide et sa phase de transmission (Hammer *et al.*, 2002). Ces études ont permis d'établir un modèle du réseau de contrôle de l'expression des traits transmissifs (Figure 18).

La synthèse de (p)ppGpp par RelA et SpoT en réponse aux faibles concentrations d'acides aminés et d'acides gras induit l'expression ou l'activation du facteur σ^{38} RpoS (Dalebroux *et al.*, 2009). Ce facteur σ alternatif induit notamment l'expression des gènes de structure de trois systèmes à deux composants : LetS/LetA, CpxA/CpxR et PmrB/PmrA (Hovel-Miner *et al.*, 2009, Rasis *et al.*, 2009). Les systèmes CpxA/CpxR et PmrB/PmrA modulent l'expression de substrats du système de sécrétion Dot/Icm, et CpxA/CpxR est également capable de contrôler l'expression de gènes *dot* et *icm* (Gal-Mor *et al.*, 2003, Altman *et al.*, 2008). Le système LetS/LetA permet, lorsqu'il est activé et avec l'assistance du complexe histone-like IHF, l'expression de trois ARN non codants (ARNnc), RsmX, RsmY et RsmZ (Hovel-Miner *et al.*, 2009, Rasis *et al.*, 2009, Sahr *et al.*, 2012, Pitre *et al.*, 2013). Ces ARNnc séquestrent le répresseur de traduction CsrA dont l'expression est contrôlée par le système PmrB/PmrA (Rasis *et al.*, 2009, Sahr *et al.*, 2009), dé-réprimant ainsi la traduction d'ARNm codant des effecteurs du SST4 Dot/Icm, notamment ceux impliqués dans le détournement du trafic vésiculaire (Rasis *et al.*, 2009, Nevo *et al.*, 2014). Cette séquestration de CsrA permet également la dépression de l'ARNm de *fleQ* déclenchant ainsi, avec l'assistance du facteur σ^{54} RpoN, l'expression en cascade des gènes flagellaires (Figure 18).

Les systèmes de quorum sensing (QS) sont des mécanismes de signalisation permettant de contrôler l'expression de gènes spécifiques en fonction de la densité cellulaire via la production et la perception de molécules diffusibles appelées autoinducteurs. *L. pneumophila* possède un de ces systèmes, le système Lqs (Tiaden *et al.*, 2008). Ce système semble également être impliqué dans le contrôle de la transition de phase (Figure 18 et 19). Les souches délétées pour la synthétase d'autoinducteur LqsA, la kinase senseur LqsS ou le régulateur de réponse LqsR présentent des phénotypes en partie similaires à ceux des mutants Δ*rpoS* et Δ*letA* (Tiaden *et al.*, 2007, Spirig *et al.*, 2008, Tiaden *et al.*, 2008, Tiaden *et al.*, 2010). De plus, l'expression des gènes *lqsA*, *lqsR* et *lqsS* est

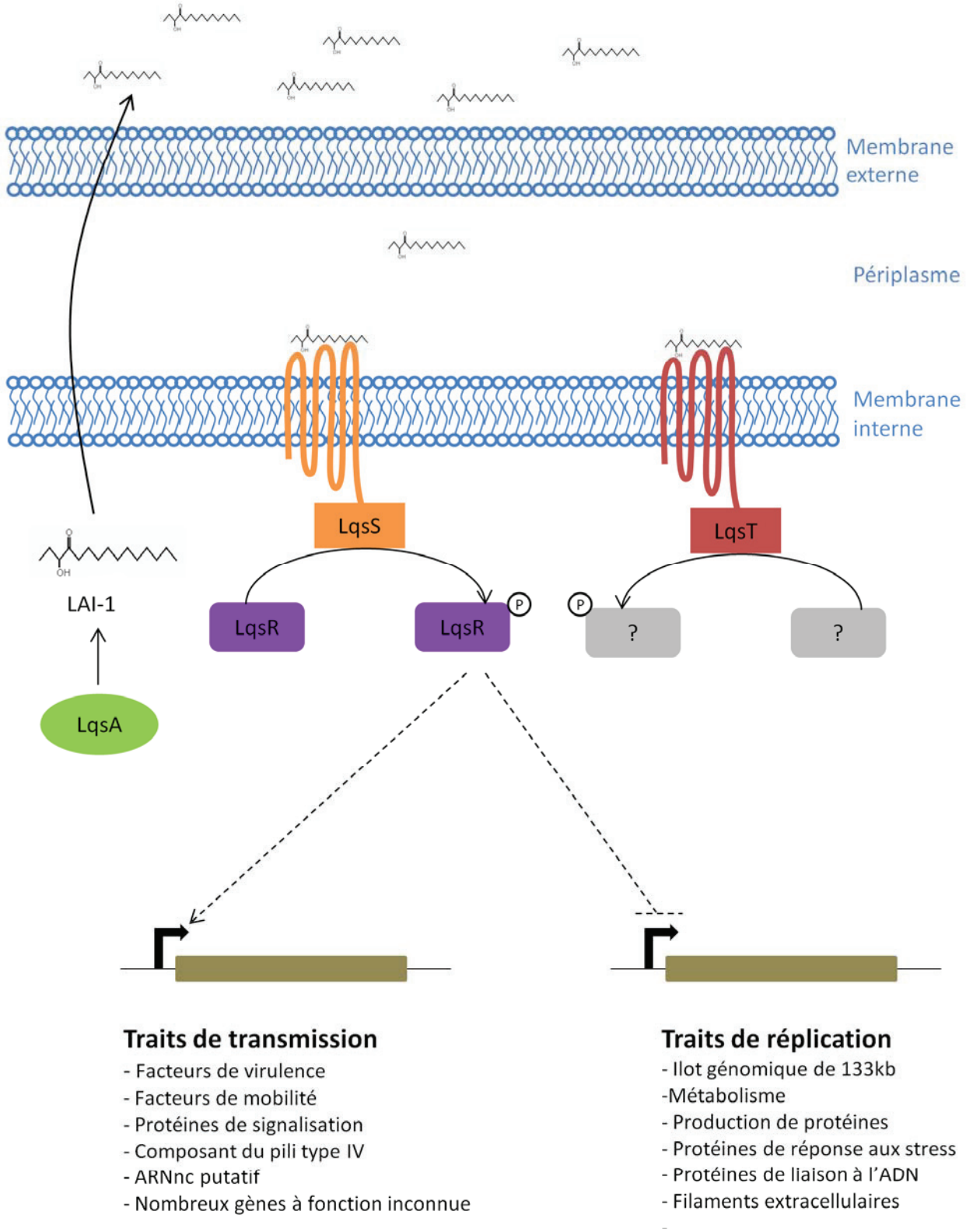


Figure 19 : Modèle du système de quorum sensing de *L. pneumophila*
La synthétase LqsA produit l'autoinducteur LAI-1 (3-hydroxypentadecan-4-one) en réponse à des signaux encore inconnus. Une fois dans le milieu extérieur, LAI-1 est capable de se fixer sur les senseusr-kinases membranaires LqsS et LqsT. En réponse à cette fixation, LqsS phosphoryle son régulateur de réponse LqsR. Le régulateur de réponse de LqsT n'est pas connu : il pourrait s'agir de LqsR ou d'une autre protéine (Kessler *et al.,* 2013). LqsR est capable d'agir via des mécanismes encore inconnus sur l'expression de nombreux gènes. Il tend à activer l'expression des traits de transmission et d'inhiber celle des facteurs de réplication.

particulièrement induite en début et milieu de phase stationnaire de croissance, lors de laquelle la bactérie est dans un état proche de la phase de transmission (Kessler *et al.*, 2013). Le gène *lqsR* est, par ailleurs, sous le contrôle transcriptionnel de deux régulateurs de la transition de phase : RpoS et LetA (Figure 18) (Tiaden *et al.*, 2007). Enfin, les analyses transcriptomiques réalisées sur les mutants Δ*lqsA*, Δ*lqsR* et Δ*lqsS* ont révélé que les trois protéines correspondantes participent à l'induction de l'expression des traits de transmission et à l'inhibition de la production des traits de la phase réplicative (Tiaden *et al.*, 2007, Tiaden *et al.*, 2008, Tiaden *et al.*, 2010). Récemment, un nouveau participant à ce système a été identifié, une seconde kinase senseur, LqsT, dont le régulateur de réponse reste à mettre en évidence (Figure 19) (Kessler *et al.*, 2013). Ces données suggèrent donc que la densité bactérienne est probablement l'un des signaux pris en compte par *L. pneumophila* pour amorcer la transition de phase.

Ce modèle de régulation est certainement encore incomplet puisque les phases stationnaire de croissance et transmissive ne sont pas exactement identiques. En effet, la comparaison des données transcriptomiques obtenues *in vivo* (phase réplicative/transmissive) et *in vitro* (phase exponentielle/stationnaire de croissance) a mis en évidence que près de 33% des gènes induits en phase transmissive ne le sont pas en phase stationnaire de croissance (Brüggemann *et al.*, 2006). Ces résultats suggèrent que certaines voies de régulation ne sont probablement activées qu'en réponse à des signaux de l'environnement intracellulaire, dont peut-être les signaux activant les systèmes à deux composants dans le modèle proposé. De plus, environ 60% des 713 ARNnc identifiés dans le génome de *L. pneumophila* ont une expression dépendante de la phase de croissance, ce qui laisse penser que certains pourraient aussi jouer un rôle dans la régulation de cette transition de phase (Sahr *et al.*, 2012).

2.1.3.6 La sortie de la cellule-hôte

De même que l'entrée dans la cellule-hôte, la libération de *L. pneumophila* dans le milieu extérieur est un mécanisme encore mal connu. Une hypothèse longtemps proposée était que la lyse de la cellule hôte était la conséquence du trop grand nombre de bactéries mobiles à l'intérieur de la cellule eucaryote, laquelle voyait sa membrane rompre sous les contraintes physiques. Cependant, des études plus récentes tendent à montrer que la bactérie rompt activement sa cellule-hôte (Molmeret *et al.*, 2004a). Ce mécanisme aurait lieu en deux temps : tout d'abord, les bactéries sont libérées de la LCV dans le cytoplasme, au sein duquel la bactérie continue à se répliquer, puis les bactéries sont délivrées dans le milieu extérieur provoquant alors la mort de la cellule-hôte (Molmeret *et al.*, 2004a). Ce mécanisme actif permettant de contrôler la sortie de la bactérie pourrait cibler et détourner l'un des processus de mort cellulaire de l'hôte ou bien mettre en jeu une activité cytotoxique de la bactérie.

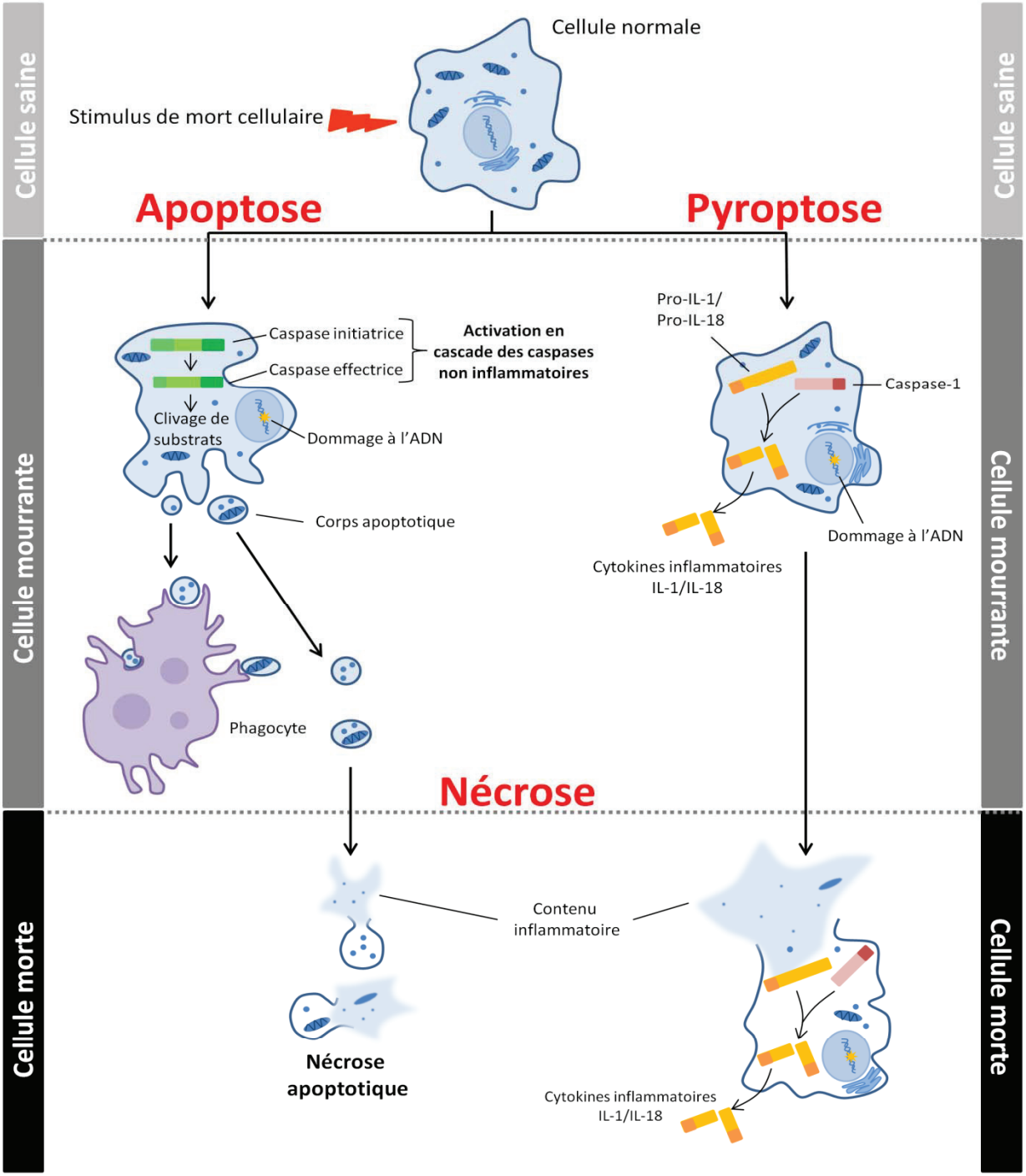


Figure 20 : Types de mort cellulaire (d'après Fink *et al.*, 2005).
La mort des cellules saines peut être initiée par des stimuli activant différentes voies moléculaires. L'apoptose est une voie de mort cellulaire dont les principales caractéristiques sont : l'activation de la cascade des caspases, la condensation du cytoplasme et du noyau, les dommages sur l'ADN, la formation de corps apoptotiques et le maintien de l'intégrité de la membrane plasmique. Les corps apoptotiques formés peuvent être pris en charge par des phagocytes qui permettront leur dégradation. Si ce n'est pas le cas, ceux-ci peuvent alors être dégradés par nécrose apoptotique. La pyroptose est une voie de mort cellulaire activée par la caspase-1, une protéase qui active notamment les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1β ou l'IL-18. La nécrose réfère aux effets morphologiques de la mort cellulaire, c'est-à-dire à la perte d'intégrité de la membrane plasmique ainsi que le relargage du contenu cellulaire dans l'environnement.
Caspases initiatrices : caspases 2, 8, 9 et 10.
Caspases effectrices : caspases 3, 6 et 7.

L'apoptose est le mécanisme de mort cellulaire dont la description est la plus détaillée. Elle est décrite comme un processus actif, programmé et autonome de démantèlement cellulaire sans activation de l'inflammation (Fink *et al.*, 2005). La morphologie associée à ce phénomène est caractérisée par une condensation nucléaire et cytoplasmique ainsi qu'une fragmentation cellulaire dans des vésicules appelés corps apoptotiques (Figure 20). Ces corps apoptotiques peuvent être pris en charge par d'autres cellules, particulièrement par les phagocytes, et dégradés via la voie endosomale (Figure 20). Le mécanisme d'apoptose dépend de protéases spécifiques, les caspases (*c*ysteine-dependent *asp*artate-specific prote*ases*). Celles-ci sont classées en deux catégories : les caspases initiatrices (2, 8, 9, 10) qui sont responsables de l'activation de caspases effectrices (3, 6, 7) à l'origine du clivage de différents substrats et par conséquent du démantèlement cellulaire (Figure 20). Il existe deux voies d'activation de l'apoptose : la voie extrinsèque impliquant des récepteurs de la superfamille des récepteurs au TNF (Tumor Necrosis Factor) et la voie intrinsèque dans laquelle les mitochondries jouent un rôle clé. En effet, l'espace intermembranaire des mitochondries contient le cytochrome *c* ainsi que des activateurs de caspases comme AIF (Apoptosis Inducing Factor). La libération de ces molécules, contrôlée par les protéines de la famille BCL-2, est causée par la perturbation de la membrane externe mitochondriale par les protéines BAX et BAK capables de s'enchâsser dans cette membrane pour former des pores et de stimuler l'ouverture de canaux VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel) (Shimizu *et al.*, 1999, Chinnadurai *et al.*, 2008). La libération de cytochrome *c* dans le cytoplasme mène à l'assemblage d'un complexe supramoléculaire appelé apoptosome qui initie l'activation des caspases (Riedl *et al.*, 2007).

Des observations en microscopie électronique ont permis de mettre en évidence qu'en fin de cycle infectieux de *L. pneumophila*, la chromatine de la cellule-hôte se condense, ce qui est une caractéristique de l'apoptose (Molmeret *et al.*, 2004a). Il est par ailleurs démontré que la caspase-3 (effectrice) est activée par *L. pneumophila* chez les macrophages (Molmeret *et al.*, 2004b) par le biais de différents effecteurs : Ceg18, Lpg0716, Lem12, LegS2, VipD (Zhu *et al.*, 2013). La plupart de ces effecteurs sont retrouvés au niveau des mitochondries, éléments centraux dans le contrôle de l'apoptose. Plus précisément, VipD induit la libération de cytochrome *c* en compromettant l'intégrité des membranes mitochondriales via son activité phospholipase A2, induisant par conséquent l'activation de la caspase-3 (Zhu *et al.*, 2013). Cependant, l'apoptose peut être bloquée d'une manière dépendante du SST4 Dot/Icm par d'autres effecteurs, comme SidF (Banga *et al.*, 2007), via l'activation de voies anti-apoptotiques liées au facteur NF-κB (Nuclear Factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells) (Abu-Zant *et al.*, 2007). En effet, le contrôle négatif de l'apoptose et donc l'inhibition de la mort prématurée de la cellule infectée sont vraisemblablement favorables dans un premier temps à la multiplication des légionelles. Par conséquent, *L. pneumophila*

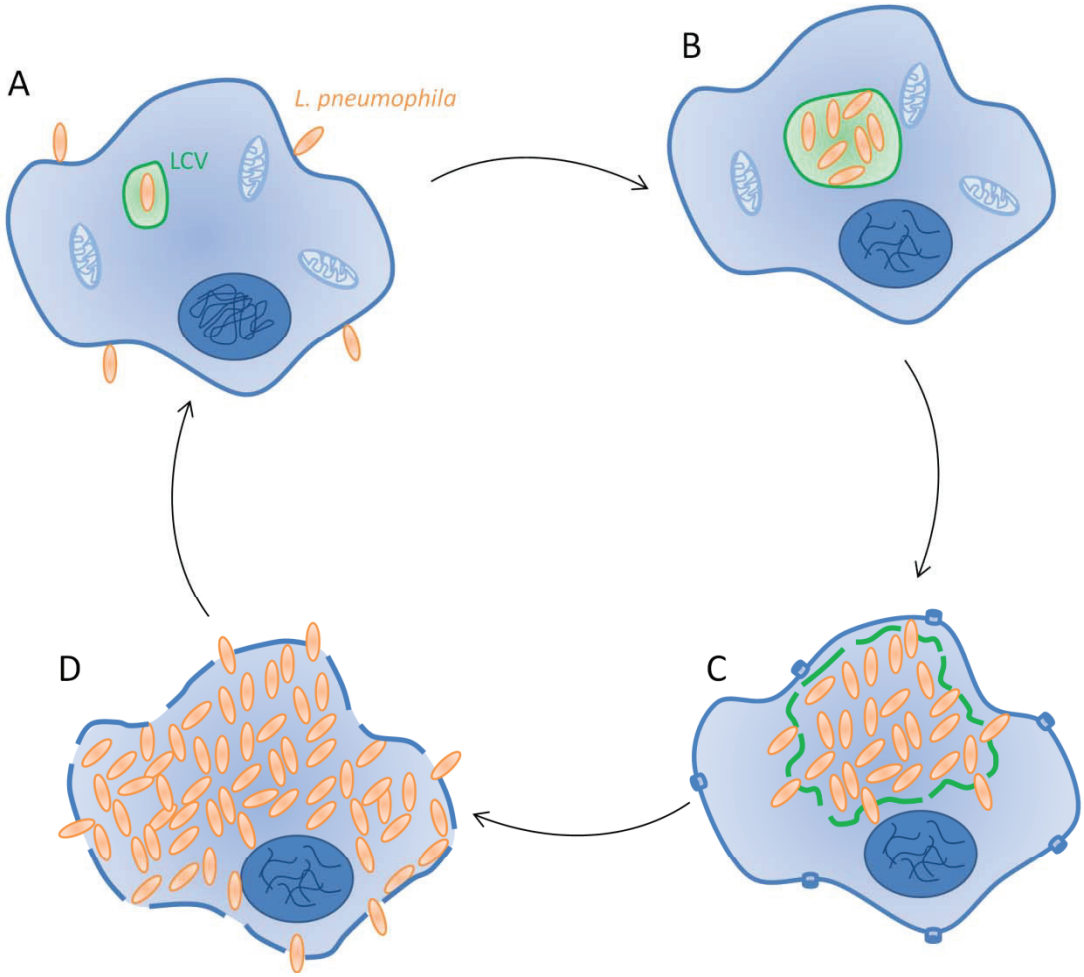


Figure 21 : Modèle de sortie par lyse de la cellule-hôte par *L. pneumophila*. (d'après Molmeret *et al*., 2002a et Molmeret *et al.,* 2010).

(A) Après attachement à la cellule-hôte, il est probable que l'insertion du SST4 Dot/Icm provoque une rupture d'intégrité dans la membrane plasmique. Cependant, les dommages engendrés sur la membrane plasmique peuvent être réparés à ce stade de l'infection, sauf dans le cas d'une importante quantité de bactéries où les dommages pourraient être irréversibles et conduirait à la lyse de la cellule.

(B) Au cours des étapes précoces de l'infection et pendant la réplication intracellulaire exponentielle de la bactérie, la sécrétion de la toxine à activité pore-forming serait inhibée puisque l'hôte doit être viable pour que la bactérie forme sa LCV et s'y multiplie.

(C) Les mécanismes permettant la sortie de la LCV ne sont pas encore décrits. Cependant, ils ne semblent pas impliquer l'activité pore-forming de la bactérie.

(D) Les pores sont ensuite formés dans la membrane plasmique de l'hôte, menant à une lyse osmotique de la cellule et à la libération des bactéries intracellulaires

est probablement capable de contrôler de façon temporelle la sécrétion de ses effecteurs afin tout d'abord d'inhiber, puis d'activer l'apoptose en fonction de l'avancement du cycle infectieux.

La pyroptose est également un mécanisme de mort programmée (Figure 20). Elle est activée par la caspase-1 qui initie une réponse inflammatoire via l'activation par clivage des cytokines inflammatoires pro-IL1β et pro-IL18 (Figure 20) (Fantuzzi *et al.*, 1999, Fink *et al.*, 2005). Morphologiquement, les effets de cette mort cellulaire sont la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN ainsi que les effets observés lors de la nécrose, c'est-à-dire la formation de pores dans la membrane plasmique qui engendre un déséquilibre du gradient ionique. L'augmentation de la pression osmotique provoque alors une entrée massive d'eau et, par conséquent, un gonflement puis un éclatement de la cellule. Dans le même temps, le contenu cytosolique est libéré dans le milieu extérieur (Figure 20). Historiquement, la nécrose était considérée comme un mécanisme à part entière de mort accidentelle de la cellule. Actuellement, elle est plutôt considérée comme la conséquence de la mort par apoptose ou pyroptose (Fink *et al.*, 2005).

La pyroptose est particulièrement nécessaire à l'hôte pour restreindre la multiplication de *L. pneumophila*. En effet, dans les lignées macrophagiques murines, peu permissives à la multiplication de *L. pneumophila*, ce type de mort cellulaire est rapidement déclenché via l'activation de la caspase-1 par les NLR (NOD-like receptors) NAIP5 et NLRC4 en réponse à la détection de la flagelline de la bactérie (Silveira *et al.*, 2010, Byrne *et al.*, 2013). De plus, la lignée murine A/J, permissive à l'infection par *L. pneumophila,* ne possède pas cette protéine NAIP5, puisque le gène correspondant se situe au niveau du locus *Lgn1* du chromosome 13, absent chez ces souris (Watarai *et al.*, 2001, Diez *et al.*, 2003). Au contraire, à l'instar de l'apoptose, la pyroptose est probablement contrôlée par *L. pneumophila* dans son hôte macrophagique humain afin d'éviter sa mort précoce. Les macrophages humains possèdent pourtant la protéine NAIP, dont le rôle est identique à la protéine NAIP5 murine (Katagiri *et al.*, 2012), mais la présence de *L. pneumophila* à l'intérieur de macrophages humains de type U937 ou THP-1 n'engendre qu'une très faible activation de la caspase-1, donc de la pyroptose, et par conséquent une très faible restriction de la croissance intracellulaire de la bactérie (Yang *et al.*, 2013b), suggérant que ce mécanisme peut être contrôlé par la bactérie via des mécanismes qui restent encore à éclaircir.

Il est aussi envisagé par Molmeret *et al*. que *L. pneumophila* rompe activement sa LCV puis sa cellule-hôte par le biais d'une activité de formation de pores (ou activité pore-forming) (Figure 21) (Molmeret *et al.*, 2002a). La découverte de mutants incapables de lyser leur hôte, piégés dans le cytoplasme de l'hôte malgré leur réplication efficace, appuie cette hypothèse (mutant *rib* pour

Release of Intracellular Bacteria) (Gao *et al.*, 2000). Les auteurs ont pu lier l'absence de sortie de la cellule à l'absence d'activité pore-forming des mutants et à une mutation ponctuelle dans le gène *icmT* (Molmeret *et al.*, 2002c). Ils ont proposé un modèle selon lequel cette activité pore-forming des bactéries leur permettrait de sortir de la LCV puis de la cellule. Depuis, ce modèle a été revu car une étude portant sur la disruption de la LCV a montré que celle-ci n'est pas due à l'activité pore-forming de *L. pneumophila* (Molmeret *et al.*, 2010).

Enfin, certaines études suggèrent un processus de sortie non lytique des protozoaires au cours duquel la membrane de la LCV fusionnerait avec la membrane plasmique de l'hôte (Chen *et al.*, 2004). Les effecteurs LepA et LepB, qui présentent des similarités avec les protéines de type SNARE, permettraient la fusion de la membrane de la LCV avec la membrane plasmique, libérant la bactérie directement dans l'environnement extérieur. Néanmoins, le mécanisme précis mis en place reste à élucider et, en particulier, le rôle de LepB, protéine connue par ailleurs pour participer au détournement des petites GTPases (Ingmundson *et al.*, 2007).

2.1.4 La formation de biofilms par *L. pneumophila*

Une fois libérée dans son environnement aquatique naturel, *L. pneumophila* est capable de coloniser différentes surfaces et de se maintenir au sein de biofilms, correspondant à une structure complexe formée de micro-organismes entourés d'une matrice extracellulaire dont la composition dépend des espèces bactériennes présentes dans le biofilm. Ce mode de vie, qualifié de sessile, lui confère une résistance accrue aux traitements de désinfection des réseaux d'eau en comparaison à sa résistance sous forme de bactérie planctonique (Cooper *et al.*, 2010). Du fait de la vie intracellulaire de cette bactérie, il est difficile d'évaluer si cette résistance est liée à la structure du biofilm qui peut limiter la diffusion des biocides, à la présence dans ces biofilms de protozoaires, parfois sous une forme enkystée, dans lesquels *L. pneumophila* peut s'abriter, se répliquer ou les deux à la fois. De plus, il a été mis en évidence ces dernières années que *L. pneumophila* peut entrer dans un état viable mais non cultivable, notamment lorsque les conditions de croissance ne leur sont pas favorables (Moritz *et al.*, 2010). Une partie des légionelles présentes dans les biofilms des réseaux d'eau ou tours aéro-réfrigérantes sont probablement sous cette forme particulièrement résistante, permettant une meilleure survie du fait d'un métabolisme ralenti et d'une enveloppe plus résistante (Gião *et al.*, 2009).

La survie de *L. pneumophila* dans l'environnement sous forme de biofilms pourrait dans certains cas favoriser la virulence de la bactérie. En effet, les bactéries dérivées de biofilms sont plus infectieuses vis-à-vis des macrophages murins que les bactéries planctoniques et échappent plus efficacement à la dégradation par la voie endosomale (Abu Khweek *et al.*, 2013). Cette observation

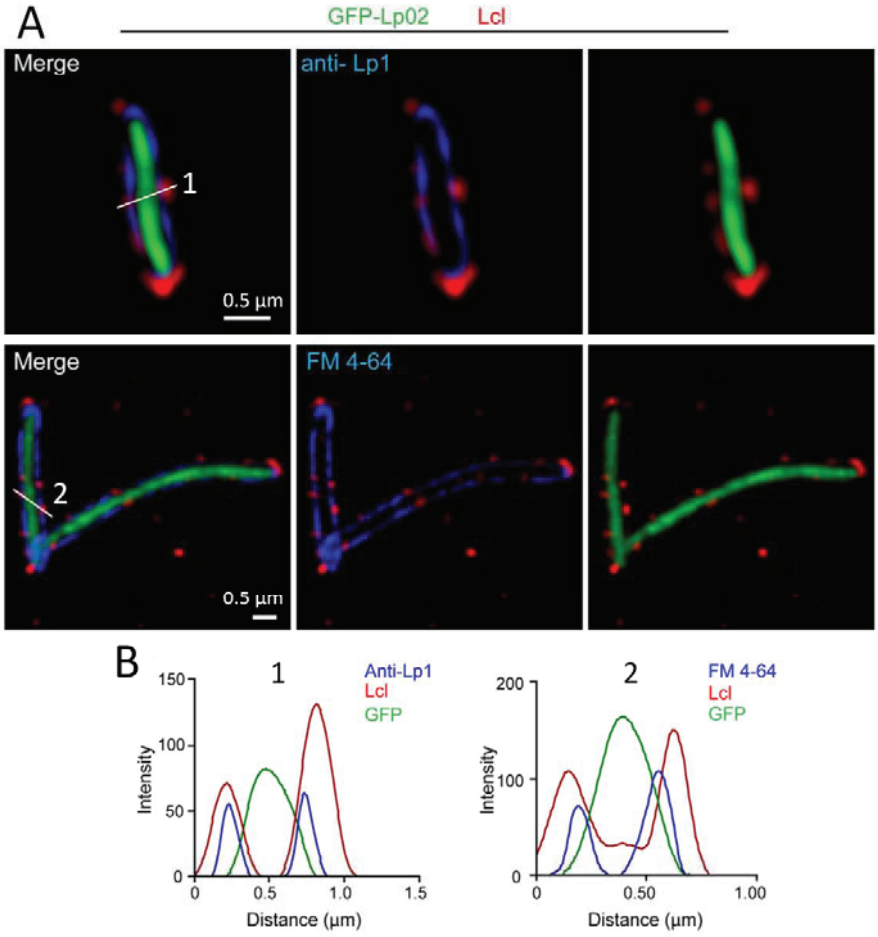


Figure 22 : Localisation cellulaire de l'adhésine Lcl de *L. pneumophila* (d'après Mallegol *et al.*, 2012).

(A) Lcl est présente à la surface de Lcl sous forme de puncta. Lcl est immuno-marquée avec des anticorps primaires anti-Lcl et des anticorps secondaires conjugués à un fluorophore Alexa 555 (rouge). Les bactéries apparaissent en vert car elles produisent la GFP. La surface de *L. pneumophila* apparait en bleu par immunomarquage de la membrane externe avec des anticorps anti-*Legionella* (en haut) ou par marquage de la membrane interne avec la sonde lipophile FM 4-64 (en bas). (B) La localisation de Lcl a été déterminée par comparaison des intensités de fluorescence le long des lignes blanches indiquées sur les clichés.

est assez surprenante au vu de données transcriptomiques recueillies à partir de bactéries sessiles (Hindré *et al.*, 2008). En effet, les traits de transmission (gènes codant des effecteurs du SST4 Dot/Icm et gènes flagellaires) sont réprimés lorsque les bactéries sont sous forme de biofilms. La virulence accrue des bactéries sessiles provient probablement du fait qu'elles ne sont pas flagellées. Ainsi, elles ne déclenchent pas les caspases 1 et 7 de l'inflammasome : elles échappent donc mieux au système immunitaire de l'hôte notamment dans un modèle murin où cette réponse immunitaire est particulièrement efficace (Abu Khweek *et al.*, 2013).

2.1.4.1 Les facteurs endogènes de *L. pneumophila* impliqués dans la formation de biofilms

Peu de facteurs moléculaires de *L. pneumophila* impliqués dans la formation de biofilms ont été clairement identifiés. L'adhésine Lcl et le pilus de type IV sont les seules structures ayant été mises en évidence dans ce processus à ce jour.

L'adhésine Lcl est une adhésine de type fixatrice de glycoaminoglycane qui est présente à la surface de la bactérie sous forme de puncta (Figure 22) (Mallegol *et al.*, 2012). Elle permet l'adhésion aux cellules hôtes mais elle participe aussi à la formation de biofilms en favorisant les interactions avec les surfaces abiotiques, la matrice extracellulaire et les autres cellules du biofilm (Vandersmissen *et al.*, 2010, Duncan *et al.*, 2011, Mallegol *et al.*, 2012). L'expression de Lcl est modulée au cours de la transition de phase et est particulièrement induite pendant la phase stationnaire (Mallegol *et al.*, 2012).

Le pilus de type IV a tout d'abord été impliqué dans l'adhérence de *L. pneumophila* aux cellules protozoaires ou mammifères (Stone *et al.*, 1998, Yaradou *et al.*, 2007). Cependant, certaines données suggèrent que les pili pourraient participer de manière encore plus importante à l'adhésion aux surfaces et à la formation de biofilms. En effet, un mutant Δ*pilE,* incapable de produire un pilus de type IV, ne présente aucun défaut de croissance intracellulaire dans les amibes ou les macrophages (Stone *et al.*, 1998) ou de colonisation d'un biofilm contenant des amibes (Lucas *et al.*, 2006). Par contre, Δ*pilE* est défaillant dans la colonisation d'un biofilm uniquement bactérien puisque la colonisation de biofilms est 1000 fois moins efficace que celle de la souche sauvage après 15 jours (Lucas *et al.*, 2006). De plus, des mutants Δ*tatB* et Δ*tatC* du système d'exportation Tat ont, eux aussi, des défaut de formation de biofilms (De Buck *et al.*, 2005). Ce système permet notamment l'exportation de différents substrat et son absence conduit à un phénotype pléiotrope (défaut de formation de biofilms mais aussi de multiplication intracellulaire). Les substrats du système Tat requis pour la formation de biofilms restent encore à identifier.

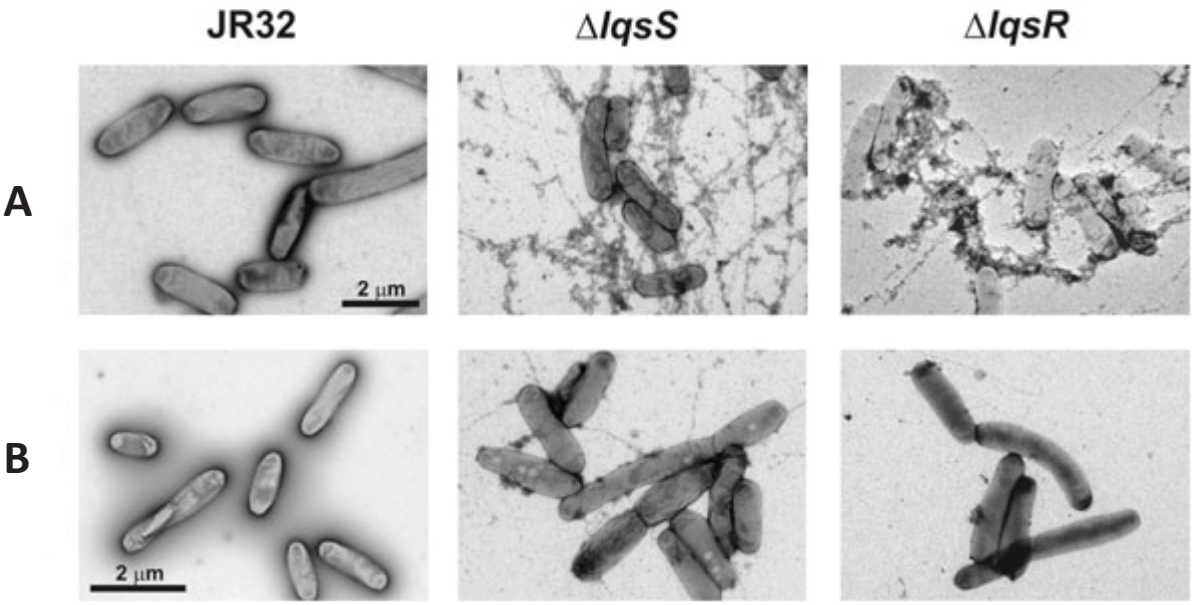


Figure 23 : Le système Lqs contrôle la formation de filaments extracellulaires (d'après Tiaden *et al.,* 2010).
Les clichés de microscopie électronique présentés ont été réalisés après la sédimentation pendant 12h d'une culture de *L. pneumophila* à DO≈3,5. Les échantillons ont été lavés (B) ou non (A) avec de l'eau avant leur montage sur les supports de microscopie électronique.

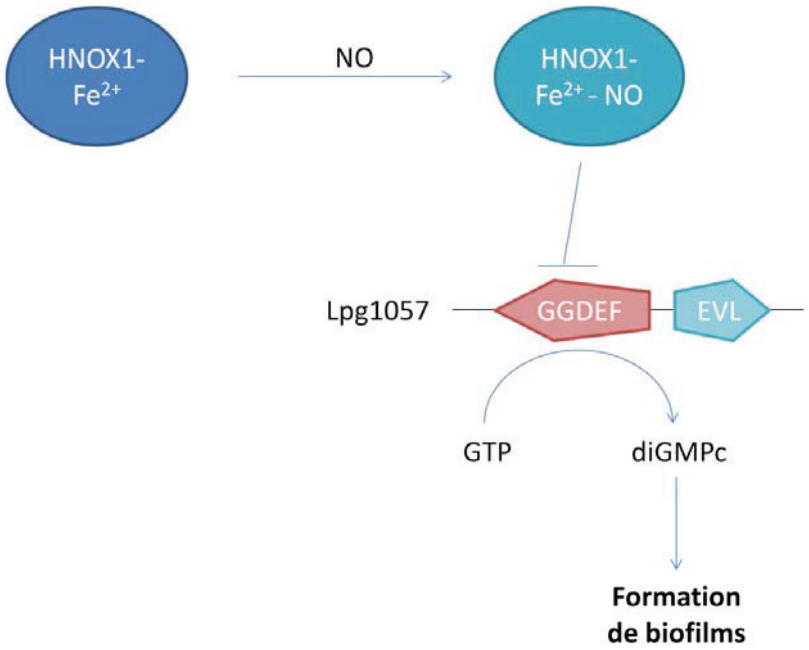


Figure 24 : Modèle de fonctionnement du système Hnox1-Lpg1057 de *L. pneumophila* (d'après Carlson *et al.,* 2010).
La protéine Hnox1 inhibe l'activité diguanylate cyclase de Lpg1057 à domaine GGDEF et EAL dégénéré (EVL) en réponse à la présence d'oxyde nitrique (NO). Cette inhibition mène à la diminution de la concentration intracellulaire en diGMPc et par conséquent à une réduction de la formation de biofilms.

De même, les systèmes de régulation de la formation de biofilms chez *L. pneumophila* sont mal connus. Les systèmes classiques comme le quorum sensing, la signalisation via le di-GMP cyclique ou via l'alarmone (p)ppGpp ont des rôles encore incertains dans ce processus.

Chez certaines espèces bactériennes, comme *Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae* ou *Streptococcus mutans*, les systèmes de quorum sensing contrôlent la formation de biofilms (Sauer *et al.*, 2002, Balestrino *et al.*, 2005, Huang *et al.*, 2009, De Araujo *et al.*, 2010, Kamruzzaman *et al.*, 2010). D'après les travaux de Tiaden *et al.*, le système de QS de *L. pneumophila*, Lqs, ne serait pas impliqué dans la formation de biofilms (Mampel *et al.*, 2006, Tiaden *et al.*, 2010). Par ailleurs, quelques données suggèrent qu'au contraire ce système Lqs pourrait être lié à la formation de biofilms. Tout d'abord, ce système Lqs permet de contrôler l'expression de filaments extracellulaires, formant une sorte de matrice extracellulaire, qui limitent la sédimentation de la bactérie (Figure 23) (Tiaden *et al.*, 2010). De tels filaments sont impliqués dans la formation de biofilms chez différentes bactéries dont *Listeria monocytogenes* et *Salmonella* Typhimurium (Baugh *et al.*, 2012, Renier *et al.*, 2013). Ces filaments joueraient un rôle d'adhésion et participeraient à la fixation de la bactérie aux surfaces et/ou aux cellules voisines. Il a également été mis en évidence que certains auto-inducteurs synthétisés par *P. aeruginosa*, les N-3-oxo-dodecanoyl-L-homoserine lactone (3-oxo-C_{12}-HSL), sont perçus par *L. pneumophila* et inhibent la colonisation de biofilms. Bien que la voie de perception de ces molécules ne soit pas encore clairement établie, il semblerait que cette inhibition est le résultat d'une répression de la transcription de *lqsR* et du gène codant l'adhésine Lcl (Kimura *et al.*, 2009, Mallegol *et al.*, 2012).

Les voies de signalisation utilisant le messager secondaire diGMP cyclique (diGMPc) sont impliquées chez différentes bactéries dans divers processus cellulaires dont la transition entre les modes de vie sessile et planctonique (Römling *et al.*, 2013). *L. pneumophila* possède 22 gènes codant des protéines responsables de la synthèse et/ou de la dégradation du diGMPc (Levi *et al.*, 2011). Une de ces protéines, Lpg1057, synthétisant du diGMPc, participe à la formation de biofilms de cette bactérie (Carlson *et al.*, 2010). En effet, l'activité enzymatique de cette protéine est modulée par la protéine Hnox1 en réponse à la présence d'oxyde nitrique (NO) (Figure 24). A ce jour, Lpg1057 est la seule protéine du métabolisme du diGMPc qui est liée à la formation de biofilms chez *L. pneumophila*. Il est aussi possible que la protéine Lpg0829, un orthologue de LapD de *Pseudomonas fluorescens,* contrôle son adhésion en réponse à la disponibilité en diGMPc, participe à la formation de biofilms chez les légionelles (Chatterjee *et al.*, 2012, Abdel-Nour *et al.*, 2013). En effet, chez *P. fluorescens*, LapD séquestre la protéase périplasmique LapG en réponse à la présence de diGMPc (Figure 25). Cette séquestration permet à l'adhésine LapA de rester intacte à la surface de la bactérie et d'assurer

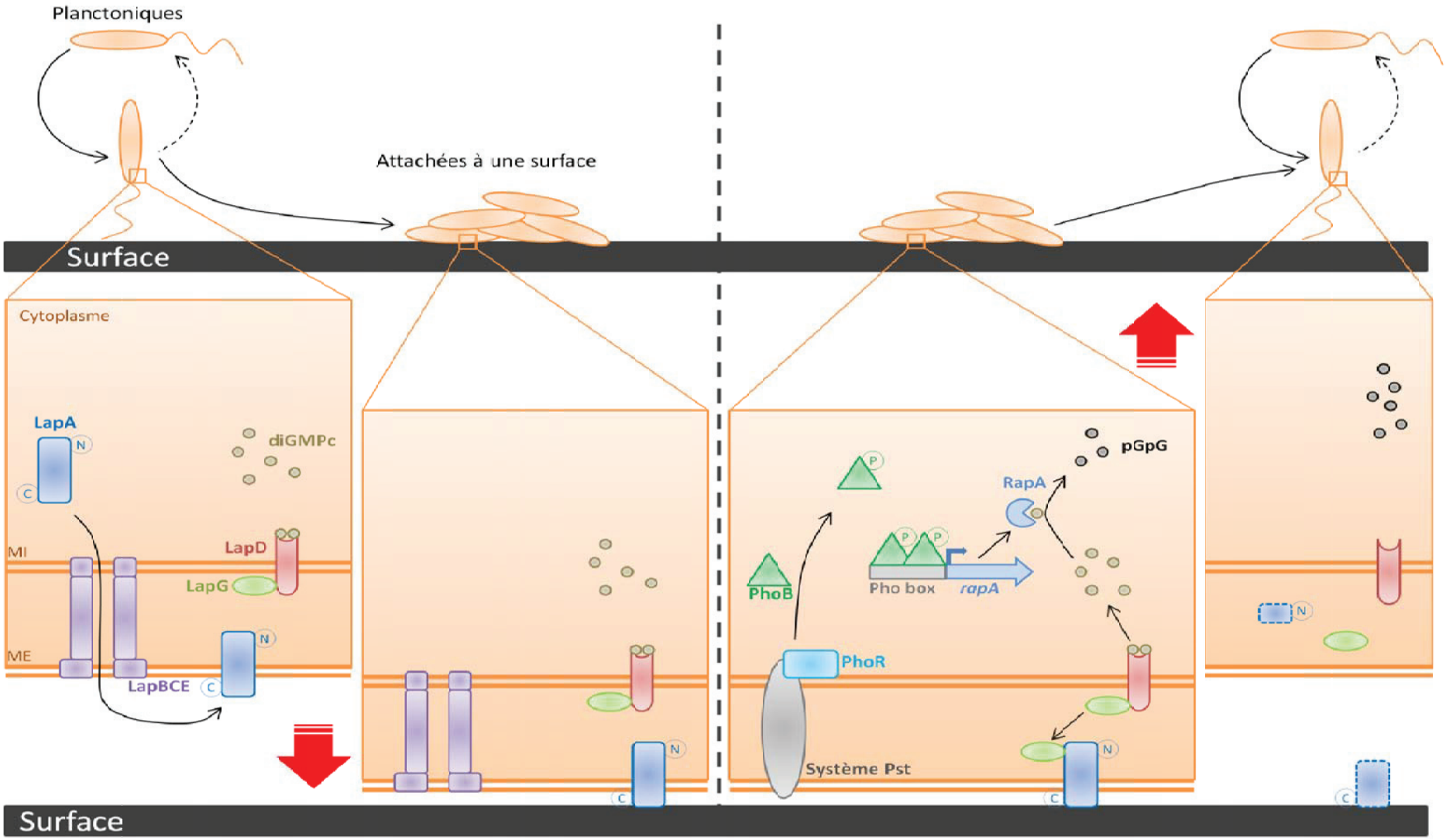


Figure 25 : Modèle de fonctionnement du système Lap de *Pseudomonas fluorescens.*

LapA est transportée sur la face externe de la membrane externe (ME) par le transporteur de type ABC LapBCE. *P. fluorescens* adhère à la surface. En présence de diGMPc, LapD séquestre LapG empêchant ainsi le clivage de LapA. En réponse à des signaux environnementaux (disponibilité en phosphate inorganique), le système de transport Pst et surtout le système à deux composants PhoR/PhoB induisent l'expression de la phosphodiestérase RapA. RapA dégrade le diGMPc en pGpG. L'absence de diGMPc fixé à LapD entraine un changement de sa conformation dans la membrane interne (MI), libérant la protéase LapG, qui clive alors LapA. La bactérie se décroche alors du support.

son adhésion à une surface (Newell *et al.*, 2011b). Cependant, le rôle de Lpg0829 reste à établir expérimentalement.

Enfin, l'alarmone (p)ppGpp connue pour son rôle dans le contrôle de la transition de phase de *L. pneumophila* pourrait également participer au contrôle de la formation de biofilms. Ce messager secondaire, produit en réponse à la carence en nutriments, influence la production du facteur σ RpoS (Hammer *et al.*, 1999, Bachman *et al.*, 2001). En plus de contrôler l'expression des gènes de virulence et de mobilité, RpoS module l'expression du régulateur de réponse du QS LqsR (Tiaden *et al.*, 2007). Ainsi, le (p)ppGpp pourrait jouer indirectement sur la formation de biofilm via le contrôle de l'expression des composants du QS. Cependant, des souches délétées pour *rpoS*, *letA* ou *csrA*, appartenant aux voies de régulation de la transition de phase, ne présentent aucun défaut de formation de biofilm, suggérant que ce rôle pourrait être minoritaire (Mampel *et al.*, 2006). Seul l'absence du facteur σ^{28} FliA semble avoir un impact sur la formation de biofilm qui se traduit par une diminution de la biomasse d'environ 30% en 5 jours (Mampel *et al.*, 2006). FliA pourrait donc contrôler positivement la formation de biofilms bien que le mécanisme impliqué soit encore obscur (Mampel *et al.*, 2006).

2.1.4.2 Déterminants physicochimiques de la formation/colonisation de biofilms

Certains déterminants physicochimiques influant sur la formation de biofilms par *L. pneumophila* ont également été identifiés. Ce sont des paramètres relativement prévisibles comme la température ou l'état stagnant/turbulent de l'environnement aquatique mais également d'autres paramètres comme la présence favorable ou défavorable de certains cations divalents ou l'effet de la concentration en fer dans l'environnement.

La température de l'environnement aquatique est un paramètre important pour la formation de biofilms par *L. pneumophila* (Martinelli *et al.*, 2000, van der Kooij *et al.*, 2005). Elle joue particulièrement sur la structure et les propriétés de ces biofilms. En effet, à 37°C, les biofilms de *L. pneumophila* sont épais et composés de bactéries filamenteuses en comparaison à ceux formés à 25°C (Figure 26) (Piao *et al.*, 2006). Ces données sont cohérentes avec une étude mettant en évidence que la filamentation des légionelles est contrôlée en fonction de la température (Konishi *et al.*, 2006). Chez de nombreuses espèces bactériennes, la filamentation a lieu dans le but d'améliorer le fitness des bactéries lorsque celles-ci sont dans des conditions pas ou peu favorables à leur croissance (Justice *et al.*, 2008). Cela semble également être le cas pour *L. pneumophila* puisqu'elle présente une meilleure croissance planctonique lorsqu'elles sont issues d'un biofilm plutôt qu'après culture en milieu liquide (Piao *et al.*, 2006). Les bactéries filamenteuses internalisées par une cellule-hôte se développent aussi plus rapidement que les légionelles non filamenteuses vraisemblablement

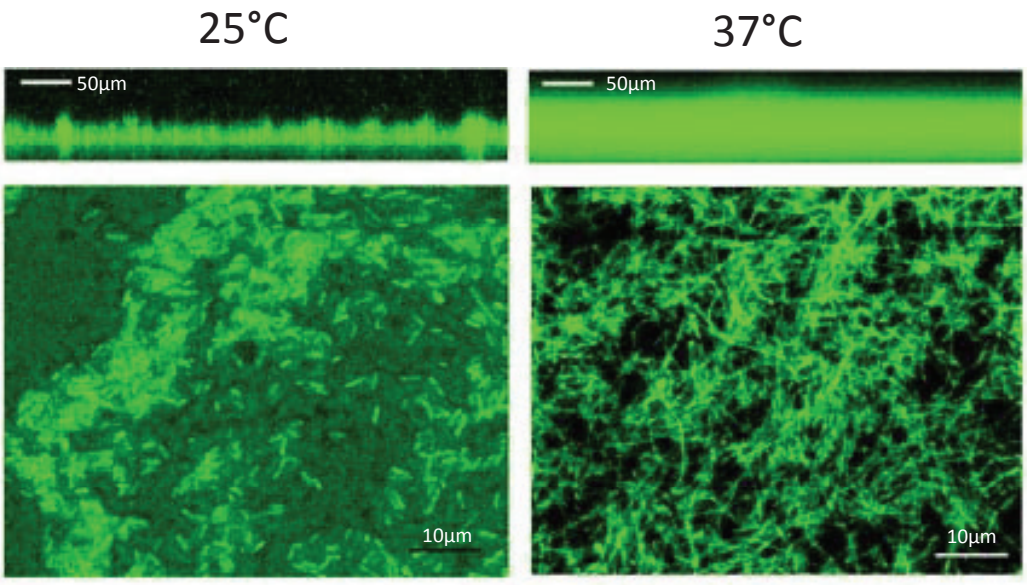


Figure 26 : Structure de biofilms de *L. pneumophila* formés à 25°C et 37°C. (Piao *et al.*, 2006).
Une souche de *L. pneumophila* exprimant la protéine fluorescente verte (GFP) a été utilisée pour former des biofilms mono-espèce à 25°C et 37°C. Les biofilms formés à 25°C et 37°C ont été observés après 18 et 4 jours de croissance, respectivement.

du fait de leur meilleure adhésion aux cellules-hôtes (Piao *et al.*, 2006, Prashar *et al.*, 2012). Les biofilms formés à 25°C sont plus adhérents aux surfaces que ceux formés à 37°C (Piao *et al.*, 2006). Ceci résulterait de la production différentielle de structures d'adhésion, dont notamment les pili de type IV, en fonction de la température (Liles *et al.*, 1998).

Dans les systèmes de distribution d'eau, les conditions de flux jouent également un rôle important dans la formation de biofilm et la colonisation de biofilms par *L. pneumophila*. La stagnation est une condition favorable à la colonisation des réseaux par les légionelles (Ciesielski *et al.*, 1984). Cependant, si les conditions de flux turbulent entraine le décrochement d'une partie de la biomasse, les biofilms persistent néanmoins et permettent le maintien d'une population de *L. pneumophila* qui peut engendrer des cas cliniques de légionellose (Fisher-Hoch *et al.*, 1981, Storey *et al.*, 2004, Liu *et al.*, 2006, Lehtola *et al.*, 2007).

La présence de fer dans l'environnement aquatique peut influencer positivement la formation de biofilms et la réplication de *L. pneumophila* (Cianciotto, 2007). Ceci est illustré par un ensemble de données : (i) l'ajout de lactoferrine, un chélateur du fer, dans le milieu de culture est fatal pour le développement de biofilms par les légionelles (Orsi, 2004) ; (ii) les systèmes de transport de fer FeoA/FeoB sont essentiels pour la réplication extracellulaire et intracellulaire de la bactérie (Robey *et al.*, 2002) ; (iii) les délétions des gènes *lbtA* et *lbtB* codant respectivement une protéine de biosynthèse d'un sidérophore, la légiobactine, et son système de transport, altèrent la formation de biofilms (Allard *et al.*, 2006, Cianciotto, 2007) ; (iv) une analyse transcriptomique comparative entre les bactéries sessiles et planctoniques qui a révélé que les gènes *lpl0236* et *lpl0237*, codant des protéines orthologues de PvcA et PvcB de *P. aeruginosa* impliqués dans la synthèse du sidérophore pyoverdine, sont induits lorsque les bactéries sont sous forme de biofilms (Hindré *et al.*, 2008). Le fer est donc un élément indispensable à la croissance et à la formation de biofilms par *L. pneumophila*. Cependant, une trop grande concentration en fer peut avoir un effet inhibiteur sur la formation de biofilms (Hindré *et al.*, 2008).

La présence de cations divalents présents dans le milieu extracellulaire est également un paramètre capable d'influencer la formation de biofilms par *L. pneumophila*. L'effet de ces cations peut être bénéfique pour la croissance du biofilm ou bien défavorable. En effet, les ions calcium, zinc, manganèse ou magnésium (Ca^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+} ou Mg^{2+}) participent aux mécanismes d'adhérence des légionelles sur les surfaces biotiques ou abiotiques (Yaradou *et al.*, 2007, Bargellini *et al.*, 2011, Koubar *et al.*, 2013). Certains de ces cations divalents (Ca^{2+}, Mg^{2+} ou Zn^{2+}) sont particulièrement nécessaires pour l'adhésion cellule/cellule via l'adhésine Lcl (Abdel-Nour *et al.*, 2014). Il est aussi possible que le calcium joue sur l'adhésion des bactéries via Lpg0828, l'homologue de LapG de *P. fluorescens*, une protéase périplasmique dépendante du calcium impliquée dans le clivage de

l'adhésine LapA (Figure 25) (Boyd *et al.*, 2012, Chatterjee *et al.*, 2012). D'autres ions dont les cations cuivre et argent (Cu^{2+} et Ag^{2+}) ont, quant à eux, un effet négatif sur la formation ou la colonisation de biofilms par *L. pneumophila* (Rogers *et al.*, 1994, van der Kooij *et al.*, 2005, Unger *et al.*, 2012).

2.1.4.3 Influence de la présence de protozoaires et d'autres espèces bactériennes dans les biofilms

Dans l'environnement, *L. pneumophila* fait partie de biofilms complexes contenant différentes espèces bactériennes ainsi que des organismes protozoaires. La nature de chacun de ces micro-organismes peut influencer la capacité de *L. pneumophila* à coloniser ces biofilms.

Différents types de protozoaires sont fréquemment retrouvés en association avec *L. pneumophila* dans les biofilms, dont notamment *Hartmanella vermiformis* et plusieurs espèces d'*Acanthamoeba* (Taylor *et al.*, 2009). Habituellement, les protozoaires se nourrissent des bactéries présentes dans les biofilms mais *L. pneumophila* tire avantage de leur présence pour se multiplier dans leurs cytoplasmes et, par conséquent, pour coloniser ces biofilms plus efficacement (Murga *et al.*, 2001, Lucas *et al.*, 2006, Valster *et al.*, 2010, Valster *et al.*, 2011). En effet, la quantité de légionelles présentes dans ces biofilms est corrélée à la quantité de protozoaires permissifs à l'infection par *L. pneumophila* (Liu *et al.*, 2012b). Les biofilms flottants, qui se forment aux interfaces liquide-air, peuvent également contenir à la fois des légionelles et des protozoaires ce qui suggère que *L. pneumophila* est capable d'interactions cellule-cellule en absence de surface abiotique (Declerck *et al.*, 2007a, Declerck *et al.*, 2007b, Hsu *et al.*, 2011). En plus de favoriser la réplication de *L. pneumophila*, la présence des protozoaires joue un rôle protecteur contre les stress environnementaux, tels que l'acidité, et les biocides, comme les composés chlorés utilisés pour désinfecter les systèmes d'eau (Atlas, 1999, Thomas *et al.*, 2004, Donlan *et al.*, 2005). De même, la présence de protozoaires thermo-tolérants permet aux légionelles de persister malgré les chocs thermiques infligés pour décontaminer certains réseaux d'eau (Wright *et al.*, 1989). Il semblerait aussi que la réplication des légionelles dans les amibes leur permettent de former des biofilms plus efficacement. En effet, ceux-ci sont plus épais, plus denses et présentent une quantité plus importante d'exopolysaccharides que lorsque les bactéries sont cultivées en milieu de culture (Bigot *et al.*, 2013). Cette propriété est probablement due au fait que les bactéries issues d'une réplication dans des amibes sécrètent un facteur de chimiotactisme après leur libération dans l'environnement qui facilite leur agrégation, ce qui n'est pas le cas des bactéries cultivées en milieu liquide (Bigot *et al.*, 2013).

La présence d'autres espèces bactériennes dans les biofilms naturels des environnements aquatiques ont aussi une influence directe sur la capacité de *L. pneumophila* à coloniser et à persister dans les biofilms. Les biofilms contenant *Klebsiella pneumoniae* ou *Flavobacterium sp.* sont

efficacement colonisés par *L. pneumophila* (Stewart *et al.*, 2012). Au contraire, la présence de *Pseudomonas aeruginosa* a un effet négatif sur la présence de légionelles dans les biofilms. Cet effet est drastique lorsque *L. pneumophila* est implantée dans un biofilm mono-espèce de *P. aeruginosa* mais il est allégé par la présence d'autres bactéries telles que *K. pneumoniae*, permettant ainsi leur coexistence dans des biofilms complexes (Murga *et al.*, 2001, Mampel *et al.*, 2006, Moritz *et al.*, 2010, Stewart *et al.*, 2012). Cet impact défavorable de *P. aeruginosa* proviendrait de la perception des autoinducteurs de *P. aeruginosa* par *L. pneumophila* qui modulerait notamment la production de l'adhésine Lcl (Kimura *et al.*, 2009, Mallegol *et al.*, 2012). La présence de *Pseudomonas fluorescens* mais aussi de *P. aeruginosa* et de nombreuses autres bactéries aquatiques capables de produire des bactériocines plus ou moins actives contre *L. pneumophila* peut influencer négativement la colonisation de biofilms par cette bactérie (Guerrieri *et al.*, 2008). Au contraire, *Acinetobacter lwoffi*, qui ne produit pas de bactériocine, n'est pas capable de perturber cette colonisation par les légionelles voire la favorise (Guerrieri *et al.*, 2008).

Enfin, *L. pneumophila* agit elle aussi sur la présence de certaines espèces bactériennes dans les biofilms. En effet, *L. pneumophila* a un effet inhibiteur sur la présence d'autres espèces de légionelles, comme *L. anisa* ou *L. micdadei*, via la production d'un surfactant exporté d'une manière dépendante de la protéine TolC (Stewart *et al.*, 2011). Cet impact semble cependant être restreint au genre *Legionella* car d'autres bactéries comme *E. coli*, *K. pneumoniae* ou *L. monocytogenes* ne sont pas sensibles à ce surfactant. Ces données sont corrélées avec des observations réalisées dans les systèmes des tours-aéroréfrigérantes qui mettent en évidence que lorsque *L. pneumophila* prolifère, alors la quantité des autres espèces de légionelles diminue (Wéry *et al.*, 2008).

La présence de ces autres espèces bactériennes peut également jouer sur les interactions entre *L. pneumophila* et ses hôtes amibiens au sein des biofilms. En effet, la présence d'*Escherichia coli* a un impact négatif sur l'internalisation et la réplication de *L. pneumophila* dans *A. castellanii* probablement car *E. coli* est une source de nourriture pour ces amibes (Declerck *et al.*, 2005). Au contraire, *Flavobacterium breve* a un impact bénéfique sur ces interactions, vraisemblablement car la croissance de *F. breve* permet d'apporter des nutriments essentiels à la croissance de *L. pneumophila* comme la L-cystéine par exemple (Wadowsky *et al.*, 1983, Declerck *et al.*, 2005). Dans les biofilms contenant à la fois *P. aeruginosa*, *L. pneumophila* et *A. castellanii*, les légionelles sont internalisées et se répliquent plus efficacement, colonisant les biofilms malgré la présence de *P. aeruginosa* (Declerck *et al.*, 2005). Parfois, des cellules de *P. aeruginosa* sont même retrouvées internalisées dans une LCV puisque *P. aeruginosa* est également capable de se répliquer à l'intérieur d'*A. castellanii* (Michel *et al.*, 1995, Declerck *et al.*, 2005). Cette intrusion de *P. aeruginosa* dans la LCV pourrait gêner la multiplication des légionelles.

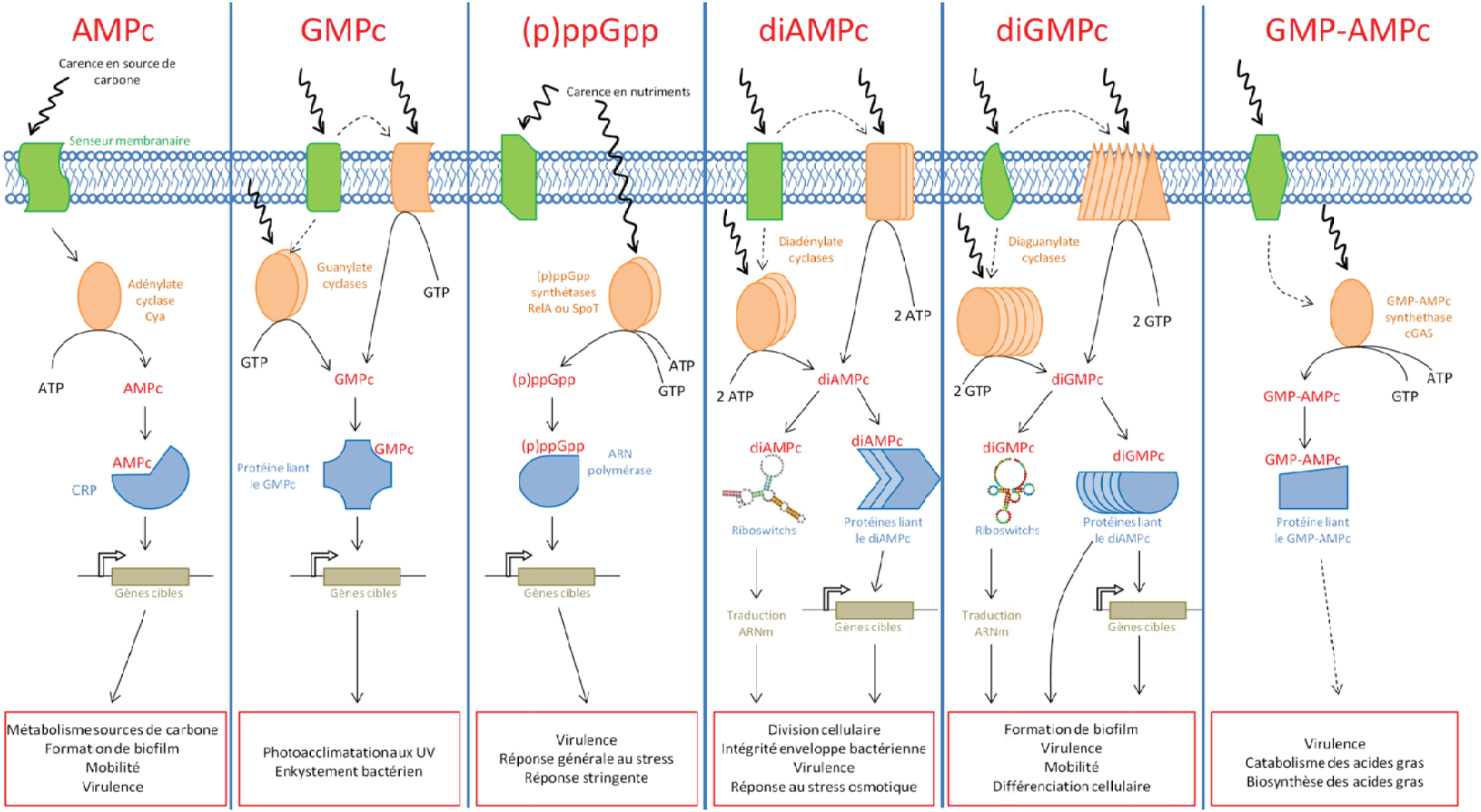


Figure 27 : Différentes voies de signalisation utilisant les messagers secondaires nucléotidiques chez les organismes procaryotes (γ-protéobactéries)

Ces six voies de signalisation sont activées par des signaux qui sont encore inconnus pour la plupart. Ces signaux peuvent être détectés par une protéine senseur ou directement par les enzymes de synthèse des messagers secondaires. Ces enzymes sont plus ou moins nombreuses en fonction de la voie de signalisation : on ne compte qu'une adénylate cyclase et qu'une GMP-AMPc synthétase mais de très nombreuses diguanylate cyclases (22 protéines au sein du même organisme en moyenne chez les γ-protéobactéries. Les messagers secondaire synthétisés sont capables de se lier sur des protéines effectrices voire sur des structures d'ARNm appelées riboswitchs. Selon les cas, cette fixation permet le contrôle de l'expression de gènes cibles au niveau transcriptionnel ou traductionnel) ou encore influe sur l'activité des protéines effectrices. Ces signalisations modulent des processus cellulaires très différents dont la virulence, la formation de biofilms ou la réponse au stress.

2.2 *Le messager secondaire diGMPc*

2.2.1 Les messagers secondaires nucléotidiques

Les messagers secondaires sont des molécules permettant la transduction intracellulaire d'un premier signal provenant de l'extérieur de la cellule. Généralement, la stimulation d'un récepteur ou d'un senseur protéique est à l'origine de la libération ou de la production temporaire du messager secondaire dans le cytoplasme. Cette molécule entraine une cascade de réactions, qui amplifient le signal, et aboutissent à une réponse cellulaire, souvent via la transcription de gènes cibles. Les messagers secondaires peuvent être de différentes natures : le cation calcium (Ca^{2+}) (Rasmussen *et al.*, 1976), l'inositoltriphosphate (Aub *et al.*, 1984), le diacylglycérol (Martin *et al.*, 1984), l'alarmone (p)ppGpp (Kalia *et al.*, 2013) ou les nucléotides cycliques (Kalia *et al.*, 2013) font partie de cette famille. A ce jour, six messagers secondaires nucléotidiques sont décrits : l'adénylate cyclique (AMPc), la guanosine penta ou tétraphosphate ((p)ppGpp), le guanylate cyclique (GMPc), le diadénylate cyclique (diAMPc), l'hybride guanylate-adénylate cyclique (GMP-AMPc) et le diguanylate cyclique (diGMPc) (Figure 27).

L'AMPc a tout d'abord été identifié comme un messager secondaire eucaryote en 1958 par l'équipe d'Earl Sutherland (RALL *et al.*, 1958, Kresge *et al.*, 2005). Cependant, cette molécule de signalisation est également utilisée par les organismes procaryotes (OKABAYASHI *et al.*, 1963). Chez les bactéries, l'AMPc est impliqué dans de nombreuses voies de régulation contrôlant notamment le métabolisme du carbone (MAKMAN *et al.*, 1965), dans la modulation de l'expression des facteurs de virulence et de mobilité ainsi que pour la formation de biofilms (Figure 27) (Båga *et al.*, 1985, Jackson *et al.*, 2002, Liang *et al.*, 2007).

Le (p)ppGpp a été mis en évidence pour la première fois en 1971 par M. Cashel et J. Gallant dans des souches d'*E. coli* en état de carence nutritionnelle (Lazzarini *et al.*, 1971a, Lazzarini *et al.*, 1971b). Chez les bactéries, mais aussi chez les plantes, ce messager secondaire agit comme une alarmone produite en conditions de stress, dont notamment la carence en nutriments (Lazzarini *et al.*, 1971b, van der Biezen *et al.*, 2000). Le (p)ppGpp est particulièrement requis pour le contrôle de la croissance bactérienne, de la division cellulaire, de la mobilité ou de la virulence lorsque la bactérie se trouve en conditions de stress (Figure 27) (Svitil *et al.*, 1993, Thompson *et al.*, 2006, Magnusson *et al.*, 2007).

Le GMPc a tout d'abord été identifié dans les cellules eucaryotes en 1969 (Hardman *et al.*, 1969, Ishikawa *et al.*, 1969), puis quelques années après chez la bactérie *E. coli* (Bernlohr *et al.*, 1974). Dès lors, il est très étudié dans les cellules eucaryotes où il participe notamment au contrôle de la contraction musculaire (Dunham *et al.*, 1974). Au contraire, sa présence chez les bactéries a

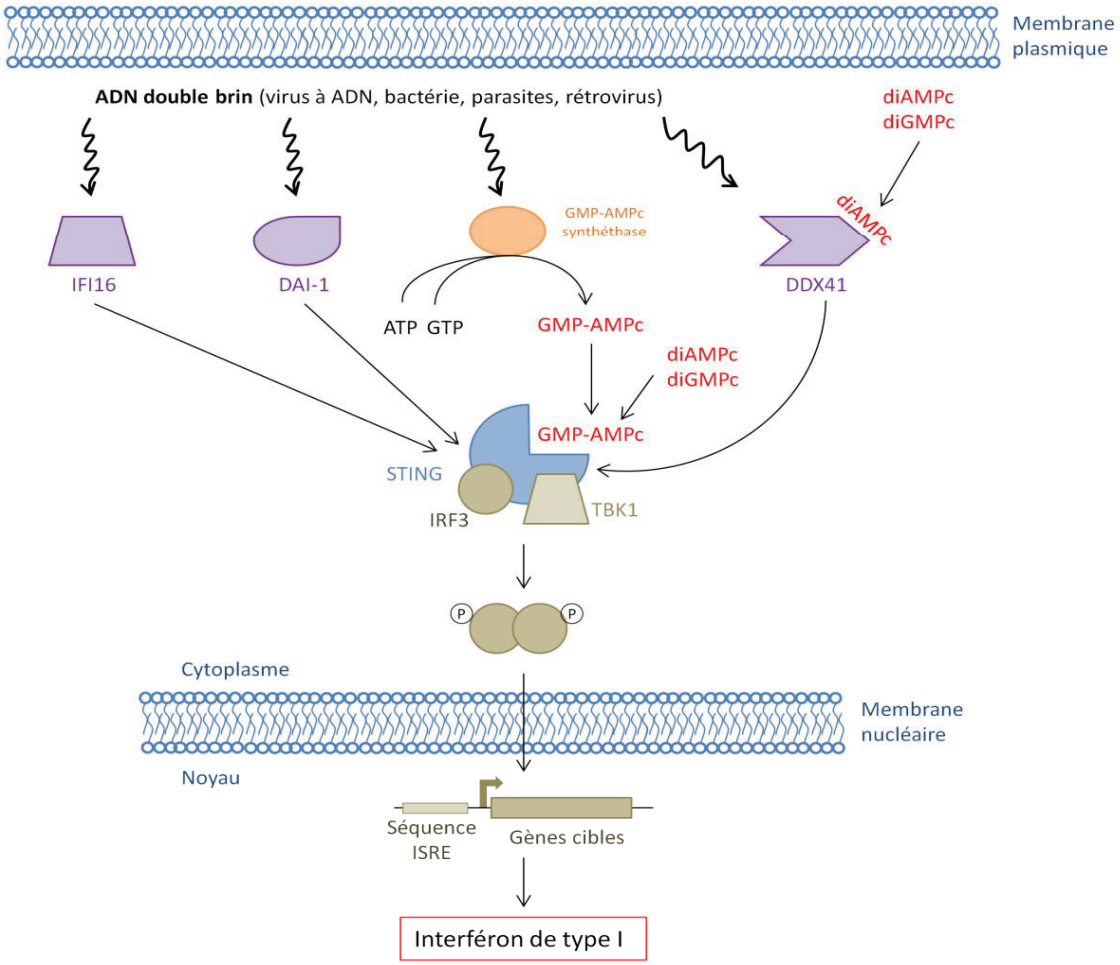


Figure 28 : Voie de signalisation utilisant le messager secondaire GMP-AMPc chez les organismes eucaryotes.

La présence d'ADN double brin d'origine exogène peut être détectée par différents senseurs cytoplasmiques : DAI1, IFI16, DDX41 ou les GMP-AMPc synthétases. En parallèle, DDX41 est également capable de détecter le diGMPc et le diAMPc. Les GMP-AMPc synthétases ainsi activées produisent le messager secondaire GMP-AMPc. Celui-ci se fixe alors sur le senseur STING, capable par ailleurs de détecter les autres dinucléotides. Cette fixation conduit à l'activation d'IRF3 (Interferon Regulatory Factor), un régulateur transcriptionnel qui contrôle l'expression de gènes cibles présentant une séquence ISRE (Interferon Stimulated Response Element) dans leur région promotrice. Ces gènes codent pour les interféron de type I (IFNα et β).

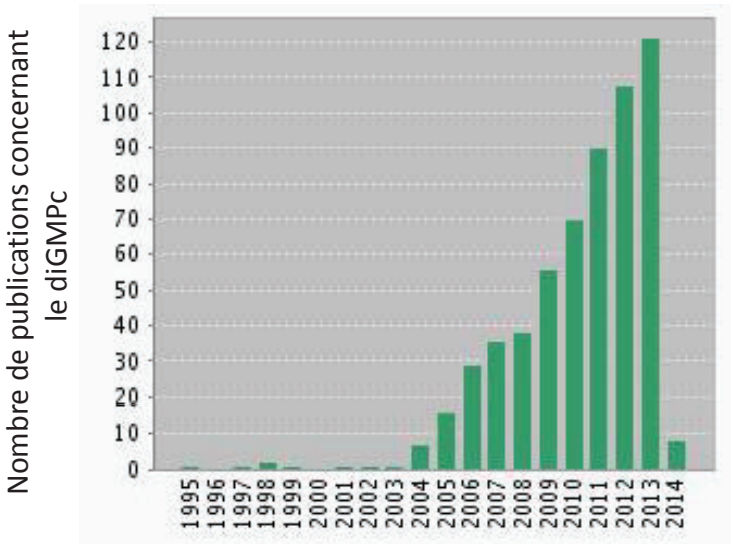


Figure 29 : Nombre de publications concernant le diGMPc en fonction des années.

D'après la base de données de Web of Science (WebofScienceDatabase) en mai 2014.

longtemps été perçue comme un effet secondaire de la synthèse d'AMPc jusqu'à ce que, récemment, son rôle dans la photoacclimatation des cyanobactéries (Cadoret *et al.*, 2005), dans le contrôle de l'enkystement de *Rhodospirillum centenum* (Marden *et al.*, 2011) et dans le contrôle de la virulence et de la formation de biofilms chez le phytopathogène *Xanthomonas campestris* ait été mis en évidence (An *et al.*, 2013) (Figure 27).

Le diAMPc n'a été découvert que très récemment chez *Bacillus subtilis* (Witte *et al.*, 2008). Ce dinucléotide semble particulièrement impliqué dans l'homéostasie de l'enveloppe bactérienne (Corrigan *et al.*, 2011, Luo *et al.*, 2012, Kaplan Zeevi *et al.*, 2013, Witte *et al.*, 2013), dans le contrôle de la division cellulaire (Oppenheimer-Shaanan *et al.*, 2011, Witte *et al.*, 2013) ainsi que dans la régulation de la virulence de bactéries pathogènes telles que *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* ou *Borrelia burgdorferi* (Cho *et al.*, 2013, Witte *et al.*, 2013, Ye *et al.*, 2014). Cette molécule exclusivement bactérienne joue le rôle de PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern) perçue par la protéine STING (STimulator of INterferon Genes) chez les organismes eucaryotes et déclenche la production d'interféron de type I, permettant notamment la détection des pathogènes *L. monocytogenes* ou *Chlamydia trachomatis* (Figure 27) (Woodward *et al.*, 2010, Barker *et al.*, 2013).

Le GMP-AMPc a également été mis en évidence très récemment chez *Vibrio cholerae* où il participe au contrôle de la virulence de cette bactérie (Figure 27) (Davies *et al.*, 2012). Au cours de cette dernière année, il a aussi été impliqué dans un mécanisme original de signalisation de la présence d'ADN exogène chez les eucaryotes (Figure 28) (Wu *et al.*, 2013b). Dans ce modèle, le GMP-AMPc est synthétisé par une GMP-AMPc synthétase cytoplasmique en réponse à la fixation d'ADN double brin exogène (Gao *et al.*, 2013, Li *et al.*, 2013a, Sun *et al.*, 2013). Le GMP-AMPc produit se lierait alors sur le senseur STING, impliqué dans la reconnaissance d'autres dinucléotides tels que le diGMPc ou le diAMPc, induisant par conséquent la production d'interféron β (Figure 28) (Wu *et al.*, 2013b). Ce messager secondaire est également capable de diffuser via les jonctions GAP mises en place entre les cellules eucaryotes, signalant ainsi aux cellules voisines la présence de pathogènes (Ablasser *et al.*, 2013).

Enfin, le diGMPc est un messager secondaire quasiment exclusivement bactérien découvert en 1987 par l'équipe de Moshe Benziman chez *Gluconacetobacter xylinus* (Ross *et al.*, 1987). Tout d'abord, l'importance de cette découverte a été sous-estimée jusqu'à ce que les premières publications concernant les différents rôles du diGMPc paraissent (Rashid *et al.*, 2003, Häussler, 2004, Tischler *et al.*, 2004) et que ce second messager soit considéré comme ubiquitaire chez les bactéries (D'Argenio *et al.*, 2004, Jenal, 2004, Römling *et al.*, 2005). A partir de là, le nombre de publications concernant cette molécule s'est envolé (Figure 29) (WebofScienceDatabase). L'ensemble des

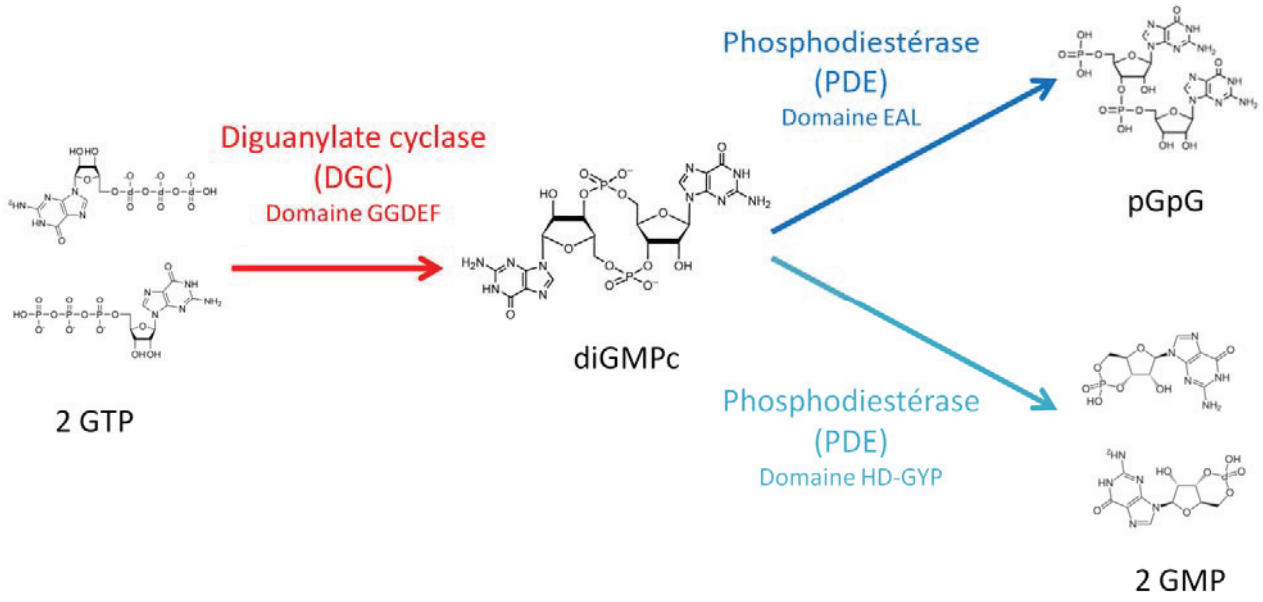


Figure 30 : Synthèse et dégradation du diGMPc par les diguanylate cyclases et les phosphodiestérases

Les diguanylates (DGC), protéines à domaine GGDEF, catalysent la formation de diGMPc à partir de deux molécules de GTP. L'hydrolyse du diGMPc est prise en charge par deux types de phosphodiestérases (PDE). Les protéines à domaine EAL linéarisent le diGMPc en une molécule de pGpG, alors que les protéines à domaine HD-GYP hydrolysent directement le diGMPc en deux molécules de GMP.

données collectées depuis a permis d'impliquer le diGMPc dans de nombreuses fonctions décrites plus précisément dans ce chapitre (cf. paragraphe 2.2.4 p. 73).

2.2.2 Les diguanylates cyclases et phosphodiestérases

La synthèse et la dégradation du diGMPc sont prises en charge par des enzymes spécifiques appelées diguanylate cyclases (DGC) et phosphodiestérases (PDE), respectivement (Figure 30).

L'activité DGC, de synthèse du diGMPc, a tout d'abord été génétiquement liée aux protéines portant des domaines GGDEF (Ausmees *et al.*, 2001, Aldridge *et al.*, 2003, Simm *et al.*, 2004, Tischler *et al.*, 2005). Ce domaine GGDEF (Glycine-Glycine-Aspartate-Glutamate-Phenylalanine) est composé d'environ 160 acides aminés (cf. paragraphe 2.2.2.2 p. 58). Une analyse bioinformatique de la séquence et de la structure du domaine GGDEF a renforcé cette connexion avec la synthèse du diGMPc (Pei *et al.*, 2001). En effet, les auteurs ont découvert que le domaine GGDEF est lointainement lié aux domaines catalytiques des adénylates/guanylates cyclases (Linder, 2006, Sinha *et al.*, 2006). A première vue, les séquences primaires n'ont qu'une très faible similarité mais les structures secondaires et tertiaires sont remarquablement similaires aux adénylate cyclases de type III. L'activité biochimique de ces protéines n'a été mise en évidence qu'ensuite, notamment en démontrant que la protéine PleD phosphorylée de *Caulobacter crescentus* convertit le GTP en diGMPc *in vitro* (Figure 30) (Paul *et al.*, 2004, Hickman *et al.*, 2005, Ryjenkov *et al.*, 2005).

L'activité PDE, de dégradation du diGMPc, peut être liée à la présence de domaines EAL ou HD-GYP. Le domaine EAL (Glutamate-Alanine-Leucine) est composé d'environ 240 acides aminés et le domaine HD-GYP (Histidine-Aspartate-Glycine-Tyrosine-Proline) d'environ 165 acides aminés (cf. paragraphe 2.2.2.2 p. 58). De même que pour l'activité DGC et le domaine GGDEF, l'activité PDE a tout d'abord été liée génétiquement aux protéines à domaine EAL (Simm *et al.*, 2004, Tischler *et al.*, 2004) et l'activité biochimique n'a été démontrée qu'ensuite grâce à l'hydrolyse *in vitro* d'un substrat spécifique, le bis(*p*-nitrophényl)-phosphate, par HmsP de *Yersinia pestis* (Bobrov *et al.*, 2005). D'autres travaux ont complété ces données en révélant que l'hydrolyse du diGMPc par les protéines EAL conduit à la production de pGpG (Figure 30) (Christen *et al.*, 2005, Schmidt *et al.*, 2005, Tamayo *et al.*, 2005) et que cette activité est spécifique du diGMPc (Tuckerman *et al.*, 2009). Le domaine HD-GYP est porté par des protéines appartenant à la famille des protéines à domaine HD possédant des activités hydrolytiques envers divers substrats (Galperin *et al.*, 1999, Galperin *et al.*, 2012). Le domaine HD-GYP a tout d'abord été prédit comme ayant une activité PDE du fait de son association avec le domaine GGDEF puisqu'il est retrouvé chez 7% des protéines à domaine GGDEF, ce qui peut faire écho à celle, plus importante, existant entre les domaines GGDEF et EAL (68%) (Galperin *et al.*, 1999, Galperin *et al.*, 2001, Seshasayee *et al.*, 2010). Il a cependant fallu attendre les travaux de Ryan

Figure 31 : Distribution du domaine GGDEF parmi les espèces. (d'après Finn *et al.*, 2014)

Cette représentation montre chaque nœud d'un arbre phylogénétique sous la forme d'un arc de cercle, disposé radialement à partir des domaines *Eukaryota*, *Bacteria* et *Archaea* au centre jusqu'aux espèces sur l'anneau le plus extérieur.

La classe des *Gamma-proteobacteria* est indiquée en rouge et à l'intérieur de cette classe l'espèce *Legionella pneumophila* est colorée en vert.

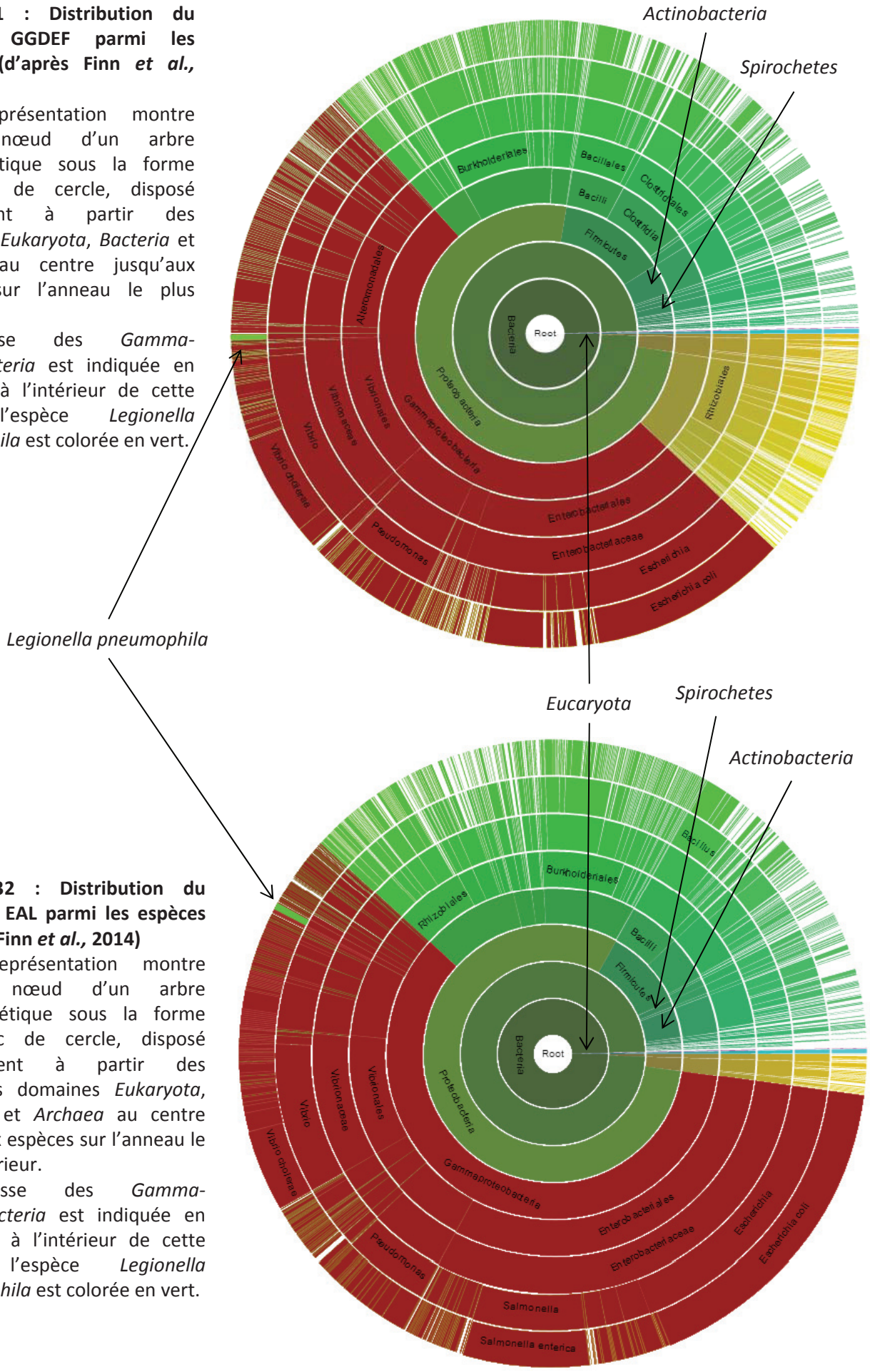


Figure 32 : Distribution du domaine EAL parmi les espèces (d'après Finn *et al.*, 2014)

Cette représentation montre chaque nœud d'un arbre phylogénétique sous la forme d'un arc de cercle, disposé radialement à partir des domaines domaines *Eukaryota*, *Bacteria* et *Archaea* au centre jusqu'aux espèces sur l'anneau le plus extérieur.

La classe des *Gamma-proteobacteria* est indiquée en rouge et à l'intérieur de cette classe l'espèce *Legionella pneumophila* est colorée en vert.

et al., en 2006, pour la mise en évidence de l'activité biochimique *in vitro* de la protéine à domaine HD-GYP RpfG de *Xanthomonas campestris* (Ryan *et al.*, 2006). Cette étude a démontré que cette hydrolyse est différente de celle du domaine EAL car elle conduit à la formation de deux molécules de GMP et non de pGpG (Figure 30).

2.2.2.1 Distribution des protéines DGC et PDE

Pour des raisons qui restent encore obscures, les protéines à domaines GGDEF et/ou EAL sont très peu représentées chez les archéobactéries. A ce jour, seules trois protéines sont connues chez ces organismes et sont codées dans les génomes de *Methanocella arvoryzae, Haloferax volcanii* et *Candidatus Micrarchaeum acidiphilum* (Finn *et al.,* 2014). Ces observations suggèrent que, soit ce système de signalisation n'est pas utilisé par les archéobactéries, soit que celles qui les utilisent occupent des niches écologiques inhabituelles ou n'ont pas encore été découvertes.

La distribution de ces protéines chez les organismes eucaryotes est plus complexe. Actuellement, selon la base de données Pfam (Finn *et al.,* 2014), une dizaine d'espèces eucaryotes portent des gènes codant putativement des protéines à domaines GGDEF et/ou EAL. Ce sont des parasites (*Trypanosoma congolense*), des amibes (*Dictyostelium discoideum* ou *D. fasciculatum*), des champignons (*Laccaria bicolor* ou *Polysphondylum pallidum*) ou plusieurs espèces de plantes (*Oryza sativa* (riz), *Populus trichocarpa* (peuplier) ou *Ricinus communis* (ricin)). Une seule de ces protéines, la DGC de *D. discoideum*, a été caractérisée récemment, apportant la preuve du rôle du diGMPc en tant que régulateur du développement chez les eucaryotes inférieurs (Chen *et al.*, 2012b). En effet, cette DGC permet la régulation de la différenciation de *D. discoideum* en une structure de fructification multicellulaire et sporogène appelée « fruiting body » (Chen *et al.*, 2012b). Le rôle des protéines GGDEF/EAL chez les organismes végétaux, s'il existe, reste encore inconnu.

Les protéines à domaines GGDEF et/ou EAL sont présentes dans toutes les branches phylogénétiques bactériennes majeures pour lesquelles au moins un génome a été entièrement séquencé (Figure 31 et 32) (Finn *et al.,* 2014). Cette distribution suggère fortement que le diGMPc est devenu un messager secondaire dans les premières étapes de l'évolution bactérienne (Galperin *et al.*, 2001). Il semblerait que la signalisation via le diGMPc ait été presque perdue dans certains phyla, comme chez les *Chlamydiae*, probablement à cause de la compaction des génomes de ces bactéries parasites obligatoires (Seshasayee *et al.*, 2010); préservée dans d'autres phyla, comme les *Actinobacteria* ou les *Spirochetes* ; et s'est particulièrement développée dans d'autres phyla comme les *Proteobacteria* ou les *Firmicutes* (Figure 31 et 32). Cette expansion chez les *Proteobacteria*, et encore plus spécifiquement chez les *Gammaproteobacteria*, se traduit par la multiplicité des gènes codant ces protéines au sein du même organisme. En effet, on estime que les γ-protéobactéries

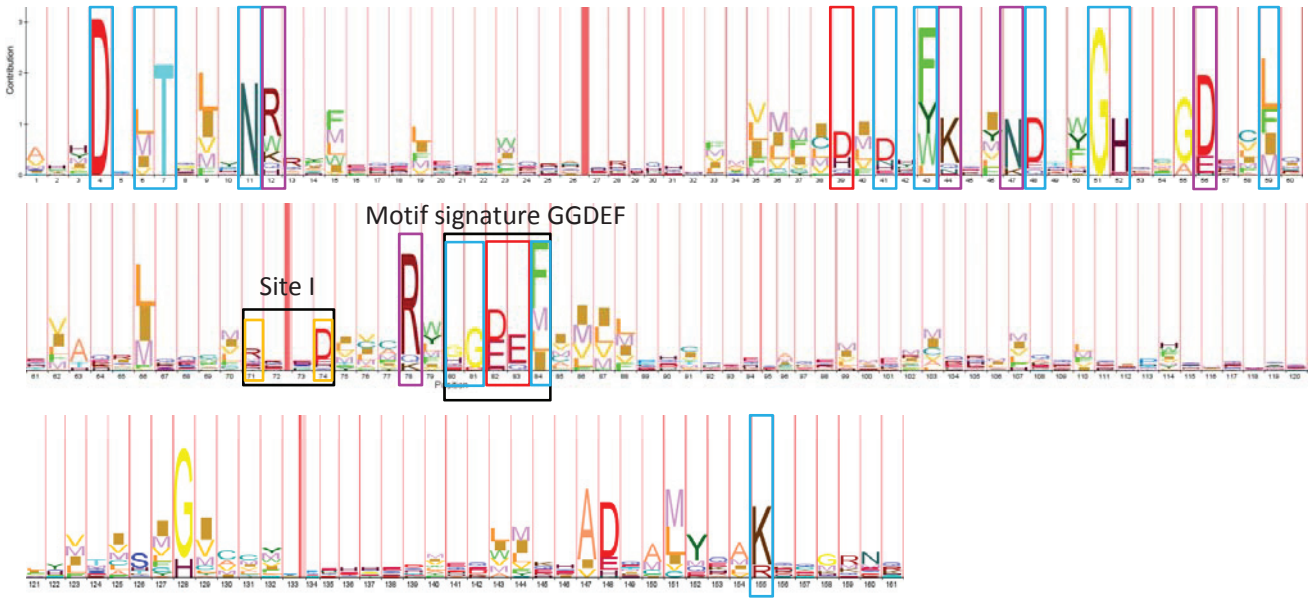


Figure 33 : Conservation de la séquence du domaine GGDEF.
Cette séquence HMMLogo a été créée dans la base de données Pfam (Finn *et al.,* 2014): ID PF09900. La taille de chaque lettre reflète la fréquence de chaque acide aminé à cette position. Le motif signature GGDEF est encadré en noir ainsi que le site inhibiteur (Site I). Les résidus encadrés en rouge sont requis pour la fixation de cations métalliques. Les cadres violets et jaunes indiquent les résidus requis pour la liaison du diGMPc et/ou des GTP et l'inhibition par le diGMPc, respectivement. Tous les résidus encadrés en bleu sont nécessaires pour l'activité de la protéine mais leur rôle est encore inconnu.

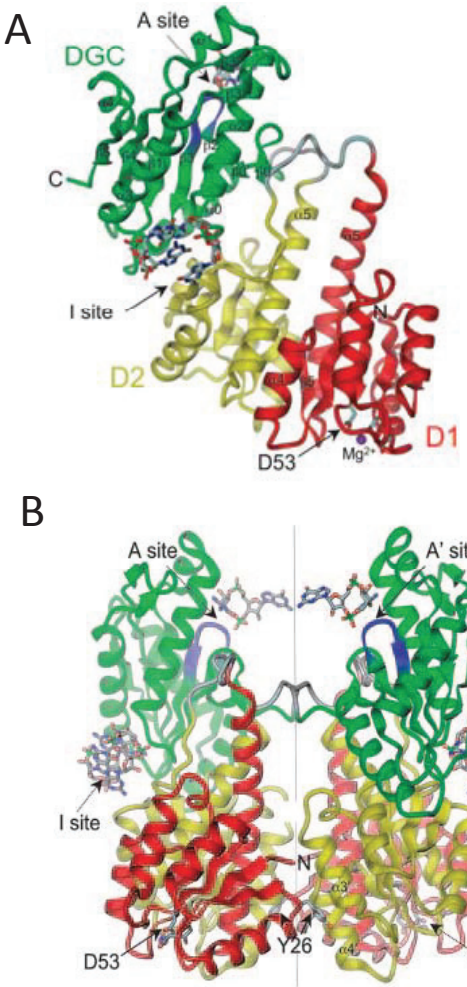


Figure 34 : Structure de PleD de *Caulobacter crescentus* déduite par analyse cristallographique (Chan *et al.,* 2004)
PleD sous forme monomérique (A) et homodimérique (B).

Les monomères sont constitués de trois domaines reliés par des chaines peptidiques non ordonnées (gris clair). Le domaine D1 (résidus 2 à 140, en rouge) et le domaine D2 (résidus 141 à 285, en jaune) composent le domaine CheY-like. D1 est le domaine receveur de phosphate (sur le résidu D53) et D2 le domaine adaptateur. Le domaine catalytique DGC est indiqué en vert (résidus 286 à 454). Le motif GGEEF est localisé sur une structure en épingle β indiquée en bleu et constitue une partie du site catalytique (A site) dans lequel est lié une molécule de diGMPc. Deux molécules de diGMPc sont visibles à l'interface entre les domaines DGC et D2 au niveau du site inhibiteur (I site).

possèdent en moyenne 22 gènes codant ces protéines au sein du même génome contre 1 gène/génome chez les *Firmicutes* et 3,5 gènes/génome chez les *Actinobacteria* (Seshasayee *et al.*, 2010). Cette multiplicité peut atteindre des niveaux extrêmes comme chez *Shewanella oneidensis* ou *Vibrio vulnificus* qui comptent 55 et 79 gènes codant les protéines GGDEF et/ou EAL, respectivement (Ulrich *et al.*, 2010).

Les domaines HD-GYP sont moins représentés chez les bactéries. En effet, dans les travaux de Seshasayee *et al.* (Seshasayee *et al.*, 2010), sur 867 génomes entièrement séquencés, 1034 gènes codant des protéines HD-GYP ont été identifiés ce qui est peu en comparaison du nombre de gènes codant les protéines à domaine GGDEF (9443 gènes) et EAL (5574 gènes).

2.2.2.2 Architectures des DGC et PDE

- *Les domaines GGDEF*

Le domaine GGDEF, porteur de l'activité DGC, est composé d'environ 160 acides aminés (Figure 33). Le site actif (Site A) est composé du motif signature GGDEF et de 16 acides aminés conservés (Figure 33). Le motif GGDEF est conservé dans 88% des protéines à domaine GGDEF mais seulement dans 57% des protéines à domaines GGDEF et EAL (Seshasayee *et al.*, 2010). Chaque substitution sur les acides aminés de ce motif abolissent l'activité enzymatique des protéines mis à part la substitution de l'aspartate (D) en glutamate (E) formant un motif GGEEF (Seshasayee *et al.*, 2010). Les seize autres acides aminés sont requis pour l'activité DGC car ils participent à la fixation du GTP et du diGMPc et à la liaison de cations métalliques de type Mg^{2+} ou Mn^{2+} (Figure 33) (Yang *et al.*, 2011).

Une meilleure compréhension mécanistique de la synthèse de diGMPc par le domaine GGDEF a résulté de la caractérisation structurale des DGC. Les sites catalytiques de différentes DGC sont composés de 5 feuillets β centraux entourés de 5 hélices α (Chan *et al.*, 2004, De *et al.*, 2008, Navarro *et al.*, 2009, Yang *et al.*, 2011). Ces travaux sur la structure de ces enzymes ont également permis d'identifier de nouveaux acides aminés conservés participant à la fixation du diGMPc ou à la fixation des cations métalliques (Yang *et al.*, 2011).

Ces études ont également permis d'établir que les DGC fonctionnent sous forme d'homodimère (Figure 34) (Chan *et al.*, 2004, Paul *et al.*, 2007). La dimérisation permet le positionnement proche des deux sites catalytiques liant chacun une molécule de GTP. Chaque monomère contribue alors à la formation d'un pont phosphoester entre les deux molécules de GTP, produisant un intermédiaire de type pppGpG ainsi que deux molécules de pyrophosphate (Ross *et al.*, 1987, Paul *et al.*, 2007).

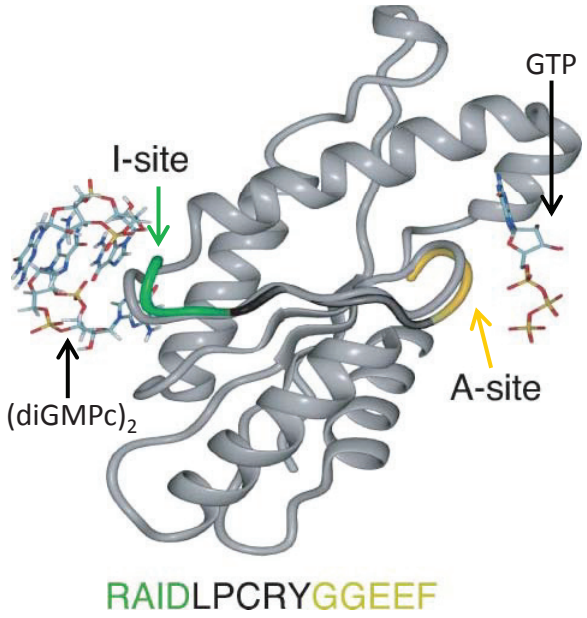


Figure 35 : Structure de la DGC PleD de *C. crescentus* en présence d'un dimère de diGMPc fixé sur le site I (Christen *et al.*, 2006)

Le domaine GGDEF de PleD est indiqué en gris. Le site I est coloré en vert, le site A en jaune et l'épingle β les reliant en noir. Une molécule de GTP est fixée au site A en accord avec l'orientation observée pour la fixation du diGMPc dans les études de structure par cristallographie. Un dimère de diGMPc est lié au site I. Cette fixation engendre un déplacement de 1 à 4 Å de l'épingle β, rappelant un mouvement de balancier centré sur cette structure. Ce déplacement correspondrait au transfert direct d'information entre les sites I et A.

La séquence en acides aminés du site I, du feuillet β et du site A est indiquée sous la structure avec le code couleur correspondant.

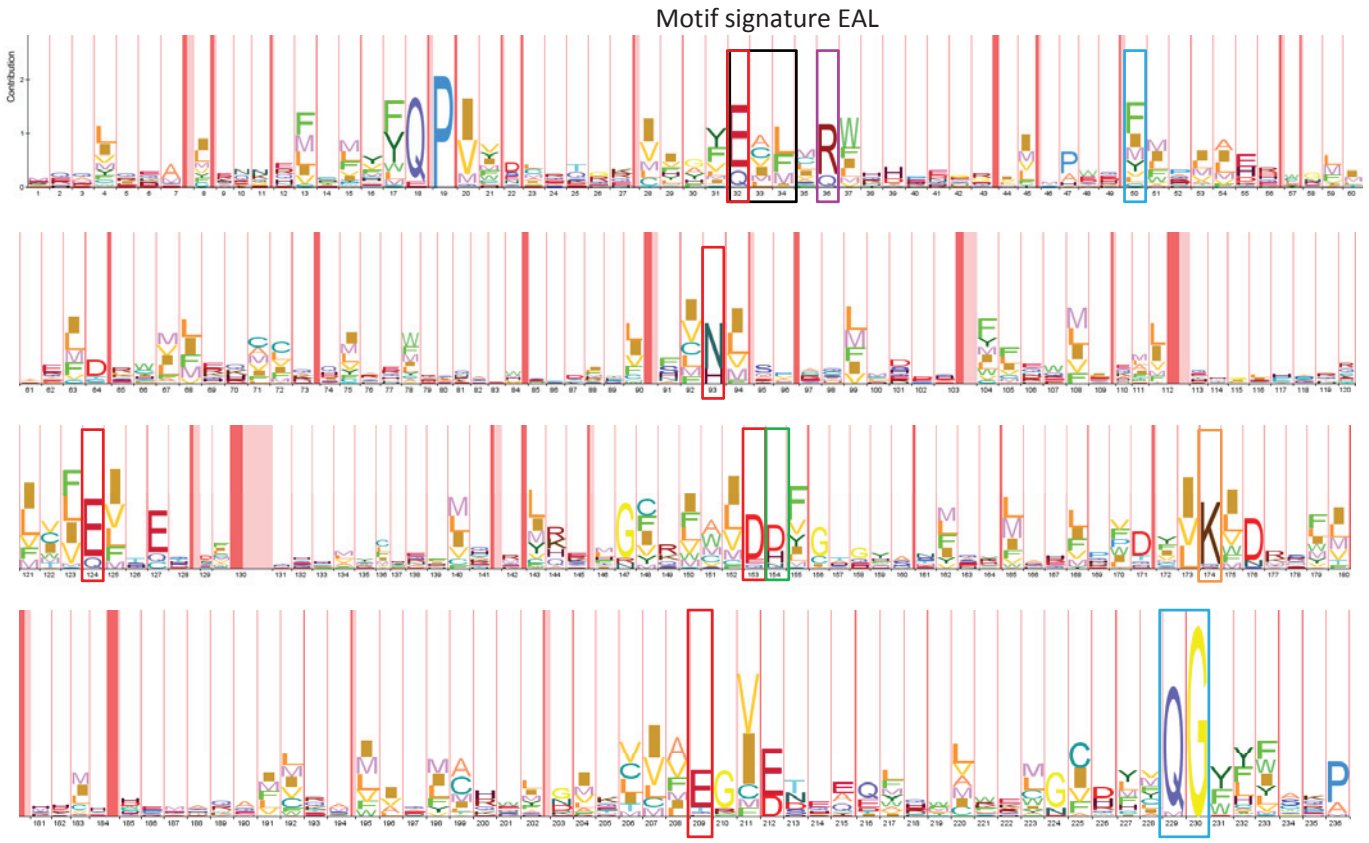


Figure 36 : Conservation de la séquence du domaine EAL.

Cette séquence HMMLogo a été créée dans la base de données Pfam (Finn *et al.*, 2014) : ID PF00563. La taille de chaque lettre reflète la fréquence de chaque acide aminé à cette position. Les résidus encadrés en rouge seraient nécessaires à la fixation des cations métalliques, le résidu encadré en violet serait nécessaire à la fixation du diGMPc, le résidu encadré en vert participerait à l'orientation de la molécule d'eau liée aux cations, le résidu encadré en orange permettrait l'activation de la molécule d'eau et la production de l'hydroxyl hydrophile. Tous les résidus encadrés en bleu seraient requis pour la fonctionnalité de l'enzyme mais leurs rôles ne sont pas encore décryptés. Le motif signature EAL de ce domaine est encadré en noir.

Les travaux menés sur la DGC PleD de *Caulobacter crescentus* ont, par ailleurs, mis en évidence les mécanismes d'activation et d'inhibition par le produit des DGC (Chan *et al.*, 2004, Wassmann *et al.*, 2007). Ces mécanismes affectent la formation ou la conformation d'un dimère de DGC enzymatiquement actif.

L'activation des DGC implique des réarrangements conformationnels en réponse à la détection de signaux par les domaines senseurs fréquemment associés au domaine GGDEF (cf. paragraphe « Les domaines senseurs de signaux » p. 62).

L'inhibition des DGC est causée directement par leur produit, le diGMPc. En effet, le diGMPc est capable de se fixer sur un site secondaire qui correspond à un site inhibiteur (site I). Ce site I est composé des résidus R et D (RxxD) en amont de 5 et 8 acides aminés du motif signature GGDEF (Figure 35). Malgré leur proximité sur la séquence, le site RxxD et le motif GGDEF sont structurellement placés sur les faces opposés du domaine (Figure 35) (Chan *et al.*, 2004, Christen *et al.*, 2006). La liaison d'un dimère de diGMPc sur le site I bloque le site A dans une conformation inactive. En effet, l'étude de la structure de PleD en présence de diGMPc révèle une conformation inhibée lorsque le diGMPc est intercalé dans la séquence RxxD (Figure 35) (Chan *et al.*, 2004, Christen *et al.*, 2006). Ces sites I sont retrouvés dans environ la moitié des protéines à domaine GGDEF (Seshasayee *et al.*, 2010). Toutefois, les DGC ne possédant pas ce motif seraient également soumises à une inhibition par le diGMPc. En effet, la structure de la DGC XCC4471 de *Xanthomonas campestris* en présence de diGMPc a révélé la fixation d'un dimère de diGMPc directement sur le site A, mettant ainsi en évidence un second mécanisme d'inhibition des DGC par leur propre produit (Yang *et al.*, 2011).

- *Les domaines EAL*

Le domaine EAL (Glutamate-Alanine-Leucine), associé à l'activité PDE, est composé d'environ 240 acides aminés (Figure 36). Le motif signature EAL est conservé dans 75% des protéines à domaine uniquement EAL et dans 87% des protéines à domaines GGDEF et EAL (Seshasayee *et al.*, 2010). Ce motif ainsi que dix autres acides aminés bien conservés participent à la liaison du diGMPc et à la fixation de cations métalliques (Mg^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+} ou Ca^{2+}) (Figure 36) (Rao *et al.*, 2009, Tchigvintsev *et al.*, 2010). Ces résidus sont d'ailleurs utilisés pour prédire la fonctionnalité enzymatique des PDE à domaine EAL (Rao *et al.*, 2009) : sur 5846 domaines EAL comptabilisés, 49% sont prédits pour être enzymatiquement actifs, 18% pour être inactifs et la séquence des 33% restants ne permet pas de prédire leur fonctionnalité enzymatique.

La résolution de structures de PDE a révélé que le domaine EAL adopte une structure en tonneau avec 8 feuillets β internes et 8 hélices α (Figure 37) (Rao *et al.*, 2009, Schirmer *et al.*, 2009,

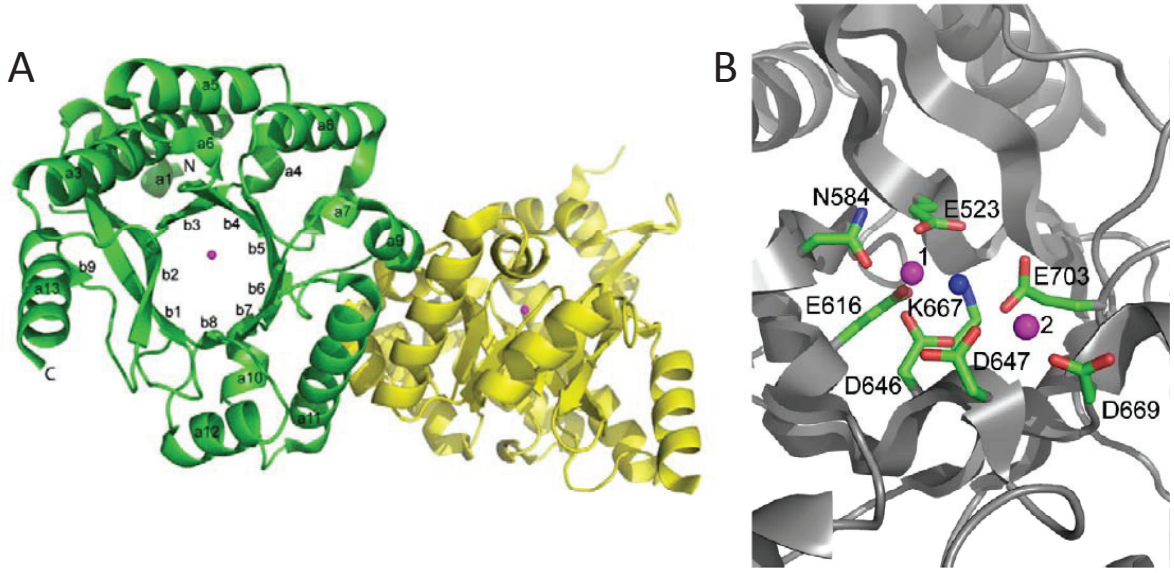


Figure 37 : Structure de la PDE à domaine EAL TDB1265 de *Thiobacillus denitrificans* (Tchigvintsev *et al.*, 2010).
(A) TDB1265 est organisée sous forme de dimère anti-parallèle. Son domaine EAL adoptre une conformation en tonneau grâce aux 8 feuillets β (b1 à b8). (B) Structure du site catalytique EAL de TDB1265 avec les différents résidus conservés impliqués dans la fixation des cations, ici le Mg^{2+} symbolisé par les sphères magenta. La molécule d'eau nécessaire pour l'attaque hydrophile d'un pont phosphoester du diGMPc, est symbolisée par la sphère bleue. Les molécules de diGMPc ou de pGpG ne sont pas représentées ici.

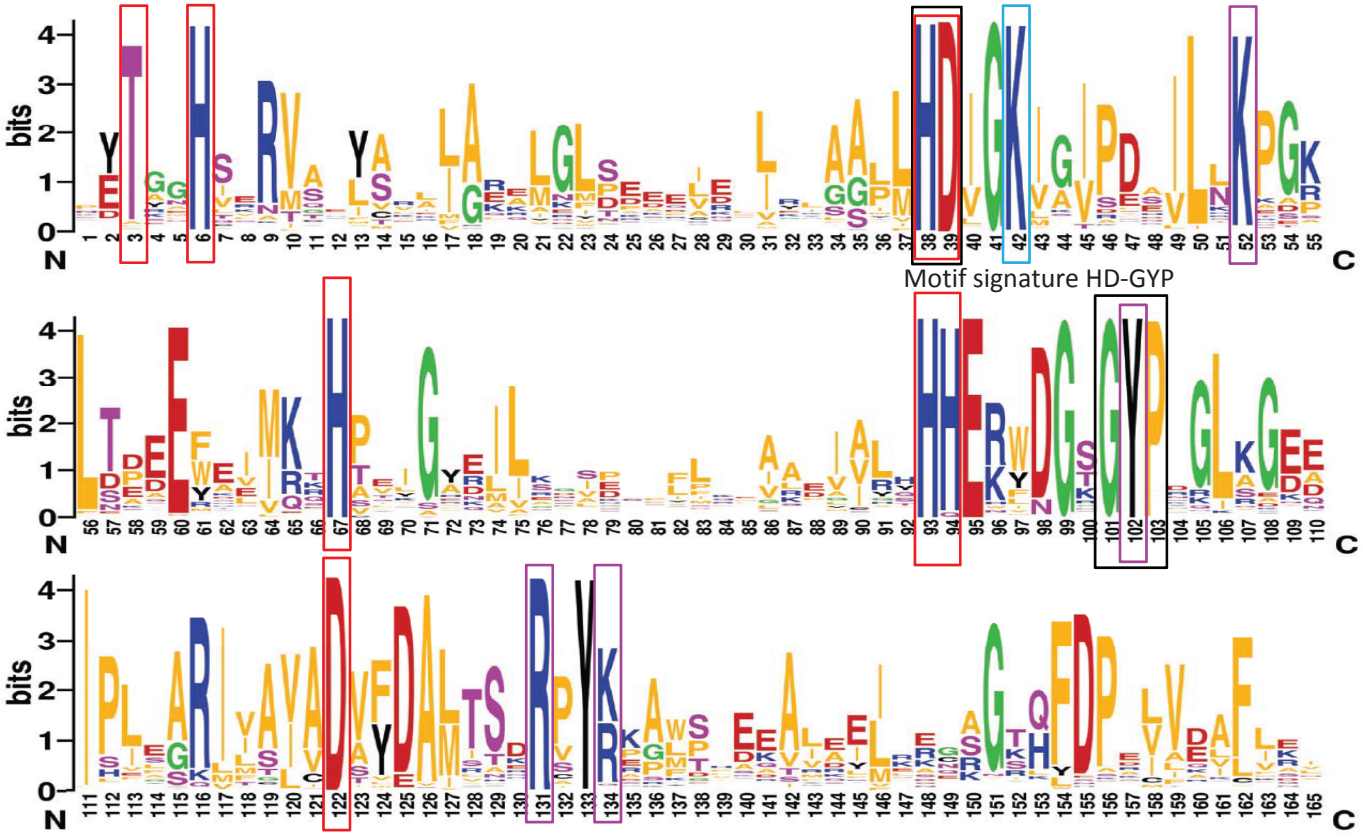


Figure 38 : Conservation de la séquence du domaine HD-GYP (d'après Römling *et al.*, 2013).
Cette séquence HMMLogo a été générée à partir des alignements de la base de données Pfam (Finn *et al.*, 2014) : ID PF01966 avec le logiciel WebLogo. La taille de chaque lettre reflète la fréquence de chaque acide aminé à cette position. Les résidus encadrés en rouge participeraient à la fixation des cations métalliques, ceux encadrés en violet à la fixation du diGMPc et ceux encadrés en bleu sont requis pour l'activité enzymatique mais leurs fonctions restent encore inconnues.

Tchigvintsev *et al.*, 2010). De plus, à l'instar des DGC, les PDE à domaine EAL fonctionnent *in vitro* et probablement *in vivo* sous forme de dimères ou d'oligomères de plus grande taille, bien que la forme monomérique puisse suffire pour l'hydrolyse de diGMPc *in vitro* (Schmidt *et al.*, 2005, Tarutina *et al.*, 2006, Rao *et al.*, 2008, Barends *et al.*, 2009, Tchigvintsev *et al.*, 2010).

Malgré ces données structurales, le mécanisme d'hydrolyse du diGMPc par les PDE est encore controversé, notamment en ce qui concerne la nécessité d'un ou de deux cations métalliques (Minasov *et al.*, 2009, Rao *et al.*, 2009). Toutefois, les travaux les plus récents soutiennent le mécanisme à deux cations (Barends *et al.*, 2009, Tchigvintsev *et al.*, 2010). Les deux cations seraient liés aux résidus indiqués en rouge dans la figure 36, à deux des atomes d'oxygène d'un des phosphates du diGMPc, ainsi qu'à une molécule d'eau (Tchigvintsev *et al.*, 2010). Ces liaisons permettent notamment le positionnement du diGMPc dans une conformation étirée autorisant l'attaque hydrophile par la molécule d'eau sur un des ponts phosphoesters et conduisant à la formation d'une molécule de pGpG (Barends *et al.*, 2009, Tchigvintsev *et al.*, 2010). La liaison d'un cation Ca^{2+}, plutôt que des cations Mg^{2+} ou Mn^{2+}, induirait une modification des distances entre le diGMPc et la molécule d'eau d'où le fort effet inhibiteur de ce cation sur l'activité PDE (Sundriyal *et al.*, 2014).

Le pGpG est le produit de l'hydrolyse du diGMPc par les PDE à domaine EAL. Cependant, certains domaines EAL sont capables d'hydrolyser le pGpG en 2 molécules de GMP (Schmidt *et al.*, 2005). Cette activité est lente et n'est probablement pas pertinente physiologiquement. Il est plus vraisemblable que cette hydrolyse du pGpG en GMP soit catalysée par d'autres enzymes telles que des nucléases cellulaires (Tal *et al.*, 1998).

Les PDE à domaine EAL, comme les DGC, peuvent être activées par la perception de signaux par des domaines senseurs (cf. paragraphe « Les domaines senseurs de signaux » p. 62).

- *Les domaines HD-GYP*

Les protéines à domaine HD-GYP (Histidine-Aspartate-Glycine-Tyrosine-Proline) font partie de la grande famille des protéines à domaine HD (Histidine-Aspartate) qui présentent envers divers substrats des activités phosphohydrolases dépendantes de la présence d'ions métalliques (Aravind *et al.*, 1998, Galperin *et al.*, 1999).

Le domaine HD-GYP est constitué d'environ 165 acides aminés (Figure 38). De nombreux acides aminés sont très conservés et sont impliqués dans la liaison de cations métalliques (Fe^{2+} ou Mn^{2+}) et dans la fixation du diGMPc (Figure 38) (Lovering *et al.*, 2011, Bellini *et al.*, 2014).

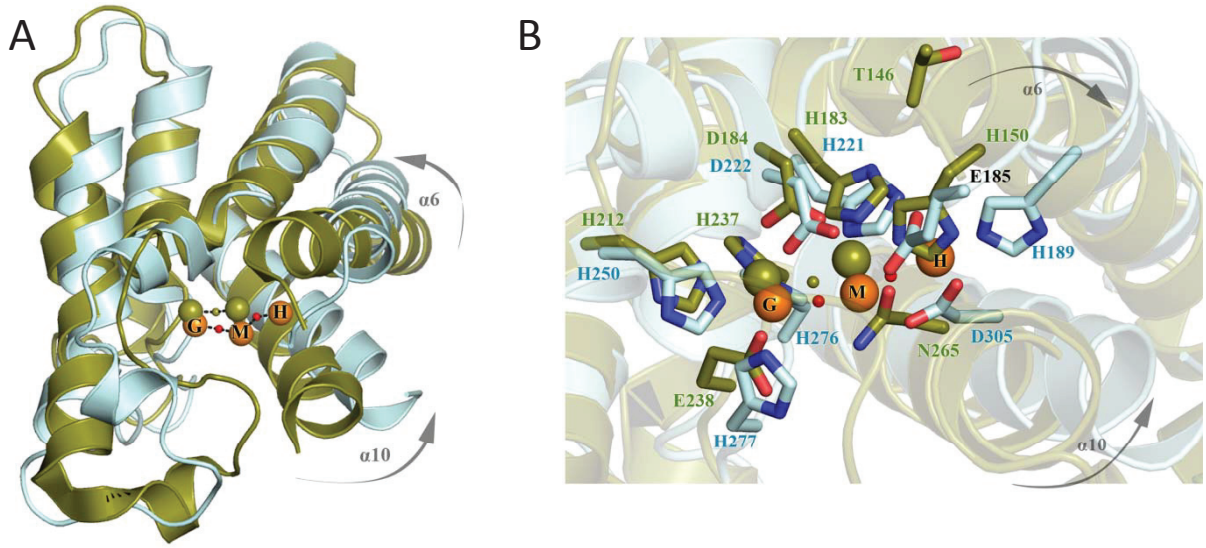


Figure 39 : Comparaison des structures des PDE à domaine HD-GYP PmGH de *Persephonella marina* (Bellini *et al.*, 2014) et Bd1817 de *Bdellovibrio bacteriovorus* (Lovering *et al.*, 2011).
(A) Comparaison des structures des domaines HD-GYP de PmGH (bleu) et Bd1817 (vert). Les sphères orange représentent les trois cations métalliques fixés par PmGH et les deux sphères verte ceux liés par Bd1817. Les différences d'orientation des hélices α6 et α10 entre ces deux structures expliquent la capacité de PmGH à fixer 3 cations plutôt que 2. (B) Superposition des structures secondaires des sites actifs des domaines HD-GYP des deux protéines. Les résidus indiqués permettent la fixation des cations métalliques

	GGDEF uniquement	EAL uniquement	GGDEF et EAL
Protéines totales (n)	5674	1805	3796
Signaux de localisation (%)	56,3%	35,6%	56,4%
- hélices transmembranaires	**54,5%**	**33,5%**	**53,5%**
- peptide signal Sec	25,3%	23,1%	28,3%
- peptide signal Tat	2,0%	0,8%	2,6%
- signal d'ancrage des lipoprotéines	0,4%	1,2%	1,4%
Domaines partenaires (%)	44,9%	26,2%	69,4%
- domaine PAS	14,1%	1,2%	45,8%
- domaine GAF	7,8%	2,3%	9,4%
- domaine REC	9,7%	6,8%	6,2%
- domaine HAMP	5,8%	0,3%	10,4%
- domaine HDOD	0,5%	7,1%	0,0%

Tableau 7 : Occurrence des signaux de localisation spatiale et des domaines associés aux domaines GGDEF et/ou EAL (d'après Seshasayee *et al.*, 2010)
Les peptides signaux Sec et Tat permettent aux protéines de traverser la membrane interne des bactéries à Gram négatif dans une conformation repliée (Tat) ou non (Sec). Le signal d'ancrage des lipoprotéines permet l'ancrage des protéines dans la membrane externe.
PAS : Per-Arnt-Sim ; GAF : cGMP-regulated phosphodiesterases, Adenylate cyclases et FhlA ; REC : phosphoRECeveur ; HAMP : Histidine kinase, Adenylate cyclases, Methyl-binding proteins, Phosphatases ; HDOD : Histidine-Aspartate-Pyrrolysine-Aspartate, Phosphohydrolase de la famille HD.

Très peu de données mécanistiques concernant l'hydrolyse du diGMPc par les domaines HD-GYP sont disponibles car les premières structures de ces protéines n'ont été obtenues que récemment par cristallographie (Lovering *et al.*, 2011, Bellini *et al.*, 2014). Celles-ci ont tout d'abord permis d'appuyer les observations de Ryan *et al*. sur le fonctionnement dimérique de ces protéines (Ryan *et al.*, 2006, Bellini *et al.*, 2014). La structure de la PDE Bd1817 de *Bdellovibrio bacteriovorus* a également permis d'identifier les différents résidus impliqués dans la liaison de deux cations Fe^{2+} ou Mn^{2+} (Lovering *et al.*, 2011). L'absence d'activité de cette enzyme, probablement du fait de l'absence du résidu tyrosine du motif HD-GYP, n'a toutefois pas permis l'identification des acides aminés requis pour la fixation du diGMPc (Lovering *et al.*, 2011). Ceux-ci n'ont été déterminés qu'avec l'obtention de la structure de la protéine PmGH de *Persephonella marina* (Figure 39) (Bellini *et al.*, 2014). La structure de cette protéine, enzymatiquement active, a mis en évidence une liaison du diGMPc dans une conformation différente de la liaison dans le domaine EAL. En effet, dans les PDE à domaine EAL, le diGMPc fixé est dans une conformation étirée alors qu'il se fixe en conformation *cis* dans les PDE à domaine HD-GYP (Bellini *et al.*, 2014). Cette fixation place le diGMPc de manière à ce que les deux ponts phosphoester soient hydrolysables. Cette hydrolyse se ferait de façon séquentielle avec la production intermédiaire de pGpG (Stelitano *et al.*, 2013, Bellini *et al.*, 2014) et pourrait n'impliquer que deux des trois cations que PmGH est capable de fixer (Bellini *et al.*, 2014). Comme les deux structures disponibles sont celles d'enzymes non conventionnelles, l'une inactive (Bd1817) et l'autre liant 3 cations métalliques (PmGH), les mécanismes biochimiques permettant l'hydrolyse devront être confirmés grâce aux structures de nouvelles protéines HD-GYP.

De même que pour les DGC et PDE à domaine EAL, les protéines à domaine HD-GYP sont probablement activées par la perception de signaux via des domaines senseurs (cf. paragraphe « les domaines senseurs de signaux » p. 62).

Un second mécanisme de contrôle de l'activité de ces protéines a été proposé. Il repose sur la nature oxydée ou réduite des cations fixés au niveau du site actif. En effet, la protéine VCA0681 de *Vibrio cholerae* est active lorsque les cations fixés sont des ions Fe^{2+} mais est inactivée par la liaison d'ions Fe^{3+} (Miner *et al.*, 2013).

- *Les domaines associés*

Les domaines GGDEF, EAL et HD-GYP sont fréquemment associés à d'autres domaines. Ce sont principalement des domaines requis pour la détection de signaux ainsi que des signaux d'adressage permettant leur localisation cellulaire.

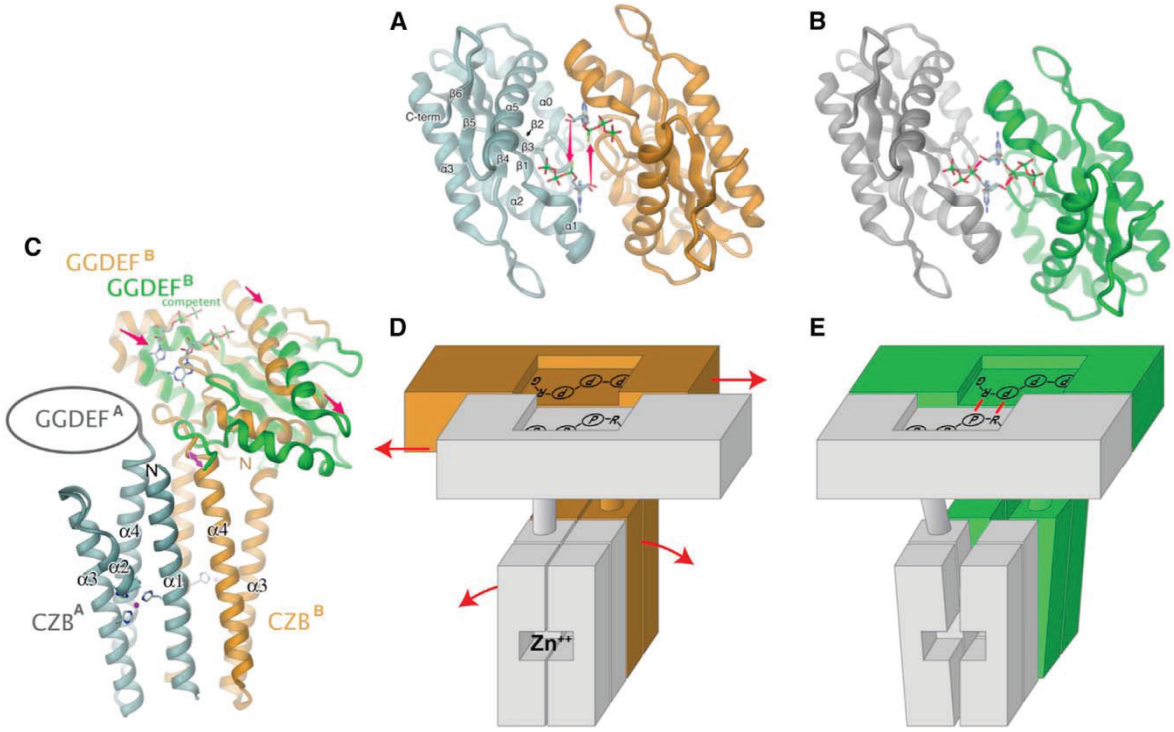


Figure 40 : Modèle du mécanisme d'inhibition de DgcZ d'*E. coli* par le zinc (Zähringer *et al.*, 2013)
(A) Structure du domaine GGDEF de DgcZ sous forme de dimère en présence de zinc. Dans ce cas, les deux molécules de GTP (indiquées par les flèches rouges) ne sont pas à une distance correcte pour permettre la réaction enzymatique, expliquant l'absence de synthèse de diGMPc de DgcZ (B) Modèle structural d'un dimère de domaine GGDEF enzymatiquement actif. Les deux GTP sont plus proches permettant alors la création des deux ponts phosphoester du diGMPc. (C) Comparaison de la structure complète d'un dimère DgcZ inhibé par le zinc (orange et gris) avec le modèle dimérique actif (vert). Pour être active, la structure en orange doit prendre la conformation en vert (mouvements indiqués par les flèches rouges). Ces mouvements seraient inhibés par la présence de zinc sur le domaine CZB (flèche rose) (D&E) Modèle de régulation de DgcZ par le zinc. (D) La fixation de zinc par le domaine CZB joue sur l'interface entre les deux domaines GGDEF, plaçant les deux molécules de GTP en positions trop éloignées pour que la réaction enzymatique puisse se faire. (E) Après la libération du zinc, la conformation du domaine CZB et du reste de la protéine se modifie et permet la juxtaposition des 2 GTP au niveau de l'interface des domaines GGDEF, autorisant la création des deux ponts phosphoester du diGMPc.

~ Les domaines senseurs de signaux

Les DGC et PDE portent fréquemment, en plus de leurs domaines catalytiques, des domaines impliqués dans la détection de signaux. Environ 50% de ces protéines adoptent cette architecture (Tableau 7), suggérant que divers signaux environnementaux influent sur l'activité des domaines GGDEF, EAL ou HD-GYP. Ces domaines senseurs appartiennent à deux catégories : les domaines permettant la perception d'un signal environnemental primaire et ceux permettant la détection d'un signal secondaire transduit par une protéine senseur de signal. Les domaines PAS (Per, Arnt, Sim) et HAMP (Histidine kinases, Adénylates cyclases, Methyl-accepting protein, Phosphatases) sont activés par la fixation directe d'un ligand comme la flavine, le monoxyde de carbone (CO) ou l'oxyde nitrique (NO) (Taylor *et al.*, 1999, Galperin *et al.*, 2001). Le domaine BLUF (Blue-Light sensor Using FAD), souvent associé à une molécule de flavine, permet la détection de lumière bleue (Gomelsky *et al.*, 2002). Le domaine CZB (Chemoreceptor Zinc Binding) perçoit la présence d'ions zinc (Zn^{2+}) (Draper *et al.*, 2011). Quant aux domaines GAF (cGMP-specific phosphodiesterases, Adenylates cyclases, FhlA) et REC (phosphoRECeveur), ils permettent la détection de signaux secondaires via la détection de GMPc ou d'AMPc pour le domaine GAF ou par le biais d'une phosphorylation pour le domaine REC (Ho *et al.*, 2000, Stock *et al.*, 2000).

De nombreuses preuves biochimiques mettent en évidence que ces différents domaines sont requis pour la modulation des activités des domaines GGDEF et EAL (Ryjenkov *et al.*, 2005, Qi *et al.*, 2009, Bharati *et al.*, 2012, Savakis *et al.*, 2012, Yang *et al.*, 2012, Giardina *et al.*, 2013). Cependant, peu de travaux apportent des données structurales sur ces mécanismes, à l'exception de ceux menés sur les protéines à domaine REC (Barends *et al.*, 2009, Deng *et al.*, 2012, Zähringer *et al.*, 2013). Les deux exemples les plus détaillés concernent DgcZ d'*Escherichia coli* et BlrP1 de *Klebsiella pneumoniae*. DgcZ possède un domaine GGDEF ainsi qu'un domaine CZB (Zähringer *et al.*, 2013). Lorsque des ions Zn^{2+} se fixent sur le domaine CZB, DgcZ prend une conformation inadéquate pour l'activité enzymatique, plaçant les deux molécules de GTP de façon trop éloignée pour que la réaction enzymatique puisse se faire (Figure 40) (Zähringer *et al.*, 2013). BlrP1 contient un domaine BLUF et un domaine EAL (Barends *et al.*, 2009). La détection de lumière bleue par la flavine liée au domaine BLUF engendre une modulation de la conformation de ce domaine ainsi que du domaine EAL, stimulant ainsi l'activité PDE de BlrP1 (Barends *et al.*, 2009).

Les protéines à domaines REC sont des régulateurs de réponses (RR) de systèmes à deux composants. Ces systèmes sont constitués d'un senseur associé à un domaine histidine kinase (HK) qui, lorsqu'il est activé par la perception d'un signal, s'autophosphoryle puis phosphoryle le domaine REC de son RR. Les protéines GGDEF/EAL représentent 2,3% de tous les RR des systèmes à deux composants bactériens (Galperin, 2010). Les mécanismes d'activation des protéines GGDEF et/ou

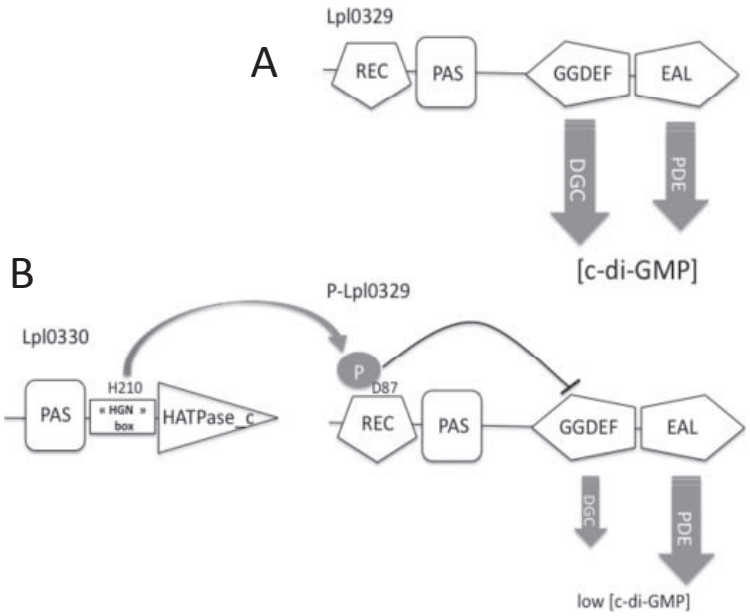


Figure 41 : Modèle de contrôle de la double activité de Lpl0329 par l'histidine kinase Lpl0330 chez *L. pneumophila* (Levet-Paulo *et al.,* 2011)

(A) Lpl0329 non phosphorylée présente une forte activité DGC qui prévaut sur l'activité PDE plus faible. La concentration en diGMPc augmente alors. (B) Lorsque l'HK Lpl0330 phosphoryle le résidu D87 du domaine REC de Lpl0329 alors l'activité PDE de Lpl0329 devient majoritaire. Par conséquent, la concentration en diGMPc diminue.

EAL mettant en jeu la phosphorylation sont les mieux documentés (Ryjenkov *et al.*, 2005, Rao *et al.*, 2009, Levet-Paulo *et al.*, 2011). Par exemple, les protéines Rrp1 de *Borrelia burgdorferi* (Ryjenkov *et al.*, 2005) et RocR de *Pseudomonas aeruginosa* (Rao *et al.*, 2009) doivent être sous une forme phosphorylée pour exercer leurs activités DGC. La phosphorylation peut également moduler les activités des protéines bifonctionnelles. En effet, lorsque la protéine Lpl0329 de *L. pneumophila* à double activité (DGC et PDE) n'est pas phosphorylée, son activité DGC prévaut, alors que lorsqu'elle est phosphorylée par l'HK Lpl0330, c'est son activité PDE qui est majoritaire (Figure 41) (Levet-Paulo *et al.*, 2011). La phosphorylation peut aussi jouer sur l'activation des DGC et PDE en contrôlant leur niveau d'oligomérisation. Dans le cas de PleD de *Caulobacter crescentus*, la phosphorylation du domaine REC module positivement la dimérisation de la protéine, indispensable à son activité enzymatique (Paul *et al.*, 2007).

La caractérisation des signaux perçus par les domaines senseurs autres que le domaine REC est souvent difficile du fait de la variété de signaux que certains domaines peuvent percevoir, expliquant que peu de signaux soient expérimentalement associés aux mécanismes d'activation des DGC et PDE (Barends *et al.*, 2009, Qi *et al.*, 2009, Deng *et al.*, 2012, Savakis *et al.*, 2012). Chez *Acetobacter xylinum*, la protéine AxDGC2 à domaine PAS, GGDEF et EAL est capable de lier la flavine sur son domaine PAS et de moduler l'activité DGC du domaine GGDEF en fonction de son état d'oxydoréduction (Qi *et al.*, 2009). En effet, AxDGC2 synthétise du diGMPc uniquement si la flavine fixée est sous sa forme oxydée (Qi *et al.*, 2009). Chez *Burkholderia cenocepacia*, le domaine PAS de la protéine RpfR lui permet de lier un autoinducteur du système de quorum sensing de cette bactérie (Deng *et al.*, 2012). La fixation de cette molécule provoque des changements de conformation qui stimulent l'activité PDE de RpfR (Deng *et al.*, 2012).

Dans certains cas, le domaine senseur et le domaine catalytique ne sont pas portés par la même protéine. Par exemple, chez *Rhodopseudomonas palustris,* l'activation de la protéine PapA à domaine EAL nécessite la présence de la protéine PapB à domaine BLUF (Kanazawa *et al.*, 2010). Lorsque PapB perçoit de la lumière bleue grâce à la flavine fixée sur son domaine BLUF, alors le complexe PapA/PapB a une activité PDE (Kanazawa *et al.*, 2010).

~ <u>Les séquences peptidiques permettant la localisation spatiale</u>

Les séquences contrôlant la localisation des protéines participent à la répartition des DGC et PDE au sein de la cellule. Parmi celles-ci, les séquences codant les domaines transmembranaires, permettant l'insertion dans la membrane interne, sont majoritaires (Tableau 7) (Seshasayee *et al.*, 2010). En effet, environ 56% des protéines GGDEF et/ou EAL portent des hélices transmembranaires. Par ailleurs, environ 25% des DGC et PDE portent également des signaux permettant leur sécrétion

au travers de la membrane interne par les systèmes d'export Sec ou Tat (Seshasayee *et al.*, 2010). Enfin, une faible proportion de ces protéines (environ 1%) est associée à des signaux de lipoprotéines qui sont requis pour l'ancrage de ces DGC et PDE dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif (Seshasayee *et al.*, 2010).

La localisation de certaines DGC ou PDE peut aussi dépendre de leur conformation activée ou non. C'est notamment le cas pour la protéine PleD de *C. crescentus*. En effet, lorsque PleD n'est pas phosphorylée, elle est présente de façon diffuse dans tout le cytoplasme de la bactérie alors que lorsqu'elle est phosphorylée, elle est localisée à l'un des pôles de la bactérie uniquement (Paul *et al.*, 2007).

2.2.2.3 Le casse-tête (« conundrum ») des protéines à double domaines GGDEF et EAL

Des analyses génomiques mettent en évidence que les domaines GGDEF et EAL ou HD-GYP sont fréquemment portés par une même protéine. En effet, envivon 1/3 des domaines GGDEF et 2/3 des domaines EAL sont organisés en tandem (Seshasayee *et al.*, 2010). Etant donné que ces domaines ont des activités antagonistes de synthèse et de dégradation du diGMPc, pourquoi autant de protéines contiennent-elles ces domaines GGDEF-EAL ou GGDEF-HD-GYP ? Deux possibilités non exclusives sont envisagées pour répondre à cette interrogation. Dans le premier scénario, les deux domaines antagonistes seraient actifs mais ils seraient contrôlés différemment, de sorte qu'à tout moment, une activité prévaudrait sur l'autre. Le second scénario envisage une fonctionnalité que d'un seul des deux domaines.

- *Bifonctionnalité et activation différentielle des deux domaines*

Cette première possibilité est appuyée par l'existence de protéines à double activité enzymatique. En effet, il existe quelques protéines à domaine GGDEF et EAL dont la bifonctionnalité a été démontrée *in vitro* : MsDGC1 de *Mycobacterium smegmatis* (Kumar *et al.*, 2008b) et son homologue MtDGC de *Mycobacterium tuberculosis* (Gupta *et al.*, 2010), BphG1 de *Rhodobacter sphaeroides* (Tarutina *et al.*, 2006), ScrC de *Vibrio parahaemolyticus* (Ferreira *et al.*, 2008), Lpl0329 de *Legionella pneumophila* (Levet-Paulo *et al.*, 2011), SwDGC de *Shewanella woodyi* (Liu *et al.*, 2010) et PP2258 de *Pseudomonas putida* (Österberg *et al.*, 2013). Si ces exemples sont encore peu nombreux dans la littérature, des études génomiques ont révélé que 55% des protéines à domaines GGDEF et EAL contiennent des signatures non dégénérées pour les deux domaines ce qui suggère l'existence d'une bifonctionnalité pour la majorité de ces protéines (Seshasayee *et al.*, 2010). Cette organisation en tandems antagonistes n'est pas exclusive aux DGC et PDE car elle est aussi observée pour les histidines kinases – phosphatases des systèmes à deux composants (Perego *et al.*, 1996) ou pour la protéine SpoT qui synthétise et dégrade l'alarmone (p)ppGpp (Potrykus *et al.*, 2008).

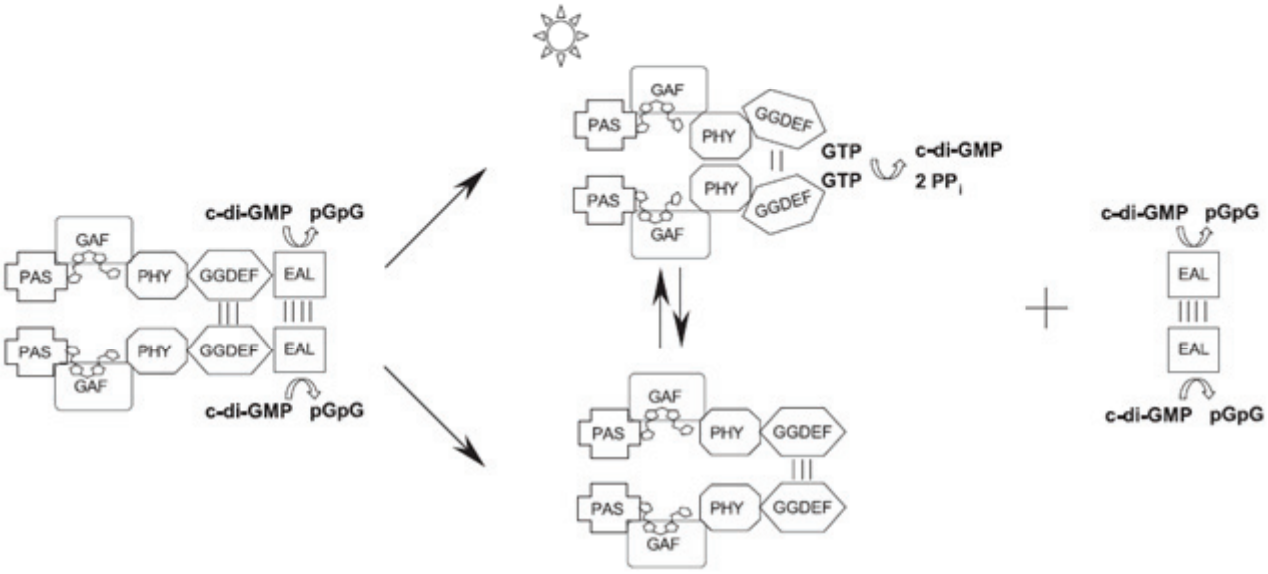


Figure 42 : Modèle de mécanisme d'activation des fonctions DGC de la protéine PDE BphG1 de *Rhodobacter sphaeroides* (Tarutina *et al.,* 2006)
La protéine BphG1, à domaines PAS, GAF, PHY, GGDEF et EAL, est représentée sous forme de dimère. Lorsque la protéine est entière, BphG1 a une activité PDE. Chez *E. coli*, cette protéine est clivée par protéolyse libérant d'une part un peptide avec les domaines senseurs et le domaine GGDEF et d'autre part le domaine EAL. Le peptide EAL garde son activité PDE. La partie contenant le domaine GGDEF peut avoir une activité DGC lorsque les domaines senseurs associés perçoivent des ondes lumineuses.

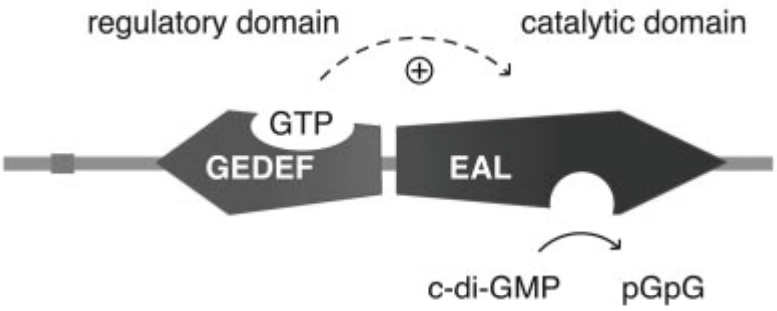


Figure 43 : Modèle de mécanisme de régulation de CC3396 de *Caulobacter crescentus* par le GTP (Christen *et al.,* 2005).
Le motif dégénéré GEDEF ne présente pas d'activité enzymatique mais il a gardé la capacité de fixer une molécule de GTP. Cette liaison de GTP entraine une activation de l'activité PDE du domaine EAL.

Si l'existence de protéines bifonctionnelles est encore peu documentée, il en va de même pour les mécanismes favorisant l'une ou l'autre des activités. A ce jour, nous pouvons recenser des mécanismes de modifications post-traductionnelles (clivage et phosphorylation) et d'interactions avec des protéines partenaires, illustrés par les 3 exemples suivants.

L'une de ces enzymes bifonctionnelles est BphG1 de *R. sphaeroides,* un bacteriophytochrome portant un module photosensible PAS-GAF-PHY (PHYtochrome) lié à un tandem GGDEF et EAL (Figure 42) (Tarutina *et al.*, 2006). Cette protéine présente une activité PDE *in vitro* indépendante de la présence de lumière (Tarutina *et al.*, 2006). Quand BphG1 est surexprimée chez *E. coli*, l'enzyme est spontanément clivée par protéolyse, séparant le domaine EAL du reste de la protéine (Tarutina *et al.*, 2006). Le peptide PAS-GAF-PHY-GGDEF présente alors une activité DGC fortement dépendante de la perception de lumière (Tarutina *et al.*, 2006). Cependant, le déroulement de cette protéolyse chez *R. sphaeroides* est encore hypothétique et il n'est pas exclu que BphG1 puisse être contrôlée par des interactions entre protéines, comme l'est ScrC de *V. parahaemolyticus* (cf. ci-après).

La protéine bifonctionnelle Lpl0329 de *L. pneumophila*, lorsqu'elle n'est pas phosphorylée, présente une activité DGC majoritaire (Levet-Paulo *et al.*, 2011). La phosphorylation de son domaine REC par l'HK atypique Lpl0330 entraine probablement un changement de la conformation de la protéine qui se traduit par une activité PDE majoritaire et une activité DGC minoritaire (Levet-Paulo *et al.*, 2011).

Le gène *scrC* appartient à un opéron de trois gènes *scrABC* qui contrôle la transition entre l'état mobile et l'état sessile de *V. parahaemolyticus* (Boles *et al.*, 2002). *scrC* code une protéine possédant un domaine senseur périplasmique ainsi qu'un tandem GGDEF-EAL (Ferreira *et al.*, 2008). *In vitro*, ScrC a une activité DGC (Ferreira *et al.*, 2008). Cependant, en présence de ScrA et ScrB, ScrC présente une activité PDE (Ferreira *et al.*, 2008). L'interaction de ScrC avec ses deux partenaires contrôlerait directement la transition entre les activités DGC et PDE.

- *Bifonctionnalité et lien entre domaines actifs et dégénérés*

L'obtention des structures de DGC et PDE par crystallographie combinée avec des expériences de mutagénèse spécifique a permis d'établir des règles pour distinguer les sites enzymatiques actifs et inactifs à partir de la séquence protéique. Ces règles ont permis d'estimer qu'environ 45% des protéines à double domaine ont un ou deux de leurs deux domaines catalytiques dégénérés (Seshasayee *et al.*, 2010). Ainsi, ces protéines organisées en tandem ne possèderaient qu'une seule activité enzymatique, voire aucune, bien que le(s) domaine(s) dégénéré(s) puisse(nt) assurer une autre fonction.

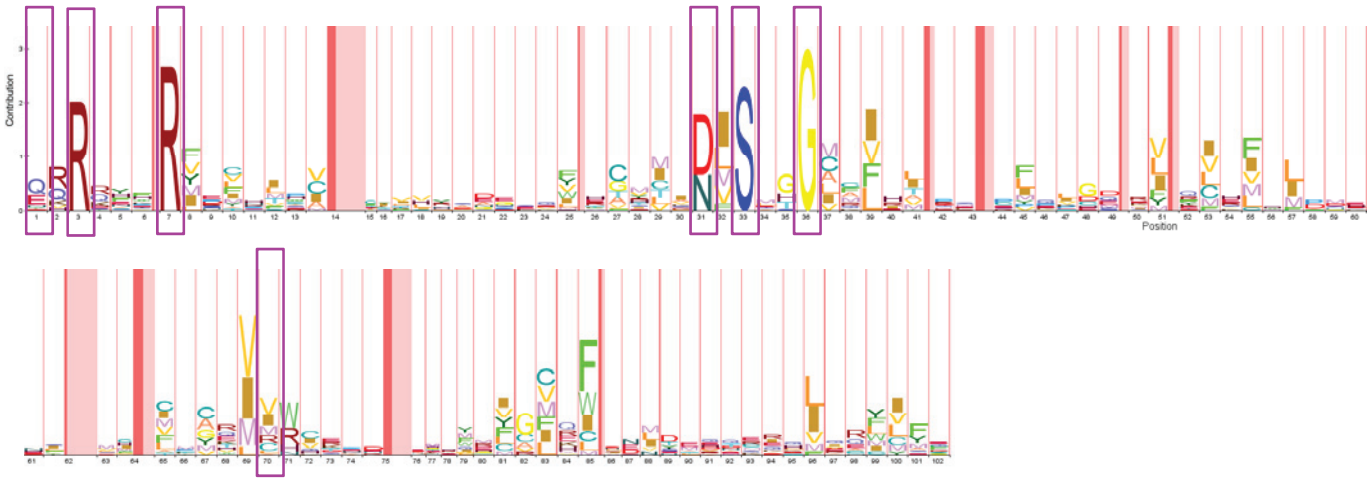


Figure 44 : Conservation de la séquence du domaine PilZ.
Cette séquence HMMLogo a été générée à partir des alignements de la base de données Pfam (Finn *et al.,* 2014) : ID PF07238 avec le logiciel WebLogo. La taille de chaque lettre reflète la fréquence de chaque acide aminé à cette position. Les résidus encadrés en violet participeraient à la fixation du diGMPc.

Cette possibilité est supportée par l'étude de la protéine CC3396 de *Caulobacter crescentus* (Christen *et al.*, 2005). Cette enzyme possède un domaine PAS, un domaine GGDEF dégénéré (GEDEF) ainsi qu'un domaine EAL (Figure 43) (Christen *et al.*, 2005). Le motif dégénéré GGDEF ne présente pas d'activité DGC, cependant, il a gardé la capacité de fixation de son substrat, le GTP (Christen *et al.*, 2005). La fixation de GTP sur ce domaine GEDEF entraine une activation de l'activité PDE du domaine EAL. En effet, la fixation de GTP entraine une hausse de l'affinité du domaine EAL pour le diGMPc (Christen *et al.*, 2005). Ainsi, le domaine GGDEF assurerait un rôle structural et/ou régulateur sur la protéine et ce rôle deviendrait probablement négatif lorsque la bactérie est en état de carence et que sa concentration intracellulaire en GTP est basse.

La protéine CdpA de *Vibrio cholerae*, à domaines GGDEF dégénéré et EAL conservé, semble également se comporter de cette façon. Cette protéine présente une activité PDE (Tamayo *et al.*, 2008). Cependant, lorsque les quelques acides aminés conservés du domaine GGDEF dégénéré (GVGEW) sont mutés (AVGAW), alors la protéine perd son activité PDE (Tamayo *et al.*, 2008), probablement car les mutations introduites abolissent sa capacité de fixation du GTP.

2.2.3 Les effecteurs du diGMPc

Les génomes bactériens contiennent fréquemment de nombreux gènes codant des DGC et PDE, facilement identifiables par la présence de domaines GGDEF, EAL ou HD-GYP. Toutefois, l'identification des molécules liant le diGMPc, appelées effecteurs du diGMPc, est plus compliquée. Actuellement, plusieurs catégories d'effecteurs du diGMPc sont décrites : les protéines à domaine PilZ, les protéines de type CRP-like, certaines protéines GGDEF/EAL inactives ainsi que d'autres protéines ne possédant aucune de ces caractéristiques. De plus, le diGMPc peut être lié à des effecteurs non protéiques : les riboswitches portés par certains ARN.

2.2.3.1 Les effecteurs à domaine PilZ

Les protéines à domaine PilZ ont été les premières protéines fixatrices du diGMPc mises en évidence. Leur fonction a tout d'abord été prédite dans les travaux de Amikam *et al.* (Amikam *et al.*, 2006). En effet, ces protéines ont une distribution phylogénique similaire à celle des protéines GGDEF/EAL et l'une d'elles est présente dans le complexe de synthèse de la cellulose de *G. xylinum* qui a permis la découverte du diGMPc par Ross *et al.* (Ross *et al.*, 1987). Les vérifications expérimentales de la fixation du diGMPc par les protéines à domaine PilZ ont été publiées très peu de temps après (Ryjenkov *et al.*, 2006, Christen *et al.*, 2007, Merighi *et al.*, 2007, Pratt *et al.*, 2007, Freedman *et al.*, 2010). Ces études ont mis en évidence que la fixation du diGMPc sur ce domaine PilZ s'effectue avec une forte affinité *in vitro*, inférieure à 1 µM, ce qui est cohérent par rapport à la concentration intracellulaire en diGMPc qui est de l'ordre du µM (Weinhouse *et al.*, 1997, Paul *et al.*, 2004, Simm *et al.*, 2004).

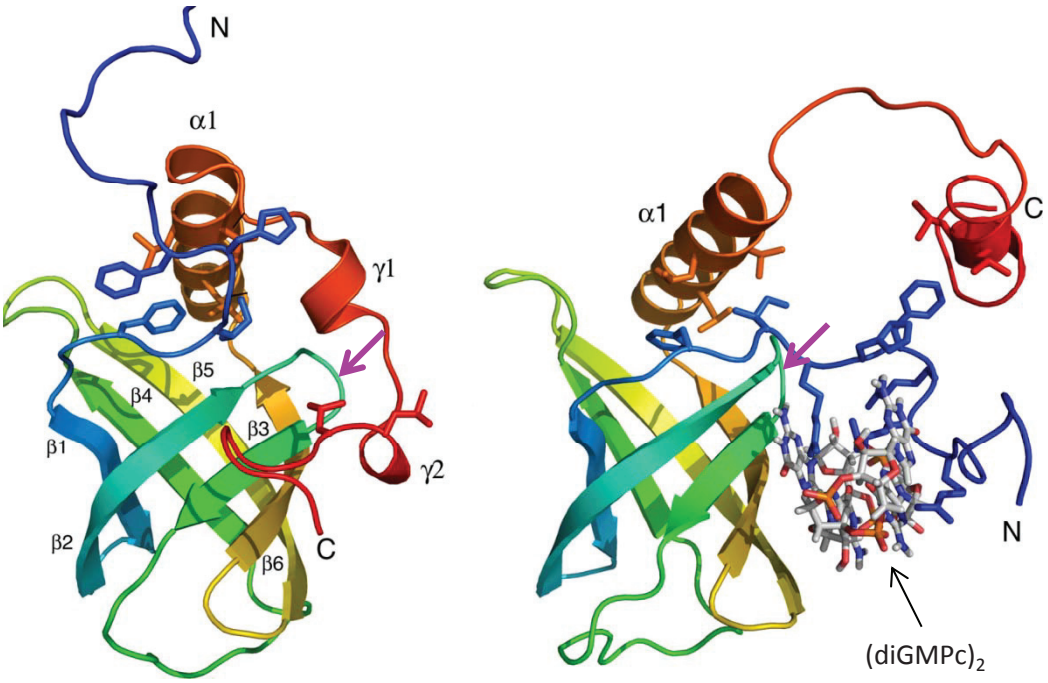


Figure 45 : Structure de la protéine PA4608 de *Pseudomonas aeruginosa* en complexe ou non avec le diGMPc (Habazettl *et al.*, 2011).
(A) PA4608 seule et (B) PA4608 en complexe avec le diGMPc sous forme de dimère intercalant.
La fixation du diGMPc induit une forte réorganisation de la protéine, en particulier des extrémités N (en bleu) et C (en rouge). Les résidus conservés RxxxR se situent au niveau de la partie en bleue et les résidus DxSxxG entre les feuillets β2 et β3 au niveau de la flèche violette.

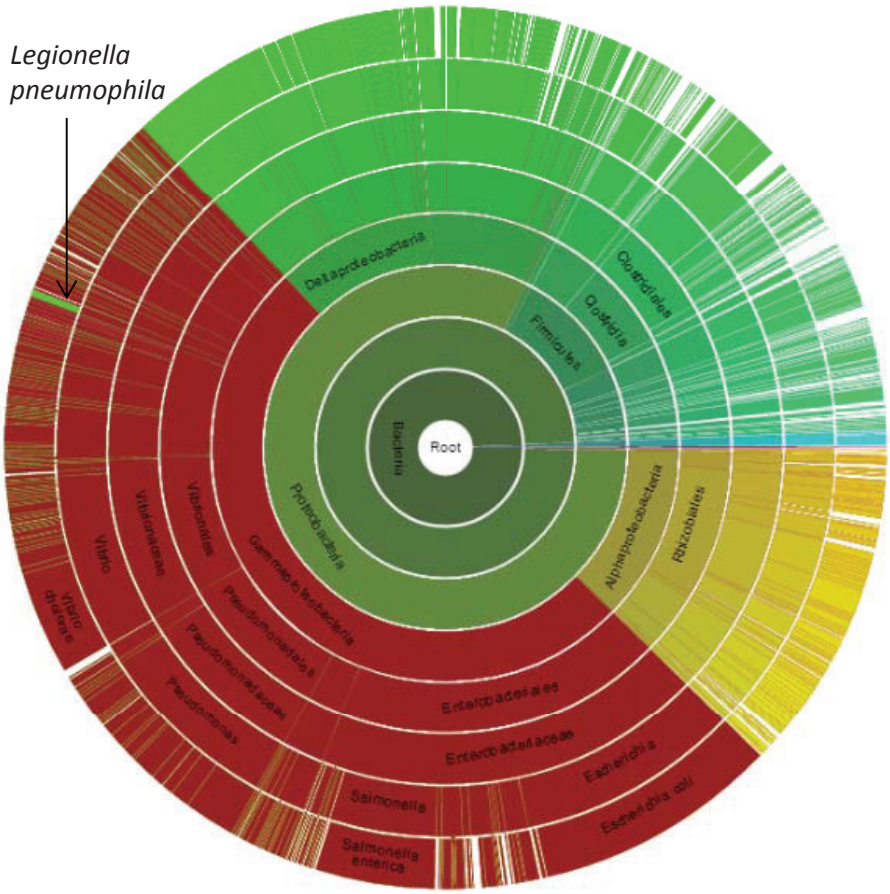


Figure 46 : Distribution du domaine PilZ parmi les espèces. (d'après Finn *et al.*, 2014).
Cette représentation montre chaque nœud d'un arbre phylogénétique sous la forme d'un arc de cercle, disposé radialement à partir des domaines domaines *Eukaryota*, *Bacteria* et *Archaea* au centre jusqu'aux espèces sur l'anneau le plus extérieur.
La classe des *Gamma-proteobacteria* est indiquée en rouge et à l'intérieur de cette classe l'espèce *Legionella pneumophila* est colorée en vert.

Plusieurs structures de protéines à domaine PilZ ont été résolues (Benach *et al.*, 2007, Ramelot *et al.*, 2007, Ko *et al.*, 2010, Habazettl *et al.*, 2011, Shin *et al.*, 2011, Fujiwara *et al.*, 2013). Elles ont confirmées les prédictions biofinformatiques (Amikam *et al.*, 2006) et les observations biochimiques (Ryjenkov *et al.*, 2006) suggérant que 2 zones de résidus sont nécessaires pour la liaison de diGMPc. L'ensemble de ces données a permis de définir un consensus indiqué dans la figure 44. Le diGMPc se fixerait d'abord sur le motif RxxxR localisé sur une boucle qui entourerait le diGMPc (Figure 45) (Habazettl *et al.*, 2011). Cette fixation attirerait les résidus de la seconde zone conservée. Le diGMPc fonctionnerait comme un « ciment interdomaine » en reliant ces deux parties du domaine PilZ, initiant de cette façon les événements de signalisation en aval (Habazettl *et al.*, 2011). Ces protéines peuvent fixer le diGMPc sous sa forme dimérique intercalée (Figure 45) (Ryjenkov *et al.*, 2006, Ramelot *et al.*, 2007, Ko *et al.*, 2010) ou sous sa forme monomérique à conformation fermée (Benach *et al.*, 2007). Elles adoptent elles-mêmes différents états oligomériques puisqu'elles peuvent être monomériques, dimériques ou tétramériques (Ko *et al.*, 2010, Habazettl *et al.*, 2011, Li *et al.*, 2011, Gentner *et al.*, 2012), suggérant d'éventuelles différences dans les modes de transduction du signal.

Les gènes codant les protéines PilZ présentent une distribution phylogénique similaire à celle des gènes codant les protéines GGDEF/EAL (Figure 46). Cependant, leur nombre varie beaucoup et ne corrèle pas avec le nombre de gènes codant les protéines à domaine GGDEF/EAL (Römling *et al.*, 2013). Par exemple, *E. coli* qui possède 29 protéines à domaine GGDEF/EAL a seulement 2 protéines à domaine PilZ. Au contraire, *Bdellovibrio bacteriovorus* qui ne possède que 12 DGC et PDE compte 15 protéines à domaine PilZ. La moitié des protéines PilZ ne possède que le domaine PilZ. Pour l'autre moitié, le domaine PilZ est associé avec des domaines senseurs (REC, MCP (methyl-accepting chemotaxis protein), HAMP, PAS…), des domaines de fixation à l'ADN ou des domaines portant des activités enzymatiques (glycosyltransférases, adenylate/guanylate cyclases,…) (Amikam *et al.*, 2006). L'association avec ces domaines met en évidence les potentiels modes d'action de ces protéines : la modulation de l'expression de gènes ou la modification d'une cible protéique par une activité enzymatique.

Etant donné que certains génomes bactériens ne codent pour aucune protéine à domaine PilZ alors qu'ils codent des protéines à domaine GGDEF/EAL (Römling *et al.*, 2013), il existe très vraisemblablement d'autres effecteurs du diGMPc (Amikam *et al.*, 2006). D'ailleurs, cette hypothèse a été vérifiée génétiquement puisque la délétion de tous les gènes codant les protéines à domaine PilZ de *V. cholerae* n'abolit pas l'effet du diGMPc sur la morphologie des colonies, suggérant que d'autres acteurs sont bien capables de répondre à la présence de ce messager secondaire (Beyhan *et al.*, 2008).

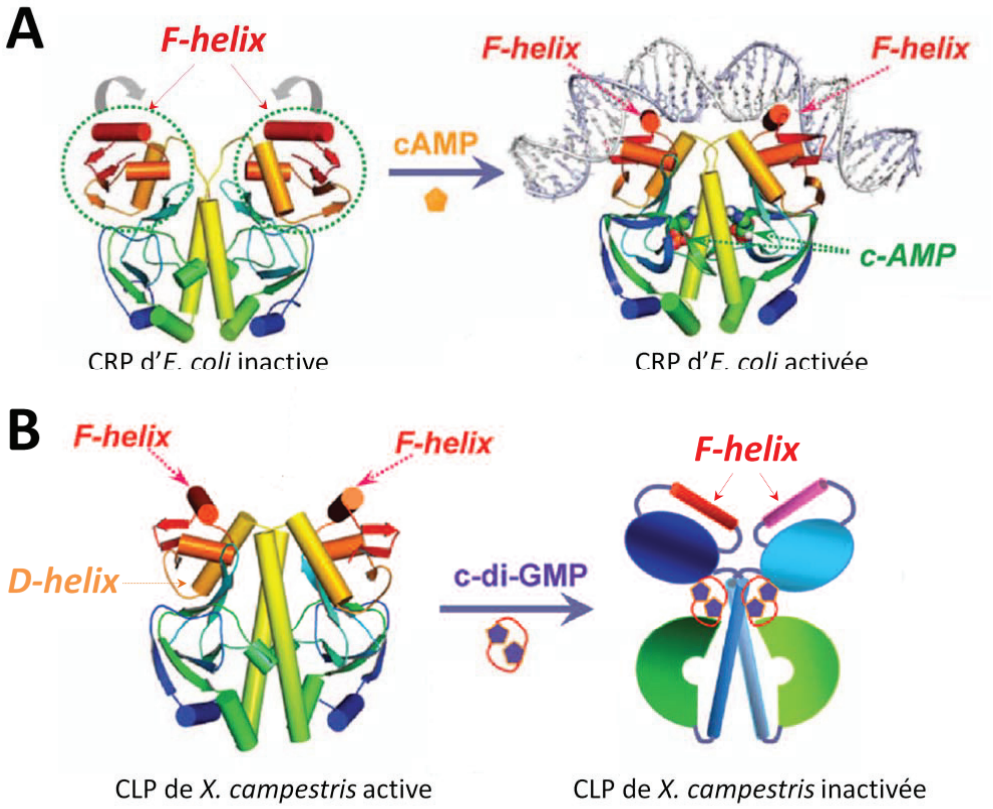


Figure 47 : Modèle de fonctionnement de la CRP d'*E. coli* et de la CLP de *X. campestris* (d'après Chou *et al.,* 2011)

(A) La fixation d'AMPc sur les protéines CRP engendre d'importants réarrangements de conformation permettant le bon positionnement des hélices F capables d'interagir avec l'ADN. (B) Clp peut fixer le diGMPc au niveau de son hélice D. Cette fixation n'entraine pas une stimulation de sa capacité à fixer l'ADN via ces hélices F, comme le fait l'AMPc sur les CRP, mais une inhibition de cette propriété.

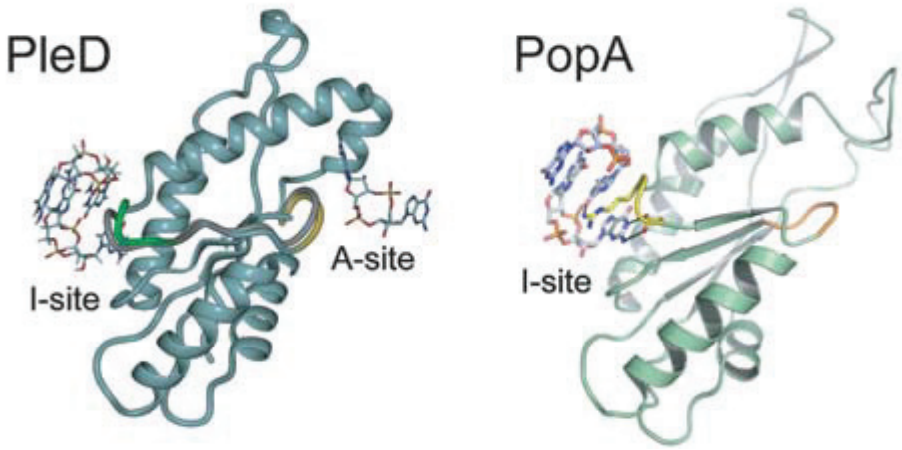


Figure 48 : Comparaison des structures d'une DGC active, PleD, et d'une DGC inactive, PopA, chez *Caulobacter crescentus* (d'après Duerig *et al.,* 2009)

La structure de la protéine PleD provient des travaux de Chan *et al.* (Chan *et al.,* 2004). Cette comparaison met en évidence que le site actif (A-site) de PopA ne prend pas une conformation en hélice requise pour la fonctionnalité de l'enzyme. Cependant, son site inhibiteur (I-site) adopte une conformation similaire à celle de PleD et permet la fixation du diGMPc.

2.2.3.2 Les protéines de type CLP

Certaines protéines de la famille des protéines CRP (cAMP receptor protein), notées CLP (CRP-like protein) font partie des effecteurs du diGMPc. Les protéines CRP sont des régulateurs transcriptionels capables de fixer l'AMPc (Emmer *et al.*, 1970). La fixation de l'AMPc sur les CRP augmente l'affinité de ces protéines pour l'ADN, permettant ainsi leur fixation sur des régions promotrices cibles et l'expression des gènes correspondants (Emmer *et al.*, 1970). Actuellement, deux catégories de CLP sont décrites : celles stimulées par la fixation de diGMPc et celles inhibées.

Historiquement, la première CLP identifiée est la protéine Clp de *Xanthomonas campestris* (Leduc *et al.*, 2009). Presque toutes les études concernant les CLP ont été réalisées sur cette protéine (Leduc *et al.*, 2009, Chin *et al.*, 2010, Tao *et al.*, 2010, Chou, 2011) et sur son homologue chez *Xanthomonas axonopodis* (Leduc *et al.*, 2009) bien qu'elle soit également présente et fonctionnelle chez d'autres espèces bactériennes comme *Stenotrophomonas maltophilia* (Tao *et al.*, 2010). Ces études ont mis en évidence que la fixation du diGMPc sur Clp abolit la capacité de cette protéine à interagir avec les promoteurs de ces gènes cibles (Leduc *et al.*, 2009, Chin *et al.*, 2010). En effet, cette affinité pour l'ADN, inférieure à 100 nM en absence de diGMPc, avoisine les 10 µM en présence de diGMPc (Leduc *et al.*, 2009). La résolution de la structure de Clp ainsi que des travaux de mutagénèse dirigée ont révélé que l'hélice F (Figure 47) ainsi que les résidus E99, R150, D162, V165 et R195 sont nécessaires pour la liaison à l'ADN et que l'hélice D participe à la fixation du diGMPc (Figure 47) (Chin *et al.*, 2010, Tao *et al.*, 2010, Chou, 2011). La fixation du diGMPc engendre une modification de la conformation de la protéine, induisant un déplacement des hélices F qui ne sont plus orientées correctement pour interagir avec l'ADN (Figure 47) (Chou, 2011).

La protéine Bcam1349 de *Burkholderia cenocepacia* est également capable de lier le diGMPc (Fazli *et al.*, 2011). Cette protéine, qui ne présente que 15% d'identité avec Crp d'*E. coli*, appartient tout de même à la famille des régulateurs transcriptionnels CLP (Fazli *et al.*, 2011). Bcam1349 appartient à la famille des CLP stimulées par la fixation du diGMPc puisque la présence de ce messager secondaire augmente l'affinité de Bcam1349 pour les promoteurs de ses gènes cibles (Fazli *et al.*, 2011). En absence de structure résolue pour cette protéine, le mécanisme d'activation par le diGMPc reste encore à élucider.

2.2.3.3 Les protéines GGDEF/EAL

Les protéines à domaines GGDEF/EAL jouent parfois le rôle d'effecteur du diGMPc, notamment lorsqu'elles contiennent des sites GGDEF ou EAL dégénérés.

En effet, bien que les protéines a domaine GGDEF dégénéré soient enzymatiquement inactives, elles gardent souvent la capacité de fixer leur substrat, le GTP (Christen *et al.*, 2005), mais

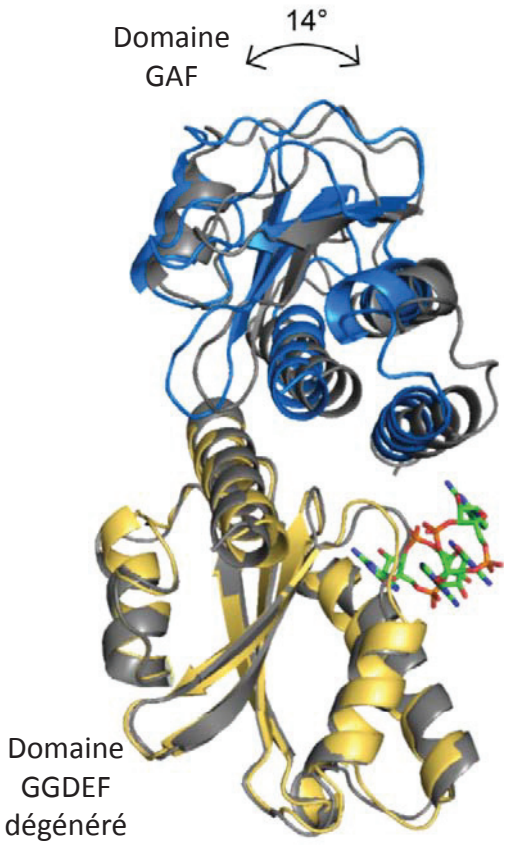


Figure 49 : Comparaison des structures de PelD de *P. aeruginosa* liée ou non au diGMPc (d'après Whitney *et al.,* 2012)
La protéine PelD possède un domaine GAF ainsi qu'un domaine GGDEF dégénéré mais contenant un site I intact. La fixation du diGMPc sur le site GGDEF dégénéré entraine une modification subtile de la conformation de la protéine qui se traduit par une rotation de 14° du domaine GAF. La structure en gris représente PelD sans fixation de diGMPc et la structure en bleu et jaune PelD liant le diGMPc.

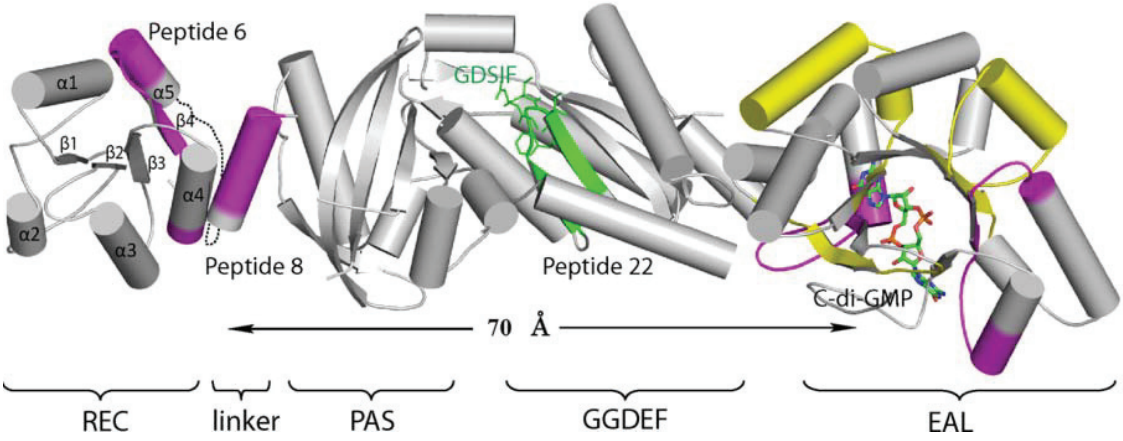


Figure 50 : Modèle structural de FimX de *P. aeruginosa* (d'après Qi *et al.,* 2011).
Les changements de conformation de la protéine en présence du diGMPc ont été évaluées par deutération. La structure présentée ici met en évidence en magenta et jaune les régions dont la conformation est largement ou moyennement modifiée, respectivement. Le peptide contenant le motif GGDEF, ici GDSIF, est indiqué en vert.

également leur produit, le diGMPc, au niveau de leurs sites I (Figure 48) (Christen *et al.*, 2006). Plusieurs exemples ont ainsi été mis en évidence dans la littérature (Duerig *et al.*, 2009, Hobley *et al.*, 2012, Petters *et al.*, 2012). La protéine PopA de *Caulobacter crescentus* est capable de lier le diGMPc au niveau du site I de son domaine GGDEF dégénéré (Figure 48) (Duerig *et al.*, 2009). Cette fixation entraine sa localisation au pôle cellulaire et le recrutement à ce même pôle de l'inhibiteur de l'initiation du cycle cellulaire CtrA. Cette localisation de CtrA conduira à sa dégradation par la protéase ClpXP, permettant ainsi a la progression du cycle cellulaire (cf. paragraphe « Différentiation cellulaire de *Caulobacter crescentus* » p. 75) (Duerig *et al.*, 2009).

La protéine SgmT de *Myxococcus xanthus* appartient également à cette catégorie d'effecteurs (Petters *et al.*, 2012). Cette protéine à domaines GAF, HK, REC et GGDEF dégénéré, contrôle la production de la matrice extracellulaire (Petters *et al.*, 2012). L'activation de l'activité HK est contrôlée par la perception d'un signal par le domaine senseur GAF (Petters *et al.*, 2012). La liaison du diGMPc sur le domaine GGDEF n'influe par sur l'activité HK mais permet le contrôle de la localisation cytoplasmique de la protéine (Petters *et al.*, 2012).

Parfois, comme pour la protéine membranaire PelD de *Pseudomonas aeruginosa*, le site GGDEF est tellement dégénéré qu'il est à peine identifiable (Lee *et al.*, 2007, Whitney *et al.*, 2012). En effet, la séquence protéique de PelD est très peu conservée par rapport à celles des DGC actives malgré la présence d'un site I (Lee *et al.*, 2007). La résolution de la structure de PelD en présence ou non de diGMPc a permis de mettre en évidence que la fixation du diGMPc entraine, comme la perception des signaux par les domaines senseurs, un changement de conformation de la protéine nécessaire à la production de la matrice extracellulaire (Figure 49) (Whitney *et al.*, 2012).

A l'instar des domaines GGDEF dégénérés, les domaines EAL dégénérés peuvent fonctionner comme effecteurs du diGMPc lorsqu'ils ont gardé la capacité de fixer le diGMPc au niveau de leurs sites actifs. Plusieurs protéines entrent dans cette classe d'effecteurs : la protéine LapD de *Pseudomonas fluorescens* (Newell *et al.*, 2009, Newell *et al.*, 2011a, Newell *et al.*, 2011b), la protéine FimX de *P. aeruginosa* (Kazmierczak *et al.*, 2006, Navarro *et al.*, 2009, Qi *et al.*, 2011) et vraisemblablement la protéine YkuI de *Bacillus subtilis* qui fixe le diGMPc mais ne présente pas d'activité PDE à ce jour (Minasov *et al.*, 2009). La protéine FimX, impliquée dans le contrôle de la mobilité dépendante du pilus de type IV, est constituée de domaines REC, PAS, GGDEF dégénéré et EAL dégénéré (Kazmierczak *et al.*, 2006). La fixation du diGMPc sur le domaine EAL inactif ainsi que la phosphorylation du domaine REC sont nécessaires pour la localisation de FimX au niveau du pôle cellulaire où est ancré le pilus de type IV (Kazmierczak *et al.*, 2006). Là encore, la liaison du diGMPc entraine une modulation de la conformation totale de la protéine (Figure 50) (Qi *et al.*, 2011).

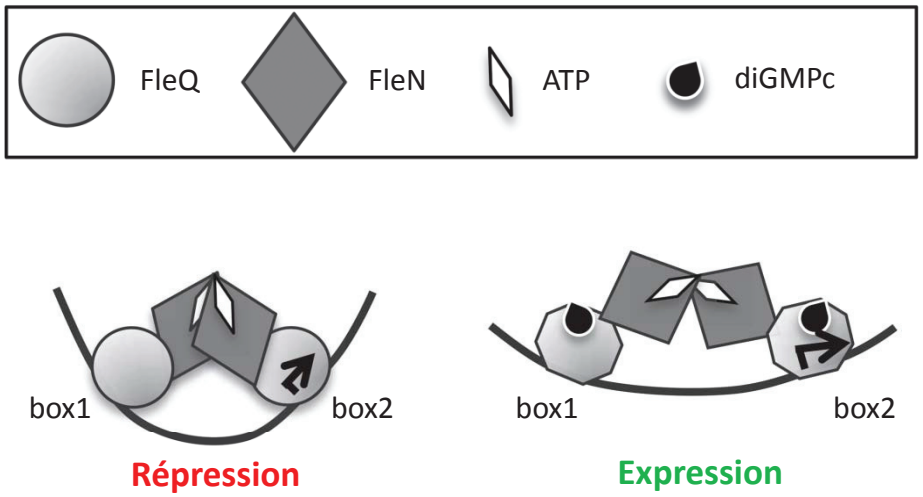


Figure 51 : Modèle de régulation de l'expression des gènes *pel* par l'effecteur du diGMPc FleQ chez *P. aeruginosa* (d'après Baraquet *et al.,* 2012).
(A) FleQ se fixe sur deux types de séquences présentes sur les promoteurs de gènes *pel* : box1 et box2 située au niveau du +1 de transcription. En présence d'ATP, FleQ interagit avec FleN, ce qui induit une torsion de l'ADN, empêchant l'expression des gènes *pel*. Il est proposé que les deux protéines FleN qui interagissent avec les deux FleQ forment un pont en interagissant l'une avec l'autre, provoquant ainsi la courbure de l'ADN. (B) La fixation de diGMPc sur FleQ induirait un changement de conformation de la protéine et peut-être même de FleN. Ce changement engendrerait un relâchement de la torsion de l'ADN, permettant l'accès à l'ARN polymérase et par conséquent l'expression des gènes *pel*.

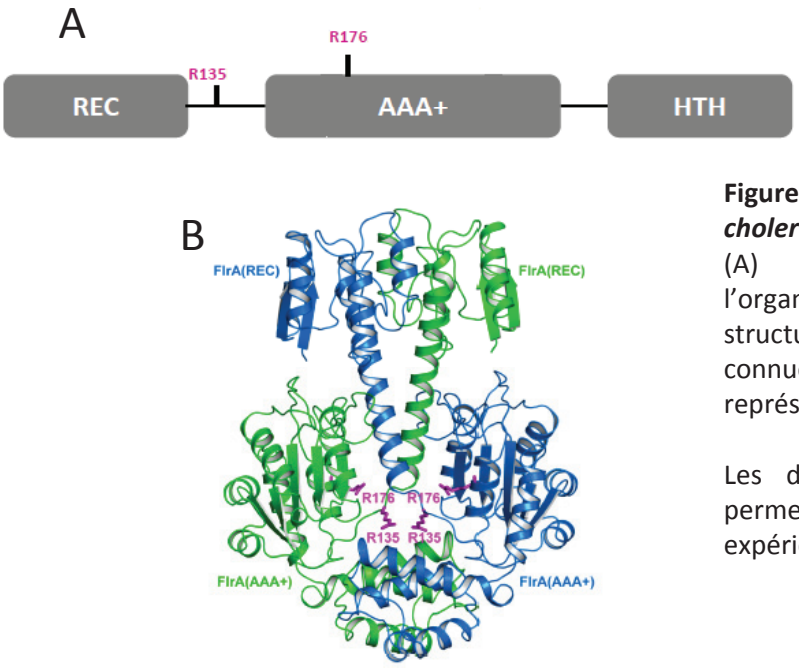


Figure 52 : Structure de FlrA de *Vibrio cholerae* (d'après Srivastava *et al.,* 2013).
(A) Représentation schématique de l'organisation de FlrA. (B) Modélisation de la structure de FlrA à partir des structures connues des domaines REC et AAA+. FlrA est représentée ici sous forme de dimère.

Les deux résidus indiqués en magenta permettent de fixer le diGMPc d'après des expériences de mutagénèse dirigée.

Il est probable que les domaines HD-GYP dégénérés puissent également assurer cette fonction d'effecteur. Toutefois, l'existence de ce type de protéine n'a pas encore été mise en évidence.

2.2.3.4 Autres protéines effectrices fixant le diGMPc

Ces dernières années, plusieurs nouvelles protéines ont été identifiées comme effecteurs du diGMPc, bien qu'elles ne possèdent aucun des domaines précédemment décrits. Ce sont majoritairement des facteurs de transcription appartenant aux familles NtrC/DctD et CsgD/LuxR.

Chez *P. aeruginosa*, le facteur de transcription FleQ, de la famille NtrC/DctD, est capable de fixer le diGMPc malgré l'absence de structures secondaires similaires à celles d'effecteurs connus du diGMPc (Hickman *et al.*, 2008). Elle est organisée en trois domaines : un domaine phosphoreceveur REC, un domaine AAA^+ à activité ATPase et un domaine de liaison à l'ADN HTH (Hélice-Tour-Hélice) (Hickman *et al.*, 2008). La fixation du diGMPc au niveau du motif Walker A du domaine AAA^+ (Baraquet *et al.*, 2013), qui lie habituellement l'ATP (Bose *et al.*, 2008), contrôle la fonction de facteur de transcription de FleQ (Figure 51) (Hickman *et al.*, 2008, Baraquet *et al.*, 2012). En effet, la liaison de diGMPc convertit FleQ de répresseur en activateur transcriptionnel des gènes *pel*, codant des exopolysaccharides nécessaires pour la formation de biofilms (Baraquet *et al.*, 2012, Baraquet *et al.*, 2013). Ainsi, en absence de diGMPc, FleQ interagit avec les régions promotrices des gènes *pel* ainsi qu'avec la protéine FleN, bloquant la transcription de ces gènes du fait de la formation d'une torsion de l'ADN (Figure 51A) (Baraquet *et al.*, 2012). Lorsque le diGMPc se fixe sur FleQ, l'ADN est libéré de cette torsion ce qui permet probablement à l'ARN polymérase d'accéder au promoteur pour initier la transcription (Figure 51B) (Baraquet *et al.*, 2012). L'homologue de FleQ chez *V. cholerae*, FlrA, est également capable de lier le diGMPc (Srivastava *et al.*, 2013). Toutefois, FlrA permet de contrôler l'expression de gènes flagellaires, dont l'opéron *flrBC,* et non des gènes nécessaires à la synthèse des exopolysaccharides (Srivastava *et al.*, 2013). De plus, l'action de FlrA sur la transcription ne semble pas requérir des protéines partenaires comme FleN pour FleQ (Srivastava *et al.*, 2013). Enfin, cette étude à permis d'identifier deux résidus requis pour la fixation du diGMPc, les arginines en positions 135 et 176 (Figure 52) (Srivastava *et al.*, 2013).

Le diGMPc peut également être fixé par des régulateurs de transcription de la famille CsgD/LuxR tels que VpsT de *V. cholerae* (Krasteva *et al.*, 2010) et son homologue CpsQ chez *V. parahaemolyticus* (Ferreira *et al.*, 2012). La liaison de diGMPc sur VpsT module directement son niveau d'oligomérisation, nécessaire à son effet activateur de transcription des gènes *vps* (*Vibrio* PolySaccharide) (Krasteva *et al.*, 2010). De plus, VpsT liant le diGMPc peut également assurer un rôle de répresseur, notamment sur la transcription du gène *rpoS* codant le facteur sigma alternatif RpoS

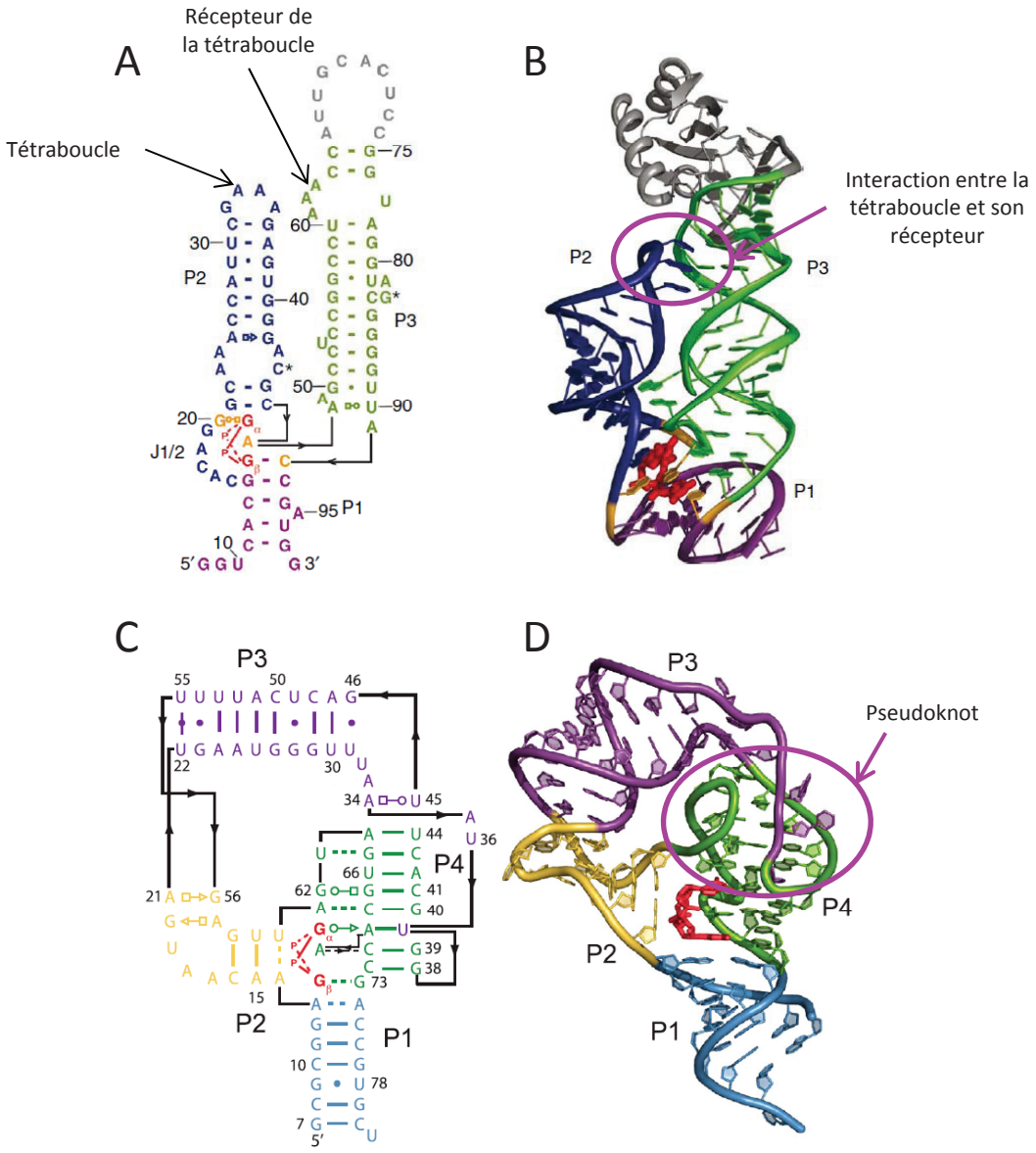


Figure 53 : Structures des riboswitchs de classe I et II (d'après Smith *et al.,* 2009 ; Smith *et al.,* 2011).
Représentation schématique de la séquence (A) et de la structure (B) du riboswitch de classe I porté par l'ARNm de *VC1722* de *V. cholerae,* un gène de type *tfoX.* Ce riboswitch porte un motif GEMM (Genes for Environment, Membranes and Motility) de type I caractérisé par la séquence GRRA (ou R est une purine). Les hélices P1, P2 et P3 sont indiquées en violet, bleu et vert, respectivement. Les nucléotides qui interagissent avec le diGMPc (en rouge) sont indiqués en orange. L'interaction entre la tétraboucle, c'est-à-dire une boucle terminale de 4 nucléotides, et sa séquence récepteur est indiquée par le cercle violet.
Représentation schématique de la séquence (C) et de la structure (D) du riboswitch de classe II porté par l'ARNm de *CA_C0561* de *Clostridium acetobutylicum*. Les hélices P1, P2, P3 et P4 sont indiquées en bleu, jaune, violet et vert, respectivement. Le diGMPc est représenté en rouge. Cette structure est caractérisé par un pseudoknot ou pseudonoeud (cercle violet), c'est-à-dire une structure à deux tige-boucle dans laquelle la boucle de la première structure est impliquée dans la structure tige de la seconde tige boucle, formant ainsi un triplex.

impliqué dans l'entrée en phase stationnaire de croissance et dans la réponse à différents stress (Wang *et al.*, 2014).

Enfin, parmi les effecteurs du diGMPc sans domaines de fixation identifiés, il existe des protéines n'agissant pas sur le contrôle transcriptionnel. C'est, par exemple, le cas de BdcA d'*E. coli* qui appartient à la famille des oxydoréductases à courte chaine (Ma *et al.*, 2011). Cependant, les mécanismes dépendants du diGMPc qui permettent à cette protéine de contrôler la dispersion des bactéries à partir d' un biofilm ne sont pas encore élucidés.

2.2.3.5 Les effecteurs de type nucléique : les riboswitchs

Le diGMPc compte également des effecteurs de nature nucléique, les riboswitchs ou riborégulateurs. Ce sont des structures secondaires portées par certains ARN permettant la fixation de petites molécules (Winkler, 2005, Breaker, 2008). Lorsque que le ligand se fixe sur le riboswitch, la structure secondaire change ce qui induit des effets positifs ou négatifs sur la terminaison de la transcription, la stabilité de l'ARNm (ARN messager) ou la traduction du gène porté par l'ARNm (Barrick *et al.*, 2007, Serganov *et al.*, 2013).

Deux types de riboswitchs sont capables de lier spécifiquement le diGMPc (Figure 53) (Sudarsan *et al.*, 2008, Lee *et al.*, 2010). Ils sont séparés en deux classes en fonction de leur structure : les riboswitchs de classe I et II (Figure 53). Ces structures sont présentes en amont de nombreux gènes. En effet, 322 séquences codant des riboswitchs de classe I ont été identifiées dans les génomes de nombreuses bactéries, et plus spécifiquement dans les génomes des *Proteobacteria* et des *Firmicutes* (Sudarsan *et al.*, 2008). La delta-protéobactérie *Geobacter uraniumreducens* compte même 30 de ces séquences dont 5 sont organisées en tandem (Sudarsan *et al.*, 2008). La distribution des riboswitchs de classe II est plus réduite. Ils sont majoritairement retrouvés dans les génomes des *Deinococcus* et des *Clostridia* (Lee *et al.*, 2010). Notamment, *Clostridium difficile* possède 12 séquences codant ce type de riborégulateur (Lee *et al.*, 2010).

- *Les riboswitchs de classe I*

Les riboswitchs de classe I sont caractérisés par un motif spécifique, GEMM (Genes for Environment, Membranes and Motility), contenant une structure particulière : une tétraboucle GNRA, c'est-à-dire une boucle constituée de 4 nucléotides où R est une purine et N l'un des 4 nucléotides (Weinberg *et al.*, 2007, Sudarsan *et al.*, 2008). Ce motif GEMM est classé en fonction de son architecture, basée sur la présence de la tétraboucle uniquement (GEMM de type II avec une tétraboucle GRRA) ou sur la présence de la tétraboucle associée à une région capable d'interagir avec celle-ci (GEMM de type I avec une tétraboucle GYRA où Y est une pyrimidine), donnant au riboswitch plus ou moins de flexibilité (Sudarsan *et al.*, 2008, Fujita *et al.*, 2012). Ces structures sont portées par

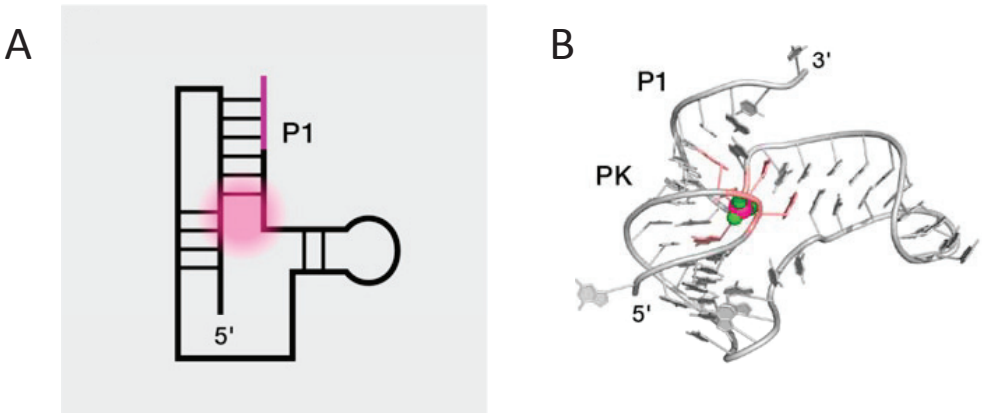


Figure 54 : Structure des pseudoknots (Serganov *et al.*, 2013)
Représentation schématique (A) et structure (B) d'un pseudoknot. La zone indiquée en rose représente le site de fixation du ligand (en rose et vert). Le segment en magenta dans l'hélice P1 indique les séquences qui peuvent être impliquées dans une hybridation alternative.
PK : pseudoknot

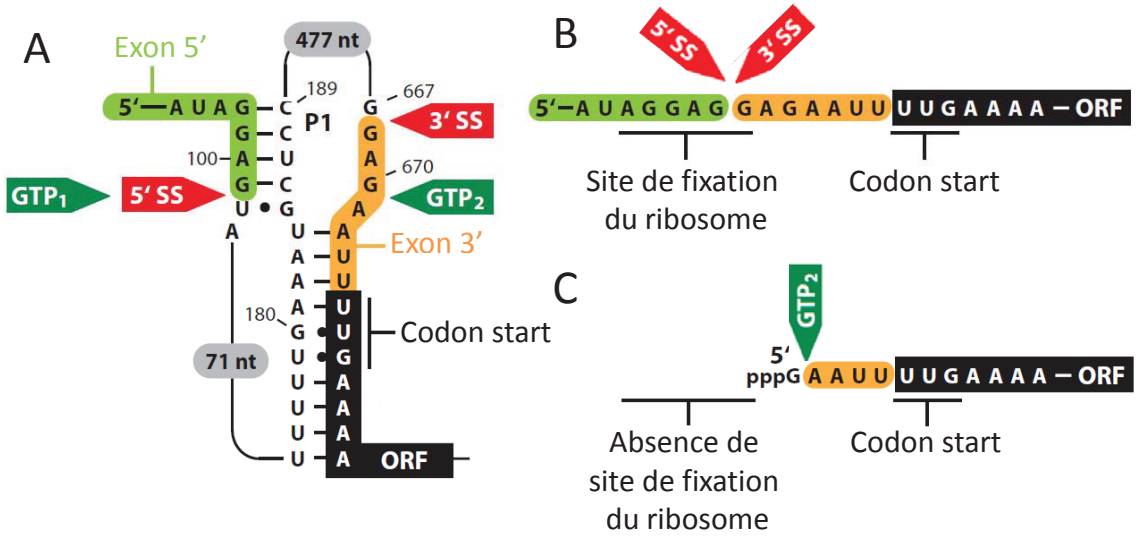


Figure 55 : Modèle du mécanisme de contrôle de l'activité ribozyme par le diGMPc du riboswitch de classe II porté par l'ARNm de *CD3246* de *Clostridium difficile* (d'après Lee *et al.*, 2010).
(A) Structure simplifiée du riboswitch de classe II portant l'ORF *CD3246* de *C. difficile*. (B) ARN auto-épissé par l'activité ribozyme en présence de GTP et de diGMPc. La fixation de diGMPc sur le riboswitch module la structure secondaire de l'ARNm de sorte que le codon start soit accessible et que l'auto-épissage de l'ARNm crée un site de fixation du ribosome. (C) ARN auto-épissé en présence seulement du GTP. Le site de fixation du ribosome n'est pas créé donc l'ORF n'est pas traduite.

les hélices P2 et P3, respectivement, et interagissent par le biais de liaisons hydrogènes (Figure 53) (Smith *et al.*, 2010). Les riboswitchs de classe I fixent le diGMPc à la jonction de 3 hélices différentes (Figure 53) avec une forte affinité, inférieure à 1 nM (Sudarsan *et al.*, 2008, Kulshina *et al.*, 2009, Smith *et al.*, 2009). Cette interaction met en jeu plusieurs nucléotides : la Guanine 20, l'Adénine 48 et la Cytosine 92 chez le riboswitch porté en amont du gène codant un homologue du facteur de transcription TfoX (VC1722) de *V. cholerae* (Smith *et al.*, 2009). D'après des travaux récents, la fixation du diGMPc pourrait différer entre les riboswitchs de type I. En effet, bien que ces riborégulateurs aient une affinité similaire pour le diGMPc, ils ne fixent pas ses analogues avec la même efficacité, suggérant des architectures différentes (Luo *et al.*, 2013, Luo *et al.*, 2014).

La fixation du diGMPc sur les riboswitchs de classe I peut avoir un effet activateur ou inhibiteur sur l'expression de l'ORF porté en aval. Le riboswitch Cd1 de *C. difficile* présent en amont d'un opéron de gènes flagellaires (*flgBCDG-fliEFGHI-flbD-motA*) appartient à cette seconde catégorie (Sudarsan *et al.*, 2008). En effet, la présence de diGMPc induit une terminaison de transcription précoce *in vitro* (Sudarsan *et al.*, 2008). Une partie des gènes de l'opéron n'est donc pas exprimée ce qui se traduit par une inhibition de la mise en place du flagelle (Sudarsan *et al.*, 2008). Au contraire, le riboswitch porté par l'ARNm de *VC1722* de *V. cholerae* fait partie des riborégulateurs dont la fixation du diGMPc a un effet positif sur l'expression de *vc1722* codant un homologue de TfoX, nécessaire pour la compétence naturelle (Sudarsan *et al.*, 2008).

- *Les riboswitchs de classe II*

Les riboswitchs de classe II sont associés à la présence de « pseudoknot » ou pseudo-nœud (Figure 54) (Lee *et al.*, 2010). Ceux-ci correspondent à deux structures tige-boucle intercalées où la boucle d'une des structures est engagée dans la formation de la tige de la seconde structure (Figure 54) (Chen *et al.*, 2005, Theimer *et al.*, 2005). Le diGMPc se fixe au niveau du triplex formé par le pseudo-nœud avec une affinité extrêmement forte, de l'ordre de 200 pM dans le cas du riboswitch porté par l'ARNm de *CD3246* de *C. difficile* (Lee *et al.*, 2010). Cette fixation se fait notamment grâce à l'adénine et la guanine en positions 70 et 73 du riboswitch porté par l'ARNm de *ca_c0561* de *Clostridium acteobutylicum* (Figure 53) (Smith *et al.*, 2011).

Le riboswitch de classe II le mieux caractérisé est celui porté par l'ARNm de *cd3246* de *C. difficile* (Lee *et al.*, 2010, Chen *et al.*, 2011). Celui-ci permet de contrôler l'expression de *cd3246* en modulant l'activité ribozyme également portée par cet ARNm (Lee *et al.*, 2010). Les ribozymes sont des structures d'ARN capables de catalyser une activité enzymatique, notamment les réactions permettant l'auto-épissage de l'ARN (Kruger *et al.*, 1982). La fixation du diGMPc sur le riboswitch provoque un changement de la conformation de la molécule d'ARN ce qui conduit à un auto-épissage

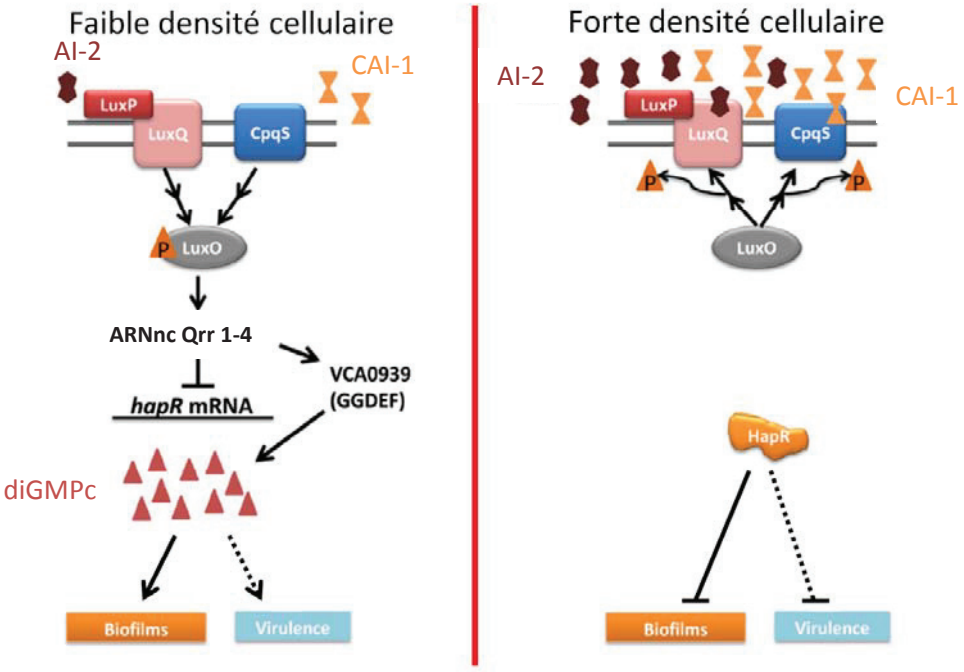


Figure 56 : Modèle d'interconnexion entre le QS de *V. cholerae* et la signalisation à diGMPc (d'après Srivastava *et al.,* 2012).

A faible densité cellulaire, les protéines détectrices des autoinducteurs (AI-2 et CAI-1), CpqS et luxQ, respectivement, agissent comme un phosphorelais menant à la phosphorylation de LuxO qui stimule alors la production de 4 ARNnc Qrr. L'un de ces ARNnc contrôle négativement la traduction de l'ARNm de HapR, un régulateur majeur de de système de QS, mais permet aussi de stimuler la traduction de la DGC VCA_0339. La production de cette enzyme provoque une hausse de la concentration en diGMPc ce qui favorise la formation de biofilm et aussi indirectement la virulence de *V. cholerae*. A haute densité cellulaire, LuxQ et CpqS ont une activité phosphatase sur LuxO et les ARNnc ne sont pas exprimés. Par conséquent, HapR est produite, au contraire de la DGC VCA0939, ce qui influe négativement la formation de biofilms et la virulence de la bactérie. AI-2 : autoinducteur 2; CAI-1 : Cholera autoinducer 1.

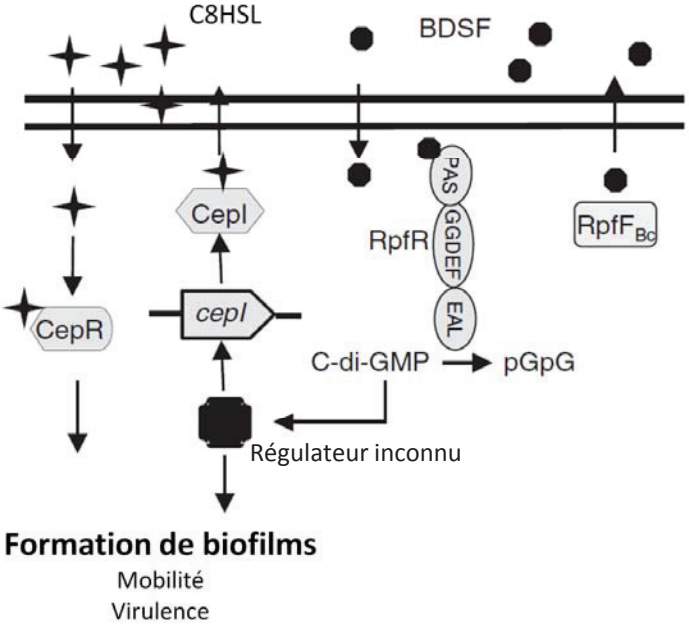


Figure 57 : Modèle d'interconnexion entre les deux systèmes de QS de *B. cenocepacia* via la signalisation à diGMPc (d'après Deng *et al.,* 2013).

B. cenocepacia possède deux systèmes de quorum sensing impliqués notamment dans le contrôle de la formation de biofilms. L'autoinducteur BDSF (Burkholderia diffusible signalling factor) est synthétisé par la protéine RpfF. Il peut être fixer par la protéine RpfR, constitué de domaines PAS, GGDEF et EAL. La fixation de BDSF sur le domaine PAS stimule l'activité PDE du domaine EAL. La diminution de la concentration en diGMPc induit une baisse de la transcription du gène *cepI* par un régulateur inconnu, codant la synthétase de l'autoinducteur C8HSL (N-octanoyl-homosérine lactone)

alternatif de celui-ci (Figure 55A) (Lee *et al.*, 2010). En effet, en présence de diGMPc et de GTP, l'auto-épissage de l'ARNm induit la formation d'un site de fixation du ribosome (RBS, Ribosome-Binding Site) permettant ainsi la traduction de l'ORF en aval (Figure 55B)(Lee *et al.*, 2010). L'absence de diGMPc favorise la formation d'un ARNm sans RBS (Figure 55C) (Lee *et al.*, 2010). De plus, le riboswitch modulerait également l'accessibilité du codon « start », c'est-à-dire son implication ou non dans une structure secondaire en tige (Chen *et al.*, 2011).

Il est enfin à noter que les riboswitchs à diGMPc se sont pas toujours situés au niveau d'ARNm. En effet, un petit ARNnc de *B. bacteriovorus*, massivement exprimé lorsque la bactérie est dans un état prédatoire, contient un riboswitch à diGMPc (Karunker *et al.*, 2013). Les auteurs proposent un rôle de capture du diGMPc par cet ARNnc, permettant ainsi de moduler extrêmement rapidement la concentration intracellulaire en diGMPc (Karunker *et al.*, 2013). Cette hypothèse ajouterait un niveau de complexité supplémentaire au fonctionnement des voies de signalisation à diGMPc.

2.2.4 Rôles des voies de signalisation impliquant le diGMPc

Les voies de signalisation à diGMPc participent au contrôle de divers processus cellulaires, dont la transition entre les modes de vie planctonique et en biofilm, mais aussi dans le contrôle de la virulence des bactéries pathogènes. Ces voies de signalisation permettent à la bactérie de choisir le mode de vie le plus adapté à son environnement en fonctionnant dans certains cas en connection avec d'autres systèmes de signalisation comme le quorum sensing, les systèmes à deux composants ou les voies utilisant l'AMPc.

2.2.4.1 Interconnexion des voies à diGMPc avec d'autres voies de signalisation

L'interconnexion entre les voies de signalisation à diGMPc et d'autres acteurs du réseau de signalisation bactérien sont illustrés par les exemples suivants :

Chez *V. cholerae*, le QS agit en amont de voies de signalisation à diGMPc (Zhao *et al.*, 2013). A faible densité bactérienne, les ARNnc Qrr sont produits en réponse à l'activation d'une cascade de phosphorylation déclenchée par deux types d'autoinducteurs : AI-2 (autoinducteur 2) et CAI-1 (Cholera Autoinducer 1)(Figure 56). Ils contrôlent négativement la traduction de régulateurs du QS dont HapR fait partie (Figure 56) (Srivastava *et al.*, 2012, Zhao *et al.*, 2013). L'ARNnc qui contrôle l'expression de l'ARNm de *hapR* est capable de s'hybrider également sur l'ARNm du gène codant la DGC VCA_0339 et de contrôler positivement sa traduction (Figure 56) (Zhao *et al.*, 2013). L'activité de cette DGC induit une augmentation de la concentration intracellulaire en diGMPc et promeut ainsi la formation de biofilms en condition de faible densité cellulaire (Figure 56) (Zhao *et al.*, 2013).

Burkholderia cenopacia possède deux systèmes de QS qui reposent sur la production de deux autoinducteurs différents : la N-octanoyl-homosérine lactone (C8HSL) et l'acide cis-2-dodecenoique appelé aussi BDSF (*Burkholderia* Diffusible Signalling Factor) (Figure 57) (Gotschlich *et al.*, 2001, Wang *et al.*, 2004a, Malott *et al.*, 2005). Le diGMPc est capable de faire le lien entre ces deux systèmes (Figure 57) (Deng *et al.*, 2013). En effet, la protéine RpfR, à domaines PAS, GGDEF et EAL, est capable de fixer les molécules de BDSF (Figure 57) (Deng *et al.*, 2013). Cette fixation stimule l'activité PDE de RpfR et provoque par conséquent une réduction de la concentration intracellulaire en diGMPc (Figure 57) (Deng *et al.*, 2013). Cette diminution de concentration entraine une inhibition de la transcription du gène codant la synthétase de C8HSL, CepI, et donc un arrêt de la production de l'autoinducteur C8HSL (Figure 57) (Deng *et al.*, 2013).

Les voies de signalisation à diGMPc peuvent également s'entrecroiser avec des voies de signalisation utilisant d'autres messagers secondaires. Chez *X. campestris*, la protéine XC_0249 est constituée d'un domaine de liaison du GMPc et d'un domaine GGDEF (An *et al.*, 2013). La fixation de GMPc stimule l'activité DGC de XC_0249 nécessaire pour le contrôle positif de la formation de biofilms mais également pour la virulence de ce phytopathogène (An *et al.*, 2013). Chez *V. cholerae*, la production de certaines DGC sont sous le contrôle de la protéine CRP, l'effecteur spécifique de l'AMPc (Fong *et al.*, 2008). C'est le cas de CdgA qui est impliquée dans la régulation de la formation de biofilm (Beyhan *et al.*, 2008, Fong *et al.*, 2008).

2.2.4.2 Diversité des fonctions contrôlées par le diGMPc

Les voies de signalisation à diGMPc participent à la régulation de la transition entre les modes de vie planctonique et sessile en contrôlant inversement la mobilité bactérienne et la formation de biofilms. Elles peuvent aussi moduler la différenciation cellulaire, impliquant notamment un contrôle de la mobilité. Enfin, le diGMPc contrôle la virulence de certaines bactéries pathogènes voire le type d'infection : les infections aigues sont reliées à des bactéries mobiles exprimant des facteurs de virulence, et les infections chroniques associées à des bactéries arborant des caractéristiques proches du mode de vie sessile.

- *Le contrôle de la différenciation cellulaire*

Les voies de signalisation à diGMPc participent au contrôle de la différenciation cellulaire chez plusieurs espèces bactériennes. Chez *Caulobacter crescentus*, elles permettent la différenciation d'une cellule flagellée en cellule pédonculée, nécessaire pour la progression du cycle cellulaire de cette bactérie. Chez *Bdellovibrio bacteriovorus*, ces voies modulent la transition entre les deux modes de vie de cette bactérie : l'état axénique et l'état prédatoire. Enfin, le diGMPc est également impliqué dans le contrôle de la différenciation cellulaire de bactéries qui présentent des comportements multicellulaires comme *Anabaena sp*. ou *Streptomyces coelicolor*.

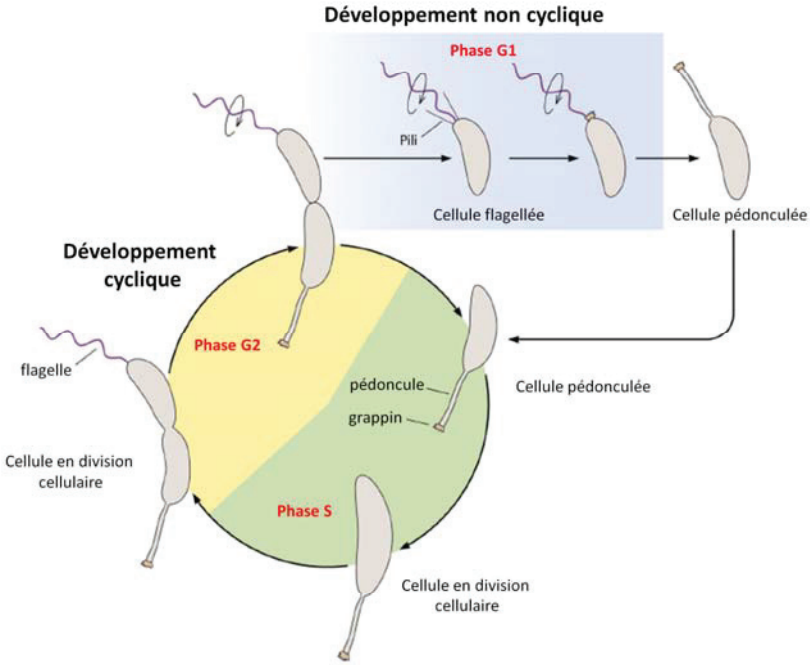


Figure 58 : Cycle de vie de *Caulobacter crescentus* (d'après Curtis *et al.*, 2010).
Le cycle cellulaire de *C. crescentus* est intimement couplé à un mécanisme de différentiation cellulaire. En effet, les bactéries flagellées et mobiles ne peuvent entreprendre une division cellulaire sans subir une différentiation morphologique en cellule pédonculée. Une fois la bactérie pédonculée et fixée sur une surface, la réplication de l'ADN peut avoir lieu (phase S) et la division cellulaire s'enclenche. Cette division est asymétrique et permet la création d'une cellule-fille flagellée. La bactérie mobile formée peut s'éloigner pour coloniser une nouvelle surface sur laquelle elle adhère grâce à ces pili de type IV, avant de se différentier en cellule pédonculée et de se diviser à nouveau. La cellule mère pédonculée peut entreprendre à nouveau un cycle de division cellulaire.

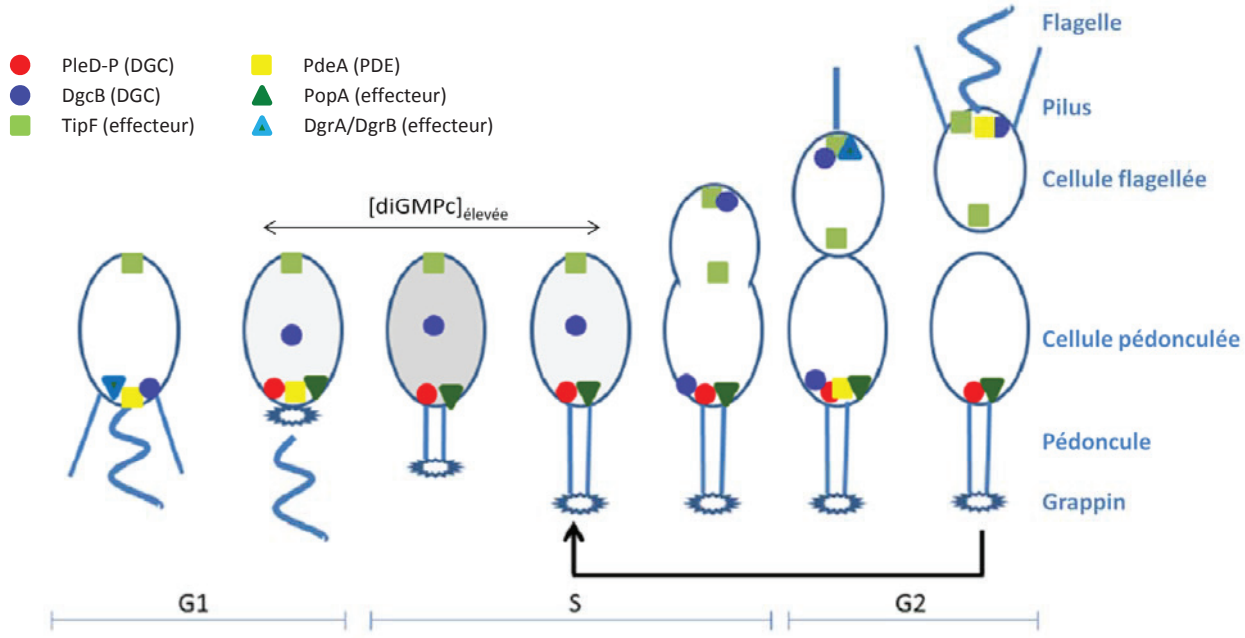


Figure 59 : Contrôle de la différentiation cellulaire et de la progression du cycle cellulaire de *Caulobacter crescentus* par les voies de signalisation à diGMPc (d'après Römling *et al.*, 2013).
Toutes les étapes de cette différentiation cellulaire sont commentées précisément dans le texte.

~ La différenciation de *Caulobacter crescentus*

Au cours de son cycle de vie, *C. crescentus* subit une différenciation morphologique. En effet, une cellule flagellée et mobile, présentant un flagelle et des pili de type IV polaires peut se différencier en cellule sessile et pédonculée (Curtis *et al.*, 2010). Le pédoncule se développe au pôle cellulaire portant initialement le flagelle polaire, permettant à la bactérie d'adhérer fortement aux surfaces grâce au grappin placé au bout du pédoncule (Figure 58) (Curtis *et al.*, 2010). Cette différenciation est couplée à l'initiation du cycle de division cellulaire. En effet, la cellule pédonculée entreprend une division asymétrique créant une cellule-fille flagellée (Figure 58) (Curtis *et al.*, 2010). Après cette division, la cellule pédonculée peut s'engager dans un nouveau cycle de division cellulaire alors que la cellule-fille flagellée n'initiera sa division qu'après accrochage à une nouvelle surface et différenciation en cellule pédonculée (Curtis *et al.*, 2010).

Les voies de signalisation utilisant le diGMPc participent au contrôle de cette différenciation cellulaire tout en modulant la progression du cycle de division cellulaire de *C. crescentus* ainsi que le contrôle de la mobilité de la bactérie.

Dans la cellule-mère flagellée, la DGC PleD inactive est diffuse dans le cytoplasme. Elle est activée par phosphorylation par les HK DivJ et PleC avec l'assistance du RR DivK (Paul *et al.*, 2004, Skerker *et al.*, 2005, Paul *et al.*, 2008). PleD se localise alors au pôle cellulaire portant le flagelle (Figure 59) où elle participe à l'éjection du flagelle (Aldridge *et al.*, 2003), à la biogénèse du grappin ainsi qu'à l'initiation et à l'élongation du pédoncule (Hecht *et al.*, 1995).

Une seconde DGC, DgcB, constitutivement exprimée, participe au contrôle de cette différenciation (Abel *et al.*, 2011). Son activité DGC est compensée par l'activité de la PDE PdeA (Abel *et al.*, 2011). Cet équilibre est levé par la dégradation protéolytique de PdeA par la protéase ClpXP pendant la phase de réplication du chromosome (Phase S) (Figure 59) (Abel *et al.*, 2011). Comme PdeA inhibe la mise en place prématurée du grappin, son absence en phase S déclenche donc la biogénèse du grappin et l'élongation du pédoncule (Abel *et al.*, 2011).

La protéine PopA, capable de lier le diGMPc grâce au site I de son domaine GGDEF dégénéré, permet de coupler le processus de différenciation avec le cycle cellulaire (Figure 59). En effet, PopA, localisée au pôle pédonculé d'une manière dépendante du diGMPc, et en association avec la protéine RdcA, permet le recrutement de CtrA au pôle pédonculé (Figure 59) (Duerig *et al.*, 2009). CtrA est une protéine du cycle cellulaire qui inhibe la réplication de l'ADN bactérien en se fixant sur l'origine de réplication du chromosome (Quon *et al.*, 1998). Le recrutement de CtrA par PopA induit sa dégradation par la protéase ClpXP, également présente au pôle pédonculé (Duerig *et al.*, 2009).

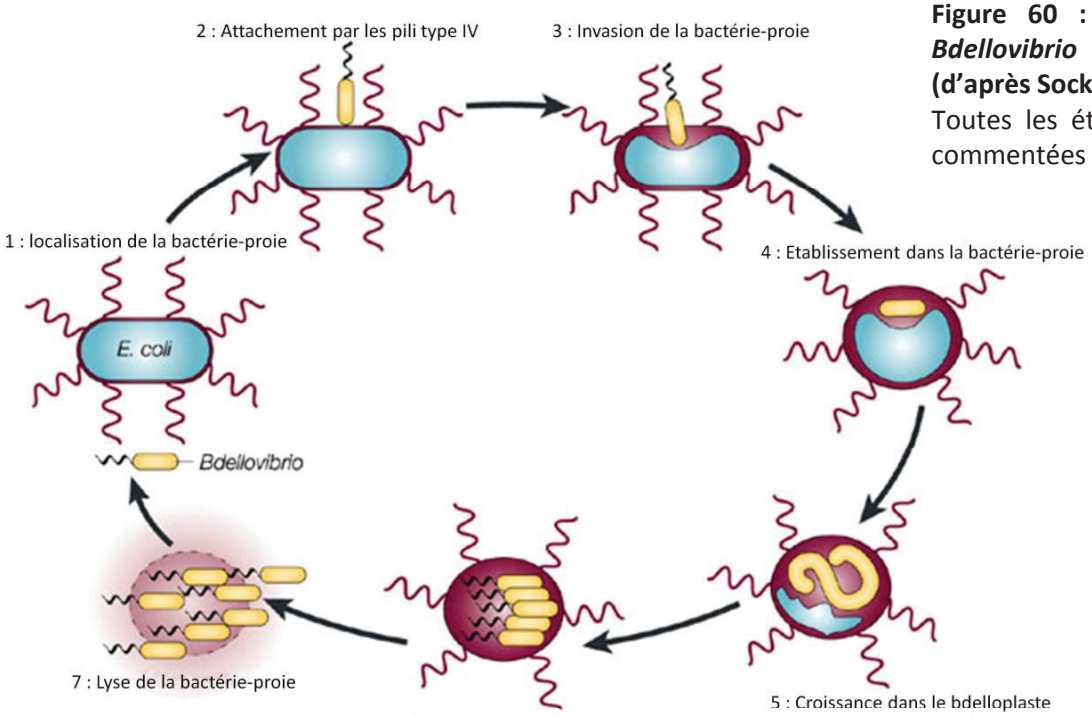


Figure 60 : Cycle de vie de *Bdellovibrio bacteriovorus* (d'après Sockett *et al.*, 2004).
Toutes les étapes du cycle sont commentées dans le texte.

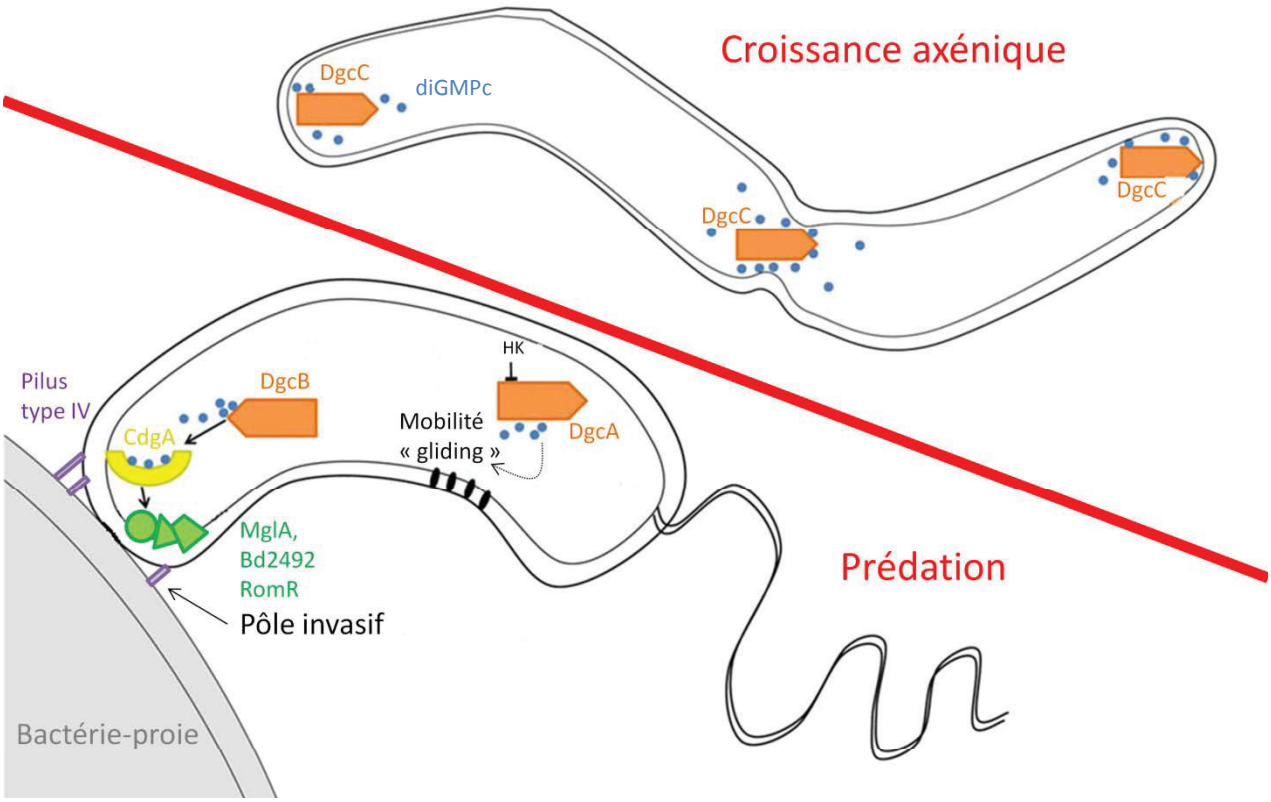


Figure 61 : Rôles des voies de signalisation à diGMPc dans le contrôle de la croissance axénique et de la prédation de *Bdellovibrio bacteriovorus* (d'après Hobley *et al.*, 2012).
La DGC DgcC est impliquée dans la croissance axénique de la bactérie car lorsqu'elle est absente *B. bacteriovorus* devient un prédateur obligatoire. Elle est localisée au niveau des pôles cellulaires formés et au niveau des pôles cellulaires en formation au cours de la division cellulaire. Au contraire, la DGC DgcB est impliquée dans la prédation de la bactérie car une souche *ΔdgcB* est uniquement capable de croître de façon axénique. L'effecteur CdgA, qui fixe le diGMPc, semble impliqué dans la même voie de signalisation que DgcB. Sa présence au pôle invasif permet le recrutement des plusieurs protéines, MglA, Bd2492 et RomR nécessaires au contrôle de la mobilité de type par gliding et à la mise en place du pilus de type IV. Enfin, la DGC DgcA n'est pas impliquée dans la différentiation cellulaire mais le mutant *ΔdgcA* présente une mobilité de type « gliding » diminuée.

Cette dégradation permet de lever l'inhibition de la réplication du chromosome et par conséquent promeut l'entrée en phase S du cycle cellulaire.

Plusieurs autres effecteurs du diGMPc ont été identifiés chez *C. crescentus* : la protéine TipF à domaine EAL dégénéré (Davis *et al.*, 2013) et les protéines DgrA et DgrB à domaines PilZ (Figure 59) (Christen *et al.*, 2007). Ces protéines ne sont pas impliquées directement dans la différenciation morphologique mais dans le contrôle de la mobilité (Huitema *et al.*, 2006, Christen *et al.*, 2007, Davis *et al.*, 2013). En effet, TipF participe à l'assemblage du flagelle dans la cellule-fille car elle permet le recrutement au pôle cellulaire du facteur de positionnement de flagelle PflI et d'autres facteurs flagellaires dont FliG et FliM impliqués dans la permutation du sens de rotation du flagelle (Huitema *et al.*, 2006, Davis *et al.*, 2013). DgrA est impliquée dans l'expression du gène codant FliL nécessaire à la rotation du flagelle. Le mécanisme moléculaire impliquant DgrB reste encore à élucider.

~ La différenciation de *Bdellovibrio bacteriovorus*

Bdellovibrio bacteriovorus est une δ-protéobactérie capable d'infecter d'autres bactéries, dont des phytopathogènes et des pathogènes humains (Jurkevitch *et al.*, 2000, Sockett *et al.*, 2004, Dashiff *et al.*, 2011). Elle alterne entre deux modes de vie caractérisés par des profils d'expression génétique différents : la croissance axénique et la prédation (Karunker *et al.*, 2013). Lors de l'infection d'une bactérie-proie, *B. bacteriovorus* se fixe sur la membrane de son hôte grâce à ses pili de type IV portés par son pôle cellulaire non flagellé, appelé aussi pôle invasif (Figure 60) (Evans *et al.*, 2007). Une fois entré dans le périplasme de sa proie, *B. bacteriovorus* perd ses traits de mobilité et dégrade les macromolécules de son hôte afin de les utiliser pour sa propre croissance (Figure 60) (Hespell *et al.*, 1973). Celle-ci s'effectue de façon polaire, donnant naissance à une bactérie allongée multi-nucléée (Figure 60). La cellule-hôte ainsi infectée devient ronde et porte le nom de bdelloplaste (Figure 60). Puis *B. bacteriovorus* subit une septation synchronisée, créant de nombreuses bactéries mobiles (Figure 60) (Fenton *et al.*, 2010). Cette descendance exprime des facteurs de mobilité flagellaire mais également des facteurs permettant la mobilité de type « gliding », c'est-à-dire la mobilité par glissement sur une surface.

Les voies de signalisation utilisant le diGMPc semblent essentielles pour le contrôle de la transition entre l'état axénique et l'état prédatoire, interconnectant par conséquent le contrôle de la différenciation cellulaire avec la régulation de la virulence et de la mobilité bactérienne (Hobley *et al.*, 2012, Milner *et al.*, 2014). Ces voies impliquent les DGC DgcB et DgcC (Figure 61) (Hobley *et al.*, 2012). En effet, la délétion des gènes codant ces deux protéines entraine un blocage de *B. bacteriovorus* dans l'un ou l'autre de ces états : la souche Δ*dgcB* ne se développe que de façon axénique et le mutant Δ*dgcC* est un prédateur obligatoire (Hobley *et al.*, 2012).

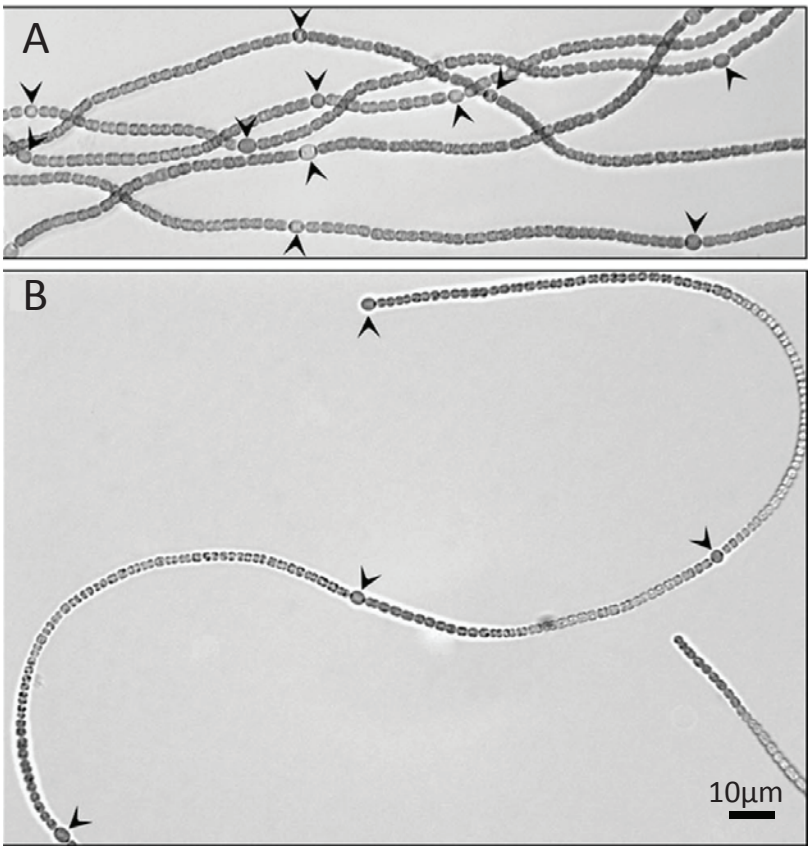


Figure 62 : La protéine All2874 est nécessaire au développement d'hétérocystes par *Anabaena sp.* en condition de carence en azote (d'après Neunuebel *et al.,* 2008).
Les filaments d'*Anabaena sp.* sont développés en milieu liquide BG-11 puis sont transférés en milieu BG-11_0 pour induire le développement d'hétérocystes. Après 96h de carence en azote (BG-11_0), la souche sauvage (A) forme plus fréquemment des hétérocystes que la souche délétée de *all2874* (B).

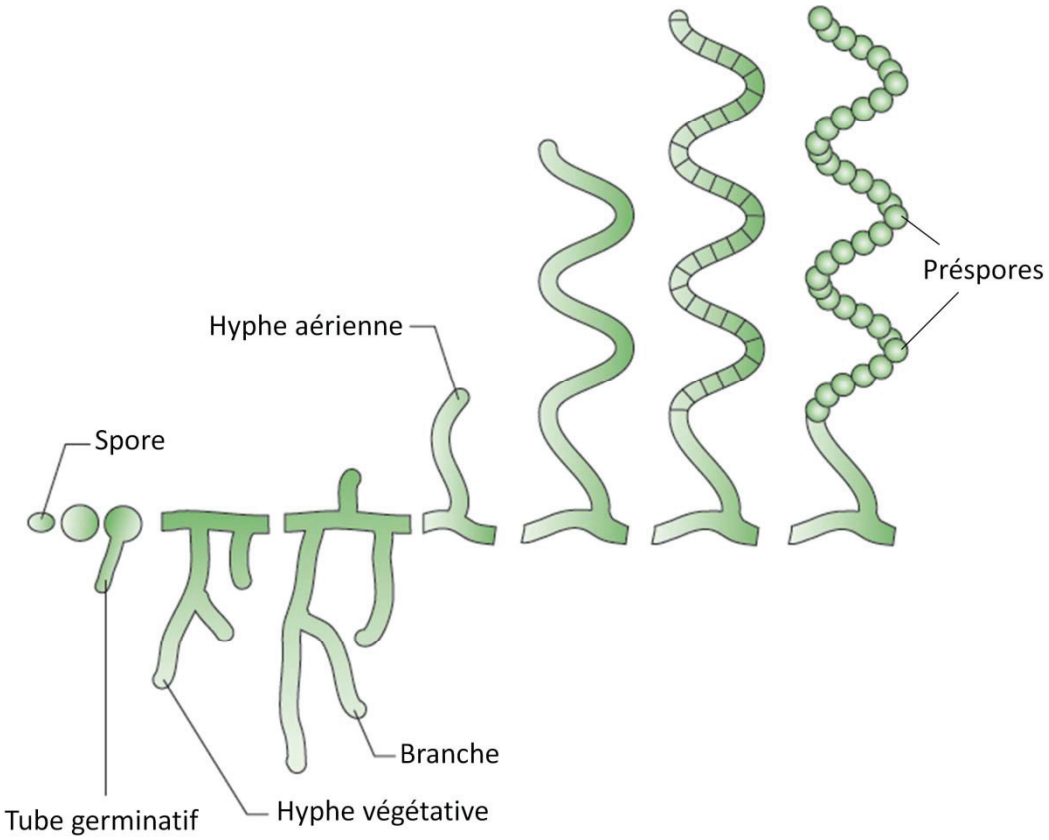


Figure 63 : Différentiation morphologique de *Stretomyces coelicolor* (d'après Flardh *et al.,* 2009).
La germination de la spore implique un gonflement de la cellule et l'émergence d'un tube germinatif. Ce tube se développe ensuite en hyphe végétative. Ces filaments se divisent rarement et donnent donc des hyphes multinucléées avec quelques ramifications. En réponse à une carence en nutriments ou à d'autres signaux, des hyphes aériennes se développent. Elles se différencient ensuite en un compartiment contenant une chaine de préspores.

La signalisation par DgcB qui promeut la prédation pourrait impliquer la protéine CdgA, fixatrice de diGMPc grâce au site I de son domaine GGDEF dégénéré (Figure 61) (Hobley *et al.*, 2012). En effet, la souche Δ*cdgA* présente une prédation diminuée par rapport à la souche sauvage (Hobley *et al.*, 2012). CdgA interagit avec Bd2492, RomR et MglA et facilite leur ancrage au niveau du pôle invasif de *B. bacteriovorus* (Figure 61) (Milner *et al.*, 2014). Ces trois protéines sont connues chez *Myxococcus xanthus* pour leur rôle dans la régulation de la mobilité, soit de type « gliding » ou mobilité par glissement, soit médiée par les pili de type IV (Leonardy *et al.*, 2010, Zhang *et al.*, 2010). Ces rôles sont vraisemblablement conservés chez *B. bacteriovorus* puisque la souche avirulente Δ*mglA* est hypopiliée et présente une fréquence augmentée de réversion de direction lorsque la bactérie se déplace par gliding (Milner *et al.*, 2014). CdgA promeut donc probablement l'entrée dans la cellule hôte en contrôlant la mise en place des pili de type IV au pôle invasif .

~ La différenciation des bactéries à comportements multicellulaires

Anabaena sp. est une cyanobactérie filamenteuse qui répond à la privation de composés azotés en déclenchant la différenciation de certaines bactéries en hétérocystes (Bottomley *et al.*, 1979). Ces hétérocystes sont capables de fixer l'azote et sont positionnés à intervalles réguliers le long des filaments bactériens, environ toutes les 25 cellules végétatives et photosynthétiques (Figure 62A) (Bottomley *et al.*, 1979). Parmi les 14 protéines GGDEF et/ou EAL que possède cette bactérie, une DGC, All2874, participe la différenciation en hétérocystes (Neunuebel *et al.*, 2008). En effet, une souche Δ*all2874* présente une diminution de la fréquence d'hétérocystes le long des filaments d'*Anabaena sp.* (Figure 62B) (Neunuebel *et al.*, 2008). Le mécanisme moléculaire permettant le contrôle de la différenciation par All2874 et le diGMPc reste encore à élucider, toutefois il semble agir en amont de HetR, le régulateur majeur du développement d'hétérocystes (Neunuebel *et al.*, 2008).

Streptomyces coelicolor est une actinobactérie présente dans le sol qui met en place une différenciation morphologique très complexe (Figure 63) (Flärdh *et al.*, 2009). La germination d'une spore de *S. coelicolor* produit un long filament végétatif multinucléé (Flärdh *et al.*, 2009). En réponse à certains signaux environnementaux, dont la carence en nutriments, des hyphes aériennes se développent (Flärdh *et al.*, 2009). Ces hyphes subissent des divisions cellulaires donnant ainsi naissance à de nombreuses préspores (Flärdh *et al.*, 2009). Plusieurs protéines à domaines GGDEF et/ou EAL sont impliquées dans cette différenciation morphologique (den Hengst *et al.*, 2010, Tran *et al.*, 2011, Hull *et al.*, 2012). En effet, les DGC CdgA et CdgB participent au contrôle de la formation des hyphes aériennes (den Hengst *et al.*, 2010, Tran *et al.*, 2011). Les deux PDE RmdA et RmdB sont également importantes pour cette différenciation : la souche Δ*rmdA* présente un défaut de

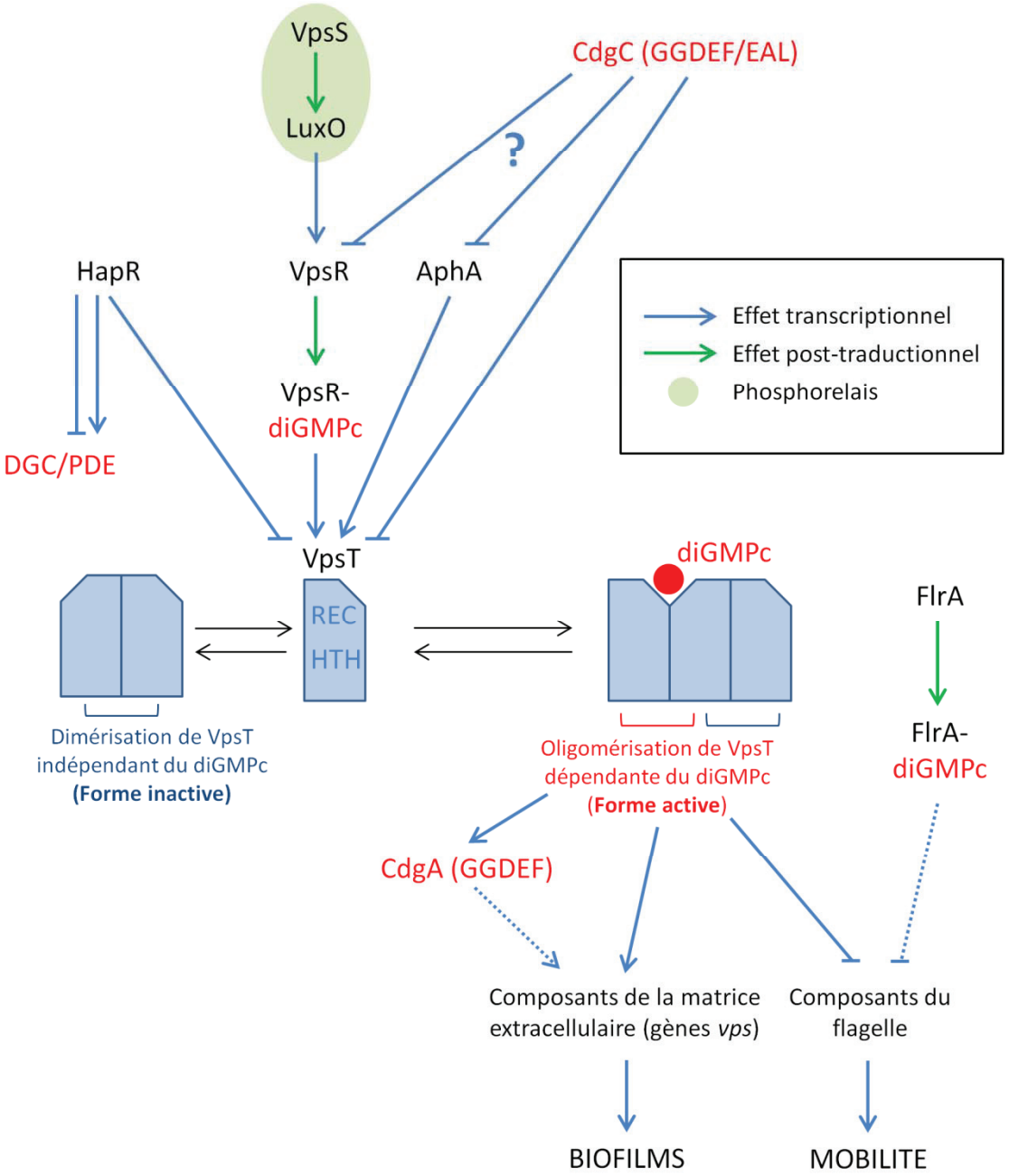


Figure 64 : Réseau de contrôle de l'expression des gènes flagellaires et de la matrice extracellulaire impliquant le diGMPc chez *Vibrio cholerae*.

Le phosphorelais VpsS/LuxO, ainsi que la DGC CdgG contrôlent directement ou indirectement la transcription des gènes codant les régulateurs AphA et VpsR. AphA module directement la transcription du gène *vpsT*. VpsR agit sur la transcription de *vpsT* uniquement lorsqu'il interagit avec le diGMPc. En paralèlle, le régulateur HapR intervient aussi dans le contrôle de la production de VpsT ainsi que de plusieurs DGC et PDE. VpsT est un régulateur de transcription du fait de son domaine HTH de liaison à l'ADN. Il est activé par une oligomérisation dépendante de la liaison de diGMPc. Il contrôle alors négativement l'expression des gènes flagellaires et positivement l'expression des gènes *vps* codant les composants de la matrice extracellulaire des biofilms. Par ailleurs, il joue sur la transcription de la DGC CdgA qui participe au contrôle des gènes *vps* de classe I, uniquement. Enfin, FlrA, un effecteur du diGMPc, inhibe l'expression de certains gènes flagellaires (opéron *flrBC*) lorsqu'il est lié au diGMPc.

production des préspores et la souche Δ*rmdA*Δ*rmdB* est affectée dans la formation des hyphes aériennes (Hull *et al.*, 2012).

❖ *Le contrôle de la mobilité*

Les voies de signalisation à diGMPc interviennent également dans le contrôle de la mobilité bactérienne. Elles participent notamment au contrôle transcriptionnel de l'expression des gènes flagellaires et de récents travaux ont mis en évidence une implication du diGMPc dans le contrôle physique de la rotation du flagelle. Comme cela a été évoqué précédemment, les voies à diGMPc semblent aussi intervenir dans la régulation d'autres types de mobilité que la nage (ou « swimming ») : le « swarming » (ou essaimage), le « twitching » (ou déplacement par mouvements saccadés) et le « gliding » (ou mobilité par glissement). Enfin, récemment, le diGMPc a été mis en évidence dans le contrôle de la mobilité via une régulation des mécanismes de chimiotactisme, notamment de la phototaxie et de l'aérotaxie.

~ Le contrôle de l'expression des gènes flagellaires

La participation des voies de signalisation à diGMPc dans le contrôle de la transcription des gènes flagellaires a été particulièrement étudiée chez *Vibrio cholerae* (Beyhan *et al.*, 2007, Lim *et al.*, 2007, Waters *et al.*, 2008, Krasteva *et al.*, 2010, Srivastava *et al.*, 2011, Shikuma *et al.*, 2012, Srivastava *et al.*, 2013). Les données recueillies au cours de tous ces travaux sont synthétisées dans la figure 64. Ce contrôle est antagoniste à celui de l'expression des gènes *vps (Vibrio* polysaccharides*),* codant des composants de la matrice extracellulaire des biofilms.

Dans ce réseau de régulation, le diGMPc intervient à différents niveaux. En effet, le diGMPc est fixé par plusieurs protéines : VpsR, VpsT et FlrA (Figure 64) (Krasteva *et al.*, 2010, Srivastava *et al.*, 2011, Srivastava *et al.*, 2013). VpsR, capable de lier le diGMPc par son domaine de fixation de l'ATP, est un régulateur transcriptionnel modulant entre autres la transcription de *vpsT* (Figure 64) (Srivastava *et al.*, 2011). VpsT est également un régulateur transcriptionnel, connu pour inhiber la transcription des gènes flagellaires et activer l'expression des gènes *vps* (Figure 64) (Krasteva *et al.*, 2010). VpsT assure cette régulation uniquement lorsqu'il interagit avec le diGMPc car cette interaction provoque une modification de son état d'oligomérisation et sa relocalisation cellulaire sous forme de puncta dans le cytosol (Figure 64) (Krasteva *et al.*, 2010, Shikuma *et al.*, 2012). FlrA est un homologue de FleQ de *P. aeruginosa* (Srivastava *et al.*, 2013). Son interaction avec le diGMPc entraine également une répression de l'expression de certains gènes flagellaires, dont l'opéron *flrB*, mais n'influe pas sur l'expression des gènes *vps* (Figure 64) (Srivastava *et al.*, 2013).

Par ailleurs, des protéines GGDEF/EAL ont également été impliquées dans ce réseau de régulation (Figure 64) (Beyhan *et al.*, 2007, Lim *et al.*, 2007). En effet, la protéine CdgC, à domaines

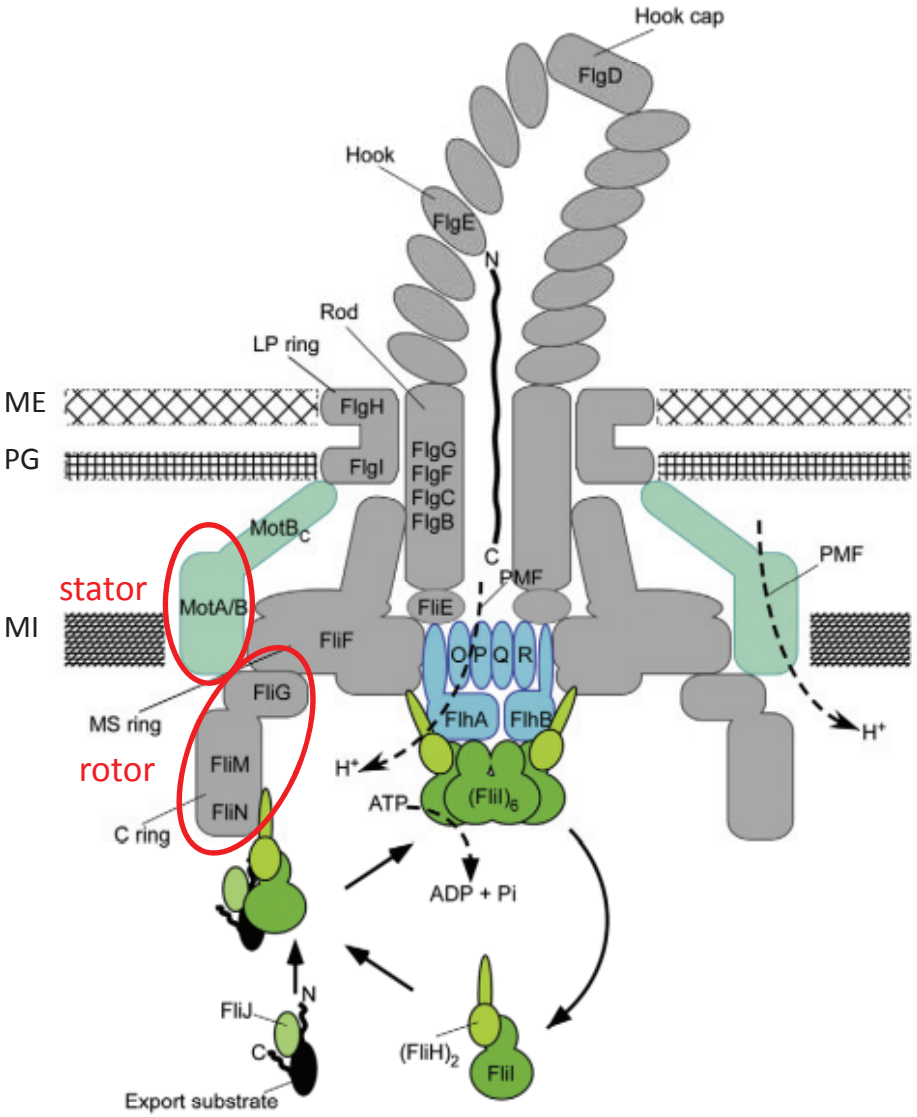


Figure 65: Structure du corps basal du flagelle (d'après Minamino et al., 2008).
Représentation schématique du système flagellaire. Le corps basal membranaire (en gris) est composé des disques MS (MS ring) et C (C ring) (FliF et FliG/FliM/FliN), de la tige (rod) (FliE, FlgB, FlgC, FlgF et FlgG) et du disque LP (LP ring) (FlgH et FlgI). La structure tubulaire courbée à l'extérieur de la cellule (en gris) est le crochet (hook). Le complexe MotA/MotB compose le stator. Il transforme le flux de protons entre le périplasme et la membrane interne en mouvement de rotation du flagelle par interaction avec le rotor (disques MS et C). L'appareil d'export de protéines flagellaires est constitué de 6 protéines membranaires (FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ et FliR) et de 3 protéines solubles (FliH, FliI et FliJ). FliH et FliI composent l'ATPase du système.
ME : membrane externe, PG : peptidoglycane, MI : membrane interne.

GGDEF et EAL, participe à l'inhibition de l'expression de *vpsR* et *vpsT* par un mécanisme encore inconnu mais ce contrôle impacte l'expression des gènes flagellaires et *vps* (Figure 64) (Lim *et al.*, 2007). La production de la protéine CdgA, à domaine GGDEF, est sous le contrôle de VpsT (Figure 64) (Beyhan *et al.*, 2007). CdgA interviendrait, par un mécanisme encore obscur, dans la stimulation de l'expression de certains gènes *vps* uniquement (Figure 64) (Beyhan *et al.*, 2007).

Le contrôle transcriptionnel de l'expression des gènes flagellaires a été mis en évidence chez d'autres espèces bactériennes dont *Brucella melitensis* (Petersen *et al.*, 2011), *Xanthomonas campestris* (Lee *et al.*, 2003, Liu *et al.*, 2013) ou *Caulobacter crescentus* (Huitema *et al.*, 2006, Davis *et al.*, 2013).

~ Le contrôle de la rotation du flagelle

Le diGMPc intervient également dans le contrôle de la mobilité via la régulation de la rotation du flagelle. La voie impliquant la protéine YcgR d'*Escherichia coli* et *Salmonella Typhimurium* en est l'exemple le plus détaillé (Boehm *et al.*, 2010, Fang *et al.*, 2010, Paul *et al.*, 2010).

E. coli et *S. Typhimurium* portent des flagelles péritriches qui peuvent tourner dans le sens des aiguilles d'une montre noté CW (« clockwise ») ou dans le sens inverse noté CCW (« counterclockwise ») (Larsen *et al.*, 1974). Dans ces espèces bactériennes, la rotation CCW du flagelle permet la propulsion de la bactérie (Larsen *et al.*, 1974). Lorsque la bactérie perçoit des signaux chimiotactiques, un ou plusieurs flagelles changent de sens de rotation (CW), provoquant un culbutage de la bactérie. Le retour de ces flagelles à une rotation CCW propulse à nouveau la bactérie dans une nouvelle direction aléatoire (Larsen *et al.*, 1974). La protéine qui transduit les signaux chimiotactiques est le RR CheY (Berg, 2003, Minamino *et al.*, 2008). Lorsqu'il est phosphorylé, le RR CheY se lie sur une protéine du moteur flagellaire, FliM, ce qui induit une réversion du sens de rotation du flagelle (CW) (Berg, 2003, Minamino *et al.*, 2008). FliM, ainsi que FliG et FliN, forment le « rotor » du flagelle, aussi appelé disque C, localisé dans le cytoplasme à la base du système flagellaire (Figure 65) (Minamino *et al.*, 2008). FliG est essentielle pour la conversion de l'énergie fournie par le flux de protons généré par MotA/B, composant le « stator », en mouvement de rotation du flagelle (Minamino *et al.*, 2008). L'interaction de FliG et FliM est également critique pour la détermination du sens de rotation du flagelle (Minamino *et al.*, 2008).

Les premiers travaux impliquant le diGMPc dans le contrôle de la rotation ont mis en évidence qu'en absence de la PDE YhjH la bactérie opérait plus fréquemment un changement du sens de rotation de ses flagelles, ayant pour conséquence une restriction de la bactérie dans une zone plus petite que celle de la souche sauvage (Girgis *et al.*, 2007). Puis, la protéine YcgR, un effecteur du diGMPc, a été impliquée dans ce mécanisme car la délétion de *ycgR* dans un contexte *ΔyhjH* restaure

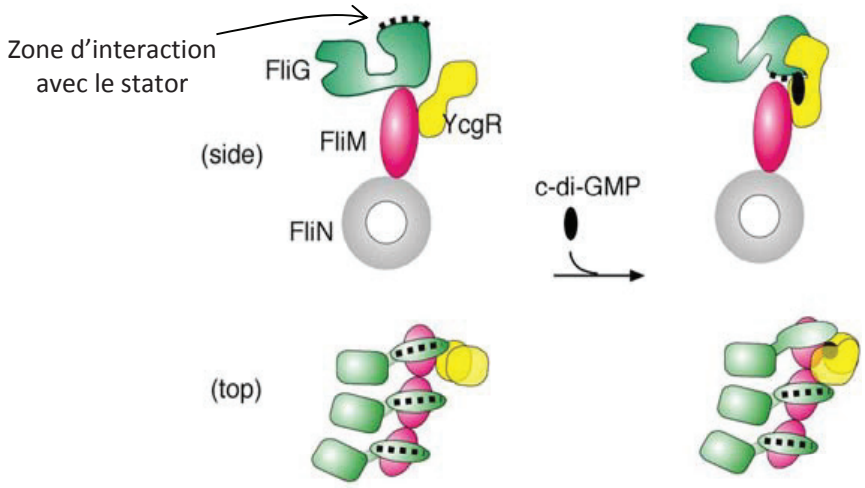


Figure 66 : Modèle du contrôle du sens de rotation du flagelle par YcgR chez *E. coli* et *S. Typhimurium* (d'après Paul *et al.,* 2010).
Hypothèse des réarrangements induits par la fixation de diGMPc sur YcgR (vue de côté en haut de la figure (« side ») et vue de dessus en bas de la figure (« top »). Cette liaison induirait un mouvement du domaine N-terminal d'YcgR, permettant son interaction avec le domaine C-terminal de FliG. L'interaction de YcgR avec FliG provoquerait une réorientation du domaine C-terminal de FliG, l'empêchant d'interagir avec le stator. Cette interaction pourrait aussi contraindre le mouvement du domaine C-terminal de FliG nécessaire pour le changement du sens de rotation du flagelle.

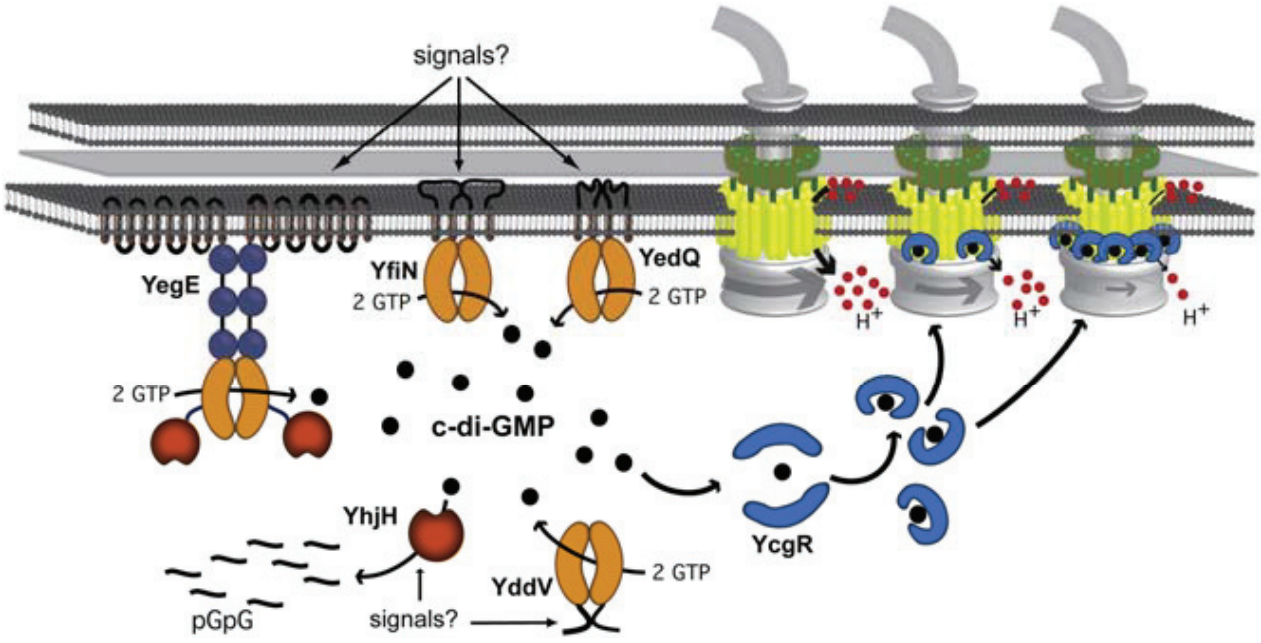


Figure 67 : Modèle du contrôle de la vitesse de rotation du flagelle par YcgR chez *E. coli* (d'après Boehm et al., 2010).
L'enveloppe cellulaire porte plusieurs corps basaux du flagelle (en gris), entourés de nombreux stators (MotA en jaune et MotB en vert). Le diGMPc est produit par 4 différentes DGC (YegE, YfiN, YedQ et YddV) et il est hydrolysé par la PDE YhjH. Les domaines GGDEF des DGC sont indiqués en orange et les domaines EAL en rouge. Lorsque la concentration en diGMPc augmente, grâce à l'activation des DGC et/ou l'inactivation de la PDE, le diGMPc se fixe sur YcgR (en bleu). Cette interaction modifie la conformation de YcgR qui interagit alors avec la protéine MotA du stator. L'occupation progressive des stators du même moteur flagellaire par YcgR-diGMPc mènerait à une diminution du flux de protons à travers la membrane interne (sphères rouges) et par conséquent à une décélération de la vitesse de rotation du flagelle (indiquée par la taille des flèches grises)

partiellement la mobilité de la souche *ΔyhjH* (Ko *et al.*, 2000, Ryjenkov *et al.*, 2006, Girgis *et al.*, 2007). Römling *et al.* (Römling *et al.*, 2006) ainsi que Wolfe *et al.* (Wolfe *et al.*, 2008), ont proposé que YcgR puisse interagir directement avec le moteur du flagelle. Deux modèles ont alors émergé pour expliquer l'effet de YcgR.

Le premier modèle propose que YcgR contrôle le sens de rotation du flagelle par interaction avec FliG et FliM du moteur flagellaire (Fang *et al.*, 2010, Paul *et al.*, 2010). Naturellement, YcgR interagirait faiblement avec ce complexe (Figure 66), ce qui permettrait sa localisation à la base du flagelle, favorisant ainsi une réponse très rapide à la présence de diGMPc (Fang *et al.*, 2010, Paul *et al.*, 2010). En présence de diGMPc, l'interaction entre YcgR, lié au diGMPc, et FliG/FliM serait renforcée et modulerait la conformation de FliG (Figure 66), stabilisant la rotation du flagelle dans un sens CCW (Fang *et al.*, 2010, Paul *et al.*, 2010). Cette modulation de l'affinité d'interaction pourrait s'expliquer par le changement de conformation de YcgR induite par la fixation du diGMPc : la région N-terminale de YcgR est ramenée à proximité du domaine PilZ C-terminal (Figure 66) (Ryjenkov *et al.*, 2006). En plus de ce changement de rotation du flagelle, YcgR aurait un impact sur la vitesse de rotation puisque celle-ci est diminuée d'environ 30% lorsque YcgR est surproduite (Paul *et al.*, 2010).

Dans le second modèle, YcgR serait impliqué dans la décélération de la rotation du flagelle (Figure 67), sans moduler le sens de rotation de celui-ci (Boehm *et al.*, 2010). YcgR, lié au diGMPc, interagirait avec la sous-unité MotA du stator (Boehm *et al.*, 2010). En interférant avec le transfert d'énergie entre le stator (MotA) et le rotor (FliG), YcgR ralentirait la vitesse de rotation du flagelle (Figure 67) (Boehm *et al.*, 2010).

Ce second modèle est supporté par une analyse génétique et des expériences de transfert d'énergie par FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) (Boehm *et al.*, 2010). Cependant, le premier modèle s'appuie sur une démonstration biochimique des interactions entre YcgR, FliG et FliM (Fang *et al.*, 2010, Paul *et al.*, 2010). Des données expérimentales manquent donc encore pour privilégier l'un des deux modèles.

Plusieurs DGC contribuent à la synthèse de diGMPc nécessaire au rôle de YcgR (Figure 67), suggérant que cette fonction de contrôle du sens et/ou de la vitesse de rotation du flagelle répond à de nombreux signaux (Pesavento *et al.*, 2008, Boehm *et al.*, 2010). En effet, la délétion simultanée de 4 DGC, YedQ, YfiN, YddV et YegE, est nécessaire pour restaurer la mobilité d'un mutant *ΔyhjH* (Boehm *et al.*, 2010).

Enfin, YcgR n'est vraisemblablement qu'un acteur de la régulation de la mobilité par le diGMPc car son absence ne restaure que partiellement la mobilité du mutant *ΔyhjH* (Ko *et al.*, 2000,

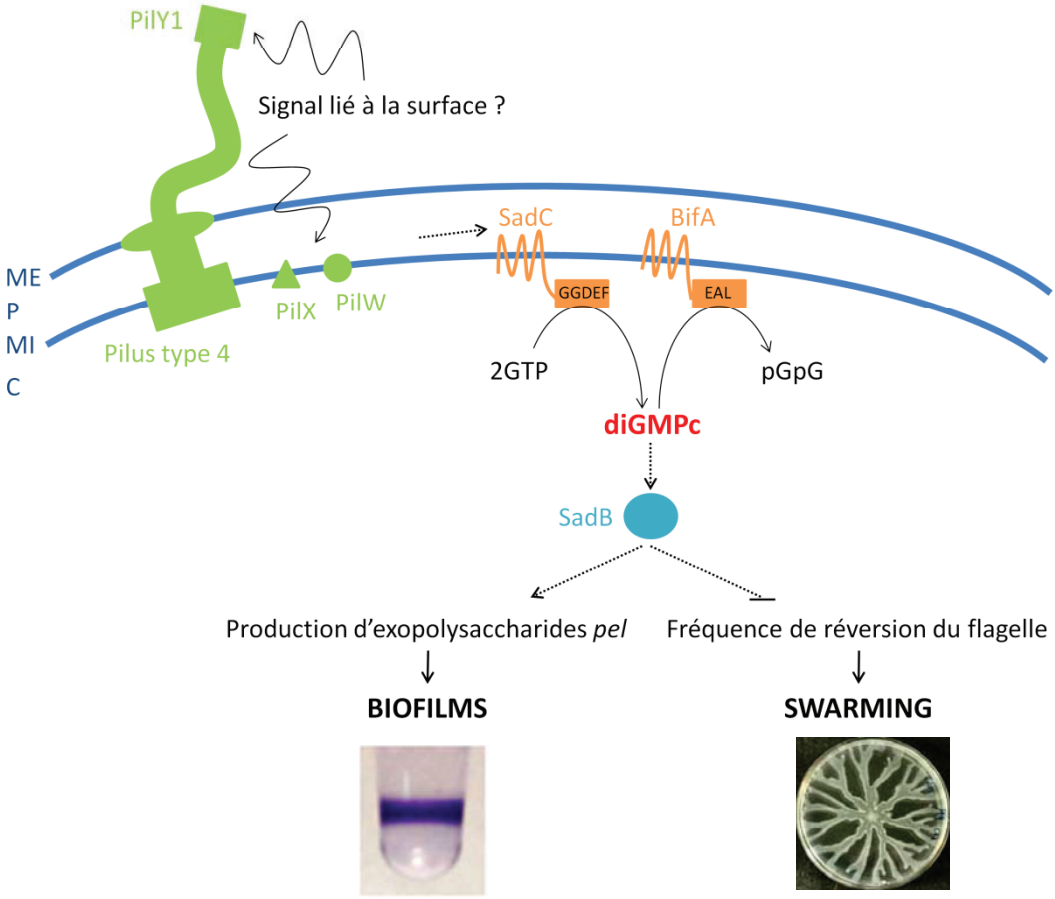


Figure 68 : Modèle de contrôle par le diGMPc de la mobilité par swarming chez *Pseudomonas aeruginosa* (d'après Kuchma *et al.*, 2007; Merritt *et al.*, 2007; Kuchma *et al.*, 2010 et Kuchma *et al.*, 2012).

Les protéines PilX, PilW et PilY1 sont nécessaires à la biogénèse du pilus de type IV. D'une façon encore obscure ces protéines perçoivent et/ou transduisent un signal lié à la présence d'une surface, activant l'activité DGC de la protéine membranaire SadC. L'activité de celle-ci peut être neutralisée par la PDE BifA. La forte concentration en diGMPc engendrée par SadC déclenche une ou des voies de signalisation dont l'un des participants est la protéine SadB. SadB est connue pour stimuler la production d'exopolysaccharides *pel* nécessaires à la formation de biofilms mais aussi pour inhiber la fréquence de réversion du flagelle jouant ainsi sur la mobilité par swarming de la bactérie.

Ryjenkov *et al.*, 2006, Girgis *et al.*, 2007). Une étude récente a permis d'identifier un nouvel acteur, BcsA, dont l'absence permet de restaurer la mobilité de ce mutant (Zorraquino *et al.*, 2013). BcsA est une synthétase de cellulose répondant à la fixation de diGMPc (Zorraquino *et al.*, 2013). La haute concentration en diGMPc dans le mutant *ΔyhjH* activerait BcsA et par conséquent la synthèse de cellulose, un composant de la matrice extracellulaire des biofilms (Zorraquino *et al.*, 2013). Cette production de cellulose empêcherait physiquement la rotation du flagelle par encombrement stérique (Zorraquino *et al.*, 2013). Là encore, les systèmes de contrôle de la mobilité et de la formation de biofilm gérés par le diGMPc s'entrecroisent.

Chez d'autres espèces, des protéines à domaines GGDEF et/ou EAL différentes peuvent également intervenir dans le contrôle de la rotation du flagelle, comme YpfA de *Bacillus subtilis* (Chen *et al.*, 2012a), DgrA de *C. crescentus* (Christen *et al.*, 2007) et peut-être FlgZ de *P. aeruginosa* (Martínez-Granero *et al.*, 2014).

~ Le contrôle des autres types de mobilité

Le diGMPc est capable de contrôler la nage bactérienne ou « swimming » mais aussi les autres types de mobilité que les bactéries utilisent. En effet, ce messager secondaire module la mobilité de type « swarming » ou essaimage, qui correspond à un mode de déplacement collectif et coordonné sur une surface semi-solide nécessitant le flagelle et la production d'un surfactant (Henrichsen, 1972). Il participe aussi à la régulation de la mobilité de type « twitching », appelée aussi mobilité par contraction, reposant sur des cycles d'extension, d'adhésion puis de rétraction des pili de type IV (Merz *et al.*, 2000, Skerker *et al.*, 2001). Enfin, le diGMPc contrôle la mobilité par gliding dont les mécanismes moléculaires ne sont pas encore clairement établis et pourraient différer selon l'espèce bactérienne : certains travaux proposent une propulsion de la bactérie par la libération d'un polymère appelé hydrogel, alors que d'autres mettent en évidence une traction de la bactérie grâce à des complexes d'adhésion à la surface couplés à des moteurs moléculaires et ancrés sur le cytosquelette de la bactérie (Mauriello *et al.*, 2010). Les exemples ci-dessous illustrent chacun l'influence du diGMPc sur une de ces formes de mobilité.

Le diGMPc contrôle la mobilité par swarming de *P. aeruginosa* (Figure 68) (Kuchma *et al.*, 2007, Merritt *et al.*, 2007, Kuchma *et al.*, 2010, Kuchma *et al.*, 2012). En effet, la DGC SadC et la PDE BifA contrôlent la mobilité de type swarming puisque la souche *ΔsadC* a un phénotype d'hyperswarming et la souche *ΔbifA* un défaut de mobilité par swarming (Kuchma *et al.*, 2007, Merritt *et al.*, 2007). La voie de signalisation impliquant SadC et BifA requiert, en aval, la protéine SadB (Figure 68), connue notamment pour contrôler la fréquence de réversion du sens de rotation du flagelle (Caiazza *et al.*, 2007, Kuchma *et al.*, 2007, Merritt *et al.*, 2007). D'autres acteurs de cette

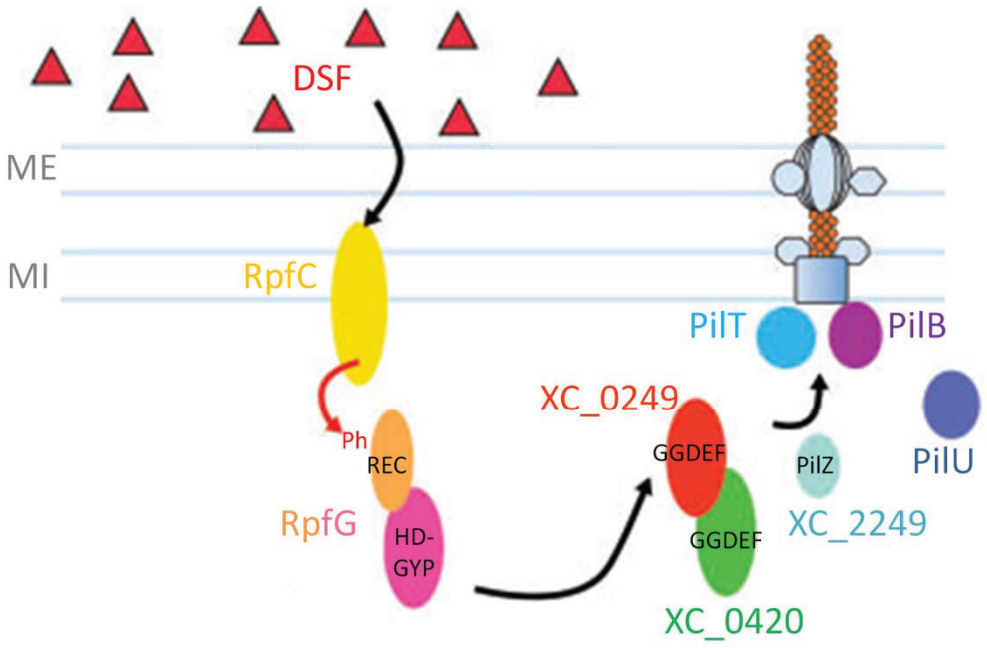


Figure 69 : Modèle de contrôle par le diGMPc de la mobilité par twitching chez *Xanthomonas campestris* (d'après Ryan *et al.,* 2013).
La perception de DSF par le senseur kinase RpfC induit l'activation de la PDE RpfG et promeut son interaction avec deux DGC (XC_0249 et XC_0420). Ce complexe interagit avec un quatrième partenaire, la protéine XC_2249 à domaine PilZ. Enfin, ce complexe peut interagir avec les sous-unités PilU et PilT du moteur du pilus de type IV qui sont nécessaires à la rétractation du pilus et donc à la mobilité par twitching.

voie de signalisation ont été identifiés par recherche de mutants suppresseurs du défaut de swarming de la souche *ΔbifA* : les pilines mineurs PilX et PilW ainsi que la adhésine PilY1 (Heiniger *et al.*, 2010, Kuchma *et al.*, 2010, Kuchma *et al.*, 2012). Ces trois protéines membranaires pourraient être impliquées dans la perception et/ou la transduction d'un signal indiquant la présence d'une surface, induisant l'activation de la DGC SadC (Figure 68) (Kuchma *et al.*, 2012).

Chez *Xanthomonas campestris*, les voies de signalisation à diGMPc participent à la régulation de la rétractation du pilus de type IV, nécessaire à la mobilité par twitching (Figure 69) (Ryan *et al.*, 2012). La protéine kinase RpfC perçoit la présence de DSF (Diffusible Signalling Factor) et phosphoryle son RR RpfG, à domaine HD-GYP, en réponse à ce signal (Figure 69) (Ryan *et al.*, 2010). Cette phosphorylation stimule l'activité PDE de RpfG et promeut son interaction avec deux protéines à domaines GGDEF, XC_0249 et XC_0420 (Figure 69) (Ryan *et al.*, 2010, Ryan *et al.*, 2012). Ce complexe tripartite peut alors interagir avec un quatrième partenaire, la protéine XC_2249 à domaine PilZ (Figure 69), connue par ailleurs pour son implication dans le contrôle de la mobilité par twitching (McCarthy *et al.*, 2008, Ryan *et al.*, 2012). Le complexe, par l'intermédiaire de la protéine à domaine PilZ, interagit alors avec les sous-unités du moteur du pilus de type IV, PilU et PilT, requises pour sa rétraction et par conséquent pour la mobilité par twitching (Mattick, 2002, Guzzo *et al.*, 2009, Ryan *et al.*, 2012). Etonnamment, l'établissement des interactions entre les différents partenaires ne requiert pas le diGMPc car des substitutions par une alanine au sein du motif GGDEF n'abolissent pas l'interaction (Ryan *et al.*, 2012). Cependant, à l'instar de YcgR, le diGMPc pourrait jouer sur l'intensité de ces interactions.

Enfin, le diGMPc participerait au contrôle de la mobilité de type gliding chez *Bdellovibrio bacteriovorus* (Figure 61) (Hobley *et al.*, 2012). La délétion de la protéine DgcA provoque une incapacité à réaliser un cycle de prédation de *B. bacteriovorus* (Hobley *et al.*, 2012). Une analyse plus poussée du phénotype de la souche *ΔdgcA* a mis en évidence que cette bactérie était infectieuse pour sa bactérie-proie lorsque les deux sont mises en contact étroit (Hobley *et al.*, 2012). Cependant, après la lyse du bdelloplaste, cette souche mutante n'est pas capable de s'éloigner de sa proie par gliding (Hobley *et al.*, 2012). En effet, 120 min après la lyse du bdelloplaste, *ΔdgcA* est toujours localisée dans les restes de sa proie alors que la bactérie sauvage a quitté cet emplacement 10 min après la lyse (Hobley *et al.*, 2012). DgcA est donc nécessaire au contrôle de la mobilité par gliding, ce type de déplacement étant par ailleurs important pour la virulence de *B. bacteriovorus* (Hobley *et al.*, 2012).

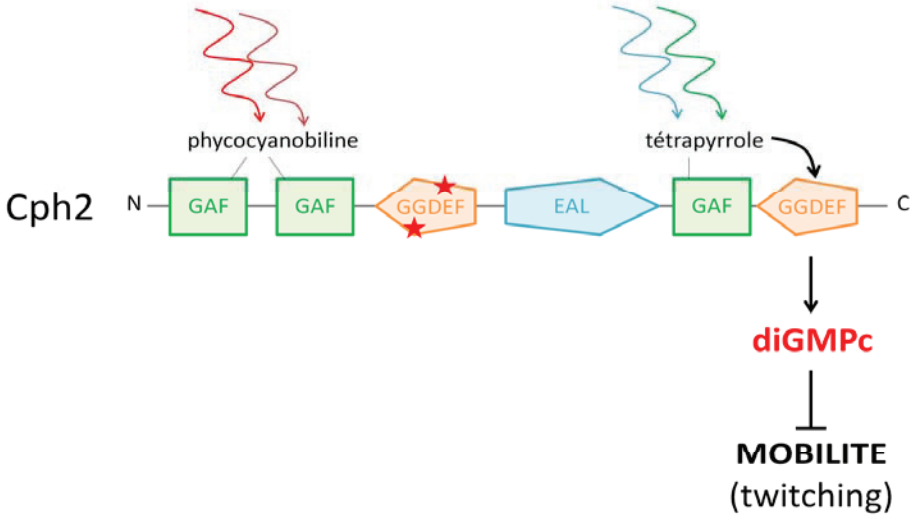


Figure 70 : Structure et activation de Cph2 de *Synechocystis sp.*
Cph2 a une architecture complexe séparée en deux modules. Le premier module est composé de deux domaines GAF, un domaine GGDEF dégénéré et d'un domaine EAL. Les deux domaines GAF fixent la phycocyanobiline, une molécule capable d'absorber les longueurs d'onde lumineuses correspondant au rouge et au rouge lointain. Actuellement, la conséquence de cette détection sur le domaine EAL n'est pas déterminée. De même, le rôle du domaine GGDEF dégénéré n'est pas établi. Le second module est composé d'un domaine GAF et d'un domaine GGDEF fonctionnel. Le domaine GAF lie le tétrapyrrole, une molécule capable d'absorber les longueurs d'onde lumineuses correspondant au bleu et au vert. Cette détection entraine une activation de l'activité DGC du domaine GGDEF. La synthèse de diGMPc par Cph2 dans ces conditions entraine une inhibition de la mobilité de *Synechocystis sp*..

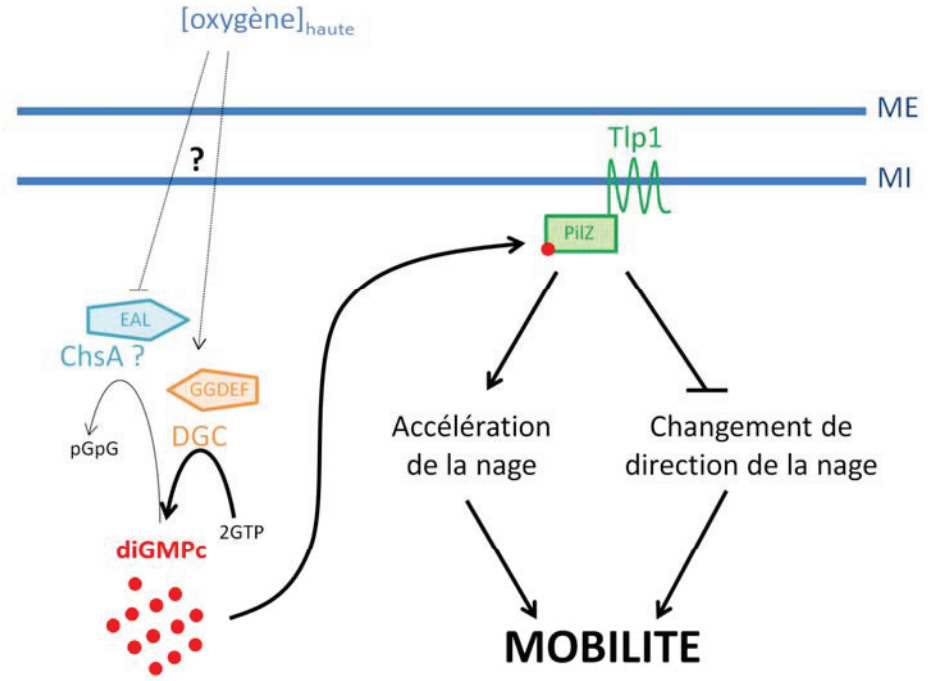


Figure 71 : Modèle de contrôle de la mobilité liée à l'aérotaxie par Tlp1 chez *Azospirillum brasilense* (d'après Russell *et al.*, 2013).
Les hautes concentrations en oxygène dans l'environnement extracellulaire induisent une hausse de la concentration intracellulaire en diGMPc. Les enzymes (DGC et PDE) impliquées dans cette hausse sont encore inconnues, mais l'une d'elles pourrait être la PDE CHsA. Le diGMPc ainsi produit est fixé notamment par la protéine membranaire Tlp1 à domaine PilZ. Cette fixation promeut l'accélération de la nage et inhibe la réversion de direction de la bactérie.

~ Le contrôle du chimiotactisme

Chez les bactéries, la mobilité est influencée par la composition de l'environnement extracellulaire (Armitage, 1992). En effet, le pH, la température, le taux d'oxygène ou encore la présence de nutriments modulent la mobilité de la bactérie, provoquant son attirance ou sa répulsion (Armitage, 1992). Ce phénomène est appelé chimiotactisme (Armitage, 1992). Les voies de signalisation à diGMPc participeraient également au contrôle de la mobilité bactérienne via la régulation du chimiotactisme. Les deux exemples ci-dessous illustrent ce phénomène.

Chez la cyanobactérie *Synechocystis sp*., la mobilité par twitching est contrôlée par phototaxie, c'est-à-dire par chimiotactisme envers la lumière, dans le but de placer la bactérie dans les conditions optimales pour la photosynthèse (Yoshihara *et al.*, 2004). Cette phototaxie implique la protéine Cph2 (Wilde *et al.*, 2002). En effet, une souche *Δcph2* est mobile en présence de lumière bleue alors que la souche sauvage est immobile (Wilde *et al.*, 2002). L'architecture très complexe de cette protéine, à domaines GAF-GAF-GGDEFdégénéré-EAL-GAF-GGDEF, lui permet notamment de produire du diGMPc grâce au domaine GGDEF C-terminal en réponse à la perception de lumière par les différents domaines GAF (Figure 70) (Savakis *et al.*, 2012). Plus particulièrement, le 3ème domaine GAF permet la détection de lumière bleue et la stimulation de l'activité DGC (Figure 70) (Savakis *et al.*, 2012). La production de diGMPc par Cph2 inhibe alors la mobilité par twitching de la cyanobactérie via un mécanisme encore inconnu, laissant la bactérie immobile (Figure 70) (Savakis *et al.*, 2012). Les autres domaines senseurs de cette protéine participent vraisemblablement à un contrôle plus complexe de l'activité DGC en réponse à d'autres longueurs d'onde qui composent la lumière blanche (Figure 70) (Savakis *et al.*, 2012).

Azospirillum brasilense est une α-protéobactérie à flagelle polaire qui présente une forte aérotaxie, c'est-à-dire un chimiotactisme envers l'oxygène (Alexandre *et al.*, 2000). Cette aérotaxie, permet à la bactérie d'atteindre par la nage flagellaire les zones où la concentration en oxygène est faible, c'est-à-dire optimale pour son métabolisme microaérophile (Zhulin *et al.*, 1996, Bible *et al.*, 2012). Les changements de la concentration en oxygène dans l'environnement sont rapidement perçus par la bactérie et se traduisent notamment par des ajustements rapides de la concentration intracellulaire en diGMPc (Figure 71) (Russell *et al.*, 2013). Ces variations de concentration en diGMPc pourraient être le fait de la PDE ChsA car la délétion de *chsA* rend *A. brasilense* insensible aux variations de la concentration en oxygène (Figure 71) (Carreño-López *et al.*, 2009). Le diGMPc est perçu par la protéine à domaine PilZ Tlp1 (Figure 71) (Russell *et al.*, 2013). La liaison du diGMPc sur Tlp1 affecte positivement l'accélération de la nage et négativement les changements de direction de la bactérie lorsque la concentration en oxygène est haute, promouvant la mobilité de la bactérie (Figure 71) (Russell *et al.*, 2013). Lorsque *A. brasilense* atteint une zone où la concentration en

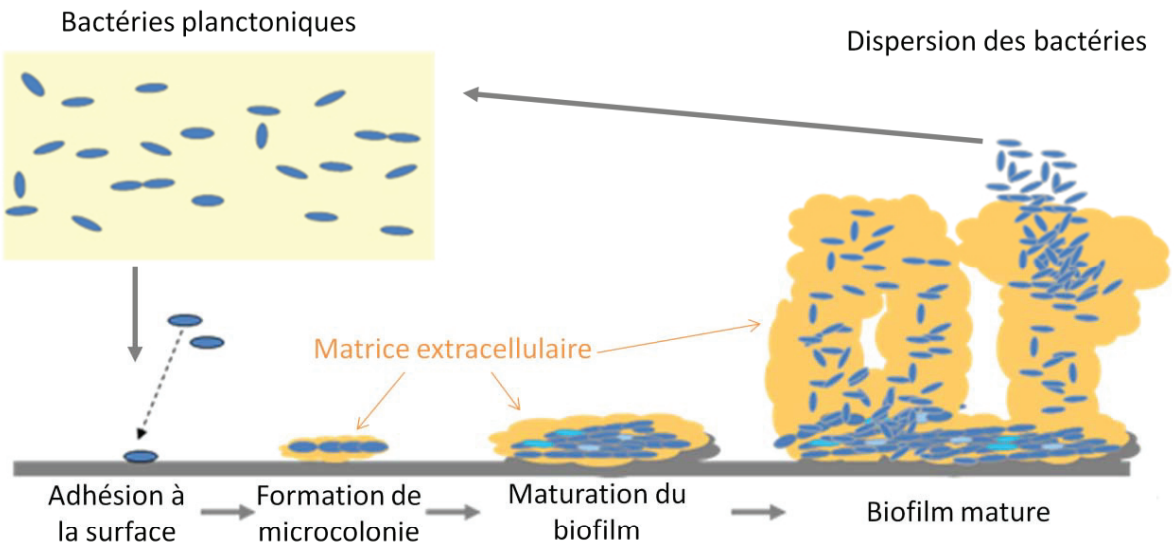


Figure 72 : Les étapes de la formation de biofilms par les bactéries.
Les bactéries planctoniques en réponse à certains signaux adhèrent à une surface de façon réversible puis irréversible grâce à des structures spécifiques comme les adhésines, les fimbriae ou les pili de type IV. Elles forment ensuite des microcolonies, c'est-à-dire des agrégats de bactéries. Dès cette étape, les bactéries adhérées synthétisent la matrice extracellulaire, un mélange d'exopolysaccharides, d'ADN exogène et de protéines. La maturation du biofilm résulte à la fois de l'agrégation de nouvelles bactéries ainsi que de la multiplication bactérienne. Le biofilm mature prend une structure tridimensionnelle typique en « champignon ». Dans ces biofilms, certaines bactéries synthétisent des protéines spécifiques qui fragilisent la matrice extracellulaire et qui permettent par conséquent la dispersion d'une partie du biofilm.

oxygène est plus faible, et donc optimale, alors la concentration en diGMPc décroit, inhibant la mobilité de la bactérie (Russell *et al.*, 2013).

❖ *Le contrôle de la formation de biofilms*

Les biofilms sont des communautés de bactéries à architecture tridimensionnelle complexe, structurées par une matrice extracellulaire, et adhérentes à une surface (Figure 72) (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Les bactéries planctoniques adhèrent tout d'abord à la surface grâce à des structures spécifiques telles que les adhésines, les fimbriae ou les pili de type IV (Figure 72). Une fois liées à la surface, elles s'agrègent sous forme de microcolonies et synthétisent une matrice extracellulaire composée d'exopolysaccharides (EPS), d'ADN extracellulaire et de protéines (Figure 72). La maturation du biofilm, qui résulte à la fois de l'agrégation de nouvelles bactéries et de la multiplication bactérienne, est caractérisée par une architecture spécifique en « champignon » (Figure 72). Dans le biofilm mature, certaines bactéries synthétisent des protéines spécifiques permettant de fragiliser la matrice extracellulaire et par conséquent de libérer une partie de la population du biofilm (étape de « dispersion ») (Figure 72).

Les voies de signalisation à diGMPc sont particulièrement requises pour la régulation de deux étapes cruciales: la production de la matrice extracellulaire et la biosynthèse des structures qui permettent l'adhérence de la bactérie à la surface. Enfin, le diGMPc participe aussi au contrôle de l'architecture du biofilm via la modulation de la dispersion des bactéries à partir du biofilm. Comme cela a été vu précédemment, ce contrôle de la formation du biofilm est antagoniste à celui de la mobilité flagellaire (Figures 64 p. 78 et 68 p. 81).

~ Production de la matrice extracellulaire des biofilms

La matrice extracellulaire, qui protège les bactéries du biofilm, est composée d'exopolysaccharides, d'ADN extracellulaire et de protéines. La nature des exopolysaccharides dépend de l'espèce bactérienne : *E. coli*, par exemple, produit notamment des poly-*N*-acetylglucosamine (PNAG) et de la cellulose (Ross *et al.*, 1991, Wang *et al.*, 2004b). La production de ces deux molécules est sous le contrôle de voies de signalisation à diGMPc (Zogaj *et al.*, 2001, Weber *et al.*, 2006, Boehm *et al.*, 2009, Tagliabue *et al.*, 2010a, Lindenberg *et al.*, 2013). La présence d'ADN extracellulaire est également sous le contrôle des voies à diGMPc (Ueda *et al.*, 2010). La présence de protéines dans cette matrice est probablement liée à la production de structures d'adhérence, notamment des adhésines (cf. paragraphe « Production des structures d'adhérences » p. 86).

o *Production d'exopolysaccharides*

La production de PNAG, nécessaire à la composition de la matrice extracellulaire d'*E. coli,* est sous le contrôle de deux DGC, YddV et YdeH, et d'une PDE, DosP (Figure 73) (Boehm *et al.*, 2009,

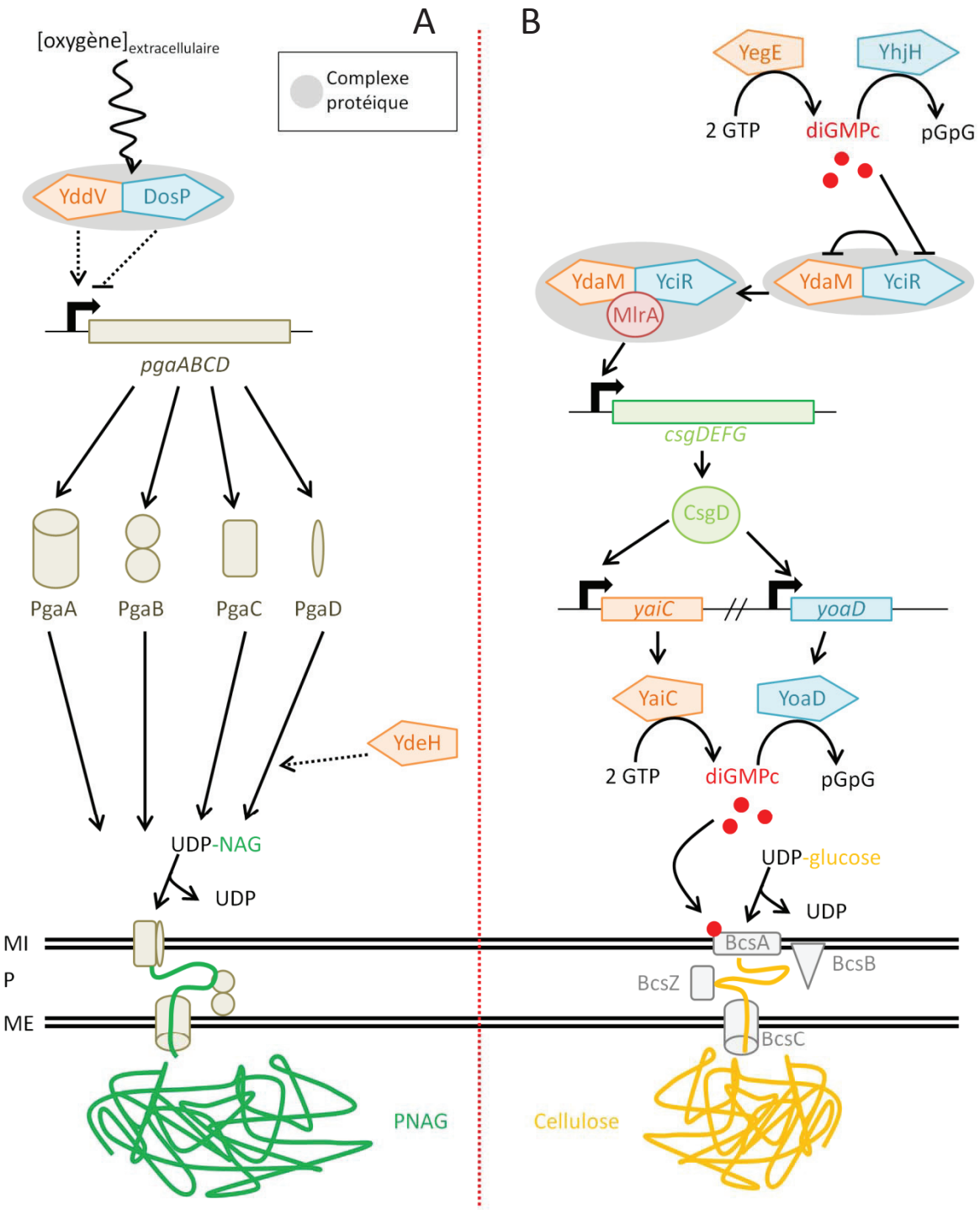


Figure 73 : Le contrôle de la synthèse de PNAG et de cellulose par les voies à diGMPc chez *E. coli.*
(A) Le complexe YddV(DGC)/DosP(PDE) contrôle l'expression de l'opéron *pgaABCD* d'une manière dépendante de la concentration en oxygène. Les protéines PgaA, PgaB, PgaC et PgaD constituent le complexe membranaire de biosynthèse du PNAG. La DGC YdeH intervient aussi dans le contrôle de la production de PNAG en stabilisant la protéine PgaD essentielle au fonctionnement du complexe Pga. (B) La synthèse de diGMPc par le module YegE(DGC)/YhjH(PDE) inhibe l'activité de la PDE YciR, levant ainsi l'inhibition que YciR impose à son interactant, la DGC YdaM. Le complexe actif interagit alors avec MlrA, un régulateur transcriptionnel nécessaire pour l'expression de l'opéron *csgDEFG*, permettant notamment la production de la protéine CsgD. CsgD est un régulateur transcriptionnel qui contrôle l'expression d'un troisième module : YaiC(DGC)/YoaD(PDE). La synthèse de diGMPc par ce module active allostériquement la synthétase de cellulose BcsA et permet par conséquent la production de cellulose.

Tuckerman *et al.*, 2009, Tagliabue *et al.*, 2010a). La DGC YddV, appelée aussi DosC, affecte positivement la formation de biofilm via la stimulation de la transcription de l'opéron *pgaABCD*, nécessaire à la biosynthèse de PNAG (Figure 73) (Tagliabue *et al.*, 2010a). Son action est neutralisée par la PDE DosP (Figure 73), dont le gène est organisé en opéron avec *yddV* (Tuckerman *et al.*, 2009). De plus, ces deux protéines antagonistes appartiennent au même complexe de protéines et leurs activités enzymatiques sont modulées en fonction de la concentration en oxygène dans l'environnement extracellulaire (Figure 73) (Tuckerman *et al.*, 2009). L'opéron *pgaABCD* porte, entre autres, le gène codant la protéine de membrane interne PgaD, essentielle pour la biosynthèse de PNAG (Wang *et al.*, 2004b, Daley *et al.*, 2005, Itoh *et al.*, 2008). La DGC YdeH contrôle positivement la production de PNAG en stabilisant la protéine PgaD (Figure 73) (Boehm *et al.*, 2009).

La synthèse de cellulose chez *E. coli* est contrôlée par trois couples de DGC et de PDE : YegE/YhjH, YdaM/YciR et YaiC/YoaD (Figure 73) (Zogaj *et al.*, 2001, Weber *et al.*, 2006, Lindenberg *et al.*, 2013). La synthèse de diGMPc par le couple YegE/YhjH inhibe la PDE YciR, levant ainsi l'inhibition qu'il impose à son interactant, la DGC YdaM (Figure 73) (Lindenberg *et al.*, 2013). Le complexe YdaM/YciR interagit alors avec MlrA, un régulateur transcriptionnel nécessaire à l'expression de l'opéron *csgDEFG* (Figure 73) (Weber *et al.*, 2006, Ogasawara *et al.*, 2010, Lindenberg *et al.*, 2013). CsgD est un régulateur transcriptionnel qui contrôle l'expression du troisième couple DGC/PDE, YaiC/YoaD (Figure 73) (Weber *et al.*, 2006). La synthèse de diGMPc par ce dernier couple active allostériquement la synthétase BcsA par fixation du diGMPc sur le domaine PilZ de cette protéine (Figure 73) (Morgan *et al.*, 2014). En effet, la fixation du diGMPc induit un changement de la conformation de BcsA, provoquant le démasquage du site catalytique de cette synthétase (Morgan *et al.*, 2014). Celle-ci peut alors synthétiser la cellulose à partir d'UDP-glucose (Figure 73) (Ross *et al.*, 1991).

La production d'EPS d'autres espèces bactériennes apparait également sous le contrôle de voies de signalisation à diGMPc. C'est le cas de la synthèse d'alginate, des EPS Psl et Pel chez *Pseudomonas aeruginosa* (Figure 68) (Merighi *et al.*, 2007, Borlee *et al.*, 2010, Merritt *et al.*, 2010), de la cellulose chez *Agrobacterium tumefasciens* (Barnhart *et al.*, 2013) ou encore des EPS Vps chez *Vibrio cholerae* (Figure 64) (Beyhan *et al.*, 2007, Lim *et al.*, 2007).

- *Production d'ADN extracellulaire*

Le rôle de l'ADN extracellulaire, bien qu'essentiel pour le développement d'un biofilm, n'est pas clairement défini (Whitchurch *et al.*, 2002, Okshevsky *et al.*, 2013). Il est envisagé que sa présence faciliterait la liaison aux surfaces abiotiques dès les premières étapes de la formation du biofilm (Okshevsky *et al.*, 2013). Dans un biofilm mature, cet ADN pourrait jouer un rôle de chélateur

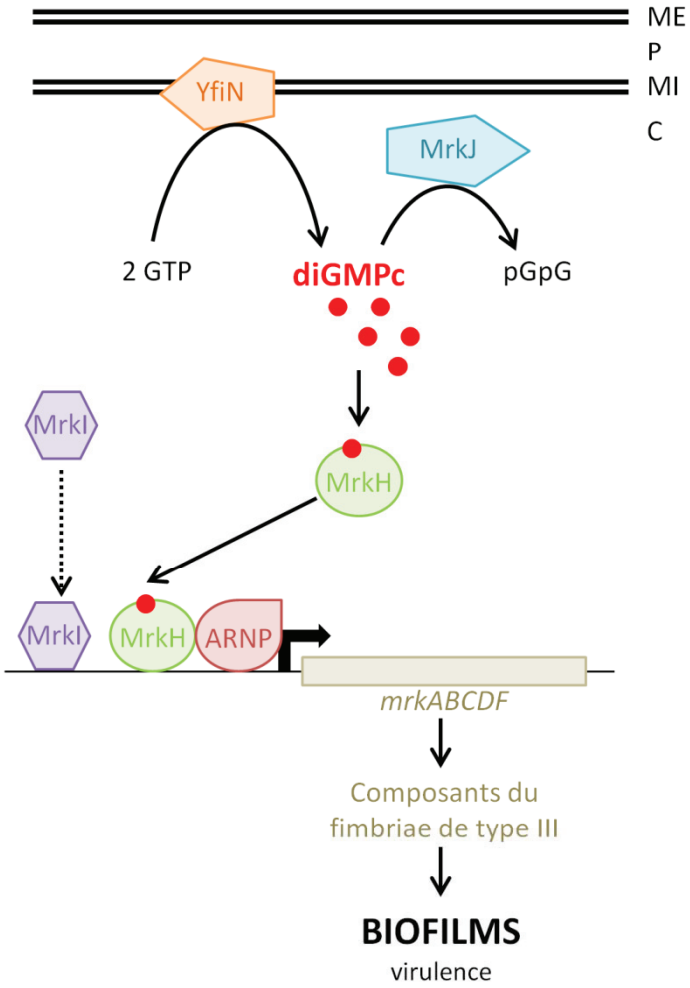


Figure 74 : Contrôle de la production de fimbriae de type III par le diGMPc chez *K. pneumoniae*
La DGC YfiN et la PDE MrkJ contrôlent la synthèse et la dégradation du diGMPc. La fixation de diGMPc sur la protéine à domaine PilZ MrkH provoque probablement un changement de conformation de la protéine. Ce changement de conformation faciliterait la liaison de MrkH sur le promoteur de l'opéron *mrkABCDF*. La fixation de MrkH sur l'ADN faciliterait à son tour la liaison de l'ARNpolymérase, activant ainsi la transcription de l'opéron. Les gènes *mrk* portés par l'opéron codent les constituants des fimbriae de type III : MrkA est la piline constituant les fimbriae et MrkD l'adhésine située au bout du filament. MrkI, à domaine de liaison à l'ADN HTH, est aussi requise pour la transcription de cet opéron mais son rôle dans le mécanisme reste obscur.

de cations, notamment de Mg^{2+}, promouvant ainsi l'entrée des bactéries dans un état particulièrement résistant (Okshevsky *et al.*, 2013).

Le diGMPc contrôle également la production de ce composant de la matrice extracellulaire. En effet, l'absence de la DGC TpbB engendre une hausse de la quantité d'ADN extracellulaire présent dans la matrice (Ueda *et al.*, 2010). Cette hausse est corrélée avec la diminution de la concentration intracellulaire en diGMPc engendrée par l'absence de TpbB (Ueda *et al.*, 2010). Plus précisément, la réduction de la concentration en diGMPc influencerait la lyse cellulaire, promouvant ainsi la présence d'ADN extracellulaire (Ueda *et al.*, 2010). L'activité DGC de TpbB semble être contrôlée négativement par la tyrosine phosphatase TpbA, probablement par une déphosphorylation (Ueda *et al.*, 2010). Les mécanismes moléculaires permettant au diGMPc d'influencer la lyse cellulaire doivent encore être élucidés.

~ Production des structures d'adhérence

Le rôle des structures bactériennes d'adhérence aux surfaces est cruciale pour la formation de biofilms. Parmi celles-ci, on trouve les fimbriae, les curli ainsi que les adhésines, dont la production peut être sous le contrôle de voies de signalisation à diGMPc.

o *Production des fimbriae*

Les fimbriae ou pili sont de longs filaments protéiques non flagellaires présents à la surface de nombreuses bactéries (Fronzes *et al.*, 2008). Ces structures participent à l'adhérence des bactéries sur les surfaces biotiques et/ou abiotiques, jouant un rôle dans la formation de biofilms mais aussi parfois dans la virulence de la bactérie (Fronzes *et al.*, 2008).

La production de ces structures peut être contrôlée par le diGMPc, comme par exemple la production de fimbriae de type III chez *Klebsiella pneumoniae* (Figure 74) (Johnson *et al.*, 2011, Wilksch *et al.*, 2011, Yang *et al.*, 2013a). En effet, la DGC YfiN et la PDE MrkJ ont un effet positif et négatif, respectivement, sur la formation des pili de type III (Wilksch *et al.*, 2011). La synthèse de diGMPc par YfiN permet l'activation allostérique du régulateur transcriptionnel MrkH (Figure 74) (Johnson *et al.*, 2011, Wilksch *et al.*, 2011, Yang *et al.*, 2013a). En effet, la fixation de diGMPc sur le domaine PilZ de MrkH induit probablement un changement de conformation qui facilite la liaison de MrkH sur le promoteur de l'opéron *mrkABCDF*, codant les composants des fimbriae (Figure 74) (Wilksch *et al.*, 2011). La présence de MrkH sur le promoteur de cet opéron facilite alors l'interaction du promoteur avec l'ARN polymérase, activant ainsi l'expression des gènes de structure des pili (Figure 74) (Yang *et al.*, 2013a). La présence de ces fimbriae de type III chez *K. pneumoniae* permet à la bactérie d'adhérer aux surfaces abiotiques et de former des biofilms notamment dans les

dispositifs médicaux comme les cathéters urinaires, promouvant ainsi l'infection par ce pathogène opportuniste (Langley *et al.*, 2001, Yu *et al.*, 2007).

D'autres types de pili nécessaires à la formation de biofilms sont aussi contrôlés par le diGMPc. C'est le cas des Cup fimbriae (Chaperon/usher pathway) de *P. aeruginosa* (Mikkelsen *et al.*, 2009), les fimbriae de type I de *K. pneumoniae* (Wang *et al.*, 2013) ou des pili de *Porphyromonas gingivalis* (Chaudhuri *et al.*, 2014).

Les curli font partie de la famille des pili (Fronzes *et al.*, 2008). La particularité de ces structures repose sur leur mode d'assemblage (Fronzes *et al.*, 2008). En effet, alors que les fimbriae communs sont assemblés depuis la base périplasmique de la structure, les curli sont assemblés par nucléation spontanée de la curline directement à l'extérieur de la bactérie (Fronzes *et al.*, 2008).

Chez *E.coli*, la production des curli est, en partie, sous le contrôle de la voie de signalisation à diGMPc qui permet de contrôler la production de PNAG (Weber *et al.*, 2006, Tagliabue *et al.*, 2010b, Raterman *et al.*, 2013). En effet, la DGC YddV et la PDE DosP sont nécessaires à la production des curli (Tagliabue *et al.*, 2010b). L'absence et la surproduction de ces deux protéines affectent l'expression de l'opéron *csgBAC*, codant les constituants des curli (Römling *et al.*, 1998, Tagliabue *et al.*, 2010b). Cet effet sur l'expression de l'opéron *csgBAC* ne se fait pas par l'intermédiaire de CsgD, le régulateur transcriptionnel participant à la production de la cellulose et contrôlant l'opéron *csgBAC* (Brombacher *et al.*, 2006, Tagliabue *et al.*, 2010b). Il semblerait également que cette synthèse soit modulée par le biais de la DGC YfiN et de son régulateur YfiR (Raterman *et al.*, 2013).

Le diGMPc permet également de contrôler la production de curli chez *Salmonella Typhimurium* (Kader *et al.*, 2006).

- *Production d'adhésines*

Parmi les structures d'adhérence qui sont impliquées dans la formation de biofilms, on compte les adhésines. Celles-si peuvent être sécrétées par la bactérie, comme CdrA de *P. aeruginosa* (Borlee *et al.*, 2010) ou être associées à la cellule comme LapA de *P. fluorescens* (Monds *et al.*, 2007, Newell *et al.*, 2009, Navarro *et al.*, 2011).

La production de la protéine CdrA est stimulée chez un variant morphologique de *P. aeruginosa* caractérisé par la formation de petites colonies à l'aspect rugueux (RSCV, rugose small colony variant) et de hautes concentrations en diGMPc (Starkey *et al.*, 2009, Borlee *et al.*, 2010). Le gène codant CdrA fait d'ailleurs partie des 35 gènes influencés par la haute concentration en diGMPc dans ce variant (Starkey *et al.*, 2009, Borlee *et al.*, 2010). Les DGC et PDE responsables de la hausse de concentration en diGMPc n'ont pas été identifiées, mais la DGC WspR pourrait intervenir (Starkey

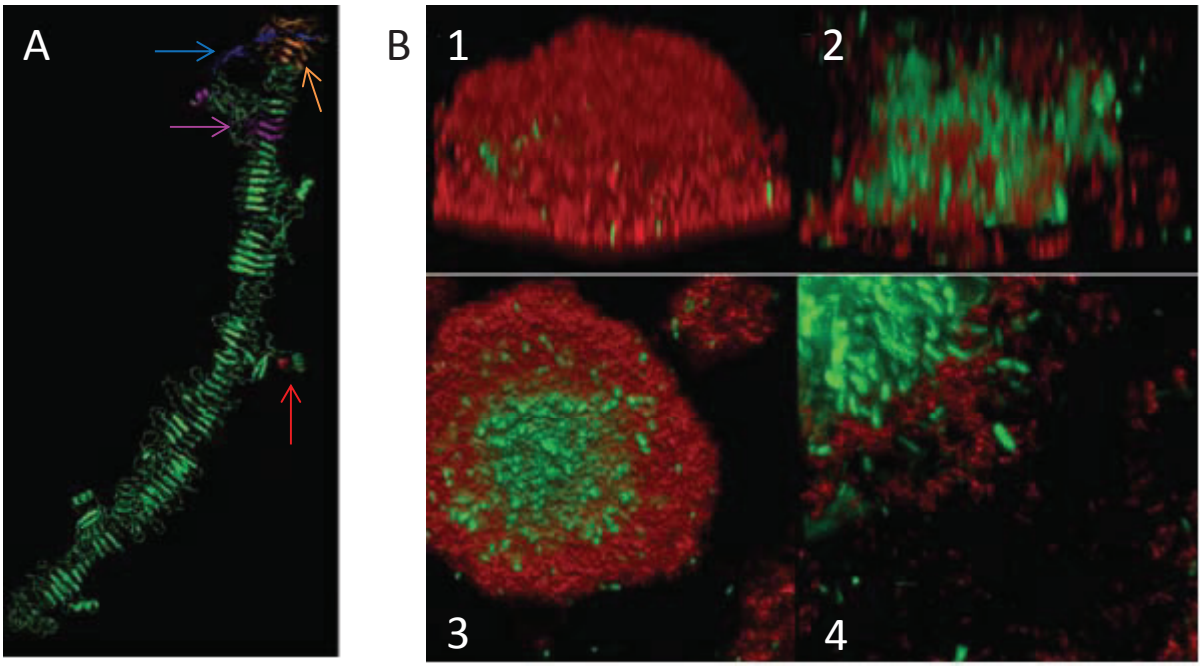


Figure 75 : Structure et rôle de la protéine CdrA de *P. aeruginosa* dans l'architecture des biofilms (d'après Borlee *et al.*, 2010).

(A) Structure de la protéine CdrA prédite par modélisation *de novo*. CdrA est organisée principalement en hélices β. Elle est également constituée de plusieurs motifs : un peptide signal de sécrétion (en bleu), un motif hémagglutinine (en orange), un site de liaison aux sucres (en violet) et un motif de type intégrine (en rouge). (B) Architecture des biofilms formés par un variant RSCV (Rugose Small Colony Variant) (*ΔwspF*). Les bactéries sont marquées avec le Syto9 (en vert) et les EPS Psl grâce à des lectines marquées avec la tétraméthylrhodamine (en rouge). Les clichés 1 (vue de côté) et 3 (vue de haut) présentent l'architecture d'un biofilm formé par le variant RSCV *ΔwspF* : les bactéries sont localisées au centre de la structure et sont entourées d'EPS Psl. Les clichés 2 (vue de côté) et 4 (vue de haut) présentent l'architecture d'un biofilm formé par la souche *ΔwspF ΔcdrA* : les EPS sont présents en plus petite quantité autour des agrégats de bactéries et organisés de façon moins dense.

et al., 2009). En effet, le phénotype RSCV peut être induit par une mutation dans le gène *wspF* codant un régulateur négatif de l'activité de la DGC WspR (D'Argenio *et al.*, 2002, Hickman *et al.*, 2005). Le gène *cdrA* est organisé en opéron avec le gène *cdrB* (Borlee *et al.*, 2010). CdrA est une protéine filamenteuse structurée en hélices β et porteuse d'un peptide signal de sécrétion, d'un motif hémagglutinine, d'un site de liaison aux sucres ainsi que d'un motif de type intégrine (Figure 75) (Borlee *et al.*, 2010). CdrB est une protéine de membrane externe permettant l'export de CdrA puisqu'une souche Δ*cdrB* n'est plus capable de sécréter CdrA (Borlee *et al.*, 2010). Ces protéines promeuvent la formation de biofilms et plus particulièrement la localisation des EPS Psl dans l'architecture du biofilm (Figure 75) (Borlee *et al.*, 2010). Le contrôle de la localisation des EPS Psl par CdrA est vraisemblablement dû à la capacité de cette adhésine à fixer les sucres de type mannose présents en abondance dans les polymères d'EPS Psl (Borlee *et al.*, 2010). CdrA, dont la production est contrôlée par le diGMPc, est donc une adhésine impliquée dans l'architecture du biofilm et plus particulièrement dans la structure de la matrice extracellulaire (Borlee *et al.*, 2010).

L'adhérence de *P. fluorescens* aux surfaces et par conséquent la formation de biofilms nécessite l'adhésine LapA (Hinsa *et al.*, 2003, Ivanov *et al.*, 2012, El-Kirat-Chatel *et al.*, 2014). Le transport de LapA jusqu'à la face externe de la membrane externe nécessite le transporteur de type ABC LapBCE (Figure 25 p. 50) (Hinsa *et al.*, 2003). La localisation de LapA dans la membrane externe est contrôlée en fonction de la concentration intracellulaire en diGMPc de la bactérie (Monds *et al.*, 2007). En présence de diGMPc, la protéine de membrane interne LapD, à domaines HAMP, GGDEF dégénéré et EAL dégénéré, fixe le diGMPc au niveau de son domaine EAL dégénéré (Figure 25 p. 50) (Newell *et al.*, 2009). Cette fixation entraine un changement de la conformation de la protéine LapD et promeut son interaction avec la protéase périplasmique LapG (Figure 25 p. 50) (Navarro *et al.*, 2011, Newell *et al.*, 2011a). La séquestration de LapG par LapD l'empêche de cliver la région N-terminale de LapA, ce qui permet l'ancrage de LapA dans la membrane externe et donc l'adhérence de *P. fluorescens* aux surfaces (Figure 25 p. 50) (Newell *et al.*, 2011a, Boyd *et al.*, 2012, Ivanov *et al.*, 2012). En réponse à des signaux environnementaux tels que la disponibilité en phosphate inorganique, le système Pst et le système à deux composants PhoR/PhoB stimulent la production de la PDE RapA (Figure 25 p. 50) (Monds *et al.*, 2007). La diminution de la concentration en diGMPc résultant de la production de RapA entraine d'une part, une inhibition de la production du transporteur LapBCE, et d'autre part, le clivage de LapA par LapG (Figure 25 p. 50) (Monds *et al.*, 2007, Newell *et al.*, 2009, Newell *et al.*, 2011b). Dans ces conditions de faibles concentrations en diGMPc et donc d'absence de LapA ancrée dans la membrane externe, *P. fluorescens* a une affinité diminuée d'un facteur 2 pour son support (Ivanov *et al.*, 2012).

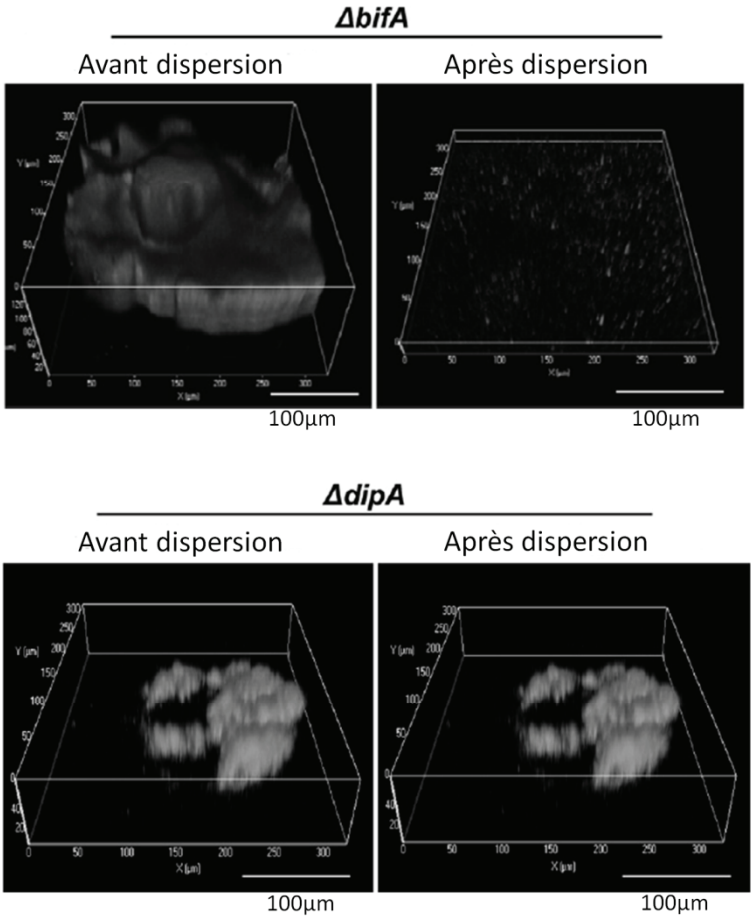


Figure 76 : La PDE DipA est essentielle à la dispersion du biofilm de *P. aeruginosa* (d'après Roy *et al.*, 2012).
Des biofilms de 5 jours des souches *ΔbifA* et *ΔdipA* ont été traités avec 18mM de glutamate pour déclencher la dispersion du biofilm en réponse à cette brusque augmentation de source de carbone. Les bactéries viables sont révélées grâce au marqueur Live/Dead BacLight. Les clichés à gauche ont été pris avant ajout du glutamate alors que les clichés à droite ont été pris 30 min après traitement. La souche *ΔbifA* a été utilisée comme témoin positif car elle réagit par une forte dispersion du biofilm en présence de glutamate.

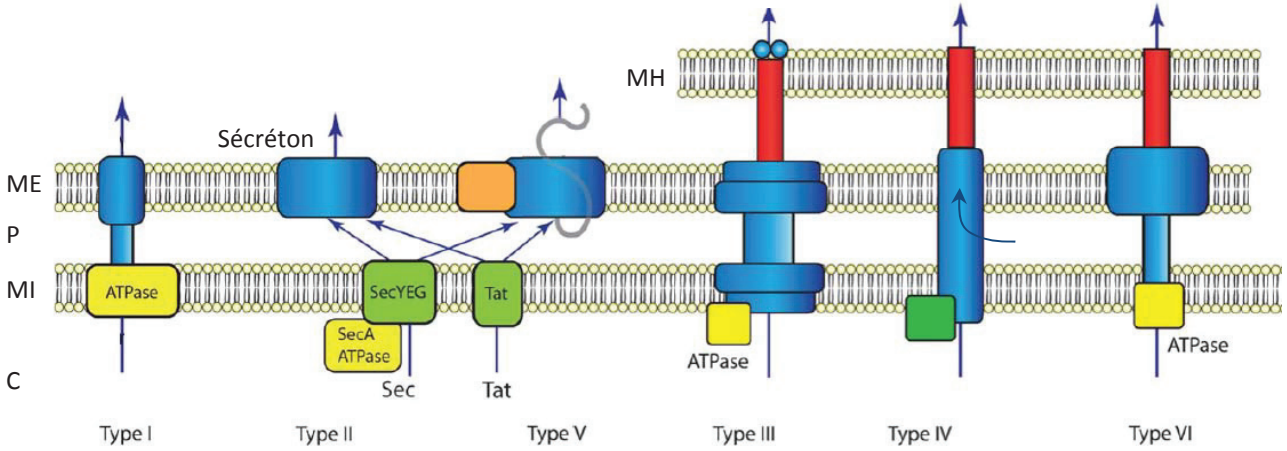


Figure 77 : Structure des différents systèmes de sécrétion des bactéries Gram négatives (d'après Tseng *et al.*, 2009).
Les 6 systèmes de sécrétion connus chez les bactéries Gram négatives permettent le transport de protéines depuis de cytoplasme (C) à travers les deux membranes et le périplasme (P) de l'enveloppe bactérienne. Les systèmes de sécrétion de type III (SST3), de type IV (SST4) et de type VI (SST6) permettent la traversée d'une troisième membrane (MH, Membrane de l'hôte) pour injecter des facteurs de virulence directement dans une cellule-hôte/cellule-cible. La sécrétion se fait le plus souvent en une étape sauf dans le cas des systèmes de sécrétion de type II (SST2), de type V (SST5) et de certains SST4. Pour le SST2, le passage de la membrane interne (MI) se fait via les systèmes Sec ou Tat (en vert) et le passage de la membrane externe (ME) par un complexe appelé sécréton, constitué d'une sécrétine et d'une structure de type pilus. Pour le SST5, la traversée de la MI se fait via les systèmes Sec ou Tat mais la traversée de la ME nécessite un domaine translocateur, porté par la protéine sécrétée ou exprimé comme protéine à part entière.

Les voies de signalisation à diGMPc contrôlent également la production et la sécrétion d'adhésines nécessaires à l'adhérence aux surfaces et à la virulence des pathogènes *Shewanella putresfaciens* (Wu *et al.*, 2013a) et *Pectobacterium atrosepticum* (Pérez-Mendoza *et al.*, 2011).

~ Contrôle de la dispersion du biofilm

Lorsque les conditions de survie dans le biofilm sont défavorables, une partie de la population bactérienne entreprend une dispersion coordonnée depuis le biofilm (Purevdorj-Gage *et al.*, 2005, McDougald *et al.*, 2012). Cette étape de dispersion peut être contrôlée par les voies de signalisation à diGMPc (Barraud *et al.*, 2009, An *et al.*, 2010, Petrova *et al.*, 2012b, Petrova *et al.*, 2012a, Roy *et al.*, 2012).

Chez *P. aeruginosa*, la dispersion du biofilm fait intervenir les PDE DipA et RbdA (Figure 76) (An *et al.*, 2010, Petrova *et al.*, 2012b, Roy *et al.*, 2012). DipA interagit avec la protéine BdlA, connue pour son implication dans la dispersion des biofilms de *P. aeruginosa* en présence d'oxyde nitrique (NO) (Morgan *et al.*, 2006, Petrova *et al.*, 2012b). Cette interaction stimule l'activité PDE d'un des deux domaines EAL de DipA, induit une baisse de la concentration en diGMPc et promeut la dispersion du biofilm (Petrova *et al.*, 2012b). Les cibles moléculaires de cette voie de signalisation ne sont pas connues mais celles-ci ne semblent pas jouer sur le contrôle positif de la mobilité bactérienne (Morgan *et al.*, 2006). Au contraire, la PDE RbdA, à domaine PAS, PAC, GGDEF et EAL, permet la dispersion des bactéries du biofilm en stimulant la mobilité bactérienne (An *et al.*, 2010). En effet, RbdA favorise la mobilité, notamment par swarming, en stimulant la synthèse de rhamnolipides, un biosurfactant (An *et al.*, 2010). De plus, cette PDE joue un rôle inhibiteur sur la formation de biofilms en réprimant l'expression des gènes *pel* codant les EPS Pel de *P. aeruginosa* (An *et al.*, 2010). Le diGMPc joue donc un rôle central dans ce processus de dispersion en contrôlant à la fois la formation de biofilm et la mobilité de la bactérie.

Enfin, le diGMPc peut contrôler la dispersion du biofilm en modulant la présence des structures d'adhérence de la bactérie comme chez *P. fluorescens* ou *P. putida* où la PDE RapA contrôle l'adhésion via la protéine LapA (cf. paragraphe « Production d'adhésines » p. 88) (Monds *et al.*, 2007, Newell *et al.*, 2009, Gjermansen *et al.*, 2010, Navarro *et al.*, 2011).

❖ *Le contrôle de la virulence bactérienne*

Le diGMPc est impliqué dans le contrôle de la virulence des bactéries pathogènes (Edmunds *et al.*, 2013, Hu *et al.*, 2013). Ces voies de signalisation contrôlent particulièrement la production des facteurs de virulence, tels que les systèmes de sécrétion et leurs substrats mais également la présence de structures d'adhérence (Tischler *et al.*, 2005, Moscoso *et al.*, 2011, Pérez-Mendoza *et al.*, 2011). Elles permettent aussi de moduler la formation d'agrégats bactériens, intra ou extracellulaires

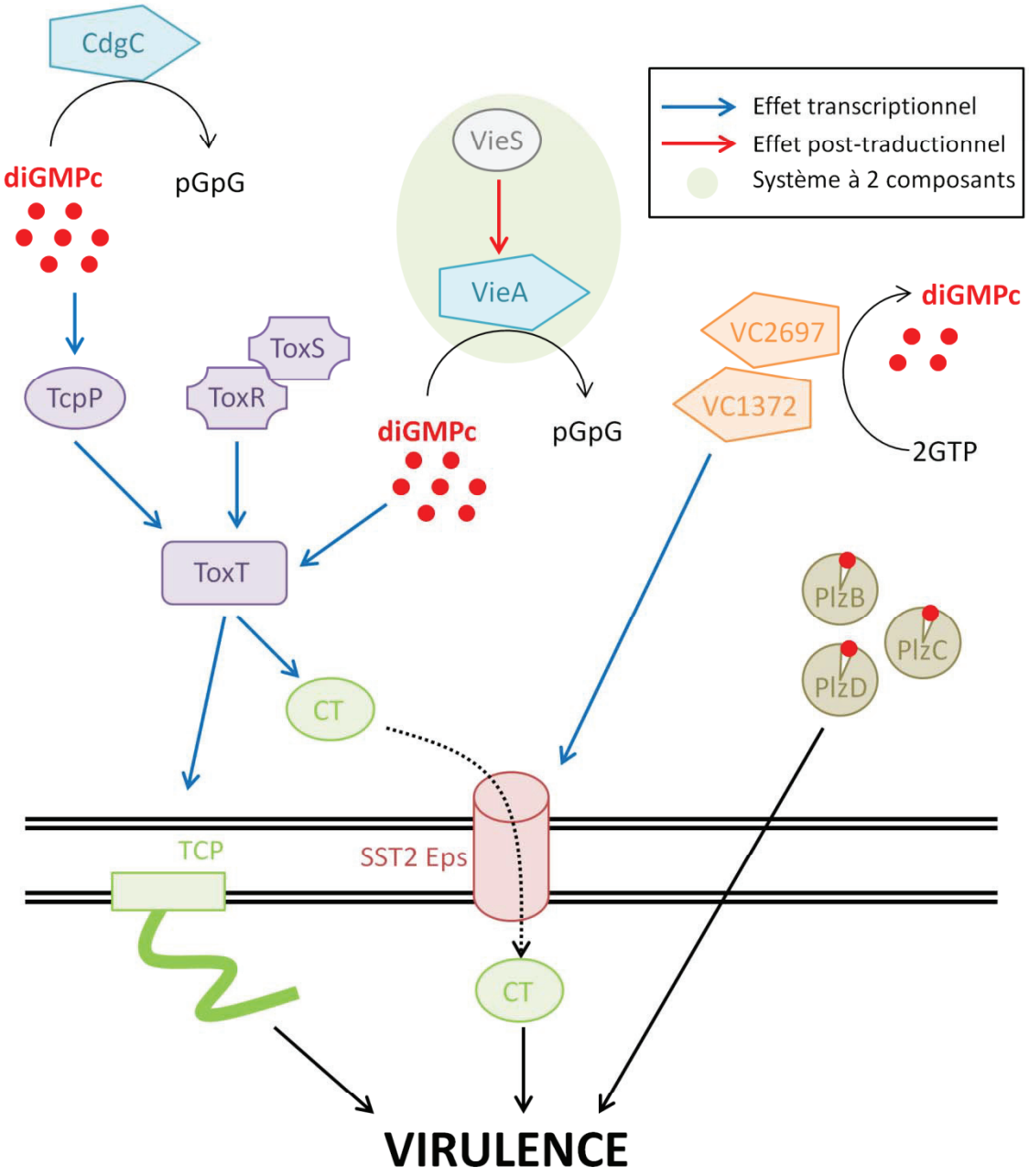


Figure 78 : Modèle de régulation par les voies de signalisation à diGMPc de l'expression de la toxine cholérique et de son système de sécrétion, le SST2 Eps, chez *V. cholerae*.

La PDE CdgC contrôle négativement via la dégradation de diGMPc l'expression du régulateur transcriptionnel TcpP. Ce régulateur, avec l'assistance du complexe ToxR/ToxS module l'expression du gène *toxT*. La production du régulateur transcriptionnel ToxT est également contrôlée, via le diGMPc, par la PDE VieA dont l'activation dépend de la kinase VieS. ToxT promeut l'expression de *ctxAB* codant la toxine cholérique (CT) et l'opéron *tcp* codant le pilus TCP (Toxin-coregulated pilus). Ce pilus participe à la virulence en stimulant l'adhésion de la bactérie aux cellules épithéliales intestinales. Les protéines à domaine GGDEF, VC2697 et VC1372, modulent via un mécanisme inconnu l'expression des deux opérons codant le SST2 Eps nécessaire à la sécrétion de la toxine cholérique. Les trois protéines à domaines PilZ, PlzB, PlzC et PlzD, participent également au contrôle de la virulence de *V. cholerae* via des mécanismes inconnus, peut-être en lien avec les trois voies de signalisation décrites ici.

(Kumagai *et al.*, 2011). Enfin, le diGMPc participe aux mécanismes de défenses des bactéries face à l'hôte, notamment en modulant la dormance ou la résistance aux dérivés réactifs de l'oxygène produits par les cellules-hôtes (Chua *et al.*, 2013, Hong *et al.*, 2013).

~ Contrôle de la production des facteurs de virulence

Parmi les facteurs de virulence présents chez les bactéries, on trouve les systèmes de sécrétion qui permettent soit la sécrétion de protéines dans l'environnement extracellulaire, soit l'injection de protéines directement dans une cellule-cible (Figure 77) (Tseng *et al.*, 2009). Les substrats exportés par ces systèmes peuvent être des enzymes, des adhésines ou des toxines. Les structures d'adhérence font aussi partie des facteurs de virulence car elles peuvent promouvoir l'adhésion de la bactérie à son hôte. Le diGMPc participe au contrôle de la production ou de la fonctionnalité de ces différents facteurs de virulence.

o *Contrôle de la production des systèmes de sécrétion*

Les voies de signalisation à diGMPc participent au contrôle de la sécrétion de facteurs de virulence en contrôlant la production de ces facteurs et/ou la synthèse ou la fonctionnalité des systèmes de sécrétion.

Chez le phytopathogène *Shewanella putrefaciens*, le diGMPc joue sur la virulence en contrôlant la sécrétion de l'adhésine MRP (Multi Repeat Adhesin) (ECA3266) qui permet adhérence à la plante-hôte (Pérez-Mendoza *et al.*, 2011). Elle est exportée par le système de sécrétion de type I (SST1) codé par les gènes adjacents à *eca3266* : *eca3267, eca3268* et *eca3269* (Pérez-Mendoza *et al.*, 2011). La DGC ECA3270 et la PDE ECA3271, codées par les gènes voisins à ceux du SST1, modulent positivement et négativement la sécrétion de MRP, respectivement (Pérez-Mendoza *et al.*, 2011). Ce contrôle ne semble pas affecter la production du SST1, mais pourrait contrôler la production de l'adhésine MRP ou la fonctionnalité du système comme semble le faire par ailleurs la protéine ECA3265 (Pérez-Mendoza *et al.*, 2011). En effet, l'absence de ECA3265 n'affecte pas la production de MRP, ni celle du SST1, mais impacterait la fonctionnalité de ce système de sécrétion au vu des variations inverses et simultanées des quantités de MRP sécrétées et intracellulaires (Pérez-Mendoza *et al.*, 2011).

Chez *Vibrio cholerae*, les voies de signalisation à diGMPc contrôlent à la fois la production de la toxine cholérique et celle de son système de sécrétion, le SST2 Eps (Figure 78) (Sandkvist *et al.*, 1997, Tischler *et al.*, 2005, Lim *et al.*, 2007, Zielke *et al.*, 2014). Ce SST2 est codé par deux opérons *epsAB* et *epsCDEFGHIJKLMN* dont la transcription est affectée par deux protéines à domaines GGDEF, VC1372 et VC2697 (Figure 78) (Sandkvist, 2001, Zielke *et al.*, 2014). La production de la toxine cholérique, codée par l'opéron *ctxAB*, est, elle, sous le contrôle de deux voies de signalisation à

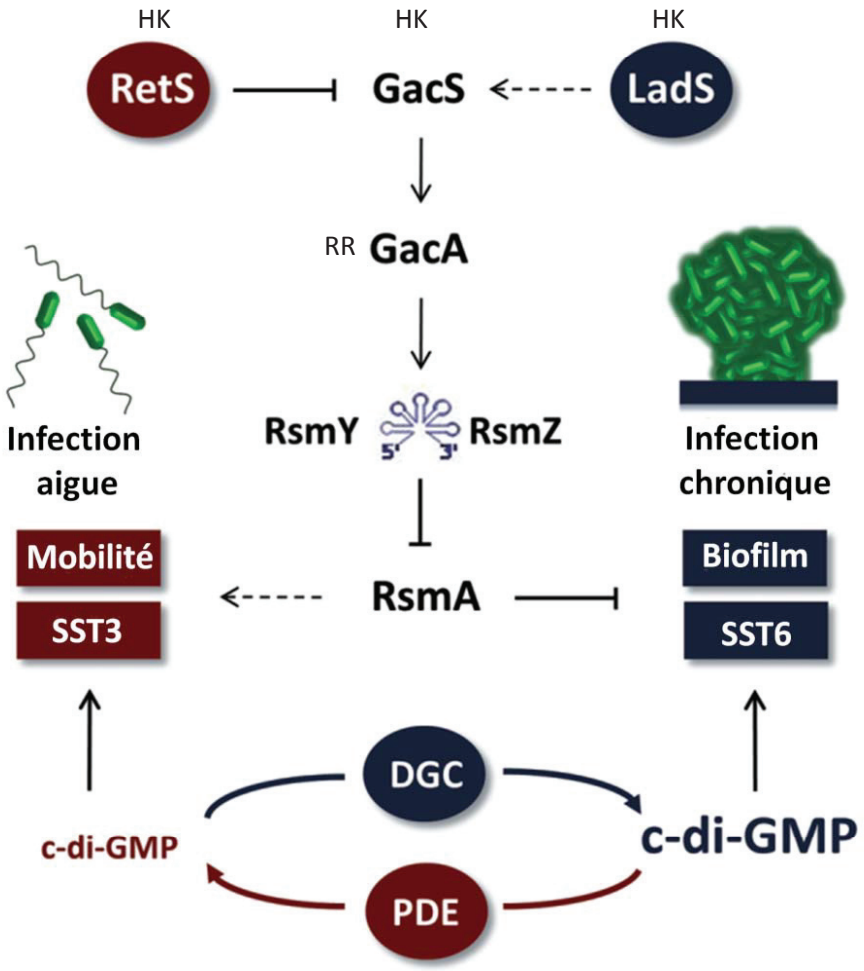


Figure 79 : Modèle de régulation de la transition entre les modes de vie planctonique et sessile de *P. aeruginosa* (d'après Moscoso *et al.,* 2011).

Les voies de signalisation impliquant le senseur kinase GacS ou le diGMPc agissent sur les mêmes cibles moléculaires pour contrôler inversement la mobilité de la bactérie, associée aux infections aigues, et la formation de biofilm, associée aux infections chroniques. La signalisation via les senseurs kinases RetS et LadS module négativement ou positivement la transduction du signal entre l'HK GacS et son RR GacA. GacA phosphorylée contrôle l'expression de deux ARNnc, RsmY et RsmZ, capables de séquestrer le répresseur post-transcriptionnel RsmA. Cette séquestration lève la répression de RsmA sur la traduction des gènes *pel* et *psl,* codant des EPS, et des gènes codant le SSTn Elle inhibe de manière indirecte l'expression des gènes codant le SST3 et les facteurs de mobilité. La régulation inverse est observée par modulation artificielle de la concentration intracellulaire en diGMPc.

diGMPc (Figure 78) (Tischler *et al.*, 2005, Lim *et al.*, 2007). L'une de ces voies implique la PDE VieA produite lorsque la bactérie est au contact de ces cellules cibles, les cellules épithéliales intestinales (Tamayo *et al.*, 2005, Tischler *et al.*, 2005, Dey *et al.*, 2013). VieA contrôle transcriptionnellement la production du régulateur ToxT, nécessaire à la transcription de *ctxAB* (Figure 78) (Champion *et al.*, 1997, Tischler *et al.*, 2005). L'activation de VieA pourrait être déclenchée par la phosphorylation de son domaine REC par la kinase VieS, codée par le gène en amont de *vieA* (Figure 78) (Martinez-Wilson *et al.*, 2008). La seconde voie de signalisation, qui implique la PDE CdgC, agit plus en amont en contrôlant l'expression du gène *tcpP*, codant un régulateur transcriptionnel activateur de la transcription de *toxT* (Figure 78) (Häse *et al.*, 1998, Lim *et al.*, 2007). Enfin, il semblerait que les protéines à domaine PilZ, PlzB, PlzC et PlzD, participent également au contrôle de la virulence de *V. cholerae* (Figure 78) (Pratt *et al.*, 2007). Les mécanismes dans lesquelles elles interviennent restent à élucider, notamment leur implication dans les trois voies décrites ci-dessus (Pratt *et al.*, 2007).

Chez *Pseudomonas aeruginosa*, les voies impliquant le diGMPc contrôlent inversement la transition entre les modes de vie planctonique et sessile ainsi que la production des SST3 et SST6 (Figure 79) (Moscoso *et al.*, 2011). Ces deux systèmes de sécrétion participent à la virulence de la bactérie : le SST3 est exprimé par des bactéries mobiles, responsables d'infections aigues, alors que le SST6 est présent chez les bactéries vivant sous forme de biofilms, responsables d'infections chroniques. La transition entre ces deux états est contrôlée par les kinases RetS et LadS agissant négativement ou positivement sur une troisième kinase, GacS (Goodman *et al.*, 2004). Le senseur kinase RetS interagit avec GacS, empêchant ainsi son autophosphorylation et la phosphorylation de son RR GacA (Figure 79) (Brencic *et al.*, 2009b). GacA phosphorylée contrôle l'expression de deux ARNnc, RsmY et RsmZ, nécessaires à la séquestration du répresseur post-transcriptionnel RsmA (Figure 79) (Brencic *et al.*, 2009b). RsmA est impliquée dans l'inhibition de la traduction des gènes *pel* et *psl*, codant des EPS de la matrice extracellulaire des biofilms, et des gènes codant le SST6 (Figure 79) (Brencic *et al.*, 2009a, Irie *et al.*, 2010). Par ailleurs, RsmA participerait indirectement à la stimulation de l'expression des gènes codant le SST3 (Figure 79) (Brencic *et al.*, 2009a). Le diGMPc intervient dans ce mécanisme de transition (Moscoso *et al.*, 2011). En effet, la modulation artificielle de la concentration intracellulaire en diGMPc par la surexpression d'une DGC ou d'une PDE joue sur cette transition entre SST3 et SST6 (Figure 79) (Moscoso *et al.*, 2011). La DGC WspR et la protéine à domaine GGDEF PA0290 seraient les enzymes impliquées spécifiquement dans cette voie de contrôle (Moscoso *et al.*, 2011). Le mécanisme par lequel ces protéines interviennent n'est pas clairement établi mais semble requérir les ARNnc RsmY et RsmZ (Moscoso *et al.*, 2011).

D'autres exemples de contrôle de la production des systèmes de sécrétion et de leurs substrats existent. L'expression des gènes codant les SST3 de *Dickeya dadantii* (Yi *et al.*, 2010), d'*E.*

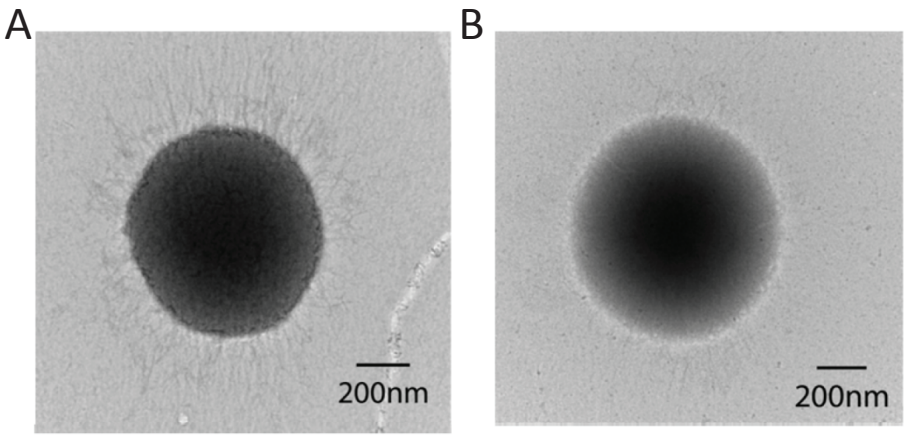


Figure 80 : Conséquence de l'absence de la DGC PGN_1932 sur la production des longs fimbriae chez *Porphyromonas gingivalis* (Chaudhuri *et al.,* 2014).
Les souches de *P. gingivalis* sauvage (A) et *Δpgn1932* (B) ont été préparées par marquage avec du molybdate d'ammonium. Les fimbriae sont observées par microscopie électronique à transmission.

coli entérohémorragique O157:H7 (Hu *et al.*, 2013), d'*Erwinia amylovora* (Edmunds *et al.*, 2013) et de *Xanthomonas oryzae* (Yang *et al.*, 2014) sont aussi soumis à une régulation par le diGMPc, de même que l'expression des toxines TcdA et TcdB de *Clostridium difficile* (McKee *et al.*, 2013).

- *Régulation des structures d'adhérence*

Différents exemples illustrent l'impact sur la virulence du contrôle exercé par le diGMPc sur la production des structures d'adhérence.

Ainsi, chez le pathogène oral *Porphyromonas gingivalis*, les fimbriae permettent à la bactérie d'adhérer à la surface de la dent, aux cellules épithéliales ainsi qu'aux fibroblastes parodontaux (Lamont *et al.*, 1998, Wang *et al.*, 2007, Chaudhuri *et al.*, 2014). Leur production est sous le contrôle d'une voie de signalisation à diGMPc impliquant la DGC PGN_1932 (Chaudhuri *et al.*, 2014). En effet, la délétion de *pgn1932* induit une diminution de la virulence de *P. gingivalis*, due à un défaut d'adhérence et de colonisation de ces tissus-cibles (Chaudhuri *et al.*, 2014). Ce défaut d'adhésion résulte de la diminution de la production des fimbriae par la souche *Δpgn1932* (Figure 80), elle-même causée par une réduction de l'expression du gène *fimA* codant le composant majeur de ces fimbriae (Chaudhuri *et al.*, 2014). Par ailleurs, les fimbriae permettent une adhésion spécifique d'un type cellulaire (Chaudhuri *et al.*, 2014). En effet, les fibroblastes parodontaux sont colonisés plus efficacement que les cellules épithéliales par la souche sauvage (Chaudhuri *et al.*, 2014). Cependant, cette colonisation est identique pour la souche *Δpgn1932*, suggérant que les fimbriae favorisent l'adhésion aux fibroblastes parodontaux plutôt qu'aux cellules épithéliales (Chaudhuri *et al.*, 2014).

D'autres structures d'adhérence, nécessaires à la virulence de bactéries pathogènes, sont contrôlées par le diGMPc, notamment des fimbriae Cup (Chaperon Usher Pathway) et les pili de type IV de *P. aeruginosa* (Kazmierczak *et al.*, 2006, Mikkelsen *et al.*, 2009).

~ Contrôle de la formation des agrégats bactériens extra- et intracellulaires

Certaines bactéries, lorsqu'elles sont au contact de leur cellule-hôte, forment des structures intracellulaires, similaires à des structures de type biofilm, appelées communautés intracellulaires bactériennes (Valle *et al.*, 2013). Ces structures sont formées notamment par des souches d'*E. coli* uropathogène (UPEC) (Berry *et al.*, 2009), de *K. pneumoniae* (Rosen *et al.*, 2007), de *P. aeruginosa* (Garcia-Medina *et al.*, 2005), de *Staphylococcus aureus* (Clement *et al.*, 2005) et d'*Ehrlichia chaffeensis* (Rikihisa, 1991, Zhang *et al.*, 2007). La formation de ces communautés peut également être contrôlée par les voies de signalisation à diGMPc, comme c'est le cas chez *E. chaffeensis* (Kumagai *et al.*, 2010).

E. chaffeensis est une α-protéobactérie intracellulaire obligatoire capable d'infecter des monocytes et macrophages humains (Rikihisa, 1991). Dans ses cellules-hôtes, cette bactérie forme

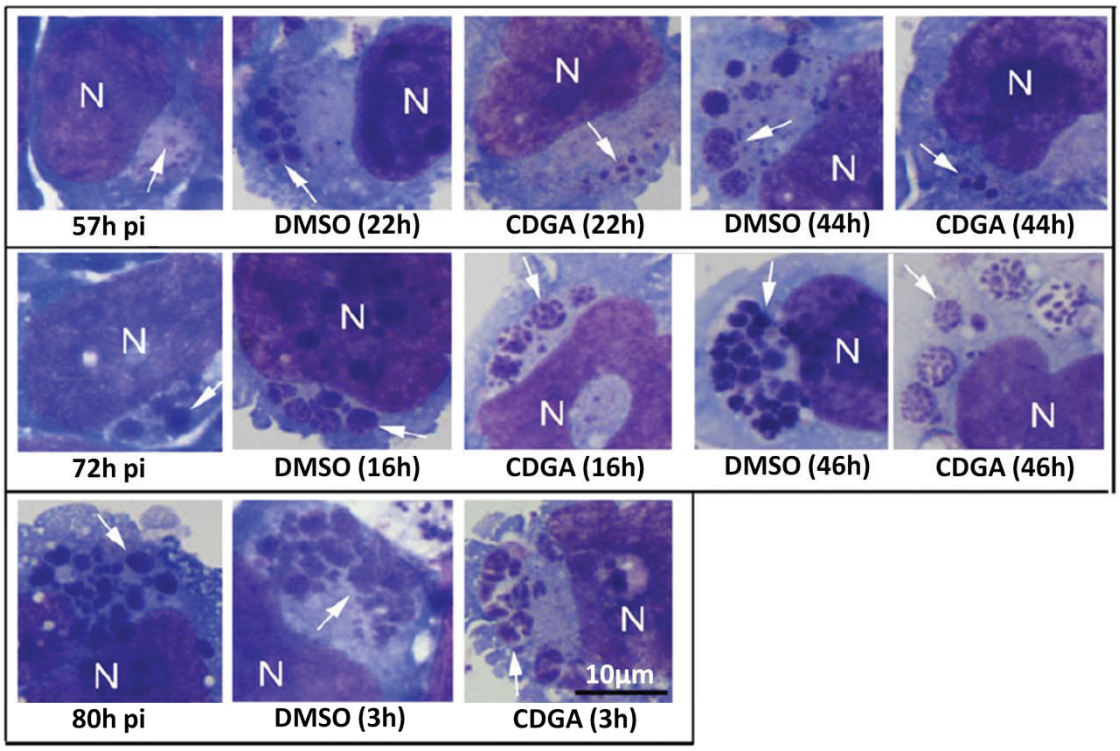


Figure 81 : Structure de la morula formée par *Ehrlichia chaffeensis* en présence ou non du compétiteur du diGMPc CDGA (d'après Kumagai *et al.*, 2011).

Des macrophages THP-1 ont été infectés avec *E. chaffeensis*. Les observations de la structure de la morula ont été réalisées à 57h post-infection (pi) (début de la phase exponentielle de croissance intracellulaire), à 72h pi (milieu de la phase exponentielle) et 80h pi (fin de la phase exponentielle). Les infections ont été traitées avec du DMSO (Dimethyl sulfoxide) ou avec le compétiteur du diGMPc (CDGA, 2-*O*-di(*tert*-butyldimethysilyl)-diGMPc) sur une durée de 3h à 46h (indiquées entre parenthèse sur la figure pour chaque condition). Les infections ont ensuite été marquées avec le kit Diff-Quick : le noyau (N) apparait en violet, le cytoplasme en bleu clair et les bactéries formant la morula en bleu foncé (indiquées par les flèches blanches).

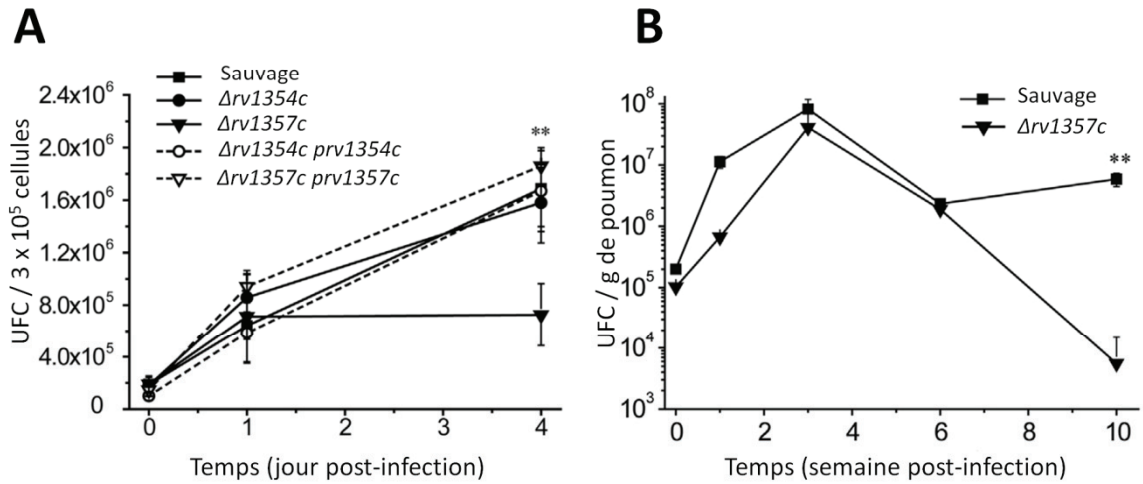


Figure 82 : Implication de la PDE Rv1357c dans la virulence de *Mycobacterium tuberculosis* (d'après Hong *et al.*, 2013).

(A) Réplication intracellulaire en macrophages humains THP-1 à MOI 1 (Multiplicity of infection) de la souche sauvage, des deux souches mutantes, délétées des gènes codant la DGC Rv1354 et la PDE Rv1357, et des deux souches complémentées. Les résultats sont exprimés en nombre d'UFC (unité formant colonie) comptabilisées pour $3x10^5$ macrophages. (B) Infection d'un modèle murin avec les souches sauvages et *Δrv1357c*. Les résultats présentés sont exprimés en nombre d'UFC par gramme de poumons.

une structure appelée morula dont les caractéristiques rappellent celles des biofilms : les bactéries, en cours de multiplication, s'agrègent les unes aux autres et sont agglomérées dans une matrice filamenteuse (Rikihisa, 1991, Popov *et al.*, 2000, Zhang *et al.*, 2007). Après la multiplication des bactéries, la morula se disperse, et les bactéries, virulentes, sont libérées dans l'environnement extracellulaire (Zhang *et al.*, 2007). Le diGMPc a tout d'abord été impliqué dans le contrôle de la virulence d'*E. chaffeensis* grâce à l'utilisation d'un analogue compétiteur, le 2-*O*-di(*tert*-butyldimethysilyl)-diGMPc ou CDGA (Kumagai *et al.*, 2010). Une analyse approfondie de l'effet de ce compétiteur sur le cycle infectieux de cette bactérie a révélé que le CDGA modifie la structure de la morula (Figure 81) et sa dispersion, induisant la libération de bactéries non infectieuses (Kumagai *et al.*, 2011). En effet, dans les macrophages infectés traités avec le compétiteur, les morulae sont moins compactes et moins nombreuses que dans les macrophages infectés non traités (Figure 81) (Kumagai *et al.*, 2011). Le CDGA induit également une dispersion de la morula via un mécanisme dépendant de sérine protéases (Kumagai *et al.*, 2011). Les voies de signalisation à diGMPc, altérées par la présence de cet inhibiteur, contrôlent donc positivement le développement de la morula et négativement sa dispersion (Kumagai *et al.*, 2011).

~ Contrôle des défenses face à l'hôte

Les bactéries, en plus de produire des enzymes ou toxines dirigées contre leurs cellules-cibles, peuvent mettre en place des stratégies pour contrer les défenses immunitaires de leurs hôtes. Certaines, comme *Mycobacterium tuberculosis*, entrent dans un état de dormance lorsque les conditions ne sont pas favorables à leur développement, notamment face à la réponse immunitaire de l'hôte (Boon *et al.*, 2012). D'autres, comme *K. pneumoniae*, ont développé des stratégies différentes telles que la résistance au stress oxydatif.

Chez *Mycobacterium tuberculosis*, les cellules dormantes sont caractérisées par une forte réduction du métabolisme, rendant ainsi *M. tuberculosis* moins sensible aux traitements antibiotiques (Wayne *et al.*, 1996, Ojha *et al.*, 2008, Hussain *et al.*, 2009). Cette dormance est induite en conditions d'hypoxie (Taneja *et al.*, 2010), en présence de NO (Voskuil *et al.*, 2003) ou de monoxyde de carbone (CO) (Kumar *et al.*, 2008a) ou pendant l'infection *in vitro* de macrophages (Schnappinger *et al.*, 2003) et *in vivo* de souris (Karakousis *et al.*, 2004). Ce processus est contrôlé par le système DosR/DosS/DosT qui contrôle l'expression d'une cinquantaine de gènes majoritairement impliqués dans le métabolisme cellulaire (Sherman *et al.*, 2001). Les voies de signalisation à diGMPc permettent la régulation de la dormance via la DGC Rv1354c et la PDE Rv1357c (Gupta *et al.*, 2010, Hong *et al.*, 2013). En effet, les souches *Δrv1354c* et *Δrv1357c* sont affectées de manière positive et négative dans leur capacité de survie par dormance en conditions anaérobies ainsi que dans la récupération après la dormance (Hong *et al.*, 2013). Le diGMPc participerait ainsi négativement au

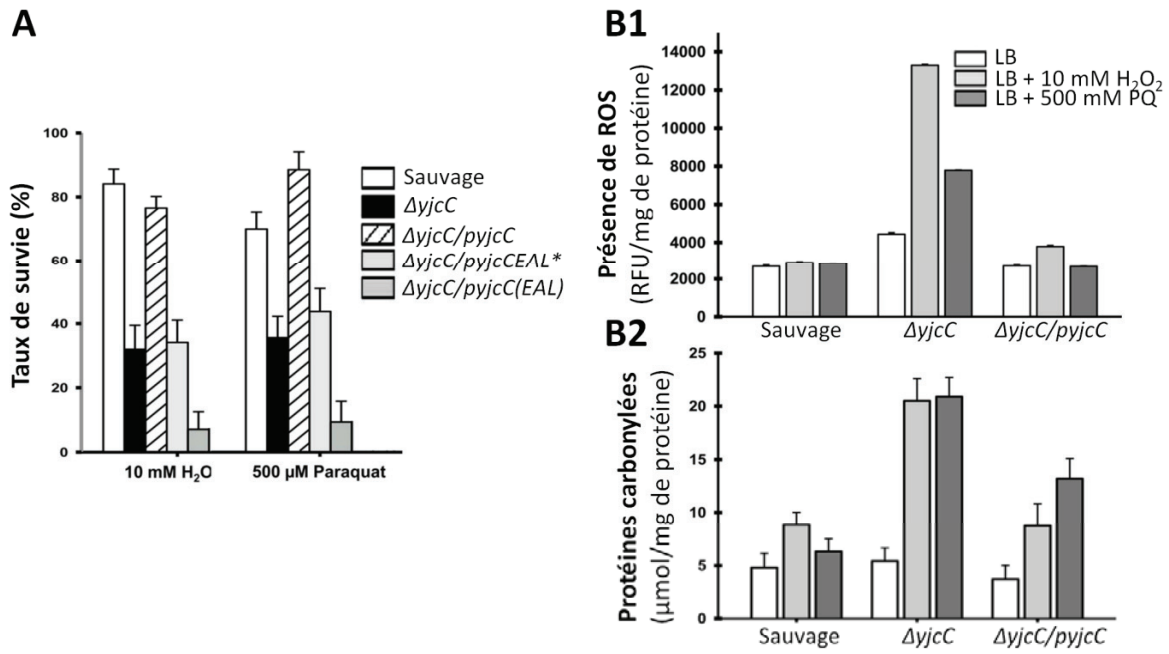


Figure 83 : Implication de la PDE YjcC dans la résistance aux ROS de *Klebsiella pneumoniae* (d'après Huang *et al.,* 2013).

(A) Survie de la souche sauvage, du mutant *ΔyjcC*, de la souche complémentée *ΔyjcC/pyjcC,* du mutant catalytique *ΔyjcC/pyjcCEAL*,* de la souche complémentée avec uniquement le domaine EAL *ΔyjcC/pyjcC(EAL).* 500mM de paraquat (PQ), un générateur de ROS, ou 10mM de H_2O_2 ont été ajoutés dans des suspensions bactériennes à DO_{600nm}≈0.7 pendant 35 min. La survie des souches a été quantifiée par numération des bactéries viables après traitement. (B) Les souches sauvage, mutante et complémentée ont été exposées à 500 mM de PQ ou à 10 mM de H_2O_2 pendant 40 min. Le contenu en ROS a été quantifié grâce à l'utilisation d'un marqueur fluorescent, la 2',7'-dihydro-dichlorofluoresceine diacetate (B1). La concentration en protéines portant des groupements carbonylés a été également déterminée après précipitation des protéines (B2).

contrôle de la dormance de *M. tuberculosis* (Hong *et al.*, 2013). Chez la souche *Δrv1357c,* cette capacité diminuée à entrer en dormance se traduit par un défaut de virulence *in vitro* et *in vivo* (Figure 82) (Hong *et al.*, 2013).

Klebsiella pneumoniae est un pathogène opportuniste responsable de pneumonies sévères. Cette bactérie, comme d'autres pathogènes, doit faire face, au cours de l'infection, à la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS, reactive oxygen species) par les cellules immunitaires. Ces molécules endommagent l'ADN, l'ARN ainsi que les protéines des bactéries conduisant à la mort de celles-ci. Les voies de signalisation à diGMPc jouent un rôle dans la résistance aux ROS. Le gène codant la PDE YjcC est exprimé au cours de l'infection de souris BALB/c mais aussi en présence de ROS, suggérant qu'au cours de l'infection cette protéine est nécessaire à la résistance au stress oxydatif (Lai *et al.*, 2001). L'absence de cette PDE provoque, en effet, une sensibilité accrue de *K. pneumoniae* à la présence de ROS tels que le peroxyde d'hydrogène ou les radicaux superoxydes (Figure 83A) (Huang *et al.*, 2013). La souche Δ*yjcC* parait bloquée dans un état de stress oxydatif : la quantité de ROS est particulièrement élevée et de nombreuses molécules sont oxydées et donc endommagées (Figure 83B) (Huang *et al.*, 2013). La PDE YjcC participerait donc à l'élimination des ROS et/ou des molécules qu'ils endommagent (Huang *et al.*, 2013). Les activités catalases ou superoxyde dismutases, nécessaires pour l'élimination des ROS, ne sont pas altérées dans la souche Δ*yjcC* (Huang *et al.*, 2013). Une analyse transcriptomique réalisée sur une souche surproduisant YjcC a révélé que l'expression de gènes codant différentes protéines chaperonnes est fortement augmentée, suggérant plutôt que YjcC est impliquée dans la réponse anti-stress oxydatif (Huang *et al.*, 2013). L'absence de résistance à la présence de ROS entraine une altération de la virulence puisque la souche Δ*yjcC* est altérée pour l'infection d'un modèle murin (Huang *et al.*, 2013).

D'autres mécanismes de résistance aux défenses de l'hôte sont contrôlés par le diGMPc. C'est notamment le cas chez *P. aeruginosa* où celui-ci module la résistance aux antibiotiques peptidiques, comme la colistine, dont le mode d'action est similaire à celui des peptides antimicrobiens cationiques.

2.2.5 Fonctionnement des voies de signalisation à diGMPc

Du fait de la multiplicité de protéines permettant la synthèse et la dégradation du diGMPc, de la diversité de molécules capables de fixer ce messager secondaire et de la variété de fonctions cellulaires que le diGMPc peut contrôler, le fonctionnement du réseau de voies de signalisation à diGMPc est particulièrement complexe. Actuellement, deux hypothèses sont envisagées pour le fonctionnement de ce réseau. La première repose sur la convergence de ces voies de signalisation pour contrôler très finement la concentration intracellulaire globale en diGMPc, concentration

perçue ensuite par les différents effecteurs du diGMPc qui y répondront. La seconde hypothèse, au contraire, propose un fonctionnement via des concentrations en diGMPc locales contrôlées par des voies de signalisation extrêmement spécifiques. Ces deux hypothèses de fonctionnement ne sont pas exclusives et une même bactérie pourrait utiliser à la fois des voies de signalisation modulant la concentration globale ou d'autres en utilisant une concentration locale en diGMPc.

2.2.5.1 Fonctionnement via un contrôle de la concentration intracellulaire globale en diGMPc

- *L'impact de la surproduction de DGC et PDE sur les processus cellulaires contrôlés par le diGMPc*

Le fonctionnement des voies de signalisation à diGMPc via le contrôle de la concentration intracellulaire globale en diGMPc a été envisagé du fait que lorsque la concentration intracellulaire en diGMPc est modifiée artificiellement par la surproduction d'une DGC ou d'une PDE, alors les fonctions contrôlées par le diGMPc sont affectées. En effet, dans de nombreuses espèces bactériennes, la surproduction de DGC, conduisant vraisemblablement à une hausse de la concentration en diGMPc intracellulaire, impacte négativement la capacité de la bactérie à se mouvoir et positivement sa propriété à former des biofilms (Simm *et al.*, 2004, Tischler *et al.*, 2004, Kozlova *et al.*, 2011, Tan *et al.*, 2014). La surproduction de PDE a l'effet inverse sur ces deux processus cellulaires (Simm *et al.*, 2004, Tischler *et al.*, 2004, Tan *et al.*, 2014). Ces études sont à l'origine de la notion, largement admise dans la communauté scientifique, que le diGMPc stimule la formation de biofilm et inhibe la mobilité bactérienne. Les variations de concentration en diGMPc influencent aussi la virulence des bactéries pathogènes (Levi *et al.*, 2011, Tan *et al.*, 2014). Toutefois, il est plus difficile d'établir une corrélation entre cette concentration en diGMPc et l'impact sur la virulence.

- *La rapidité de la diffusion du diGMPc dans le cytoplasme de la bactérie*

Cette hypothèse de fonctionnement via la concentration globale en diGMPc est aussi supportée par la rapidité de la diffusion des petites molécules (Mills *et al.*, 2011). En effet, la vitesse de diffusion de petites molécules, comme l'AMPc, est comprise entre 270 et 780 $\mu m^2/s$ (Zaccolo *et al.*, 2006). Or, la taille d'une bactérie, comme *E. coli* par exemple, est estimée à $2\mu m^3$ (Schulz *et al.*, 2001). Selon ces données, l'équilibration de la concentration intracellulaire en diGMPc devrait se faire en seulement quelques millisecondes (Mills *et al.*, 2011).

Les cellules eucaryotes ont développé des systèmes permettant la restriction de la diffusion de l'AMPc dans leurs cytoplasmes (Zaccolo *et al.*, 2006). Ces systèmes permettent de compartimenter la concentration intracellulaire en AMPc au sein de la même cellule (Zaccolo *et al.*, 2006). Cependant, la taille de ces compartiments, estimée grâce à une technique basée sur le FRET

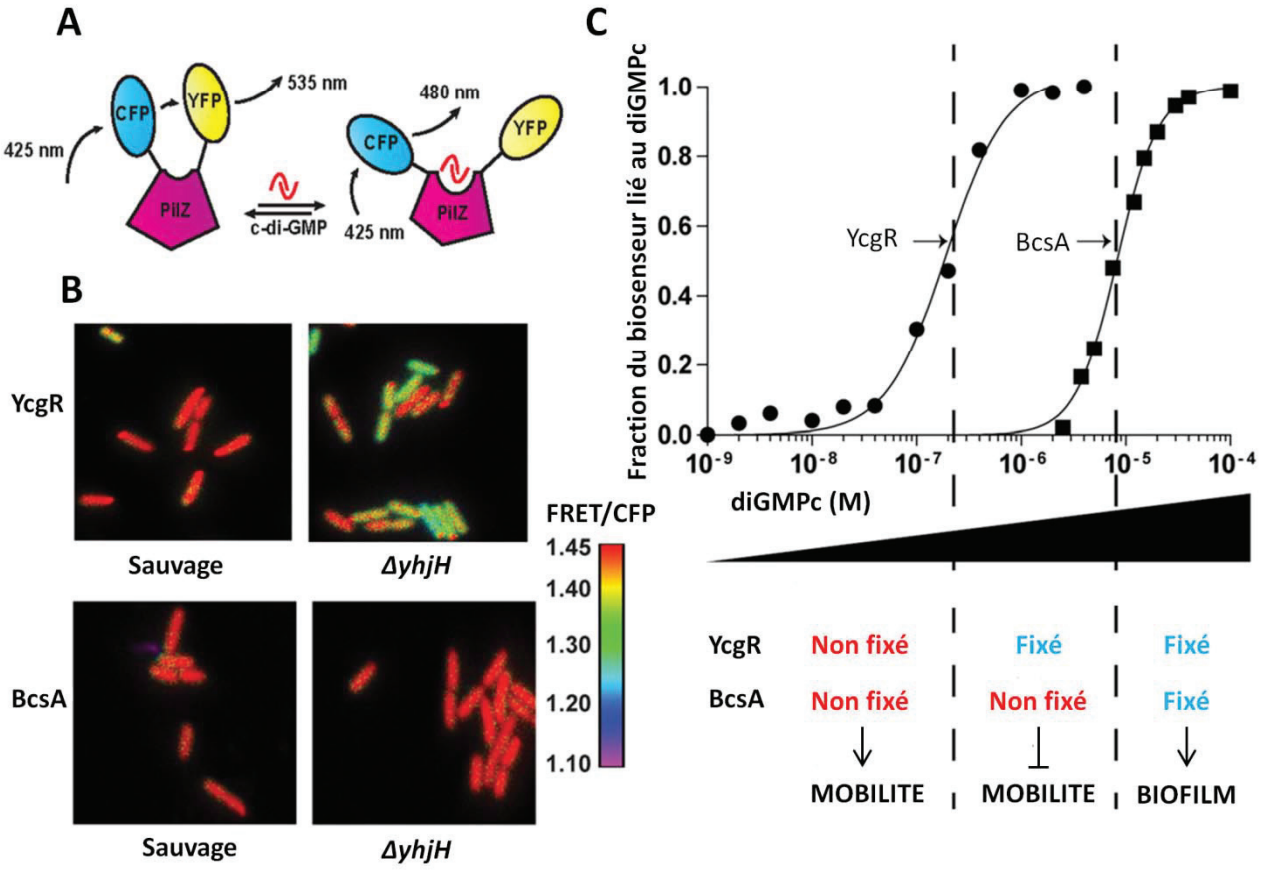


Figure 84 : Différences d'affinité vis-à-vis du diGMPc des protéines à domaine PilZ YcgR et BcsA de *S. Typhimurium* (d'après Pultz *et al.,* 2012).

(A) Un système de biosenseur a été créé pour étudier l'affinité des protéines à domaine PilZ. Il est composé de la protéine à domaine PilZ à tester fusionnée à chaque extrémité à un fluorophore : la YFP et la CFP. Ces protéines fusions présentent un profil de FRET caractéristique. Dans cet exemple, les deux fluorophores effectuent un transfert d'énergie en absence de diGMPc : l'excitation de la CFP (425nm) provoque l'excitation et l'émission de fluorescence jaune par la YFP (535nm). En présence de diGMPc, les deux fluorophores sont trop éloignés: l'excitation de la CFP (425nm) induit l'émission de la fluorescence bleue (480nm).

(B) Observation par microscopie confocale de *S. Typhimurium* sauvage et *ΔyhjH* (PDE) exprimant les biosenseurs composés de YcgR (en haut) et BcsA (en bas). Les couleurs représentent les ratio de fluorescence FRET/CFP (émission à 527nm / émission à 480nm).

(C) Les constantes de dissociation des biosenseurs composés de YcgR et BcsA ont été mesurées par FRET et correspondent à 191nM et 8240nM, respectivement. Elles participent au contrôle de la transition entre les modes de vie planctoniques et sessiles. Lorsque la concentration en diGMPc est faible, aucune des deux protéines ne fixe le diGMPc. La bactérie est alors mobile et ne produit pas de cellulose. Quand la concentration en diGMPc augmente (activation de DGC ou inactivation de PDE) et dépasse le K_d de YcgR, alors YcgR fixe le diGMPc et inhibe la mobilité de la bactérie. Quand la concentration en diGMPc augmente encore et dépasse le K_d de BcsA, alors BcsA fixe le diGMPc, activant la production de la cellulose.

(Fluorescence Resonance Energy Transfer), est de l'ordre de plusieurs micromètres, excédant donc la taille d'une bactérie (Zaccolo *et al.*, 2006).

❖ *Les différences d'affinité des effecteurs pour le diGMPc*

Du fait de la diffusion probablement très rapide du diGMPc au sein de la cellule, l'activation spécifique de certaines voies de signalisation par la concentration globale en diGMPc pourrait résulter de différences d'affinité des effecteurs pour le diGMPc, comme le suggère les travaux de Pultz *et al*. (Pultz *et al.*, 2012). En effet, cette étude, grâce à l'utilisation d'une technique de FRET (Figure 84A), met en évidence la différence d'affinité qui existe entre deux effecteurs à domaine PilZ de *Salmonella Typhimurium*, YcgR et BcsA (Pultz *et al.*, 2012). Cette technique consiste à fusionner les protéines YcgR et BcsA à deux fluorophores, la CFP (Cyan Fluorescent Protein) et la YFP (Yellow Fluorescent Protein) (Figure 84A) (Pultz *et al.*, 2012). Ces protéines fusions, ou biosenseurs, présentent des profils de FRET caractéristiques : en absence de diGMPc, les deux fluorophores sont proches et effectuent un transfert d'énergie lorsque la CFP est excitée, provoquant l'excitation et l'émission de fluorescence par la YFP (Figure 84A) (Pultz *et al.*, 2012). La présence de diGMPc, fixé sur la protéine à domaine PilZ, change la conformation de la protéine fusion, éloignant les deux fluorophores et empêchant ainsi le FRET (Figure 84A) (Pultz *et al.*, 2012). L'utilisation de ces biosenseurs dans une souche dont la concentration intracellulaire en diGMPc a été augmentée artificiellement par la délétion de la PDE YhjH, met en évidence la différence d'affinité entre YcgR et BcsA (Figure 84B) (Pultz *et al.*, 2012). En effet, le biosenseur constitué de YcgR perd sa capacité à réaliser le FRET du fait de sa liaison avec le diGMPc, ce qui n'est pas le cas du biosenseur construit à partir de BcsA (Figure 84B) (Pultz *et al.*, 2012). Dans les mêmes conditions, YcgR fixe donc le diGMPc alors que BcsA ne le peut pas (Pultz *et al.*, 2012). Ces données ont été confirmées par la détermination de la constante de dissociation (K_d) de ces deux protéines fusions pour le diGMPc (Figure 84C) (Pultz *et al.*, 2012). Le K_d du biosenseur de YcgR (191 nM) est 43 fois plus faible que celui du biosenseur de BcsA (8240 nM), révélant une affinité plus forte de YcgR pour le diGMPc (Figure 84C) (Pultz *et al.*, 2012). Ces différences d'affinités permettent donc un contrôle spécifique de l'inhibition de la mobilité par YcgR et l'activation de la formation de biofilms par BcsA à partir de la concentration intracellulaire globale en diGMPc (Figure 84C) (Pultz *et al.*, 2012).

❖ *L'indépendance de certains effecteurs à des DGC ou PDE spécifiques*

Enfin, le fonctionnement des voies de signalisation via la modulation de la concentration intracellulaire globale du diGMPc est supportée par le fait que les activités de certains effecteurs du diGMPc ne dépendent pas d'une DGC ou PDE spécifique. C'est notamment le cas de l'effecteur VpsT de *Vibrio cholerae* (Shikuma *et al.*, 2012). VpsT est un régulateur transcriptionnel capable de lier le diGMPc (Krasteva *et al.*, 2010). Son activité d'activateur transcriptionnel est stimulée par la fixation

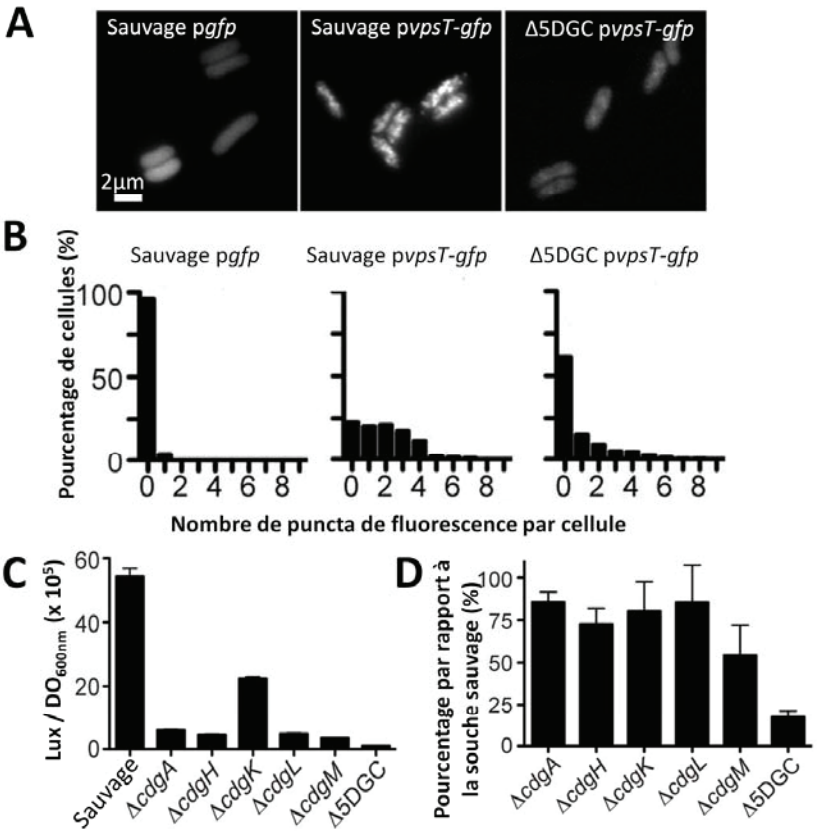


Figure 85 : Indépendance de l'activité de VpsT de *V. cholerae* vis-à-vis d'une DGC spécifique (d'après Shikuma *et al.*, 2012).

(A) Observation par microscopie confocale de la localisation cellulaire de la GFP seule (à gauche) ou de la protéine fusion de VpsT-GFP dans la souche sauvage (au milieu) ou dans la souche délétée de 5 DGC (à droite). La localisation de VpsT sous forme de puncta cytoplasmiques, dépendante de la présence de diGMPc, n'est altérée qu'après délétion de 5 DGC différentes.

(B) Quantification de la localisation de VpsT. Le nombre de puncta par cellule a été déterminé à partir des clichés de microscopie confocale pour les trois souches et pour un nombre total de 150 bactéries par condition.

(C) Expression de la fusion transcriptionnelle du promoteur de *vpsL* avec le gène reporter *lux*, codant la luciférase. Le gène *vpsL* est l'un des gènes cibles de l'effecteur VpsT. L'expression de la fusion a été mesurée dans la souche sauvage, dans les souches délétées pour une DGC (CdgA, CdgH, CdgK, CdgL et CdgM) ou la souche invalidée simultanément pour ces 5 DGC. L'expression est indiquée en unité de luminescence par min et par ml, corrigée en fonction de la DO_{600nm}. (D) Quantification de la concentration en diGMPc dans les souches invalidées pour chacune des DGC et la souche délétée des 5 DGC. Les données sont exprimées en pourcentage par rapport à la concentration intracellulaire de la souche sauvage. Le dosage a été réalisé par LC-MS (liquid chromatography mass spectrometry).

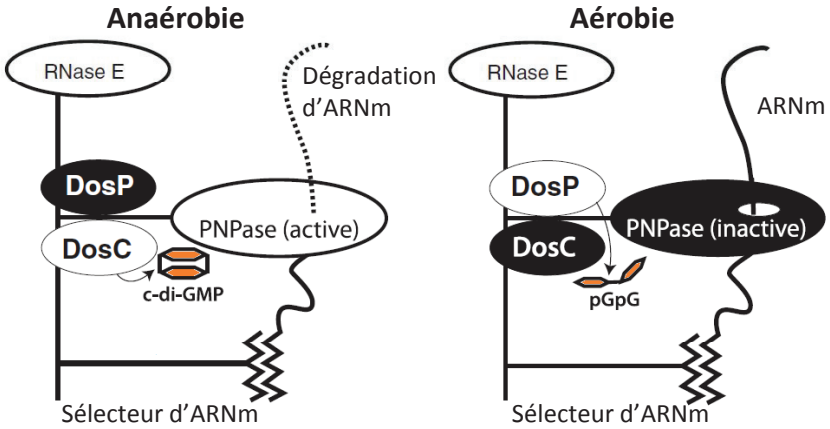


Figure 86 : Modèle de fonctionnement du complexe ribonucléoprotéique contenant DosC et DosP chez *E. coli* (d'après Tuckerman *et al.*, 2011).

DosP et DosC sont capables de détecter la présence d'oxygène via leurs domaines senseurs. En conditions anaérobies, la DGC DosC est active et catalyse la formation de diGMPc. Celui-ci peut être fixé par la PNPase (polynucleotide phosphorylase) du complexe, induisant une activation de l'activité de dégradation de l'ARNm par cette protéine. En conditions aérobies, la PDE DosP est activée et elle hydrolyse le diGMPc, induisant la désactivation de la PNPase et inhibant par conséquent la dégradation de l'ARNm. Les ARNm dont la préservation et la dégradation dépendent de la présence d'oxygène sont sélectionnés spécifiquement. Cette sélection se fait probablement par le biais d'un ARNnc ou d'une protéine liant l'ADN (sélecteur d'ARNm).

du diGMPc (Krasteva *et al.*, 2010). Son activation s'accompagne d'une localisation cytoplasmique, sous forme de puncta, probablement due à sa liaison sur les promoteurs de ses gènes cibles (Figure 85A et B) (Shikuma *et al.*, 2012). Sa transcription est elle-même contrôlée par plusieurs facteurs dont l'effecteur fixant le diGMPc VpsR et la protéine à domaine GGDEF et EAL CdgC (Beyhan *et al.*, 2007, Lim *et al.*, 2007). Cependant, l'activité de VpsT n'est pas reliée à une DGC spécifique (Shikuma *et al.*, 2012). En effet, cette activité est altérée par l'absence de chacune des DGC et, d'autant plus, par l'absence simultanée des 5 DGC (CdgA, CdgH, CdgK, CdgL et CdgM) (Figure 85A, B et C) (Shikuma *et al.*, 2012). Ces effets ne sont pas liés à de fortes réductions de la concentration en diGMPc sauf lorsque les 5 délétions sont cumulées (Figure 85D) (Shikuma *et al.*, 2012). Comme chaque DGC a un effet sur VpsT, cet effecteur répond donc vraisemblablement à la concentration intracellulaire globale en diGMPc (Shikuma *et al.*, 2012).

2.2.5.2 Fonctionnement via le contrôle de concentrations intracellulaires locales en diGMPc

❖ *L'existence de protéines à double activité enzymatique*

Le fonctionnement des voies de signalisation à diGMPc via un contrôle local de la concentration en diGMPc est tout d'abord supporté par l'existence de protéines possédant une double activité enzymatique (Tarutina *et al.*, 2006, Ferreira *et al.*, 2008, Kumar *et al.*, 2008b, Tuckerman *et al.*, 2009, Gupta *et al.*, 2010, Liu *et al.*, 2010, Levet-Paulo *et al.*, 2011, Österberg *et al.*, 2013). L'existence de deux activités antagonistes portées par la même protéine n'est pas une propriété exclusive des enzymes bifonctionelles DGC/PDE. En effet, elle est retrouvée dans de nombreux systèmes à deux composants, lorsque la protéine kinase est aussi la phosphatase du régulateur de réponse (Perego *et al.*, 1996). Ainsi, l'HK peut phosphoryler puis déphosphoryler très rapidement son RR pour contrôler très finement la voie de signalisation en aval (Perego *et al.*, 1996). Ce fonctionnement peut aussi être envisagé pour les protéines bifonctionnelles DGC/PDE. Ainsi, la même protéine pourrait contrôler précisément et rapidement la disponibilité locale en diGMPc perçue presque instantanément par des effecteurs proches.

❖ *La formation de complexes DGC/PDE/effecteurs du diGMPc*

Ce type de fonctionnement est également soutenu par l'existence de complexes protéiques constitués de DGC et/ou de PDE et d'effecteurs du diGMPc (Chin *et al.*, 2012, Ryan *et al.*, 2012). C'est par exemple le cas chez *E. coli* où la PDE DosP et la DGC DosC interagissent ensemble ainsi qu'avec plusieurs autres protéines : une polynucléotide phosphorylase (PNPase) capable de fixer le diGMPc, la RNase E (ribonucléase), le facteur de terminaison transcriptionnelle Rho et plusieurs protéines chaperonnes (DnaJ, DnaK et GroEL) (Figure 86) (Tuckerman *et al.*, 2009, Tuckerman *et al.*, 2011). Ce complexe permet la dégradation, dépendante du diGMPc, d'ARNm spécifiques en fonction de la

disponibilité en oxygène (Figure 86) (Tuckerman *et al.*, 2011). Chez *X. campestris*, la PDE RpfG interagit avec deux DGC ainsi qu'avec une protéine à domaine PilZ (Ryan *et al.*, 2012). Ce complexe agit sur la mobilité par twitching en interagissant directement avec les sous-unités PilU et PilT du moteur du pilus de type IV (Ryan *et al.*, 2012). La proximité physique entre les protéines responsables de la synthèse et/ou de la dégradation du diGMPc, et des protéines capables de fixer ce messager secondaire, suggère un mode de fonctionnement spécifique où le diGMPc synthétisé serait capté rapidement et uniquement par l'effecteur présent dans le complexe.

❖ *L'association entre une même activité enzymatique et deux effets antagonistes*

Le fait que deux protéines ayant la même activité engendrent des effets antagonistes est un nouvel argument en faveur du fonctionnement des voies de signalisation via des concentrations en diGMPc spécifiques et locales. Ce type d'antagonisme a été mis en évidence entre deux DGC de *Bdellovibrio bacteriovorus* (Hobley *et al.*, 2012). En effet, DgcB stimule la prédation de la bactérie, alors que DgcC favorise sa croissance axénique, deux étapes mutuellement exclusives du cycle de vie de cette bactérie (cf. paragraphe « Différenciation cellulaire de *Bdellovibrio bacteriovorus* » p. 76) (Hobley *et al.*, 2012). Ces deux enzymes sont fonctionnelles et permettent toutes deux la synthèse de diGMPc (Hobley *et al.*, 2012). Le diGMPc ainsi synthétisé est probablement fixé par deux effecteurs distincts et spécifiques, impliqués dans le contrôle de ces deux processus cellulaires antagonistes (Hobley *et al.*, 2012). Ainsi une même activité enzymatique pourrait permettre de moduler deux mécanismes opposés et, au contraire, deux activités antagonistes pourraient avoir un effet similaire sur le même processus cellulaire.

❖ *L'absence de corrélation entre la concentration intracellulaire en diGMPc et les effets sur les processus cellulaires contrôlés par le diGMPc*

L'un des principaux arguments du fonctionnement des voies de signalisation via des concentrations intracellulaires locales et spécifiques repose sur l'absence de corrélation entre la concentration intracellulaire globale en diGMPc et les effets sur les processus cellulaires contrôlés par ce messager secondaire comme la formation de biofilms ou la mobilité bactérienne (Kulasakara *et al.*, 2006, Merritt *et al.*, 2010, Tagliabue *et al.*, 2010a, Massie *et al.*, 2012, Abel *et al.*, 2013).

Chez *P. aeruginosa*, les DGC SadC et RoeA sont impliquées dans le contrôle de la mobilité par swarming et dans la régulation de la production d'EPS, respectivement (Merritt *et al.*, 2010). Les souches *ΔsadC* et *ΔroeA* présentent des concentrations intracellulaires en diGMPc similaires, correspondant à 50% de la concentration intracellulaire en diGMPc de la souche sauvage (Merritt *et al.*, 2010). Cependant, ces deux souches n'ont pas le même comportement : *ΔsadC* est capable de produire des EPS et présente un phénotype d'hyperswarming alors que la souche *ΔroeA* n'est pas mobile et ne produit pas d'EPS (Merritt *et al.*, 2010). Par conséquent, une même concentration

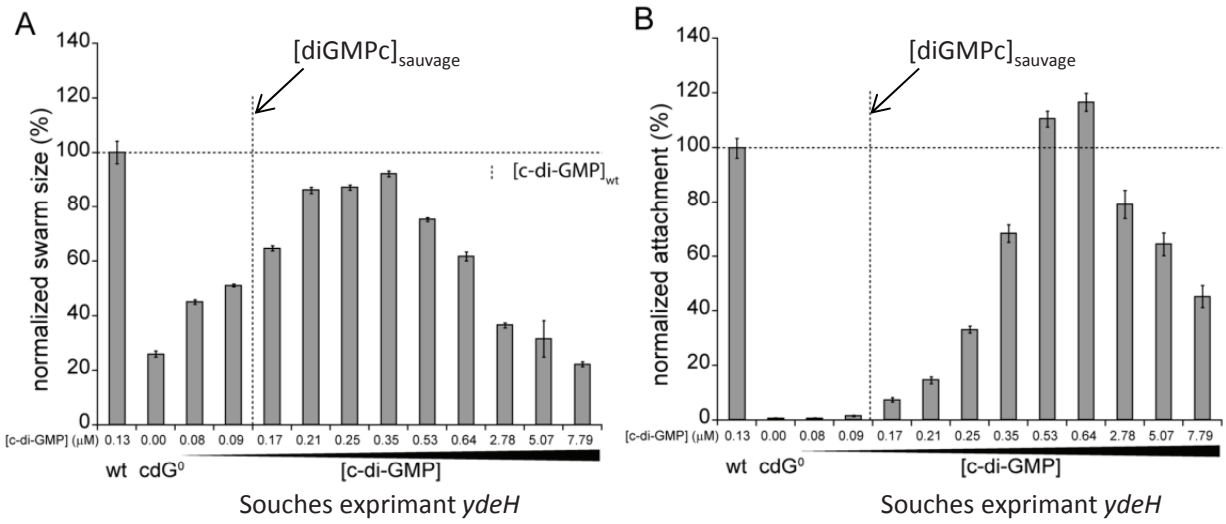


Figure 87 : La complémentation des phénotypes d'une souche de *C. crescentus* sans diGMPc par une DGC d'*E. coli* nécessite des concentrations intracellulaires en diGMPc supérieures à celle de la souche sauvage (d'après Abel *et al.,* 2013).

La mobilité (A) et l'adhérence aux surfaces (B) ont été évaluées chez la souche sauvage (Wt), chez la souche délétée de tous les gènes codant les DGC (cdG°) et chez les souches exprimant la DGC YdeH d'*E. coli* a différents niveaux. Pour chaque souche, la concentration intracellulaire en diGMPc est indiquée en abscisse.

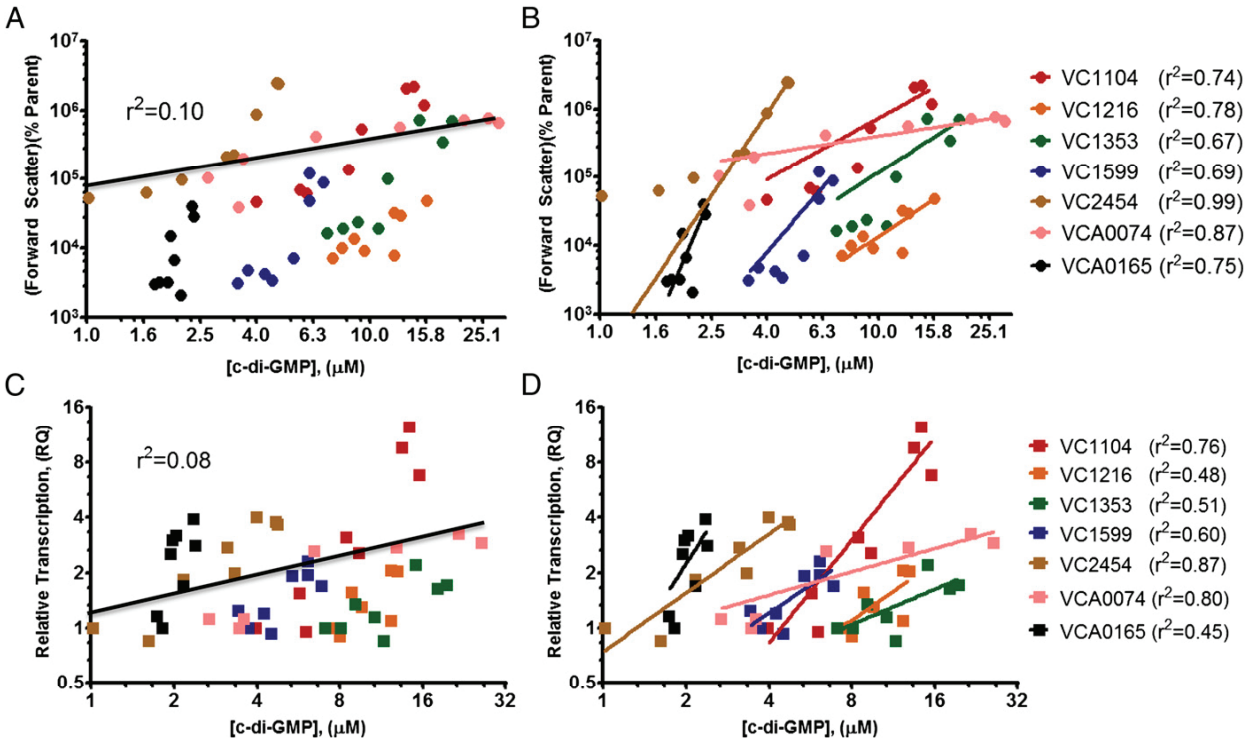


Figure 88 : Corrélation entre le niveau d'expression de DGC spécifiques et la formation de biofilms ou l'expression du gène *aphA* induite par le diGMPc (Massie *et al.,* 2012).

(A&B) La formation de biofilms par les différentes souches a été quantifiée par une technique de cytométrie en flux basée sur la production d'agrégats en conditions de culture liquide. Ces capacités de formation de biofilms sont présentées en fonction de la concentration intracellulaire en diGMPc de chaque souche. Il n'existe aucune corrélation entre cette concentration intracellulaire et la capacité à former des biofilms (A) alors que l'analyse réalisée pour chaque DGC présente une corrélation entre le niveau d'expression de cette DGC, la concentration en diGMPc et la capacité à former des biofilms (B). (C&D) Les mêmes observations ont été réalisées concernant la transcription du gène *aphA* inductible par le diGMPc .

intracellulaire en diGMPc n'engendre pas les mêmes effets cellulaires selon qu'elle soit causée par l'invalidation de telle ou telle DGC ou PDE (Merritt *et al.*, 2010).

Une étude menée sur *C. crescentus* a permis d'appuyer encore cette absence de corrélation entre la concentration intracellulaire en diGMPc et les effets sur les processus cellulaires (Abel *et al.*, 2013). Pour cette analyse, les auteurs ont créé une souche délétée pour tous les gènes codant des DGC de *C. crescentus* (Abel *et al.*, 2013). Cette souche est très sévèrement affectée au niveau de la mobilité par swarming, de l'adhérence aux surfaces et à la production du grappin qui a lieu pendant la différenciation de cette bactérie (Figure 87) (Abel *et al.*, 2013). La complémentation de ces phénotypes par la production de la DGC hétérologue YdeH d'*E.coli* nécessite d'atteindre des concentrations en diGMPc supérieures à celle de la souche sauvage (Figure 87) (Abel *et al.*, 2013). Si le rétablissement d'une concentration intracellulaire comparable à celle de la souche sauvage ne suffit pas à rétablir le phénotype sauvage, cela suggère qu'au-delà de la concentration intracellulaire globale en diGMPc, la disponibilité en diGMPc à proximité des effecteurs cibles, donc la concentration locale contrôlée par une DGC spécifique, a son importance (Abel *et al.*, 2013).

Enfin, s'il n'existe pas de corrélation entre la concentration intracellulaire globale en diGMPc et les effets sur les processus cellulaires contrôlés par le diGMPc, il semble exister une corrélation entre le niveau d'expression d'une DGC spécifique et les effets sur ces processus cellulaires (Massie *et al.*, 2012). Dans l'étude de Massie *et al.* menée sur *V. cholerae*, des souches ont été créées pour permettre 8 niveaux d'expression différents pour chacun des gènes codant 7 DGC différentes (Massie *et al.*, 2012). La concentration intracellulaire en diGMPc, la capacité à former des biofilms et la transcription du gène *aphA* inductible par le diGMPc ont été quantifiées pour chacune des 56 souches (Massie *et al.*, 2012). L'analyse des données obtenues met en évidence l'absence de corrélation entre chacun des processus suivis et la concentration intracellulaire en diGMPc (Figure 88A et C) (Massie *et al.*, 2012). Cependant, il semble exister une corrélation entre le niveau d'expression de chaque DGC et les effets sur la formation de biofilms ou sur la transcription de *aphA*, suggérant ainsi que chaque DGC a un effet spécifique et indépendant de celui dû à la concentration globale en diGMPc (Figure 88B et D) (Massie *et al.*, 2012).

Malgré le nombre impressionnant de publications qui paraissent chaque année sur le diGMPc, le fonctionnement des réseaux de signalisation à diGMPc reste largement inexploré. Il est donc important de continuer les études sur ces voies de signalisation chez diverses espèces bactériennes afin de mieux appréhender la diversité des mécanismes sous-jacents et de progresser dans la compréhension du niveau de spécificité de ces voies.

3 Objectifs

Legionella pneumophila est une bactérie dont le cycle de vie oscille entre une phase de réplication à l'intérieur d'une cellule-hôte, et une phase de transmission où elle est capable d'infecter une nouvelle cellule-hôte, mais également de survivre, si besoin, dans le milieu aquatique. Elle doit donc mettre en place des mécanismes lui permettant de s'adapter rapidement aux différentes conditions rencontrées notamment au cours de la phase de transmission. Les voies de signalisation impliquées doivent permettre de contrôler la production des facteurs de virulence nécessaires à l'infection de l'hôte, la mobilité de la bactérie requise pour sa dissémination jusqu'à un nouvel hôte et la formation de biofilms qui lui permet de résister dans l'environnement même en absence de cellules-hôtes.

Dans ce contexte, mes travaux de thèse visent à une meilleure compréhension des mécanismes favorisant la virulence de *L. pneumophila* ou sa capacité à former des biofilms. Ils se sont concentrés sur un type de voies de signalisation : les voies de signalisation à diGMPc. En effet, ce messager secondaire est impliqué chez de nombreuses espèces bactériennes dans le contrôle de la transition entre les modes de vie sessile et planctonique ainsi que dans le contrôle de la virulence pour les bactéries pathogènes. Chez *L. pneumophila*, les protéines GGDEF et/ou EAL, responsables de la synthèse et/ou de la dégradation du diGMPc, sont particulièrement abondantes, en comparaison aux autres protéines impliquées dans la signalisation intracellulaire, suggérant qu'elles sont importantes pour le cycle de vie de cette bactérie. Elles sont particulièrement produites lors de la phase de transmission où la bactérie doit exprimer ses facteurs de virulence mais également pouvoir survivre, si besoin, dans l'environnement aquatique sous forme de biofilms avant d'infecter une nouvelle cellule-hôte.

Cette étude repose sur une approche génétique basée sur la délétion systématique de chacun des 22 gènes codant les protéines à domaines GGDEF et/ou EAL, chargées de la synthèse et de la dégradation du diGMPc. Cette analyse a été réalisée sur la souche *L. pneumophila* Lens, une souche épidémique française qui est à l'origine de 86 cas de légionellose, dont 18 ont conduit au décès du patient. Elle a été choisie comme modèle pour l'étude, du fait de sa virulence, mais également car elle a été récemment isolée (2003-2004) et n'a donc subi que peu de dérive génétique due aux multiplications en conditions de laboratoire. Cette analyse a été initiée avant mon arrivée au laboratoire par Jean-Claude Lazzaroni, Anne Vianney et Mélanie Levet-Paulo, notamment pour la création de toutes les souches invalidées. A partir de cette collection de souches, mon objectif était d'identifier les protéines à domaines GGDEF et/ou EAL particulièrement impliquées dans le contrôle de la virulence ou de la formation de biofilms.

Concernant le contrôle de la virulence, trois protéines à domaines GGDEF et/ou EAL étaient déjà suspectées de jouer un rôle dans ce processus avant mon arrivée au laboratoire. Mon objectif était donc de valider ou non leur implication dans le contrôle de la virulence, de mettre en évidence la nécessité de leurs activités enzymatiques pour assurer leurs rôles et, le cas échéant, de déterminer à quelles étapes de l'infection ces protéines interviennent : l'entrée dans la cellule-hôte, l'échappement à la dégradation par la voie endosomale, la biogénèse de la LCV ou la sécrétion d'effecteurs par le SST4 Dot/Icm. Enfin, j'avais également pour but d'initier la recherche des autres acteurs de ces voies de signalisation : les signaux qui les déclenchent, leurs cibles moléculaires ainsi que les effecteurs du diGMPc par l'intermédiaire desquels elles fonctionnent.

Dès mon arrivée au laboratoire, le laboratoire a obtenu un financement de l'ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail) pour un projet mené en collaboration avec Christine Roques et Sophie Pécastaings du Laboratoire de Génie Chimique de l'Université de Toulouse. Ce projet vise à identifier les protéines à domaines GGDEF et/ou EAL requises pour la formation de biofilms de *L. pneumophila*. Pour cela, nos collaboratrices, spécialistes de la formation de biofilms mono-espèces de *L. pneumophila*, ont testé l'implication de chaque protéine à domaines GGDEF et/ou EAL dans la formation et l'architecture tridimensionnelle des biofilms. Mon objectif, dans ce projet, était de finaliser la construction des plasmides porteurs des gènes d'intérêt (sauvages ou mutés) et de les introduire dans les différents contextes génétiques afin de pouvoir fournir l'ensemble des souches nécessaires à cette étude. Par ailleurs, une seconde part de ma contribution avait pour but de purifier les différentes protéines d'intérêt après ajout d'une étiquette de 6 histidines afin de tester *in vitro* les activités enzymatiques de ces protéines.

4 Résultats et Discussion

4.1 Etude du rôle des protéines GGDEF/EAL dans le contrôle de la virulence

Afin d'identifier quelles voies de signalisation à diGMPc sont impliquées dans le contrôle de la virulence, une stratégie consistant en l'inactivation de chacun des gènes de *L. pneumophila* Lens codant les protéines à domaines GGDEF et/ou EAL a été mise en place au laboratoire. Ces gènes ont été invalidés par l'insertion d'une cassette de résistance à la kanamycine. La collection de souches inactivées ainsi obtenue a été criblée pour la recherche de défauts de virulence. A mon arrivée au laboratoire, des observations d'infections par microscopie optique avaient permis de suspecter que trois souches étaient altérées dans la virulence de *L. pneumophila* envers l'amibe *Acanthamoeba castellanii*. Mes travaux de thèse ont donc débuté par la mise au point d'une technique de suivi par fluorescence de la réplication intracellulaire de *L. pneumophila* dans ses diverses cellules-hôtes (*A. castellanii*, *Dictyostelium discoideum* et les macrophages humains U937). Les résultats obtenus ont permis de confirmer que les trois souches présentaient effectivement un défaut de réplication intracellulaire mais aussi de valider qu'aucune des autres souches mutantes n'était altérée. Les protéines à domaines GGDEF et/ou EAL correspondantes, Lpl0780, Lpl0922 et Lpl1118, ont été surproduites et purifiées afin de déterminer leur fonctionnalité. Les tests d'activité enzymatique réalisés à partir de GTP radioactif ont révélé que ces protéines portent des activités antagonistes : Lpl0780 est une DGC, Lpl0922 une protéine bifonctionnelle DGC/PDE et Lpl1118 une PDE.

Une analyse approfondie des étapes du cycle infectieux de *L. pneumophila* a ensuite été initiée. Des expériences de numération des bactéries intracellulaires viables dans différentes cellules-hôtes ont tout d'abord révélé que ces trois protéines sont requises à la survie précoce de la bactérie dans les cellules-hôtes, suggérant une participation à l'échappement à la dégradation par la voie endosomale de l'hôte. Cette étape dépend partiellement de la création de la vacuole de réplication, par conséquent l'implication de ces trois protéines dans ce processus a été testée grâce à une souche de *D. discoideum* exprimant un composé du RE, la calnexine, fusionné à la GFP. Ces tests ont mis en évidence que seule la protéine Lpl1118 est impliquée dans la création de la LCV. Enfin, l'échappement à la dégradation par la voie endosomale et la biogénèse de la LCV dépendent de la capacité de la bactérie à sécréter ses effecteurs par le SST4 Dot/Icm dans le cytoplasme de l'hôte. L'utilisation d'une technique basée sur l'activité de la β-lactamase a permis de mettre en évidence que la sécrétion des effecteurs est altérée différentiellement dans les 3 souches mutantes.

Ces travaux ont donné lieu à une publication dans le journal Infection and Immunity (Allombert *et al.*, 2014). Cet article est présenté ci-après.

4.1.1 Article n°1

IAI Journals.ASM.org

Three Antagonistic Cyclic di-GMP-Catabolizing Enzymes Promote Differential Dot/Icm Effector Delivery and Intracellular Survival at the Early Steps of *Legionella pneumophila* Infection

Julie Allombert,[a,b,c,d,e] Jean-Claude Lazzaroni,[a,b,c,d,e] Nathalie Baïlo,[a,b,c,d,e] Christophe Gilbert,[a,b,c,d,e] Xavier Charpentier,[f,g] Patricia Doublet,[a,b,c,d,e] Anne Vianney[a,b,c,d,e]

International Center for Infectiology Research (CIRI), Legionella Pathogenesis Group, Université de Lyon, Lyon, France[a]; Inserm, U1111, Lyon, France[b]; Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France[c]; Université Lyon 1, Centre International de Recherche en Infectiologie, Lyon, France[d]; CNRS, UMR5308, Lyon, France[e]; CNRS, UMR5240, Villeurbanne, France[f]; Université Lyon 1, Villeurbanne, France[g]

***Legionella pneumophila* is an intracellular pathogen which replicates within protozoan cells and can accidently infect alveolar macrophages, causing an acute pneumonia in humans. The second messenger cyclic di-GMP (c-di-GMP) has been shown to play key roles in the regulation of various bacterial processes, including virulence. While investigating the function of the 22 potential c-di-GMP-metabolizing enzymes of the *L. pneumophila* Lens strain, we found three that directly contribute to its ability to infect both protozoan and mammalian cells. These three enzymes display diguanylate cyclase (Lpl0780), phosphodiesterase (Lpl1118), and bifunctional diguanylate cyclase/phosphodiesterase (Lpl0922) activities, which are all required for the survival and intracellular replication of *L. pneumophila*. Mutants with deletions of the corresponding genes are efficiently taken up by phagocytic cells but are partially defective for the escape of the *Legionella*-containing vacuole (LCV) from the host degradative endocytic pathway and result in lower survival. In addition, Lpl1118 is required for efficient endoplasmic reticulum recruitment to the LCV. Trafficking and biogenesis of the LCV are dependent upon the orchestrated actions of several type 4 secretion system Dot/Icm effectors proteins, which exhibit differentially altered translocation in the three mutants. While translocation of some effectors remained unchanged, others appeared over- and undertranslocated. A general translocation offset of the large repertoire of Dot/Icm effectors may be responsible for the observed defects in the trafficking and biogenesis of the LCV. Our results suggest that *L. pneumophila* uses cyclic di-GMP signaling to fine-tune effector delivery and ensure effective evasion of the host degradative pathways and establishment of a replicative vacuole.**

Cyclic-di-GMP (c-di-GMP) is a nearly ubiquitous bacterial second messenger involved in signaling pathways that control lifestyle transitions, among which are the transition from the motile to the sessile state and, for pathogenic bacteria, the transition from pathogenic to environmental lifestyles or from acute/planktonic infections to chronic/biofilm infections (1–4). c-di-GMP is produced from GTP by diguanylate cyclases (DGCs), is degraded by phosphodiesterases (PDEs), and acts through various effector proteins or RNA riboswitches (5–8). The catalytic site of DGCs is associated with the GGDEF domain, while PDE activity involves either the EAL or the HD-GYP domains. Genes encoding these proteins have been identified in all major bacterial phyla and are particularly expanded in gammaproteobacteria, with a median of 22 genes per genome (9). Consistently, the genomes of gammaproteobacterium *Legionella pneumophila* strains encode from 22 to 24 GGDEF/EAL proteins (10, 11). Few are specific to each strain, but most of them are highly conserved in *L. pneumophila* strains (11). c-di-GMP seems to be strongly involved in *Legionella* cell signaling, since the 22 GGDEF/EAL proteins represent 13.5% of proteins containing one of the main signal domains listed in the MiST2 database (namely, the small-molecule-binding, DNA-binding, diguanylate cyclase, and receiver domains) versus 6.16% in *Escherichia coli* or 4.76% in *Pseudomonas aeruginosa*, for example (see Table S1 in the supplemental material) (12). This rate, which is also higher than in *Vibrio cholerae* (11.36%), which produces 51 GGDEF/EAL proteins, makes *L. pneumophila* a relevant pathogen model for exploring complex c-di-GMP signaling networks (Table S1).

L. pneumophila is able to colonize and replicate within different phagocytic cells, from various protozoan species in freshwater environments to human alveolar macrophages, and can result in a severe pneumonia called Legionnaires' disease in humans (13, 14). Following host cell uptake, *L. pneumophila* requires the Dot/Icm type 4 secretion system (T4SS) to translocate more than 280 effector proteins within host cells and establish a replication-permissive vacuole called the *Legionella*-containing vacuole (LCV) (15–21). Through a complex and well-orchestrated process, the translocated effector proteins allow evasion of the phagosome from the endocytic pathway, recruitment of vesicles from the endoplasmic reticulum (ER), and biogenesis of the LCV (14, 22–24). Within the LCV, *L. pneumophila* efficiently replicates until nutrient deficiencies trigger a large genetic expression reprogramming, which includes both the expression of virulence factor-encoding

Received 28 August 2013 **Returned for modification** 27 September 2013
Accepted 20 December 2013
Published ahead of print 30 December 2013
Editor: C. R. Roy
Address correspondence to Anne Vianney, anne.vianney@univ-lyon1.fr.
Supplemental material for this article may be found at http://dx.doi.org/10.1128/IAI.01077-13.
Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.
doi:10.1128/IAI.01077-13

Downloaded from http://iai.asm.org/ on February 27, 2014 by UNIV CLAUDE BERNARD

genes, such as Dot/Icm machinery-encoding genes, and the upregulation of GGDEF/EAL protein-encoding genes (11).

We investigated the role of GGDEF/EAL proteins in the intracellular infection of *L. pneumophila* by systematically inactivating each of the 22 GGDEF/EAL-encoding genes in the *L. pneumophila* French epidemic strain Lens. We identified three genes, namely, *lpl0780*, *lpl0922*, and *lpl1118*, required for *Legionella* intracellular growth in multiple hosts. Our data suggest that these 3 GGDEF/EAL proteins contribute to orchestrate appropriate delivery of effector proteins through the Dot/Icm T4SS, controlling the biogenesis of the LCV and thus the efficient intracellular multiplication of *L. pneumophila*. This work provides the first evidence that regulation of secretion through the Dot/Icm secretion system involves cyclic di-GMP-dependent signaling pathways.

MATERIALS AND METHODS

Strains and growth conditions. Bacterial strains and plasmids used in the present study are summarized in Table S2 in the supplemental material. *L. pneumophila* strains were grown at 30°C either on buffered charcoal yeast extract (BCYE) agar [*N*-(2-acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid (ACES) at 10 g · liter^{-1}, yeast extract at 10 g · liter^{-1}, charcoal at 2 g · liter^{-1}, agar at 15 g · liter^{-1}, L-cysteine at 0.4 g · liter^{-1}, $FeNO_3$ at 0.25 g · liter^{-1}, pH 6.9] or in liquid *Legionella* growth medium (LGM) (α-ketoglutarate at 1 g · liter^{-1}, yeast extract at 12 g · liter^{-1}, L-cysteine at 0.5 g · liter^{-1}, iron pyrophosphate at 0.3 g · liter^{-1}, pH 6.9). Media were supplemented with kanamycin (10 μg · ml^{-1}), gentamicin (5 ng · ml^{-1}), or chloramphenicol (5 μg · ml^{-1}) when appropriate. *Escherichia coli* strains were grown at 37°C in LB medium supplemented with ampicillin (100 μg · ml^{-1}), kanamycin (20 μg · ml^{-1}), or chloramphenicol (5 μg · ml^{-1}). *E. coli* BL21(DE3)(pREP4-*groESL*) was used for recombinant protein overproduction. Host cells used in this study are listed in Table S2. Axenic *Acanthamoeba castellanii* cells were grown on PYG medium (proteose peptone-yeast extract-glucose medium) at 30°C. *Dictyostelium discoideum* cells were axenically grown in HL5 medium at 22°C, supplemented with G418 (20 μg · ml^{-1}) when necessary. U937 cells were maintained at 37°C in 5% CO_2 and RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum. The differentiation of U937 monocytes into macrophages is conducted at a phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) concentration of 100 ng/ml.

Gene inactivation in *L. pneumophila*. To obtain *L. pneumophila* Lens mutants defective for the *lpl0780* gene, a homologous-recombination strategy was chosen as previously described (25) The 400-bp upstream and downstream regions of the gene of interest were amplified by PCR, digested by NotI, and then cloned into pAV695. A kanamycin resistance cassette was amplified from pKD13 (with AV80 and AV81 primers [see Table S3 in the supplemental material]), digested by SalI, and cloned inside the encoding sequence of the gene in pAV695.

To obtain Δ*lpl0922* and Δ*lpl1118* mutants, inactivation fragments were created with a double-joint PCR method as previously described (26). These inactivation fragments were digested by NotI and then cloned into pAV695. The resulting constructs were introduced by electroporation into *L. pneumophila* for chromosomal recombination.

Expression and purification of recombinant proteins. DNA fragments corresponding to the coding sequences of *lpl0780*, *lpl0922*, and *lpl1118* (full-length open reading frame [ORF]) were PCR amplified using genomic DNA of *L. pneumophila* Lens as the template and the following oligonucleotide pairs: JC397-JC398 (*lpl0780*), AV166-AV167 (*lpl0922*), and AV170-JA1 (*lpl1118*) (see Table S3 in the supplemental material). The amplified DNA fragments were digested with BamHI and SalI and then inserted into pQE30. The resulting plasmids (pQE30-*lpl0780*, pQE30-*lpl0922*, and pQE30-*lpl1118*) were introduced into *E. coli* strain BL21(DE3)(pREP4-*groESL*). Transformants were grown at 37°C until cultures reached an optical density at 600 nm (OD_{600}) of 0.8. Gene expression was induced with 1 mM IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) for 1 or 3 h at 20°C, and cell lysates were prepared by using a French pressure cell. His_6-tagged recombinant proteins were purified under native conditions by affinity chromatography with magnetic beads (PureProteome nickel magnetic beads; Millipore), according to the manufacturer's recommendations. The purity of the eluted protein was analyzed by SDS-PAGE. Fractions containing pure proteins were pooled and dialyzed against a reaction buffer (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, $MgCl_2$ 20 mM). The concentrations of the dialyzed protein fractions were determined using Nanodrop 2000 (Thermo).

DGC, PDE assays, and thin-layer chromatography (TLC) analysis. DGC/PDE assays were performed as previously described (27). Briefly, full-length His_6-tagged proteins were purified and were incubated at 30°C in reaction buffer (described above) with 50 μM GTP and 15 μCi [α-^{32}P]GTP (PerkinElmer) in a final volume of 50 μl. For PDE assays, [^{32}P]c-di-GMP was first enzymatically synthesized by incubating purified His_6-Lpl0922* (with a mutated EAL domain) with [α-^{32}P]GTP and GTP as described above. Nonreacted GTP was cleaved by incubation with 1 U of calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP; Fermentas). It is noteworthy that [^{32}P]pGpG produced in low quantities by His_6-Lpl0922* is changed in [^{32}P]GpG by CIAP at this stage. The mixture was heated for 5 min at 95°C, centrifuged, and filtered on a Microcon YM-30 filter (Millipore) to eliminate proteins. PDE assays were then carried out by addition of purified His_6-tagged proteins and $MnCl_2$ (30 mM), needed for some PDE activities (4). In both DGC and PDE assays, samples were taken at different time points, and the reaction was stopped by the addition of EDTA (0.16 M, pH 8). Reaction products (1.5 μl) were separated on polyethyleneimine (PEI)-cellulose plates (Macherey-Nagel) in 1:1.5 (vol/vol) 4 M $(NH_4)_2SO_4$ (pH 3.6)-1.5 M KH_2PO_4 (pH 3.6). Plates were exposed to a PhosphorImager screen.

Amino acid substitutions. Substitutions in the *lpl0780*, *lpl0922*, and *lpl1118* genes were made with a QuikChange II site-directed mutagenesis kit (Stratagene) using the primers listed in Table S3 in the supplemental material, with pQE30-*lpl0780*, pQE30-*lpl0922*, pQE30-*lpl1118*, p*lpl0780*, p*lpl0922*, or p*lpl1118* as the template. Final constructs with *lpl0780*E438D,F439I (*lpl0780*GGDEF*), *lpl0922*E422D,F423I (*lpl0922*GGDEF*), *lpl0922*F546V,E547D (*lpl0922*EAL*), and *lpl1118*L428V, E429D (*lpl1118*EAL*) were used to transform *E. coli* BL21 (pQE30-derived plasmids) or *L. pneumophila* Lens (pJCL2968-derived plasmids).

Intracellular growth in host cells. The intracellular growth of *L. pneumophila* in host cells was monitored as previously described with some modifications (28, 29). Briefly, bacteria harboring a fluorescent-protein-producing plasmid (mCherry or green fluorescent protein [GFP]) were grown in LGM containing 0.5 mM IPTG and an appropriate antibiotic(s) (gentamicin and/or chloramphenicol) for 3 days at 30°C. Host cells, *A. castellanii*, *D. discoideum*, or U937 macrophages, were seeded in multiwell plates. After adhesion (and PMA differentiation for U937 macrophages), cells were infected with *L. pneumophila* at a multiplicity of infection (MOI) of 10 or 1 (as specified below). The plates were centrifuged (880 × *g*, 10 min), followed by incubation for 1 h at 37°C. Monolayers were then washed four times with proteose peptone-yeast extract medium (PY) to remove extracellular bacteria. The time at the end of the final wash was the initial time point. Intracellular growth was automatically monitored by measuring the fluorescence of mCherry (excitation, 580 nm; emission, 620 nm) or GFP (excitation, 485 nm; emission, 520 nm) in an Infinite M200 plate reader (Tecan) every hour for 65 h in *A. castellanii* and U937 macrophages or for 145 h in *D. discoideum*. Fluorescence data were subjected to background subtractions (uninfected cells).

Bacterial uptake and early survival. *A. castellanii* cells were infected at an MOI of 10 as previously described (28). After a 1-h contact, monolayers were treated for 1 h with gentamicin (50 μg · ml^{-1}) to kill adherent bacteria and then disrupted with Triton X-100 (0.04%). Viable intracellular bacteria were diluted and plated onto BCYE agar plates for colony enumeration.

Bacterial uptake assays by trypan blue quenching. *L. pneumophila* phagocytosis was measured by Trypan blue quenching as previously de-

Downloaded from http://iai.asm.org/ on February 27, 2014 by UNIV CLAUDE BERNARD

scribed (30). Briefly, bacteria from 3-day cultures in LGM were labeled with 5,(6)-carboxyfluorescein succinimidyl ester. *A. castellanii* cells were grown as adherent cells in 96-well microplates and then infected with fluorescent legionellae (MOI, 20) in the presence or absence of wortmannin (2 μM) or cytochalasin D (10 μM). After centrifugation (880 × *g* for 10 min) to initiate cell-bacterium contact, the plate was incubated at 30°C for 30 min. The medium was then replaced by 50 μl per well of Trypan blue solution to quench the fluorescence of noninternalized bacteria. After 1 min of incubation, the fluorescence of internalized bacteria was measured on a plate reader (Infinite M200; Tecan) with an excitation of 485 nm and an emission of 530 nm. Fluorescence data were normalized in order to suppress differences related to the labeling efficiency of each strain.

Maturation of the *Legionella*-containing phagosome. *D. discoideum* cells were infected on sterile glass coverslips with mCherry-producing *L. pneumophila* cells at an MOI of 100 and incubated for 1 h at 25°C. Monolayers were fixed with paraformaldehyde (4%), permeabilized with ice-cold methanol (100%) for 2 min at room temperature, and blocked with phosphate-buffered saline supplemented with bovine serum albumin (BSA; 0.2%). The coverslips were then stained with anti-VatA antibodies (221-35-2; gift of F. Letourneur, Lyon, France) for 1 h and visualized with Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibody (A11029; Molecular Probes). Microscopy was carried out on a laser scanning confocal microscope (LSM 510 Meta; Zeiss).

ER recruitment to the LCV in *D. discoideum*. *D. discoideum* cells producing calnexin-GFP were used to analyze by fluorescence microscopy the recruitment of ER to the *Legionella*-containing vacuole (LCV), which harbors mCherry-labeled *L. pneumophila*. *D. discoideum* cells were seeded onto sterile glass coverslips in 6-well plates at 5×10^6 cells per well in HL5 medium and allowed to adhere overnight. Monolayers were infected at an MOI of 100 with bacteria grown in LGM for 3 days at 30°C. The plates were spun (880 × *g*, 10 min) and incubated for 1 h at 25°C. Monolayers were then washed two times with 2 ml of phosphate buffer and fixed with 3.7% paraformaldehyde (30 min, 4°C). Coverslips were examined with an inverted confocal microscope (Axiovert 200M; Zeiss) equipped with a 63× phase-contrast objective lens (Plan Neofluar [Zeiss]; aperture, 1.4, oil).

Construction of plasmidic TEM fusion. Plasmids expressing β-lactamase effector fusion proteins were constructed as previously described (31). Primers used to amplify each effector gene are listed in Table S3 in the supplemental material. Briefly, the PCR product of the effector gene was digested with appropriate restriction enzymes and cloned into the KpnI-SmaI-BamHI-XbaI polylinker of pXDC61. Final constructs were used to transform *L. pneumophila* strains by electroporation.

Analysis of production of TEM fusion proteins. *L. pneumophila* strains expressing TEM-effector fusion proteins were grown in 10 ml of LGM at 30°C for 3 days. Bacteria were washed 3 times with 20 ml of distilled water and then disrupted with 0.1-mm-diameter glass beads in a FastPrep-24 instrument (MP Biomedicals), using six 30-s pulses at a speed of 6.5 m/s at room temperature, separated by 5-min intervals on ice. Cell debris was pelleted by centrifugation (13,000 × *g*, 20 min). Protein concentrations of intracellular extracts were measured in order to load the same protein quantity in each gel well for SDS-PAGE. Then, proteins were transferred to an Optitran cellulose nitrate membrane, BA-S 85 (pore size, 0.45 μm; Schleicher & Schuell, Germany), and membranes were saturated with TBS (Tris-buffered saline [100 mM Tris, NaCl 150 mM, pH 8]) supplemented with BSA (5%) and incubated with anti-TEM rabbit serum (32). Detection was performed with anti-rabbit IgG-peroxidase antibodies (A0545; Sigma-Aldrich). Immunoblots were revealed with Pierce SuperSignal West Pico chemiluminescent substrates (ThermoScientific).

TEM translocation assays. TEM translocation assays were performed as previously described (31). Briefly, PMA-differentiated U937 cells grown in RPMI 1640 containing 10% fetal calf serum were seeded in black, clear-bottom 96-well plates 72 h prior to infection. *L. pneumophila* strains carrying the various TEM–β-lactamase fusion proteins were grown in LGM containing chloramphenicol and 0.5 mM IPTG for 3 days. Then, bacteria resuspended in RPMI 1640 were used to infect U937 cells (MOI, 20). After centrifugation (600 × *g*, 10 min), the plate was shifted to 37°C with 5% CO_2 for 1 h of incubation. Cell monolayers were loaded with the fluorescent substrate by adding 20 μl of 6× CCF4/AM solution (LiveBLAzer-FRET B/G loading kit; Invitrogen) containing 15 mM probenecid. Cells were incubated for an additional 2 h at room temperature. Fluorescence was quantified on a plate reader (Infinite M200; Tecan), with excitation at 405 nm; emission was then detected at 460 nm (blue fluorescence) and at 530 nm (green fluorescence).

RESULTS

The GGDEF/EAL domains of Lpl0780, Lpl0922, and Lpl1118 are required for intracellular *Legionella pneumophila* Lens infection. The annotated genome of *L. pneumophila* Lens contains 22 putative GGDEF/EAL protein-encoding genes (10). In order to assess the individual contribution of the GGDEF/EAL proteins to the control of the *Legionella* infectious cycle, each corresponding gene, except two (*lpl2581* and *lpl1308*), was interrupted by the insertion of a kanamycin resistance gene by homologous recombination. The two missing mutants most likely correspond to genes with flanking regions allowing aberrant homologous-recombination events.

The virulence of the 20 constructed strains toward *A. castellanii* amoebae was evaluated by monitoring intracellular growth. The deletion mutant strains were transformed by *gfp*- or *mcherry*-carrying plasmids, and bacterial multiplication was monitored by fluorescence measurement (see Fig. S1 in the supplemental material). As expected, an avirulent *dotA* mutant failed to replicate in host cells (Fig. S1; Fig. 1). The Δ*lpl0780*, Δ*lpl0922*, and Δ*lpl1118* mutant strains exhibited a significant reduction of multiplication efficiency in *A. castellanii* infected with a multiplicity of infection (MOI) of 10 (Fig. 1A to C). Indeed, while an increase of fluorescence was detected from 15 h postinfection for the wild-type strain, the Δ*lpl0780*, Δ*lpl0922*, and Δ*lpl1118* mutant strains replicated later (20 h) (Fig. 1A to C). When infection was carried out at an MOI of 1, the intracellular multiplication rates were quite similar for the mutant and the wild-type strains; however, intracellular multiplication appeared clearly delayed for at least 12 h in the mutant strains (Fig. S2), while they grow axenically in rich medium as optimally as the wild-type strain (Fig. S3). Complementation experiments were carried out by introducing pJCL2968-derivative vectors that expressed the corresponding wild-type gene, in addition to the fluorescent mCherry-expressing plasmid. Intracellular multiplication kinetics (Fig. 1A to C) observed for the complemented strains were similar to that of the parental Lens strain.

To check whether GGDEF/EAL domains are needed for controlling intracellular infection, amino acid substitutions of highly conserved residues, known to abolish DGC and PDE activities (27), were introduced into the GGDEF or EAL domain of the three proteins by site-directed mutagenesis. These substitutions introduced in His_6 recombinant proteins do not generate a decrease of protein stability, except for Lpl0922EAL*, which is slightly less stable than Lpl0922 or Lpl0922GGDEF* (see Fig. S4 in the supplemental material). The mutated genes were unable to restore intracellular growth ability to the deletion mutant strains (Fig. 1), thus suggesting that the GGDEF/EAL domains of Lpl0780, Lpl0922, and Lpl1118 play a key role in the virulence of *L. pneumophila*.

Intracellular multiplication of the Δ*lpl0780*, Δ*lpl0922*, and Δ*lpl1118* mutant strains was monitored at an MOI of 10 in two other phagocytic cells, namely, human U937 macrophages (Fig. 1D to F) and *D. discoideum* amoebae (see Fig. S5 in the supplemental material). Intracellular multiplication was altered in both host cells, with a delay of 9 h to 14 h depending on the mutant

Downloaded from http://iai.asm.org/ on February 27, 2014 by UNIV CLAUDE BERNARD

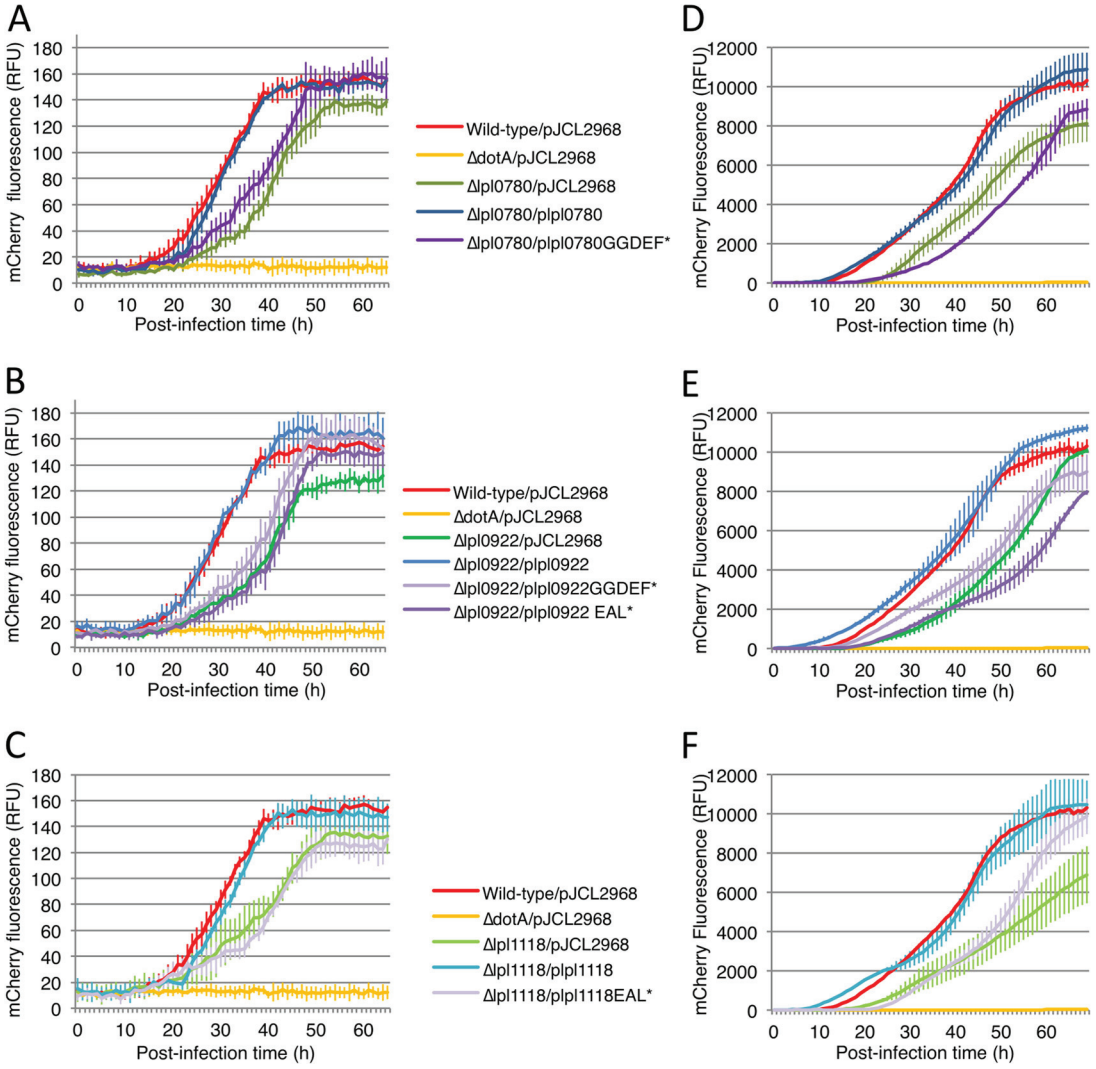


FIG 1 Lpl0780, Lpl0922, and Lpl1118 GGDEF/EAL proteins are required for *Legionella pneumophila* Lens intracellular infection in different host cells through their GGDEF and/or EAL domain. Intracellular growth of mCherry-producing *L. pneumophila* in *A. castellanii* (A, B, C), or U937 human macrophages (D, E, F) at an MOI of 10. Bacterial multiplications of strains derived from the Δ*lpl0780* (A and D), Δ*lpl0922* (B and E), or Δ*lpl1118* (C and F) strain were automatically monitored for fluorescence as described in Materials and Methods. Error bars represent standard deviations from three independent experiments performed in quadruplicate. Complementation tests were performed with pJCL2968-derived plasmids expressing wild-type genes or mutated derivative genes. GGDEF* and EAL* indicates GGDEF and EAL domains with substitutions at the catalytic sites described in Materials and Methods. Control strains were systematically transformed with the parental pJCL2968 plasmid. RFU, relative fluorescence units.

strain (Fig. S5; Fig. 1D to F). Moreover, complementation experiments with U937 cells confirmed the role of the GGDEF/EAL domains of Lpl0780, Lpl0922, and Lpl0118 in efficient *Legionella* multiplication in host cells.

Thus, Lpl0780, Lpl0922, and Lpl1118 proteins, and especially their GGDEF/EAL domains, are required for efficient intracellular infection of various host cells. Given that the multiplication rate of mutant strains is similar to that of the parental strain, both under planktonic and intracellular conditions (Fig. S2 and S3), these three proteins may be involved in the control of early stages of infection allowing bacteria to enter the cell and/or establish the replicative vacuole before being degraded by the endosomal pathway.

Lpl0780 displays a diguanylate cyclase activity, Lpl0922 is a bifunctional diguanylate cyclase and phosphodiesterase enzyme, and Lpl1118 is a phosphodiesterase. According to the NCBI's Conserved Domain Database (CDD) (33), Lpl0780 contains a conserved GGDEF domain, Lpl0922 displays both the GGDEF and EAL domains, and Lpl1118 contains a degenerated GGDEF and a well-conserved EAL domain (Fig. 2A). To determine whether Lpl0780, Lpl0922, and Lpl1118 are enzymatically functional, each protein was overproduced and purified and their enzymatic activities were assayed *in vitro* in the presence of [α-^{32}P]GTP. Samples were taken at different time points and analyzed by PEI-cellulose thin-layer chromatography (TLC). All retention factor (R_F) values for nucleotide species detected in these assays agreed with those identified previously (27, 34) (Fig. 2B).

His_6-Lpl0780 exhibits a DGC activity, since c-di-GMP was produced from GTP. An additional intermediate product, probably pppGpG, was produced during this two-step reaction (4, 34, 35); this intermediate product was notably accumulated under

Downloaded from http://iai.asm.org/ on February 27, 2014 by UNIV CLAUDE BERNARD

A

Gene	Structure	Conservation	
		Domains	CDD NCBI
lpl0780	GGDEF	GG**E**EF	6.39×10^{-57}
lpl0922	PAS PAS PAC GGDEF EAL	GGDEF	8.05×10^{-59}
		EAL	1.81×10^{-108}
lpl1118	PAC PAS PAC GGDEF EAL	GL**S**EF	4.83×10^{-14}
		EAL	2.03×10^{-81}

B

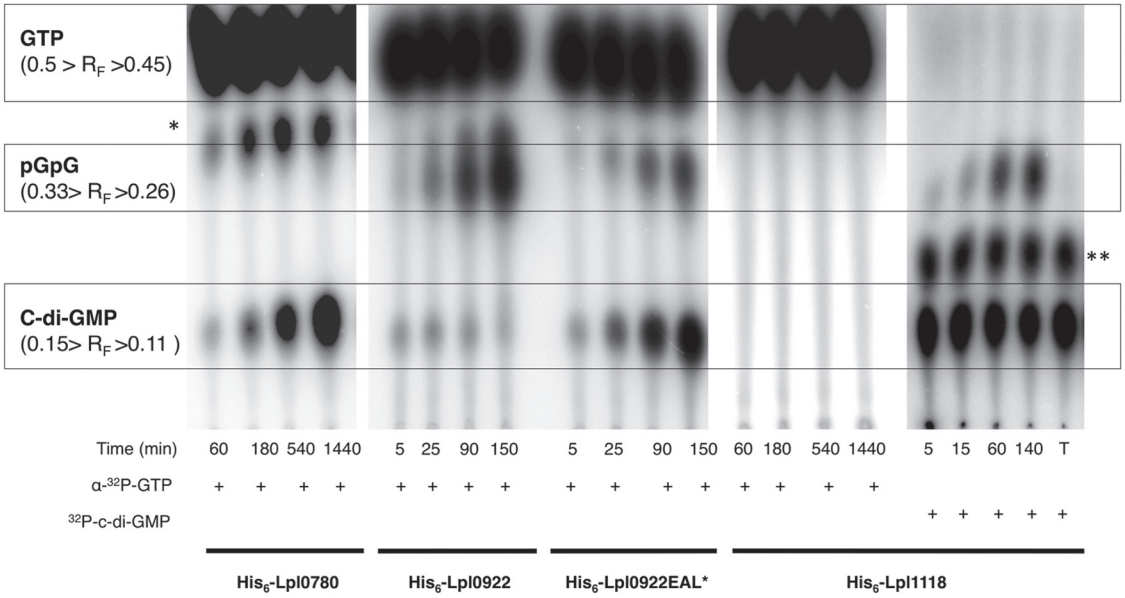


FIG 2 Lpl0780, Lpl0922, and Lpl1118 display functional DGC, DGC/PDE, and PDE activities, respectively. (A) Structural diversity of Lpl0780, Lpl0922, and Lpl1118. The domain architectures of the 3 proteins are illustrated. The expected values for the GGDEF and EAL domains of NCBI's Conserved Domain Database (CDD) are indicated (29). Nonconserved amino acid residues in consensus sequences are boldface. Sensor domains are as follows: the Per-Arnt-Sim (PAS) domain and the PAS domain-associated C-terminal (PAC) domain. The black box indicates a coil-coiled region, and the gray box indicates the methyl-accepting chemotaxis protein (MCP) signal-associated domain. (B) Purified His_6-tagged proteins were incubated with [α-^{32}P]GTP or enzymatically synthetized [α-^{32}P]c-di-GMP as described in Materials and Methods. Samples were withdrawn at different time points and analyzed by PEI-cellulose TLC, and plates were exposed to a phosphorimager screen. Lane T, a reaction control without purified His_6-Lpl1118 withdrawn at 60 min; EAL*, EAL domain with substitutions at catalytic sites, described in Materials and Methods; * and **, spots which correspond to pppGpG (an intermediary molecule of the DGC reaction) and GpG (the product from pGpG after CIAP treatment [see Materials and Methods]), respectively.

these circumstances because of the relative slowness of c-di-GMP production observed at 24 h (Fig. 2B). Lpl0922 has both DGC and PDE activities. Indeed, c-di-GMP is produced by the His_6-Lpl0922 protein but is subsequently degraded to pGpG, resulting in efficient pGpG but not c-di-GMP accumulation (Fig. 2B). This DGC activity was confirmed by the fact that His_6-Lpl0922 with a mutated EAL domain (His_6-Lpl0922EAL*) produced and accumulated c-di-GMP, although a small part of c-di-GMP was still linearized in pGpG (Fig. 2B). Moreover, this result showed that Lpl0922EAL* remains enzymatically functional despite a slight decrease in its stability (Fig. S4), thus justifying its use in the complementation experiments and supporting the idea that the Lpl0922 DGC activity alone is not sufficient to restore the wild-type phenotype in the Δ*lpl0922* strain. As expected, the degenerated GGDEF domain of His_6-Lpl1118 is not active, as neither c-di-GMP nor pGpG was produced after 24 h of incubation with GTP (Fig. 2B). Its PDE activity was tested by incubation of His_6-Lpl1118 with enzymatically produced [^{32}P]c-di-GMP. A spot corresponding to pGpG was rapidly detected; we thus concluded that the EAL domain of Lpl1118 is active for c-di-GMP degradation (Fig. 2B).

Together, our results establish that Lpl0780, Lpl0922, and Lpl1118 exhibit DGC, DGC/PDE, and PDE enzymatic activities, respectively, and that these activities are required for efficient *L. pneumophila* intracellular growth.

Lpl0780, Lpl0922, and Lpl1118 GGDEF/EAL proteins are required for *L. pneumophila* Lens evasion of endocytic degradation. As intracellular multiplication of mutant strains seems to be delayed rather than reduced, suggesting that the infectious cycle

Downloaded from http://iai.asm.org/ on February 27, 2014 by UNIV CLAUDE BERNARD

does not optimally start, the requirement of the corresponding GGDEF/EAL proteins in early steps of infection was investigated.

Some *Legionella* mutants with attenuated virulence traits exhibit a defect in transition between the replicative and transmissive phases, and consequently, their pigment production is decreased and their resistance to sodium ions is increased compared to those of the wild-type strain (36–39). The Δ*lpl0780*, Δ*lpl0922*, and Δ*lpl1118* strains accumulated pigment during growth to the same extent as the parental strain (see Fig. S6A in the supplemental material) and exhibit the same sensitivity to sodium ions as the wild-type strain (Fig. S6B), unlike the Δ*letA* (*Legionella* transmission activator) mutant, which is deficient for the LetA/LetS two-component system required for the replicative- to transmissive-phase transition (40). Thus, the Δ*lpl0780*, Δ*lpl0922*, and Δ*lpl1118* mutants appeared different from the type of mutants with an overall defect in transition to the transmissive phase.

Bacterial uptake in amoebae was assessed by trypan blue quenching assays. The *L. pneumophila* wild-type strain or mutant derivatives were fluorescein labeled and used to infect *A. castellanii*. Trypan blue was added after 30 min of contact to quench the fluorescence of noninternalized bacteria. Measured fluorescence is representative of bacterial uptake, as demonstrated by the negative effect of the actin polymerization inhibitor cytochalasin D or the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitor wortmannin (Fig. 3A). All mutant strains present a fluorescence similar to that measured for the wild-type strain (Fig. 3A), thus suggesting that bacterial uptake is not altered in the Δ*lpl0780*, Δ*lpl0922*, and Δ*lpl1118* strains. In addition, the number of bacteria per infected *D. discoideum* cell was determined by confocal microscopy on scans obtained 1 h postinfection by the different strains. No significant difference could be detected between the wild-type and mutant strains (Fig. 3B), supporting the idea that the Δ*lpl0780*, Δ*lpl0922*, and Δ*lpl1118* strains are not altered for uptake mechanisms.

Furthermore, the intracellular survival of wild-type and mutant strains was assessed by counting the viable intracellular bacteria at 2 h postinfection in *A. castellanii*, in *D. discoideum*, and in U937 cells. In these three host cells, the intracellular viability of mutant strains was found to be at least 60% lower than that of the parental strain (Fig. 3C and D; see also Fig. S7 in the supplemental material). As expected, intracellular survival ability was restored to wild-type levels when mutants were complemented with a plasmid expressing a gene corresponding the wild-type gene but not when they were complemented with mutated genes (Fig. 3C and D; Fig. S7). Given that mutant strain uptake has previously been shown to be similar to that of the parental strain, this result highlights the key role of Lpl0780, Lpl0922, and Lpl1118 in intracellular survival and, thus, probably in bacterial evasion from endocytic degradation in various phagocytic cells.

The abilities of the strains to escape degradation by the endocytic pathway were evaluated through the presence on the LCV of the vacuolar ATPase subunit VatA, a marker for the endolysosomal system (41). *D. discoideum* cells were infected with mCherry-producing *Legionella* cells. After 1 h, cells were fixed, VatA was immunolabeled, and more than 200 LCVs were observed by confocal laser scanning microscopy for each experiment (Fig. 4A). The rate of vacuoles stained by the VatA antibodies increased from 50 to 58% for the mutant strains. This increase is statistically significant (P = 0.0021, 0.0110, and 0.0063 for the Δ*lpl0780*, Δ*lpl0922*, and Δ*lpl1118* mutants, respectively) although substantially lower than that observed for the avirulent Δ*dotA* mutant; it was abolished by introduction of the wild-type genes but not complemented by mutated genes (Fig. 4B). Thus, the three mutant strains do not escape degradation through the endocytic pathway as efficiently as the reference strain.

Together, these data support the finding that Lpl0780, Lpl0922, and Lpl1118 are not involved in bacterial uptake but are required for early survival within host cells, suggesting a role in subsequent steps of infection, such as LCV biogenesis.

Lpl1118 GGDEF/EAL protein is required for ER recruitment to the LCV. A characteristic trait of LCV biogenesis is endoplasmic reticulum (ER) recruitment to the phagosome (21, 22). ER recruitment to the LCV was observed in the model amoeba *D. discoideum* expressing a specific marker for ER, namely, calnexin, fused to the GFP. Amoebae were infected with mCherry-labeled wild-type or mutant bacteria. Calnexin-positive LCVs were scored by confocal laser scanning microscopy at 1 h postinfection for more than 200 intracellular bacteria for each experiment (Fig. 5A). About 60% of the LCVs containing the Δ*lpl0780* and Δ*lpl0922* mutants and the wild-type strain stained positive for calnexin-GFP. In contrast, only 42% of the Δ*lpl1118* mutant-containing vacuoles were labeled by calnexin (Fig. 5B). This 30% reduction in ER recruitment is statistically significant (P = 0.0002). Moreover, restoration of the wild-type phenotype was achieved by transforming a plasmid expressing wild-type *lpl1118* but not by introducing a mutated allele of *lpl1118* (Fig. 5B). These results demonstrate that Lpl1118 is required for efficient ER recruitment to the LCV.

The translocated-effector repertoire is differentially altered by *lpl0780*, *lpl0922*, and *lpl1118* deletions. Crucial to LCV biogenesis, particularly to ER recruitment to the LCV, is the Dot/Icm T4SS, which translocates numerous effector proteins into the host cell cytoplasm. We hypothesized that the Δ*lpl0780*, Δ*lpl0922*, and Δ*lpl1118* mutant intracellular infection defects were due to a defect in effector secretion. The translocation of 11 different Dot/Icm effectors, including effectors known to be involved in the trafficking of the LCV (24, 31, 42), was tested by using a β-lactamase translocation reporter system (30). Plasmids expressing the C-terminal part of the TEM-1 β-lactamase fused to the Dot/Icm effector proteins LepA (positive control), LegK4, SidJ, LegK2, SidC, VipA, AnkB, SidM, LidA, LepB, and AnkJ and the nontranslocated fatty acid biosynthetic enzyme enoyl-coenzyme A (enoyl-CoA) reductase (FabI, negative control) were introduced into wild-type and mutant *Legionella* Lens strains. Gene fusions were under the control of the *tac* promoter, and Western blot analysis confirmed that each TEM-effector fusion protein is stable and is similarly expressed in the different genetic backgrounds in the presence of IPTG (Fig. 6A).

Differentiated U937 cells were infected at an MOI of 20 in the presence of IPTG, and the translocated β-lactamase activity in host cells was quantified using a spectrofluorimeter to measure the concentrations of the cleaved (emission at 460 nm) and intact (emission at 530 nm) β-lactamase substrate CCF4. The Δ*dotA* strain, deficient in the Dot/Icm T4SS, and fusion with FabI, a cytoplasmic protein, have been used as controls to validate the translocation reporter system. As expected, β-lactamase activity was detected in U937 cells infected with the Lens strain expressing the various TEM-effector fusion proteins but not in U937 cells infected with the Lens strain expressing TEM-FabI (Fig. 6B). In addition, β-lactamase activity was not detected in U937 cells infected with the Δ*dotA* strain expressing TEM-LepA (Fig. 6B). Mu-

Downloaded from http://iai.asm.org/ on February 27, 2014 by UNIV CLAUDE BERNARD

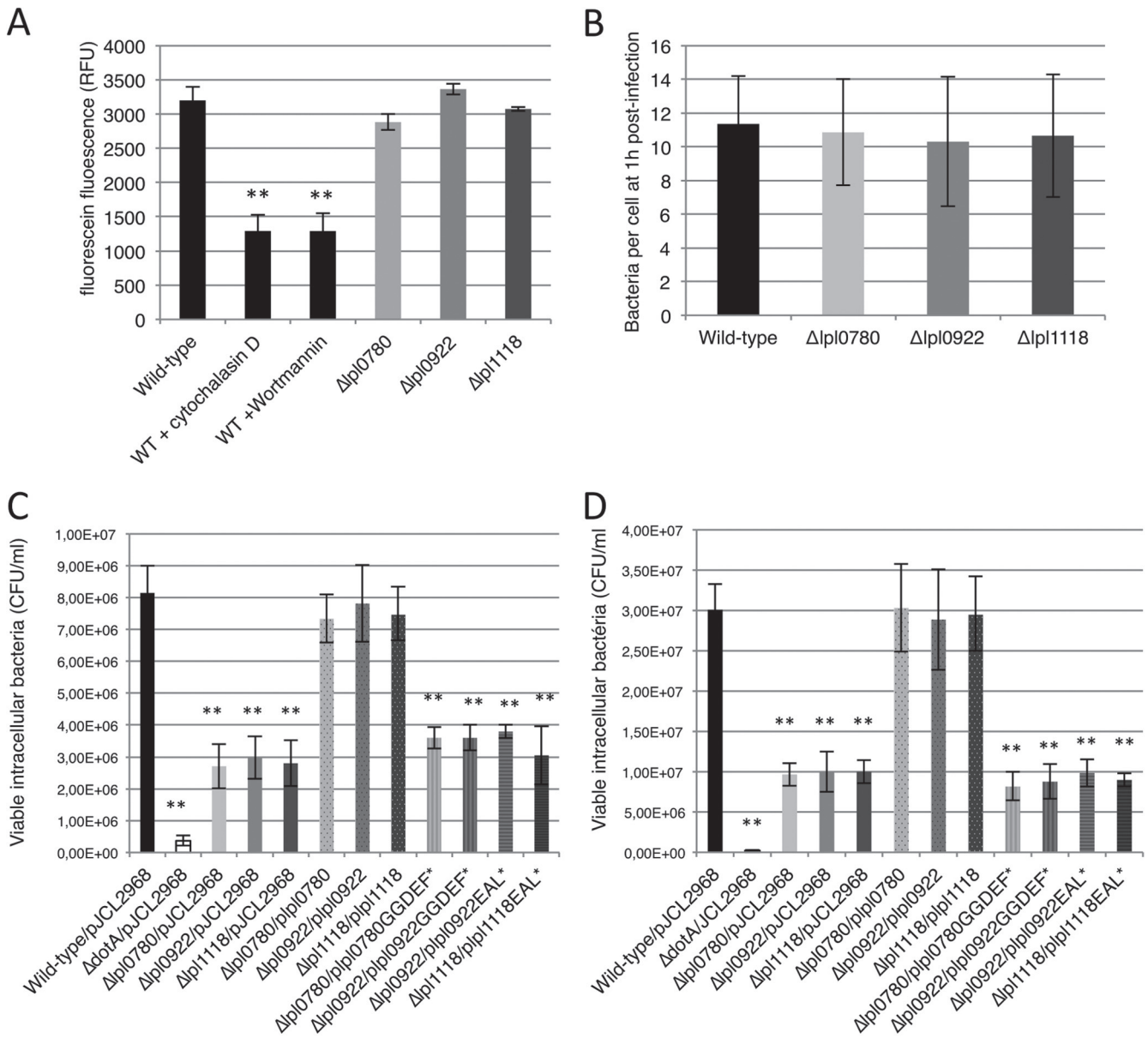


FIG 3 Lpl0780, Lpl0922, and Lpl1118 GGDEF/EAL proteins are required for *L. pneumophila* Lens intracellular survival but not for bacterial uptake into host cells. (A) Bacterial-uptake assays by trypan blue quenching at 30 min postinfection of *A. castellanii*. Infection assays in the presence of wortmannin (PI3K inhibitor) or cytochalasin D (actin polymerization inhibitor) are used as negative controls. Fluorescence data were normalized in order to suppress differences related to the labeling efficiency of each strain. (B) Internalization of mCherry-producing *L. pneumophila* within *D. discoideum* cells. From pictures obtained for endoplasmic reticulum recruitment (see Materials and Methods), the efficiency of bacterial uptake was evaluated for more than 50 cells for each experiment. (C and D) Viable intracellular bacteria after gentamicin treatment and host cell lysis 2 h postinfection of *A. castellanii* (C) or *Dictyostelium discoideum* (D). The results were statistically analyzed by using a Student *t* test. **, $P < 0.05$. Error bars represent standard deviations from three independent experiments performed in triplicate. GGDEF* and EAL*, GGDEF and EAL domains with substitutions at catalytic sites (described in Materials and Methods); WT, wild type.

tations in *lpl0780*, *lpl0922*, and *lpl1118* have distinct consequences on effector translocation. The Δ*lpl0780* mutant is affected in LegK4, SidJ, LepB, and AnkJ translocation compared to the wild-type strain (Fig. 6C). Interestingly, the rate of translocated LegK4 is significantly increased (60%), whereas the rates of translocated SidJ, LepB, and AnkJ are decreased (about 40%, 40%, and 60%, respectively). In the Δ*lpl0922* strain, the translocation of the effectors is quite similar to that of the wild-type strain even if the translocation of some effectors is slightly (about 25%), but significantly, decreased (SidC, SidM, and AnkJ) (Fig. 6C). In contrast, *lpl1118* deletion results in decreased translocation rates for most effectors, especially for LepA and LepB, but also LegK2, SidJ, SidC, and LepB (about 25%, 30%, 35%, and 50%, respectively), previously shown to be involved in ER recruitment to the LCV (28, 43–45) (Fig. 6C). The concomitant decreases in the rates of translocation of LegK2, SidJ, SidC, and LepB may explain the specific defect of the *lpl1118* mutant for ER recruitment to the LCV.

Thus, Lpl0780, Lpl0922, and Lpl1118 differentially control the translocation of various Dot/Icm T4SS effectors. This result may explain both the common key role of these proteins in the early

Downloaded from http://iai.asm.org/ on February 27, 2014 by UNIV CLAUDE BERNARD

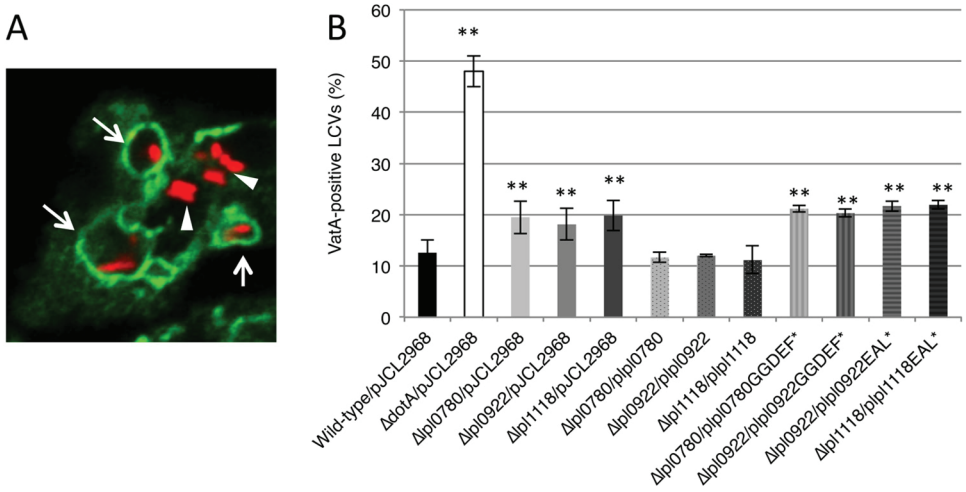


FIG 4 *lpl0780*, *lpl0922*, and *lpl1118* deletions affect escape from the endocytic pathway. (A) Confocal laser scanning micrographs of *D. discoideum* with mCherry-producing *L. pneumophila* at an MOI of 100 after immunolabeling of VatA. Typical VatA-positive phagosomes are indicated with white arrows, and VatA-negative LCVs are indicated with white triangles. (B) Percentages of VatA-positive phagosomes. More than 200 *Legionella*-containing phagosomes were checked for each strain in each experiment by confocal laser scanning microscopy to score VatA-positive phagosomes. The data are representative of three independent experiments. The results were statistically analyzed by using a Student *t* test. **, $P < 0.05$. GGDEF* and EAL*, GGDEF and EAL domains with substitutions at catalytic sites (described in Materials and Methods).

steps of infection, as supported by the crucial importance of Dot/Icm-dependent translocation in the *Legionella* infectious cycle, and the subtle phenotype differences of the corresponding mutants, as illustrated by the specific ER defect of the *lpl1118* mutant. Moreover, these results are the first evidence that secretion of effector proteins through the Dot/Icm T4SS may be controlled by c-di-GMP signaling pathways.

DISCUSSION

In this work, we highlight the role of c-di-GMP in the control of the *L. pneumophila* Lens infectious cycle. A systematic mutagenesis of each GGDEF/EAL protein-encoding gene revealed that three inactivated mutants, namely, the Δ*lpl0780*, Δ*lpl0922*, and Δ*lpl1118* mutants, were significantly altered in their intracellular infection of both amoebae and macrophages. More precisely, they were impaired in setting up efficient intracellular replication. These mutants were not defective for uptake into host cells, but their intracellular survival was drastically altered. These data suggest that these strains exhibit defects in LCV biogenesis resulting in a less efficient evasion of the endocytic pathway.

Surprisingly, inactivation of the homologous genes *lpl0780*, *lpl0922*, and *lpl1118* in the *L. pneumophila* Philadelphia JR32 strain resulted in no detectable defect of intracellular growth in *A. castellanii* amoebae and THP-1 macrophages (46). This discrepancy may be related to bacterial-strain specificities and/or the *Legionella* permissivity of the host cell model, as suggested by the

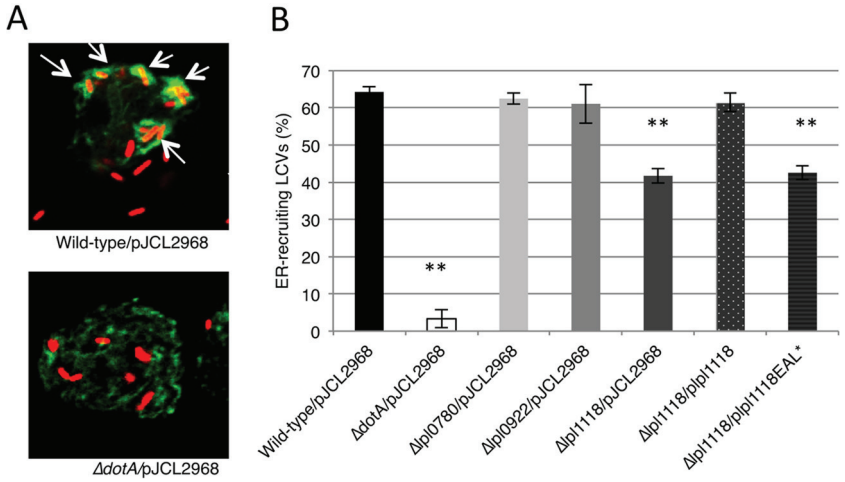


FIG 5 Lpl1118 is required for ER recruitment to the LCV. (A) Confocal laser scanning micrographs of *D. discoideum* cells producing GFP-calnexin with mCherry-synthetizing *L. pneumophila* at an MOI of 100. Typical calnexin-positive vacuoles are indicated by white arrows. (B) Percentages of ER-recruiting LCVs. More than 200 *Legionella*-containing vacuoles were checked for each strain in each experiment by confocal laser scanning micrography to score calnexin-positive vacuoles. The data are representative of three independent experiments. The results were statistically analyzed by using a Student *t* test. **, $P < 0.05$. EAL*, EAL domain with substitutions at catalytic sites (described in Materials and Methods).

Downloaded from http://iai.asm.org/ on February 27, 2014 by UNIV CLAUDE BERNARD

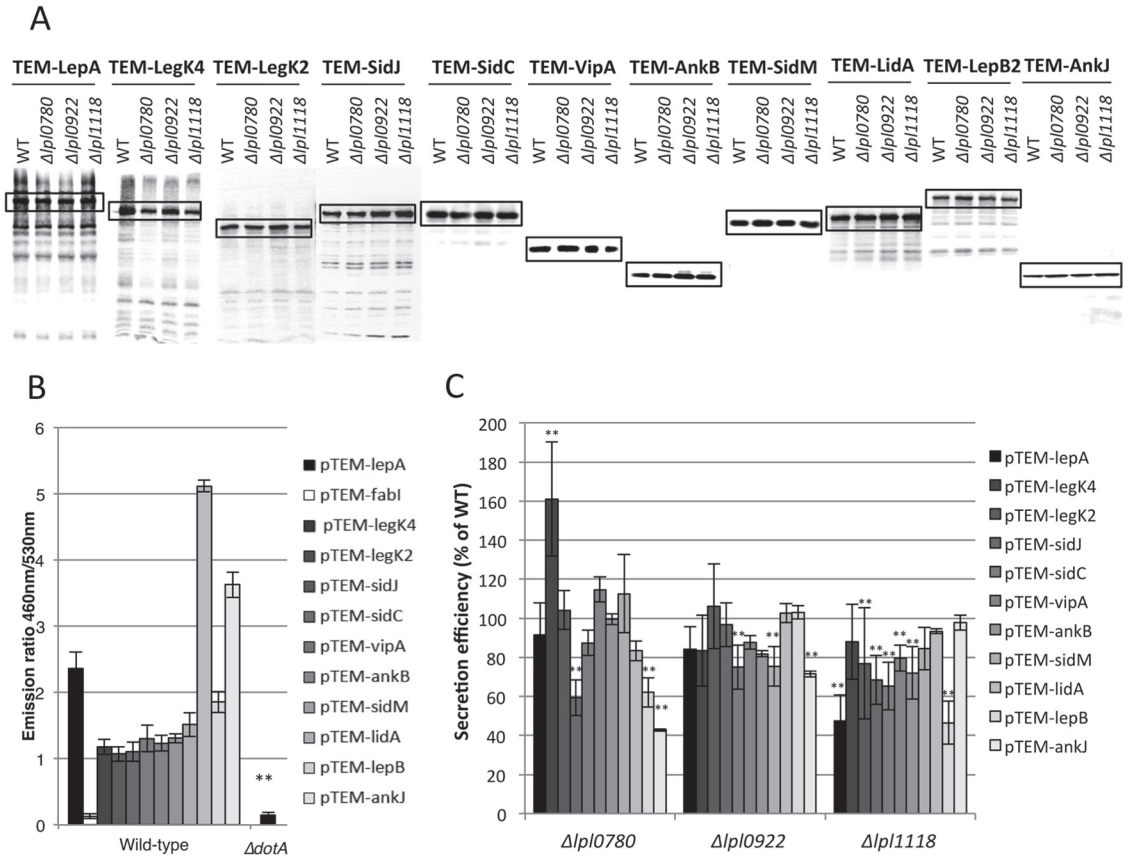


FIG 6 The translocated effector repertoire is differentially altered by *lpl0780*, *lpl0922*, and *lpl1118* deletions in differentiated U937 cells. (A) Immunoblots for each TEM-effector fusion in the different genetic backgrounds (wild-type, Δ*lpl0780*, Δ*lpl0922*, and Δ*lpl1118* strains). (B) T4SS effector translocation assays. Differentiated U937 cells were infected with wild-type and Δ*dotA* strains harboring a TEM-LepA, TEM-FabI, TEM-LegK4, TEM-LegK2, TEM-SidJ, TEM-SidC, TEM-VipA, TEM-AnkB, TEM-SidM, TEM-LidA, TEM-LepB, or TEM-AnkJ expression plasmid at an MOI of 20. Infected cells were loaded with CCF4/AM, and translocation was determined by comparison of cleaved and uncleaved CCF4, which results in blue and green fluorescence, respectively. (C) T4SS effectors translocation assays. Differentiated U937 cells were infected with the Δ*lpl0780*, Δ*lpl0922*, and Δ*lpl1118* strains harboring each TEM-effector expression plasmid. For easier interpretation, all data are expressed as a percentage of the value for the wild-type strain. Thus, 100% indicates a translocation similar to that of the reference strain. (B and C) The data are representative of four independent experiments. The results were statistically analyzed by using a Student *t* test. **, $P < 0.05$.

weak infection phenotype observed in U937 macrophages compared to *D. discoideum* cells in our study, as well as conditions of infection, such as multiplicity of infection. However, Levi et al. first highlighted the idea that c-di-GMP controls *L. pneumophila* virulence, since they observed that overexpression of several DGC- and PDE-encoding genes strongly decreased the ability of the *L. pneumophila* Philadelphia strain to grow inside host cells (46).

We demonstrated that Lpl0780, Lpl0922, and Lpl1118, which are concomitantly involved in early steps of infection, are functional enzymes with antagonistic activities. Indeed, Lpl0780 was *in vitro* characterized as a DGC, Lpl0922 possesses both DGC and PDE activities, and Lpl1118 is a PDE. Their enzymatic activities are needed for controlling *L. pneumophila* intracellular infection. With regard to Lpl0922, the two antagonistic enzymatic activities are necessary for the role of this protein, since substitutions in each catalytic site induce an infection defect. It can be hypothesized that this bifunctional protein switches from DGC to PDE activity upon a specific signal, as previously described for *L. pneumophila* Lpl0329 (27). It is noteworthy that few bifunctional enzymes, namely, MSDGC-1 in *Mycobacterium smegmatis*, BphG1 in *Rhodobacter sphaeroides*, ScrC in *Vibrio parahaemolyticus*, and Lpl0329 in *L. pneumophila* (27, 47–49), have been biochemically characterized to date, while conservation of GGDEF and EAL catalytic sites in bacterial proteins suggest that 55% of GGDEF/EAL hybrid proteins may have double enzymatic activities (9). This second DGC/PDE in the *L. pneumophila* Lens strain suggests that the number of real bifunctional enzymes is probably underestimated. The existence of such bifunctional enzymes supports the hypothesis that some specific c-di-GMP-dependent signaling pathways rely on the local c-di-GMP concentration (4). The high specificity of c-di-GMP pathways based on highly local c-di-GMP production has recently been shown to control various and independent phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, and *Bdellovibrio bacteriovorus* (50–52). Moreover, such specific c-di-GMP pathways may explain the apparent contradiction in the involvement of three antagonistic enzymes at the early steps of the *Legionella* infectious cycle.

We demonstrate that Lpl0780, Lpl0922, and Lpl1118 are needed to orchestrate suitable effector translocation, which promotes the biogenesis of the LCV and subsequently efficient bacterial intracellular replication. It is noteworthy that none of the

Downloaded from http://iai.asm.org/ on February 27, 2014 by UNIV CLAUDE BERNARD

three deletions abolishes the overall translocation efficiency of the Dot/Icm machinery, as observed for T6SS production in *Pseudomonas aeruginosa* (2) and for T1SS in *Shewanella putrefaciens* (53). However, they have distinct effects on the translocation of 11 Dot/Icm effectors. In particular, deletion of *lpl1118* resulted in the decreased translocation of LegK2, SidJ, SidC, and LepB, four effectors known to be required for ER recruitment to the LCV, while deletion of *lpl0780* reduced the translocation of only SidJ and LepB. The efficient translocation of LegK2 and SidC in the Δ*lpl0780* strain may explain why this mutant is not defective for ER recruitment onto the LCV. Interestingly, LegK4 translocation is increased during infection with the *lpl0780* mutant compared to that during infection with the parental strain. Western blot analysis did not reveal any major difference in LegK4 production in the different bacterial strains. The observed increase in LegK4 translocation may be due to a higher translocation activity or to improved effector stability in the infected cell. A significant increased translocation of the *Legionella* effector SidH has previously been shown in the Δ*lubX* context (54). In that case, the lack of LubX, a secreted bacterial E3 ubiquitin ligase, reduced the proteosomal degradation of SidH in the host cell. It is possible that the apparent increase in LegK4 translocation is the consequence of the reduced secretion of other meta-effectors, like LubX. Regardless of the mechanism involved, disruption of c-di-GMP signaling results in a significant imbalance of effector translocation that directly impacts LCV biogenesis.

Over the last decade, an increasing number of *L. pneumophila* proteins have been identified as T4SS Dot/Icm effector proteins (15–20), although few of these effectors have been functionally characterized during infection. The transcriptional and posttranscriptional control of genes which encode these effector proteins is becoming better understood; (i) CpxR/A and PmrA/B two-component systems were shown previously to directly regulate the expression of *icm*/*dot* genes or effector-encoding genes (55–57), and (ii) the LetA/S-RsmYZ-CsrA regulatory cascade posttranscriptionally controls the expression of three effector-encoding genes (58). However, little is known about processes or signaling events that trigger the secretion of these effectors within host cells. Events that are clearly established are that secretion through Dot/Icm requires contact with the host cell (59) and that the IcmS and IcmW proteins are needed to function as a chaperone complex that enables the translocation of some effector proteins (20, 60). The three c-di-GMP-dependent signaling pathways pinpointed in this study modulate the translocation of effectors requiring IcmS/W for translocation (e.g., VipA, AnkJ, and SidC), as well as IcmS/W-independent effectors (e.g., LepA and LepB). However, the impact of the Δ*lpl0780*, Δ*lpl0922*, or Δ*lpl1118* deletion on effector translocation is not limited to effectors whose translocation is dependent on IcmS/W proteins. These data suggest that c-di-GMP control operates independently of the IcmS/W chaperone complex.

Finally, we provide the first evidence that cyclic di-GMP contributes to the regulatory network involved in the secretion orchestration of *L. pneumophila* effector proteins through the Dot/Icm T4SS. Further characterization of c-di-GMP-dependent signaling, in particular, determination of the targets of the c-di-GMP signaling pathways identified in this study, will be critical to understanding the molecular mechanisms used by *Legionella* to ensure appropriate effector delivery in host cells.

ACKNOWLEDGMENTS

J.A. was supported by a fellowship from the Ministère de l'Enseignement et de la Recherche. X.C. is supported by an ATIP-AVENIR grant from CNRS/INSERM.

We are grateful to Claire Andréa for technical assistance and F. Letourneur for the gift of anti-VatA antibody.

REFERENCES

1. **Tamayo R, Pratt J, Camilli A.** 2007. Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis. Annu. Rev. Microbiol. **61:**131–148. http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093426.
2. **Moscoso JA, Mikkelsen H, Heeb S, Williams P, Filloux A.** 2011. The *Pseudomonas aeruginosa* sensor RetS switches type III and type VI secretion via c-di-GMP signalling. Environ. Microbiol. **13:**3128–3138. http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02595.x.
3. **Povolotsky TL, Hengge R.** 2012. 'Life-style' control networks in *Escherichia coli*: signaling by the second messenger c-di-GMP. J. Biotechnol. **160:**10–16. http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.12.024.
4. **Römling U, Galperin MY, Gomelsky M.** 2013. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **77:**1–52. http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.00043-12.
5. **Hengge R.** 2009. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. Nat. Rev. Microbiol. **7:**263–273. http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2109.
6. **Hengge R.** 2010. Cyclic-di-GMP reaches out into the bacterial RNA world. Sci. Signal. **3:**pe44. http://dx.doi.org/10.1126/scisignal.3149pe44.
7. **Sondermann H, Shikuma NJ, Yildiz FH.** 2012. You've come a long way: c-di-GMP signaling. Curr. Opin. Microbiol. **15:**140–146. http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2011.12.008.
8. **Schirmer T, Jenal U.** 2009. Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling. Nat. Rev. Microbiol. **7:**724–735. http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2203.
9. **Seshasayee AS, Fraser GM, Luscombe NM.** 2010. Comparative genomics of cyclic-di-GMP signalling in bacteria: post-translational regulation and catalytic activity. Nucleic Acids Res. **38:**5970–5981. http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkq382.
10. **Cazalet C, Rusniok C, Brüggemann H, Zidane N, Magnier A, Ma L, Tichit M, Jarraud S, Bouchier C, Vandenesch F, Kunst F, Etienne J, Glaser P, Buchrieser C.** 2004. Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. Nat. Genet. **36:**1165–1173. http://dx.doi.org/10.1038/ng1447.
11. **Brüggemann H, Hagman A, Jules M, Sismeiro O, Dillies M, Gouyette C, Kunst F, Steinert M, Heuner K, Coppée J, Buchrieser C.** 2006. Virulence strategies for infecting phagocytes deduced from the in vivo transcriptional program of *Legionella pneumophila*. Cell. Microbiol. **8:**1228–1240. http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00703.x.
12. **Ulrich L, Zhulin I.** 2010. The MiST2 database: a comprehensive genomics resource on microbial signal transduction. Nucleic Acids Res. **38:**D401–D407. http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkp940.
13. **Rowbotham TJ.** 1980. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. J. Clin. Pathol. **33:**1179–1183. http://dx.doi.org/10.1136/jcp.33.12.1179.
14. **Horwitz MA, Silverstein SC.** 1980. Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) multiples intracellularly in human monocytes. J. Clin. Invest. **66:**441–450. http://dx.doi.org/10.1172/JCI109874.
15. **Ninio S, Roy CR.** 2007. Effector proteins translocated by *Legionella pneumophila*: strength in numbers. Trends Microbiol. **15:**372–380. http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2007.06.006.
16. **Burstein D, Zusman T, Degtyar E, Viner R, Segal G, Pupko T.** 2009. Genome-scale identification of *Legionella pneumophila* effectors using a machine learning approach. PLoS Pathog. **5:**e1000508. http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000508.
17. **Heidtman M, Chen EJ, Moy MY, Isberg RR.** 2009. Large-scale identification of *Legionella pneumophila* Dot/Icm substrates that modulate host cell vesicle trafficking pathways. Cell. Microbiol. **11:**230–248. http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01249.x.
18. **Luo ZQ, Isberg RR.** 2004. Multiple substrates of the *Legionella pneumophila* Dot/Icm system identified by interbacterial protein transfer. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **101:**841–846. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0304916101.
19. **Zhu W, Banga S, Tan Y, Zheng C, Stephenson R, Gately J, Luo ZQ.** 2011. Comprehensive identification of protein substrates of the Dot/Icm

Downloaded from http://iai.asm.org/ on February 27, 2014 by UNIV CLAUDE BERNARD

type IV transporter of *Legionella pneumophila*. PLoS One **6:**e17638. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0017638.
20. **Lifshitz Z, Burstein D, Peeri M, Zusman T, Schwartz K, Shuman HA, Pupko T, Segal G.** 2013. Computational modeling and experimental validation of the *Legionella* and *Coxiella* virulence-related type-IVB secretion signal. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **110:**E707–E715. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1215278110.
21. **Swanson MS, Isberg RR.** 1995. Association of *Legionella pneumophila* with the macrophage endoplasmic reticulum. Infect. Immun. **63:**3609–3620.
22. **Tilney LG, Harb OS, Connelly PS, Robinson CG, Roy CR.** 2001. How the parasitic bacterium *Legionella pneumophila* modifies its phagosome and transforms it into rough ER: implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane. J. Cell Sci. **114:**4637–4650.
23. **Horwitz MA.** 1983. The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. J. Exp. Med. **158:**2108–2126. http://dx.doi.org/10.1084/jem.158.6.2108.
24. **Isberg RR, O'Connor TJ, Heidtman M.** 2009. The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells. Nat. Rev. Microbiol. **7:**13–24. http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1967.
25. **Ferhat M, Atlan D, Vianney A, Lazzaroni J, Doublet P, Gilbert C.** 2009. The TolC protein of *Legionella pneumophila* plays a major role in multidrug resistance and the early steps of host invasion. PLoS One **4:**e7732. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0007732.
26. **Yu JH, Hamari Z, Han KH, Seo JA, Reyes-Domínguez Y, Scazzocchio C.** 2004. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. Fungal Genet. Biol. **41:**973–981. http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2004.08.001.
27. **Levet-Paulo M, Lazzaroni JC, Gilbert C, Atlan D, Doublet P, Vianney A.** 2011. The atypical two-component sensor kinase Lpl0330 from *Legionella pneumophila* controls the bifunctional diguanylate cyclase-phosphodiesterase Lpl0329 to modulate bis-(3′-5′)-cyclic dimeric GMP synthesis. J. Biol. Chem. **286:**31136–31144. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.231340.
28. **Hervet E, Charpentier X, Vianney A, Lazzaroni JC, Gilbert C, Atlan D, Doublet P.** 2011. Protein kinase LegK2 is a type IV secretion system effector involved in endoplasmic reticulum recruitment and intracellular replication of *Legionella pneumophila*. Infect. Immun. **79:**1936–1950. http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00805-10.
29. **Kessler A, Schell U, Sahr T, Tiaden A, Harrison C, Buchrieser C, Hilbi H.** 2013. The *Legionella pneumophila* orphan sensor kinase LqsT regulates competence and pathogen-host interactions as a component of the LAI-1 circuit. Environ. Microbiol. **15:**646–662. http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02889.x.
30. **Charpentier X, Gabay JE, Reyes M, Zhu JW, Weiss A, Shuman HA.** 2009. Chemical genetics reveals bacterial and host cell functions critical for type IV effector translocation by *Legionella pneumophila*. PLoS Pathog. **5:**e1000501. http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000501.
31. **de Felipe KS, Glover RT, Charpentier X, Anderson OR, Reyes M, Pericone CD, Shuman HA.** 2008. *Legionella* eukaryotic-like type IV substrates interfere with organelle trafficking. PLoS Pathog. **4:**e1000117. http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000117.
32. **Faucher SP, Mueller CA, Shuman HA.** 2011. *Legionella pneumophila* transcriptome during intracellular multiplication in human macrophages. Front. Microbiol. **2:**60. http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2011.00060.
33. **Marchler-Bauer A, Anderson J, Chitsaz F, Derbyshire M, DeWeese-Scott C, Fong J, Geer L, Geer R, Gonzales N, Gwadz M, He S, Hurwitz D, Jackson J, Ke Z, Lanczycki C, Liebert C, Liu C, Lu F, Lu S, Marchler G, Mullokandov M, Song J, Tasneem A, Thanki N, Yamashita R, Zhang D, Zhang N, Bryant S.** 2009. CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. Nucleic Acids Res. **37:**D205–D210. http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkn845.
34. **Wan X, Tuckerman J, Saito J, Freitas T, Newhouse J, Denery J, Galperin M, Gonzalez G, Gilles-Gonzalez M, Alam M.** 2009. Globins synthesize the second messenger bis-(3′-5′)-cyclic diguanosine monophosphate in bacteria. J. Mol. Biol. **388:**262–270. http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2009.03.015.
35. **Ross P, Weinhouse H, Aloni Y, Michaeli D, Weinberger-Ohana P, Mayer R, Braun S, de Vroom E, van der Marel GA, van Boom JH, Benziman M.** 1987. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. Nature **325:**279–281. http://dx.doi.org/10.1038/325279a0.
36. **Wiater LA, Sadosky AB, Shuman HA.** 1994. Mutagenesis of *Legionella pneumophila* using Tn*903* dlllacZ: identification of a growth-phase-regulated pigmentation gene. Mol. Microbiol. **11:**641–653. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00343.x.
37. **Byrne B, Swanson MS.** 1998. Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions. Infect. Immun. **66:**3029–3034.
38. **Sahr T, Brüggemann H, Jules M, Lomma M, Albert-Weissenberger C, Cazalet C, Buchrieser C.** 2009. Two small ncRNAs jointly govern virulence and transmission in *Legionella pneumophila*. Mol. Microbiol. **72:**741–762. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06677.x.
39. **Molofsky AB, Swanson MS.** 2004. Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle. Mol. Microbiol. **53:**29–40. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04129.x.
40. **Hammer BK, Tateda ES, Swanson MS.** 2002. A two-component regulator induces the transmission phenotype of stationary-phase *Legionella pneumophila*. Mol. Microbiol. **44:**107–118. http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02884.x.
41. **Liu T, Mirschberger C, Chooback L, Arana Q, Dal Sacco Z, MacWilliams H, Clarke M.** 2002. Altered expression of the 100 kDa subunit of the Dictyostelium vacuolar proton pump impairs enzyme assembly, endocytic function and cytosolic pH regulation. J. Cell Sci. **115:**1907–1918.
42. **Luo ZQ.** 2012. *Legionella* secreted effectors and innate immune responses. Cell. Microbiol. **14:**19–27. http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01713.x.
43. **Liu Y, Luo ZQ.** 2007. The *Legionella pneumophila* effector SidJ is required for efficient recruitment of endoplasmic reticulum proteins to the bacterial phagosome. Infect. Immun. **75:**592–603. http://dx.doi.org/10.1128/IAI.01278-06.
44. **Ragaz C, Pietsch H, Urwyler S, Tiaden A, Weber SS, Hilbi H.** 2008. The *Legionella pneumophila* phosphatidylinositol-4 phosphate-binding type IV substrate SidC recruits endoplasmic reticulum vesicles to a replication-permissive vacuole. Cell. Microbiol. **10:**2416–2433. http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01219.x.
45. **Ingmundson A, Delprato A, Lambright DG, Roy CR.** 2007. *Legionella pneumophila* proteins that regulate Rab1 membrane cycling. Nature **450:**365–369. http://dx.doi.org/10.1038/nature06336.
46. **Levi A, Folcher M, Jenal U, Shuman HA.** 2011. Cyclic diguanylate signaling proteins control intracellular growth of *Legionella pneumophila*. mBio **2**(1):00316–10. http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00316-10.
47. **Kumar M, Chatterji D.** 2008. Cyclic di-GMP: a second messenger required for long-term survival, but not for biofilm formation, in *Mycobacterium smegmatis*. Microbiology **154:**2942–2955. http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.2008/017806-0.
48. **Tarutina M, Ryjenkov D, Gomelsky M.** 2006. An unorthodox bacteriophytochrome from *Rhodobacter sphaeroides* involved in turnover of the second messenger c-di-GMP. J. Biol. Chem. **281:**34751–34758. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M604819200.
49. **Ferreira R, Antunes L, Greenberg E, McCarter L.** 2008. *Vibrio parahaemolyticus* ScrC modulates cyclic dimeric GMP regulation of gene expression relevant to growth on surfaces. J. Bacteriol. **190:**851–860. http://dx.doi.org/10.1128/JB.01462-07.
50. **Kulasakara H, Lee V, Brencic A, Liberati N, Urbach J, Miyata S, Lee D, Neely A, Hyodo M, Hayakawa Y, Ausubel F, Lory S.** 2006. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3′-5′)-cyclic-GMP in virulence. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **103:**2839–2844. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0511090103.
51. **Massie JP, Reynolds EL, Koestler BJ, Cong JP, Agostoni M, Waters CM.** 2012. Quantification of high-specificity cyclic diguanylate signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **109:**12746–12751. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1115663109.
52. **Hobley L, Fung RK, Lambert C, Harris MA, Dabhi JM, King SS, Basford SM, Uchida K, Till R, Ahmad R, Aizawa S, Gomelsky M, Sockett RE.** 2012. Discrete cyclic di-GMP-dependent control of bacterial predation versus axenic growth in *Bdellovibrio bacteriovorus*. PLoS Pathog. **8:**e1002493. http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002493.
53. **Wu C, Cheng YY, Yin H, Song XN, Li WW, Zhou XX, Zhao LP, Tian LJ, Han JC, Yu HQ.** 2013. Oxygen promotes biofilm formation of *Shewanella putrefaciens* CN32 through a diguanylate cyclase and an adhesin. Sci. Rep. **3:**1945. http://dx.doi.org/10.1038/srep01945.
54. **Kubori T, Shinzawa N, Kanuka H, Nagai H.** 2010. *Legionella* metaeffector exploits host proteasome to temporally regulate cognate effector. PLoS Pathog. **6:**e1001216. http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1001216.

Downloaded from http://iai.asm.org/ on February 27, 2014 by UNIV CLAUDE BERNARD

55. **Gal-Mor O, Segal G.** 2003. Identification of CpxR as a positive regulator of *icm* and *dot* virulence genes of *Legionella pneumophila*. J. Bacteriol. **185:**4908–4919. http://dx.doi.org/10.1128/JB.185.16.4908-4919.2003.
56. **Zusman T, Aloni G, Halperin E, Kotzer H, Degtyar E, Feldman M, Segal G.** 2007. The response regulator PmrA is a major regulator of the icm/dot type IV secretion system in *Legionella pneumophila* and *Coxiella burnetii*. Mol. Microbiol. **63:**1508–1523. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05604.x.
57. **Altman E, Segal G.** 2008. The response regulator CpxR directly regulates expression of several *Legionella pneumophila* icm/dot components as well as new translocated substrates. J. Bacteriol. **190:**1985–1996. http://dx.doi.org/10.1128/JB.01493-07.
58. **Rasis M, Segal G.** 2009. The LetA-RsmYZ-CsrA regulatory cascade, together with RpoS and PmrA, post-transcriptionally regulates stationary phase activation of *Legionella pneumophila* Icm/Dot effectors. Mol. Microbiol. **72:**995–1010. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06705.x.
59. **Chen J, Reyes M, Clarke M, Shuman HA.** 2007. Host cell-dependent secretion and translocation of the LepA and LepB effectors of *Legionella pneumophila*. Cell Microbiol. **9:**1660–1671. http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00899.x.
60. **Ninio S, Zuckman-Cholon DM, Cambronne ED, Roy CR.** 2005. The *Legionella* IcmS-IcmW protein complex is important for Dot/Icm-mediated protein translocation. Mol. Microbiol. **55:**912–926. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04435.x.

Downloaded from http://iai.asm.org/ on February 27, 2014 by UNIV CLAUDE BERNARD

Supplemental Material

Les tableaux S1, S2 et S3 indiqués dans l'article n°1 correspondent aux tableaux présentés dans les fiches techniques n°1, n°2 et n°3 de ce manuscrit.

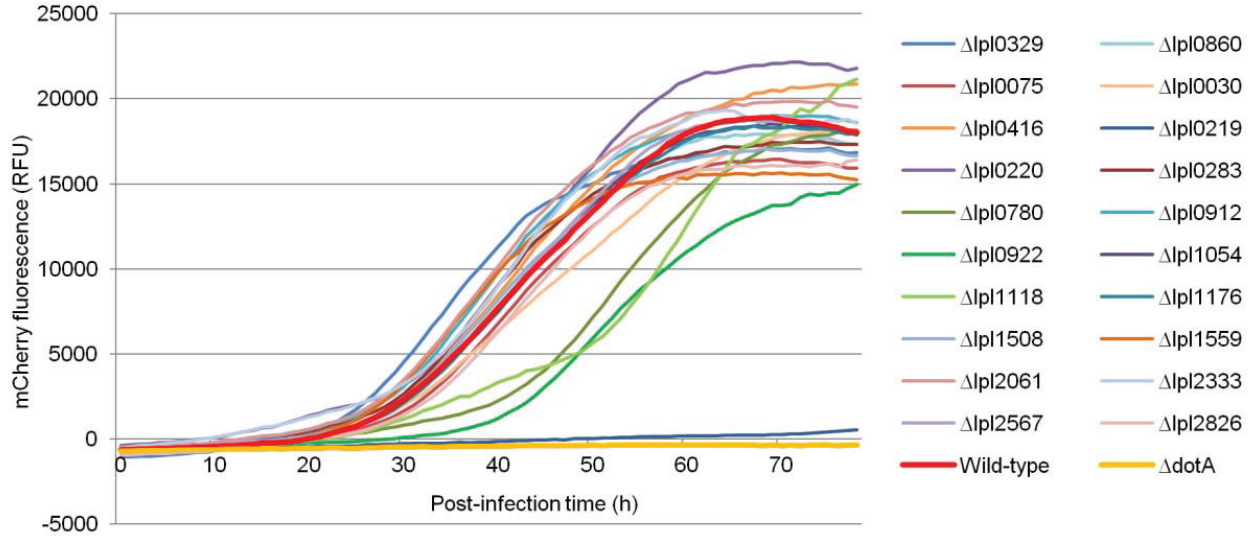


Figure S1: Only Δ*lpl0780*, Δ*lpl0922* and Δ*lpl1118* mutant strains exhibit an altered intracellular replication in *A. castellanii*.

Intracellular growth of mCherry-producing *L. pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* at an MOI of 10. Bacteria multiplications were automatically monitored by fluorescence as described in "Materials and Methods". Fluorescence data were subjected to background subtractions (uninfected cells).

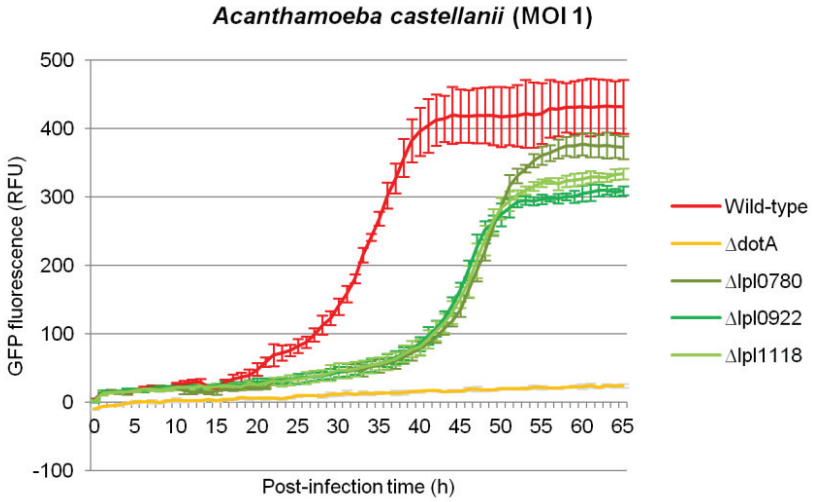


Figure S2 : Δ*lpl0780*, Δ*lpl0922* and Δ*lpl1118* mutant strains exhibit a delayed intracellular replication in *A. castellanii* in comparison to the wild-type strain.

Intracellular growth of GFP-producing *L. pneumophila* in *A. castellanii* at an MOI of 1. Bacteria multiplications were automatically monitored by fluorescence as described in "Materials and

Methods". Fluorescence data were subjected to background subtractions (uninfected cells). Error bars represent standard deviation from three independent experiments performed in quadruplicate.

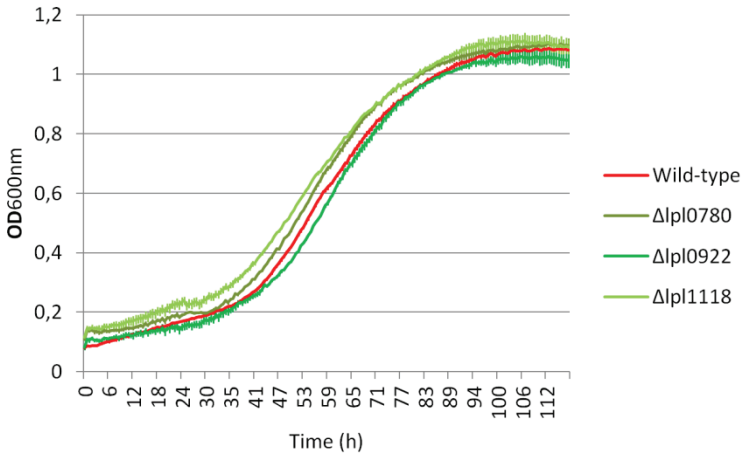


Figure S3: Deletions of *lpl0780, lpl0922* and *lpl1118* do not affect planktonic growth of *L. pneumophila*.

Growth of *L. pneumophila* in LGM for 118 h.

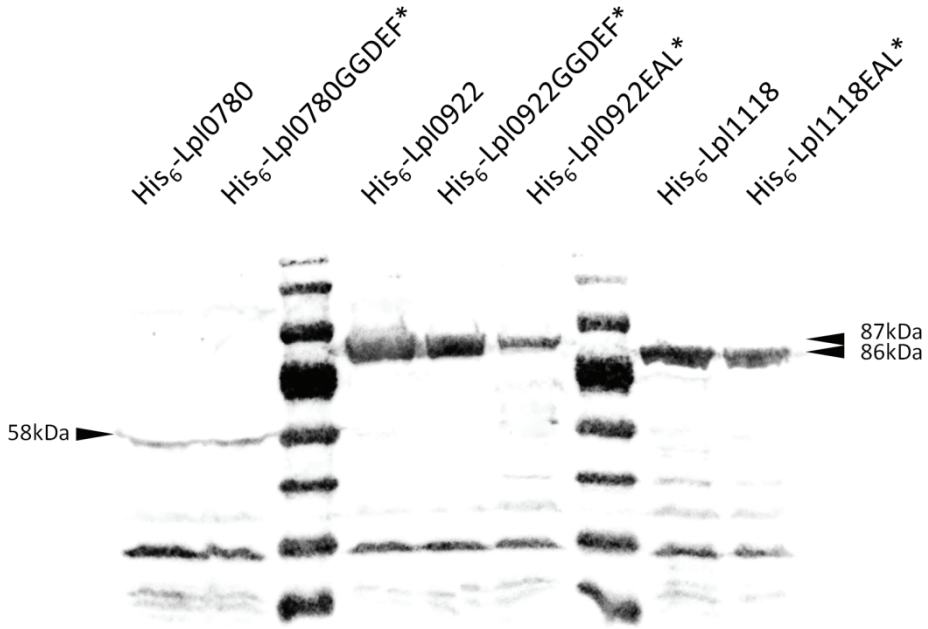


Figure S4 : Stability of proteins carrying catalytic substitutions in comparison to wild-type proteins.

Wild-type or mutated His_6-tagged proteins were overproduced in *E. coli* and then detected by immunoblotting with anti-His_4 antibodies and anti-IgG mouse antibodies coupled with HRP (horseradish peroxidase).

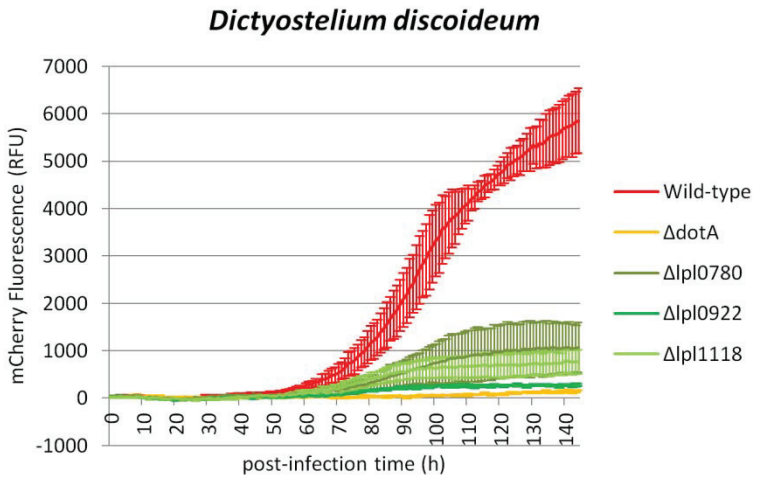


Figure S5 : Lpl0780, Lpl0922 and Lpl1118 are required for intracellular replication in *Dictyostelium discoideum*.

Intracellular growth of mCherry-producing *L. pneumophila* in *Dictyostelium discoideum* at an MOI of 10. Bacteria multiplications were automatically monitored by fluorescence as described in "Materials and Methods". Fluorescence data were subjected to background substractions (uninfected cells). Error bars represent standard deviation from three independent experiments performed in quadruplicate.

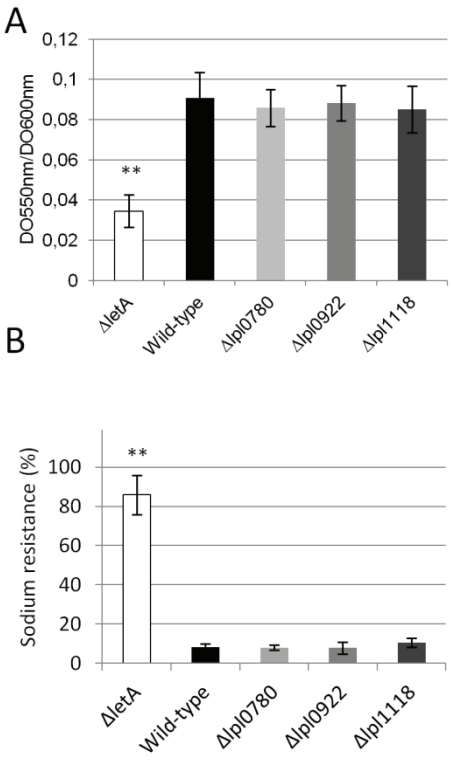


Figure S7: Lpl0780, Lpl0922 and Lpl1118 are not required for the overall transition from replicative phase to transmissive phase.

(A) Pigment production after a 5-day culture in rich liquid medium. *L. pneumophila* cells were grown in LGM for 5 days at 37°C. OD_{600nm} was measured for each culture. After centrifugation (5000 x *g*, 10 min), pigment production was evaluated by measuring OD_{550nm}. Pigment production was corrected in function of cellular density (OD_{550nm}/OD_{600nm}). Δ*letA* mutant strain are used as positive control (1).

(B) Sodium sensitivity. *L. pneumophila* bacterial suspensions from 3-day cultures on BCYE agar plates were diluted and spotted on BCYE agar plates supplemented or not with 100mM NaCl for colony enumeration. Percentage of sodium resistance was calculated by comparison of *L. pneumophila* CFUs obtained onto NaCl supplemented BCYE and BCYE agar plates. Δ*letA* mutant strain are used as positive control (1).

Error bars represent standard deviation from three independent experiments. The results were statistically analyzed by using a Student *t* test. **, *p*-value < 0.05.

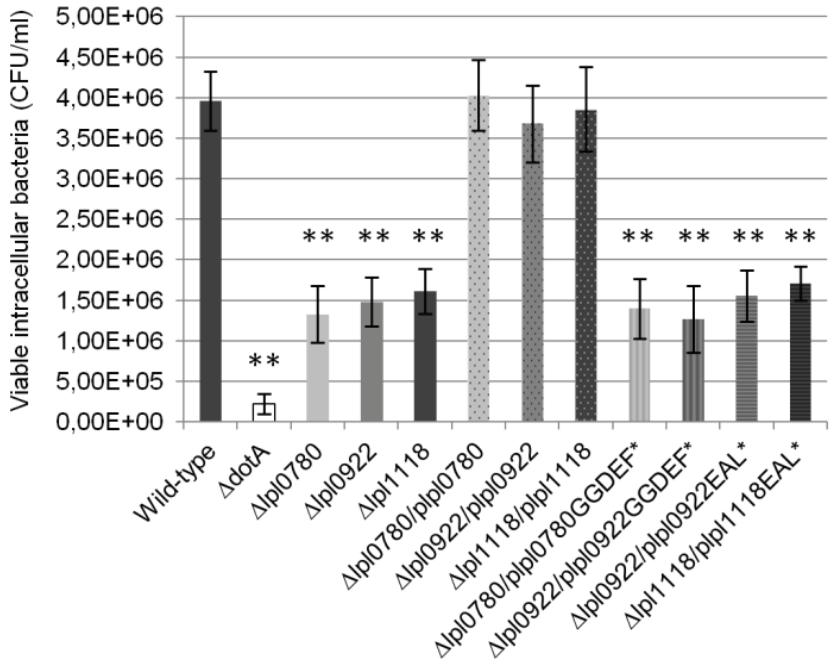


Figure S7 : Lpl0780, Lpl0922 and Lpl1118 are required for early survival of *L. pneumophila* in U937 human macrophages.

Viable intracellular bacteria after gentamicin treatment and host-cells lysis 2 h post-infection of U937 human macrophages. The results were statistically analyzed by using a Student *t* test. **, *p*-value < 0.05. Error bars represent standard deviation from three independent experiments performed in triplicate.

References

1. **Sahr T, Brüggemann H, Jules M, Lomma M, Albert-Weissenberger C, Cazalet C, Buchrieser C.** 2009. Two small ncRNAs jointly govern virulence and transmission in *Legionella pneumophila*. Mol Microbiol **72:**741-762.

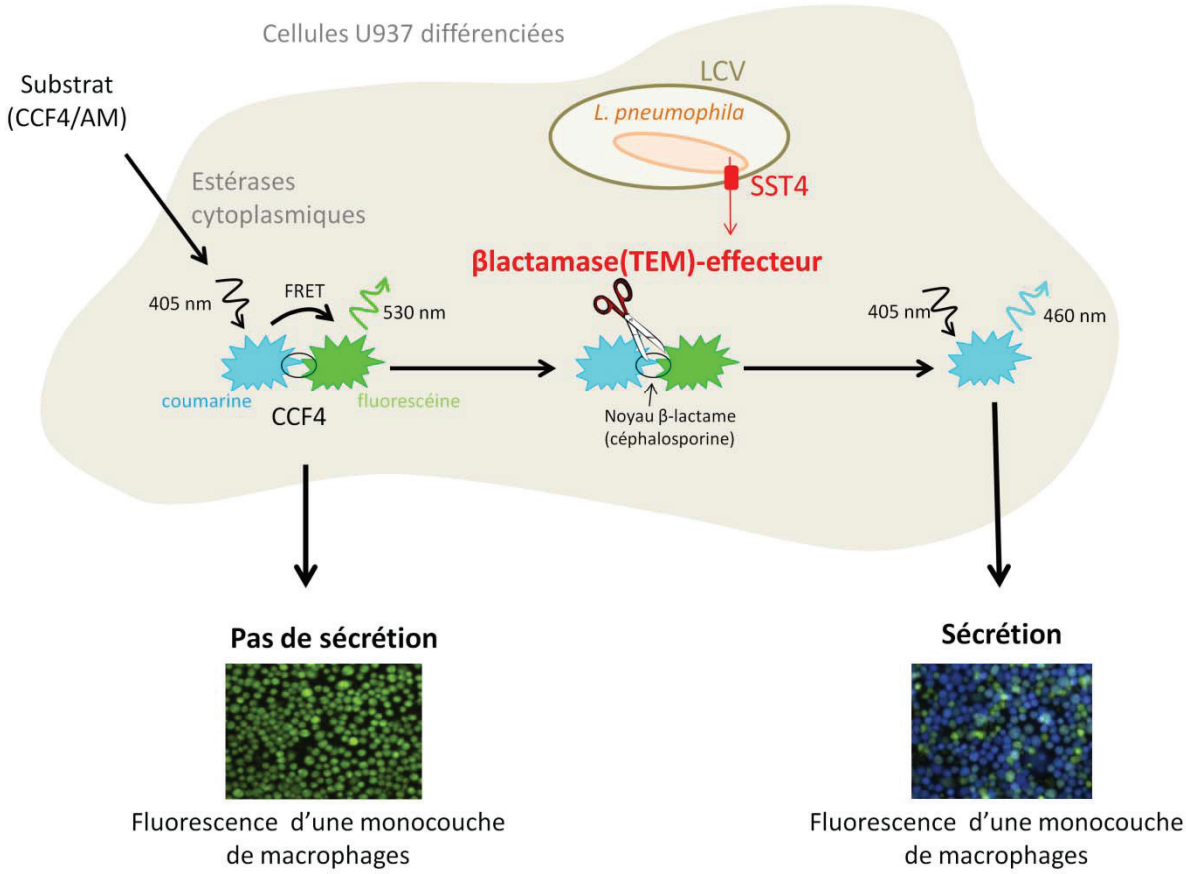


Figure 89 : Principe du test de sécrétion des effecteurs de *L. pneumophila* utilisant le CCF4
Le principe de ce test est explicité précisément dans le texte.
Les deux clichés ont été obtenus par observation par microscopie à épifluorescence de monocouche de macrophages infectés avec des *L. pneumophila* produisant une fusion de la β-lactamase avec l'effecteur LepA sécrété par le SST4 Dot/Icm (monocouche fluoresçant en bleu), ou avec la protéine cytoplasmique FabI (monocouche fluoresçant en vert). Clichés de microscopie à fluorescence : (Charpentier *et al.,* 2009).

4.1.2 Résultats complémentaires

Les trois voies de signalisation à diGMPc identifiées sont requises pour la sécrétion optimale des effecteurs à l'intérieur de la cellule-hôte. Afin d'approfondir l'étude du rôle de ces trois voies dans le contrôle de la sécrétion des effecteurs de *L. pneumophila*, j'ai adapté la technique mise en œuvre pour les tests de sécrétion pour pouvoir suivre la sécrétion des différentes protéines fusions β-lactamase-effecteur au cours du temps.

4.1.2.1 Validation de la méthode de suivi de la sécrétion des effecteurs en cinétique

❖ *Validation de la spécificité de la méthode*

La technique utilisée pour réaliser les tests de sécrétion est basée sur technique de FRET (de Felipe *et al.*, 2008, Charpentier *et al.*, 2009). Des souches de *L. pneumophila* produisant des protéines fusions β-lactamase-effecteurs sont utilisées pour infecter des macrophages dérivés de monocytes humains U937 selon les conditions précisées dans la Fiche technique n°10. La stabilité de chaque protéine fusion a été vérifiée par western blot (Figure 6A de l'article n°1). Après une heure d'infection, un substrat spécifique, le CCF4/AM (Invitrogen), est ajouté. Ce substrat, lipophile sous sa forme estérifiée et constitué de fluorochromes bleu (coumarine) et vert (fluorescéine) séparés par un noyau β-lactame (céphalosporine), est naturellement non fluorescent (Figure 89). Lorsqu'il pénètre dans les cellules eucaryotes, il est pris en charge par des estérases cytoplasmiques qui clivent ce substrat produisant une forme non estérifiée et chargée négativement qui sera retenue dans le cytosol (CCF4). La conformation du CCF4 permet un transfert d'énergie (FRET) entre le fluorochrome bleu et le fluorochrome vert (Figure 89) : l'excitation du fluorochrome bleu à 405 nm permet l'excitation du fluorochrome vert, provoquant l'émission d'une fluorescence verte (530 nm). Lorsque la bactérie sécrète la protéine fusion β-lactamase-effecteur, l'activité β-lactamase permet le clivage du noyau β-lactame séparant les deux fluorochromes (Figure 89). Ainsi, lorsque le fluorochrome bleu est excité à 405 nm, la fluorescence émise en réponse est bleue (460 nm) (Figure 89). Le ratio de la fluorescence bleue par rapport à la fluorescence verte permet d'estimer la quantité de protéines fusions présentes dans le cytosol et, par conséquent, l'efficacité de sa sécrétion par le SST4 Dot/Icm.

Cette méthode a été adaptée afin de suivre la sécrétion des différentes protéines fusions au cours du temps. Les infections sont réalisées dans les mêmes conditions que des tests de sécrétion classiques. A différents temps post-infection, une solution de CCCP (Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone) est ajoutée (cf. fiche technique n°10). Cette molécule est un inhibiteur chimique de la force protomotrice (Mitchell *et al.*, 1967) qui bloque notamment la sécrétion des effecteurs via le SST4 Dot/Icm (Charpentier *et al.*, 2009). Ainsi, la détection des protéines fusions β-lactamase-effecteur reflète la quantité de protéines fusions présentes dans le cytosol de la cellule-hôte au moment de l'ajout du CCCP.

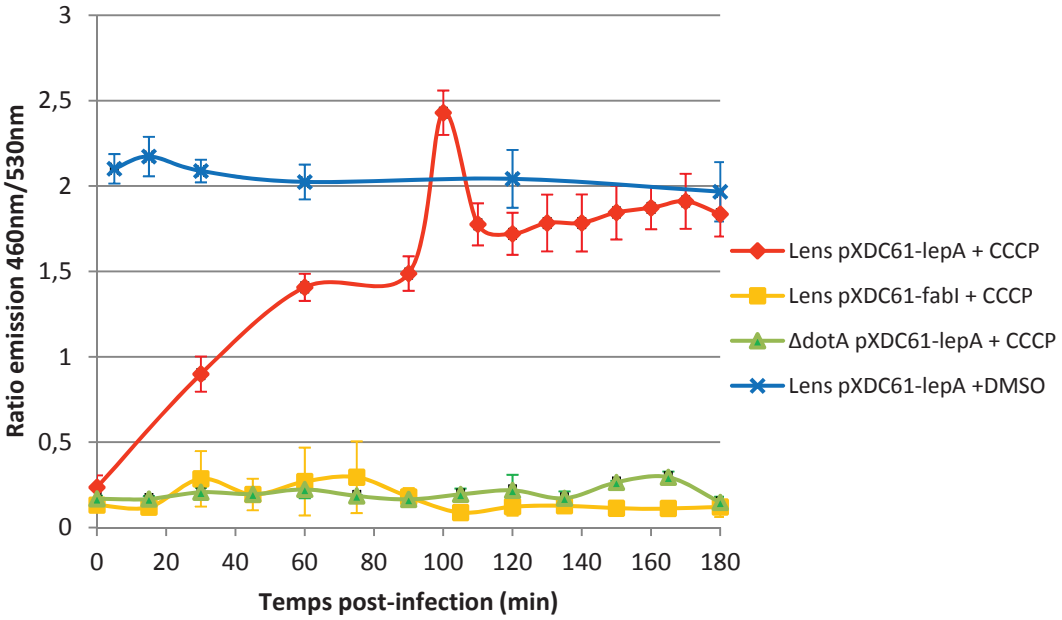


Figure 90 : L'ajout de CCCP au cours de l'infection permet de suivre la cinétique de sécrétion de la protéine fusion β-lactamase-LepA
Cinétique de sécrétion de la protéine fusion β-lactamase-LepA chez la souche sauvage traitée à différents temps post-infection avec un inhibiteur de la force protomotrice, le CCCP (solubilisé en DMSO) (courbe rouge), ou avec du DMSO uniquement (courbe bleue). L'absence de sécrétion de la fusion β-lactamase-LepA a été vérifiée chez le mutant *ΔdotA* (courbe verte), qui ne possède pas de SST4 fonctionnel. L'absence de sécrétion par la souche sauvage d'une protéine cytoplasmique, FabI, a également été confirmée (courbe jaune). Les données présentées sont issues d'au moins 2 expériences indépendantes réalisées en triplicats lors d'infections de cellules U937.

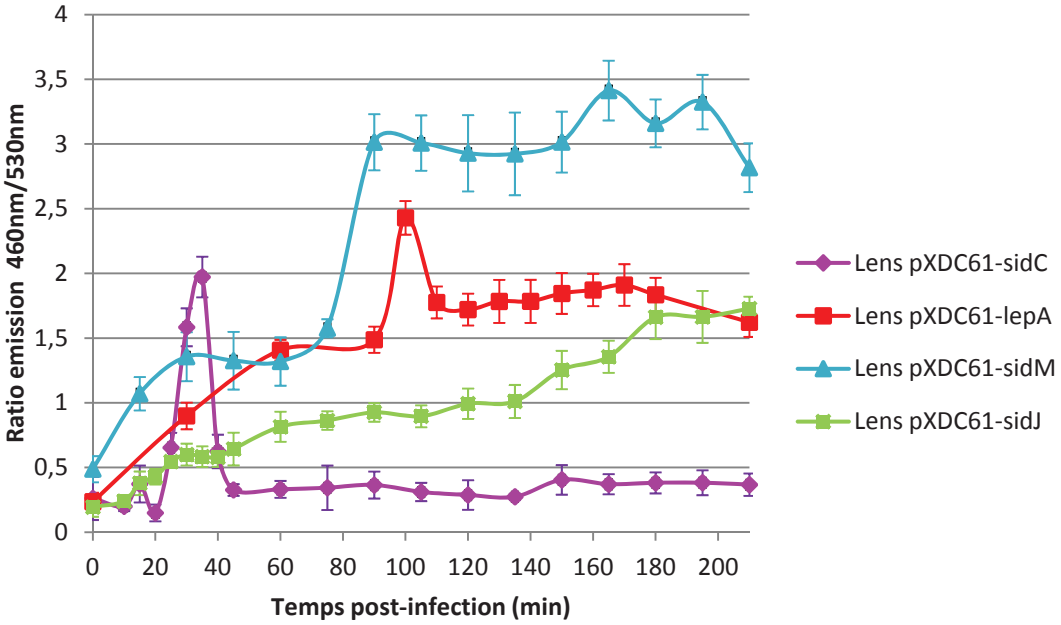


Figure 91 : Les profils de cinétique de sécrétion varient en fonction des différentes protéines fusions
Les profils de sécrétion ont été réalisés dans la souche *L. pneumophila* Lens sauvage exprimant des protéines fusions de la β-lactamase avec différents effecteurs connus : SidC, LepA, SidM et SidJ. Les données présentées sont issues d'au moins 2 expériences indépendantes réalisées en triplicats lors d'infections de cellules U937.

L'effet du CCCP sur la sécrétion a tout d'abord été vérifié pour la protéine fusion β-lactamase-LepA chez la souche sauvage *L. pneumophila* Lens (Figure 90). En présence de CCCP, solubilisé dans du DMSO (Dimethyl sulfoxide), la protéine fusion présente un profil de sécrétion spécifique : elle parait injectée dans l'hôte dès le début de l'infection mais elle est particulièrement accumulée autour de 100 min post-infection (Figure 90). Ce profil n'est pas obtenu lorsque les infections sont traitées avec du DMSO seul. Dans ces conditions et sachant que la lecture de fluorescence se fait en toute fin de cinétique, il apparait que la sécrétion a lieu avec la même efficacité quel que soit le temps post-infection auquel le DMSO a été ajouté (Figure 90). Par conséquent, la sécrétion est bien stoppée en présence de CCCP mais pas en présence de DMSO seul. Comme attendu, la protéine fusion β-lactamase-FabI n'est pas sécrétée par la souche *L. pneumophila* Lens sauvage puisque FabI n'est pas un effecteur mais une protéine cytoplasmique. De même, la protéine fusion β-lactamase-LepA n'est pas sécrétée par la souche avirulente Δ*dotA*, dont le SST4 Dot/Icm n'est pas fonctionnel (Figure 90). L'ensemble de ces témoins permet de conclure que l'évolution de la quantité de la protéine hybride β-lactamase-LepA dans le cytosol des cellules infectées au cours du temps est bien due au mécanisme de sécrétion par le SST4 Dot/Icm (et non à une fuite du contenu bactérien au cours de l'infection) et que cette sécrétion est stoppée efficacement par le CCCP.

❖ *Diversité des profils de sécrétion obtenus en fonction des effecteurs*

Le suivi de la sécrétion a été réalisé pour des protéines fusions associant la β-lactamase à d'autres effecteurs que LepA (Figure 91). Les profils de sécrétion obtenus dépendent de l'effecteur testé. Les 4 exemples choisis dans la Figure 91 en sont l'illustration. Comme cela a été décrit précédemment, la fusion β-lactamase-LepA est sécrétée dès le début de l'infection, puis elle est accumulée progressivement avec une accélération notable se traduisant par un pic autour de 100 min post-infection (Figure 91). Au contraire, la protéine fusion β-lactamase-SidC n'est présente dans la cellule-hôte qu'entre 20 min et 45 min post-infection (Figure 91). En dehors de cet intervalle de temps, la fusion ne semble pas présente comme le suggère le ratio de fluorescence inférieur à 0,5 qui correspond au ratio observé pour la protéine fusion non sécrétée β-lactamase-FabI (Figure 90). La sécrétion de la protéine fusion β-lactamase-SidM présente un profil « en plateau » (Figure 91). Elle est sécrétée dès le début de l'infection et s'accumule particulièrement rapidement entre 75 min et 90 min post-infection. Ensuite, sa présence reste stable dans la cellule-hôte, au contraire de la fusion β-lactamase-LepA (Figure 91). Enfin, la fusion β-lactamase-SidJ présente encore un autre type de profil de sécrétion (Figure 91). La protéine fusion est sécrétée dès le début de l'infection et s'accumule progressivement et de façon relativement constante dans la cellule-hôte.

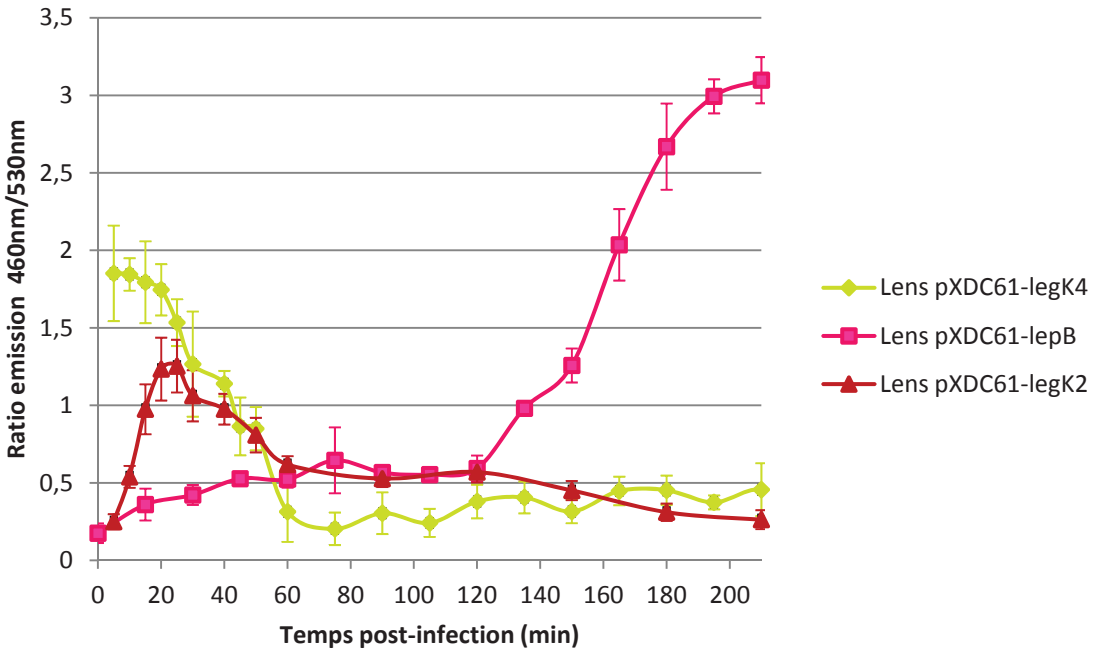


Figure 92 : La sécrétion des protéines fusions peut être précoce ou tardive en fonction des effecteurs concernés.

Parmi les 9 constructions testées, les fusions traductionnelles β-lactamase-LegK4 et β-lactamase-LegK2 sont les fusions qui sont sécrétées le plus rapidement alors que la fusion β-lactamase-LepB est la plus tardive. Les données présentées sont issues d'au moins 2 expériences indépendantes réalisées en triplicats lors d'infections de cellules U937.

Ces différences de profils indiquent qu'il existe des fenêtres de temps, larges ou étroites, plus ou moins favorables à la sécrétion selon l'effecteur concerné. Les profils en pics, observé notamment pour la fusion β-lactamase-SidC, suggèrent que les effecteurs concernés peuvent être dégradés une fois dans la cellule-hôte, que ce soit activement ou par instabilité intrinsèque. Il est difficile, à ce stade, de dire si un profil en plateau, comme celui de la fusion β-lactamase-SidM, est dû à un arrêt de la sécrétion après 100 min ou à la dégradation de la protéine fusion compensée par une sécrétion persistante. Cependant, les différences de profils de sécrétion observés pour les différentes protéines fusions mettent en évidence que la sécrétion et la disponibilité dans la cellule-hôte de chaque effecteur est contrôlée spécifiquement au cours du temps.

- *Sécrétion précoce et tardive des effecteurs*

L'obtention de cinétique de sécrétion pour des protéines fusions supplémentaires a révélé un important contrôle temporel de la sécrétion des effecteurs. En effet, certaines protéines fusions sont sécrétées dans l'hôte très précocement, comme celles contenant LegK4 ou LegK2 alors que d'autres sont injectées beaucoup plus tardivement, comme la fusion β-lactamase-LepB (Figure 92). La sécrétion de la fusion β-lactamase-LegK4 est extrêmement précoce car la protéine est massivement présente dans la cellule-hôte dès 5 min post-infection, puis sa présence diminue progressivement jusqu'à n'être plus détectée à partir d'1h post-infection (Figure 92). La sécrétion de la fusion β-lactamase-LegK2 est légèrement moins précoce. Elle est particulièrement accumulée autour de 20 min post-infection, puis sa présence s'estompe (Figure 92). La fusion β-lactamase-LepB est la fusion qui est sécrétée le plus tardivement parmi les 9 protéines fusions testées. Elle n'est sécrétée qu'à partir de 120 min post-infection (Figure 92).

Le contrôle que *L. pneumophila* exerce sur la sécrétion de ces effecteurs est spécifique pour chaque effecteur et permet d'orchestrer temporellement la sortie de chacun de ces effecteurs. Certains effecteurs, probablement nécessaires au début du cycle infectieux, sont sécrétés très rapidement après le démarrage du cycle infectieux alors que d'autres probablement requis plus tardivement sont exportés plus tard au cours du cycle.

- *Lien entre la séquentialité de la sécrétion des effecteurs et la séquentialité fonctionnelle*

Certains effecteurs sont connus pour agir séquentiellement dans la cellule-hôte. C'est le cas des effecteurs de *L. pneumophila* impliqués dans le détournement de la petite GTPase RAB1 (Figure 14 p. 36). SidM est requise pour l'ancrage de RAB1 sur la LCV et pour son blocage en forme activée par AMPylation (Machner *et al.*, 2006, Müller *et al.*, 2010). L'effecteur AnkX est nécessaire pour la phosphocholination de RAB1, permettant également son blocage sous sa forme active (Mukherjee *et al.*, 2011). LidA assume également un rôle d'activation de RAB1 ainsi qu'une fonction de protection

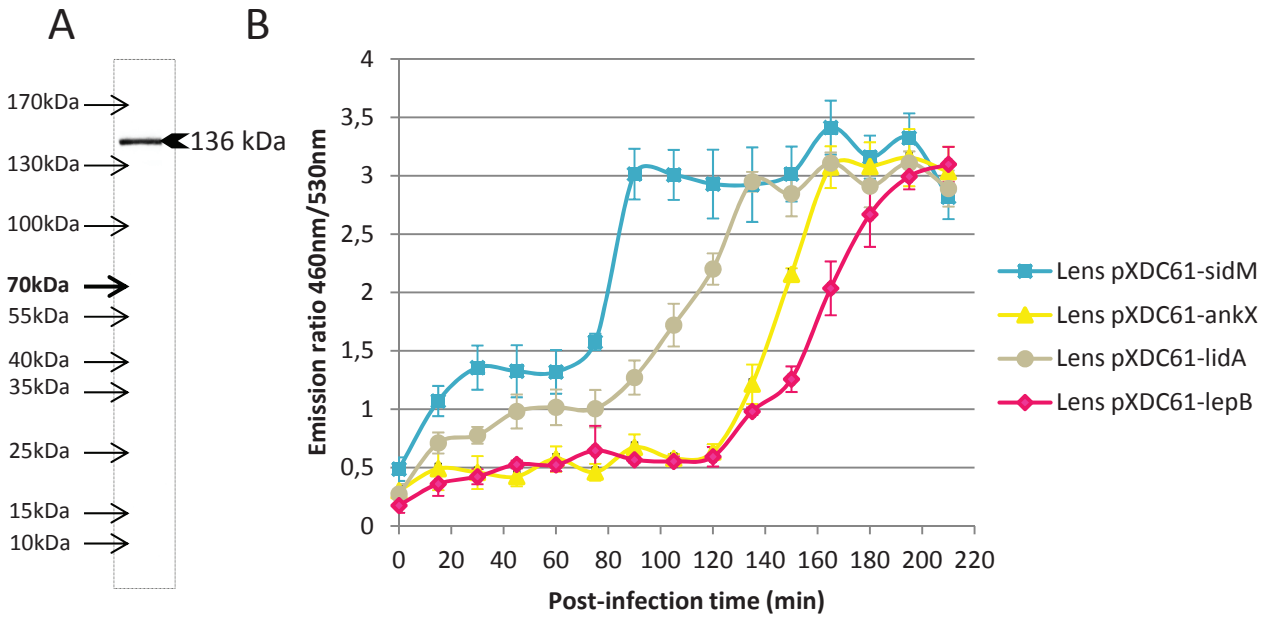


Figure 93 : Les effecteurs agissant séquentiellement sur la biogénèse de la LCV sont sécrétées successivement.
(A) Western blot de la fusion β-lactamase-AnkX produite par la souche *L. pneumophila* Lens sauvage. La protéine est immunomarquée grâce à un anticorps de lapin dirigé contre la β-lactamase et un anticorps secondaire dirigé contre les IgG (immunoglobuline G) de lapin et couplé à une peroxydase. (B) Cinétique de sécrétion des fusions de la β-lactamase avec les effecteurs SidM, AnkX, LidA et LepB. Dans le cycle infectieux, ces effecteurs agissent séquentiellement sur le détournement de la petite GTPase RAB1 de l'hôte (cf. figure 14 p. 36). Les données présentées sont issues d'au moins 2 expériences indépendantes réalisées en triplicats lors d'infections de cellules U937.

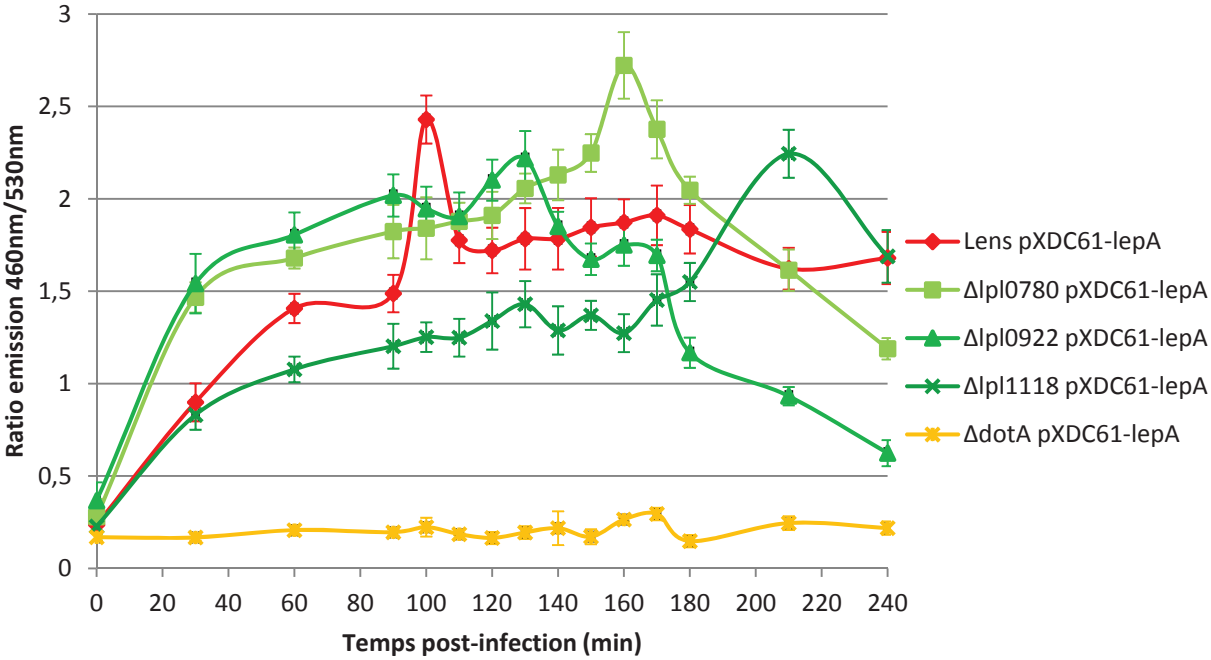


Figure 94 : Les souches *Δlpl0780*, *Δlpl0922* et *Δlpl1118* sont affectées dans l'orchestration de la sécrétion de la fusion β-lactamase-LepA.
La sécrétion de la fusion β-lactamase-LepA par les souches de *L. pneumophila* Lens sauvage, *Δlpl0780*, *Δlpl0922*, *Δlpl1118* et *ΔdotA* a été suivie. Les données présentées sont issues d'au moins 2 expériences indépendantes réalisées en triplicats lors d'infections de cellules U937.

(Schoebel *et al.*, 2011) de sa désactivation par d'autres effecteurs tels que LepB (Mihai Gazdag *et al.*, 2013).

Les fusions traductionnelles de la β-lactamase avec 3 de ces effecteurs ont été créées pour les tests de sécrétion classiques et leur stabilité a été validée par western blot (voir Figure 6A dans l'article n°1). La fusion β-lactamase-AnkX a été construite pour cette étude. Sa stabilité a également été vérifiée par western blot (Figure 93A). Ces 4 protéines fusions présentent un profil de sécrétion en plateau (Figure 93B). Cependant, leur accumulation est orchestrée différemment au cours du temps (Figure 93B). La fusion β-lactamase-SidM s'accumule plus précocement que les autres protéines fusions (Figure 93B) : le ratio de fluorescence 460 nm/530 nm dépasse 1,5 à partir de 80 min post-infection, ce niveau n'est atteint qu'à partir de 95 min, 135 min et 150 min post-infection pour les fusions contenant AnkX, LidA et LepB, respectivement (Figure 93B).

La séquentialité de la sécrétion de ces 4 protéines fusions respecte parfaitement la séquentialité d'action des effecteurs qu'elles contiennent. Ainsi, la protéine SidM peut ancrer RAB1 sur la LCV avant que les effecteurs AnkX et LidA bloquent RAB1 sous sa forme active, puis enfin que l'effecteur LepB la désactive. Cette séquentialité de sécrétion suggère que *L. pneumophila* contrôle l'ordre de sortie de ses plus de 300 effecteurs très spécifiquement, permettant ainsi uniquement la sortie des effecteurs nécessaires à chaque instant du cycle infectieux.

Cette méthode permet donc de suivre spécifiquement la sécrétion des protéines fusions β-lactamase-effecteur au cours du temps. Elle est assez sensible pour révéler la sécrétion séquentielle d'effecteurs qui agissent successivement et est assez « robuste » pour permettre d'obtenir des résultats reproductibles : chaque expérience a été reproduite entre 2 et 6 fois en triplicats et les écart-types restent néanmoins relativement faibles. Ainsi, les tests effectués avec cette technique ont permis de mettre en lumière l'orchestration temporelle très fine que *L. pneumophila* exerce sur la sécrétion de ses effecteurs.

4.1.2.2 Lpl0780, Lpl0922 et Lpl1118 semblent participer à l'orchestration de la sécrétion des effecteurs

La méthode de suivi de la sécrétion de protéines fusions β-lactamase-effecteur au cours du temps a été utilisée pour approfondir l'étude des trois voies de signalisation à diGMPc nécessaires à la virulence de *L. pneumophila*. En effet, les trois voies impliquant les protéines à domaines GGDEF et/ou EAL Lpl0780, Lpl0922 et Lpl1118 participent au contrôle de la sécrétion des effecteurs du SST4 Dot/Icm (Allombert *et al.*, 2014).

La sécrétion de la protéine fusion β-lactamase-LepA par les souches délétées pour les gènes *lpl0780*, *lpl0922* ou *lpl1118* a tout d'abord été suivie et comparée à celle de la souche sauvage *L.*

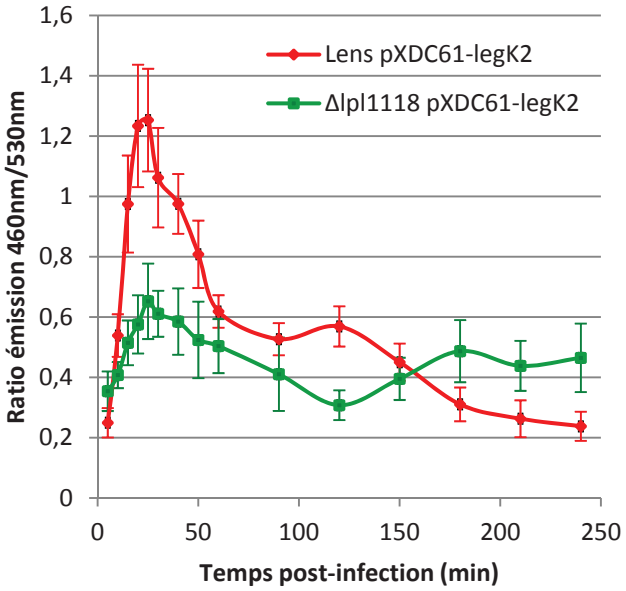


Figure 95 : La souche *Δlpl1118* est altérée dans la sécrétion de la fusion β-lactamase-LegK2.
La sécrétion de la fusion β-lactamase-LegK2 a été suivie pour la souche sauvage et pour le mutant *Δlpl1118* uniquement. Les données présentées sont issues d'au moins 2 expériences indépendantes réalisées en triplicats lors d'infections de cellules U937.

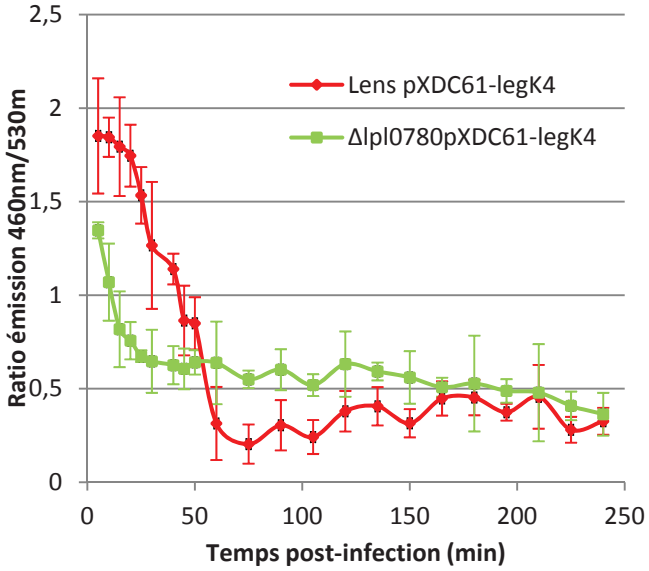


Figure 96 : La souche *Δlpl0780* est altérée dans la sécrétion de la fusion β-lactamase-LegK4.
La sécrétion de la fusion β-lactamase-LegK4 a été suivie pour la souche sauvage et pour le mutant *Δlpl0780* uniquement. Les données présentées sont issues d'au moins 2 expériences indépendantes réalisées en triplicats lors d'infections de cellules U937.

pneumophila Lens. Comme observé précédemment, la souche sauvage présente une accumulation spécifique de la protéine fusion dans le cytosol des cellules-hôtes autour de 100 min post-infection (Figure 94). Comme attendu, la souche témoin Δ*dotA*, sans SST4 Dot/Icm fonctionnel, ne sécrète pas cette protéine fusion (Figure 94). Chacune des souches mutantes présente une cinétique de sécrétion de la fusion β-lactamase-LepA différente de celle de la souche sauvage (Figure 94) alors que l'expression et la stabilité de la protéine fusion ne varie pas dans les différents contextes génétiques (Figure 6A de l'article n°1). La souche Δ*lpl0780,* de même que la souche Δ*lpl0922,* sécrète la protéine fusion tout d'abord plus efficacement que la souche sauvage : à 30 min post-infection le ratio de fluorescence dans ces mutants est supérieur d'un facteur 2 environ au ratio obtenu avec la souche sauvage (Figure 94). De plus, ces deux souches mutantes ne présentent pas le pic de présence maximale de la protéine fusion autour de 100 min post-infection : les cellules infectées par les souches Δ*lpl0780* et Δ*lpl0922* accumulent un maximum de la fusion β-lactamase-LepA autour de 160 min et 130 min post-infection, respectivement (Figure 94). La souche Δ*lpl1118* est affectée différemment. La fusion est tout d'abord sécrétée moins efficacement que chez la souche sauvage puisqu'à 60 min post-infection le ratio obtenu pour le mutant est diminué de 25% par rapport à la souche sauvage (Figure 94). La fusion s'accumule au maximum dans le cytosol ensuite autour de 210 min plutôt qu'à environ 100 min post-infection (Figure 94). Les trois souches Δ*lpl0780*, Δ*lpl0922* et Δ*lpl1118* présentent une dérégulation temporelle spécifique de la sécrétion de la fusion β-lactamase-LepA par rapport à la souche sauvage qui se traduit par un taux anormalement faible ou anormalement élevé de la sécrétion de la protéine fusion en fonction du temps que l'on considère.

Afin de poursuivre l'analyse des phénotypes des trois souches mutantes, la sécrétion d'autres protéines fusions a été initiée. Les résultats préliminaires mettent en évidence que la sécrétion d'autres effecteurs que LepA semble dérégulée dans les souches invalidées.

Ainsi, par exemple, la sécrétion de la fusion β-lactamase-LegK2 a été suivie pour la souche sauvage et pour la souche Δ*lpl1118* uniquement. La sécrétion de la protéine fusion est altérée pour la souche mutante : à 25 min post-infection, le ratio de fluorescence observé pour la souche mutante est diminué d'un facteur 2 environ par rapport à la souche sauvage, traduisant une réduction de la l'efficacité de la sécrétion entre les deux souches (Figure 95). Les profils de sécrétion de la fusion β-lactamase-LegK4 ont été également obtenus pour la souche sauvage et la souche mutante Δ*lpl0780* (Figure 96). Là encore, la sécrétion par la souche mutante est altérée : dès 10 min post-infection, le ratio de fluorescence observé pour la souche Δ*lpl0780* est diminué d'environ 45% par rapport au ratio obtenu pour la souche sauvage (Figure 96). Les cinétiques des souches Δ*lpl1118* et Δ*lpl0780* ne présentent pas un décalage de la sécrétion comme cela a été observée pour la fusion β-lactamase LepA (Figure 94), suggérant que ces souches mutantes ne sont pas uniquement dérégulées dans le

contrôle temporel de la sécrétion de certains effecteurs mais pourraient présenter des défauts plus globaux de l'efficacité de sécrétion d'autres effecteurs. Ces données seront à compléter par l'obtention des cinétiques pour les deux souches manquantes pour chaque protéine fusion.

La cinétique de sécrétion des fusions β-lactamase-effecteur testées est affectée dans chacune des trois souches mutantes. Les protéines Lpl0780, Lpl0922 et Lpl1118 sont donc nécessaires pour orchestrer la sécrétion des effecteurs au cours de l'infection. Le fait que chaque souche mutante présente une altération différente, notamment de la sécrétion de la fusion β-lactamase-LepA, suggère que les trois protéines interviennent à un niveau différent dans ce mécanisme de contrôle et que les trois voies de signalisation à diGMPc dans lesquelles elles sont impliquées ne visent probablement pas les mêmes cibles moléculaires.

4.1.3 Discussion

La stratégie de délétion systématique des gènes codant les protéines à domaines GGDEF et/ou EAL a permis l'identification de trois voies de signalisation à diGMPc nécessaires au contrôle de la virulence de la souche Lens de *L. pneumophila*. Ces voies de signalisation font intervenir trois protéines à activités enzymatiques antagonistes : la DGC Lpl0780, la protéine bifonctionnelle DGC/PDE Lpl0922 et la PDE Lpl1118. Ces trois protéines sont nécessaires à la réplication intracellulaire optimale de *L. pneumophila* dans les cellules hôtes amibiennes et macrophagiques. Elles sont plus particulièrement requises pour l'échappement à la dégradation par la voie endosomale de l'hôte et, pour Lpl1118, pour la biogénèse de la LCV. L'étude plus approfondie des phénotypes de défaut de virulence des trois souches mutantes Δ*lpl0780*, Δ*lpl0922* et Δ*lpl1118* a mis en évidence des altérations de la sécrétion des effecteurs par le SST4 Dot/Icm. Ces résultats, publiés en 2014, sont discutés dans l'article n°1 ci-dessus (Allombert *et al.*, 2014).

Dans le but d'analyser plus précisément les défauts de sécrétion des trois souches mutantes, j'ai adapté une technique existante afin de suivre temporellement la sécrétion des effecteurs de *L. pneumophila*. Du CCCP, un inhibiteur de la chaine respiratoire, a été ajouté à différents temps post-infection afin de bloquer la sécrétion par le SST4 qui est énergie-dépendante. Puis le test de sécrétion, basé sur la technique de FRET mesurant l'activité cytosolique de protéines fusions β-lactamase-effecteurs, a été réalisé. J'ai ainsi obtenu des profils de cinétique de sécrétion pour 9 effecteurs : LepA, SidM, AnkX, LepB, LidA, LegK2, LegK4, SidJ et SidC.

Les résultats que nous avons obtenus donnent des informations sur la disponibilité des effecteurs et sont en cohérence avec d'autres données disponibles dans la littérature. J'ai pu notamment mettre en évidence que la protéine fusion β-lactamase-SidM s'accumule particulièrement dans le cytosol de l'hôte entre 75 min et 195 min post-infection et l'accumulation

de la fusion β-lactamase-LepB débute à partir de 150 min post-infection. Ces résultats sont en cohérence avec les travaux de Neunuebel *et al.* (Neunuebel *et al.*, 2011) dans lesquels des analyses par western blot confirment l'accumulation de l'effecteur SidM entre 1h et 3h post-infection et mettent même en évidence une diminution à partir de 4h post-infection. Ces mêmes travaux révèlent également la présence de LepB à partir de 3h post-infection (Neunuebel *et al.*, 2011). La réalisation de cinétiques de sécrétion sur des temps plus longs permettraient probablement de visualiser la diminution de SidM, qui est déjà peut-être amorcée à 210 min post-infection (Figure 91). Par ailleurs, j'ai pu mettre en évidence que la fusion β-lactamase-LegK2 est présente entre 10 min et 60 min post-infection, avec une accumulation maximale à 20 min post-infection (Figure 92). Cette orchestration de la sécrétion de LegK2 est validée par des expériences d'immunofluorescence menées au laboratoire dans le cadre d'un autre axe de recherche (Michard *et al.*, données non publiées). En effet, ces expériences, permettant de visualiser la localisation de LegK2 sur la LCV, ont été réalisées à divers temps post-infection et révèlent que LegK2 est présente en plus grande quantité à 20 min post-infection (Michard *et al.*). Enfin, j'ai démontré la présence précoce de la fusion β-lactamase-SidC entre 20 min et 45 min post-infection (Figure 91). Celle-ci a pu être observée, sur la LCV, par immunofluorescence à 1h post-infection dans les travaux de Ragaz *et al*. et Brombacher *et al*. (Ragaz *et al.*, 2008, Brombacher *et al.*, 2009). Les différences de conditions expérimentales entre ces travaux et les nôtres expliquent, sans doute, la petite différence de temps observée pour la présence de SidC dans le cytosol de la cellule-hôte.

Les cinétiques de sécrétion que j'ai réalisé ont permis de mettre en évidence différents profils de sécrétion d'effecteurs. L'aspect de certaines de ces cinétiques apparaissent sous forme de « pic » comme pour la fusion contenant SidC, suggérant que les protéines fusions concernées ne sont disponibles dans le cytosol que pendant une courte période. Cette baisse brutale de la disponibilité de ces protéines fusions pourrait refléter l'arrêt de la sécrétion d'un effecteur intrinsèquement instable ou l'augmentation de l'instabilité de ces protéines fusions, éventuellement associée à une baisse de la sécrétion. Afin de déterminer si ces diminutions sont dues à une dégradation des protéines fusions par le protéasome de la cellule-hôte, nous envisageons à très court terme de réaliser la cinétique de sécrétion de SidC en présence d'un inhibiteur du protéasome, le MG132. Ce traitement sera aussi appliqué lors de cinétiques de sécrétion de la fusion β-lactamase-SidM afin de déterminer si l'aspect en « plateau » observé résulte de la stabilité de la protéine dans l'hôte alors qu'elle n'est plus sécrétée, ou d'un équilibre entre la sécrétion de l'effecteur et sa dégradation. Cette dégradation protéosomale, si elle a lieu, pourrait être contrôlée par des métaeffecteurs tels que LubX, absent dans la souche *L. pneumophila* Lens, mais connu pour stimuler la dégradation de l'effecteur SidH dès 1h post-infection par la souche *L. pneumophila* Philadelphia (Kubori *et al.*, 2010). Elle

pourrait aussi dépendre de l'effecteur AnkB, capable d'exploiter la machinerie d'ubiquitinylation de l'hôte et par conséquent la dégradation par le protéasome (Price *et al.*, 2009, Price *et al.*, 2010, Price *et al.*, 2011).

Le contrôle très fin que *L. pneumophila* exerce sur la sécrétion des effecteurs permet probablement à la bactérie de moduler la présence de chaque effecteur au moment du cycle infectieux où il est opportun. Cette hypothèse est supportée par l'obtention de cinétiques de sécrétion spécifiques pour chaque protéine fusion. En effet, certaines fusions sont présentes dans le cytosol uniquement à un moment du cycle infectieux, comme les fusions contenant SidC ou LegK2, d'autres s'accumulent au cours du temps comme celles contenant SidM ou SidJ. De plus, certains effecteurs sont sécrétés précocement, comme LegK2 ou LegK4, alors que d'autres, tels que LepB, sont détectés plus tardivement dans le cytosol de l'hôte. Cette hypothèse est également soutenue par la sécrétion en séquence des effecteurs impliqués dans le détournement de la GTPase RAB1 démontrée par notre étude, ainsi que par les expériences de western blot dans les travaux de Neunuebel *et al.* (Neunuebel *et al.*, 2011). En effet, *L. pneumophila* sécrète SidM, requise notamment pour l'ancrage de RAB1 sur la LCV, avant d'exporter LidA et AnkX, nécessaires pour son activation ; elles-mêmes sont sécrétées avant LepB, impliquée dans l'inactivation et le décrochage de RAB1. Cette supposition est également confortée par l'existence de métaeffecteurs, tels que LubX qui promeut la dégradation de l'effecteur SidH dès 1h post-infection, suggérant qu'il n'est plus utile, voire peut-être néfaste, pour la poursuite du cycle infectieux (Kubori *et al.*, 2010).

La sécrétion d'effecteurs par les souches mutantes Δ*lpl0780*, Δ*lpl0922* et Δ*lpl1118* semble être affectée au vu des cinétiques obtenues pour les fusions de la β-lactamase avec LepA, LegK2 et LegK4. Ces résultats sont en accord avec les données collectées grâce aux tests de sécrétion classiques (publiés dans l'article n°1), et permettent la mise en évidence de défauts qui n'avaient pas pu être observés alors. Ainsi, lors des tests classiques, la sécrétion de la fusion β-lactamase-LepA, mesurée à environ 2h post-infection, ne semblait être affectée que dans la souche Δ*lpl1118* (Figure 6C de l'article n°1). Dans les cinétiques, à 2h post-infection, la sécrétion de cette fusion par la souche Δlpl1118 est effectivement plus faible que celles des autres souches (Figure 94). Toutefois, une altération de la sécrétion de cette protéine fusion β-lactamase-LepA est également visible pour les souches Δ*lpl0780* et Δ*lpl0922*. De même, la sécrétion augmentée de la fusion β-lactamase-LegK4 par la souche Δ*lpl0780* est mise en évidence à 2h post-infection par le suivi en cinétique, bien que les ratio de fluorescence soient très faibles (Figure 96). L'analyse de la sécrétion des effecteurs au cours du temps a permis de révéler des altérations de sécrétion qui n'étaient pas visibles grâce aux tests de sécrétion classiques car la mesure de la sécrétion à 2h post-infection n'est pas adaptée pour certains

effecteurs sécrétés précocement ou tardivement ou sur une durée très courte, comme LegK2, LepB ou SidC.

Les trois souches mutantes sont affectées pour la sécrétion de la protéine fusion β-lactamase-LepA. Ces altérations sont différentes pour chacune des souches et se traduisent principalement par un décalage dans le temps du pic de sécrétion : il a lieu autour de 100 min pour la souche sauvage et à 160 min, 130 min et 210 min post-infection pour les souches Δ*lpl0780*, Δ*lpl0922* et Δ*lpl1118*, respectivement (Figure 94). Ces résultats suggèrent donc une dérégulation temporelle de la sécrétion de ces effecteurs. Toutefois, les résultats obtenus pour les protéines fusions contenant les effecteurs LegK2 et LegK4, bien que préliminaires, évoquent plutôt une altération plus globale de l'efficacité de sécrétion de ces fusions.

Des tests de complémentation fonctionnelle devront être effectués lors de ces tests de sécrétion en cinétique, comme cela a été fait pour chacun des phénotypes perturbés par les délétions Δ*lpl0780*, Δ*lpl0922* et Δ*lpl1118*. Nous comparerons en particulier l'effet de l'introduction des gènes codant des protéines portant des substitutions dans les sites catalytiques par rapport à l'apport des gènes sauvages. Parmi la collection de plasmides de *L. pneumophila* disponible au laboratoire, aucun vecteur n'était compatible avec le plasmide pXDC61, qui permet l'expression des protéines fusions β-lactamase-effecteur du fait d'une même origine de réplication ou d'un même gène de sélection (résistance au chloramphénicol). Les plasmides dérivés du plasmide pJCL2968 (Allombert *et al.*, 2014) portant le gène de résistance à la gentamicine, l'origine de réplication *colE1* mutée et les gènes codant les trois protéines à domaines GGDEF et/ou EAL, sont actuellement en cours de construction.

La réalisation des cinétiques de sécrétion par les trois souches mutantes devront également être étendues à d'autres effecteurs afin de déterminer si les délétions affectent la sécrétion d'effecteurs spécifiques ou si elles ont un effet global sur l'orchestration de la sécrétion par le SST4 Dot/Icm. En effet, chacune des trois voies de signalisation identifiées pourrait moduler la sécrétion d'effecteurs spécifiques dont les fonctions ou le programme temporel de sécrétion sont similaires.

Le diGMPc semble donc avoir un rôle clé dans le contrôle de la sécrétion par le SST4 Dot/Icm au vu des dérégulations observées chez nos trois souches mutantes. Une telle dérégulation de la sécrétion n'a jamais été mise en lumière dans la littérature mis à part en absence des protéines chaperonnes IcmS, IcmW et LvgA (Ninio *et al.*, 2005, Vincent *et al.*, 2006b, Cambronne *et al.*, 2007). En effet, la délétion des gènes codant ces protéines chaperonnes entrainent une réduction de la sécrétion de certains effecteurs tels que SdeA ou SidC (Bardill *et al.*, 2005, Cambronne *et al.*, 2007). Il est peu probable que Lpl0780, Lpl0922 et Lpl1118, affectent la production ou la fonctionnalité de ces

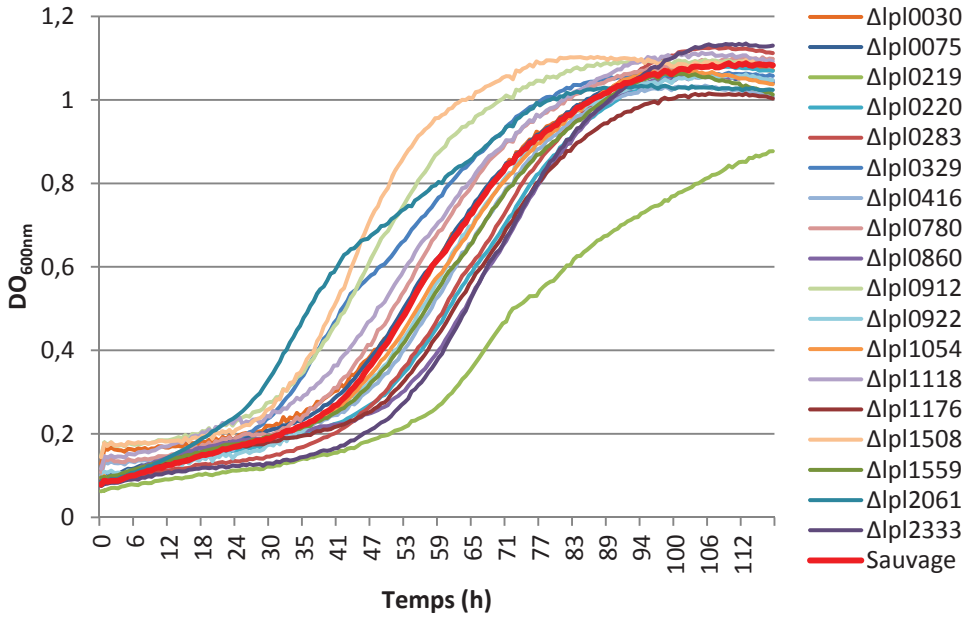


Figure 97 : A l'exception de la souche *Δlpl0219,* les souches portant des délétions de gènes codant les protéines à domaines GGDEF et/ou EAL ne présentent pas de défaut de multiplication planctonique.

La croissance planctonique des souches mutantes a été évaluée en milieu LGM supplémenté en chloramphénicol pendant 118h. Toutes les souches testées contiennent le plasmide pJCL2968, le vecteur utilisé pour la construction des plasmides de complémentation, qui confère la résistance au chloramphénicol.

chaperonnes car la sécrétion d'effecteurs comme LepA et LepB, indépendante de IcmS/W/LvgA, est altérée. Toutefois, il n'est pas exclu que nos trois voies de signalisation à diGMPc contrôlent la production ou la fonctionnalité d'une autre catégorie de protéines chaperonnes ou alors qu'elles impactent la fonction des protéines accessoires du SST4 Dot/Icm, DotU, IcmF ou IcmH.

4.2 Etude du rôle des protéines GGDEF/EAL dans la régulation de la formation de biofilms

La collection de souches dérivées de la souche *L. pneumophila* Lens et invalidées pour les gènes codant les protéines à domaines GGDEF et/ou EAL a également été utilisée afin d'identifier quelles protéines sont nécessaires pour la formation de biofilm par *L. pneumophila*. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec Christine Roques et Sophie Pécastaings de l'Université de Toulouse, spécialistes de la formation de biofilms mono-espèces de *L. pneumophila*.

4.2.1 Lpl0075, Lpl0329, Lpl1054, Lpl1176 et Lpl1559 participent au contrôle de la formation de biofilms de *L. pneumophila*

4.2.1.1 La densité de la population bactérienne des biofilms formés par les souches Δ*lpl0075*, Δ*lpl0329*, Δ*lpl1054*, Δ*lpl1176* et Δ*lpl1559* est affectée.

La collection de souches utilisée comprend 20 souches mutantes, portant le plasmide pJCL2968, conférant la résistance au chloramphénicol et utilisé par la suite pour la construction des plasmides de complémentation (répertoriés dans la fiche technique n°2). Deux souches n'ont pas été obtenues, Δ*lpl2581* et Δ*lpl1308*, vraisemblablement car les gènes sont localisés dans des régions favorisant les recombinaisons homologues aberrantes. La capacité de croissance planctonique de chacune des 20 souches mutantes a été mesurée. Seule la souche Δ*lpl0219* présente un défaut de multiplication (Figure 97). Comme les défauts de formation de biofilms liés à un défaut global de métabolisme ou de structure ne présentent que peu d'intérêt, cette souche à été éliminée de l'étude.

Le développement des biofilms formés par les 19 autres souches mutantes a été analysé. Pour cela, les puits d'une microplaque sont ensemencés avec une suspension contenant 10^4 bactéries en milieu SBB (Supplemented Biofilm Broth) supplémenté en chloramphénicol, qui ne permet pas la multiplication planctonique de *L. pneumophila* (Pécastaings *et al.*, 2010). Les biofilms se développent pendant 9 jours d'incubation en position statique avec un changement de milieu tous les 3 jours, permettant l'apport d'éléments essentiels et l'élimination des bactéries planctoniques. La population bactérienne de ces biofilms est alors quantifiée pour chacune des souches par PCR quantitative (qPCR) classique ou vPCR (« viable PCR »). La vPCR est une qPCR réalisée uniquement sur l'ADN des bactéries viables. En effet, l'ADN des bactéries non viables est rendu inaccessible à la polymérase par un traitement à l'éthidium monoazide (EMA) qui pénètre uniquement dans les

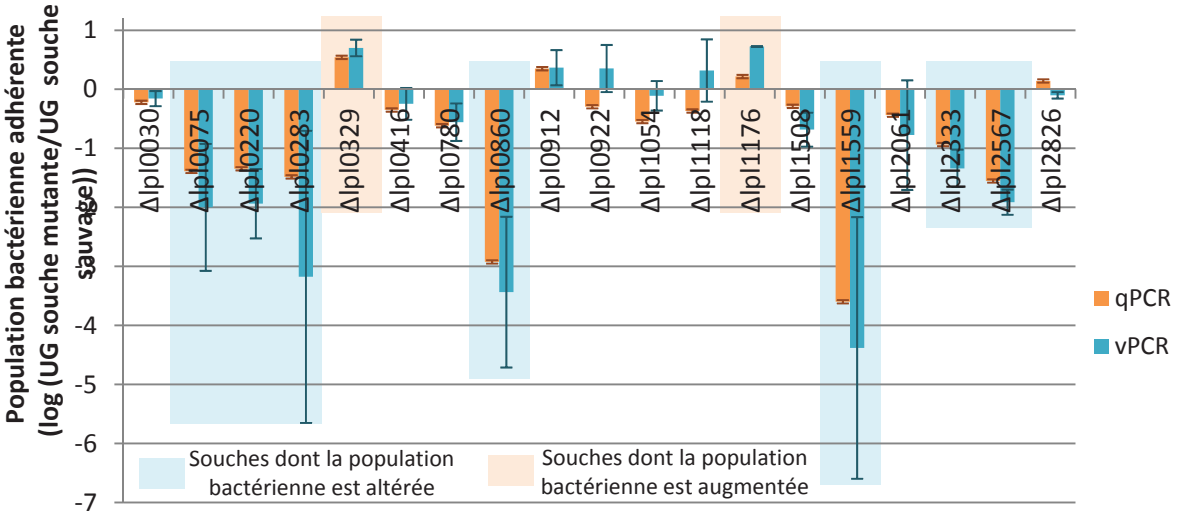


Figure 98 : La population bactérienne des biofilms, quantifiée par qPCR et vPCR, est affectée pour 10 souches inactivées.

Chaque souche mutante (portant le plasmide vide pJCL2968) a été utilisée pour former des biofilms de 9 jours selon les conditions explicitées dans la fiche technique n°11. Les bactéries sessiles ont ensuite été récupérées par grattage et utilisées pour réaliser des qPCR (PCR quantitative) ou des vPCR (qPCR sur bactéries viables) afin de quantifier la population bactérienne présente dans les biofilms. Les résultats sont exprimés par le log du rapport entre les unités génomiques (UG) correspondant à la souche mutante et celles correspondant à la souche sauvage. Ainsi, une valeur inférieure à 0 traduit une diminution de la population bactérienne du biofilm et une valeur supérieure à 0 une augmentation de cette population. Ces données représentent trois expériences indépendantes réalisées en triplicats.

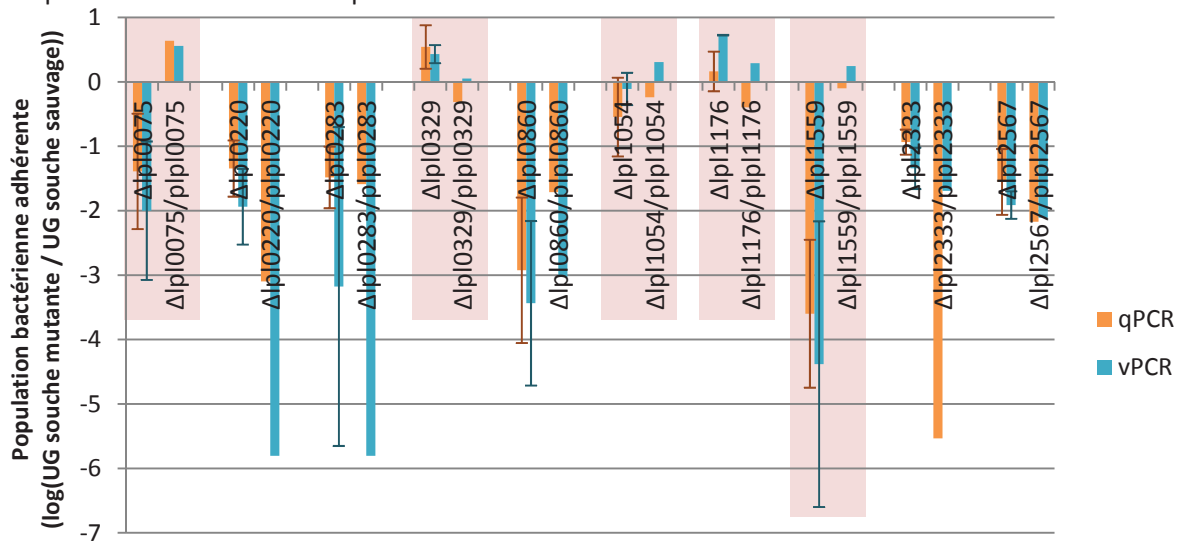


Figure 99 : Seuls les phénotypes de 5 souches inactivées sur les 10 sélectionnées sont complémentées par l'apport du gène sauvage correspondant sur un plasmide.

Chaque souche mutante (portant le vecteur vide pJCL2968) ou complémentée à été utilisée pour former des biofilms de 9 jours selon les conditions explicitées dans la fiche technique n°11. Les bactéries sessiles ont ensuite été récupérées par grattage et utilisées pour réaliser des qPCR (PCR quantitative) ou des vPCR (qPCR sur bactéries viables) afin de quantifier la population bactérienne présente dans les biofilms. Les résultats sont exprimés par le log du rapport entre les unités génomiques (UG) correspondant à la souche mutante et celles correspondant à la souche sauvage. Ainsi, une valeur inférieure à 0 traduit une diminution de la population bactérienne du biofilm et une valeur supérieure à 0 une augmentation de cette population. Ces données sont représentatives de trois expériences réalisées en triplicats pour les souches inactivées et d'une seule expérience effectuée en triplicat pour les souches complémentées. Les couples de souches encadrés correspondent aux situations de complémentation fonctionnelle lors de l'introduction de l'allèle sauvage dans la souche invalidée.

bactéries mortes et endommagées et se lie covalemment sur leurs ADN génomiques, bloquant par conséquent la réaction PCR à partir de ces ADN.

Plusieurs souches mutantes présentent une population bactérienne moins importante dans les biofilms ainsi formés. Ces écarts sont retrouvés sur la population bactérienne globale mais sont souvent plus nets concernant la population bactérienne viable : ainsi, la perte de population bactérienne viable est très marquée chez Δ*lpl0860* ou Δ*lpl1559* qui présentent une réduction de cette population d'un facteur 1000 environ par rapport à la souche sauvage (Figure 98). D'autres souches telles que Δ*lpl0075*, Δ*lpl0220*, Δ*lpl0283*, Δ*lpl2333* et Δ*lpl2567* sont affectées de manière moins importante, bien qu'elles présentent des diminutions allant d'un facteur 10 à un facteur 100 par rapport à la souche sauvage (Figure 98). Deux souches, Δ*lpl0329* et Δ*lpl1176*, présentent, quant à elles, une augmentation de la population bactérienne viable au sein du biofilm par rapport à la souche sauvage (Figure 98). Ces augmentations sont toutefois modérées puisque ce sont des hausses de facteurs compris entre 5 et 10 (Figure 98). Les 10 souches restantes présentent des variations de densité bactérienne mineures. Parmi elles, on trouve notamment la souche Δ*lpl1054*, invalidée pour le gène codant la seule protéine à domaines GGDEF et/ou EAL qui ait été impliquée dans la formation de biofilms de *L. pneumophila* (Carlson *et al.*, 2010). Dans notre analyse, cette souche présente un phénotype très faible avec une réduction de la population bactérienne globale d'un facteur inférieur à 5 (Figure 98), mais, du fait des données de la littérature, cette souche a été retenue avec les 9 autres identifiées par ce premier crible pour la suite des expériences.

Afin de confirmer que les effets observés sur la densité bactérienne des biofilms est le fait de l'absence des protéines à domaines GGDEF et/ou EAL, des expériences de complémentation fonctionnelle ont été réalisées sur les 10 souches retenues. Des plasmides portant chacun des gènes sauvages codant ces 10 protéines GGDEF et/ou EAL ont été introduits dans les souches mutantes correspondantes. La population bactérienne des biofilms formés en 9 jours par ces souches complémentées a ensuite été évaluée par qPCR et vPCR (Figure 99). Chez cinq souches parmi les 10 sélectionnées (Δ*lpl0075*, Δ*pl0329*, Δ*lpl1054*, Δ*lpl1176* et Δ*lpl1559)*, l'apport du gène sauvage sur un plasmide permet un retour au phénotype de la souche sauvage (Figure 99). Dans le cas de la délétion Δ*lpl0075,* la complémentation plasmidique a même un effet inverse probablement du fait d'une légère surproduction de la protéine (Figure 99). Les 5 souches restantes (Δ*lpl0220*, Δ*lpl0283*, Δ*lpl0860*, Δ*lpl2333* et Δ*lpl2567*) ne sont pas complémentées par l'apport du gène sauvage correspondant (Figure 99). Ces résultats suggèrent que les phénotypes observés ne sont pas le fait de la délétion des gènes codant les protéines à domaines GGDEF et/ou EAL. Ils pourraient provenir d'une mutation secondaire dans le génome, mais il est également possible que l'inactivation des gènes, obtenue par l'insertion d'une cassette de résistance à la kanamycine, induise un effet polaire

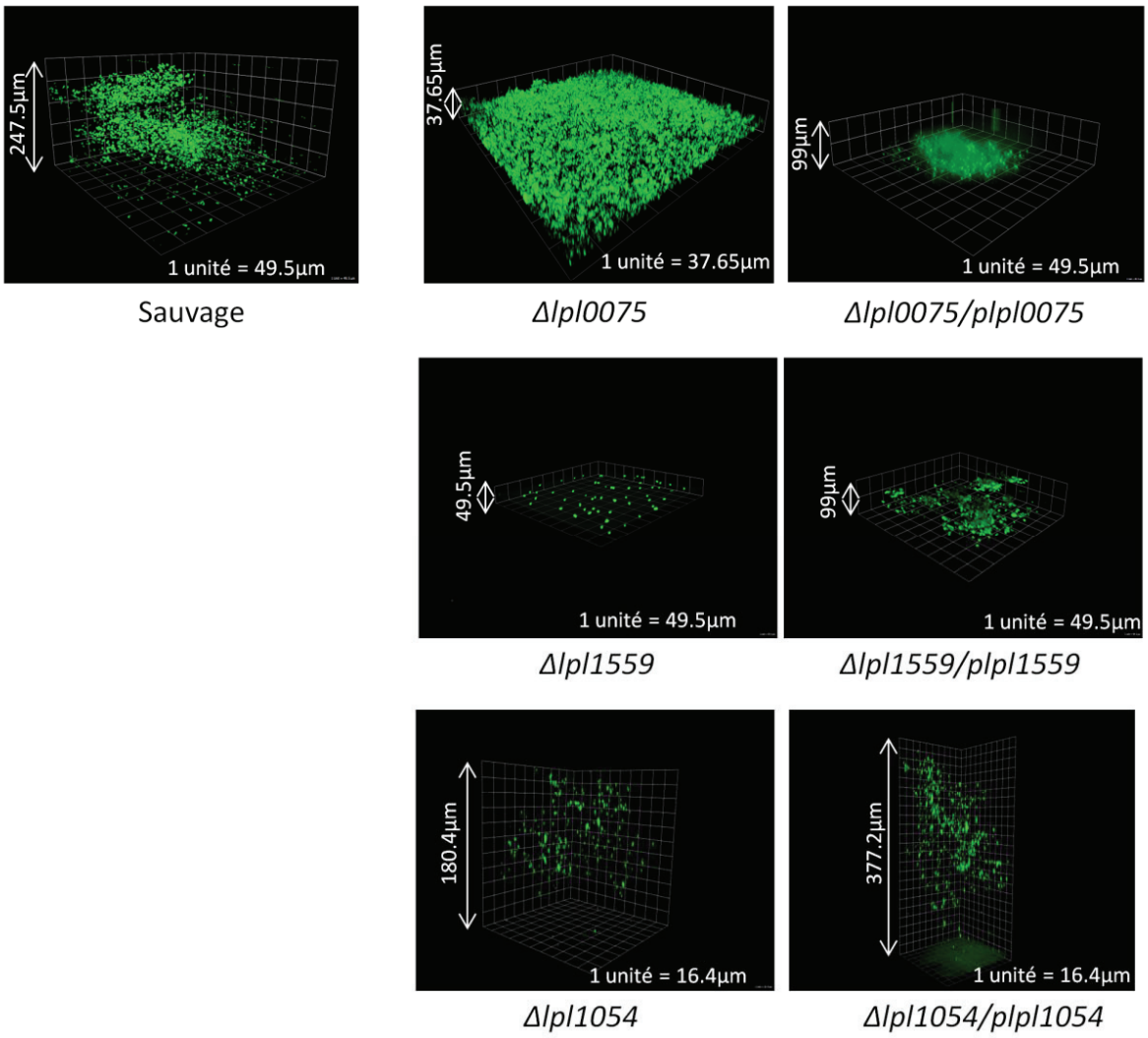


Figure 100 : Les délétions *Δlpl0075*, *Δlpl1559* et *Δlpl1054* ont un impact négatif spécifique sur l'architecture des biofilms de *L. pneumophila.*

Architecture des biofilms des souches sauvage, mutantes (*Δlpl0075*, *Δlpl1054* et *Δlpl1559*) et complémentées. Les bactéries des biofilms ont tout d'abord été marquées avec le Syto9. L'architecture des biofilms est ensuite observée par microscopie confocale. Les clichés obtenus permettent de réaliser des modélisations en 3 dimensions, présentées ici. L'épaisseur du biofilms ainsi que la taille correspondant à une unité de quadrillage sont indiquées sur chaque cliché.

sur l'expression des gènes situés en aval qui pourrait être à l'origine du phénotype observé. Quoi qu'il en soit, ces 5 souches ont été éliminées de la suite de l'étude puisque le rôle direct des protéines GGDEF et/ou EAL concernées dans la formation de biofilm n'a pas pu être mis en évidence ici. En conclusion, dans nos conditions expérimentales, 5 protéines à domaines GGDEF et/ou EAL sont clairement impliquées dans la formation de biofilms : Lpl0075, Lpl1054 et Lpl1559 ont un effet positif sur ce processus alors que Lpl0329 et Lpl1176 ont un effet négatif.

4.2.1.2 Les protéines Lpl0075, Lpl0329, Lpl1054, Lpl1176 et Lpl1559 participent au contrôle de l'architecture des biofilms

Afin d'approfondir l'étude des phénotypes des 5 souches mutantes identifiées, l'architecture tridimensionnelle des biofilms qu'elles forment a été observée. Pour cela, les bactéries sessiles ont été marquées en utilisant le Syto9, un marqueur capable de lier les acides nucléiques et fluoresçant en vert. Les biofilms ont alors été observés par microscopie confocale et les clichés obtenus ont été utilisés pour réaliser des modélisations en 3 dimensions. La souche *L. pneumophila* Lens sauvage est capable de former des biofilms d'environ 240 µm d'épaisseur (Figure 100). Dans ce biofilm, les bactéries apparaissent relativement dispersées, vraisemblablement reliées les unes avec les autres par la matrice extracellulaire, et forment une structure tridimensionnelle souvent plus dense à distance de la surface, rappelant la structure en « champignon » caractéristique des biofilms bactériens (Figure 100).

Les trois souches, Δ*lpl0075*, Δ*lpl1054* et Δ*lpl1559*, qui forment des biofilms moins denses en bactéries que la souche sauvage, sont affectées différemment au niveau de l'architecture de leurs biofilms. Les bactéries de la souche Δ*lpl0075* semblent être capables d' adhérer à la surface et de former une multicouche dense en bactéries d'une épaisseur inférieure à 37µm (Figure 100). Cependant, elles ne paraissent pas aptes à former une structure tridimensionnelle en « champignon » comme celle de la souche sauvage (Figure 100). Ce défaut de structure est partiellement complémenté par l'apport du gène sauvage *lpl0075* sur un plasmide puisque les bactéries semblent capables d'élever par endroit le biofilm en une structure de type « champignon », bien que l'épaisseur de celle-ci soit encore faible en comparaison à la souche sauvage (Figure 100). La souche Δ*lpl1559* parait, quant à elle, déficiente dès l'étape d'adhésion au support puisque seules quelques microcolonies semblent s'être formées (Figure 100). Cette souche n'est par conséquent pas capable de former un biofilm structuré en 3 dimensions (Figure 100). Ces données corrèlent donc le défaut très marqué de formation de biofilm observé pour cette souche en qPCR (Figures 98 et 99). Ce défaut de colonisation du support parait complémenté par l'apport du gène *lpl1559*, car les bactéries de la souche Δ*lpl1559/*p*lpl1559* forment une structure tridimensionnelle en « champignon » d'aspect normal même si l'épaisseur de celle-ci reste inférieure à celle de la souche sauvage (Figure 100).

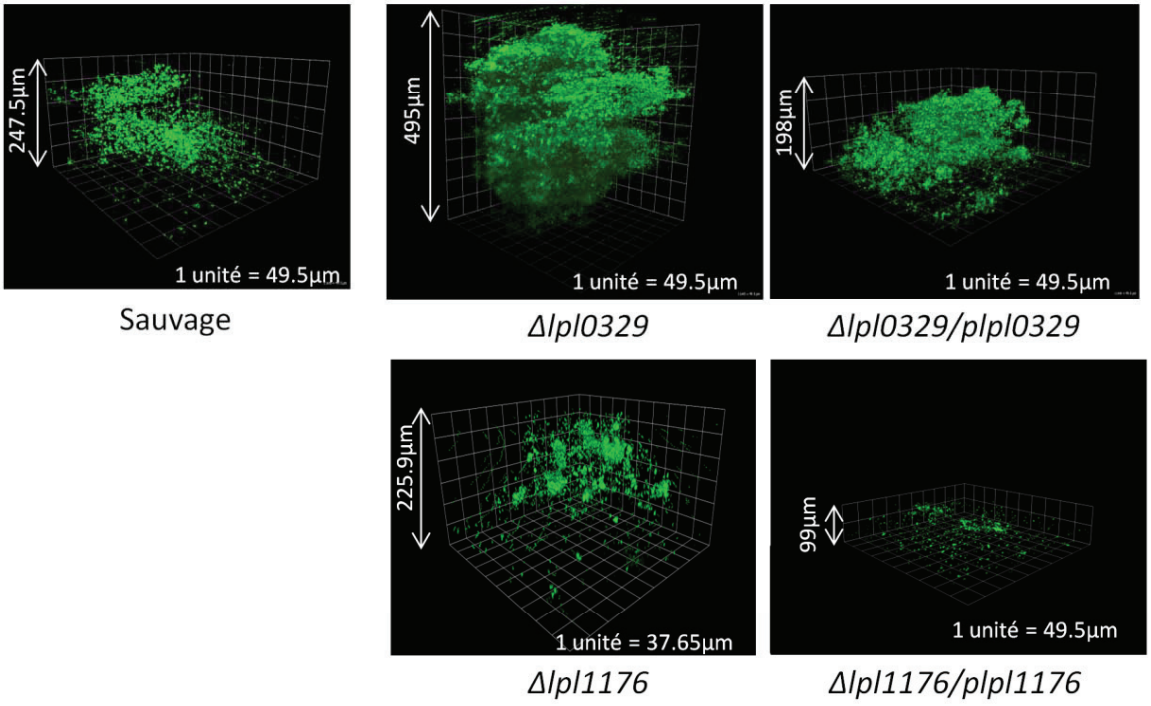


Figure 101 : Les délétions *Δlpl0329* et *Δlpl1176* affectent postivement et spécifiquement l'architecture des biofilms de *L. pneumophila*.

Architecture des biofilms des souches sauvage, mutantes (*Δlpl0329* et *Δlpl1176*) et complémentées. Les bactéries des biofilms ont tout d'abord été marquées avec le Syto9. L'architecture des biofilms est ensuite observée par microscopie confocale. Les clichés obtenus permettent de réaliser des modélisations en 3 dimensions, présentées ici. L'épaisseur du biofilm ainsi que la taille d'une unité du quadrillage sont indiquées sur chaque cliché.

Enfin, l'architecture des biofilms formés par la souche Δ*lpl1054* n'est pas clairement altérée : la structure tridimensionnelle en « champignon » parait conservée, cependant, les bactéries semblent légèrement plus dispersées et un peu moins nombreuses que pour la souche sauvage (Figure 100). Ces résultats sont cohérents avec les données de qPCR qui ne mettent en évidence qu'une très faible diminution de la population bactérienne organisée en biofilms. Par ailleurs, l'introduction du gène sauvage permet de densifier et d'épaissir le biofilm ce qui confirme le rôle positif de la protéine Lpl1054 décrit dans la littérature (Carlson *et al.*, 2010).

Les architectures des biofilms formés par les deux souches, Δ*lpl329* et Δ*lpl1176*, qui présentent une augmentation de la densité bactérienne, sont également affectées. La souche Δ*lpl0329* forme des biofilms dont l'épaisseur, de presque 500 µm, est augmentée d'un facteur 2 par rapport à la souche sauvage (Figure 101). Ceux-ci adoptent une structure tridimensionnelle en « champignon » qui semble plus dense en bactéries que celle de la souche sauvage (Figure 101). Ce phénotype est complémenté par l'apport du gène *lpl0329* sur un plasmide car la souche Δ*lpl0329/*p*lpl0329* forme des biofilms moins épais et légèrement moins denses que la souche mutante (Figure 101), ce qui confirme les données sur la complémentation fonctionnelle obtenues par qPCR et vPCR (Figure 99). Il est possible que le phénotype « d'hyperbiofilm » de la souche Δ*lpl0329* soit dû à la capacité de cette souche à se multiplier plus efficacement dans un biofilm que la souche sauvage ou alors à une altération de sa capacité à se disperser à partir du biofilm mature. La souche Δ*lpl1176* est capable de former des biofilms en 3 dimensions aussi épais que la souche sauvage (Figure 101). Les bactéries de ces biofilms ne semblent pas plus nombreuses que pour la souche sauvage mais leur viabilité dans le biofilm semble être améliorée d'après les résultats de vPCR (Figure 99). Le rôle inhibiteur du développement du biofilm de Lpl1176 est renforcé par les expériences de complémentation : l'apport du gène *lpl11176* engendre une légère surproduction de la protéine Lpl1176 qui se traduit par une diminution de l'épaisseur du biofilm (Figure 101) et une réduction de la population de bactéries viables (Figure 99).

Les 5 protéines à domaines GGDEF et/ou EAL identifiées semblent participer différemment au contrôle de l'architecture des biofilms. Certaines comme Lpl1559 pourraient être requises pour l'adhérence à la surface, d'autres telles que Lpl0075 pourraient jouer un rôle dans l'architecture tridimensionnelle du biofilm et d'autres encore comme Lpl0329 pourraient moduler la multiplication bactérienne dans le biofilm ou la dispersion des bactéries.

4.2.1.3 Les 5 protéines identifiées pourraient être associées à des activités enzymatiques antagonistes.

Ces 5 protéines identifiées possèdent des domaines GGDEF et/ou EAL et sont donc susceptibles de synthétiser et/ou de dégrader le diGMPc. La conservation des domaines de ces

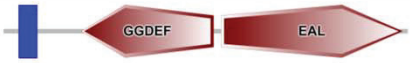
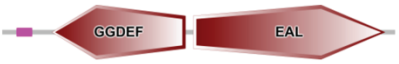
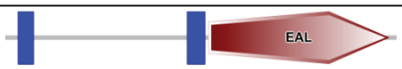
Gène	Structure	Conservation	
		Domaine	CDD NCBI
lpl0075		QSDEF	$7,93 \times 10^{-19}$
		ESS	$1,54 \times 10^{-75}$
lpl0329		GGDEF	$2,11 \times 10^{-65}$
		EAL	$9,56 \times 10^{-93}$
lpl1054		GGDEF	$1,46 \times 10^{-60}$
		EVL	$2,47 \times 10^{-99}$
lpl1176		GGDEF	$1,08 \times 10^{-67}$
		EIL	$1,01 \times 10^{-94}$
lpl1559		EVL	$3,70 \times 10^{-92}$

Tableau 8 : Les 5 protéines identifiées sont associées à des structures diverses.
Les architectures des 5 protéines (Lpl0075, Lpl0329, Lpl1054, Lpl1176 et Lpl1559) sont illustrées dans ce tableau. La conservation des domaines a été déterminée via la base de donnée Conserved Domain Database (CDD) du NCBI (Marchler-Bauer *et al.,* 2013). Les domaines senseurs PAS et REC sont indiqués, ainsi que les segments transmembrannaires (rectangle bleu). La zone indiquée en rose dans la structure de Lpl1054 correspond à une zone de faible complexité.

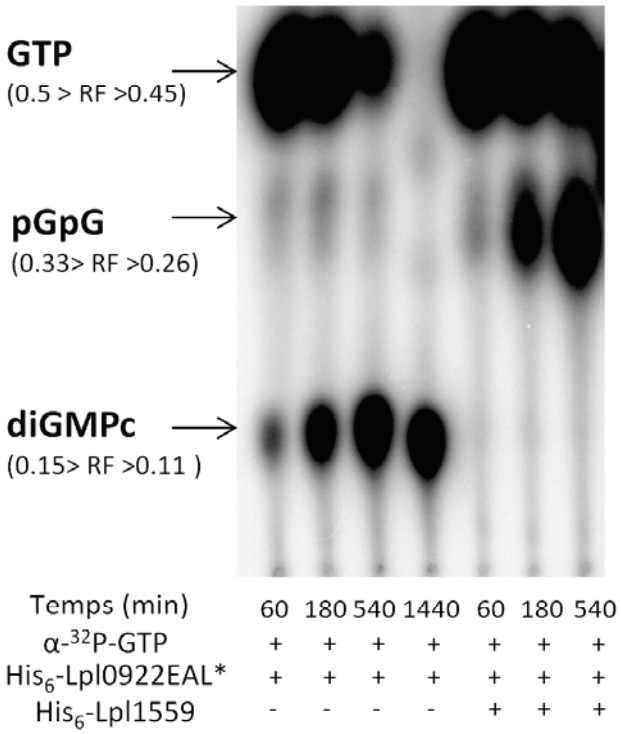


Figure 102 : Lpl1559 est une phosphodiestérase
La protéine Lpl1559 portant une étiquette His_6 ainsi que la protéine His_6 -Lpl0922 mutée au niveau de son motif EAL ont été surproduites et purifiées. La protéine His_6-Lpl0922EAL* a été incubée en présence ou non de la protéine His_6-Lpl1559 avec du GTP radioactif (α-^{32}P-GTP) dans un tampon de réaction contenant du $MnCl_2$. Des prélèvements ont été réalisés à 60 min, 180 min, 540 min et 1440 min puis analysés par chromatographie sur couche mince. La présence de ^{32}P est ensuite révélée par exposition sur un écran phosphorimager.
RF : facteur de rétention.

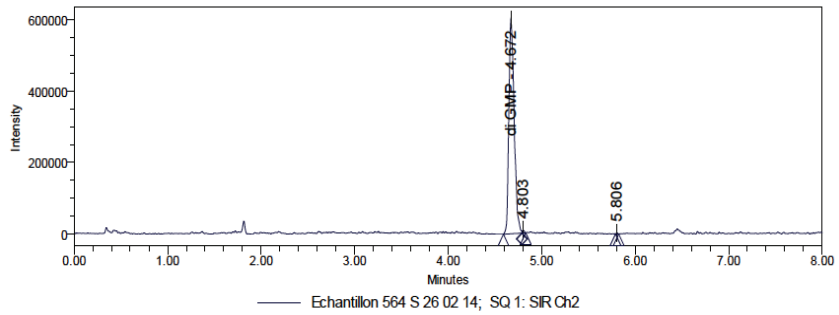
protéines, déterminée via la base de données « Conserved Domains Database » du NCBI (National center for biotechnology information)(Marchler-Bauer *et al.*, 2013), permettent d'estimer la probabilité de la fonctionnalité des activités enzymatiques. Ainsi, un domaine GGDEF associé à une E-value inférieure à 10^{-50} dans la base de données CDD possède très probablement une activité DGC, de même une E-value inférieure à 10^{-50} pour un domaine EAL est vraisemblement lié à une activité PDE. La protéine Lpl0075 possède un domaine GGDEF peu conservé (E-value = $7{,}9.10^{-19}$) et un domaine EAL conservé (E-value = $1{,}54.10^{-75}$) (Tableau 8). Ces données suggèrent que cette protéine fonctionne plus probablement comme une PDE. Les protéines Lpl0329, Lpl1054 et Lpl1176 présentent des domaines GGDEF et EAL conservés (Tableau 8). Ces protéines devraient donc être des DGC et/ou des PDE en fonction des conditions. C'est effectivement le cas de la protéine Lpl0329 dont la double activité a été démontrée *in vitro* au laboratoire (Levet-Paulo *et al.*, 2011). La double activité de Lpl1054 n'a pas été mise en évidence, toutefois, cette protéine est au moins une DGC fonctionnelle (Carlson *et al.*, 2010). Enfin, la protéine Lpl1559 porte uniquement un domaine EAL conservé (E-value = $3{,}70.10^{-92}$) (Tableau 8), suggérant que cette protéine présenterait une activité PDE.

Nous avons entrepris de mettre en évidence *in vitro* la fonctionnalité enzymatique des 4 enzymes identifiées dans cette étude en plus de Lpl0329. Pour cela, les gènes codant ces protéines sont clonés dans le plasmide pQE30 (Qiagen) permettant ainsi l'expression de protéines portant une étiquette de 6 histidines (His_6). Ces protéines étiquetées sont surproduites chez *E. coli* puis purifiées grâce à des billes magnétiques captant l'étiquette His_6. Les protéines purifiées sont alors incubées *in vitro* avec du GTP radioactif (α-^{32}P-GTP). Les échantillons sont ensuite séparés par chromatographie sur couche mince afin de visualiser la production de diGMPc et/ou de pGpG radioactifs.

Les constructions des plasmides pQE30 portant les gènes *lpl0075*, *lpl1054*, *lpl1176* et *lpl1559* ont été initiées. Comme les protéines Lpl0075, Lpl1176 et Lpl1559 sont probablement membranaires, les gènes correspondants n'ont pas été clonés en totalité : les régions codant les segments transmembranaires ont été éliminées afin de faciliter la surproduction et la purification de ces protéines. Après différentes tentatives, seul le plasmide pQE30-*lpl1559* a été obtenu.

Seule l'activité de la protéine Lpl1559 a donc pu être testée à ce jour (Figure 102). Comme la protéine His_6-Lpl1559 ne possède qu'un domaine EAL, elle est incapable de synthétiser du diGMPc radioactif à partir du GTP radioactif. Elle a donc été incubée avec le GTP radioactif en présence de la protéine His_6-Lpl0922EAL*. Cette protéine présente une forte activité DGC comme le démontre l'accumulation de diGMPc radioactif dès 1h et une très faible activité PDE, du fait de la présence d'une mutation dans son motif EAL, ce qui se traduit par une très faible production de pGpG

A



B

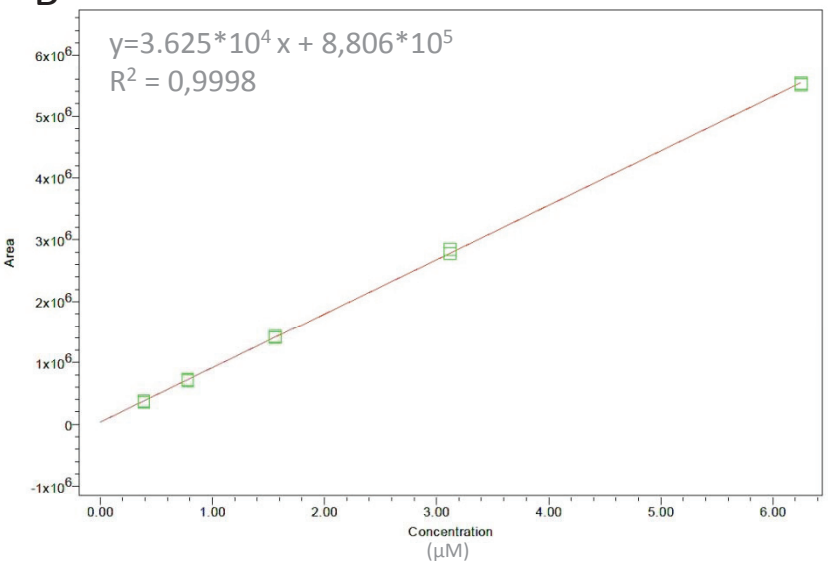


Figure 103 : Relation entre la concentration en diGMPc et l'aire sous le pic des chromatogrammes obtenus par LC-MS

(A) Exemple de chromatogramme obtenu pour la souche sauvage. Le temps de rétention du diGMPc est de 4,67 min.

(B) Courbe étalon mettant en relation la concentration en diGMPc et l'aire sous le pic observé dans les chromatogrammes. Les solutions de référence utilisées pour réaliser cette courbe étalon ont des concentrations comprises entre 0,39 µM et 12,5 µM.

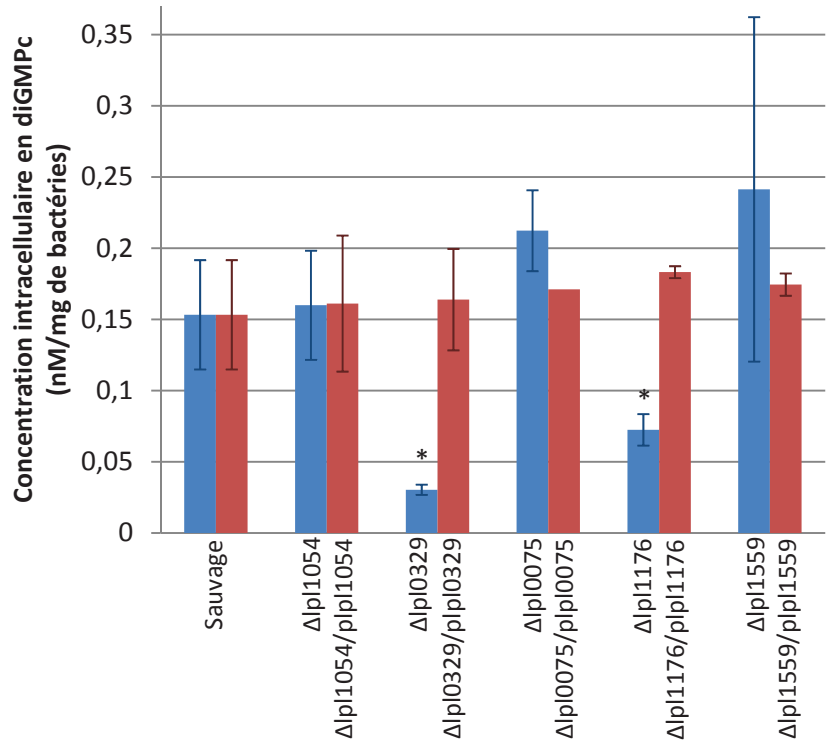


Figure 104 : La concentration intracellulaire en diGMPc mesurée par LC-MS n'est pas corrélée aux capacités de formation de biofilms des souches inactivées.

Le diGMPc contenu dans la souche sauvage, les 5 souches mutantes et les 5 souches complémentées a été extrait selon les conditions explicitées dans la fiche technique n°12. Les dosages ont ensuite été réalisés par chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse (LC-MS). La concentration en diGMPc dosée est exprimée en fonction du poids sec bactérien (des bactéries ayant servi pour l'extraction).

*, *p*-value <0,05

Effet de la délétion sur la formation de biofilms	-	+	-	+	-
Effet de la protéine sur la formation de biofilms	+	-	+	-	+
Activité enzymatique (supposée) ou démontrée	DGC (PDE)	DGC PDE	(PDE)	(DGC) (PDE)	PDE

radioactif (Figure 102). Cette protéine produit donc le diGMPc radioactif nécessaire pour tester l'activité PDE de His_6-Lpl1559. Lorsque les deux protéines sont co-incubées avec le GTP radioactif, le diGMPc radioactif produit par His_6-Lpl0922EAL* ne s'accumule pas et est directement dégradé en pGpG radioactif par His_6-Lpl1559 (Figure 102). Lpl1559 porte donc bien une activité PDE.

4.2.1.4 La concentration intracellulaire en diGMPc dans les 5 souches mutantes sélectionnées n'est pas corrélée à leurs capacités à former des biofilms

Les 5 protéines identifiées sont potentiellement capables de synthétiser et/ou de dégrader le diGMPc. L'absence de ces protéines dans les souches mutantes pourrait donc engendrer une variation de la concentration intracellulaire globale en diGMPc qui serait responsable des phénotypes de formation de biofilms observés. Le dosage de la concentration intracellulaire en diGMPc dans chacune des souches sauvages ainsi que dans les souches complémentées a donc été réalisé afin de tester cette hypothèse. La mise au point de ce dosage a été réalisée par nos collaboratrices de Toulouse, Sophie Pécastaings et Christine Roques.

Le diGMPc a été extrait des bactéries par la chaleur (fiche technique n°12) à partir de la souche sauvage *L. pneumophila* Lens, des 5 souches mutantes (Δ*lpl0075*, Δ*lpl0329*, Δ*lpl1054*, Δ*lpl1176* et Δ*lpl1559*) et des 5 souches complémentées correspondantes. Les dosages ont été ensuite réalisés par une technique de chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse (LC-MS, Liquid Chromatography-Mass Spectrometry). Dans les conditions utilisées, le temps de rétention du diGMPc est de 4,67 min (Figure 103A). L'aire sous le pic du diGMPc permet d'évaluer la concentration en diGMPc de l'échantillon grâce à la réalisation d'une courbe étalon (Figure 103B). Cette courbe a été construite à partir des aires sous les pics observées dans les chromatogrammes obtenus pour des solutions dont les concentrations en diGMPc sont connues. Grâce à cette courbe étalon, les concentrations en diGMPc des extraits réalisés sur les différentes souches de *L. pneumophila* ont été déterminées (Figure 104). Pour chaque extrait, la concentration en diGMPc est exprimée en fonction du poids sec des bactéries ayant servi à l'extraction (fiche technique n°12). Pour la souche sauvage, l'extrait présente une concentration en diGMPc d'environ 0,15mM/mg de bactéries (Figure 104). Les concentrations obtenues sur les souches Δ*lpl0075*, Δ*lpl1054* et Δ*lpl1559* ainsi que pour les souches complémentées ne sont pas significativement différentes de celle de la souche sauvage (Figure 104). Ceci suggère que la présence ou l'absence des ces protéines n'influe pas sur la concentration globale en diGMPc et renforce l'idée que de telles protéines pourraient jouer sur le contrôle de la disponibilité locale en diGMPc. Seules les concentrations des extraits réalisés à partir des souches Δ*lpl0329* et Δ*lpl1176* sont significativement différentes et inférieures à celle de la souche sauvage (environ 0,03 nM/mg et 0,07nM/mg, respectivement) (Figure 104). La concentration intracellulaire est rétablie par complémentation fonctionnelle suggérant plutôt un

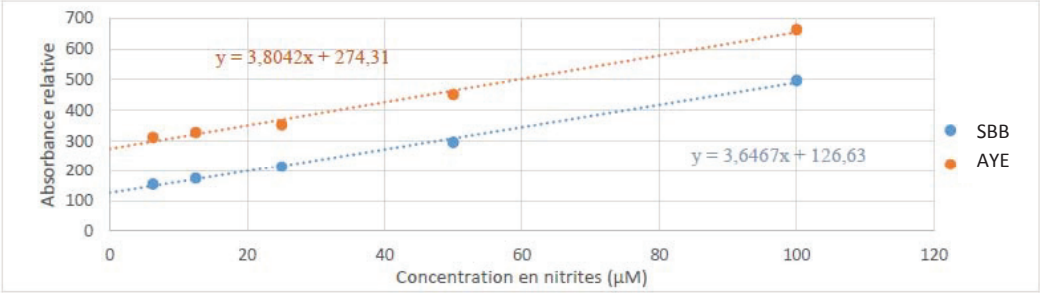


Figure 105 : Gamme étalon de l'absorbance à 490nm en fonction de la concentration en nitrites dans les milieux SBB et AYE

Des solutions dont la concentration en nitrites a été calibrée ont été utilisées pour réaliser une courbe étalon. Le dosage des nitrites a été effectué en utilisant le réactif de Griess qui réagit avec les nitrites, produisant un composé rouge. La présence de nitrites se traduit par une coloration rose qui absorbe à 490nm. Les courbes étalons ont été réalisées pour les milieux SBB et AYE.

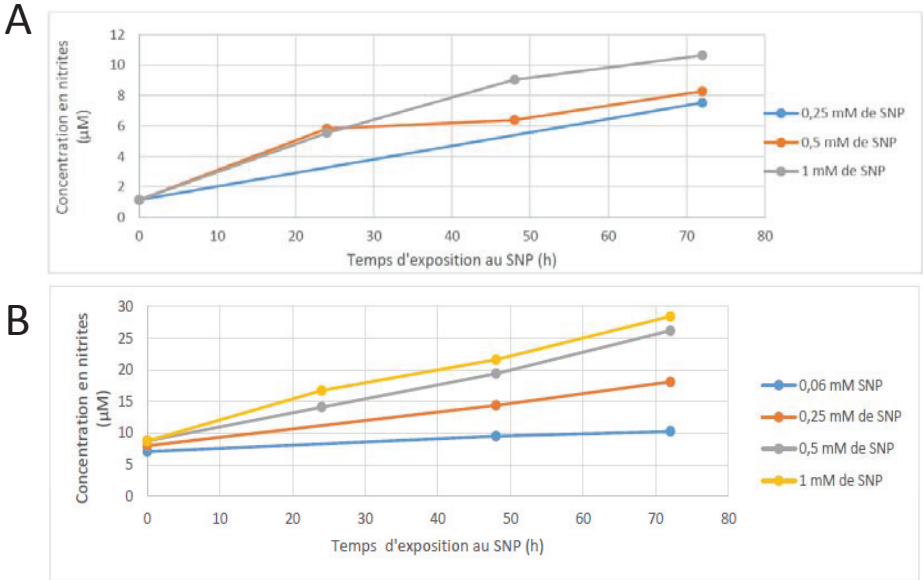


Figure 106 : Dosage de la concentration en nitrites dans les milieux SBB et AYE après ajout quotidien de SNP.

La concentration en nitrites dans le milieu SBB (A) et AYE (B) a été quantifiée en utilisant le réactif de Griess et à partir de la courbe étalon précédente. Le SNP a été dosé à 0h, 24h, 48h et 72h. Comme le SNP a une demi-vie courte et est photodégradable, il est ajouté quotidiennement dans les solutions de SBB à des concentrations finales de 0,25 mM, 0,5 mM et 1 mM.

impact de la concentration globale en diGMPc. Cependant, il est à noter que ces deux souches sont celles qui présentent une formation de biofilm augmentée par rapport à la souche sauvage. Or, dans la littérature, une hausse de la formation de biofilms est plutôt associée à une augmentation de la concentration intracellulaire en diGMPc (Simm *et al.*, 2004, Tischler *et al.*, 2004, Kozlova *et al.*, 2011, Tan *et al.*, 2014). Cependant, certains travaux, à l'instar de nos propres résultats, vont à l'encontre de ce dogme (Massie *et al.*, 2012).

4.2.2 Lpl1054 est impliquée dans la formation de biofilm en réponse à la présence d'oxyde nitrique

La protéine Lpg1057, l'homologue chez *L. pneumophila* Philadelphia de Lpl1054, est la seule protéine à domaines GGDEF et/ou EAL décrite dans la littérature pour son implication dans la formation de biofilms (Carlson *et al.*, 2010). En effet, une délétion du gène *lpg1057* diminue le phénotype d'« hyperbiofilm » observé en absence de la protéine Hnox1 et l'activité DGC de Lpg1057 est contrôlée *in vitro* négativement par la protéine Hnox1, capable de percevoir la présence d'oxyde nitrique (NO) (Carlson *et al.*, 2010). Ces données suggèrent un rôle de la protéine Hnox1 dans le contrôle de la formation de biofilms via la régulation de la production de diGMPc par Lpg1057, en réponse à la disponibilité en NO. Nous avons démontré précédemment que la souche Δ*lpl1054* présente un léger défaut de formation de biofilms. Ces travaux, comme ceux de Carlson *et al*., ont été réalisés en aérobiose, or, comme l'activité DGC de Lpg1057 est contrôlée en réponse à la présence de NO (Carlson *et al.*, 2010), nous avons donc souhaité évaluer l'impact de la présence de NO directement sur la formation de biofilms par *L. pneumophila*, en particulier dans les contextes génétiques sauvages et Δ*lpl1054*.

L'exposition de *L. pneumophila* au NO est réalisée par ajout de nitroprussiate de sodium (SNP) dans le milieu de culture. Le SNP est un donneur de NO couramment utilisé dans ce genre d'étude (Barraud *et al.*, 2006, Barraud *et al.*, 2009). La première étape de cette analyse a donc été de tester la disponibilité du NO dans les milieux de culture et sa cytotoxicité envers *L. pneumophila* afin de déterminer la concentration optimale en SNP à utiliser pour la suite des expériences. Ce travail a été réalisé par notre collaboratrice Sophie Pécastaings.

La disponibilité en NO dans les milieux de culture n'est pas directement mesurable mais est directement corrélée à la présence d'ions nitrites (NO_2^-), un produit de dégradation primaire du NO, stable et non volatile. Le dosage de ces ions est réalisé via l'utilisation du réactif de Griess qui forme, en présence de nitrites, un composé rouge absorbant à 490 nm. La détermination de la disponibilité en NO dans les milieux de culture a donc débuté avec la construction de courbes étalons reliant l'absorbance à 490 nm et la concentration en nitrites (Figure 105). Grâce à ces courbes, la concentration en nitrites, et par conséquent en NO, a pu être déterminée dans les milieux de

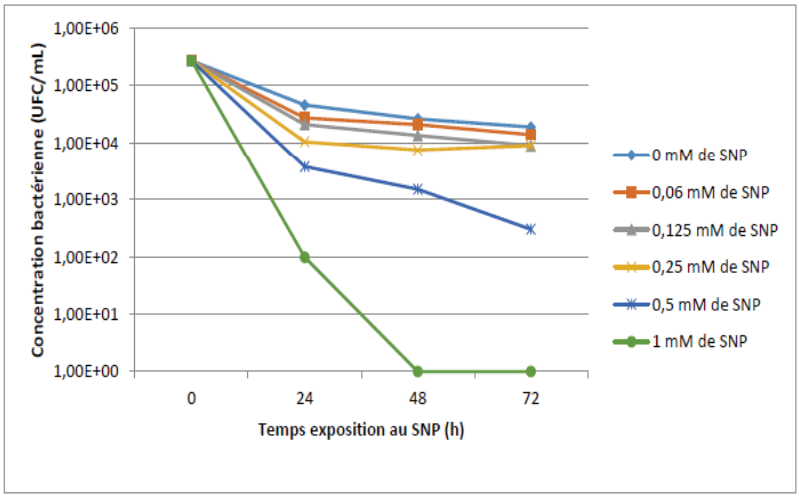


Figure 107 : Cinétique de cytotoxicité du NO sur la souche *L. pneumophila* Lens
Des suspensions de bactéries ont été réalisées en milieu AYE à DO = 0,22. Du SNP à une concentration finale de 0,06 mM, 0,125 mM, 0,25 mM, 0,5 mM ou 1 mM a été ajouté quotidiennement pendant 72h. Les bactéries viables à 0h, 24h, 48h et 72h ont été quantifiées par numérations des CFU.

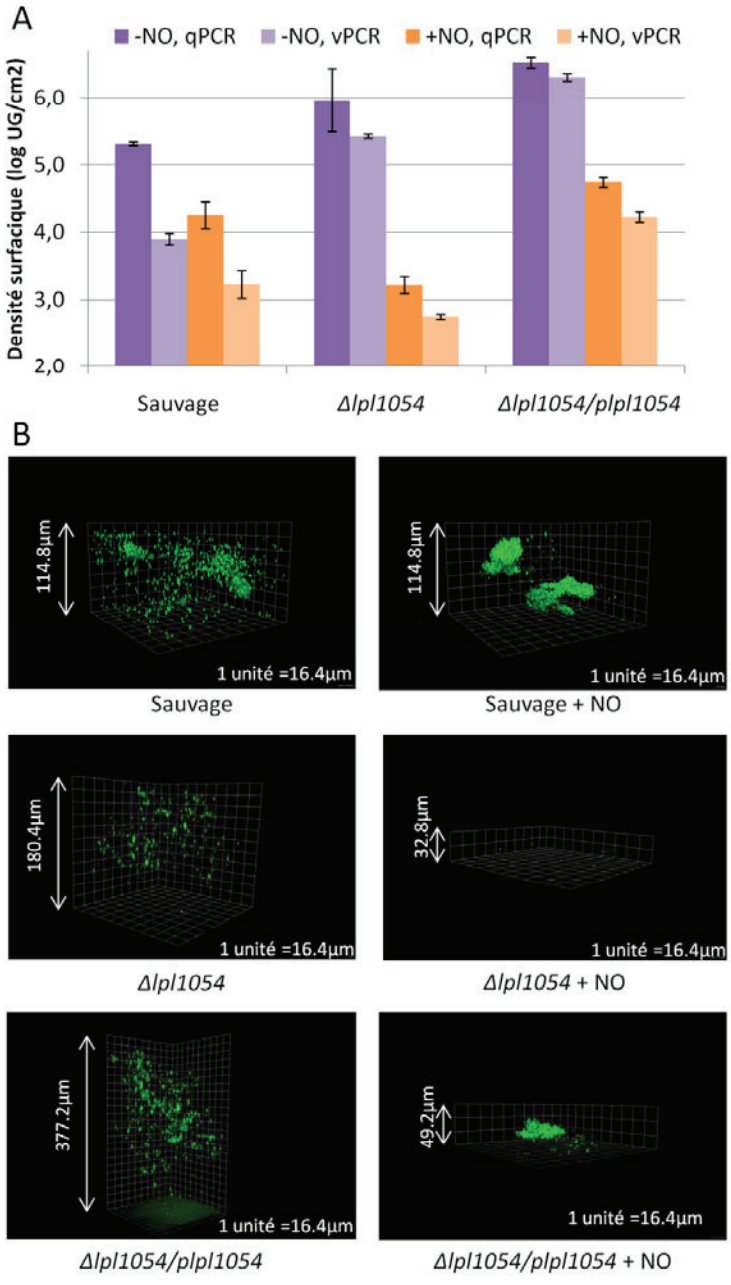


Figure 108 : Lpl1054 est requise pour le contrôle de la formation de biofilms denses en réponse à la présence de NO.
(A) Quantification de la population bactérienne des biofilms agés de 9 jours formés par la souche sauvage, la souche mutante *Δlpl1054* et la souche complémentée *Δlpl1054 /plpl1054* par qPCR et vPCR. Les biofilms ont été incubés en présence (en orange) ou en absence (en violet) de 0,25mM de SNP pendant les 3 derniers jours.
(B) Architecture des biofilms des souches sauvage, mutante et complémentée en présence ou non de SNP. L'architecture des biofilms a été observée par microscopie confocale après marquage des bactéries au Syto9. Les clichés obtenus permettent de réaliser des modélisations en 3 dimensions, présentées ici.

cultures en fonction de la quantité de SNP ajouté (Figure 106). Ces données ont mis en évidence que la concentration en nitrites n'est rapidement plus proportionnelle à la concentration en SNP du milieu (Figure 106). En effet, la concentration en nitrites n'augmente que peu au-delà de 0,25 mM de SNP en milieu SBB (utilisé pour la formation de biofilms de *L. pneumophila*) et au-delà de 0,5 mM en milieu AYE (ACES Yeast Extract ,utilisé pour la croissance planctonique).

La cytotoxicité du SNP, et donc du NO, envers *L. pneumophila* a ensuite été évaluée afin de déterminer la concentration sub-létale qui pourra être utilisée par la suite. Pour cela, des suspensions de la souche sauvage ont été mises en présence de différentes concentrations de SNP. Du fait de sa demi-vie courte et de sa sensibilité à la lumière, le SNP est ajouté quotidiennement dans les suspensions pour maintenir la présence de NO pendant 72h. Les bactéries viables de ces suspensions ont été dénombrées à 24h, 48h et 72h. La viabilité des bactéries est dramatiquement affectée par l'ajout quotidien de SNP à 1 mM : dès 48h de contact, les bactéries ne sont plus viables (Figure 107). Une diminution marquée de la viabilité est observée avec l'ajout de SNP à 0,5 mM mais l'ajout de SNP à 0,25 mM a un effet plus modéré (Figure 107). Par conséquent, pour la suite des expériences, le SNP est ajouté à hauteur de 0,25 mM, ce qui correspond à une concentration en nitrites d'environ 17 µM après de 72h (Figure 106).

Afin de tester l'implication de Lpl1054 dans la formation de biofilms en présence de NO, des biofilms des souches sauvage, Δ*lpl1054* et Δ*lpl1054/*p*lpl1054* ont été formés pendant 9 jours en présence de SNP à 0,25 mM pendant les trois derniers jours (fiche technique n°12). La densité de la population bactérienne de ces biofilms a ensuite été quantifiée par qPCR et vPCR et est exprimée en unité logarithmique des unités génomiques (UG) rapportée à la surface du biofilm (Figure 108A). Chez la souche sauvage, la présence de NO engendre une diminution de la population bactérienne viable d'un facteur inféreur à 10 (Figure 108A). Ces données sont cohérentes avec les tests de cytotoxicité qui mettent en évidence une certaine toxicité dû à l'ajout de SNP à 0,25 mM (Figure 107). Comme précédemment, en absence de NO, la densité bactérienne des biofilms formés à partir de la souche Δ*lpl1054* n'est pas significativement différente de celle de la souche sauvage (Figures 98, 99 et 108A). Cependant, en présence de NO, la densité bactérienne ne diminue pas d'un facteur 10 comme pour la souche sauvage mais d'un facteur 1000 (Figure 108A), indiquant que Lpl1054 est requise pour la formation de biofilm en présence de NO. Le phénotype sauvage est restauré partiellement par l'apport du gène *lpl1054* sauvage sur un plasmide (Figure 108A), démontrant ainsi que l'absence de Lpl1054 est bien à l'origine du défaut observé.

Comme précédemment, l'étude du phénotype mis en évidence par qPCR a été approfondie par l'observation de l'architecture des biofilms formés en présence de NO. Celle-ci affecte

l'architecture des biofims formés par la souche sauvage (Figure 108B) : les bactéries sont toujours capables de créer un biofilm structuré en 3 dimensions mais elles forment des agrégats denses alors que les bactéries sont plus dispersées en absence de NO (Figure 108B). En absence de NO, la souche Δ*lpl1054* forme un biofilm similaire à celui de la souche sauvage (Figure 108B). Toutefois, en présence de NO, elle ne semble plus du tout capable de former un biofilm (Figure 108B), confirmant ainsi les résultats obtenus en qPCR (Figure 108A). Ce défaut est partiellement complémenté par l'apport du gène *lpl1054* sauvage sur un plasmide : la souche Δ*lpl1054/*p*lpl1054* est capable de former un biofilm structuré, bien que celui-ci ait une épaisseur inférieure à celui de la souche sauvage (Figure 108B).

La présence de NO affecte directement l'architecture des biofilms formés par *L. pneumophila*. Ceux-ci sont beaucoup plus denses que ceux formés en absence de NO. Le fait que la souche Δ*lpl1054* soit complètement incapable de former des biofilms en présence de NO met en évidence le rôle essentiel que joue Lpl1054 dans ce processus.

4.2.3 Discussion

L'objectif de ce projet, financé par l'ANSES et réalisé en collaboration avec Christine Roques et Sophie Pécastaings du Laboratoire de Génie Chimique de l'Université de Toulouse, vise à identifier les protéines à domaines GGDEF et/ou EAL, et donc les voies de signalisation à diGMPc, impliquées dans la régulation de la formation de biofilms. Pour cela, notre collection de souches invalidées pour 20 des 22 gènes codant ces protéines à domaines GGDEF et/ou EAL de la souche Lens de *L. pneumophila* a été utilisée pour rechercher des souches affectées dans leurs capacités à former des biofilms.

Tout d'abord, les 20 souches ont été transformées par le plasmide pJCL2968, servant de contrôle dans les expériences de complémentation. La capacité de ces 20 souches à croître en milieu liquide a été testée. Seule la souche Δ*lpl0219* présente un défaut de croissance planctonique. Le gène *lpl0219*, codant une protéine à domaines PAS et GGDEF est organisé en opéron avec le gène *lpl0220* codant une protéine à domaine EAL. Cette organisation génétique suggère un fonctionnement commun des deux protéines correspondantes. Or, la souche Δ*lpl0220* ne présente pas de défaut de croissance planctonique, éliminant ainsi la possibilité que le phénotype soit dû à un effet polaire de l'insertion de la casette d'inactivation dans *lpl0219*. Il serait donc intéressant de déterminer par des expériences de complémentation fonctionnelle si la délétion de *lpl0219* altère véritablement la croissance planctonique ou si cet effet est la conséquence d'une mutation secondaire par exemple. En attendant, cette souche a été directement écartée de l'étude car les défauts de formation de biofilms liés à un défaut de métabolisme ou de structure ne présente que

peu d'intérêt dans notre étude, même s'il n'est pas exclu que Lpl0219 puisse jouer un rôle dans la formation de biofilms par *L. pneumophila*.

La capacité de production de biofilms par les 19 souches invalidées restantes a ensuite été évaluée par des expériences de qPCR et vPCR. Ce crible a permis de sélectionner 10 souches pour lesquelles la population bactérienne du biofilm est significativement différente de celle du biofilm formé par la souche sauvage. Ces défauts sont visibles pour la population bactérienne globale quantifiée par qPCR mais sont majoritairement marqués plus nettement pour la population bactérienne viable estimée par vPCR. Les expériences de complémentation fonctionnelle ont permis d'éliminer 5 nouvelles souches de l'étude : Δ*lpl0220*, Δ*lpl0283*, Δ*lpl0860*, Δ*lpl2333* et Δ*lpl2567*. Chez ces mutants, le phénotype sauvage n'est pas restauré par l'apport des gènes sauvages correspondants. Ils portent donc probablement des mutations secondaires qui sont à l'origine des phénotypes observés ou bien l'insertion des cassettes d'inactivation de gènes, permettant la résistance à la kanamycine, ont un effet polaire sur l'expression de gènes en aval impliqués dans la formation de biofilms. Ces souches ont, par conséquent, été éliminées de l'étude. Au contraire, les délétions de *lpl0075*, *lpl0329*, *lpl1054*, *lpl1176* et *lpl1559* sont bien à l'origine des phénotypes de formation de biofilms observés car ceux-ci sont complémentés, au moins partiellement, par l'apport d'une copie sauvage des gènes correspondants.

Ces informations sur la quantité de bactéries présentes dans les biofilms formés par les souches retenues ont été complétées par des observations par microscopie confocale de la structure des différents biofilms. Les délétions de ces 5 gènes (*lpl0075*, *lpl0329*, *lpl1054*, *lpl1176* et *lpl1559*) affectent différemment la formation du biofilm. Les souches Δ*lpl0329* et Δ*lpl1176* forment des biofilms plus denses et épais que la souche sauvage. Le mutant Δ*lpl1054* n'est que très faiblement altéré pour ce processus alors que la souche Δ*lpl0075* présente un phénotype négatif modéré et le mutant Δ*lpl1559* un défaut fortement marqué. Les 5 protéines correspondantes n'affectent donc pas la formation de biofilms de la même manière. Ces résultats sont confirmés par l'étude de l'architecture des biofilms formés à partir de ces 5 souches inactivées. En effet, la souche Δ*lpl0075* semble capable d'adhérer au support mais pas de former un biofilm structuré en « champignon ». Au contraire, la souche Δ*lpl1559* ne semble pas apte à adhérer à la surface, suggérant plutôt un défaut de production ou de fonctionnalité des structures d'adhérence. La délétion de *lpl0329* engendre la formation de biofilms épais et denses par *L. pneumophila*, résultant potentiellement d'une augmentation de l'efficacité de la multiplication dans les biofilms ou alors d'une altération de la capacité des bactéries à se disperser à partir du biofilm mature. Enfin, la souche Δ*lpl1176* forme des biofilms dont la structure tridimensionnelle est légèrement plus agrégée que la souche sauvage. Ensemble, ces résultats mettent donc en évidence que ces différentes protéines jouent des rôles

différents, et non redondants, afin de contrôler les différentes étapes du développement et de la structuration des biofilms de *L. pneumophila*.

Ces 5 protéines sont porteuses de domaines GGDEF et/ou EAL et sont donc susceptibles de synthétiser et/ou de dégrader le diGMPc. Actuellement, seules la double activité de la protéine Lpl0329 (Levet-Paulo *et al.*, 2011), l'activité DGC de Lpl1054 (Carlson *et al.*, 2010) et l'activité PDE de Lpl1559 (cette étude) ont été mises en évidence. Les autres activités ne peuvent qu'être prédites : Lpl0075 pourrait être une PDE, Lpl1176 aurait une double activité DGC/PDE et Lpl1054 pourrait également avoir une activité PDE en plus de son activité DGC déjà démontrée. Les constructions des plasmides permettant la surproduction de ces protéines fusionnées à une étiquette His_6 sont actuellement en cours de construction et permettront de tester *in vitro* les activités de ces trois enzymes. Si Lpl1054 et Lpl1176 sont effectivement bifonctionelles, elles rejoindront la liste restreinte des enzymes dont la double activité a été démontrée *in vitro* (MsDGC1 de *M. smegmatis* (Kumar *et al.,* 2008b), MtDGC de *M. tuberculosis* (Gupta *et al.*, 2010), BphG1 de *R. sphaeroides* (Tarutina *et al.*, 2006), ScrC de *V. parahaemolyticus* (Ferreira *et al.*, 2008), SwDGC de *S. woodyi* (Liu *et al.*, 2010), PP2258 de *P. putida* (Österberg *et al.*, 2013) et Lpl0329 (Levet-Paulo *et al.*, 2011) et Lpl0922 (Allombert *et al.*, 2014) de *L. pneumophila*), appuyant les prédictions de Seshasayee *et al.* sur le nombre vraisemblablement important de protéines bifonctionnelles (Seshasayee *et al.*, 2010).

Les activités enzymatiques de ces 5 protéines pourraient être requises pour leur rôle dans la formation de biofilms, comme c'est le cas pour les trois protéines à domaines GGDEF et/ou EAL impliquées dans le contrôle de la virulence de *L. pneumophila* (Allombert *et al.*, 2014). Des expériences de complémentation fonctionnelle par l'apport d'une copie mutée du gène, codant des protéines avec des substitutions dans les sites catalytiques GGDEF ou EAL, permettraient de répondre à cette interrogation. De plus, ces tests permettront peut-être de déterminer si l'une ou l'autre, ou bien les deux activités des protéines bifonctionnelles, comme Lpl0329, sont requises. Certains plasmides portant les mutations introduisant des substitutions dans les sites actifs ont d'ores et déjà été construits (p*lpl0329* avec les domaines GGDEF ou EAL mutés (p*lpl0329GGDEF** ou p*lpl0329EAL**) ; p*lpl1054GGDEF** et p*lpl1054EAL** ; p*lpl1176GGDEF** et p*lpl1559EAL**) et introduits dans les souches inactivées de *L. pneumophila* (voir fiches techniques n°1 et 2). La caractérisation des phénotypes de formation de biofilms suivis par qPCR et microscopie confocale est en cours.

Il est classiquement décrit dans la littérature que l'augmentation de la concentration intracellulaire en diGMPc favorise la formation de biofilms pour de nombreuses espèces bactériennes. Cependant, notre étude a permis de mettre en évidence un rôle positif dans la formation de biofilms de 2 PDE (Lpl1559 et Lpl0075) dont l'activité conduit à la dégradation du

diGMPc et donc à un abaissement de la concentration en diGMPc, à moins qu'elles ne contrôlent qu'une disponibilité locale en diGMPc. Afin de mesurer l'impact des différentes délétions sur la concentration globale en diGMPc, des dosages ont été réalisés par LC-MS. Pour les mutants dont la formation de biofilms est diminuée (Δ*lpl0075*, Δ*lpl1054* et Δ*lpl1559*), aucune variation significative n'a été détectée, même dans les contextes génétiques de complémentation fonctionnelle. Ces données suggèrent plutôt que les voies de signalisation impliquant ces trois protéines fonctionnent via la modulation spécifique d'une concentration locale en diGMPc. Au contraire, les souches capables de former des biofilms plus denses (Δ*lpl0329* et Δ*lpl1176*) ont des concentrations intracellulaires en diGMPc significativement réduites. Ces résultats vont à l'encontre du dogme admis dans la communauté scientifique qui relie les fortes concentrations en diGMPc à la stimulation de la formation de biofilms (Simm *et al.*, 2004, Tischler *et al.*, 2004, Kozlova *et al.*, 2011, Tan *et al.*, 2014). Ils supportent plutôt des travaux récents qui mettent en évidence l'absence de corrélation entre la concentration intracellulaire en diGMPc et la formation de biofilms chez *V. cholerae* (Massie *et al.*, 2012).

Il serait intéressant d'approfondir encore cette analyse en étudiant notamment la qualité de la matrice extracellulaire des biofilms formés par les 5 souches inactivées. L'engluement des bactéries dans la matrice peut, par exemple, être facilement observé par CryoMEB (Microscopie Electronique à Balayage avec préparation des échantillons par congélation/lyophilisation), et pourrait permettre la mise en évidence de différences dans la qualité voire la quantité de cette matrice. La place de cette matrice dans l'architecture des biofilms pourrait être observée par microscopie confocale après le marquage des protéines extracellulaires au SYPRO® Ruby ou par le marquage des exopolysaccharides avec un ester de la concanavaline A conjugué à un fluorochrome comme la rhodamine (ConA-TAMRA). Ces tests pourraient apporter des données supplémentaires permettant notamment de comprendre pourquoi Δ*lpl0075* n'est pas capable de former une structure tridimensionnelle ou pourquoi les bactéries Δ*lpl1176* sont moins dispersées dans le biofilm que la souche sauvage.

La souche Δ*lpl1054*, qui présente un phénotype modéré, a été incluse dans cette étude car elle est la seule protéine à domaines GGDEF et/ou EAL de *L. pneumophila* décrite dans littérature pour son rôle dans la régulation de la formation de biofilms (Carlson *et al.*, 2010). Ces travaux mettent en évidence l'inhibition de l'activité DGC de Lpg1057, l'homologue de Lpl1054 *chez L. pneumophila* Philadelphia, par la protéine Hnox1, fixatrice de NO (Carlson *et al.*, 2010). Ces travaux, ainsi que nos résultats précédents, ont été ménés en conditions d'aérobiose. Nous avons donc souhaité évaluer l'impact de la présence de NO directement sur la formation de biofilms par *L. pneumophila*, en particulier dans le contexte génétique Δ*lpl1054*. Cette souche invalidée ne présente

qu'un très faible phénotype de défaut de formation de biofilms en aérobiose mais elle est complètement incapable de former un biofilm en présence de NO, suggérant que Lpl1054 est essentielle pour ce processus. Les résultats que nous avons obtenus sont en cohérence avec l'étude menée par Carlson *et al.* qui suggère le rôle stimulateur de la protéine Lpg1057 sur la formation de biofilms (Carlson *et al.*, 2010). Ensemble, nos travaux et ceux de Carlson *et al.* mettent en évidence que, chez la souche sauvage, l'inhibition de l'activité DGC de Lpl1054/Lpg1057 par Hnox1 favorise la formation d'un biofilm en présence de NO (Carlson *et al.*, 2010). Au contraire, la délétion de *lpl1054* entraine l'absence de Lpl1054, et par conséquent l'absence de son activité DGC, et conduit à une incapacité totale à former un biofilm en présence de NO. Il semblerait donc que Lpl1054 assure un autre rôle que la synthèse de diGMPc : elle pourrait, par exemple, exercer une activité PDE qui pourrait être favorisée par l'inhibition de l'activité DGC ou elle pourrait interagir avec d'autres protéines uniquement lorsque son activité DGC est inhibée.

Nos résultats et les travaux de Carlson *et al.* sur le couple Hnox1-Lpg1057(Lpl1054) mettent en évidence un fonctionnement inverse à celui du couple, répondant aussi à la présence de NO, SwHnox/SwDgc de *Shewanella woodyi* (Carlson *et al.*, 2010, Liu *et al.*, 2012a). Dans ces travaux, en présence de NO, la protéine SwHnox module négativement l'activité DGC de SwDgc, favorisant ainsi son activité PDE (Liu *et al.*, 2012a). Cela conduit alors à une inhibition de la formation de biofilms (Liu *et al.*, 2012a) et non pas à une activation comme nous l'avons observé pour *L. pneumophila*. Plus généralement, *L. pneumophila* semble répondre différemment à la présence de NO en comparaison d'autres espèces bactériennes. En effet, nos travaux mettent en évidence que *L. pneumophila* est capable de former des biofilms en présence de NO, bien que ceux-ci se structurent plus densément qu'en absence de NO. Chez d'autres espèces bactériennes telles que *P. aeruginosa*, *S. woodyi* et *Azospirillum brasilense*, la présence de NO favorise, au contraire, la dispersion des bactéries et inhibe la formation de biofilms (Barraud *et al.*, 2006, Barraud *et al.*, 2009, Liu *et al.*, 2012a, Arruebarrena Di Palma *et al.*, 2013, Li *et al.*, 2013b).

Concernant les modes de perception du NO, les mécanismes de fixation et d'activation des protéines Hnox sont décrits dans la littérature : la fixation du NO sur la poche à hème des protéines Hnox induit un changement de conformation de celles-ci (Plate *et al.*, 2013). Toutefois, les mécanismes moléculaires mis en place par Hnox1 pour moduler l'activité de Lpl1054 doivent encore être élucidés. Comme aucun autre domaine que HNOB (Hème NO Binding) n'est annoté sur Hnox1, il est peu probable qu'elle module Lpl1054 via des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation par exemple. Il est donc plus vraisemblable qu'elle agisse par l'intermédiaire d'une interaction avec Lpl1054. L'existence ou non de complexes Hnox1-Lpl1054 pourrait être révélée par des expériences de GST-pulldown et de double-hybride.

L'identification des signaux et des mécanismes d'activation devront également être élucidés pour les 4 autres protéines identifiées. Concernant Lpl0329, ces mécanismes sont partiellement connus. Cette protéine est le RR d'un système à deux composants et peut être phosphorylée sur son domaine REC par l'HK atypique Lpl0330 (Levet-Paulo *et al.*, 2011). Cette phosphorylation module l'activité de Lpl0329, favorisant sa capacité à dégrader le diGMPc (Levet-Paulo *et al.*, 2011). Il serait particulièrement intéressant de tester la formation de biofilms en absence de Lpl0330 afin de déterminer si la phosphorylation de Lpl0329 stimule ou inhibe la formation de biofilms. La réponse à cette interrogation sera partiellement obtenue grâce à la formation de biofilms par les souches produisant les protéines Lpl0329 mutées au niveau des sites GGDEF et EAL. Les signaux perçus par Lpl0330 doivent aussi être déterminés. Cette HK porte un domaine PAS contenant une poche à hème qui pourrait permettre de percevoir la disponibilité en oxygène, comme pour le système à deux composants FixL/FixJ de *Rhozobium meliloti* (Monson *et al.*, 1992, Gilles-Gonzalez *et al.*, 1993, Gilles-Gonzalez *et al.*, 2008). Pour les 3 autres protéines (Lpl0075, Lpl1176 et Lpl1559), aucun domaine senseur n'est annoté, ce qui va rendre difficile l'identification des signaux capables de les activer.

Les cibles moléculaires de ces 5 voies de signalisation identifiées devront également être identifiées. Cet aspect, commun à l'étude des trois voies de signalisation impliquées dans la virulence de *L. pneumophila*, est abordé dans la partie « Conclusion et Perspectives ».

5 Conclusion et Perspectives

Ce travail démontre l'existence de voies de signalisation à diGMPc impliquées dans le contrôle de la virulence de *L. pneumophila* Lens. L'importance du diGMPc dans ce contrôle avait déjà été mis en évidence dans les travaux de Levi *et al.* au travers de la perturbation du contenu en diGMPc intracellulaire, via la surexpression des gènes codant les DGC ou PDE, sans pour autant associer un phénotype aux délétions de ces mêmes gènes (Levi *et al.*, 2011). Les travaux effectués pendant ma thèse ont permis d'identifier de façon originale 3 protéines à domaines GGDEF et/ou EAL nécessaires à la virulence de *L. pneumophila.* En effet, la délétion des gènes *lpl0780*, *lpl0922* et *lpl1118* conduit à un défaut dans le déroulement des étapes précoces du cycle infectieux. Le fait que ces mêmes délétions ne soient pas associées à un phénotype dans les travaux de Levi *et al.* est probablement dû à l'utilisation de souches différentes (*L. pneumophila* Lens et Philadelphia) et/ou aux conditions expérimentales utilisées, telles que la multiplicité d'infection (MOI), par exemple. Par ailleurs, nos travaux ont également permis d'identifier 5 autres voies participant à la régulation de la formation de biofilms par *L. pneumophila*, complétant ainsi les données obtenues sur Lpg1057 dans les travaux de Carlson *et al.* (Carlson *et al.*, 2010).

Malgré leur capacité commune à synthétiser ou dégrader le diGMPc, ces 8 protéines à domaines GGDEF et/ou EAL assurent des rôles spécifiques. Elles sont dédiées spécifiquement au contrôle de la virulence ou de la formation des biofilms et, même si elles affectent le même processus cellulaire, leurs rôles de ne sont pas redondants. En effet, les trois protéines impliquées dans le contrôle de la virulence jouent sur la sécrétion des effecteurs par le SST4 Dot/Icm mais de manière différente puisque chaque délétion mène à une dérégulation spécifique de la sécrétion d'un même effecteur. Cette même spécificité est observée pour les 5 protéines à domaines GGDEF et/ou EAL impliquées dans la formation de biofilms : Lpl1559 semble requise pour l'adhérence des bactéries à la surface, Lpl0075 est nécessaire pour la mise en place d'une architecture tridimensionnelle en « champignon », Lpl0329 semble influer soit sur la multiplication bactérienne dans le biofilm, soit sur la dispersion des bactéries et, enfin, Lpl1054 est impliquée dans la formation de biofilms en présence de NO. Chaque protéine, très probablement par le biais de ses activités DGC et/ou PDE, assure un rôle spécifique dans la bactérie.

Cette notion de spécificité est également supportée par les dosages de la concentration intracellulaire en diGMPc des souches affectées pour la formation de biofilms. A l'instar de certains travaux récents (Massie *et al.*, 2012), nos données vont à l'encontre du dogme reliant les hautes concentrations intracellulaires en diGMPc à la stimulation de la formation de biofilms et les faibles concentration à la mobilité et à la virulence bactériennes. En effet, d'une part, 3 des 5 délétions de gènes codant des protéines à domaines GGDEF et/ou EAL affectant la formation de biofilms n'ont pas

de conséquence sur la concentration intracellulaire globale en diGMPc (Δ*lpl0075*, Δ*lpl1054,* Δ*lpl1559*). Ces résultats soutiennent donc plutôt un fonctionnement spécifique de ces 3 voies de signalisation identifiées via une modulation de la concentration intracellulaire locale en diGMPc. D'autre part, les 2 autres délétions (Δ*lpl0329 et* Δ*lpl1176)* conduisent à une diminution de la concentration en diGMPc globale, alors que ce sont justement celles qui favorisent la formation de biofilms plus épais et plus denses. Ces mêmes dosages de diGMPc pourraient être réalisés sur les trois souches inactivées impliquées dans la virulence de *L. pneumophila* (Δ*lpl0780*, Δ*lpl0922* et Δ*lpl1118*) afin de vérifier l'absence de corrélation entre les faibles concentrations en diGMPc et la virulence.

Toutes les protéines à domaines GGDEF et/ou EAL identifiées sont associées à des activités enzymatiques différentes, voire antagonistes. Nous avons démontré que ces activités sont requises pour les rôles de la DGC Lpl0780, de la PDE Lpl1118 et de la protéine bifonctionnelle Lpl0922 dans le contrôle de la virulence. Ces trois enzymes antagonistes interviennent précocement pendant l'infection d'une cellule-hôte et sont nécessaires au bon déroulement du cycle infectieux, suggérant qu'elles assurent, dans le même temps, des rôles parallèles malgré leurs activités antagonistes. De plus, les deux activités de la protéine bifonctionnelle Lpl0922 sont essentielles à son rôle dans le contrôle de la virulence, suggérant un fonctionnement de la voie de signalisation qui implique cette protéine via une modulation locale et rapide de la concentration en diGMPc. La détermination des activités enzymatiques et l'effet des substitutions dans les domaines catalytiques des 5 protéines impliquées dans la formation de biofilms sont en cours de réalisation et pourraient permettre d'appuyer encore plus l'hypothèse de fonctionnement spécifique de ces voies de signalisation.

La poursuite de ces travaux nécessitera l'identification des signaux déclenchant ces voies de signalisation ainsi que les cibles moléculaires qu'elles affectent afin de moduler la virulence et la formation de biofilms de *L. pneumophila*.

Le signal d'activation de Lpl1054 a été mis en évidence dans cette étude ainsi que dans les travaux de Carlson *et al.* (Carlson *et al.*, 2010) : le NO est perçu et fixé par la protéine Hnox1 qui, en réponse, module l'activité de Lpl1054. Les mécanismes moléculaires d'action de Hnox1 sur Lpl1054 reste toutefois à élucider. Les protéines Lpl0329, Lpl0922 et Lpl1118 pourraient peut-être répondre à la disponibilité en oxygène du fait de la présence de poches à hème au sein des domaines senseurs PAS portés par ces 3 protéines. Des tests d'activités enzymatiques réalisés en absence d'oxygène pourraient permettre de valider ou non cette hypothèse. Lpl1118 porte également un domaine CZB (Chemoreceptor zinc binding) impliqué dans la perception du zinc : son activité pourrait donc être modulée par la présence de zinc. Toutes ces annotations sont des pistes à suivre afin de déterminer les signaux d'activation ou d'inhibition de ces 3 protéines. Malheureusement, les annotations des

protéines Lpl0075, Lpl1176, Lpl0780 et Lpl1559 ne mettent en évidence aucun domaine senseur conservé, compliquant donc l'identification des signaux perçus par ces protéines.

L'identification des cibles moléculaires de ces 8 voies de signalisation nécessitera de déterminer quelles molécules (protéines ou ARN) sont capables de capter le diGMPc. Deux candidats ont déjà été identifiés : les deux protéines à domaine PilZ, Lpl1352 et Lpl1890 (Levi *et al.*, 2011). Leur implication dans le contrôle de la virulence ou de la formation de biofilm pourra être mise en évidence grâce à la construction des deux souches inactivées. Il est plus que vraisemblable que ces deux protéines ne sont pas les seuls effecteurs du diGMPc chez *L. pneumophila*. Ces autres effecteurs pourraient être identifier via des expériences de South Western : les protéines de *L. pneumophila* pourraient être séparées par migration en conditions dénaturantes puis incubées avec du diGMPc radioactif, par exemple, et enfin, les protéines capables de lier le diGMPc radioactif pourraient être identifiées par spectrométrie de masse (Abdul-Sater *et al.*, 2012).

Ces effecteurs, encore inconnus, peuvent agir sur des cibles moléculaires à plusieurs niveaux en contrôlant la transcription, la traduction ou d'autres événements post-traductionnels. Actuellement, l'identification des cibles modulées transcriptionellement a été amorcée pour les trois souches inactivées altérées dans la virulence de *L. pneumophila* (Δ*lpl0780*, Δ*lpl0922* et Δ*lpl1118*). Les ARN de ces trois souches, ainsi que de la souche sauvage, ont été extraits au laboratoire et leur séquençage (RNAseq) est actuellement en cours de réalisation sur la plateforme MGX de Montpellier. Cette approche est également envisagée, à court-terme, pour les cinq souches invalidées impliquées dans la formation de biofilms. Si aucun contrôle transcriptionnel n'est mis en évidence alors les études seront poursuivies par des analyses protéomiques comparatives entre la souche sauvage et les souches inactivées afin de détecter la présence différentielle ou les variations de quantité de certaines protéines.

Le but de cette étude est de décrypter le réseau de voies de signalisation à diGMPc de *L. pneumophila* et d'assigner à chacune d'entre elles un rôle dans un processus cellulaire. Les travaux réalisés pendant ma thèse ont permis d'attribuer un rôle à 8 des 22 protéines à domaines GGDEF et/ou EAL de *L. pneumophila*.

Cette étude se poursuivra probablement par l'identification des protéines GGDEF et/ou EAL qui sont impliquées dans le contrôle de la mobilité bactérienne. Afin de répondre à cette interrogation, nous disposons au laboratoire d'une fusion transcriptionnelle contenant le gène rapporteur codant la GFP sous le contrôle du promoteur du gène *flaA*, codant la flagelline. Dans le cas où la grande stabilité de la GFP serait gênante pour la détection des défauts d'expression de la

flagelline, le matériel génétique permettant la construction d'une fusion du promoteur de *flaA* avec le gène codant la luciférase est également disponible au laboratoire.

Toutes les protéines restantes ne seront vraisemblablement pas impliquées dans la mobilité flagellaire. Certaines pourraient moduler la mobilité par glissement de type « sliding » de *L. pneumophila* (Stewart *et al.*, 2009, Stewart *et al.*, 2011) et d'autres pourraient jouer sur la mobilité par twitching (Coil *et al.*, 2009). Ces protéines pourraient également participer à l'adhérence aux cellules-hôtes via la formation des pili de type IV par exemple (Liles *et al.*, 1998, Stone *et al.*, 1998, Liles *et al.*, 1999). L'une d'entre elles, LssE (Lpl1508), pourrait plus particulièrement moduler la fonctionnalité du SST1 de *L. pneumophila* puisqu'elle est codée par un opéron portant *lssB* et *lssD*, les gènes de structure des trois composants de ce SST1 (Fuche *et al.*, données non publiées).

L'étude de ces voies de signalisation à diGMPc chez *L. pneumophila* permettra une meilleure compréhension du cycle de vie de cette bactérie, que ce soient les mécanismes permettant le contrôle de la virulence vis-à-vis de la cellule-hôte, de la formation de biofilms ou encore de la mobilité bactérienne. Les données recueillies pourraient permettre d'envisager de nouvelles approches, ciblant le diGMPc, afin d'atténuer la virulence de ce pathogène ou de prévenir sa dispersion dans l'environnement.

6 Fiches techniques

6.1 Fiche technique 1 : Souches

Souches de base

Souches	Génotypes	Références
Acanthamoeba castellanii		Equipe biodiversité Amibes-Légionelles, INSERM E0230
Dictyostelium discoideum		
~ **DBS0302388**	souche sauvage DH1	(Cornillon *et al.*, 2000)
~ **DBS0236184**	(act15)*cnxA*:GFP	(Müller-Taubenberger *et al.*, 2001)
Macrophages		
~ **U937** **(ATCC num : CRL-1593.2 ™)**	monocytes humains	(Sundström *et al.*, 1976)
Escherichia coli		
~ **DH5α**	endA1, hsdR17, supE44, thi-1, recA1, gyrA, relA, Δlac	Laboratoire
~ **BL21 pREP4groESL**	groES, groEL	Laboratoire
Legionella pneumophila		
~ **Lp01**	*Legionella pneumophila* Lens	CNRL
~ **702**	Lp01 dotA::kan	Laboratoire

Souches de *L. pneumophila* Lens inactivées pour les gènes codant les protéines à domaine GGDEF/EAL

Souches	Génotypes	Références
503	*Lp01 lpl0030*::*kan* FRT	Laboratoire
505	*Lp01 lpl1508*::*kan* FRT	Laboratoire
507	*Lp01 lpl0219*::*kan* FRT	Laboratoire
511	*Lp01 lpl1559*::*kan* FRT	Laboratoire
512	*Lp01 lpl2333*::*kan* FRT	Laboratoire
517	*Lp01 lpl0283*::*kan* FRT	Laboratoire
520	*Lp01 lpl0780*::*kan* FRT	Laboratoire
521	*Lp01 lpl2826*::*kan* FRT	Laboratoire
523	*Lp01 lpl0416*::*kan* FRT	Laboratoire
524	*Lp01 lpl0220*::*kan* FRT	Laboratoire
804	*Lp01 Δ (lpl0329)*::*kan*	Laboratoire
806	*Lp01 Δ (lpl0912)*::*kan*	Laboratoire
807	*Lp01 Δ (lpl0922)*::*kan*	Laboratoire
811	*Lp01 Δ (lpl1118)*::*kan*	Laboratoire
815	*Lp01 Δ (lpl1054)*::*kan*	Laboratoire
818	*Lp01 Δ (lpl1176)*::*kan*	Laboratoire
821	*Lp01 Δ (lpl0075)*::*kan*	Laboratoire
825	*Lp01 Δ (lpl2061)*::*kan*	Laboratoire
944	*Lp01 Δ (lpl0860)*::*kan*	Laboratoire
946	*Lp01 Δ (lpl2567a-lpl2567b)*::*kan*	Laboratoire

Souches de *L. pneumophila* Lens portant un plasmide vide ou un plasmide de complémentation portant les gènes sauvages ou les gènes mutés

Souches	Génotypes	Références
564	Lp01 p2968	Laboratoire
837	520 p2968	Laboratoire
838	520 p2988	Laboratoire
864	807 p2968	Laboratoire
865	811 p2968	Laboratoire
866	811 p3015	Laboratoire
867	807 p3011	Laboratoire
993	944 p3010	Laboratoire
994	946 p3027	Laboratoire
1151	944 p2968	Cette étude
1152	524 p2968	Cette étude
1153	523 p2968	Cette étude
1154	815 p2968	Cette étude
1155	821 p2968	Cette étude
1156	806 p2968	Cette étude
1157	815 p2993	Cette étude
1158	818 p2968	Cette étude
1159	505 p2968	Cette étude
1160	511 p2968	Cette étude
1161	825 p2968	Cette étude
1162	512 p2968	Cette étude
1163	521 p2968	Cette étude
1164	503 p2987	Cette étude
1165	517 p3009	Cette étude
1166	804 p2968	Cette étude
1167	524 p2973	Cette étude
1168	523 p3019	Cette étude
1169	521 p3007	Cette étude
1170	512 p3000	Cette étude
1171	517 p2968	Cette étude
1172	507 p2968	Cette étude
1173	507 p2998	Cette étude
1174	505 p2994	Cette étude
1179	818 p3006	Cette étude
1180	804 p2995	Cette étude
1181	806 p2974	Cette étude
1182	511 p2989	Cette étude
1183	825 p3008	Cette étude
1184	946 p2968	Cette étude
1188	503 p2968	Cette étude
1303	821 p2990	Cette étude
1391	511 pJA16	Cette étude
1392	818 pJA19	Cette étude
1393	804 pJA18	Cette étude
1394	804 pJA17	Cette étude
1501	815 pJA30	Cette étude
1502	815 pJA31	Cette étude

Souches de *L. pneumophila* Lens portant un plasmide permettant la production d'une protéine fluorescente

Souches	Génotypes	Références
972	503 p3041	Laboratoire
974	505 p3041	Laboratoire
975	507 p3041	Laboratoire
976	511 p3041	Laboratoire
977	512 p3041	Laboratoire
978	517 p3041	Laboratoire
979	523 p3041	Laboratoire
980	524 p3041	Laboratoire
981	806 p3041	Laboratoire
982	815 p3041	Laboratoire
983	818 p3041	Laboratoire
984	821 p3041	Laboratoire
985	944 p3041	Laboratoire
986	946 p3041	Laboratoire
1040	804 p3041	Laboratoire
1054	521 p3041	Laboratoire
1094	825 p3041	Laboratoire
1176	807 pXDC31	Cette étude
1178	811 pXDC31	Cette étude
1187	Lp01 pXDC31	Cette étude
1189	702 pXDC31	Cette étude
1190	520 pXDC31	Cette étude
1332	Lp01 p3041	Cette étude
1372	702 p3041	Cette étude
1373	520 p3041	Cette étude
1374	807 p3041	Cette étude
1375	811 p3041	Cette étude

Souches de *L. pneumophila* Lens portant un plasmide permettant la production d'une protéine fluorescente et un plasmide vide/de complémentation

Souches	Génotypes	Références
1026	520 p2988 – p3041	Laboratoire
1038	520 p2968 – p3041	Laboratoire
1062	807 p2968 – p3041	Laboratoire
1063	811 p3015 – p3041	Laboratoire
1071	811 p2968 – p3041	Laboratoire
1082	807 p3047 – p3041	Laboratoire
1141	520 p3034 – p3041	Laboratoire
1142	807 p3050 – p3041	Laboratoire
1144	811 p3058 – p3041	Laboratoire
1147	Lp01 p2968 – p3041	Laboratoire
1148	807 p3011 – p3041	Laboratoire

Souches de *L. pneumophila* Lens permettant la production de protéines fusionnées à la β-lactamase

Souches	Génotypes	Références
1191	807 pXDC61-LepA	Cette étude
1192	807 pXDC61-FabI	Cette étude
1194	Lp01 pXDC61-LegK4	Cette étude
1195	520 pXDC61-FabI	Cette étude
1197	807 pXDC61-LegK4	Cette étude
1199	811 pXDC61-FabI	Cette étude
1302	Lp01 pXDC61-LepA	Cette étude
1304	702 pXDC61-LepA	Cette étude
1305	Lp01 pXDC61-FabI	Cette étude
1306	Lp01 pJA1	Cette étude
1307	520 pXDC61-LepA	Cette étude
1308	520 pJA1	Cette étude
1309	807 pJA2	Cette étude
1310	807 pJA1	Cette étude
1311	811 pXDC61-LepA	Cette étude
1312	811 pJA1	Cette étude
1313	811 pXDC61-LegK4	Cette étude
1314	811 pJA2	Cette étude
1315	520 pXDC61-LegK4	Cette étude
1316	520 pJA2	Cette étude
1325	Lp01 pJA2	Cette étude
1348	520 pJA4	Cette étude
1349	807 pJA6	Cette étude
1350	811 pJA4	Cette étude
1351	807 pJA4	Cette étude
1352	Lp01 pJA3	Cette étude
1353	520 pJA3	Cette étude
1354	Lp01 pJA5	Cette étude
1355	520 pJA5	Cette étude
1356	807 pJA5	Cette étude
1357	807 pJA3	Cette étude
1358	Lp01 pJA6	Cette étude
1359	Lp01 pJA4	Cette étude
1360	811 pJA3	Cette étude
1361	811 pJA5	Cette étude
1362	811 pJA8	Cette étude
1363	520 pJA6	Cette étude
1364	811 pJA6	Cette étude
1365	807 pJA7	Cette étude
1366	807 pJA8	Cette étude
1367	520 pJA7	Cette étude
1368	520 pJA8	Cette étude
1369	811 pJA7	Cette étude
1370	Lp01 pJA7	Cette étude
1371	Lp01 pJA8	Cette étude
1389	Lp01 pJA22	Cette étude
1390	Lp01 pJA23	Cette étude

1396	Lp01 pJA28	Cette étude
1397	Lp01 pJA27	Cette étude
1398	Lp01 pJA29	Cette étude
1399	Lp01 pJA32	Cette étude
1500	Lp01 pJA33	Cette étude
1503	Lp01 pJA34	Cette étude
1504	Lp01 pJA37	Cette étude
1505	Lp01 pJA36	Cette étude
1506	Lp01 pJA35	Cette étude
1507	Lp01 pJA39	Cette étude
1508	Lp01 pJA40	Cette étude
1509	Lp01 pXDC61-RalF	Cette étude

Souches de *E.coli* permettant la surproduction de protéines taggées

Souches	Génotypes	Références
13635	BL21 pREP4groESL pJA9	Cette étude
13636	BL21 pREP4groESL pJA10	Cette étude
13637	BL21 pREP4groESL pJA11	Cette étude
13638	BL21 pREP4groESL pJA12	Cette étude
13643	BL21 pREP4groESL pJA15	Cette étude
13648	BL21 pREP4groESL pJA20	Cette étude
13655	BL21 pREP4groESL pJA26	Cette étude
13656	BL21 pREP4groESL pJA25	Cette étude
13657	BL21 pREP4groESL pJA24	Cette étude
13675	BL21 pREP4groESL pJA42	Cette étude
13676	BL21 pREP4groESL pJA38	Cette étude
13801	BL21 pREP4groESL pML24	Laboratoire
13823	BL21 pREP4groESL pML36	Laboratoire
13833	BL21 pREP4groESL pML46	Laboratoire
13846	BL21 pREP4groESL pML59	Laboratoire
13854	BL21 pREP4groESL pML67	Laboratoire
13859	BL21 pREP4groESL pML72	Laboratoire

6.2 Fiche technique 2 : Plasmides

Plasmides de base

Plasmides	Caractéristiques	Références
pCDPO5	*sacB, ats1ats2, OriT OriV, Cm, Km* (la cassette est flanquée de séquences IS10)	(Pope *et al.*, 1994)
pAV695	*sacB, OriT OriV, Cm (*pCDPO5 délété d'une région de 4.3kb, fragment permettant l'insertion aléatoire de la cassette de résistance à la kanamycine)	Laboratoire
pBR328	amp, chl, tet, OriR (ColE1)	(Covarrubias *et al.*, 1982)
pUC18-Chl	*chl, lacI,* OriR (ColE1), MCS	(Norrander *et al.*, 1983)
pLAW344	*chl, amp, sacB,* OriR (ColE1), OriT (RK2)	(Wiater *et al.*, 1994)
pXDC31	chl, p-Taq-GFP, $lacI^q$, OriV	(Kim *et al.*, 2009)
pXDC50	chl, p-Taq-mcherry, $lacI^q$, OriR (IncQ)	(Hervet *et al.*, 2011)
p3041	pXCD50 avec insertion du gène de résistance à la gentamycine entre les deux sites *Dra*I (perte de *chl*)	Laboratoire
pML5	pUC18-Chl avec la délétion d'un site *BstU*I à la position 1476 conférant une stabilité du plasmide sans pression de sélection chez *Legionella*	Laboratoire
pML4	pBR328 avec la délétion d'un site *BstU*I à la position 2013 conférant une stabilité du plasmide sans pression de sélection chez *Legionella* et une délétion d'environ 1.5kb (dont le gène *tet*)	Laboratoire
pQE30	Vecteur d'expression permettant le clonage d'un gène en phase avec un tag His_6	Qiagen
pGEX-6P-3	Vecteur d'expression permettant le clonage d'un gène en phase avec un tag GST	(Smith *et al.*, 1988)

Plasmides de *L. pneumophila* utilisés pour l'expression des gènes codant les protéines à domaines GGDEF/EAL

Plasmides	Caractéristiques	Références
p2968	pML5 avec insertion du promoteur *kan* entre *Aat*I et *Kpn*I	Laboratoire
p2973	p2968 avec insertion du gène *lpl0220* dans *Sma*I	Laboratoire
p2974	p2968 avec insertion du gène *lpl0912* dans *BamH*I-*Sac*I	Laboratoire
p2987	p2968 avec insertion du gène *lpl0030* dans *Sma*I	Laboratoire
p2988	p2968 avec insertion du gène *lpl0780* dans *Sma*I	Laboratoire
p2989	p2968 avec insertion du gène *lpl1559* dans *Nco*I-*Nhe*I	Laboratoire
p2990	p2968 avec insertion du gène *lpl0075* dans *Sma*I	Laboratoire
p2993	p2968 avec insertion du gène *lpl1054* dans *Sma*I-*Xba*I	Laboratoire
p2994	p2968 avec insertion du gène *lpl1508* dans *Eco105*I-*Nhe*I	Laboratoire
p2995	p2968 avec insertion du gène *lpl0329* dans *Sac*I	Laboratoire
p2998	p2968 avec insertion du gène *lpl0219* dans *Sma*I-*Kpn*I	Laboratoire
p3000	p2968 avec insertion du gène *lpl2333* dans *Hinc*II	Laboratoire
p3006	p2968 avec insertion du gène *lpl1176* dans *EcoR*V-*Pvu*II	Laboratoire
p3007	p2968 avec insertion du gène *lpl2826* dans *Xba*I-*Sma*I	Laboratoire

p3008	p2968 avec insertion du gène *lpl2061* dans *Sma*I	Laboratoire
p3009	p2968 avec insertion du gène *lpl0283* dans *Sma*I-*Kpn*I	Laboratoire
p3010	p2968 avec insertion du gène *lpl0860* dans *Sma*I-*Kpn*I	Laboratoire
p3011	p2968 avec insertion du gène *lpl0922* dans *BamH*I-*Sal*I	Laboratoire
p3015	p2968 avec insertion du gène *lpl1118* dans *Sma*I-*BamH*I	Laboratoire
p3019	p2968 avec insertion du gène *lpl0416* dans *Nco*I-*Kpn*I	Laboratoire
p3027	p2968 avec insertion du gène *lpl2567* dans *Sma*I-*Kpn*I	Laboratoire

Plasmides de *L. pneumophila* contenant des mutations dans les gènes codant les protéines à domaines GGDEF/EAL

Plasmides	Caractéristiques	Références
p3034	p2988 avec mutagénèse du gène codant la protéine Lpl0780 sur le motif GGDEF (E438D, F439I)	Laboratoire
p3047	p3011 avec mutagénèse du gène codant la protéine Lpl0922 sur le motif GGDEF (E422D, F423I)	Laboratoire
p3050	p3011 avec mutagénèse du gène codant la protéine Lpl0922 sur le motif EAL (F546V, E547D)	Laboratoire
p3056	p3015 avec mutagénèse du gène codant la protéine Lpl1118 sur le motif EAL (L428V, E429D)	Laboratoire
pJA16	p2989 avec mutagénèse du gène codant la protéine Lpl1559 sur le motif EAL (E312A, V313S)	Cette étude
pJA17	p2995 avec mutagénèse du gène codant la protéine Lpl0329 sur le motif EAL (M520V, E521D)	Cette étude
pJA18	p2995 avec mutagénèse du gène codant la protéine Lpl0329 sur le motif GGDEF (E393D, F394I)	Cette étude
pJA19	p3006 avec mutagénèse du gène codant la protéine Lpl1176 sur le motif GGDEF (E406D, F407I)	Cette étude
pJA30	p2993 avec mutagénèse du gène codant la protéine Lpl1054 sur le motif GGDEF (E157D, F158I)	Cette étude
pJA31	p2993 avec mutagénèse du gène codant la protéine Lpl1054 sur le motif EAL (M281V, E282D)	Cette étude

Plasmides de *L. pneumophila* codant pour les fusions des protéines effectrices du système de sécrétion de type 4 avec la β-lactamase

Plasmides	Caractéristiques	Références
pXDC61	chl, p-Taq-blaM, lacI^{q}	(Charpentier *et al.*, 2009)
pXDC61-FabI	pXDC61 avec le gène *fabI* en fusion traductionnelle avec le gène de la β-lactamase (*blaM*)	(Charpentier *et al.*, 2009)
pXDC61-LepA	pXDC61 avec le gène *lepA* en fusion traductionnelle avec le gène de la β-lactamase (*blaM*)	(Charpentier *et al.*, 2009)
pXDC61-LegK4	pXDC61 avec le gène *legK4 (lpl0262)* en fusion traductionnelle avec le gène de la β-lactamase (*blaM*)	(Hervet *et al.*, 2011)
pXDC61-RalF	pXDC61 avec le gène *ralF* en fusion traductionnelle avec le gène de la β-lactamase (*blaM*)	(Charpentier *et al.*, 2009)
pJA2	clonage *Kpn*I-*BamH*I de *sidJ* (*lpl2083,* PCR AV238-239) dans les mêmes sites de pXDC61	Cette étude

pJA3	clonage *Kpn*I-*BamH*I de *legK2* (*lpl2066*, PCR AV236-237) dans les mêmes sites de pXDC61	Cette étude
pJA4	clonage *Kpn*I-*BamH*I de *vipA(lpl0433*, PCR AV270-271) dans les mêmes sites de pXDC61	Cette étude
pJA5	clonage *Kpn*I-*BamH*I de *ankB (lpl2072,* PCR AV272-273) dans les mêmes sites de pXDC61	Cette étude
pJA6	clonage *Kpn*I-*BamH*I de *sidC (lpl2433,* PCRAV268-269) dans les mêmes sites de pXDC61	Cette étude
pJA7	clonage *Kpn*I-*BamH*I de *sidM (lpl2384,* PCR AV274-275) dans les mêmes sites de pXDC61	Cette étude
pJA8	clonage *Kpn*I-*BamH*I de *lidA (lpl0971,* PCR AV276-277) dans les mêmes sites de pXDC61	Cette étude
pJA9	clonage *Kpn*I-*BamH*I de *lepB2 (lpl2411,* PCR AV278-279) dans les mêmes sites de pXDC61	Cette étude
pJA15	clonage *Kpn*I-*BamH*I de *ankJ (lpl0479,* PCR JA55-56) dans les mêmes sites de pXDC61	Cette étude
pJA21	clonage *Kpn*I-*Xba*I de *sdhA (lpl0576,* PCR JA57-58*)* dans les mêmes sites de pXDC61	Cette étude
pJA23	clonage *Kpn*I-*BamH*I de *setA (lpl1955,* PCR JA63-64*)* dans les mêmes sites de pXDC61	Cette étude
pJA27	clonage *Kpn*I-*BamH*I de *lnaB* (*lpl2447,* PCR JA107-108) dans les mêmes sites de pXDC61	Cette étude
pJA28	clonage *Kpn*I-*BamH*I de *sidK* (*lpl0997,* PCR JA121-122) dans les mêmes sites de pXDC61	Cette étude
pJA29	clonage *BamH*I-*Xba*I de *legK1* (*lpl1545,* PCR JA123-124) dans les mêmes sites de pXDC61	Cette étude
pJA32	clonage *BamH*I-*Xba*I de *lem3* (*lpl0733,* PCR JA117-118) dans les mêmes sites de pXDC61	Cette étude
pJA33	clonage *BamH*I-*Xba*I de *sidF* (*lpl2507,* PCR JA113-114) dans les mêmes sites de pXDC61	Cette étude
pJA34	clonage *Kpn*I-*BamH*I de *legK3* (*lpl2481,* PCR JA125-126) dans les mêmes sites de pXDC61	Cette étude
pJA35	clonage *Kpn*I-*BamH*I de *ankX* (*lpl0732,* PCR JA119-120) dans les mêmes sites de pXDC61	Cette étude
pJA36	clonage *Kpn*I-*BamH*I de *ridL*(*lpl2230,* PCR JA109-110) dans les mêmes sites de pXDC61	Cette étude
pJA37	clonage *Kpn*I-*BamH*I de *romA* (*lpl1682,* PCR JA111-112) dans les mêmes sites de pXDC61	Cette étude
pJA39	clonage *Kpn*I-*Xba*I de *sidD* (*lpl2385,* PCR JA115-116) dans les mêmes sites de pXDC61	Cette étude
pJA40	clonage *Kpn*I-*BamH*I de *ankH* (*lpl2219,* PCR JA135-54) dans les mêmes sites de pXDC61	Cette étude

Plasmides de *E. coli* permettant la surproduction de protéines taggées

Plasmides	Caractéristiques	Références
pML24	clonage *BamH*I-*Sal*I du gène *lpl0780* (PCR JCL397-398) dans pQE30	Laboratoire
pML36	clonage *BamH*I-*Sal*I du gène *lpl0329* (PCR JCL412-416) dans pQE30	Laboratoire
pML46	clonage *BamH*I-*Sal*I du domaine EAL de *lpl0220* (PCR JCL408-409) dans pGEX-6P-3	Laboratoire
pML59	clonage *Sph*I-*Sal*I de *lpl0860* (PCR AV160-161) dans pQE30	Laboratoire
pML67	clonage *BamH*I-*Sal*I de *lpl0922* (PCR AV166-167) dans pQE30	Laboratoire
pML71	clonage BamHI-SalI du domaine EAL de *lpl1559* (PCR JCL 441-442) dans pQE30	Laboratoire
pML72	mutagénèse dirigée de pML36 (Lpl0329 W526S)	Laboratoire
pJA1	clonage *BamH*I-*Sal*I de *lpl1118* (PCR JA1-AV170) dans pQE30	Cette étude
pJA10	mutagénèse dirigée de pML46 (Lpl0220 E144A)	Cette étude
pJA11	mutagénèse dirigée de pML67 (Lpl0922 F546V;E547D)	Cette étude
pJA13	mutagénèse dirigée de pML59 (Lpl0860 E435A;I436S)	Cette étude
pJA20	clonage *Kpn*I-*Sal*I de *lpl1176* (PCR JA85-86) dans pQE30	Cette étude
pJA24	mutagénèse dirigée de pML067 (Lpl0922 E422D;F423I)	Cette étude
pJA25	mutagénèse dirigée de pML024 (Lpl0780 E438D;F439I)	Cette étude
pJA38	clonage *BamH*I-*Sal*I de *lpl1054* (JCL421-424) dans pQE30	Cette étude
pJA42	clonage *Kpn*I-*Sal*I de *lpl0075* (JA85-86) dans pQE30	Cette étude

6.3 Fiche technique 3 : Amorces

Amorces utilisées pour la création de protéines taggées

Amorces	Séquences (5'-3')	Couples d'amorces	Gène
JA1	gtttggtggatcccatacagaacttgttgg	JA1-AV170	*lpl1118*
AV170	atatttgtcgacaaattcattctccaatactttg		
JCL397	taacacaaggatcccaatatgagcataagtgtgac	JCL397-JCL398	*lpl0780*
JCL409	ttgtgtgcttgtgtcgacatagtcg		
JCL412	ttgagtacgaggatccatgagtactgaatc	JCL412-JCL416	*lpl0329*
JCL416	tgcaatccgtcgactagctcttgtagatg		
JCL421	acaagggatcccatttactgaaccagg	JCL421-424	*lpl1054*
JCL424	agttcctttcgtcgacaaattgcgtc		
JCL441	aacatgatggatccaaacg	JCL441-JCL442	*lpl1559*
JCL442	attgatagtcgacctttcgg		
AV166	gagggaggatcccgtaggcaagaaatcaattatg	AV166-AV167	*lpl0922*
AV167	aaacaggtcgacttcacttaatgaattagtcattac		
JA85	gaaggtaccaatttagccgggtttattcagg	JA85-JA86	*lpl0075*
JA86	gaagtcgaccagcgttgtgattcgtattcc		
JA87	gaaggatcccaaaaaaacttaaaaataaaacagg	JA87-JA88	*lpl1176*
JA88	gaagtcgactgatcctaattaaaatctgttattg		

Les sites de restriction insérés sont indiqués par les nucléotides soulignés.

Amorces utilisées pour la création des protéines effecteurs du système de sécrétion de type 4 fusionnées à la β-lactamase

Amorces	Séquences (5'-3')	Couples d'amorces	Gène
AV236	agggtaccgtttattacataaatttgaaggaac	AV236-237	clonage *legK2 (lpl2066)*
AV237	agggatcctgctctaacacttcagtgac		
AV238	agggtaccggtttcataaagaaagtacttgaa	AV238-239	clonage *sidJ (lpl2083)*
AV239	agggatccaaggagtcagatgcaggctg		
AV270	agggtaccctatcagtaatgcctttcttaag	AV270-271	clonage *vipA (lpl0433)*
AV271	agggatccttcaggaggaacagaagttggc		
AV272	agggtaccaagaatttttttctgatcttcctgag	AV272-273	clonage *ankB (lpl2072*)
AV273	agggatccctatcatagaccagacccgatc		
AV274	agggtaccagtgttaatgaagagcaatttgg	AV274-275	clonage *sidM (lpl2384)*
AV275	agggatcccatatcttcataattgaaatgcgc		
AV276	agggtaccgcaaaagataacaaatcacatcaag	AV276-277	clonage *lidA (lpl0971)*
AV277	agggatccagggagatgaaatataattctacc		
AV278	agggtaccacttatcaaggtaaagaaatagttc	AV278-279	clonage *lepB (lpl2411)*
AV279	agggatcccaacctacgccaaaaagagaag		
JA55	agggtaccggtagaagtgaaatgaaaatagca	JA55-56	clonage *ankJ (lpl0479)*
JA56	agggatcctacgaggatgacaagaaacacc		
JA57	agggtaccgtggcacgtaacagatttgatg	JA57-JA58	clonage *sdhA (lpl0576)*
JA58	agtctagaggattacatttctactatcagcc		
JA63	agggtaccgaaaatttaccacaagctggtca	JA63-64	clonage *setA (lpl1955)*
JA64	agggatcccagattaagtcaaaaccaattcac		
JA107	agggtacctcataccaaaaaatagaactcag	JA107-108	clonage *lnaB* (*lpl2447*)

JA108	agggatccggagtgggttatgcaacagct		
JA121	agggtaccggtggcttaactagcgagcaa	JA121-122	clonage *sidK* (*lpl0997*)
JA122	agggatcctatttttttattgtggacttaatcg		
JA123	agggatcccctcgtacaatgtttttttccgt	JA123-124	clonage *legK1*(*lpl1545*)
JA124	agtctagactgttataatccgggaaatacag		
JA125	agggtacctttgatagaaatataaaagaaataatcaa	JA125-126	clonage *legK3* (*lpl2481*)
JA126	agggatcctcctaacaaacccagagtaaaatc		
JA135	agggtaccagtattgcaaacgatattatcagt	JA135-54	clonage *ankH* (*lpl2219*)
JA54	agggatccattcgggttgtaatcaatgtcag		
JA136	agggtacccaaaacttagatgagattctaaag	JA136-137	clonage *ceg14* (*lpl0480*)
JA137	agggatccggcaaatagacaacgggatct		
JA138	agggtacccaagaaattgatgtccttatcatt	JA138-139	clonage *lecE* (*lpl2552*)
JA139	agggatcccattgagacttggtttttaaattc		

Les sites de restriction insérés sont indiqués par les nucléotides soulignés.

Amorces utilisées pour la mutagénèse dirigée des gènes codant les protéines GGDEF/EAL

Amorces	Séquences (5'-3')	Couples d'amorces	Mutations introduites
JA33	ctcaaaccttatggttttg**c**atgccttcttaggggaaagcaa	JA33-34	site EAL de Lpl0220 (E144A)
JA34	ttgctttcccctaagaaggcat**g**caaaaccataaggtttgag		
JA35	ggtaagaattgttttcataaag**ct**a**g**cttcgttcgaattcgcaaccaggaag	JA35-36	site EAL de Lpl0860 (E435A;I436S)
JA36	cttcctggttgcgaattcgaacgaag**ct**a**g**ctttatgaaaacaattcttacc		
JA65	cgatctttggtg**g**gaaaagaag**g**tactctcgccag	JA65-66	site I de Lpl0329 (R384G;D387G)
JA66	ctggcgagagta**c**cttctttttc**c**caccaaagatcg		
JA67	ctttggtgcgaaaagaaga**g**actctcgccagacttgg	JA67-68	site I de Lpl0329 (D387E)
JA68	ccaagtctggcgagagt**c**tcttctttttcgcaccaaag		
JA80	gaacggttcacaggggttg**c**a**tgc**ttattgcgatgggaaaatgaagac	JA80-81	site EAL de Lpl1559 (E312A;V313S)
JA81	gtcttcattttcccatcgcaataa**gcatg**caacccctgtgaaccgttc		
JA99	gttaatactcatgagattcgttcc**g**t**c**ga**c**gcattaatccggtgg	JA99-100	site EAL de Lpl0329 (M520V;E521D)
JA100	ccaccggattaatgc**g**t**c**g**ac**ggaacgaatctcatgagtattaac		
JA101	ctcgccagacttggtggggatga**tatc**gtaatgctttttcaatcg	JA101-102	site GGDEF de Lpl0329 (E393D;F394I)
JA102	cgattgaaaaagcattac**g**a**ta**tcatccccaccaagtctggcgag		
JA103	gttatccagagtaggcggagatga**tatc**acattaatctcgctgaatatag	JA103-104	site GGDEF de Lpl1176 (E406D;F407I)
JA104	ctatattcagcgagattaatgt**g**a**ta**tcatctccgcctactctggataac		
JA105	gaacggttcacaggggt**c**g**ac**gtattattgcgatgggaaaatg	JA105-106	site EAL de Lpl1559 (E312D)
JA106	cattttcccatcgcaataatac**g**t**c**g**ac**cctgtgaaccgttc		
JA131	acgaatactatggttgggg**tc**g**ac**gtcttattacgttggcaacatccc	JA131-132	site EAL de Lpl1054 (M280V;E281D)
JA132	gggatgttgccaacgtaataagac**g**t**c**g**ac**ccccaaccatagtattcgt		
JA133	gattgtgtggctcgattaggaggagatga**tatc**gctgttattttgacagaa	JA133-134	site GGDEF de Lpl1054 (E157D;F158I)
JA134	ttctgtcaaaataacagc**g**a**ta**tcatctcctcctaatcgagccacacaatc		
AV206	gcaatccagagtagtcgga**g**t**c**g**ac**gctttaatgagatggc	AV206-207	site EAL de Lpl0922 (F546V;E547D)
AV207	gccatctcattaaagc**g**t**c**g**ac**tccgactactctggattgc		

Les sites de restriction insérés sont indiqués par les nucléotides soulignés et les mutations introduites par les nucléotides en gras.

6.4 Fiche technique 4 : Milieux de culture et conditions de croissance des bactéries

6.4.1 Conditions de cultures

6.4.1.1 *Escherichia coli*

Les souches d'*E. coli* utilisées dans ces travaux sont répertoriées dans le tableau de la fiche technique 1.

La bactérie *E. coli* se développe en milieu liquide LB et sur son dérivé gélosé GL.

~ Milieu riche LB (« Luria Broth ») et GL : Tryptone 10 $g.L^{-1}$, extrait de levure 5 $g.L^{-1}$, NaCl 5 $g.L^{-1}$, pH 7. Le milieu solide est obtenu après ajout d'une solution d'agar à 12 $g.L^{-1}$ autoclavée (20 min à 120°C) et maintenue en surfusion (ajout volume à volume avec du milieu LB concentré deux fois). Les milieux LB et GL peuvent être supplémentés en chloramphénicol (20 $\mu g.mL^{-1}$), en ampicilline (100 $\mu g.mL^{-1}$), ou en kanamycine (50 $\mu g.mL^{-1}$) pour exercer une pression de sélection.

Toutes les cultures en milieu liquide sont effectuées sous agitation à 37°C. La densité cellulaire d'une culture liquide est calculée en fonction de l'absorbance de la culture à 600 nm (DO_{600nm} = 0.4 équivaut à 3.10^8 bactéries/mL^{-1}). Les cultures sur milieu gélosé sont également incubées à 37°C pendant 16 à 24h.

6.4.1.2 *Legionella pneumophila*

Les souches de *L. pneumophila* utilisées lors de ces travaux sont répertoriées dans le tableau de la fiche technique 1. Toutes les manipulations sont réalisées en laboratoire L2 sous PSM (Poste de Sécurité Microbiologique). Les milieux de culture de *Legionella pneumophila* correspondent au milieu liquide LGM et au milieu gélosé CYE qui ont la particularité de satisfaire aux exigences en fer et en cystéine de cette souche. Un milieu liquide spécifique AYE est utilisé lors de la transformation de *L. pneumophila* Paris par compétence naturelle.

~ Milieu riche LGM (« *Legionella* growth medium ») : α-cétoglutarate (Sigma) 1 $g.L^{-1}$, 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 $g.L^{-1}$, ajusté à pH 6.9 avec du KOH 1N.

~ Milieu CYE de *L. pneumophila* : ACES (Roth 9138.2) 10$g.L^{-1}$; extrait de levure (Merck 1.03753.0500) 10$g.L^{-1}$; Agar (Bacto Agar 20768.292) 15$g.L^{-1}$; charbon (Sigma C3790) 2$g.L^{-1}$; L-cystéine (Roth 1693-2) 0,4$g.L^{-1}$ et nitrate de fer (Sigma 10111572) 0,25$g.L^{-1}$, ajusté à pH 6.9 avec du KOH 10M.

~ Milieu AYE : extrait de levure (Difco) 12$g.L^{-1}$, ACES (Roth 9138.2) 10$g.L^{-1}$, L-cystéine HCl (Euromedex 1622-B) 0.4$g.L^{-1}$, pyrophosphate de fer (Sigma P6256) 0.3$g.L^{-1}$, ajusté à pH 6.9 avec KOH 1N.

~ Milieu SBB : $MgSO_4$, $2H_2O$ (0.2$g.L^{-1}$); $FeSO_4$, $7H_2O$ (0.5$mg.L^{-1}$); Na_2HPO_4 anhydre (1.25$g.L^{-1}$); KH_2PO_4 (0.5$g.L^{-1}$); $(NH_4)_2SO_4$ (0.1$g.L^{-1}$) ; glucose (0.05$g.L^{-1}$) ; suppléments dilués au 1/10 de fer et de cystéine (BioMérieux).

Les milieux CYE, LGM et SBB peuvent être supplémentés avec des antibiotiques. Ils sont alors préparés en ajoutant l'antibiotique à la concentration adéquate (kanamycine 10µg.mL^{-1}, chloramphénicol 5µg.mL^{-1} et gentamycine 5ng.mL^{-1}) après stérilisation et refroidissement du milieu aux environs de 65°C.

Les cultures liquides sont effectuées sous agitation en aérobiose à 30°C ou 37°C selon les expériences réalisées. Les cultures sur milieux gélosés sont également incubés à 30°C ou 37°C. La durée d'incubation varie également suivant les expériences menées (3 à 5 jours). La densité cellulaire d'une culture liquide est obtenue par la mesure de l'absorbance à 600 nm (DO_{600nm} =1 équivaut à 1.10^{9} bactéries.mL^{-1})

6.4.2 Stérilisation

La stérilisation des milieux est effectuée par autoclavage à 120°C pendant 20 min pour la plupart des composés et milieux. Les solutions de sucres (milieu d'autoinduction) sont autoclavées à 105°C. Les solutions d'antibiotiques et les supplémentations en nitrate de fer et cystéine des milieux CYE sont stérilisées par filtration sur une membrane Millipore 0.45 µm.

6.4.3 Conservation

- *E. coli* : Les souches contenant des constructions plasmidiques sont mises en conservation dans des cryotubes en ajoutant 1 volume de glycérol 30% stérile à 1 volume de culture liquide ensemencée la veille.
- *L. pneumophila* : La souche *L. pneumophila* Lens provenant de la collection du CNRL (Centre National de Référence des Légionelles), ainsi que les souches construites sont conservées à -80°C dans des cryotubes à billes (Roti-store, Carl Roth).

6.5 *Fiche technique 5 : Milieux de culture et conditions de culture des cellules hôtes*

6.5.1 Milieux de culture

6.5.1.1 Acanthamoeba castellanii

Les amibes *A. castellanii* sont cultivées dans le milieu PYG contenant le milieu PY (extrait de levure 1 $g.L^{-1}$, protéose peptone 20 $g.L^{-1}$, MgSO4 16 mM, $CaCl_2$ 40 mM, citrate de sodium 3.4 mM, $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ 50µM, Na_2HPO_4 2.5 mM, KH_2PO_4 2.5 mM) supplémenté en glucose (0.1M).

Lors des cultures d'entretien de routine au laboratoire, l'ajout d'un mélange d'antibiotiques (pénicilline 66 $\mu g.mL^{-1}$ et streptomycine 100 $\mu g.mL^{-1}$) permet d'obtenir des cultures axéniques (c'est-à-dire dépourvues de germes).

La stérilisation du milieu PY se fait par autoclavage à 120°C pendant 20 min. La solution mère de glucose est autoclavée à 105°C. Les solutions d'antibiotiques sont stérilisées par filtration sur une membrane Millipore 0.45 µm.

Au cours de l'infection, *A. castellanii* est maintenue dans du tampon AC (MgSO4 16 mM, $CaCl_2$ 40 mM, citrate de sodium 3.4 mM, $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ 50µM, Na_2HPO_4 2.5 mM, KH_2PO_4 2.5 mM). Ce milieu ne permet que leur survie ainsi que celle des *L. pneumophila*.

6.5.1.2 Dictyostelium discoideum

Les amibes de *D. discoideum* sont cultivées en milieu HL5 (peptone 14.30 $g.L^{-1}$, extrait de levure 7.15 $g.L^{-1}$, Maltose 18 $g.L^{-1}$, $Na_2HPO_4.12H_2O$ 0.64 $g.L^{-1}$, KH_2PO_4 0.48 $g.L^{-1}$, ajusté à pH6.5).

Dans les expériences d'infection de *D. discoideum* par *L. pneumophila*, le milieu MB (Peptone 14.30 $g.L^{-1}$, extrait de levure 7.15 $g.L^{-1}$, MES (Roth) 3.9 $g.L^{-1}$, ajusté à pH6.9) est utilisé puisqu'il permet la survie des amibes et des bactéries mais pas leurs multiplications.

Pour certaines expériences, les bactéries et les amibes sont observés en fluorescence au microscope confocal. Dans ce cadre, les *D. discoideum*, produisant des protéines fusionnées à la GFP, sont maintenues dans un milieu Lo-Flo (ForMedium), qui permet d'atténuer leur auto-fluorescence naturelle.

Ces milieux peuvent être supplémentés en G418 (20 $\mu g.mL^{-1}$) pour la culture de les souches synthétisant les protéines calnexine-GFP.

La stérilisation de ces deux milieux se fait par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

6.5.1.3 Macrophages

Les macrophages U937 et THP-1 sont cultivés en milieu RPMI Glutamax(Gibco) supplémenté en sérum de veau fœtal (SVF) à hauteur de 10%.

Lors des cinétiques de suivi de fluorescence au cours de l'infection, les macrophages sont maintenus dans un milieu CO_2-indépendant (Gibco) supplémenté en L-Glutamine à 2mM final.

6.5.2 Conditions de culture

Les cultures *d'A. castellanii* sont effectuées dans des flasques stériles en milieu PYG dans un volume de 7 ou 21 mL (en fonction de la taille de la flasque utilisée) et incubées à 30°C. La densité de cellules atteinte au bout de 4 jours de culture est d'environ 2.10^6 cellules.mL^{-1}. Pour l'entretien hebdomadaire des cultures d'amibes, les cellules sont décollées du support de culture en incubant les flasques 10 min sur la glace. Le décollement est ensuite vérifié par observation au microscope inversé (grossissement x20) puis 500 µL de culture sont prélevés et placés dans une nouvelle flasque contenant 7 mL de PYG stérile.

Les cultures de *D. discoideum* se font dans des boites de Pétri stériles en milieu HL5. La croissance de ces amibes se fait à 22°C. Pour l'entretien hebdomadaire, les cellules sont décollées du support par une action mécanique douce d'aspiration/refoulement à la pipette. 1 ml de suspension cellulaire décollée est alors prélevé et inoculé dans une nouvelle boite de Pétri contenant 15ml de milieu HL5.

Les cultures de cellules U937 et THP-1 sont réalisées dans flasques contenant 10 ou 30ml de RPMI Glutamax supplémenté en SVF à hauteur de 10% à une température de 37°C et dans une atmosphère contenant 5% de CO_2. L'entretien de ces cellules est effectué deux à trois fois par semaine simplement par ensemencement d'une nouvelle flasque au 1/10 à partir de la précédente culture d'entretien (les cellules U937 et THP-1 non différenciées ne sont pas adhérentes).

Les amibes sont dénombrées à l'aide d'une cellule de Malassez dans le but de calibrer précisément la quantité de cellules utilisées pour réaliser les infections par *L. pneumophila*.

6.6 Fiche technique 6 : Techniques de manipulation de l'ADN

6.6.1 Extraction et purification de l'ADN plasmidique

La colonie à analyser est inoculée dans 1.5 mL de milieu liquide (BL pour *E. coli* ou LGM pour *L. pneumophila*) supplémenté avec le ou les antibiotiques appropriés. Cette culture est ensuite incubée sous agitation à 37°C pendant 16 h environ (une nuit).

Les cellules sont ensuite récoltées par centrifugation (10 min à 13 000 rpm) puis le culot est repris dans 200 µL de solution I (Tris-HCl 25mM, EDTA 10 mM, glucose 50 mM, pH 8.0) additionnée de RNAse A (Qiagen, 10 $\mu g.mL^{-1}$). Les bactéries sont ainsi lysées. Puis, 200 µL de solution II (NaOH 0.2 M, SDS 1%) sont ajoutés, provoquant la dénaturation de l'ADN. L'ajout de 150 µL de solution III (acétate de potassium 5 M, acide acétique glacial 11.5%) va permettre la renaturation brutale des ADN de petite taille, laissant l'ADN chromosomique dénaturé et insoluble. Une centrifugation du mélange 10 min à 13 000 rpm permet de récupérer le surnageant contenant l'ADN plasmidique. Les échantillons sont ensuite supplémenté d'un mélange de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (Roth) dans le but d'éliminer les protéines présentes. Après centrifugation 5 min à 13 000 rpm, la phase aqueuse supérieure est récupérée. Elle contient l'ADN plasmidique soluble alors que les protéines sont présentes à l'interface entre la phase aqueuse et la phase organique. Ensuite, 1 mL d'éthanol 100% à -20°C est ajouté et les échantillons sont incubées au moins 20 min à -20°C. Après centrifugation 15 min à 13 000 rpm, les culots contenant l'ADN plasmidique sont lavés à l'éthanol 70% avant d'être séchés au speed-vac (Savant Instruments). Les culots ainsi séchés sont repris dans 50 µL d'eau ultrapure.

6.6.2 Digestion de l'ADN par des 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. Ces digestions ont été réalisées sur de l'ADN plasmidique, chromosomique ou sur des produits de PCR.

Pour cela, 5 µL d'ADN sont ajoutés à un mélange comprenant 1 µL d'enzyme appropriée à 10 $U.\mu L^{-1}$ (Fermentas ou Biolabs) et 2 µL de tampon adéquat (fourni avec l'enzyme). Dans le cas d'une double digestion, le tampon doit être compatible avec les deux enzymes utilisées (1 µL de chaque enzyme). Le mélange est ensuite incubé pendant 1 h à 37°C. Puis dans le cas de l'utilisation ultérieure des fragments digérés (ligature) une inactivation de l'enzyme 20 min à 65°C est réalisée.

6.6.3 Extraction de l'ADN chromosomique chez *L. pneumophila*

L'extraction chromosomique est effectuée à partir d'une culture obtenue sur un quart de boite CYE incubée 3 jours à 37°C. A partir de la culture en milieu gélosé une suspension est réalisée dans 750µl d'eau distillée stérile. Après une centrifugation de 10 min à 7000rpm, le culot est repris dans 750µl d'eau, puis les cellules sont lysées en ajoutant 20µl de SDS 10% filtré et 200µl d'une solution de protéinase K à 20 $mg.ml^{-1}$. Le mélange est alors incubé pendant 1 heure à 37°C sous agitation. Un traitement avec 1µl de RNAse à 100 $mg.ml^{-1}$ (RNAse A, Qiagen) est ensuite réalisé avec une incubation de 1h à 37°C sous agitation. Un mélange de 800µl de phénol/ chloroforme/ isoamylalcool (25/24/1) est alors additionné. Le mélange est homogénéisé par retournements doux pendant 15 à 30 min, puis centrifugé 5 min à 10 000rpm. La phase aqueuse est extraite, puis soumise à une seconde extraction au chloroforme/ alcool isoamylique (24/1), suivie d'une agitation douce de 15/20 min avant une nouvelle centrifugation. Deux volumes d'éthanol 100% (1.5ml) et $1/10^{ème}$ de

volume de solution III (75µl) sont alors ajoutés à la phase aqueuse récoltée pour faire précipiter l'ADN. Après agitation par retournements délicats, l'ADN chromosoique est enfin visible sous la forme d'une pelote. Il est récupéré à l'aide d'un fil de platine avant d'être séché près de la flamme puis remis en suspension dans 50µl d'eau ultrapure.

6.6.4 Analyse électrophorétique de l'ADN sur gel d'agarose

L'électrophorèse horizontale en gel d'agarose permet la séparation des fragments linéaires d'ADN dont la taille est comprise entre 300 et 20 000 paires de bases. Les gels d'agarose sont préparés à la concentration de 1% par dissolution à chaud de l'agarose en tampon TAE (Tris-HCl 40 mM, CH_3COONa 20 mM, EDTA mM ajusté à pH 7.8 avec du CH_3COONa). Du bromure d'éthidium (1 $mg.mL^{-1}$) est inclus dans le gel en surfusion. Cet agent intercalent va permettre la visualisation de l'ADN sous l'irradiation à longueur d'onde 312 nm.

L'analyse de l'ADN est effectuée en déposant 5 µL de l'ADN mélangé à un tampon de dépôt 5X (Appligene) sur gel d'agarose. La migration est effectuée à 150V pendant environ 15-20 min. A chaque migration, 5 µL de marqueur préparé selon les recommandations du fournisseur sont déposés sur le gel afin d'évaluer la taille des bandes. Deux marqueurs sont couramment utilisés au laboratoire : « MassRuler DNA Ladder Mix » (SM0403, Fermentas) permettant de visualiser des fragments de 100 à 10 000 pb et « GeneRuler 1kb DNA Ladder Plus » (SM1331, Fermentas) qui permet de visualiser des fragments de 200 à 20 000 pb.

6.6.5 Purification des fragments d'ADN

La purification permet d'éliminer les sels et les nucléotides présents dans les préparations d'ADN. L'ADN est purifié quand il s'agit de l'utiliser à des fins de transformation (élimination des sels qui sont gênants pour l'électroporation) ou dans le but de réaliser des clonages (purification des fragments après digestion avant la ligature). Deux types de purification ont donc été employées :

La purification d'ADN à partir de solution (produits de PCR ou de digestion) : le kit « QIAquick PCR purification kit » (Qiagen) a été utilisé. 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 30µl de tampon d'élution.

La purification d'ADN inclus dans un gel d'agarose : nous avons suivi la procédure du kit Gel Extraction (Qiagen). Ce kit permet la fonte du gel incluant le fragment d'ADN à purifier puis la fixation de celui-ci sur une colonne contenant également de la silice et enfin l'élution du fragment souhaité après lavage.

6.6.6 Ligature de fragments d'ADN

Des ligatures ont été réalisées dans le cadre de la réalisation des constructions plasmidiques afin d'insérer les gènes d'intérêt dans les plasmides de surproduction ou de complémentation. Les extrémités cohésives ou à bords francs sont ligaturées respectivement avec la T4 DNA ligase à 1 ou 5 $U.µl^{-1}$ (Fermentas) dans un volume réactionnel final de 20µl complété avec 2µl de tampon de ligature 10X (fourni avec l'enzyme), des deux solutions à ligaturer (rapport 1 pour 3 entre la quantité de vecteur et d'insert) et d'eau ultrapure. Le tout est ensuite incubé pendant 1h à 22°C et l'enzyme est inactivée par incubation 10min à 65°C.

6.6.7 Amplification d'ADN chromosomique par PCR

La technique d'amplification d'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 défini comme

cible. Elle nécessite deux amorces oligonucléotidiques complémentaires aux séquences délimitant la séquence à amplifier. Des cycles répétés comprenant la dénaturation de l'ADN chromosomique double brin en simple brin, l'appariement des amorces à leurs séquences complémentaires et l'extension des amorces par une ADN-polymérase thermostable, sont réalisés. Toutes ces réactions ont été réalisées dans l'appareil « Mastercycler epgradient ».

6.6.7.1 Amplification des séquences à cloner

❖ *PCR avec la polymérase DreamTaq ®*

Les amplifications sont réalisées dans un volume réactionnel de 50µl contenant : 100ng d'ADN, 2.5µl de chaque amorce à 100µM, 25µl de mélange contenant la polymérase, les dNTP et un tampon contenant du $MgCl_2$.

Le programme permettant l'amplification des fragments PCR est le suivant :

Etape		Durée	Température	Nombre de cycles
Prédénaturation		1-3min	95°C	1
Amplification	dénaturation	30s	95°C	30
	hybridation	30s	Tm-5°C	
	élongation	1min/kb	72°C	
Elongation finale		15min	72°C	1
		∞	15°C	

Le Tm correspond à la température d'hybridation calculée sur le site de finnzymes (https://www.finnzymes.fi/tm_determination.htlm). La température d'hybridation (Tm-5°C) doit être comprise entre 60°C et 72°C.

❖ *PCR avec la polymérase Phusion ®*

Chaque amplification a été réalisée à partir de 100ng d'ADN et dans un volume réactionnel final de 50µl comprenant : 0.5µl de chaque amorce à 20µM, 10µl du tampon commercial, 1µl de dNTPs à 10mM, 1µl d'ADN et 0.5µl de l'enzyme Phusion® Hot Start DNA Polymerase (2U/µl).

Le programme employé pour l'amplification de tous les fragments est le suivant :

Etape		Durée	Température	Nombre de cycles
Prédénaturation		30 sec	98°C	1
Amplification	dénaturation	15 sec	98°C	30
	hybridation	15 sec	Tm + 3°C	
	élongation	30 sec/kb	72°C	
Elongation finale		10 min	72°C	1
		∞	15°C	

Le Tm correspond à la température d'hybridation calculée sur le site de finnzymes (https://www.finnzymes.fi/tm_determination.htlm). La température d'hybridation (Tm+3°C) doit être comprise entre 60°C et 72°C.

6.7 Fiche technique 7 : Transformation des bactéries

6.7.1 Transformation d'*E. coli*

6.7.1.1 Préparation de cellules compétentes

Les cellules compétentes d'*E. coli* sont obtenues par traitement au $CaCl_2$.

Les bactéries (BL21 ou DH5α) sont cultivées en milieu LB à 37°C jusqu'à ce que la culture atteigne une DO_{600nm} d'environ 0.6. Les cultures sont alors centrifugées pendant 10min à 7000rpm puis le culot bactérien est repris dans ½ volume (par rapport au volume de culture de départ) de $CaCl_2$ 50mM froid et stérile. Les échantillons sont alors incubés pendant 40min dans la glace puis ensuite à nouveau centrifugés. Le culot est repris avec précaution, pour éviter le choc thermique, dans 1/15 volume de $CaCl_2$ 50mM + glycérol 20% froid et stérile. Les échantillons sont aliquotés par 300µl et immédiatement placés dans la glace. Ils peuvent être stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

6.7.1.2 Transformation

La transformation de ces bactéries est réalisée avec 150µl de bactéries compétentes, décongelées sur la glace, et 10µl de mélange de ligature ou 2µl d'extraction plasmidique. Le mélange est incubé pendant 20 min dans la glace avant d'effectuer un choc thermique de 3 min à 37°C. Une culture d'expression est ensuite effectuée en ajoutant 1ml de LB et en incubant les bactéries pendant 30 min à 37°C. Les cellules sont enfin étalées sur un milieu approprié (supplémenté en antibiotiques) permettant la sélection des transformants.

6.7.2 Transformation de *L. pneumophila*

6.7.2.1 Préparation des cellules électrocompétentes

Trois jours à l'avance, *L. pneumophila* (Lens ou Paris) est ensemencée sur 3 boites CYE et incubée à 37°C. A partir de ces cultures, une suspension bactérienne est réalisée dans 200ml d'eau ultrapure froide et stérile. La suspension est ensuite centrifugée pendant 20min à 4500rpm et à 4°C. Les culots bactériens sont lavés à quatre reprises avec 30ml d'eau ultrapure stérile froide. Le culot est alors remis en suspension dans 1ml de glycérol 30% froid. La suspension de cellules electrocompétentes ainsi obtenue est répartie par 100µl. Les aliquots sont congelés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

6.7.2.2 Electroporation

Lors de l'électroporation, 100µl de bactéries électrocompétentes, décongelées lentement sur la glace, sont supplémentées avec environ 1µg d'ADN à transformer. Le mélange est alors introduit dans une cuve d'électroporation froide qui est soumis à un champ électrique de 2.3kV, 100Ω et 25µF. Après une remise en suspension dans 500µl de LGM, le mélange est directement incubé au moins une heure à 30°C pour permettre l'expression du plasmide transformé. La totalité de la culture est étalée sur le milieu sélectif approprié, puis incubé à 30°C pendant au moins 5 jours.

6.7.2.3 Analyse des transformants

La vérification des clones obtenus pour les clonages (chez *E. coli*) ou pour les expériences de complémentation (chez *L. pneumophila*) se fait par extraction de l'ADN plasmidique en petite quantité et par vérification du profil obtenu après digestion enzymatique (paragraphes 6.1 et 6.2).

6.8 Fiche technique 8 : Invalidation de gènes chromosomiques chez L. pneumophila

Les souches invalidées chez *L. pneumophila* Lens ont été créées par Mélanie Levet-Paulo, Anne Vianney, Nathalie Baïlo et Jean-Claude Lazzaroni.

6.8.1 Inactivation de gènes chez la souche *L. pneumophila* Paris

La création de souches invalidées chez *L. pneumophila* Paris utilise la capacité de compétence naturelle que cette bactérie présente dans des conditions environnementales très précises.

Une culture bactérienne de cette souche est ensemencée dans 5ml d'un milieu spécifique fraichement préparé, décrit dans le paragraphe 4.1.2, à partir de colonies obtenues sur boite en 3 à 4 jours de croissance à 37°C. La culture liquide est alors incubée à 37°C sous agitation à 150-200rpm. Lorsque la DO_{600nm} de la culture est comprise entre 1.1 et 1.5, celle-ci est centrifugée à 5000xg pendant 10min. Puis, environ 3ml de milieu est éliminée. Les bactéries, resuspendues dans les 2ml restants, sont mélangées avec le produit PCR purifié qui servira à l'inactivation du gène. Ce produit PCR correspond à la cassette d'inactivation entourée par 2kb de régions homologues à celles entourant le gène à inactiver. Une fois le mélange effectué, les bactéries sont incubées sur la nuit à 30°C sans agitation. Ensuite, la suspension est étalée sur le milieu sélectif adéquat (dans notre cas CYE supplémenté avec de la kanamycine) et incubée à 30°C.

6.8.2 Transformation par compétence naturelle chez *L. pneumophila* Paris

Dans certaines conditions, *L. pneumophila* Paris présente une compétence naturelle qu'il est possible d'utiliser pour transformer la bactérie avec des fragments d'ADN simple brin (produits PCR purifiés). Cette technique a été utilisée pour la création de mutants d'inactivation dans cette souche. Pour un bon rendement, il faut prévoir des régions flanquantes d'environ 2kb en amont et en aval du gène cible. Dans notre cas, cette amplification a été réalisée à partir des extractions chromosomiques des souches Lens invalidées par insertion d'une cassette de résistance à la kanamycine.

Cette technique nécessite l'utilisation d'une culture bactérienne fraiche (3 jours à 37°C sur CYE) et d'un milieu spécifique également frais (paragraphes 4.1.2). Des cultures liquides dans 5 ml de milieu sont lancées à une DO_{600nm} de départ de 0.1, 0.05, 0.025 et 0.0125. Ces cultures sont incubées à 37°C sous agitation (150-200rpm). Après 24h de croissance, la DO_{600nm} de chaque culture est mesurée. La culture ayant une DO comprise entre 1.1 et 1.5 est choisie et centrifugée à 500xg pendant 10 min. Environ 3 ml de milieu sont alors éliminés puis les bactéries sont remises en suspension dans les 2ml restants. L'ADN à transformer est alors ajouté (produit PCR purifié). Le mélange est incubé sur la nuit à 30°C en position statique (privation d'oxygène pour les bactéries). Le lendemain, 300µl du mélange sont étalés sur milieu gélosé approprié et incubé à 30°C.

6.9 Fiche technique 9 : Infection des cellules eucaryotes

Les bactéries sont mises en contact avec une monocouche de cellules-hôtes eucaryotes dans une plaque de culture cellulaire. Une centrifugation permet de synchroniser les infections en initiant le contact entre les bactéries et leurs hôtes. Puis, après un temps d'incubation défini, des lavages permettent d'éliminer les bactéries non adhérentes.

Un protocole de mesure de fluorescence des bactéries permet d'estimer la capacité de virulence de celles-ci par une analyse quantitative de la multiplication bactérienne à l'intérieur de la cellule-hôte.

6.9.1 Infections en plaque 96 puits

6.9.1.1 Infection d'amibes

Le jour de l'infection, les cellules-hôtes (*A. castellanii*, *D. discoideum*) sont tout d'abord décollées des flasques ou boites de Pétri dans lesquelles elles ont été cultivées. Ce décollement s'effectue grâce à une incubation des flasques pendant 10 min sur la glace pour *A. castellanii* ou par une simple action mécanique d'aspiration/refoulement à la pipette pour *D. discoideum*. La concentration cellulaire est ensuite estimée en utilisant une cellule de Malassez. Une suspension à 5.10^5 amibes/ml est réalisée puis 200µl de cette suspension est déposée dans chaque puits de la plaque (soit 10^5 amibes/puits). Les amibes sont alors incubées 2h minimum à 30°C. Après cette période d'incubation, les cellules adhérent à nouveau au fond des puits et forment un tapis. Les cellules non adhérentes sont éliminées par deux lavages des puits (avec du tampon AC ou du milieu MB).

Les cellules sont ensuite mises en contact avec les bactéries issues de culture en LGM de 3 jours à 30°C sous agitation. Pour cela, les cultures liquides sont diluées dans l'eau afin d'obtenir une concentration bactérienne 5.10^6 bactéries/ml. Les puits de la plaque sont ensemencés avec 200µl de suspension bactérienne (en tampon AC ou milieu MB) ce qui vaut une multiplicité d'infection (MOI) de 10 (10 bactéries par amibe). Ces suspensions sont également diluées puis déposées sur milieu CYE (5µl par dilution) pour la numération des bactéries inoculées.

Les plaques sont ensuite soumises à une centrifugation à 2000rpm pendant 10min, puis elles sont incubées 1h à 30°C.

A la fin de l'incubation, les tapis d'amibes sont lavés 4 fois avec du tampon AC ou du milieu MB afin d'éliminer les bactéries non adhérentes aux cellules-hôtes. Les plaques sont alors à nouveau incubées à 30°C. Le temps correspondant à la fin des 4 lavages a été pris comme point initial (t=0min) lors des cinétiques d'infection visant à quantifier l'efficacité d'infection des bactéries.

6.9.1.2 Infection de macrophages

Les cellules U937 provenant d'une culture de 3 jours en milieu RPMI supplémenté en SVF à 10% sont dénombrées et diluées de façon à obtenir une suspensions à 5.10^5 cellules/ml. Cette suspension est supplémentée en PMA (Phorbol-12-Myristate-13-Acétate) à 100ng/ml afin d'induire la différenciation de ces cellules en macrophages. Elles passent alors de l'état de cellules non adhérentes et capables de se multiplier à l'état de cellules adhérentes incapables de se multiplier. Les puits d'une microplaque sont alors ensemencés à hauteur de 200µl de suspension cellulaire. Les

cellules sont placés 2 jours à 37°C + 5% de CO_2 pour permettre la différenciation et l'adhésion au support.

La suite de l'infection se déroule de la même façon qu'avec les cellules-hôtes amibiennes à la différence que toutes les étapes sont réalisées en milieu RPMI.

6.9.2 Quantification de l'infection par fluorescence

Au cours de l'infection, *L. pneumophila* se multiplie dans la cellule eucaryote avant de la lyser. La numération des bactéries est un excellent moyen d'estimer la capacité de virulence d'une souche. Pour cela, les plasmides p3041 et pXDC31 permettant, en présence d'IPTG, l'expression des gènes codant respectivement les protéines fluorescentes mCherry et GFP ont été utilisés.

Les souches de *L. pneumophila* contenant ce plasmide ont été cultivées en milieu contenant de la gentamycine (pour la pression de sélection du plasmide) et de l'IPTG (pour l'induction de l'expression du gène *mcherry* ou *gfp*). Pour déterminer la capacité infectieuse de ces souches, des infections de cellules-hôtes ont été réalisées en plaque 96 puits à fond transparent. Les plaques sont déposées dans l'appareil Infinite® M200 (TECAN). La mesure de la fluorescence rouge émise par la protéine mCherry est mesurée toutes les heures avec une excitation à 580nm et une émission à 610nm (bande passante de 20nm pour chacun). La fluorescence verte émise par la GFP est également mesurée toutes les heures avec une excitation 480nm et une émission à 510nm.

6.10 Fiche technique 10 : Caractérisation des phénotypes d'altération de la virulence

6.10.1 Test de transition de phase

L'établissement d'un cycle infectieux dans les cellules-hôtes est intimement lié à une régulation temporelle précise du cycle de *Legionella*, qui aboutit en particulier au passage de la forme réplicative à la forme transmissive de la bactérie. Les caractères phénotypiques acquis au cours de la phase transmissive, parmi lesquels la sensibilité au sodium et la production de pigment, peuvent être mimés par une phase stationnaire de croissance en milieu liquide (Sahr et al., 2009).

6.10.1.1 Production de pigment

La production de pigment est évaluée sur des cultures de *L. pneumophila* en LGM de 5 jours. Les bactéries se trouvent alors en phase stationnaire qui mime l'état de transmission. La DO à 600nm est mesurée pour chacune des cultures. Après centrifugation, la DO à 550nm est également mesurée. Cette seconde mesure de DO permet de quantifier la production de pigment puisque celui-ci absorbe à 550nm. Cette mesure est corrigée par la densité cellulaire en réalisant le ratio DO_{550nm}/DO_{600nm}.

6.10.1.2 Sensibilité au sodium

La sensibilité au sodium est testée en déposant des dilutions de cultures en phase stationnaire de croissance sur une gélose CYE contenant ou non 100mM de NaCl. Les colonies sont dénombrées après 5 jours de croissance à 30°C. Le pourcentage de résistance est ensuite calculé (Sahr et al., 2009).

6.10.2 Effet cytotoxique de *L. pneumophila* vis-à-vis des cellules hôtes

Ce test vise à mesurer l'effet cytotoxique de *L. pneumophila* en estimant le nombre de cellules-hôtes d'*A. castellanii* viables à un temps donné de l'infection.

Pour cela, les cellules sont infectées comme décrit précédemment (paragraphe 9.1), puis à 24h ou 48h post-infection, les cellules sont lavées à 4 reprises avec du milieu PY puis incubées avec du milieu PY supplémenté à 10% de Bleu Alamar (v/v) (Invitrogen). Ce composé bleu absorbe à 600nm. Il peut être métabolisé par les cellules eucaryotes, induisant la formation d'un produit rose, qui absorbe à 570nm. Après une nuit d'incubation à 30°C, les densités optiques à 570nm et 600nm sont mesurées. Le degré de mortalité des amibes est exprimé par le ratio :

$$(1-(DO_{570} - DO_{600})_{\text{amibes infectées}} / (DO_{570} - DO_{600})_{\text{amibes non infectées}}) \times 100$$

6.10.3 Test de survie précoce des *L. pneumophila* après entrée dans l'hôte

Le but de ce test est d'estimer l'efficacité d'entrée et de survie précoce des souches mutantes qui ont présenté un défaut de virulence. En effet, cela permet de déterminer si les mutants sont altérés dans les étapes précoces de l'infection ou bien dans l'efficacité de la multiplication dans la vacuole de réplication.

Des cellules d'*A. castellanii* ou de macrophages U937 sont infectées par *L. pneumophila* comme décrit ci-dessus . Après 1h de contact, les cellules sont traitées pendant 1h avec du milieu PY ou RPMI+SVF10% contenant 50µg.ml^{-1} de gentamycine dans le but de détruire les bactéries qui n'ont pas été internalisées. Ensuite, les amibes sont traitées au Triton X-100 0.04% et incubées 10 min sur la glace. Par une action mécanique d'aspiration/refoulement à la pipette (minimum 5min/puits), les

cellules sont lysées. La lyse des macrophages U937 est beaucoup facile et consiste en une incubation des cellules en eau UP stérile à température ambiante pendant 10min puis une lyse rapide par aspiration/refoulement à la pipette (1min/puits). Les lysats contenant les bactéries internalisées (maintenant libérées) sont diluées de plusieurs facteurs 10 en cascade. La totalité de chaque dilution est déposée sur milieu CYE approprié. Après plusieurs jours de culture à 30°C, les UFC (unité formant colonie) obtenues sont dénombrées afin d'estimer le nombre de bactéries qui ont été internalisées et qui n'ont pas été détruites pendant les toutes premières étapes de l'infection. Les résultats obtenus pour la souche sauvage sont ramenés à 100% pour comparaison avec les souches mutantes testées.

6.10.4 Test d'entrée dans l'hôte

L'entrée de *L. pneumophila* dans les cellules-hôtes est mesurée par fluorescence par la technique de « Trypan Blue Quenching » décrite par Charpentier *et al.(Charpentier et al., 2009)*

Les bactéries issues de 3 jours de culture en LGM à 30°C sont marquées à la fluorescéine (5,6-carboxyfluorescein succinimidyl ester (FSE)). Pour cela, elles sont incubées 20 min à température ambiante et à l'abri de la lumière avec 1ml de FSE à 0.1mg.mL^{-1}. 5.10^5 cellules d'*A. castellanii* sont distribuées dans chaque puits d'une plaque 96 puits. Les cellules sont incubées 2h à30°C afin qu'elles adhèrent au support. Quatre puits contenant les amibes sont traités avec un inhibiteur de la phagocytose, la cytochalasine D, ou un inhibiteur de la PI3 kinase, la Wortmannin, afin d'avoir un témoin négatif d'entrée des bactéries dans la cellule-hôte. Puis, les cellules d'*A. castellanii* sont infectées avec 10^7 bactéries marquées à la fluorescéine (MOI=20). L'infection est synchronisée par centrifugation de la plaque à 2000rpm pendant 10 min. La plaque est alors incubée à 30°C pendant 30 min. Le milieu de culture est alors remplacé par 50µl de solution de Bleu Trypan (Bleu Trypan 0.25 mg.mL^{-1}, tampon citrate 13mM, NaCl 0.9%). Cette solution permet d'étouffer la fluorescence émise par les bactéries qui n'ont pas été internalisée. Après 1 min d'incubation, la fluorescence des bactéries internalisée est mesurée grâce à un lecteur de plaque (Infinite® M200, TECAN) avec une longueur d'onde d'excitation de 485nm (bande passante 10 nm) et une longueur d'onde d'émission de 530nm (bande passante 30nm).

6.10.5 Test de sécrétion d'effecteurs par le système de sécrétion de type 4

La sécrétion éventuelle des effecteurs est suivie comme décrit précédemment (de Felipe *et al.*, 2008). Ce test nécessite la création de souches exprimant des fusions de la β-lactamase TEM-1 avec différents effecteurs. La production et la stabilité de chaque protéine fusion est préalablement contrôlée par Western blot, grâce à des anticorps dirigés contre la β-lactamase (voir paragraphes 4.11.2.3 et 4.11.2.4).

Les cellules U937 cultivées en RPMI contenant 10% de sérum de veau fœtal sont différenciées au PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acétate) dans des microplaques noires de 96 puits à raison de 10^5 cellules par puits, 72h avant l'infection. Les souches de *L. pneumophila* portant les différentes constructions en fusion avec TEM sont cultivées en CYE contenant du chloramphénicol. Des colonies isolées sont repiquées sur CYE contenant du chloramphénicol et de l'IPTG 0.5mM et incubées 24h pour induire la synthèse des protéines hybrides. 10 µl de bactéries resuspendues en RPMI à 5.10^8 cellules/ml sont utilisés pour infecter les cellules U937. Après centrifugation pendant 10 min à 600 xg pour initier le contact bactérie-hôte, la plaque est placée pendant 1h à 37°C en présence de 5% de CO_2. Les cellules sont mises au contact du substrat fluorescent par ajout de 4,2µl d'une solution (6X)

de CCF4/AM (Live-BLAzer-FRET B/G loading kit, Invitrogen) contenant 15mM de probenecid (Sigma) qui inhibe l'efflux du substrat par les macrophages. Les cellules sont incubées 2h supplémentaires à température ambiante. La fluorescence est mesurée sur un lecteur de plaque (Infinite® M200, TECAN) à une longueur d'onde d'excitation de 405nm (bande passante 10nm) et l'émission est détectée à 460 nm (bande passante 40nm, fluorescence bleue) et 530nm (bande passante 30 nm, fluorescence verte).

6.10.6 Cinétique de sécrétion d'effecteurs par le système de sécrétion de type 4

Les cinétique de sécrétion d'effecteurs sont effectuées selon le même principe que le test décrit précédemment. Cependant, ces tests ne permettent de visualiser la présence d'un effecteur sécrété dans la cellule qu'à un instant donné (autour de 2h30 après infection) et non son évolution au cours du temps comme le permettent les cinétiques.

Les infections de cellules U937 différenciées sont effectuées comme précédemment. A différents temps souhaités, les infections sont arrêtées par ajout de 10µl de CCCP 10µM (Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone). Cette molécule bloque la force protomotrice de la cellule, arrêtant notamment la sécrétion des effecteurs via le SST4 Dot/Icm. Lorsque toutes les infections sont figées au temps souhaité, 4,2µl d'une solution (6X) de CCF4/AM contenant 15mM de probenecid sont ajoutés. Le chargement du substrat fluorescent dans les macrophages est réalisé à température ambiante pendant 1h30. Enfin, les fluorescences bleue et verte sont mesurées comme décrit ci-dessus.

6.10.7 Suivi du recrutement du réticulum endoplasmique sur la vacuole de réplication

Des cellules de *Dictyostelium discoideum* synthétisant la protéine hybride calmexine-GFP sont utilisées pour analyser par fluorescence le recrutement du réticulum endoplasmique au niveau de la vacuole de réplication des *L. pneumophila* synthétisant la mCherry.

D. discoideum est ensemencé sur des lamelles de verre stérile. Cette étape s'effectue en plaque de 6 puits contenant 5.10^6 cellules/puits dans du milieu Lo-Flo. Les cellules sont incubées une nuit pour leur permettre d'adhérer à la lamelle. Ces monocouches de *D. discoideum* sont infectées à une MOI de 100 par des *L. pneumophila* cultivées pendant 4 jours à 30°C qui produisent la mCherry. La plaque centrifugée à 800xg pendant 10min puis elle est incubée à une température de 25°C pendant 1h. Les monocouches sont alors lavées deux fois avec du tampon SorC (Na_2PO_4 2mM, KH_2PO_4 15mM, $CaCl_2$ 50mM, pH6.0) puis elles sont fixées avec 3.7% de paraformaldéhyde (30 min à 4°C). Les lamelles sont observées au microscope confocal inversé (Axiovert 200M, Zeiss) équipé avec un objectif x63 (Plan Neofluar, Zeiss, aperture 1.4, huile).

6.10.8 Suivi de l'échappement à la voie endosomale

Le suivi de l'échappement à la voie endosomale est réalisé via l'immunomarquage de l sous-unité VatA de l'ATPase vacuolaire VatM de l'hôte sur le phagosome dans lequel *L. pneumophila* a été internalisée. Cette ATPase fait partie des marqueurs de la maturation du phagosome de la voie endosomale.

Dictyostelium discoideum est ensemencé sur des lamelles de verre stérile dans une microplaque à 6 puits à hauteur de 5.10^6 cellules/puits en milieu MB. Les cellules sont incubées pendant une nuit pour leur permettre d'adhérer à la lamelle. Ces monocouches de *D. discoideum* sont ensuite infectées à une MOI de 100 par des *L. pneumophila* cultivées 3 jours à 30°C qui

produisent la mCherry. La plaque est centrifugée à 800xg pendant 10min puis elle est incubée une température de 25°C pendant 1h. Les cellules sont ensuite fixées par du paraformaldéhyde 4%, perméabilisées avec du méthanol 100% à -20°C pendant 2min à température ambiante et bloquées avec du PBS supplémenté en BSA 0,2%. Les lamelles sont incubées avec l'anticorps primaire dirigé contre VatA (Don de F. Letourneur) pendant 1h, puis après 3 lavages, elles sont mises en présence de l'anticorps secondaire (AlexaFluor488, A11029, Molecular Probes). Les lames sont observées au microscope confocal inversé (Axiovert 200M, Zeiss) équipe avec un objectif x63 (Plan Neofluar, Zeiss, aperture 1.4, huile).

6.11 Fiche technique 11 : Caractérisation des phénotypes de formation de biofilms

Les travaux utilisant les techniques ci-après ont été réalisées par nos collaboratrices de l'Université de Toulouse, Sophie Pécastaings et Christine Roques.

6.11.1 Suivi de la croissance planctonique

Des suspensions bactériennes à DO_{600nm} ≈0,2 sont distribuées dans une microplaque à 96 puits à hauteur de 200µl par puits. La microplaque est incubée à 37°C dans un lecteur de plaque (Polarstar Optima, BMG LabTech). La DO_{650nm} est mesurée toutes les 35 min afin de suivre la croissance bactérienne.

6.11.2 Création d'un biofilm mono-espèce de *L. pneumophila* en plaque 6 puits

6.11.2.1 En aérobiose

Ce protocole a été mis au point par nos collaboratrices (Pécastaings *et al.*, 2010). Les puits d'une microplaque à 24 puits sont ensemencés avec 2ml d'une suspension bactérienne de 10^2 bactéries/ml en milieu SBB. Les microplaques sont incubées statiquement à 32,5°C pendant 9 jours. Pendant cette incubation de 9 jours, le milieu SBB est renouvelé tous les 3 jours après deux lavages effectués avec 1ml d'eau distillée stérile. Ces lavages permettent d'éliminer les bactéries planctoniques et par conséquent de favoriser la croissance sessile.

6.11.2.2 En présence d'oxyde nitrique (NO)

Les biofilms sont formés de la même façon qu'en aérobiose à l'exception de la supplémentation quotidienne du milieu SBB avec du nitroprusside de sodium (SNP) sur les trois derniers jours de la formation du biofilm. La solution de supplémentation de SNP est préparée extemporanément à une concentration de 500mM. Comme le SNP n'est pas stable en solution aqueuse et est photodégradable, la solution de supplémentation est stockée à l'obscurité pour une durée qui n'excède pas 8h. La microplaque est elle aussi maintenue à l'obscurité pendant l'incubation à 32,5°C. Ici, le SNP est utilisé comme donneur de NO. La libération de NO est mesurée indirectement par quantification des ions NO_2^- dans le milieu de culture par une réaction de Griess (Griess Reagent System, Promega). Ces ions sont un produit stable et non volatile du NO.

6.11.3 Quantification des bactéries du biobilm par PCR quantitatives

6.11.3.1 Extraction des ADN génomiques

Les puits contenant les biofilms sont rincés avec 2ml d'eau distillée stérile. Les biofilms sont repris dans 1ml d'eau distillée stérile puis grattés avec une spatule stérilisée pendant 1 min afin de collecter les bactéries adhérées. L'ADN génomique des bactéries contenant dans 500µl de la suspension en utilisant le kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) selon les instructions du fournisseur.

6.11.3.2 Traitement à l'éthidium monoazide

Pour les vPCR (PCR des bactéries viables), la suspension de 500µl de bactéries est préalablement incubée avec de l'éthidium monoazide (EMA) à 10µg.mL^{-1} (Life Technologies) pendant 5 min à température à l'obscurité puis 5 min sous une lampe à néon (11W, ϕ=0,37, à 15 cm environ des tubes) dans la glace. Cette étape est nécessaire afin de lier covalemment l'EMA avec l'ADN génomique des bactéries mortes ou endommagées, afin d'empêcher leur amplification par PCR.

Cette méthode permet la quantification des bactéries viables seulement. Ensuite, l'extraction d'AND est réalisée comme précédemment.

6.11.3.3 PCR quantitative

La réaction de PCR quantitative est réalisée dans un volume final de 25µl, incluant 5µl d'ADN génomique précédemment extrait, le marqueur 2X iQ™ SYBR Green Supermix (Biorad) et le couple d'amorces, LEG427F et LEG880R (Chang *et al.*, 2009) à 200nM dans un cycler MyiQ™ (Biorad). Les conditions de température utilisées sont indiquées dans le tableau ci-dessous.

Etape		Durée	Température	Nombre de cycles
Prédénaturation		3 min	95°C	1
Amplification	dénaturation	15 sec	95°C	40
	hybridation	30 sec	63,5°C	
	élongation	30 sec	72°C	
Elongation finale		1 min	55°C	1

6.11.4 Observation de l'architecture du biofilm par microscopie confocale

Les biofilms utilisés pour les observations en microscopie confocale sont réalisés en microplaque 6 puits selon les conditions précisées précédemment. Les bactéries sont ensuite marquées avec le Syto9 (Life Technologies), permettant de marquer en vert les acides nucléiques. Le marqueur est ajouté directement dans les puits à une concentration finale de 0,28µM afin de marquer la totalité des bactéries présentes. Les observations sont effectuées sur un microscope confocal (Perkin Elmer) équipé d'un objectif x40 et de deux caméras (Hamamatsu C9100-13). Les reconstitutions en trois dimensions sont réalisées avec le logiciel Volocity (Perkin Elmer).

6.12 Fiche technique 12 : Techniques biochimiques

6.12.1 Surproduction et purification de protéine possédant une étiquette His_6

Les bactéries BL21 (pREP4*groESL*) qui contiennent un plasmide dérivé de pQE30 (Invitrogen) permettent la surproduction de protéines recombinantes contenant une étiquette 6-histidine (His_6) en N-terminal des protéines. Elles surproduisent également des protéines chaperonnes GroES et GroEL favorisant le repliement des protéines surproduites.

6.12.1.1 Production des protéines et extraction

Une colonie isolée est utilisée pour inoculer une préculture dans 5ml de LB contenant de l'ampicilline (sélection du pQE30) et de la kanamycine (sélection du pREP4*groESL*). Après incubation à 37°C sous agitation pendant la nuit, la préculture est utilisée pour inoculer au $1/100^{ème}$ 50 à 400ml de milieu LB +ampicilline + kanamycine. La croissance s'effectue jusqu'en phase de croissance exponentielle ($DO_{600nm} \approx 0.8$).

L'équivalent de 3.10^8 bactérie est prélevée à ce stade (témoin extrait protéique total non induit). Cet aliquot est centrifugé à 12 000rpm pendant 5 min. Le culot est repris dans 40µl de tampon de dépôt SDS-PAGE 2X (Tris 125mM pH6.8, SDS 2%, glycérol 20%, bleu de bromophénol 0.005%, β-mercaptoéthanol 0.1M) et conservé à température ambiante jusqu'à son analyse par SDS-PAGE.

La surproduction de la protéine recombinante est induite en ajoutant à la culture de l'IPTG à une concentration finale de 1mM. Après un temps défini d'induction (1h à 3h), l'équivalent de 3.10^8 bactérie est prélevé et traité comme précédemment (extrait protéique total induit). Le reste des cellule est récupéré par centrifugation à 6000rpm pendant 1min à 4°C.

Les cellules sont lavées avec 10ml d'eau puis resuspendues dans du tampon A (Tris-HCl 50mM pH7.5, NaCl 300mM, imidazole 10mM, β-mercaptoéthanol 1mM, EDTA 1mM). Elles sont ensuite lysées par un passage à la Presse de French. Les extraits sont ensuite centrifugés 30 min à 14 000rpm et le surnageant est récupéré. Afin d'évaluer la solubilité de la protéine recombinante, 10µl de surnageant peut être prélevé et ajouté à 10µl de tampon de dépôt SDS-PAGE 2X. Le tout est conservé à température ambiante jusqu'à analyse par SDS-PAGE.

6.12.1.2 Purification des protéines

- *Résine Ni-NTA*

La purification s'effectue par incubation 2h à 4°C de l'extrait protéique (surnageant du paragraphe précédent) avec la résine Ni^{2+}-NTA agarose (Qiagen) préalablement équilibrée avec le tampon A. Les extraits protéiques sont ensuite chargés sur une colonne de polypropylène (Qiagen). Les protéines non retenues sont éluées trois fois par rinçage de la colonne avec du tampon A contenant 20mM d'imidazole. L'élution de la protéine d'intérêt est réalisée avec 300µl de tampon A supplémenté de 150mM d'imidazole, à trois reprises. Les différentes fractions de la purification (filtrat, lavages et éluats) sont analysées par SDS-PAGE (10µl de chaque fraction avec 10µl de tampon de dépôt SDS-PAGE 2X), afin de vérifier la qualité de la purification.

Les protéines sont ensuite dialysées à l'aide d'une membrane (Spectra/por®Cellulose Ester cut-off : 5000-Spectrum) contre 1 000 volumes de tampon de dialyse (Tris 50mM, NaCl 150mM, pH7.8) pendant une nuit à 4°C.

❖ *Billes magnétiques*

La purification s'effectue par incubation 30 min des lysats bactériens avec les billes magnétiques, préalablement équilibrées avec le Tampon A. Les protéines non retenues sont éliminées par 3 lavages avec du Tampon A supplémenté en imidazole 50mM. L'élution de la protéine d'intérêt s'effectue avec 150µl de Tampon A supplémenté en imidazole 300mM, à trois reprises. Les différentes fractions sont analysées par SDS-PAGE comme décrit ci-dessus. Les protéines éluées sont ensuite dialysées contre 1 000 volumes de tampon de dialyse, comme précisé précédemment.

6.12.2 Analyse des protéines

6.12.2.1 Dosage des protéines

Les protéines sont dosées par spectrophotométrie au Nanodrop 2000 (Thermo) à DO_{280nm}.

6.12.2.2 Electrophorèse en gel de polyacrylamide SDS-PAGE

Lors de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE), les protéines sont linéarisées après dénaturation par le SDS et réduction des ponts disulfures en présence de β-mercaptoéthanol. Les charges négatives constantes apportées par le SDS leur permettent une mobilité électrophorétique vers l'anode en fonction inverse de leur masses moléculaires.

Les gels de polyacrylamide sont constitués d'un gel d'alignement (acrylamide/disacrylamide (30/0.8) 6%, Tris-HCl 0.125M pH6.8, SDS 0.1%, persulfate d'ammonium 0.1%, TEMED 0.1%) et d'un gel de séparation (composition identique à l'exception de la concentration en acrylamide/bisacrylamide (30/0.8) de 8 à 12%, et le tampon Tris-HCl 0.375M à pH8.8). 10µl de tampon de dépôt SDS-PAGE 2X sont ajoutés à 10µl d'échantillon protéique à analyser. Les protéines sont ensuite dénaturées par chauffage 5min à 100°C puis déposées sur le gel d'électrophorèse. Le marqueur de poids moléculaire utilisé est le PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas).

L'électrophorèse est conduite dans du tampon de migration (Tris 25mM, Glycine 192mM, SDS 0.1%) à 90V lorsque les protéines traversent le gel d'alignement et à 200V lorsque les protéines sont passées dans le gel de séparation, pendant 1h à température ambiante.

Les protéines sont ensuite fixées et colorées sur le gel par immersion de celui-ci pendant 30min sous agitation douce dans une solution de coloration (acide acétique 10%, éthanol 40%, Bleu de Coomassie Brillant R250 0.04%). Le gel est ensuite mis à décolorer 30 min à 1h sous agitation douce dans une solution de décoloration (acide acétique 10%, éthanol 5%).

6.12.2.3 Transfert des protéines sur membrane

Après analyse par électrophorèse SDS-PAGE, les protéines peuvent être transférées sur une membrane de nitrocellulose (Optitran BA-S85, Whatman). Trois tampons différents sont utilisés :

- Tampon 1 : Tris HCl 300mM, méthanol 20%.
- Tampon 2 : Tris HCl 25mM, méthanol 20%.
- Tampon 3 : Tris HCl 25mM, EACA (acide aminocaproïque) 40mM, méthanol 20%.

Le sandwich suivant est réalisé à l'aide de papier Whatman 3M :

Cathode (-)
_____ 9 feuilles imbibées de tampon 3
_____ gel d'électrophorèse SDS-PAGE
_____ membrane de nitrocellulose pré-imbibées de tampon 2
_____ 3 feuilles imbibées de tampon 2
_____ 6 feuilles imbibées de tampon 1
Anode (+)

Le transfert des protéines à lieu de la cathode vers l'anode, sous intensité constante pendant 1h30 (0,8 mA/cm²) ou une nuit (0,4mA/cm²). Les protéines transférées peuvent ensuite être révélées à l'aide d'anticorps spécifiques.

6.12.2.4 Immunorévélation de protéines sur membrane

Après transfert des protéines, la membrane est saturée pendant 1h sous rotation dans du TBS (Tris 100mM, NaCl 150mM, pH 8) supplémenté en BSA (Bovine Serum Albumine) à 5%. Après 3 lavages de 5 min dans du TBS Tween20 0,1%, la membrane est incubée pendant 1h sous agitation dans une solution de TBS Tween20 0,1% BSA 0,5% contenant l'anticorps primaire. La membrane est à nouveau lavée à 3 reprises avec du TBS Tween20 0,1%. La membrane est ensuite incubée 1h sous agitation dans du TBS Tween20 0, 1% BSA 0,5% en présence de l'anticorps secondaire couplé à la péroxydase puis elle est rincée 3 fois avec du TBS Tween20 0,1%. La révélation est effectuée grâce au kit « SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate » (Pierce). Pour cela, la membrane est incubée dans une solution de luminol, substrat luminescent de la péroxydase. Le signal émis est ensuite détecté par une lecture directe (ChemiStart 5000, Fisher Bioblock Scientific).

Les anticorps qui ont été utilisés dans ce travail pour réaliser des Western Blot sont indiqués dans le tableau ci-dessous.

Anticorps	Anticorps primaire/ secondaire	Origine	Dilution utilisée	Couplage	Référence
Anti-βlactamase	Primaire	Lapin	1/10 000	/	Don de X. Charpentier
Anti-IgG de lapin	Secondaire	Chèvre	1/5 000	Peroxidase	A-0545 Sigma-Aldrich
Anti-His_4	Primaire	Souris	1/20 000	/	Qiagen 34698
Anti-IgG de souris	Secondaire	Chèvre	1/10 000	Peroxidase	Sigma A0168

6.12.3 Test d'activité diguanylate cyclase ou phosphodiestérase *in vitro* des protéines purifiées

L'activité diguanylate cyclase est observée par mesure de la disparition de GTP radioactif qui formera du diGMPc. Ainsi, 5µM de protéines purifiées sont mis en contact avec 50µM de GTP et 15µCi d'α-^{32}P-GTP dans du tampon de dialyse (Tris-HCl 50mM pH8, NaCl 150mM) supplémenté de $MgCl_2$ 20mM pour atteindre un volume final de 50µl. La réaction est incubée à 30°C et des prélèvements de 4µl sont réalisés à différents temps. La réaction est arrêtée par l'ajout de 2µl de solution d'EDTA (0.5mM, pH8).

L'activité phosphodiestérase a été évaluée à partir du mélange non purifié (conservé 24h à 4°C) de l'incubation de 4h de la protéine His_6-Lpl0329W526S avec le GTP et l'α-^{32}P-GTP dans les conditions décrites ci-dessus. Le diGMPc et l'α-^{32}P-diGMPc formés ont servi de substrat pour les

protéines à domaine EAL testées. Ces dernières sont ajoutées au mélange (5µM de protéines) et incubées à 30°C. Des prélèvements sont réalisés et traités comme décrit précédemment.

Les produits de ces réactions sont séparés par chromatographie sur couche mince (plaque de cellulose MN 300 impregnée de polyetylèneimine, 20cm x 20cm, Macherey-Nagel). Des dépots de 1.5µl sont effectués sur les plaques de chromatographie et la migration est effectuée grâce à un tampon d'élution (KH_2PO_4 1.5M pH3.6, $(NH_4)_2SO_4$ 4M pH3.6, (1.5 : 1)), dans une atmosphère humide (bac de chromatographie fermé). Lorsque le front de migration atteint le haut de la plaque (migration de 15cm en environ 1h30), la plaque est enveloppée de film plastique et exposée contre un écran de PhosphoImager environ 30min. L'écran est ensuite analysé par le PhosphoImager. Le logiciel Optiquant permet une quantification de chaque produit pour chaque temps.

6.12.4 Dosage de la concentration intracellulaire en diGMPc par UPLC

6.12.4.1 Extraction du diGMPc

Les extractions de diGMPc sont effectuées à partir de suspensions bactériennes à DO_{600nm}≈1. Les suspensions sont tout d'abord centrifugées pendant 20 min, à 15°C et à 4000 rpm. Le surnageant est éliminé et le culot de bactéries est resuspendu dans 170µL d'eau ultrapure. Cette suspension est ensuite transférée dans un microtube pré-pesé. L'échantillon est ensuite chauffé pendant 15min à 96°C puis 330µL d'éthanol pur à -20°C sont ajoutés afin d'extraire les nucléotides. Les débris cellulaires sont récupérés après une nouvelle centrifugation à 10 000rpm pendant 10min et à 4°C. Cette extraction est répétée une seconde fois afin d'améliorer le rendement de l'extraction. Les tubes sont maintenus dans des portoirs réfrigérés pendant la durée de l'extraction. Les extraits finaux sont sécher au SpeedVac (Savant) et stockés à -20°C avant l'analyse en LC-MS (Liquid chromatography-mass spectrometry). Les débris cellulaires récupérés sont séchés pendant 5 jours à 86°C dans le but de mesurer le poids sec bactérien des échantillons.

6.12.4.2 Dosage du diGMPc par chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse

Les extraits cellulaires séchés sont suspendus dans 200µl d'un mélange d'eau et de méthanol (50 :50 v/v) puis sont filtrés (0,2µm) avant l'analyse. LC-MS est réalisée sur un appareil Acquity Waters (Waters) équipé avec une colonne BEH C18 (50 x 2.1mm, taille des particule : 1.7µm) à 50°C, d'un détecteur UV et détecteur de masse quadripolaire (SQD, Waters). L'éluent A est composé de 15mM de tributylamine, 10mM d'acide acétique, de 3% de méthanol et d'eau. L'éluent B est du méthanol pur. Le volume d'échantillon injecté est de 5µL avec un flux de 0.3mL.min^{-1}. Le gradient utilisé pour la chromatographie liquide est le suivant : 99% de A et 1% de B de 0min à 2min 30s ; 80% de A et 20% de B de 2min 30s à 7 min ; 35% de A et 65% de B de 7min à 7min 30s ; 5% de A et 95% de B de 7min 30s à 9min et 99% de A et 1% de B de 9 min à 9min 30s. Avec cette méthode le temps de rétention du diGMPc est de 4,67min. La détéction du diGMPc est réalisée par ESI (Electrospray ionization) selon les paramètres suivants : voltage du capillaire -3,5kV, température source 135°C, désolvatation à 450°C, azote (900L.h^{-1}), cône -50V, gaz 50L.h^{-1}. Le mode ion négatif a été utilisé pour détecter le diGMPc. Puisque le poids moléculaire du diGMPc est 690.4 alors ratio *m/z* dans ce mode ion négatif est de 689.4.

Une gamme étalon allant de 0.39µM à 12.5µM a été préparée en eau ultrapure à partir d'un stock de diGMPc commercial (BioLog). Le coefficient de corrélation de la courbe étalon correspondant est de 99,97%.

7 Références

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

Abdel-Nour, M., Duncan, C., Prashar, A., Rao, C., Ginevra, C., Jarraud, S.*, et al.* (2014). The Legionella pneumophila Collagen-Like Protein Mediates Sedimentation, Autoaggregation, and Pathogen-Phagocyte Interactions. *Appl Environ Microbiol* **80,** 1441-1454.

Abdul-Sater, A.A., Grajkowski, A., Erdjument-Bromage, H., Plumlee, C., Levi, A., Schreiber, M.T.*, et al.* (2012). The overlapping host responses to bacterial cyclic dinucleotides. *Microbes Infect* **14,** 188-197.

Abel, S., Bucher, T., Nicollier, M., Hug, I., Kaever, V., Abel Zur Wiesch, P. and Jenal, U. (2013). Bi-modal distribution of the second messenger c-di-GMP controls cell fate and asymmetry during the caulobacter cell cycle. *PLoS Genet* **9,** e1003744.

Abel, S., Chien, P., Wassmann, P., Schirmer, T., Kaever, V., Laub, M.T.*, et al.* (2011). Regulatory cohesion of cell cycle and cell differentiation through interlinked phosphorylation and second messenger networks. *Mol Cell* **43,** 550-560.

Ablasser, A., Schmid-Burgk, J.L., Hemmerling, I., Horvath, G.L., Schmidt, T., Latz, E. and Hornung, V. (2013). Cell intrinsic immunity spreads to bystander cells via the intercellular transfer of cGAMP. *Nature* **503,** 530-534.

Abu Khweek, A., Fernández Dávila, N.S., Caution, K., Akhter, A., Abdulrahman, B.A., Tazi, M.*, et al.* (2013). Biofilm-derived Legionella pneumophila evades the innate immune response in macrophages. *Front Cell Infect Microbiol* **3,** 18.

Abu-Zant, A., Jones, S., Asare, R., Suttles, J., Price, C., Graham, J. and Kwaik, Y.A. (2007). Anti-apoptotic signalling by the Dot/Icm secretion system of L. pneumophila. *Cell Microbiol* **9,** 246-264.

Al-Khodor, S., Kalachikov, S., Morozova, I., Price, C.T. and Abu Kwaik, Y. (2009). The PmrA/PmrB two-component system of Legionella pneumophila is a global regulator required for intracellular replication within macrophages and protozoa. *Infect Immun* **77,** 374-386.

Al-Quadan, T., Price, C.T., London, N., Schueler-Furman, O. and AbuKwaik, Y. (2011). Anchoring of bacterial effectors to host membranes through host-mediated lipidation by prenylation: a common paradigm. *Trends Microbiol* **19,** 573-579.

Albert-Weissenberger, C., Cazalet, C. and Buchrieser, C. (2007). Legionella pneumophila - a human pathogen that co-evolved with fresh water protozoa. *Cell Mol Life Sci* **64,** 432-448.

Aldridge, P., Paul, R., Goymer, P., Rainey, P. and Jenal, U. (2003). Role of the GGDEF regulator PleD in polar development of Caulobacter crescentus. *Mol Microbiol* **47,** 1695-1708.

Alexandre, G., Greer, S.E. and Zhulin, I.B. (2000). Energy taxis is the dominant behavior in Azospirillum brasilense. *J Bacteriol* **182,** 6042-6048.

Alix, E., Chesnel, L., Bowzard, B.J., Tucker, A.M., Delprato, A., Cherfils, J.*, et al.* (2012). The capping domain in RalF regulates effector functions. *PLoS Pathog* **8,** e1003012.

Allard, K.A., Viswanathan, V.K. and Cianciotto, N.P. (2006). lbtA and lbtB are required for production of the Legionella pneumophila siderophore legiobactin. *J Bacteriol* **188,** 1351-1363.

Allombert, J., Fuche, F., Michard, C. and Doublet, P. (2013). Molecular mimicry and original biochemical strategies for the biogenesis of a Legionella pneumophila replicative niche in phagocytic cells. *Microbes Infect* **15,** 981-988.

Allombert, J., Lazzaroni, J.C., Baïlo, N., Gilbert, C., Charpentier, X., Doublet, P. and Vianney, A. (2014). Three antagonistic cyclic di-GMP-catabolizing enzymes promote differential Dot/Icm effector delivery and intracellular survival at the early steps of Legionella pneumophila infection. *Infect Immun* **82,** 1222-1233.

Altman, E. and Segal, G. (2008). The response regulator CpxR directly regulates expression of several Legionella pneumophila icm/dot components as well as new translocated substrates. *J Bacteriol* **190,** 1985-1996.

Amaro, F., Gilbert, J.A., Owens, S., Trimble, W. and Shuman, H.A. (2012). Whole-genome sequence of the human pathogen Legionella pneumophila serogroup 12 strain 570-CO-H. *J Bacteriol* **194,** 1613-1614.

Amato-Gauci, A., de Jong, B., Coulombier, D., Payne Hallström, L., Takkinen, J., Ursut, D.*, et al.* (2013) Legionnaires' disease in Europe, 2011. European Center for Disease Prevention and Control.

Amikam, D. and Galperin, M.Y. (2006). PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics* **22,** 3-6.

An, S., Wu, J. and Zhang, L.H. (2010). Modulation of Pseudomonas aeruginosa biofilm dispersal by a cyclic-Di-GMP phosphodiesterase with a putative hypoxia-sensing domain. *Appl Environ Microbiol* **76,** 8160-8173.

An, S.Q., Chin, K.H., Febrer, M., McCarthy, Y., Yang, J.G., Liu, C.L.*, et al.* (2013). A cyclic GMP-dependent signalling pathway regulates bacterial phytopathogenesis. *EMBO J* **32,** 2430-2438.

Arasaki, K., Toomre, D.K. and Roy, C.R. (2012). The Legionella pneumophila effector DrrA is sufficient to stimulate SNARE-dependent membrane fusion. *Cell Host Microbe* **11,** 46-57.

Aravind, L. and Koonin, E.V. (1998). The HD domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases. *Trends Biochem Sci* **23,** 469-472.

Armitage, J.P. (1992). Bacterial motility and chemotaxis. *Sci Prog* **76,** 451-477.

Arruebarrena Di Palma, A., Pereyra, C.M., Moreno Ramirez, L., Xiqui Vázquez, M.L., Baca, B.E., Pereyra, M.A.*, et al.* (2013). Denitrification-derived nitric oxide modulates biofilm formation in Azospirillum brasilense. *FEMS Microbiol Lett* **338,** 77-85.

Atlas, R.M. (1999). Legionella: from environmental habitats to disease pathology, detection and control. *Environ Microbiol* **1,** 283-293.

Aub, D.L. and Putney, J.W. (1984). Metabolism of inositol phosphates in parotid cells: implications for the pathway of the phosphoinositide effect and for the possible messenger role of inositol trisphosphate. *Life Sci* **34,** 1347-1355.

Aurell, H., Farge, P., Meugnier, H., Gouy, M., Forey, F., Lina, G.*, et al.* (2005). Clinical and environmental isolates of Legionella pneumophila serogroup 1 cannot be distinguished by sequence analysis of two surface protein genes and three housekeeping genes. *Appl Environ Microbiol* **71,** 282-289.

Ausmees, N., Mayer, R., Weinhouse, H., Volman, G., Amikam, D., Benziman, M. and Lindberg, M. (2001). Genetic data indicate that proteins containing the GGDEF domain possess diguanylate cyclase activity. *FEMS Microbiol Lett* **204,** 163-167.

Babst, M. (2005). A protein's final ESCRT. *Traffic* **6,** 2-9.

Bachman, M.A. and Swanson, M.S. (2001). RpoS co-operates with other factors to induce Legionella pneumophila virulence in the stationary phase. *Mol Microbiol* **40,** 1201-1214.

Bachman, M.A. and Swanson, M.S. (2004). The LetE protein enhances expression of multiple LetA/LetS-dependent transmission traits by Legionella pneumophila. *Infect Immun* **72,** 3284-3293.

Balestrino, D., Haagensen, J.A., Rich, C. and Forestier, C. (2005). Characterization of type 2 quorum sensing in Klebsiella pneumoniae and relationship with biofilm formation. *J Bacteriol* **187,** 2870-2880.

Banga, S., Gao, P., Shen, X., Fiscus, V., Zong, W.X., Chen, L. and Luo, Z.Q. (2007). Legionella pneumophila inhibits macrophage apoptosis by targeting pro-death members of the Bcl2 protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104,** 5121-5126.

Baraquet, C. and Harwood, C.S. (2013). Cyclic diguanosine monophosphate represses bacterial flagella synthesis by interacting with the Walker A motif of the enhancer-binding protein FleQ. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110,** 18478-18483.

Baraquet, C., Murakami, K., Parsek, M.R. and Harwood, C.S. (2012). The FleQ protein from Pseudomonas aeruginosa functions as both a repressor and an activator to control gene expression from the pel operon promoter in response to c-di-GMP. *Nucleic Acids Res* **40,** 7207-7218.

Bardill, J.P., Miller, J.L. and Vogel, J.P. (2005). IcmS-dependent translocation of SdeA into macrophages by the Legionella pneumophila type IV secretion system. *Mol Microbiol* **56,** 90-103.

Barends, T.R., Hartmann, E., Griese, J.J., Beitlich, T., Kirienko, N.V., Ryjenkov, D.A*., et al.* (2009). Structure and mechanism of a bacterial light-regulated cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Nature* **459,** 1015-1018.

Bargellini, A., Marchesi, I., Righi, E., Ferrari, A., Cencetti, S., Borella, P. and Rovesti, S. (2011). Parameters predictive of Legionella contamination in hot water systems: association with trace elements and heterotrophic plate counts. *Water Res* **45,** 2315-2321.

Barker, J.R., Koestler, B.J., Carpenter, V.K., Burdette, D.L., Waters, C.M., Vance, R.E. and Valdivia, R.H. (2013). STING-dependent recognition of cyclic di-AMP mediates type I interferon responses during Chlamydia trachomatis infection. *MBio* **4,** e00018-00013.

Barnhart, D.M., Su, S., Baccaro, B.E., Banta, L.M. and Farrand, S.K. (2013). CelR, an ortholog of the diguanylate cyclase PleD of Caulobacter, regulates cellulose synthesis in Agrobacterium tumefaciens. *Appl Environ Microbiol* **79,** 7188-7202.

Barraud, N., Hassett, D.J., Hwang, S.H., Rice, S.A., Kjelleberg, S. and Webb, J.S. (2006). Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of Pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol* **188,** 7344-7353.

Barraud, N., Schleheck, D., Klebensberger, J., Webb, J.S., Hassett, D.J., Rice, S.A. and Kjelleberg, S. (2009). Nitric oxide signaling in Pseudomonas aeruginosa biofilms mediates phosphodiesterase activity, decreased cyclic di-GMP levels, and enhanced dispersal. *J Bacteriol* **191,** 7333-7342.

Barrick, J.E. and Breaker, R.R. (2007). The distributions, mechanisms, and structures of metabolite-binding riboswitches. *Genome Biol* **8,** R239.

Baugh, S., Ekanayaka, A.S., Piddock, L.J. and Webber, M.A. (2012). Loss of or inhibition of all multidrug resistance efflux pumps of Salmonella enterica serovar Typhimurium results in impaired ability to form a biofilm. *J Antimicrob Chemother* **67,** 2409-2417.

Beauté, J., Zucs, P., de Jong, B. and Network, E.L.D.S. (2013). Legionnaires disease in Europe, 2009-2010. *Euro Surveill* **18,** 20417.

Bellini, D., Caly, D.L., McCarthy, Y., Bumann, M., An, S.Q., Dow, J.M*., et al.* (2014). Crystal structure of an HD-GYP domain cyclic-di-GMP phosphodiesterase reveals an enzyme with a novel trinuclear catalytic iron centre. *Mol Microbiol* **91,** 26-38.

Benach, J., Swaminathan, S.S., Tamayo, R., Handelman, S.K., Folta-Stogniew, E., Ramos, J.E*., et al.* (2007). The structural basis of cyclic diguanylate signal transduction by PilZ domains. *EMBO J* **26,** 5153-5166.

Berg, H.C. (2003). The rotary motor of bacterial flagella. *Annu Rev Biochem* **72,** 19-54.

Berger, K.H., Merriam, J.J. and Isberg, R.R. (1994). Altered intracellular targeting properties associated with mutations in the Legionella pneumophila dotA gene. *Mol Microbiol* **14,** 809-822.

Bernlohr, R.W., Haddox, M.K. and Goldberg, N.D. (1974). Cyclic guanosine 3':5'-monophosphate in Escherichia coli and Bacillus lichenformis. *J Biol Chem* **249,** 4329-4331.

Berry, R.E., Klumpp, D.J. and Schaeffer, A.J. (2009). Urothelial cultures support intracellular bacterial community formation by uropathogenic Escherichia coli. *Infect Immun* **77,** 2762-2772.

Beyenbach, K.W. and Wieczorek, H. (2006). The V-type H+ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *J Exp Biol* **209,** 577-589.

Beyhan, S., Bilecen, K., Salama, S.R., Casper-Lindley, C. and Yildiz, F.H. (2007). Regulation of rugosity and biofilm formation in Vibrio cholerae: comparison of VpsT and VpsR regulons and epistasis analysis of vpsT, vpsR, and hapR. *J Bacteriol* **189,** 388-402.

Beyhan, S., Odell, L.S. and Yildiz, F.H. (2008). Identification and characterization of cyclic diguanylate signaling systems controlling rugosity in Vibrio cholerae. *J Bacteriol* **190,** 7392-7405.

Bharati, B.K., Sharma, I.M., Kasetty, S., Kumar, M., Mukherjee, R. and Chatterji, D. (2012). A full-length bifunctional protein involved in c-di-GMP turnover is required for long-term survival under nutrient starvation in Mycobacterium smegmatis. *Microbiology* **158,** 1415-1427.

Bible, A., Russell, M.H. and Alexandre, G. (2012). The Azospirillum brasilense Che1 chemotaxis pathway controls swimming velocity, which affects transient cell-to-cell clumping. *J Bacteriol* **194,** 3343-3355.

Bigot, R., Bertaux, J., Frere, J. and Berjeaud, J.M. (2013). Intra-amoeba multiplication induces chemotaxis and biofilm colonization and formation for Legionella. *PLoS One* **8,** e77875.

Bitar, D.M., Molmeret, M. and Kwaik, Y.A. (2005). Structure-function analysis of the C-terminus of IcmT of Legionella pneumophila in pore formation-mediated egress from macrophages. *FEMS Microbiol Lett* **242,** 177-184.

Bobrov, A.G., Kirillina, O. and Perry, R.D. (2005). The phosphodiesterase activity of the HmsP EAL domain is required for negative regulation of biofilm formation in Yersinia pestis. *FEMS Microbiol Lett* **247,** 123-130.

Boehm, A., Kaiser, M., Li, H., Spangler, C., Kasper, C.A., Ackermann, M.*, et al.* (2010). Second messenger-mediated adjustment of bacterial swimming velocity. *Cell* **141,** 107-116.

Boehm, A., Steiner, S., Zaehringer, F., Casanova, A., Hamburger, F., Ritz, D.*, et al.* (2009). Second messenger signalling governs Escherichia coli biofilm induction upon ribosomal stress. *Mol Microbiol* **72,** 1500-1516.

Boles, B.R. and McCarter, L.L. (2002). Vibrio parahaemolyticus scrABC, a novel operon affecting swarming and capsular polysaccharide regulation. *J Bacteriol* **184,** 5946-5954.

Boon, C. and Dick, T. (2012). How Mycobacterium tuberculosis goes to sleep: the dormancy survival regulator DosR a decade later. *Future Microbiol* **7,** 513-518.

Borlee, B.R., Goldman, A.D., Murakami, K., Samudrala, R., Wozniak, D.J. and Parsek, M.R. (2010). Pseudomonas aeruginosa uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Mol Microbiol* **75,** 827-842.

Bose, D., Joly, N., Pape, T., Rappas, M., Schumacher, J., Buck, M. and Zhang, X. (2008). Dissecting the ATP hydrolysis pathway of bacterial enhancer-binding proteins. *Biochem Soc Trans* **36,** 83-88.

Bottomley, P.J., Grillo, J.F., Van Baalen, C. and Tabita, F.R. (1979). Synthesis of nitrogenase and heterocysts by Anabaena sp. CA in the presence of high levels of ammonia. *J Bacteriol* **140,** 938-943.

Boyd, C.D., Chatterjee, D., Sondermann, H. and O'Toole, G.A. (2012). LapG, required for modulating biofilm formation by Pseudomonas fluorescens Pf0-1, is a calcium-dependent protease. *J Bacteriol* **194,** 4406-4414.

Brand, B.C., Sadosky, A.B. and Shuman, H.A. (1994). The Legionella pneumophila icm locus: a set of genes required for intracellular multiplication in human macrophages. *Mol Microbiol* **14,** 797-808.

Brassinga, A.K., Hiltz, M.F., Sisson, G.R., Morash, M.G., Hill, N., Garduno, E.*, et al.* (2003). A 65-kilobase pathogenicity island is unique to Philadelphia-1 strains of Legionella pneumophila. *J Bacteriol* **185,** 4630-4637.

Brassinga, A.K., Kinchen, J.M., Cupp, M.E., Day, S.R., Hoffman, P.S. and Sifri, C.D. (2010). Caenorhabditis is a metazoan host for Legionella. *Cell Microbiol* **12,** 343-361.

Breaker, R.R. (2008). Complex riboswitches. *Science* **319,** 1795-1797.

Brencic, A. and Lory, S. (2009a). Determination of the regulon and identification of novel mRNA targets of Pseudomonas aeruginosa RsmA. *Mol Microbiol* **72,** 612-632.

Brencic, A., McFarland, K.A., McManus, H.R., Castang, S., Mogno, I., Dove, S.L. and Lory, S. (2009b). The GacS/GacA signal transduction system of Pseudomonas aeruginosa acts exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ regulatory small RNAs. *Mol Microbiol* **73,** 434-445.

Brenner, D.J., Steigerwalt, A.G. and McDade, J.E. (1979). Classification of the Legionnaires' disease bacterium: Legionella pneumophila, genus novum, species nova, of the family Legionellaceae, familia nova. *Ann Intern Med* **90,** 656-658.

Brieland, J., Freeman, P., Kunkel, R., Chrisp, C., Hurley, M., Fantone, J. and Engleberg, C. (1994). Replicative Legionella pneumophila lung infection in intratracheally inoculated A/J mice. A murine model of human Legionnaires' disease. *Am J Pathol* **145,** 1537-1546.

Brombacher, E., Baratto, A., Dorel, C. and Landini, P. (2006). Gene expression regulation by the Curli activator CsgD protein: modulation of cellulose biosynthesis and control of negative determinants for microbial adhesion. *J Bacteriol* **188,** 2027-2037.

Brombacher, E., Urwyler, S., Ragaz, C., Weber, S.S., Kami, K., Overduin, M. and Hilbi, H. (2009). Rab1 guanine nucleotide exchange factor SidM is a major phosphatidylinositol 4-phosphate-binding effector protein of Legionella pneumophila. *J Biol Chem* **284,** 4846-4856.

Bruckert, W.M., Price, C.T. and Abu Kwaik, Y. (2014). Rapid Nutritional Remodeling of the Host Cell upon Attachment of Legionella pneumophila. *Infect Immun* **82,** 72-82.

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

Bucci, C., Thomsen, P., Nicoziani, P., McCarthy, J. and van Deurs, B. (2000). Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Mol Biol Cell* **11,** 467-480.

Burstein, D., Zusman, T., Degtyar, E., Viner, R., Segal, G. and Pupko, T. (2009). Genome-scale identification of Legionella pneumophila effectors using a machine learning approach. *PLoS Pathog* **5,** e1000508.

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

Byrne, B.G., Dubuisson, J.F., Joshi, A.D., Persson, J.J. and Swanson, M.S. (2013). Inflammasome components coordinate autophagy and pyroptosis as macrophage responses to infection. *MBio* **4,** e00620-00612.

Båga, M., Göransson, M., Normark, S. and Uhlin, B.E. (1985). Transcriptional activation of a pap pilus virulence operon from uropathogenic Escherichia coli. *EMBO J* **4,** 3887-3893.

Cadoret, J.C., Rousseau, B., Perewoska, I., Sicora, C., Cheregi, O., Vass, I. and Houmard, J. (2005). Cyclic nucleotides, the photosynthetic apparatus and response to a UV-B stress in the Cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803. *J Biol Chem* **280,** 33935-33944.

Caiazza, N.C., Merritt, J.H., Brothers, K.M. and O'Toole, G.A. (2007). Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by Pseudomonas aeruginosa PA14. *J Bacteriol* **189,** 3603-3612.

Cambronne, E.D. and Roy, C.R. (2007). The Legionella pneumophila IcmSW complex interacts with multiple Dot/Icm effectors to facilitate type IV translocation. *PLoS Pathog* **3,** e188.

Campese, C., Bitar, D., Jarraud, S., Maine, C., Forey, F., Etienne, J*., et al.* (2011). Progress in the surveillance and control of Legionella infection in France, 1998-2008. *Int J Infect Dis* **15,** e30-37.

Campodonico, E.M., Chesnel, L. and Roy, C.R. (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.

Carlson, H.K., Vance, R.E. and Marletta, M.A. (2010). H-NOX regulation of c-di-GMP metabolism and biofilm formation in Legionella pneumophila. *Mol Microbiol*.

Carreño-López, R., Sánchez, A., Camargo, N., Elmerich, C. and Baca, B.E. (2009). Characterization of chsA, a new gene controlling the chemotactic response in Azospirillum brasilense Sp7. *Arch Microbiol* **191,** 501-507.

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

Cazalet, C., Rusniok, C., Brüggemann, H., Zidane, N., Magnier, A., Ma, L*., et al.* (2004). Evidence in the Legionella pneumophila genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. *Nat Genet* **36,** 1165-1173.

Champion, G.A., Neely, M.N., Brennan, M.A. and DiRita, V.J. (1997). A branch in the ToxR regulatory cascade of Vibrio cholerae revealed by characterization of toxT mutant strains. *Mol Microbiol* **23,** 323-331.

Chan, C., Paul, R., Samoray, D., Amiot, N.C., Giese, B., Jenal, U. and Schirmer, T. (2004). Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101,** 17084-17089.

Chang, B., Kura, F., Amemura-Maekawa, J., Koizumi, N. and Watanabe, H. (2005). Identification of a novel adhesion molecule involved in the virulence of Legionella pneumophila. *Infect Immun* **73,** 4272-4280.

Chang, B., Sugiyama, K., Taguri, T., Amemura-Maekawa, J., Kura, F. and Watanabe, H. (2009). Specific detection of viable Legionella cells by combined use of photoactivated ethidium monoazide and PCR/real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* **75,** 147-153.

Charpentier, X., Gabay, J.E., Reyes, M., Zhu, J.W., Weiss, A. and Shuman, H.A. (2009). Chemical genetics reveals bacterial and host cell functions critical for type IV effector translocation by Legionella pneumophila. *PLoS Pathog* **5,** e1000501.

Chatterjee, D., Boyd, C.D., O'Toole, G.A. and Sondermann, H. (2012). Structural characterization of a conserved, calcium-dependent periplasmic protease from Legionella pneumophila. *J Bacteriol* **194,** 4415-4425.

Chaudhuri, S., Pratap, S., Paromov, V., Li, Z., Mantri, C.K. and Xie, H. (2014). Identification of a Diguanylate Cyclase and its Role in Porphyromonas gingivalis Virulence. *Infect Immun*.

Chen, A.G., Sudarsan, N. and Breaker, R.R. (2011). Mechanism for gene control by a natural allosteric group I ribozyme. *RNA* **17,** 1967-1972.

Chen, J., de Felipe, K.S., Clarke, M., Lu, H., Anderson, O.R., Segal, G. and Shuman, H.A. (2004). Legionella effectors that promote nonlytic release from protozoa. *Science* **303,** 1358-1361.

Chen, J.L. and Greider, C.W. (2005). Functional analysis of the pseudoknot structure in human telomerase RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102,** 8080-8085; discussion 8077-8089.

Chen, Y., Chai, Y., Guo, J.H. and Losick, R. (2012a). Evidence for cyclic Di-GMP-mediated signaling in Bacillus subtilis. *J Bacteriol* **194,** 5080-5090.

Chen, Y. and Machner, M.P. (2013a). Targeting of the small GTPase Rab6A' by the Legionella pneumophila effector LidA. *Infect Immun* **81,** 2226-2235.

Chen, Y., Tascón, I., Neunuebel, M.R., Pallara, C., Brady, J., Kinch, L.N.*, et al.* (2013b). Structural basis for Rab1 de-AMPylation by the Legionella pneumophila effector SidD. *PLoS Pathog* **9,** e1003382.

Chen, Z.H. and Schaap, P. (2012b). The prokaryote messenger c-di-GMP triggers stalk cell differentiation in Dictyostelium. *Nature* **488,** 680-683.

Cheng, W., Yin, K., Lu, D., Li, B., Zhu, D., Chen, Y.*, et al.* (2012). Structural insights into a unique Legionella pneumophila effector LidA recognizing both GDP and GTP bound Rab1 in their active state. *PLoS Pathog* **8,** e1002528.

Chien, M., Morozova, I., Shi, S., Sheng, H., Chen, J., Gomez, S.M.*, et al.* (2004). The genomic sequence of the accidental pathogen Legionella pneumophila. *Science* **305,** 1966-1968.

Chin, K.H., Kuo, W.T., Yu, Y.J., Liao, Y.T., Yang, M.T. and Chou, S.H. (2012). Structural polymorphism of c-di-GMP bound to an EAL domain and in complex with a type II PilZ-domain protein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **68,** 1380-1392.

Chin, K.H., Lee, Y.C., Tu, Z.L., Chen, C.H., Tseng, Y.H., Yang, J.M.*, et al.* (2010). The cAMP receptor-like protein CLP is a novel c-di-GMP receptor linking cell-cell signaling to virulence gene expression in Xanthomonas campestris. *J Mol Biol* **396,** 646-662.

Chinnadurai, G., Vijayalingam, S. and Gibson, S.B. (2008). BNIP3 subfamily BH3-only proteins: mitochondrial stress sensors in normal and pathological functions. *Oncogene* **27 Suppl 1,** S114-127.

Cho, K.H. and Kang, S.O. (2013). Streptococcus pyogenes c-di-AMP phosphodiesterase, GdpP, influences SpeB processing and virulence. *PLoS One* **8,** e69425.

Chou, S.H. (2011). Delicate conformational changes of a protein in the CRP family lead to dramatic functional changes via binding of an alternate secondary messenger molecule. *Virulence* **2,** 152-157.

Christen, B., Christen, M., Paul, R., Schmid, F., Folcher, M., Jenoe, P.*, et al.* (2006). Allosteric control of cyclic di-GMP signaling. *J Biol Chem* **281,** 32015-32024.
Christen, M., Christen, B., Allan, M.G., Folcher, M., Jenö, P., Grzesiek, S. and Jenal, U. (2007). DgrA is a member of a new family of cyclic diguanosine monophosphate receptors and controls flagellar motor function in Caulobacter crescentus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104,** 4112-4117.
Christen, M., Christen, B., Folcher, M., Schauerte, A. and Jenal, U. (2005). Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. *J Biol Chem* **280,** 30829-30837.
Chua, S.L., Tan, S.Y., Rybtke, M.T., Chen, Y., Rice, S.A., Kjelleberg, S.*, et al.* (2013). Bis-(3'-5')-cyclic dimeric GMP regulates antimicrobial peptide resistance in Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrob Agents Chemother* **57,** 2066-2075.
Cianciotto, N.P. (2007). Iron acquisition by Legionella pneumophila. *Biometals* **20,** 323-331.
Ciesielski, C.A., Blaser, M.J. and Wang, W.L. (1984). Role of stagnation and obstruction of water flow in isolation of Legionella pneumophila from hospital plumbing. *Appl Environ Microbiol* **48,** 984-987.
Cirillo, J.D., Cirillo, S.L., Yan, L., Bermudez, L.E., Falkow, S. and Tompkins, L.S. (1999). Intracellular growth in Acanthamoeba castellanii affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of Legionella pneumophila. *Infect Immun* **67,** 4427-4434.
Cirillo, S.L., Bermudez, L.E., El-Etr, S.H., Duhamel, G.E. and Cirillo, J.D. (2001). Legionella pneumophila entry gene rtxA is involved in virulence. *Infect Immun* **69,** 508-517.
Cirillo, S.L., Lum, J. and Cirillo, J.D. (2000). Identification of novel loci involved in entry by Legionella pneumophila. *Microbiology* **146 (Pt 6),** 1345-1359.
Cirillo, S.L., Yan, L., Littman, M., Samrakandi, M.M. and Cirillo, J.D. (2002). Role of the Legionella pneumophila rtxA gene in amoebae. *Microbiology* **148,** 1667-1677.
Clement, S., Vaudaux, P., Francois, P., Schrenzel, J., Huggler, E., Kampf, S.*, et al.* (2005). Evidence of an intracellular reservoir in the nasal mucosa of patients with recurrent Staphylococcus aureus rhinosinusitis. *J Infect Dis* **192,** 1023-1028.
Coers, J., Kagan, J.C., Matthews, M., Nagai, H., Zuckman, D.M. and Roy, C.R. (2000). Identification of Icm protein complexes that play distinct roles in the biogenesis of an organelle permissive for Legionella pneumophila intracellular growth. *Mol Microbiol* **38,** 719-736.
Coers, J., Monahan, C. and Roy, C.R. (1999). Modulation of phagosome biogenesis by Legionella pneumophila creates an organelle permissive for intracellular growth. *Nat Cell Biol* **1,** 451-453.
Coil, D.A. and Anné, J. (2009). Twitching motility in Legionella pneumophila. *FEMS Microbiol Lett* **293,** 271-277.
Conover, G.M., Derré, I., Vogel, J.P. and Isberg, R.R. (2003). The Legionella pneumophila LidA protein: a translocated substrate of the Dot/Icm system associated with maintenance of bacterial integrity. *Mol Microbiol* **48,** 305-321.
Cooper, I.R. and Hanlon, G.W. (2010). Resistance of Legionella pneumophila serotype 1 biofilms to chlorine-based disinfection. *J Hosp Infect* **74,** 152-159.
Cornillon, S., Pech, E., Benghezal, M., Ravanel, K., Gaynor, E., Letourneur, F.*, et al.* (2000). Phg1p is a nine-transmembrane protein superfamily member involved in dictyostelium adhesion and phagocytosis. *J Biol Chem* **275,** 34287-34292.
Corrigan, R.M., Abbott, J.C., Burhenne, H., Kaever, V. and Gründling, A. (2011). c-di-AMP is a new second messenger in Staphylococcus aureus with a role in controlling cell size and envelope stress. *PLoS Pathog* **7,** e1002217.
Covarrubias, L. and Bolivar, F. (1982). Construction and characterization of new cloning vehicles. VI. Plasmid pBR329, a new derivative of pBR328 lacking the 482-base-pair inverted duplication. *Gene* **17,** 79-89.
Coxon, P.Y., Summersgill, J.T., Ramirez, J.A. and Miller, R.D. (1998). Signal transduction during Legionella pneumophila entry into human monocytes. *Infect Immun* **66,** 2905-2913.

Curtis, P.D. and Brun, Y.V. (2010). Getting in the loop: regulation of development in Caulobacter crescentus. *Microbiol Mol Biol Rev* **74,** 13-41.
D'Argenio, D.A., Calfee, M.W., Rainey, P.B. and Pesci, E.C. (2002). Autolysis and autoaggregation in Pseudomonas aeruginosa colony morphology mutants. *J Bacteriol* **184,** 6481-6489.
D'Argenio, D.A. and Miller, S.I. (2004). Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger. *Microbiology* **150,** 2497-2502.
D'Auria, G., Jiménez-Hernández, N., Peris-Bondia, F., Moya, A. and Latorre, A. (2010). Legionella pneumophila pangenome reveals strain-specific virulence factors. *BMC Genomics* **11,** 181.
Dalebroux, Z.D., Edwards, R.L. and Swanson, M.S. (2009). SpoT governs Legionella pneumophila differentiation in host macrophages. *Mol Microbiol* **71,** 640-658.
Daley, D.O., Rapp, M., Granseth, E., Melén, K., Drew, D. and von Heijne, G. (2005). Global topology analysis of the Escherichia coli inner membrane proteome. *Science* **308,** 1321-1323.
Dashiff, A., Junka, R.A., Libera, M. and Kadouri, D.E. (2011). Predation of human pathogens by the predatory bacteria Micavibrio aeruginosavorus and Bdellovibrio bacteriovorus. *J Appl Microbiol* **110,** 431-444.
Davies, B.W., Bogard, R.W., Young, T.S. and Mekalanos, J.J. (2012). Coordinated regulation of accessory genetic elements produces cyclic di-nucleotides for V. cholerae virulence. *Cell* **149,** 358-370.
Davis, N.J., Cohen, Y., Sanselicio, S., Fumeaux, C., Ozaki, S., Luciano, J.*, et al.* (2013). De- and repolarization mechanism of flagellar morphogenesis during a bacterial cell cycle. *Genes Dev* **27,** 2049-2062.
De Araujo, C., Balestrino, D., Roth, L., Charbonnel, N. and Forestier, C. (2010). Quorum sensing affects biofilm formation through lipopolysaccharide synthesis in Klebsiella pneumoniae. *Res Microbiol* **161,** 595-603.
De Buck, E., Maes, L., Meyen, E., Van Mellaert, L., Geukens, N., Anné, J. and Lammertyn, E. (2005). Legionella pneumophila Philadelphia-1 tatB and tatC affect intracellular replication and biofilm formation. *Biochem Biophys Res Commun* **331,** 1413-1420.
de Felipe, K.S., Glover, R.T., Charpentier, X., Anderson, O.R., Reyes, M., Pericone, C.D. and Shuman, H.A. (2008). Legionella eukaryotic-like type IV substrates interfere with organelle trafficking. *PLoS Pathog* **4,** e1000117.
de Felipe, K.S., Pampou, S., Jovanovic, O.S., Pericone, C.D., Ye, S.F., Kalachikov, S. and Shuman, H.A. (2005). Evidence for acquisition of Legionella type IV secretion substrates via interdomain horizontal gene transfer. *J Bacteriol* **187,** 7716-7726.
De, N., Pirruccello, M., Krasteva, P.V., Bae, N., Raghavan, R.V. and Sondermann, H. (2008). Phosphorylation-independent regulation of the diguanylate cyclase WspR. *PLoS Biol* **6,** e67.
de Paz, H.D., Sangari, F.J., Bolland, S., García-Lobo, J.M., Dehio, C., de la Cruz, F. and Llosa, M. (2005). Functional interactions between type IV secretion systems involved in DNA transfer and virulence. *Microbiology* **151,** 3505-3516.
Declerck, P., Behets, J., Delaedt, Y., Margineanu, A., Lammertyn, E. and Ollevier, F. (2005). Impact of non-Legionella bacteria on the uptake and intracellular replication of Legionella pneumophila in Acanthamoeba castellanii and Naegleria lovaniensis. *Microb Ecol* **50,** 536-549.
Declerck, P., Behets, J., van Hoef, V. and Ollevier, F. (2007a). Detection of Legionella spp. and some of their amoeba hosts in floating biofilms from anthropogenic and natural aquatic environments. *Water Res* **41,** 3159-3167.
Declerck, P., Behets, J., van Hoef, V. and Ollevier, F. (2007b). Replication of Legionella pneumophila in floating biofilms. *Curr Microbiol* **55,** 435-440.
Degtyar, E., Zusman, T., Ehrlich, M. and Segal, G. (2009). A Legionella effector acquired from protozoa is involved in sphingolipids metabolism and is targeted to the host cell mitochondria. *Cell Microbiol* **11,** 1219-1235.
Den Boer, J.W., Nijhof, J. and Friesema, I. (2006). Risk factors for sporadic community-acquired Legionnaires' disease. A 3-year national case-control study. *Public Health* **120,** 566-571.

den Hengst, C.D., Tran, N.T., Bibb, M.J., Chandra, G., Leskiw, B.K. and Buttner, M.J. (2010). Genes essential for morphological development and antibiotic production in Streptomyces coelicolor are targets of BldD during vegetative growth. *Mol Microbiol* **78,** 361-379.

Deng, Y., Lim, A., Wang, J., Zhou, T., Chen, S., Lee, J.*, et al.* (2013). Cis-2-dodecenoic acid quorum sensing system modulates N-acyl homoserine lactone production through RpfR and cyclic di-GMP turnover in Burkholderia cenocepacia. *BMC Microbiol* **13,** 148.

Deng, Y., Schmid, N., Wang, C., Wang, J., Pessi, G., Wu, D.*, et al.* (2012). Cis-2-dodecenoic acid receptor RpfR links quorum-sensing signal perception with regulation of virulence through cyclic dimeric guanosine monophosphate turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109,** 15479-15484.

Desjardins, M., Huber, L.A., Parton, R.G. and Griffiths, G. (1994). Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J Cell Biol* **124,** 677-688.

Dey, A.K., Bhagat, A. and Chowdhury, R. (2013). Host cell contact induces expression of virulence factors and VieA, a cyclic di-GMP phosphodiesterase, in Vibrio cholerae. *J Bacteriol* **195,** 2004-2010.

Diez, E., Lee, S.H., Gauthier, S., Yaraghi, Z., Tremblay, M., Vidal, S. and Gros, P. (2003). Birc1e is the gene within the Lgn1 locus associated with resistance to Legionella pneumophila. *Nat Genet* **33,** 55-60.

Doléans-Jordheim, A., Akermi, M., Ginevra, C., Cazalet, C., Kay, E., Schneider, D.*, et al.* (2006). Growth-phase-dependent mobility of the lvh-encoding region in Legionella pneumophila strain Paris. *Microbiology* **152,** 3561-3568.

Donlan, R.M., Forster, T., Murga, R., Brown, E., Lucas, C., Carpenter, J. and Fields, B. (2005). Legionella pneumophila associated with the protozoan Hartmannella vermiformis in a model multi-species biofilm has reduced susceptibility to disinfectants. *Biofouling* **21,** 1-7.

Dorer, M.S., Kirton, D., Bader, J.S. and Isberg, R.R. (2006). RNA interference analysis of Legionella in Drosophila cells: exploitation of early secretory apparatus dynamics. *PLoS Pathog* **2,** e34.

Draper, J., Karplus, K. and Ottemann, K.M. (2011). Identification of a chemoreceptor zinc-binding domain common to cytoplasmic bacterial chemoreceptors. *J Bacteriol* **193,** 4338-4345.

DSMZDatabase. http://www.dsmz.de/bacterial-diversity/prokaryotic-nomenclature-up-to-date/prokariotic-nomenclature-up-to-date.htlm. [WWW document]. URL

Duerig, A., Abel, S., Folcher, M., Nicollier, M., Schwede, T., Amiot, N.*, et al.* (2009). Second messenger-mediated spatiotemporal control of protein degradation regulates bacterial cell cycle progression. *Genes Dev* **23,** 93-104.

Duménil, G. and Isberg, R.R. (2001). The Legionella pneumophila IcmR protein exhibits chaperone activity for IcmQ by preventing its participation in high-molecular-weight complexes. *Mol Microbiol* **40,** 1113-1127.

Duménil, G., Montminy, T.P., Tang, M. and Isberg, R.R. (2004). IcmR-regulated membrane insertion and efflux by the Legionella pneumophila IcmQ protein. *J Biol Chem* **279,** 4686-4695.

Duncan, C., Prashar, A., So, J., Tang, P., Low, D.E., Terebiznik, M. and Guyard, C. (2011). Lcl of Legionella pneumophila is an immunogenic GAG binding adhesin that promotes interactions with lung epithelial cells and plays a crucial role in biofilm formation. *Infect Immun* **79,** 2168-2181.

Dunham, E.W., Haddox, M.K. and Goldberg, N.D. (1974). Alteration of vein cyclic 3':5' nucleotide concentrations during changes in contractility. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71,** 815-819.

Edelstein, P.H. (1981). Improved semiselective medium for isolation of Legionella pneumophila from contaminated clinical and environmental specimens. *J Clin Microbiol* **14,** 298-303.

Edmunds, A.C., Castiblanco, L.F., Sundin, G.W. and Waters, C.M. (2013). Cyclic Di-GMP modulates the disease progression of Erwinia amylovora. *J Bacteriol* **195,** 2155-2165.

Edwards, R.L., Dalebroux, Z.D. and Swanson, M.S. (2009). Legionella pneumophila couples fatty acid flux to microbial differentiation and virulence. *Mol Microbiol* **71,** 1190-1204.

El-Kirat-Chatel, S., Beaussart, A., Boyd, C.D., O'Toole, G.A. and Dufrêne, Y.F. (2014). Single-cell and single-molecule analysis deciphers the localization, adhesion, and mechanics of the biofilm adhesin LapA. *ACS Chem Biol* **9,** 485-494.

Elliott, J.A. and Winn, W.C. (1986). Treatment of alveolar macrophages with cytochalasin D inhibits uptake and subsequent growth of Legionella pneumophila. *Infect Immun* **51,** 31-36.

Emmer, M., deCrombrugghe, B., Pastan, I. and Perlman, R. (1970). Cyclic AMP receptor protein of E. coli: its role in the synthesis of inducible enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **66,** 480-487.

Ensminger, A.W. and Isberg, R.R. (2010). E3 ubiquitin ligase activity and targeting of BAT3 by multiple Legionella pneumophila translocated substrates. *Infect Immun* **78,** 3905-3919.

Eriksson, S., Lucchini, S., Thompson, A., Rhen, M. and Hinton, J.C. (2003). Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular Salmonella enterica. *Mol Microbiol* **47,** 103-118.

Evans, K.J., Lambert, C. and Sockett, R.E. (2007). Predation by Bdellovibrio bacteriovorus HD100 requires type IV pili. *J Bacteriol* **189,** 4850-4859.

Fang, X. and Gomelsky, M. (2010). A post-translational, c-di-GMP-dependent mechanism regulating flagellar motility. *Mol Microbiol* **76,** 1295-1305.

Fantuzzi, G. and Dinarello, C.A. (1999). Interleukin-18 and interleukin-1 beta: two cytokine substrates for ICE (caspase-1). *J Clin Immunol* **19,** 1-11.

Farelli, J.D., Gumbart, J.C., Akey, I.V., Hempstead, A., Amyot, W., Head, J.F*., et al.* (2013). IcmQ in the Type 4b secretion system contains an NAD+ binding domain. *Structure* **21,** 1361-1373.

Fazli, M., O'Connell, A., Nilsson, M., Niehaus, K., Dow, J.M., Givskov, M*., et al.* (2011). The CRP/FNR family protein Bcam1349 is a c-di-GMP effector that regulates biofilm formation in the respiratory pathogen Burkholderia cenocepacia. *Mol Microbiol* **82,** 327-341.

Fenton, A.K., Kanna, M., Woods, R.D., Aizawa, S.I. and Sockett, R.E. (2010). Shadowing the actions of a predator: backlit fluorescent microscopy reveals synchronous nonbinary septation of predatory Bdellovibrio inside prey and exit through discrete bdelloplast pores. *J Bacteriol* **192,** 6329-6335.

Ferreira, R.B., Antunes, L.C., Greenberg, E.P. and McCarter, L.L. (2008). Vibrio parahaemolyticus ScrC modulates cyclic dimeric GMP regulation of gene expression relevant to growth on surfaces. *J Bacteriol* **190,** 851-860.

Ferreira, R.B., Chodur, D.M., Antunes, L.C., Trimble, M.J. and McCarter, L.L. (2012). Output targets and transcriptional regulation by a cyclic dimeric GMP-responsive circuit in the Vibrio parahaemolyticus Scr network. *J Bacteriol* **194,** 914-924.

Fields, B.S., Benson, R.F. and Besser, R.E. (2002). Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev* **15,** 506-526.

Fink, S.L. and Cookson, B.T. (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun* **73,** 1907-1916.

Finn, R.D., Bateman, A., Clements, J., Coggill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R*., et al.* (2014). Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res* **42,** D222-230.

Fisher-Hoch, S.P., Bartlett, C.L., Tobin, J.O., Gillett, M.B., Nelson, A.M., Pritchard, J.E*., et al.* (1981). Investigation and control of an outbreaks of legionnaires' disease in a district general hospital. *Lancet* **1,** 932-936.

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

Fliermans, C.B., Cherry, W.B., Orrison, L.H., Smith, S.J., Tison, D.L. and Pope, D.H. (1981). Ecological distribution of Legionella pneumophila. *Appl Environ Microbiol* **41,** 9-16.

Flärdh, K. and Buttner, M.J. (2009). Streptomyces morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat Rev Microbiol* **7,** 36-49.

Fong, J.C. and Yildiz, F.H. (2008). Interplay between cyclic AMP-cyclic AMP receptor protein and cyclic di-GMP signaling in Vibrio cholerae biofilm formation. *J Bacteriol* **190,** 6646-6659.

Franco, I.S., Shohdy, N. and Shuman, H.A. (2012). The Legionella pneumophila effector VipA is an actin nucleator that alters host cell organelle trafficking. *PLoS Pathog* **8,** e1002546.

Franco, I.S., Shuman, H.A. and Charpentier, X. (2009). The perplexing functions and surprising origins of Legionella pneumophila type IV secretion effectors. *Cell Microbiol* **11,** 1435-1443.
Freedman, J.C., Rogers, E.A., Kostick, J.L., Zhang, H., Iyer, R., Schwartz, I. and Marconi, R.T. (2010). Identification and molecular characterization of a cyclic-di-GMP effector protein, PlzA (BB0733): additional evidence for the existence of a functional cyclic-di-GMP regulatory network in the Lyme disease spirochete, Borrelia burgdorferi. *FEMS Immunol Med Microbiol* **58,** 285-294.
Fronzes, R., Christie, P.J. and Waksman, G. (2009). The structural biology of type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol* **7,** 703-714.
Fronzes, R., Remaut, H. and Waksman, G. (2008). Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria. *EMBO J* **27,** 2271-2280.
Fuche, F., Vianney, A., Andréa, C., Doublet, P. and Gilbert, C. (données non publiées) Functional type I secretion system involved in *Legionella pneumophila* virulence.
Fujita, Y., Tanaka, T., Furuta, H. and Ikawa, Y. (2012). Functional roles of a tetraloop/receptor interacting module in a cyclic di-GMP riboswitch. *J Biosci Bioeng* **113,** 141-145.
Fujiwara, T., Komoda, K., Sakurai, N., Tajima, K., Tanaka, I. and Yao, M. (2013). The c-di-GMP recognition mechanism of the PilZ domain of bacterial cellulose synthase subunit A. *Biochem Biophys Res Commun* **431,** 802-807.
Fumarola, D. (1979). Recent advances in the structure, biochemical and biological aspects of the "Legionella pneumophila", the causative agent of Legionnaires' disease: a review. *Ann Sclavo* **21,** 63-69.
Gal-Mor, O. and Segal, G. (2003). Identification of CpxR as a positive regulator of icm and dot virulence genes of Legionella pneumophila. *J Bacteriol* **185,** 4908-4919.
Gal-Mor, O., Zusman, T. and Segal, G. (2002). Analysis of DNA regulatory elements required for expression of the Legionella pneumophila icm and dot virulence genes. *J Bacteriol* **184,** 3823-3833.
Galperin, M.Y. (2010). Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Curr Opin Microbiol* **13,** 150-159.
Galperin, M.Y. and Koonin, E.V. (2012). Divergence and convergence in enzyme evolution. *J Biol Chem* **287,** 21-28.
Galperin, M.Y., Natale, D.A., Aravind, L. and Koonin, E.V. (1999). A specialized version of the HD hydrolase domain implicated in signal transduction. *J Mol Microbiol Biotechnol* **1,** 303-305.
Galperin, M.Y., Nikolskaya, A.N. and Koonin, E.V. (2001). Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiol Lett* **203,** 11-21.
Gao, D., Wu, J., Wu, Y.T., Du, F., Aroh, C., Yan, N*., et al.* (2013). Cyclic GMP-AMP synthase is an innate immune sensor of HIV and other retroviruses. *Science* **341,** 903-906.
Gao, L.Y. and Kwaik, Y.A. (2000). The mechanism of killing and exiting the protozoan host Acanthamoeba polyphaga by Legionella pneumophila. *Environ Microbiol* **2,** 79-90.
Garcia-Medina, R., Dunne, W.M., Singh, P.K. and Brody, S.L. (2005). Pseudomonas aeruginosa acquires biofilm-like properties within airway epithelial cells. *Infect Immun* **73,** 8298-8305.
Garduño, R.A., Garduño, E. and Hoffman, P.S. (1998). Surface-associated hsp60 chaperonin of Legionella pneumophila mediates invasion in a HeLa cell model. *Infect Immun* **66,** 4602-4610.
Gentner, M., Allan, M.G., Zaehringer, F., Schirmer, T. and Grzesiek, S. (2012). Oligomer formation of the bacterial second messenger c-di-GMP: reaction rates and equilibrium constants indicate a monomeric state at physiological concentrations. *J Am Chem Soc* **134,** 1019-1029.
Giardina, G., Paiardini, A., Fernicola, S., Franceschini, S., Rinaldo, S., Stelitano, V. and Cutruzzolà, F. (2013). Investigating the allosteric regulation of YfiN from Pseudomonas aeruginosa: clues from the structure of the catalytic domain. *PLoS One* **8,** e81324.
Gibson, F.C., Tzianabos, A.O. and Rodgers, F.G. (1994). Adherence of Legionella pneumophila to U-937 cells, guinea-pig alveolar macrophages, and MRC-5 cells by a novel, complement-independent binding mechanism. *Can J Microbiol* **40,** 865-872.

Gilles-Gonzalez, M.A. and Gonzalez, G. (1993). Regulation of the kinase activity of heme protein FixL from the two-component system FixL/FixJ of Rhizobium meliloti. *J Biol Chem* **268,** 16293-16297.

Gilles-Gonzalez, M.A., Gonzalez, G., Sousa, E.H. and Tuckerman, J. (2008). Oxygen-sensing histidine-protein kinases: assays of ligand binding and turnover of response-regulator substrates. *Methods Enzymol* **437,** 173-189.

Girgis, H.S., Liu, Y., Ryu, W.S. and Tavazoie, S. (2007). A comprehensive genetic characterization of bacterial motility. *PLoS Genet* **3,** 1644-1660.

Gião, M.S., Wilks, S., Azevedo, N.F., Vieira, M.J. and Keevil, C.W. (2009). Incorporation of natural uncultivable Legionella pneumophila into potable water biofilms provides a protective niche against chlorination stress. *Biofouling* **25,** 335-341.

Gjermansen, M., Nilsson, M., Yang, L. and Tolker-Nielsen, T. (2010). Characterization of starvation-induced dispersion in Pseudomonas putida biofilms: genetic elements and molecular mechanisms. *Mol Microbiol* **75,** 815-826.

Glöckner, G., Albert-Weissenberger, C., Weinmann, E., Jacobi, S., Schunder, E., Steinert, M.*, et al.* (2008). Identification and characterization of a new conjugation/type IVA secretion system (trb/tra) of Legionella pneumophila Corby localized on two mobile genomic islands. *Int J Med Microbiol* **298,** 411-428.

Gomelsky, M. and Klug, G. (2002). BLUF: a novel FAD-binding domain involved in sensory transduction in microorganisms. *Trends Biochem Sci* **27,** 497-500.

Gomez-Valero, L. and Buchrieser, C. (2013). Genome dynamics in Legionella: the basis of versatility and adaptation to intracellular replication. *Cold Spring Harb Perspect Med* **3**.

Gomez-Valero, L., Rusniok, C., Jarraud, S., Vacherie, B., Rouy, Z., Barbe, V.*, et al.* (2011). Extensive recombination events and horizontal gene transfer shaped the Legionella pneumophila genomes. *BMC Genomics* **12,** 536.

Gomis-Rüth, F.X., Solà, M., de la Cruz, F. and Coll, M. (2004). Coupling factors in macromolecular type-IV secretion machineries. *Curr Pharm Des* **10,** 1551-1565.

Goodman, A.L., Kulasekara, B., Rietsch, A., Boyd, D., Smith, R.S. and Lory, S. (2004). A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in Pseudomonas aeruginosa. *Dev Cell* **7,** 745-754.

Goody, P.R., Heller, K., Oesterlin, L.K., Müller, M.P., Itzen, A. and Goody, R.S. (2012). Reversible phosphocholination of Rab proteins by Legionella pneumophila effector proteins. *EMBO J* **31,** 1774-1784.

Gotschlich, A., Huber, B., Geisenberger, O., Tögl, A., Steidle, A., Riedel, K.*, et al.* (2001). Synthesis of multiple N-acylhomoserine lactones is wide-spread among the members of the Burkholderia cepacia complex. *Syst Appl Microbiol* **24,** 1-14.

Guerrieri, E., Bondi, M., Sabia, C., de Niederhäusern, S., Borella, P. and Messi, P. (2008). Effect of bacterial interference on biofilm development by Legionella pneumophila. *Curr Microbiol* **57,** 532-536.

Gupta, K., Kumar, P. and Chatterji, D. (2010). Identification, activity and disulfide connectivity of C-di-GMP regulating proteins in Mycobacterium tuberculosis. *PLoS One* **5,** e15072.

Guzzo, C.R., Salinas, R.K., Andrade, M.O. and Farah, C.S. (2009). PILZ protein structure and interactions with PILB and the FIMX EAL domain: implications for control of type IV pilus biogenesis. *J Mol Biol* **393,** 848-866.

Habazettl, J., Allan, M.G., Jenal, U. and Grzesiek, S. (2011). Solution structure of the PilZ domain protein PA4608 complex with cyclic di-GMP identifies charge clustering as molecular readout. *J Biol Chem* **286,** 14304-14314.

Hales, L.M. and Shuman, H.A. (1999). The Legionella pneumophila rpoS gene is required for growth within Acanthamoeba castellanii. *J Bacteriol* **181,** 4879-4889.

Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W. and Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* **2,** 95-108.

Hammer, B.K. and Swanson, M.S. (1999). Co-ordination of legionella pneumophila virulence with entry into stationary phase by ppGpp. *Mol Microbiol* **33,** 721-731.
Hammer, B.K., Tateda, E.S. and Swanson, M.S. (2002). A two-component regulator induces the transmission phenotype of stationary-phase Legionella pneumophila. *Mol Microbiol* **44,** 107-118.
Hannoush, R.N. and Sun, J. (2010). The chemical toolbox for monitoring protein fatty acylation and prenylation. *Nat Chem Biol* **6,** 498-506.
Harada, T., Tanikawa, T., Iwasaki, Y., Yamada, M., Imai, Y. and Miyake, M. (2012). Phagocytic entry of Legionella pneumophila into macrophages through phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-independent pathway. *Biol Pharm Bull* **35,** 1460-1468.
Harb, O.S., Gao, L.Y. and Abu Kwaik, Y. (2000). From protozoa to mammalian cells: a new paradigm in the life cycle of intracellular bacterial pathogens. *Environ Microbiol* **2,** 251-265.
Harding, C.R., Mattheis, C., Mousnier, A., Oates, C.V., Hartland, E.L., Frankel, G. and Schroeder, G.N. (2013). LtpD Is a Novel Legionella pneumophila Effector That Binds Phosphatidylinositol 3-Phosphate and Inositol Monophosphatase IMPA1. *Infect Immun* **81,** 4261-4270.
Harding, C.R., Schroeder, G.N., Reynolds, S., Kosta, A., Collins, J.W., Mousnier, A. and Frankel, G. (2012). Legionella pneumophila pathogenesis in the Galleria mellonella infection model. *Infect Immun* **80,** 2780-2790.
Hardman, J.G., Davis, J.W. and Sutherland, E.W. (1969). Effects of some hormonal and other factors on the excretion of guanosine 3',5'-monophosphate and adenosine 3',5'-monophosphate in rat urine. *J Biol Chem* **244,** 6354-6362.
Harrison, R.E., Bucci, C., Vieira, O.V., Schroer, T.A. and Grinstein, S. (2003). Phagosomes fuse with late endosomes and/or lysosomes by extension of membrane protrusions along microtubules: role of Rab7 and RILP. *Mol Cell Biol* **23,** 6494-6506.
Hausser, A., Storz, P., Märtens, S., Link, G., Toker, A. and Pfizenmaier, K. (2005). Protein kinase D regulates vesicular transport by phosphorylating and activating phosphatidylinositol-4 kinase IIIbeta at the Golgi complex. *Nat Cell Biol* **7,** 880-886.
Hecht, G.B. and Newton, A. (1995). Identification of a novel response regulator required for the swarmer-to-stalked-cell transition in Caulobacter crescentus. *J Bacteriol* **177,** 6223-6229.
Heidtman, M., Chen, E.J., Moy, M.Y. and Isberg, R.R. (2009). Large-scale identification of Legionella pneumophila Dot/Icm substrates that modulate host cell vesicle trafficking pathways. *Cell Microbiol* **11,** 230-248.
Heiniger, R.W., Winther-Larsen, H.C., Pickles, R.J., Koomey, M. and Wolfgang, M.C. (2010). Infection of human mucosal tissue by Pseudomonas aeruginosa requires sequential and mutually dependent virulence factors and a novel pilus-associated adhesin. *Cell Microbiol* **12,** 1158-1173.
Helbig, J.H., Bernander, S., Castellani Pastoris, M., Etienne, J., Gaia, V., Lauwers, S*., et al.* (2002). Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease: distribution of Legionella pneumophila serogroups and monoclonal subgroups. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **21,** 710-716.
Henrichsen, J. (1972). Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol Rev* **36,** 478-503.
Hervet, E., Charpentier, X., Vianney, A., Lazzaroni, J.C., Gilbert, C., Atlan, D. and Doublet, P. (2011). The protein kinase LegK2 is a T4SS effector involved in endoplasmic reticulum recruitment and intracellular replication of Legionella pneumophila. *Infect Immun*.
Hespell, R.B., Rosson, R.A., Thomashow, M.F. and Rittenberg, S.C. (1973). Respiration of Bdellovibrio bacteriovorus strain 109J and its energy substrates for intraperiplasmic growth. *J Bacteriol* **113,** 1280-1288.
Hickman, J.W. and Harwood, C.S. (2008). Identification of FleQ from Pseudomonas aeruginosa as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Mol Microbiol* **69,** 376-389.

Hickman, J.W., Tifrea, D.F. and Harwood, C.S. (2005). A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102,** 14422-14427.

Hilbi, H., Segal, G. and Shuman, H.A. (2001). Icm/dot-dependent upregulation of phagocytosis by Legionella pneumophila. *Mol Microbiol* **42,** 603-617.

Hindré, T., Brüggemann, H., Buchrieser, C. and Héchard, Y. (2008). Transcriptional profiling of Legionella pneumophila biofilm cells and the influence of iron on biofilm formation. *Microbiology* **154,** 30-41.

Hinsa, S.M., Espinosa-Urgel, M., Ramos, J.L. and O'Toole, G.A. (2003). Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by Pseudomonas fluorescens WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Mol Microbiol* **49,** 905-918.

Ho, Y.S., Burden, L.M. and Hurley, J.H. (2000). Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. *EMBO J* **19,** 5288-5299.

Hobley, L., Fung, R.K., Lambert, C., Harris, M.A., Dabhi, J.M., King, S.S*., et al.* (2012). Discrete cyclic di-GMP-dependent control of bacterial predation versus axenic growth in Bdellovibrio bacteriovorus. *PLoS Pathog* **8,** e1002493.

Hoffmann, C., Finsel, I., Otto, A., Paffinger, G., Rothmeier, E., Hecker, M*., et al.* (2013). Functional analysis of novel Rab GTPases identified in the proteome of purified Legionella-containing vacuoles from macrophages. *Cell Microbiol*.

Hong, Y., Zhou, X., Fang, H., Yu, D., Li, C. and Sun, B. (2013). Cyclic di-GMP mediates Mycobacterium tuberculosis dormancy and pathogenecity. *Tuberculosis (Edinb)* **93,** 625-634.

Horwitz, M.A. (1984). Phagocytosis of the Legionnaires' disease bacterium (Legionella pneumophila) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil. *Cell* **36,** 27-33.

Horwitz, M.A. and Silverstein, S.C. (1980). Legionnaires' disease bacterium (Legionella pneumophila) multiples intracellularly in human monocytes. *J Clin Invest* **66,** 441-450.

Hovel-Miner, G., Pampou, S., Faucher, S.P., Clarke, M., Morozova, I., Morozov, P*., et al.* (2009). SigmaS controls multiple pathways associated with intracellular multiplication of Legionella pneumophila. *J Bacteriol* **191,** 2461-2473.

Hsu, B.M., Huang, C.C., Chen, J.S., Chen, N.H. and Huang, J.T. (2011). Comparison of potentially pathogenic free-living amoeba hosts by Legionella spp. in substrate-associated biofilms and floating biofilms from spring environments. *Water Res* **45,** 5171-5183.

Hsu, F., Zhu, W., Brennan, L., Tao, L., Luo, Z.Q. and Mao, Y. (2012). Structural basis for substrate recognition by a unique Legionella phosphoinositide phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109,** 13567-13572.

Hu, J., Wang, B., Fang, X., Means, W.J., McCormick, R.J., Gomelsky, M. and Zhu, M.J. (2013). c-di-GMP signaling regulates E. coli O157:H7 adhesion to colonic epithelium. *Vet Microbiol* **164,** 344-351.

Huang, C.J., Wang, Z.C., Huang, H.Y., Huang, H.D. and Peng, H.L. (2013). YjcC, a c-di-GMP phosphodiesterase protein, regulates the oxidative stress response and virulence of Klebsiella pneumoniae CG43. *PLoS One* **8,** e66740.

Huang, Z., Meric, G., Liu, Z., Ma, R., Tang, Z. and Lejeune, P. (2009). luxS-based quorum-sensing signaling affects Biofilm formation in Streptococcus mutans. *J Mol Microbiol Biotechnol* **17,** 12-19.

Huitema, E., Pritchard, S., Matteson, D., Radhakrishnan, S.K. and Viollier, P.H. (2006). Bacterial birth scar proteins mark future flagellum assembly site. *Cell* **124,** 1025-1037.

Hull, T.D., Ryu, M.H., Sullivan, M.J., Johnson, R.C., Klena, N.T., Geiger, R.M*., et al.* (2012). Cyclic Di-GMP phosphodiesterases RmdA and RmdB are involved in regulating colony morphology and development in Streptomyces coelicolor. *J Bacteriol* **194,** 4642-4651.

Hussain, S., Malik, M., Shi, L., Gennaro, M.L. and Drlica, K. (2009). In vitro model of mycobacterial growth arrest using nitric oxide with limited air. *Antimicrob Agents Chemother* **53,** 157-161.

Huynh, K.K. and Grinstein, S. (2007). Regulation of vacuolar pH and its modulation by some microbial species. *Microbiol Mol Biol Rev* **71,** 452-462.

Häse, C.C. and Mekalanos, J.J. (1998). TcpP protein is a positive regulator of virulence gene expression in Vibrio cholerae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95,** 730-734.
Häussler, S. (2004). Biofilm formation by the small colony variant phenotype of Pseudomonas aeruginosa. *Environ Microbiol* **6,** 546-551.
Ingmundson, A., Delprato, A., Lambright, D.G. and Roy, C.R. (2007). Legionella pneumophila proteins that regulate Rab1 membrane cycling. *Nature* **450,** 365-369.
Irie, Y., Starkey, M., Edwards, A.N., Wozniak, D.J., Romeo, T. and Parsek, M.R. (2010). Pseudomonas aeruginosa biofilm matrix polysaccharide Psl is regulated transcriptionally by RpoS and post-transcriptionally by RsmA. *Mol Microbiol* **78,** 158-172.
Ishikawa, E., Ishikawa, S., Davis, J.W. and Sutherland, E.W. (1969). Determination of guanosine 3',5'-monophosphate in tissues and of guanyl cyclase in rat intestine. *J Biol Chem* **244,** 6371-6376.
Itoh, Y., Rice, J.D., Goller, C., Pannuri, A., Taylor, J., Meisner, J*., et al.* (2008). Roles of pgaABCD genes in synthesis, modification, and export of the Escherichia coli biofilm adhesin poly-beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine. *J Bacteriol* **190,** 3670-3680.
Ivanov, I.E., Boyd, C.D., Newell, P.D., Schwartz, M.E., Turnbull, L., Johnson, M.S*., et al.* (2012). Atomic force and super-resolution microscopy support a role for LapA as a cell-surface biofilm adhesin of Pseudomonas fluorescens. *Res Microbiol* **163,** 685-691.
Ivanov, S.S., Charron, G., Hang, H.C. and Roy, C.R. (2010). Lipidation by the host prenyltransferase machinery facilitates membrane localization of Legionella pneumophila effector proteins. *J Biol Chem* **285,** 34686-34698.
Jackson, D.W., Simecka, J.W. and Romeo, T. (2002). Catabolite repression of Escherichia coli biofilm formation. *J Bacteriol* **184,** 3406-3410.
Jank, T., Böhmer, K.E., Tzivelekidis, T., Schwan, C., Belyi, Y. and Aktories, K. (2012). Domain organization of Legionella effector SetA. *Cell Microbiol* **14,** 852-868.
Jenal, U. (2004). Cyclic di-guanosine-monophosphate comes of age: a novel secondary messenger involved in modulating cell surface structures in bacteria? *Curr Opin Microbiol* **7,** 185-191.
Johnson, J.G., Murphy, C.N., Sippy, J., Johnson, T.J. and Clegg, S. (2011). Type 3 fimbriae and biofilm formation are regulated by the transcriptional regulators MrkHI in Klebsiella pneumoniae. *J Bacteriol* **193,** 3453-3460.
Joshi, A.D., Sturgill-Koszycki, S. and Swanson, M.S. (2001). Evidence that Dot-dependent and -independent factors isolate the Legionella pneumophila phagosome from the endocytic network in mouse macrophages. *Cell Microbiol* **3,** 99-114.
Jurkevitch, E., Minz, D., Ramati, B. and Barel, G. (2000). Prey range characterization, ribotyping, and diversity of soil and rhizosphere Bdellovibrio spp. isolated on phytopathogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol* **66,** 2365-2371.
Justice, S.S., Hunstad, D.A., Cegelski, L. and Hultgren, S.J. (2008). Morphological plasticity as a bacterial survival strategy. *Nat Rev Microbiol* **6,** 162-168.
Kader, A., Simm, R., Gerstel, U., Morr, M. and Römling, U. (2006). Hierarchical involvement of various GGDEF domain proteins in rdar morphotype development of Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **60,** 602-616.
Kagan, J.C. and Roy, C.R. (2002). Legionella phagosomes intercept vesicular traffic from endoplasmic reticulum exit sites. *Nat Cell Biol* **4,** 945-954.
Kalia, D., Merey, G., Nakayama, S., Zheng, Y., Zhou, J., Luo, Y*., et al.* (2013). Nucleotide, c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP, (p)ppGpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis. *Chem Soc Rev* **42,** 305-341.
Kamruzzaman, M., Udden, S.M., Cameron, D.E., Calderwood, S.B., Nair, G.B., Mekalanos, J.J. and Faruque, S.M. (2010). Quorum-regulated biofilms enhance the development of conditionally viable, environmental Vibrio cholerae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107,** 1588-1593.
Kanazawa, T., Ren, S., Maekawa, M., Hasegawa, K., Arisaka, F., Hyodo, M*., et al.* (2010). Biochemical and physiological characterization of a BLUF protein-EAL protein complex involved in blue light-dependent degradation of cyclic diguanylate in the purple bacterium Rhodopseudomonas palustris. *Biochemistry* **49,** 10647-10655.

Kaplan Zeevi, M., Shafir, N.S., Shaham, S., Friedman, S., Sigal, N., Nir Paz, R.*, et al.* (2013). Listeria monocytogenes multidrug resistance transporters and cyclic di-AMP, which contribute to type I interferon induction, play a role in cell wall stress. *J Bacteriol* **195,** 5250-5261.

Karakousis, P.C., Yoshimatsu, T., Lamichhane, G., Woolwine, S.C., Nuermberger, E.L., Grosset, J. and Bishai, W.R. (2004). Dormancy phenotype displayed by extracellular Mycobacterium tuberculosis within artificial granulomas in mice. *J Exp Med* **200,** 647-657.

Karunker, I., Rotem, O., Dori-Bachash, M., Jurkevitch, E. and Sorek, R. (2013). A global transcriptional switch between the attack and growth forms of Bdellovibrio bacteriovorus. *PLoS One* **8,** e61850.

Katagiri, N., Shobuike, T., Chang, B., Kukita, A. and Miyamoto, H. (2012). The human apoptosis inhibitor NAIP induces pyroptosis in macrophages infected with Legionella pneumophila. *Microbes Infect* **14,** 1123-1132.

Kazmierczak, B.I., Lebron, M.B. and Murray, T.S. (2006). Analysis of FimX, a phosphodiesterase that governs twitching motility in Pseudomonas aeruginosa. *Mol Microbiol* **60,** 1026-1043.

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

Khan, M.A., Knox, N., Prashar, A., Alexander, D., Abdel-Nour, M., Duncan, C.*, et al.* (2013). Comparative Genomics Reveal That Host-Innate Immune Responses Influence the Clinical Prevalence of Legionella pneumophila Serogroups. *PLoS One* **8,** e67298.

Khelef, N., Shuman, H.A. and Maxfield, F.R. (2001). Phagocytosis of wild-type Legionella pneumophila occurs through a wortmannin-insensitive pathway. *Infect Immun* **69,** 5157-5161.

Kim, E.H., Charpentier, X., Torres-Urquidy, O., McEvoy, M.M. and Rensing, C. (2009). The metal efflux island of Legionella pneumophila is not required for survival in macrophages and amoebas. *FEMS Microbiol Lett* **301,** 164-170.

Kimura, S., Tateda, K., Ishii, Y., Horikawa, M., Miyairi, S., Gotoh, N.*, et al.* (2009). Pseudomonas aeruginosa Las quorum sensing autoinducer suppresses growth and biofilm production in Legionella species. *Microbiology* **155,** 1934-1939.

Ko, J., Ryu, K.S., Kim, H., Shin, J.S., Lee, J.O., Cheong, C. and Choi, B.S. (2010). Structure of PP4397 reveals the molecular basis for different c-di-GMP binding modes by Pilz domain proteins. *J Mol Biol* **398,** 97-110.

Ko, M. and Park, C. (2000). Two novel flagellar components and H-NS are involved in the motor function of Escherichia coli. *J Mol Biol* **303,** 371-382.

Konishi, T., Yamashiro, T., Koide, M. and Nishizono, A. (2006). Influence of temperature on growth of Legionella pneumophila biofilm determined by precise temperature gradient incubator. *J Biosci Bioeng* **101,** 478-484.

Koubar, M., Rodier, M.H. and Frère, J. (2013). Involvement of minerals in adherence of Legionella pneumophila to surfaces. *Curr Microbiol* **66,** 437-442.

Kozlova, E.V., Khajanchi, B.K., Sha, J. and Chopra, A.K. (2011). Quorum sensing and c-di-GMP-dependent alterations in gene transcripts and virulence-associated phenotypes in a clinical isolate of Aeromonas hydrophila. *Microb Pathog* **50,** 213-223.

Krasteva, P.V., Fong, J.C., Shikuma, N.J., Beyhan, S., Navarro, M.V., Yildiz, F.H. and Sondermann, H. (2010). Vibrio cholerae VpsT regulates matrix production and motility by directly sensing cyclic di-GMP. *Science* **327,** 866-868.

Kresge, N., Simeoni, R. and Hill, R. (2005). Earl W. Sutherland's Discovery of Cyclic Adenine Monophosphate and the Second Messenger System. *Journal of Biological Chemistry* **280,** e39.

Kruger, K., Grabowski, P.J., Zaug, A.J., Sands, J., Gottschling, D.E. and Cech, T.R. (1982). Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell* **31,** 147-157.

Ku, B., Lee, K.H., Park, W.S., Yang, C.S., Ge, J., Lee, S.G.*, et al.* (2012). VipD of Legionella pneumophila targets activated Rab5 and Rab22 to interfere with endosomal trafficking in macrophages. *PLoS Pathog* **8,** e1003082.

Kubori, T., Hyakutake, A. and Nagai, H. (2008). Legionella translocates an E3 ubiquitin ligase that has multiple U-boxes with distinct functions. *Mol Microbiol* **67,** 1307-1319.
Kubori, T., Shinzawa, N., Kanuka, H. and Nagai, H. (2010). Legionella metaeffector exploits host proteasome to temporally regulate cognate effector. *PLoS Pathog* **6,** e1001216.
Kuchma, S.L., Ballok, A.E., Merritt, J.H., Hammond, J.H., Lu, W., Rabinowitz, J.D. and O'Toole, G.A. (2010). Cyclic-di-GMP-mediated repression of swarming motility by Pseudomonas aeruginosa: the pilY1 gene and its impact on surface-associated behaviors. *J Bacteriol* **192,** 2950-2964.
Kuchma, S.L., Brothers, K.M., Merritt, J.H., Liberati, N.T., Ausubel, F.M. and O'Toole, G.A. (2007). BifA, a cyclic-Di-GMP phosphodiesterase, inversely regulates biofilm formation and swarming motility by Pseudomonas aeruginosa PA14. *J Bacteriol* **189,** 8165-8178.
Kuchma, S.L., Griffin, E.F. and O'Toole, G.A. (2012). Minor pilins of the type IV pilus system participate in the negative regulation of swarming motility. *J Bacteriol* **194,** 5388-5403.
Kulasakara, H., Lee, V., Brencic, A., Liberati, N., Urbach, J., Miyata, S.*, et al.* (2006). Analysis of Pseudomonas aeruginosa diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103,** 2839-2844.
Kulshina, N., Baird, N.J. and Ferré-D'Amaré, A.R. (2009). Recognition of the bacterial second messenger cyclic diguanylate by its cognate riboswitch. *Nat Struct Mol Biol* **16,** 1212-1217.
Kumagai, Y., Matsuo, J., Cheng, Z., Hayakawa, Y. and Rikihisa, Y. (2011). Cyclic dimeric GMP signaling regulates intracellular aggregation, sessility, and growth of Ehrlichia chaffeensis. *Infect Immun* **79,** 3905-3912.
Kumagai, Y., Matsuo, J., Hayakawa, Y. and Rikihisa, Y. (2010). Cyclic di-GMP signaling regulates invasion by Ehrlichia chaffeensis of human monocytes. *J Bacteriol* **192,** 4122-4133.
Kumar, A., Deshane, J.S., Crossman, D.K., Bolisetty, S., Yan, B.S., Kramnik, I.*, et al.* (2008a). Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide induces the Mycobacterium tuberculosis dormancy regulon. *J Biol Chem* **283,** 18032-18039.
Kumar, M. and Chatterji, D. (2008b). Cyclic di-GMP: a second messenger required for long-term survival, but not for biofilm formation, in Mycobacterium smegmatis. *Microbiology* **154,** 2942-2955.
Lai, Y.C., Peng, H.L. and Chang, H.Y. (2001). Identification of genes induced in vivo during Klebsiella pneumoniae CG43 infection. *Infect Immun* **69,** 7140-7145.
Lamont, R.J. and Jenkinson, H.F. (1998). Life below the gum line: pathogenic mechanisms of Porphyromonas gingivalis. *Microbiol Mol Biol Rev* **62,** 1244-1263.
Langley, J.M., Hanakowski, M. and Leblanc, J.C. (2001). Unique epidemiology of nosocomial urinary tract infection in children. *Am J Infect Control* **29,** 94-98.
Larsen, S.H., Reader, R.W., Kort, E.N., Tso, W.W. and Adler, J. (1974). Change in direction of flagellar rotation is the basis of the chemotactic response in Escherichia coli. *Nature* **249,** 74-77.
Lau, H.Y. and Ashbolt, N.J. (2009). The role of biofilms and protozoa in Legionella pathogenesis: implications for drinking water. *J Appl Microbiol* **107,** 368-378.
Lautner, M., Schunder, E., Herrmann, V. and Heuner, K. (2013). Regulation, integrase-dependent excision, and horizontal transfer of genomic islands in Legionella pneumophila. *J Bacteriol* **195,** 1583-1597.
Lawe, D.C., Patki, V., Heller-Harrison, R., Lambright, D. and Corvera, S. (2000). The FYVE domain of early endosome antigen 1 is required for both phosphatidylinositol 3-phosphate and Rab5 binding. Critical role of this dual interaction for endosomal localization. *J Biol Chem* **275,** 3699-3705.
Lazzarini, R.A., Cashel, M. and Gallant, J. (1971a). On the regulation of guanosine tetraphosphate levels in stringent and relaxed strains of Escherichia coli. *J Biol Chem* **246,** 4381-4385.
Lazzarini, R.A. and Dahlberg, A.E. (1971b). The control of ribonucleic acid synthesis during amino acid deprivation in Escherichia coli. *J Biol Chem* **246,** 420-429.
Leduc, J.L. and Roberts, G.P. (2009). Cyclic di-GMP allosterically inhibits the CRP-like protein (Clp) of Xanthomonas axonopodis pv. citri. *J Bacteriol* **191,** 7121-7122.

Lee, E.R., Baker, J.L., Weinberg, Z., Sudarsan, N. and Breaker, R.R. (2010). An allosteric self-splicing ribozyme triggered by a bacterial second messenger. *Science* **329,** 845-848.
Lee, M.C., Weng, S.F. and Tseng, Y.H. (2003). Flagellin gene fliC of Xanthomonas campestris is upregulated by transcription factor Clp. *Biochem Biophys Res Commun* **307,** 647-652.
Lee, V.T., Matewish, J.M., Kessler, J.L., Hyodo, M., Hayakawa, Y. and Lory, S. (2007). A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Mol Microbiol* **65,** 1474-1484.
Lehtola, M.J., Torvinen, E., Kusnetsov, J., Pitkänen, T., Maunula, L., von Bonsdorff, C.H*., et al.* (2007). Survival of Mycobacterium avium, Legionella pneumophila, Escherichia coli, and caliciviruses in drinking water-associated biofilms grown under high-shear turbulent flow. *Appl Environ Microbiol* **73,** 2854-2859.
Leonardy, S., Miertzschke, M., Bulyha, I., Sperling, E., Wittinghofer, A. and Søgaard-Andersen, L. (2010). Regulation of dynamic polarity switching in bacteria by a Ras-like G-protein and its cognate GAP. *EMBO J* **29,** 2276-2289.
Levet-Paulo, M., Lazzaroni, J.C., Gilbert, C., Atlan, D., Doublet, P. and Vianney, A. (2011). The Atypical Two-component Sensor Kinase Lpl0330 from Legionella pneumophila Controls the Bifunctional Diguanylate Cyclase-Phosphodiesterase Lpl0329 to Modulate Bis-(3'-5')-cyclic Dimeric GMP Synthesis. *J Biol Chem* **286,** 31136-31144.
Levi, A., Folcher, M., Jenal, U. and Shuman, H.A. (2011). Cyclic Diguanylate Signaling Proteins Control Intracellular Growth of Legionella pneumophila. *MBio* **2**.
Li, T.N., Chin, K.H., Fung, K.M., Yang, M.T., Wang, A.H. and Chou, S.H. (2011). A novel tetrameric PilZ domain structure from xanthomonads. *PLoS One* **6,** e22036.
Li, X.D., Wu, J., Gao, D., Wang, H., Sun, L. and Chen, Z.J. (2013a). Pivotal roles of cGAS-cGAMP signaling in antiviral defense and immune adjuvant effects. *Science* **341,** 1390-1394.
Li, Y., Heine, S., Entian, M., Sauer, K. and Frankenberg-Dinkel, N. (2013b). NO-induced biofilm dispersion in Pseudomonas aeruginosa is mediated by an MHYT domain-coupled phosphodiesterase. *J Bacteriol* **195,** 3531-3542.
Liang, W., Pascual-Montano, A., Silva, A.J. and Benitez, J.A. (2007). The cyclic AMP receptor protein modulates quorum sensing, motility and multiple genes that affect intestinal colonization in Vibrio cholerae. *Microbiology* **153,** 2964-2975.
Liles, M.R., Edelstein, P.H. and Cianciotto, N.P. (1999). The prepilin peptidase is required for protein secretion by and the virulence of the intracellular pathogen Legionella pneumophila. *Mol Microbiol* **31,** 959-970.
Liles, M.R., Viswanathan, V.K. and Cianciotto, N.P. (1998). Identification and temperature regulation of Legionella pneumophila genes involved in type IV pilus biogenesis and type II protein secretion. *Infect Immun* **66,** 1776-1782.
Lim, B., Beyhan, S. and Yildiz, F.H. (2007). Regulation of Vibrio polysaccharide synthesis and virulence factor production by CdgC, a GGDEF-EAL domain protein, in Vibrio cholerae. *J Bacteriol* **189,** 717-729.
Lindenberg, S., Klauck, G., Pesavento, C., Klauck, E. and Hengge, R. (2013). The EAL domain protein YciR acts as a trigger enzyme in a c-di-GMP signalling cascade in E. coli biofilm control. *EMBO J* **32,** 2001-2014.
Linder, J.U. (2006). Class III adenylyl cyclases: molecular mechanisms of catalysis and regulation. *Cell Mol Life Sci* **63,** 1736-1751.
Liu, N., Pak, T. and Boon, E.M. (2010). Characterization of a diguanylate cyclase from Shewanella woodyi with cyclase and phosphodiesterase activities. *Mol Biosyst* **6,** 1561-1564.
Liu, N., Xu, Y., Hossain, S., Huang, N., Coursolle, D., Gralnick, J.A. and Boon, E.M. (2012a). Nitric oxide regulation of cyclic di-GMP synthesis and hydrolysis in Shewanella woodyi. *Biochemistry* **51,** 2087-2099.
Liu, R., Yu, Z., Guo, H., Liu, M., Zhang, H. and Yang, M. (2012b). Pyrosequencing analysis of eukaryotic and bacterial communities in faucet biofilms. *Sci Total Environ* **435-436,** 124-131.

Liu, Y. and Luo, Z.Q. (2007). The Legionella pneumophila effector SidJ is required for efficient recruitment of endoplasmic reticulum proteins to the bacterial phagosome. *Infect Immun* **75,** 592-603.

Liu, Y.F., Liao, C.T., Song, W.L., Hsu, P.C., Du, S.C., Lo, H.H. and Hsiao, Y.M. (2013). GsmR, a response regulator with an HD-related output domain in Xanthomonas campestris, is positively controlled by Clp and is involved in the expression of genes responsible for flagellum synthesis. *FEBS J* **280,** 199-213.

Liu, Z., Lin, Y.E., Stout, J.E., Hwang, C.C., Vidic, R.D. and Yu, V.L. (2006). Effect of flow regimes on the presence of Legionella within the biofilm of a model plumbing system. *J Appl Microbiol* **101,** 437-442.

Lomma, M., Dervins-Ravault, D., Rolando, M., Nora, T., Newton, H.J., Sansom, F.M.*, et al.* (2010). The Legionella pneumophila F-box protein Lpp2082 (AnkB) modulates ubiquitination of the host protein parvin B and promotes intracellular replication. *Cell Microbiol* **12,** 1272-1291.

Lovering, A.L., Capeness, M.J., Lambert, C., Hobley, L. and Sockett, R.E. (2011). The structure of an unconventional HD-GYP protein from Bdellovibrio reveals the roles of conserved residues in this class of cyclic-di-GMP phosphodiesterases. *MBio* **2**.

Lucas, C.E., Brown, E. and Fields, B.S. (2006). Type IV pili and type II secretion play a limited role in Legionella pneumophila biofilm colonization and retention. *Microbiology* **152,** 3569-3573.

Luo, Y., Chen, B., Zhou, J., Sintim, H.O. and Dayie, T.K. (2014). E88, a new cyclic-di-GMP class I riboswitch aptamer from Clostridium tetani, has a similar fold to the prototypical class I riboswitch, Vc2, but differentially binds to c-di-GMP analogs. *Mol Biosyst* **10,** 384-390.

Luo, Y. and Helmann, J.D. (2012). Analysis of the role of Bacillus subtilis σ(M) in β-lactam resistance reveals an essential role for c-di-AMP in peptidoglycan homeostasis. *Mol Microbiol* **83,** 623-639.

Luo, Y., Zhou, J., Wang, J., Dayie, T.K. and Sintim, H.O. (2013). Selective binding of 2'-F-c-di-GMP to Ct-E88 and Cb-E43, new class I riboswitches from Clostridium tetani and Clostridium botulinum respectively. *Mol Biosyst* **9,** 1535-1539.

Luo, Z.Q. and Isberg, R.R. (2004). Multiple substrates of the Legionella pneumophila Dot/Icm system identified by interbacterial protein transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101,** 841-846.

Ma, J., He, Y., Hu, B. and Luo, Z.Q. (2013). Genome Sequence of an Environmental Isolate of the Bacterial Pathogen Legionella pneumophila. *Genome Announc* **1**.

Ma, Q., Yang, Z., Pu, M., Peti, W. and Wood, T.K. (2011). Engineering a novel c-di-GMP-binding protein for biofilm dispersal. *Environ Microbiol* **13,** 631-642.

Machner, M.P. and Isberg, R.R. (2006). Targeting of host Rab GTPase function by the intravacuolar pathogen Legionella pneumophila. *Dev Cell* **11,** 47-56.

Magnusson, L.U., Gummesson, B., Joksimović, P., Farewell, A. and Nyström, T. (2007). Identical, independent, and opposing roles of ppGpp and DksA in Escherichia coli. *J Bacteriol* **189,** 5193-5202.

MAKMAN, R.S. and SUTHERLAND, E.W. (1965). ADENOSINE 3',5'-PHOSPHATE IN ESCHERICHIA COLI. *J Biol Chem* **240,** 1309-1314.

Mallegol, J., Duncan, C., Prashar, A., So, J., Low, D.E., Terebeznik, M. and Guyard, C. (2012). Essential roles and regulation of the Legionella pneumophila collagen-like adhesin during biofilm formation. *PLoS One* **7,** e46462.

Malott, R.J., Baldwin, A., Mahenthiralingam, E. and Sokol, P.A. (2005). Characterization of the cciIR quorum-sensing system in Burkholderia cenocepacia. *Infect Immun* **73,** 4982-4992.

Mampel, J., Spirig, T., Weber, S.S., Haagensen, J.A., Molin, S. and Hilbi, H. (2006). Planktonic replication is essential for biofilm formation by Legionella pneumophila in a complex medium under static and dynamic flow conditions. *Appl Environ Microbiol* **72,** 2885-2895.

Marchler-Bauer, A., Zheng, C., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., Geer, L.Y., Geer, R.C.*, et al.* (2013). CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure. *Nucleic Acids Res* **41,** D348-352.

Marden, J.N., Dong, Q., Roychowdhury, S., Berleman, J.E. and Bauer, C.E. (2011). Cyclic GMP controls Rhodospirillum centenum cyst development. *Mol Microbiol* **79,** 600-615.

Marra, A., Blander, S.J., Horwitz, M.A. and Shuman, H.A. (1992). Identification of a Legionella pneumophila locus required for intracellular multiplication in human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89,** 9607-9611.

Martin, T.F. and Kowalchyk, J.A. (1984). Evidence for the role of calcium and diacylglycerol as dual second messengers in thyrotropin-releasing hormone action: involvement of diacylglycerol. *Endocrinology* **115,** 1517-1526.

Martinelli, F., Caruso, A., Moschini, L., Turano, A., Scarcella, C. and Speziani, F. (2000). A comparison of Legionella pneumophila occurrence in hot water tanks and instantaneous devices in domestic, nosocomial, and community environments. *Curr Microbiol* **41,** 374-376.

Martinez-Wilson, H.F., Tamayo, R., Tischler, A.D., Lazinski, D.W. and Camilli, A. (2008). The vibrio cholerae hybrid sensor kinase VieS contributes to motility and biofilm regulation by altering the cyclic diguanylate level. *J Bacteriol* **190,** 6439-6447.

Martínez-Granero, F., Navazo, A., Barahona, E., Redondo-Nieto, M., González de Heredia, E., Baena, I*., et al.* (2014). Identification of flgZ as a flagellar gene encoding a PilZ domain protein that regulates swimming motility and biofilm formation in Pseudomonas. *PLoS One* **9,** e87608.

Massie, J.P., Reynolds, E.L., Koestler, B.J., Cong, J.P., Agostoni, M. and Waters, C.M. (2012). Quantification of high-specificity cyclic diguanylate signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109,** 12746-12751.

Matthews, M. and Roy, C.R. (2000). Identification and subcellular localization of the Legionella pneumophila IcmX protein: a factor essential for establishment of a replicative organelle in eukaryotic host cells. *Infect Immun* **68,** 3971-3982.

Mattick, J.S. (2002). Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol* **56,** 289-314.

Mauriello, E.M., Mignot, T., Yang, Z. and Zusman, D.R. (2010). Gliding motility revisited: how do the myxobacteria move without flagella? *Microbiol Mol Biol Rev* **74,** 229-249.

McBride, H.M., Rybin, V., Murphy, C., Giner, A., Teasdale, R. and Zerial, M. (1999). Oligomeric complexes link Rab5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and syntaxin 13. *Cell* **98,** 377-386.

McCarthy, Y., Ryan, R.P., O'Donovan, K., He, Y.Q., Jiang, B.L., Feng, J.X*., et al.* (2008). The role of PilZ domain proteins in the virulence of Xanthomonas campestris pv. campestris. *Mol Plant Pathol* **9,** 819-824.

McDade, J.E., Shepard, C.C., Fraser, D.W., Tsai, T.R., Redus, M.A. and Dowdle, W.R. (1977). Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N Engl J Med* **297,** 1197-1203.

McDougald, D., Rice, S.A., Barraud, N., Steinberg, P.D. and Kjelleberg, S. (2012). Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat Rev Microbiol* **10,** 39-50.

McKee, R.W., Mangalea, M.R., Purcell, E.B., Borchardt, E.K. and Tamayo, R. (2013). The second messenger cyclic Di-GMP regulates Clostridium difficile toxin production by controlling expression of sigD. *J Bacteriol* **195,** 5174-5185.

Merighi, M., Lee, V.T., Hyodo, M., Hayakawa, Y. and Lory, S. (2007). The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa. *Mol Microbiol* **65,** 876-895.

Merritt, J.H., Brothers, K.M., Kuchma, S.L. and O'Toole, G.A. (2007). SadC reciprocally influences biofilm formation and swarming motility via modulation of exopolysaccharide production and flagellar function. *J Bacteriol* **189,** 8154-8164.

Merritt, J.H., Ha, D.G., Cowles, K.N., Lu, W., Morales, D.K., Rabinowitz, J*., et al.* (2010). Specific Control of Pseudomonas aeruginosa Surface-Associated Behaviors by Two c-di-GMP Diguanylate Cyclases. *MBio* **1**.

Merz, A.J., So, M. and Sheetz, M.P. (2000). Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature* **407,** 98-102.

Michard, C., Sperandio, D., Baïlo, N., Pizarro-Cerda, J., LeClaire, L., Chadeau-Argaud*, et al.* The *Legionella pneumophila* kinase LegK2 targets ARP2/3 complex to inhibit actin nucleation on pahgosomes and allow bacterial evasion from late endocytic pathway.

Michard, C., Sperandio, D., Baïlo, N., Pizzaro-Cerda, J., LeClaire, L., Chadeau-Argaud, E.*, et al.* (données non publiées) The *Legionella pneumophila* kinase LegK2 targets ARP2/3 complex to inhibit actin nucleation on phagosomes and allow bacterial evasion from late endocytic pathway.

Michel, R., Burghardt, H. and Bergmann, H. (1995). [Acanthamoeba, naturally intracellularly infected with Pseudomonas aeruginosa, after their isolation from a microbiologically contaminated drinking water system in a hospital]. *Zentralbl Hyg Umweltmed* **196,** 532-544.

Mihai Gazdag, E., Streller, A., Haneburger, I., Hilbi, H., Vetter, I.R., Goody, R.S. and Itzen, A. (2013). Mechanism of Rab1b deactivation by the Legionella pneumophila GAP LepB. *EMBO Rep* **14,** 199-205.

Mikkelsen, H., Ball, G., Giraud, C. and Filloux, A. (2009). Expression of Pseudomonas aeruginosa CupD fimbrial genes is antagonistically controlled by RcsB and the EAL-containing PvrR response regulators. *PLoS One* **4,** e6018.

Mills, E., Pultz, I.S., Kulasekara, H.D. and Miller, S.I. (2011). The bacterial second messenger c-di-GMP: mechanisms of signalling. *Cell Microbiol* **13,** 1122-1129.

Milner, D.S., Till, R., Cadby, I., Lovering, A.L., Basford, S.M., Saxon, E.B.*, et al.* (2014). Ras GTPase-Like Protein MglA, a Controller of Bacterial Social-Motility in Myxobacteria, Has Evolved to Control Bacterial Predation by Bdellovibrio. *PLoS Genet* **10,** e1004253.

Minamino, T., Imada, K. and Namba, K. (2008). Molecular motors of the bacterial flagella. *Curr Opin Struct Biol* **18,** 693-701.

Minasov, G., Padavattan, S., Shuvalova, L., Brunzelle, J.S., Miller, D.J., Baslé, A.*, et al.* (2009). Crystal structures of YkuI and its complex with second messenger cyclic Di-GMP suggest catalytic mechanism of phosphodiester bond cleavage by EAL domains. *J Biol Chem* **284,** 13174-13184.

Miner, K.D., Klose, K.E. and Kurtz, D.M. (2013). An HD-GYP cyclic di-guanosine monophosphate phosphodiesterase with a non-heme diiron-carboxylate active site. *Biochemistry* **52,** 5329-5331.

Mishra, A.K., Del Campo, C.M., Collins, R.E., Roy, C.R. and Lambright, D.G. (2013). The Legionella pneumophila GTPase activating protein LepB accelerates Rab1 deactivation by a non-canonical hydrolytic mechanism. *J Biol Chem* **288,** 24000-24011.

Mitchell, P. and Moyle, J. (1967). Acid-base titration across the membrane system of rat-liver mitochondria. Catalysis by uncouplers. *Biochem J* **104,** 588-600.

Molmeret, M. and Abu Kwaik, Y. (2002a). How does Legionella pneumophila exit the host cell? *Trends Microbiol* **10,** 258-260.

Molmeret, M., Alli, O.A., Radulic, M., Susa, M., Doric, M. and Kwaik, Y.A. (2002b). The C-terminus of IcmT is essential for pore formation and for intracellular trafficking of Legionella pneumophila within Acanthamoeba polyphaga. *Mol Microbiol* **43,** 1139-1150.

Molmeret, M., Alli, O.A., Zink, S., Flieger, A., Cianciotto, N.P. and Kwaik, Y.A. (2002c). icmT is essential for pore formation-mediated egress of Legionella pneumophila from mammalian and protozoan cells. *Infect Immun* **70,** 69-78.

Molmeret, M., Bitar, D.M., Han, L. and Kwaik, Y.A. (2004a). Disruption of the phagosomal membrane and egress of Legionella pneumophila into the cytoplasm during the last stages of intracellular infection of macrophages and Acanthamoeba polyphaga. *Infect Immun* **72,** 4040-4051.

Molmeret, M., Jones, S., Santic, M., Habyarimana, F., Esteban, M.T. and Kwaik, Y.A. (2010). Temporal and spatial trigger of post-exponential virulence-associated regulatory cascades by Legionella pneumophila after bacterial escape into the host cell cytosol. *Environ Microbiol* **12,** 704-715.

Molmeret, M., Zink, S.D., Han, L., Abu-Zant, A., Asari, R., Bitar, D.M. and Abu Kwaik, Y. (2004b). Activation of caspase-3 by the Dot/Icm virulence system is essential for arrested biogenesis of the Legionella-containing phagosome. *Cell Microbiol* **6,** 33-48.

Molofsky, A.B. and Swanson, M.S. (2003). Legionella pneumophila CsrA is a pivotal repressor of transmission traits and activator of replication. *Mol Microbiol* **50,** 445-461.
Monds, R.D., Newell, P.D., Gross, R.H. and O'Toole, G.A. (2007). Phosphate-dependent modulation of c-di-GMP levels regulates Pseudomonas fluorescens Pf0-1 biofilm formation by controlling secretion of the adhesin LapA. *Mol Microbiol* **63,** 656-679.
Monson, E.K., Weinstein, M., Ditta, G.S. and Helinski, D.R. (1992). The FixL protein of Rhizobium meliloti can be separated into a heme-binding oxygen-sensing domain and a functional C-terminal kinase domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89,** 4280-4284.
Moore, M.S. and Blobel, G. (1993). The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature* **365,** 661-663.
Morgan, J.L., McNamara, J.T. and Zimmer, J. (2014). Mechanism of activation of bacterial cellulose synthase by cyclic di-GMP. *Nat Struct Mol Biol*.
Morgan, R., Kohn, S., Hwang, S.H., Hassett, D.J. and Sauer, K. (2006). BdlA, a chemotaxis regulator essential for biofilm dispersion in Pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol* **188,** 7335-7343.
Moritz, M.M., Flemming, H.C. and Wingender, J. (2010). Integration of Pseudomonas aeruginosa and Legionella pneumophila in drinking water biofilms grown on domestic plumbing materials. *Int J Hyg Environ Health* **213,** 190-197.
Moscoso, J.A., Mikkelsen, H., Heeb, S., Williams, P. and Filloux, A. (2011). The Pseudomonas aeruginosa sensor RetS switches type III and type VI secretion via c-di-GMP signalling. *Environ Microbiol* **13,** 3128-3138.
Mukherjee, S., Liu, X., Arasaki, K., McDonough, J., Galán, J.E. and Roy, C.R. (2011). Modulation of Rab GTPase function by a protein phosphocholine transferase. *Nature* **477,** 103-106.
Murata, T., Delprato, A., Ingmundson, A., Toomre, D.K., Lambright, D.G. and Roy, C.R. (2006). The Legionella pneumophila effector protein DrrA is a Rab1 guanine nucleotide-exchange factor. *Nat Cell Biol* **8,** 971-977.
Murga, R., Forster, T.S., Brown, E., Pruckler, J.M., Fields, B.S. and Donlan, R.M. (2001). Role of biofilms in the survival of Legionella pneumophila in a model potable-water system. *Microbiology* **147,** 3121-3126.
Müller, M.P., Peters, H., Blümer, J., Blankenfeldt, W., Goody, R.S. and Itzen, A. (2010). The Legionella effector protein DrrA AMPylates the membrane traffic regulator Rab1b. *Science* **329,** 946-949.
Müller-Taubenberger, A., Lupas, A.N., Li, H., Ecke, M., Simmeth, E. and Gerisch, G. (2001). Calreticulin and calnexin in the endoplasmic reticulum are important for phagocytosis. *EMBO J* **20,** 6772-6782.
Nagai, H., Kagan, J.C., Zhu, X., Kahn, R.A. and Roy, C.R. (2002). A bacterial guanine nucleotide exchange factor activates ARF on Legionella phagosomes. *Science* **295,** 679-682.
Nagai, H. and Roy, C.R. (2001). The DotA protein from Legionella pneumophila is secreted by a novel process that requires the Dot/Icm transporter. *EMBO J* **20,** 5962-5970.
Navarro, M.V., De, N., Bae, N., Wang, Q. and Sondermann, H. (2009). Structural analysis of the GGDEF-EAL domain-containing c-di-GMP receptor FimX. *Structure* **17,** 1104-1116.
Navarro, M.V., Newell, P.D., Krasteva, P.V., Chatterjee, D., Madden, D.R., O'Toole, G.A. and Sondermann, H. (2011). Structural basis for c-di-GMP-mediated inside-out signaling controlling periplasmic proteolysis. *PLoS Biol* **9,** e1000588.
NCBIDatabase. http://www.ncbi.nlm.nih.gov. [WWW document]. URL
Neunuebel, M.R., Chen, Y., Gaspar, A.H., Backlund, P.S., Yergey, A. and Machner, M.P. (2011). De-AMPylation of the small GTPase Rab1 by the pathogen Legionella pneumophila. *Science* **333,** 453-456.
Neunuebel, M.R. and Golden, J.W. (2008). The Anabaena sp. strain PCC 7120 gene all2874 encodes a diguanylate cyclase and is required for normal heterocyst development under high-light growth conditions. *J Bacteriol* **190,** 6829-6836.
Neunuebel, M.R., Mohammadi, S., Jarnik, M. and Machner, M.P. (2012). Legionella pneumophila LidA affects nucleotide binding and activity of the host GTPase Rab1. *J Bacteriol* **194,** 1389-1400.

Nevo, O., Zusman, T., Rasis, M., Lifshitz, Z. and Segal, G. (2014). Identification of Legionella pneumophila Effectors Regulated by the LetAS-RsmYZ-CsrA Regulatory Cascade, Many of Which Modulate Vesicular Trafficking. *J Bacteriol* **196,** 681-692.

Newell, P.D., Boyd, C.D., Sondermann, H. and O'Toole, G.A. (2011a). A c-di-GMP effector system controls cell adhesion by inside-out signaling and surface protein cleavage. *PLoS Biol* **9,** e1000587.

Newell, P.D., Monds, R.D. and O'Toole, G.A. (2009). LapD is a bis-(3',5')-cyclic dimeric GMP-binding protein that regulates surface attachment by Pseudomonas fluorescens Pf0-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106,** 3461-3466.

Newell, P.D., Yoshioka, S., Hvorecny, K.L., Monds, R.D. and O'Toole, G.A. (2011b). Systematic analysis of diguanylate cyclases that promote biofilm formation by Pseudomonas fluorescens Pf0-1. *J Bacteriol* **193,** 4685-4698.

Newton, H.J., Sansom, F.M., Dao, J., Cazalet, C., Bruggemann, H., Albert-Weissenberger, C*., et al.* (2008). Significant role for ladC in initiation of Legionella pneumophila infection. *Infect Immun* **76,** 3075-3085.

Ninio, S., Zuckman-Cholon, D.M., Cambronne, E.D. and Roy, C.R. (2005). The Legionella IcmS-IcmW protein complex is important for Dot/Icm-mediated protein translocation. *Mol Microbiol* **55,** 912-926.

Norrander, J., Kempe, T. and Messing, J. (1983). Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene* **26,** 101-106.

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

Oesterlin, L.K., Goody, R.S. and Itzen, A. (2012). Posttranslational modifications of Rab proteins cause effective displacement of GDP dissociation inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109,** 5621-5626.

Ogasawara, H., Yamamoto, K. and Ishihama, A. (2010). Regulatory role of MlrA in transcription activation of csgD, the master regulator of biofilm formation in Escherichia coli. *FEMS Microbiol Lett* **312,** 160-168.

Ogata, H., La Scola, B., Audic, S., Renesto, P., Blanc, G., Robert, C*., et al.* (2006). Genome sequence of Rickettsia bellii illuminates the role of amoebae in gene exchanges between intracellular pathogens. *PLoS Genet* **2,** e76.

Ojha, A.K., Baughn, A.D., Sambandan, D., Hsu, T., Trivelli, X., Guerardel, Y*., et al.* (2008). Growth of Mycobacterium tuberculosis biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. *Mol Microbiol* **69,** 164-174.

OKABAYASHI, T., IDE, M. and YOSHIMOTO, A. (1963). Excretion of adenosine-3',5'-phosphate in the culture broth of Brevibacterium liquefaciens. *Arch Biochem Biophys* **100,** 158-159.

Okshevsky, M. and Meyer, R.L. (2013). The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. *Crit Rev Microbiol*.

Oppenheimer-Shaanan, Y., Wexselblatt, E., Katzhendler, J., Yavin, E. and Ben-Yehuda, S. (2011). c-di-AMP reports DNA integrity during sporulation in Bacillus subtilis. *EMBO Rep* **12,** 594-601.

Orsi, N. (2004). The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives. *Biometals* **17,** 189-196.

Ott, M., Messner, P., Heesemann, J., Marre, R. and Hacker, J. (1991). Temperature-dependent expression of flagella in Legionella. *J Gen Microbiol* **137,** 1955-1961.

Pan, X., Lührmann, A., Satoh, A., Laskowski-Arce, M.A. and Roy, C.R. (2008). Ankyrin repeat proteins comprise a diverse family of bacterial type IV effectors. *Science* **320,** 1651-1654.

Paul, K., Nieto, V., Carlquist, W.C., Blair, D.F. and Harshey, R.M. (2010). The c-di-GMP binding protein YcgR controls flagellar motor direction and speed to affect chemotaxis by a "backstop brake" mechanism. *Mol Cell* **38,** 128-139.

Paul, R., Abel, S., Wassmann, P., Beck, A., Heerklotz, H. and Jenal, U. (2007). Activation of the diguanylate cyclase PleD by phosphorylation-mediated dimerization. *J Biol Chem* **282,** 29170-29177.

Paul, R., Jaeger, T., Abel, S., Wiederkehr, I., Folcher, M., Biondi, E.G*., et al.* (2008). Allosteric regulation of histidine kinases by their cognate response regulator determines cell fate. *Cell* **133,** 452-461.

Paul, R., Weiser, S., Amiot, N.C., Chan, C., Schirmer, T., Giese, B. and Jenal, U. (2004). Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. *Genes Dev* **18,** 715-727.

Pei, J. and Grishin, N. (2001). GGDEF domain is homologous to adenylyl cyclase. *Proteins* **42,** 210-216.

Peracino, B., Balest, A. and Bozzaro, S. (2010). Phosphoinositides differentially regulate bacterial uptake and Nramp1-induced resistance to Legionella infection in Dictyostelium. *J Cell Sci* **123,** 4039-4051.

Perego, M. and Hoch, J.A. (1996). Protein aspartate phosphatases control the output of two-component signal transduction systems. *Trends Genet* **12,** 97-101.

Pesavento, C., Becker, G., Sommerfeldt, N., Possling, A., Tschowri, N., Mehlis, A. and Hengge, R. (2008). Inverse regulatory coordination of motility and curli-mediated adhesion in Escherichia coli. *Genes Dev* **22,** 2434-2446.

Petersen, E., Chaudhuri, P., Gourley, C., Harms, J. and Splitter, G. (2011). Brucella melitensis cyclic di-GMP phosphodiesterase BpdA controls expression of flagellar genes. *J Bacteriol* **193,** 5683-5691.

Petrova, O.E. and Sauer, K. (2012a). Dispersion by Pseudomonas aeruginosa requires an unusual posttranslational modification of BdlA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109,** 16690-16695.

Petrova, O.E. and Sauer, K. (2012b). PAS domain residues and prosthetic group involved in BdlA-dependent dispersion response by Pseudomonas aeruginosa biofilms. *J Bacteriol* **194,** 5817-5828.

Petters, T., Zhang, X., Nesper, J., Treuner-Lange, A., Gomez-Santos, N., Hoppert, M*., et al.* (2012). The orphan histidine protein kinase SgmT is a c-di-GMP receptor and regulates composition of the extracellular matrix together with the orphan DNA binding response regulator DigR in Myxococcus xanthus. *Mol Microbiol* **84,** 147-165.

Piao, Z., Sze, C.C., Barysheva, O., Iida, K. and Yoshida, S. (2006). Temperature-regulated formation of mycelial mat-like biofilms by Legionella pneumophila. *Appl Environ Microbiol* **72,** 1613-1622.

Piper, R.C. and Luzio, J.P. (2007). Ubiquitin-dependent sorting of integral membrane proteins for degradation in lysosomes. *Curr Opin Cell Biol* **19,** 459-465.

Pitre, C.A., Tanner, J.R., Patel, P. and Brassinga, A.K. (2013). Regulatory control of temporally expressed integration host factor (IHF) in Legionella pneumophila. *Microbiology* **159,** 475-492.

Plate, L. and Marletta, M.A. (2013). Nitric oxide-sensing H-NOX proteins govern bacterial communal behavior. *Trends Biochem Sci* **38,** 566-575.

Pope, C.D., Dhand, L. and Cianciotto, N.P. (1994). Random mutagenesis of Legionella pneumophila with mini-Tn10. *FEMS Microbiol Lett* **124,** 107-111.

Popov, V.L., Yu, X. and Walker, D.H. (2000). The 120 kDa outer membrane protein of Ehrlichia chaffeensis: preferential expression on dense-core cells and gene expression in Escherichia coli associated with attachment and entry. *Microb Pathog* **28,** 71-80.

Potrykus, K. and Cashel, M. (2008). (p)ppGpp: still magical? *Annu Rev Microbiol* **62,** 35-51.

Prashar, A., Bhatia, S., Tabatabaeiyazdi, Z., Duncan, C., Garduño, R.A., Tang, P*., et al.* (2012). Mechanism of invasion of lung epithelial cells by filamentous Legionella pneumophila. *Cell Microbiol* **14,** 1632-1655.

Pratt, J.T., Tamayo, R., Tischler, A.D. and Camilli, A. (2007). PilZ domain proteins bind cyclic diguanylate and regulate diverse processes in Vibrio cholerae. *J Biol Chem* **282,** 12860-12870.

Price, C.T., Al-Khodor, S., Al-Quadan, T., Santic, M., Habyarimana, F., Kalia, A. and Kwaik, Y.A. (2009). Molecular mimicry by an F-box effector of Legionella pneumophila hijacks a conserved polyubiquitination machinery within macrophages and protozoa. *PLoS Pathog* **5,** e1000704.

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

Price, C.T., Al-Quadan, T., Santic, M., Rosenshine, I. and Abu Kwaik, Y. (2011). Host proteasomal degradation generates amino acids essential for intracellular bacterial growth. *Science* **334,** 1553-1557.

Pultz, I.S., Christen, M., Kulasekara, H.D., Kennard, A., Kulasekara, B. and Miller, S.I. (2012). The response threshold of Salmonella PilZ domain proteins is determined by their binding affinities for c-di-GMP. *Mol Microbiol* **86,** 1424-1440.

Purevdorj-Gage, B., Costerton, W.J. and Stoodley, P. (2005). Phenotypic differentiation and seeding dispersal in non-mucoid and mucoid Pseudomonas aeruginosa biofilms. *Microbiology* **151,** 1569-1576.

Pécastaings, S., Bergé, M., Dubourg, K.M. and Roques, C. (2010). Sessile Legionella pneumophila is able to grow on surfaces and generate structured monospecies biofilms. *Biofouling* **26,** 809-819.

Pérez-Mendoza, D., Coulthurst, S.J., Humphris, S., Campbell, E., Welch, M., Toth, I.K. and Salmond, G.P. (2011). A multi-repeat adhesin of the phytopathogen, Pectobacterium atrosepticum, is secreted by a Type I pathway and is subject to complex regulation involving a non-canonical diguanylate cyclase. *Mol Microbiol* **82,** 719-733.

Qi, Y., Chuah, M.L., Dong, X., Xie, K., Luo, Z., Tang, K. and Liang, Z.X. (2011). Binding of cyclic diguanylate in the non-catalytic EAL domain of FimX induces a long-range conformational change. *J Biol Chem* **286,** 2910-2917.

Qi, Y., Rao, F., Luo, Z. and Liang, Z.X. (2009). A flavin cofactor-binding PAS domain regulates c-di-GMP synthesis in AxDGC2 from Acetobacter xylinum. *Biochemistry* **48,** 10275-10285.

Quon, K.C., Yang, B., Domian, I.J., Shapiro, L. and Marczynski, G.T. (1998). Negative control of bacterial DNA replication by a cell cycle regulatory protein that binds at the chromosome origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95,** 120-125.

Ragaz, C., Pietsch, H., Urwyler, S., Tiaden, A., Weber, S.S. and Hilbi, H. (2008). The Legionella pneumophila phosphatidylinositol-4 phosphate-binding type IV substrate SidC recruits endoplasmic reticulum vesicles to a replication-permissive vacuole. *Cell Microbiol* **10,** 2416-2433.

RALL, T.W. and SUTHERLAND, E.W. (1958). Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. *J Biol Chem* **232,** 1065-1076.

Ramelot, T.A., Yee, A., Cort, J.R., Semesi, A., Arrowsmith, C.H. and Kennedy, M.A. (2007). NMR structure and binding studies confirm that PA4608 from Pseudomonas aeruginosa is a PilZ domain and a c-di-GMP binding protein. *Proteins* **66,** 266-271.

Rao, F., Qi, Y., Chong, H.S., Kotaka, M., Li, B., Li, J*., et al.* (2009). The functional role of a conserved loop in EAL domain-based cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase. *J Bacteriol* **191,** 4722-4731.

Rao, F., Yang, Y., Qi, Y. and Liang, Z.X. (2008). Catalytic mechanism of cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase: a study of the EAL domain-containing RocR from Pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol* **190,** 3622-3631.

Rashid, M.H., Rajanna, C., Ali, A. and Karaolis, D.K. (2003). Identification of genes involved in the switch between the smooth and rugose phenotypes of Vibrio cholerae. *FEMS Microbiol Lett* **227,** 113-119.

Rasis, M. and Segal, G. (2009). The LetA-RsmYZ-CsrA regulatory cascade, together with RpoS and PmrA, post-transcriptionally regulates stationary phase activation of Legionella pneumophila Icm/Dot effectors. *Mol Microbiol* **72,** 995-1010.

Rasmussen, H., Jensen, P., Lake, W. and Goodman, D.B. (1976). Calcium ion as second messenger. *Clin Endocrinol (Oxf)* **5 Suppl,** 11S-27S.

Raterman, E.L., Shapiro, D.D., Stevens, D.J., Schwartz, K.J. and Welch, R.A. (2013). Genetic analysis of the role of yfiR in the ability of Escherichia coli CFT073 to control cellular cyclic dimeric GMP levels and to persist in the urinary tract. *Infect Immun* **81,** 3089-3098.

Raychaudhury, S., Farelli, J.D., Montminy, T.P., Matthews, M., Ménétret, J.F., Duménil, G.*, et al.* (2009). Structure and function of interacting IcmR-IcmQ domains from a type IVb secretion system in Legionella pneumophila. *Structure* **17,** 590-601.

Renier, S., Chagnot, C., Deschamps, J., Caccia, N., Szlavik, J., Joyce, S.A.*, et al.* (2013). Inactivation of the SecA2 protein export pathway in Listeria monocytogenes promotes cell aggregation, impacts biofilm architecture and induces biofilm formation in environmental condition. *Environ Microbiol*.

Riedl, S.J. and Salvesen, G.S. (2007). The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8,** 405-413.

Rikihisa, Y. (1991). The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases. *Clin Microbiol Rev* **4,** 286-308.

Robey, M. and Cianciotto, N.P. (2002). Legionella pneumophila feoAB promotes ferrous iron uptake and intracellular infection. *Infect Immun* **70,** 5659-5669.

Rogers, J., Dowsett, A.B., Dennis, P.J., Lee, J.V. and Keevil, C.W. (1994). Influence of Plumbing Materials on Biofilm Formation and Growth of Legionella pneumophila in Potable Water Systems. *Appl Environ Microbiol* **60,** 1842-1851.

Rolando, M., Sanulli, S., Rusniok, C., Gomez-Valero, L., Bertholet, C., Sahr, T.*, et al.* (2013). Legionella pneumophila effector RomA uniquely modifies host chromatin to repress gene expression and promote intracellular bacterial replication. *Cell Host Microbe* **13,** 395-405.

Rosen, D.A., Hooton, T.M., Stamm, W.E., Humphrey, P.A. and Hultgren, S.J. (2007). Detection of intracellular bacterial communities in human urinary tract infection. *PLoS Med* **4,** e329.

Ross, P., Mayer, R. and Benziman, M. (1991). Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol Rev* **55,** 35-58.

Ross, P., Weinhouse, H., Aloni, Y., Michaeli, D., Weinberger-Ohana, P., Mayer, R.*, et al.* (1987). Regulation of cellulose synthesis in Acetobacter xylinum by cyclic diguanylic acid. *Nature* **325,** 279-281.

Rothmeier, E., Pfaffinger, G., Hoffmann, C., Harrison, C.F., Grabmayr, H., Repnik, U.*, et al.* (2013). Activation of Ran GTPase by a Legionella effector promotes microtubule polymerization, pathogen vacuole motility and infection. *PLoS Pathog* **9,** e1003598.

Rowbotham, T.J. (1980). Preliminary report on the pathogenicity of Legionella pneumophila for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol* **33,** 1179-1183.

Roy, A.B., Petrova, O.E. and Sauer, K. (2012). The phosphodiesterase DipA (PA5017) is essential for Pseudomonas aeruginosa biofilm dispersion. *J Bacteriol* **194,** 2904-2915.

Roy, C.R., Berger, K.H. and Isberg, R.R. (1998). Legionella pneumophila DotA protein is required for early phagosome trafficking decisions that occur within minutes of bacterial uptake. *Mol Microbiol* **28,** 663-674.

Rozengurt, E., Rey, O. and Waldron, R.T. (2005). Protein kinase D signaling. *J Biol Chem* **280,** 13205-13208.

Russell, M.H., Bible, A.N., Fang, X., Gooding, J.R., Campagna, S.R., Gomelsky, M. and Alexandre, G. (2013). Integration of the second messenger c-di-GMP into the chemotactic signaling pathway. *MBio* **4,** e00001-00013.

Ryan, R.P. (2013). Cyclic di-GMP signalling and the regulation of bacterial virulence. *Microbiology* **159,** 1286-1297.

Ryan, R.P. and Dow, J.M. (2010). Intermolecular interactions between HD-GYP and GGDEF domain proteins mediate virulence-related signal transduction in Xanthomonas campestris. *Virulence* **1,** 404-408.

Ryan, R.P., Fouhy, Y., Lucey, J.F., Crossman, L.C., Spiro, S., He, Y.W.*, et al.* (2006). Cell-cell signaling in Xanthomonas campestris involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103,** 6712-6717.

Ryan, R.P., McCarthy, Y., Kiely, P.A., O'Connor, R., Farah, C.S., Armitage, J.P. and Dow, J.M. (2012). Dynamic complex formation between HD-GYP, GGDEF and PilZ domain proteins regulates motility in Xanthomonas campestris. *Mol Microbiol* **86,** 557-567.

Ryjenkov, D.A., Simm, R., Römling, U. and Gomelsky, M. (2006). The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: the PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. *J Biol Chem* **281,** 30310-30314.

Ryjenkov, D.A., Tarutina, M., Moskvin, O.V. and Gomelsky, M. (2005). Cyclic diguanylate is a ubiquitous signaling molecule in bacteria: insights into biochemistry of the GGDEF protein domain. *J Bacteriol* **187,** 1792-1798.

Römling, U. and Amikam, D. (2006). Cyclic di-GMP as a second messenger. *Curr Opin Microbiol* **9,** 218-228.

Römling, U., Bian, Z., Hammar, M., Sierralta, W.D. and Normark, S. (1998). Curli fibers are highly conserved between Salmonella typhimurium and Escherichia coli with respect to operon structure and regulation. *J Bacteriol* **180,** 722-731.

Römling, U., Galperin, M.Y. and Gomelsky, M. (2013). Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol Mol Biol Rev* **77,** 1-52.

Römling, U., Gomelsky, M. and Galperin, M.Y. (2005). C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. *Mol Microbiol* **57,** 629-639.

Sahr, T., Brüggemann, H., Jules, M., Lomma, M., Albert-Weissenberger, C., Cazalet, C. and Buchrieser, C. (2009). Two small ncRNAs jointly govern virulence and transmission in Legionella pneumophila. *Mol Microbiol* **72,** 741-762.

Sahr, T., Rusniok, C., Dervins-Ravault, D., Sismeiro, O., Coppee, J.Y. and Buchrieser, C. (2012). Deep sequencing defines the transcriptional map of L. pneumophila and identifies growth phase-dependent regulated ncRNAs implicated in virulence. *RNA Biol* **9,** 503-519.

Sandkvist, M. (2001). Biology of type II secretion. *Mol Microbiol* **40,** 271-283.

Sandkvist, M., Michel, L.O., Hough, L.P., Morales, V.M., Bagdasarian, M., Koomey, M. and DiRita, V.J. (1997). General secretion pathway (eps) genes required for toxin secretion and outer membrane biogenesis in Vibrio cholerae. *J Bacteriol* **179,** 6994-7003.

Sauer, J.D., Bachman, M.A. and Swanson, M.S. (2005). The phagosomal transporter A couples threonine acquisition to differentiation and replication of Legionella pneumophila in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102,** 9924-9929.

Sauer, K., Camper, A.K., Ehrlich, G.D., Costerton, J.W. and Davies, D.G. (2002). Pseudomonas aeruginosa displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* **184,** 1140-1154.

Savakis, P., De Causmaecker, S., Angerer, V., Ruppert, U., Anders, K., Essen, L.O. and Wilde, A. (2012). Light-induced alteration of c-di-GMP level controls motility of Synechocystis sp. PCC 6803. *Mol Microbiol* **85,** 239-251.

Schirmer, T. and Jenal, U. (2009). Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling. *Nat Rev Microbiol* **7,** 724-735.

Schmidt, A.J., Ryjenkov, D.A. and Gomelsky, M. (2005). The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: enzymatically active and inactive EAL domains. *J Bacteriol* **187,** 4774-4781.

Schmitz-Esser, S., Tischler, P., Arnold, R., Montanaro, J., Wagner, M., Rattei, T. and Horn, M. (2010). The genome of the amoeba symbiont "Candidatus Amoebophilus asiaticus" reveals common mechanisms for host cell interaction among amoeba-associated bacteria. *J Bacteriol* **192,** 1045-1057.

Schnappinger, D., Ehrt, S., Voskuil, M.I., Liu, Y., Mangan, J.A., Monahan, I.M.*, et al.* (2003). Transcriptional Adaptation of Mycobacterium tuberculosis within Macrophages: Insights into the Phagosomal Environment. *J Exp Med* **198,** 693-704.

Schoebel, S., Blankenfeldt, W., Goody, R.S. and Itzen, A. (2010). High-affinity binding of phosphatidylinositol 4-phosphate by Legionella pneumophila DrrA. *EMBO Rep* **11,** 598-604.

Schoebel, S., Cichy, A.L., Goody, R.S. and Itzen, A. (2011). Protein LidA from Legionella is a Rab GTPase supereffector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108,** 17945-17950.

Schoebel, S., Oesterlin, L.K., Blankenfeldt, W., Goody, R.S. and Itzen, A. (2009). RabGDI displacement by DrrA from Legionella is a consequence of its guanine nucleotide exchange activity. *Mol Cell* **36,** 1060-1072.

Schroeder, G.N., Petty, N.K., Mousnier, A., Harding, C.R., Vogrin, A.J., Wee, B.*, et al.* (2010). Legionella pneumophila strain 130b possesses a unique combination of type IV secretion systems and novel Dot/Icm secretion system effector proteins. *J Bacteriol* **192,** 6001-6016.

Schulz, H.N. and Jorgensen, B.B. (2001). Big bacteria. *Annu Rev Microbiol* **55,** 105-137.

Segal, G., Russo, J.J. and Shuman, H.A. (1999a). Relationships between a new type IV secretion system and the icm/dot virulence system of Legionella pneumophila. *Mol Microbiol* **34,** 799-809.

Segal, G. and Shuman, H.A. (1997). Characterization of a new region required for macrophage killing by Legionella pneumophila. *Infect Immun* **65,** 5057-5066.

Segal, G. and Shuman, H.A. (1999b). Legionella pneumophila utilizes the same genes to multiply within Acanthamoeba castellanii and human macrophages. *Infect Immun* **67,** 2117-2124.

Serganov, A. and Nudler, E. (2013). A decade of riboswitches. *Cell* **152,** 17-24.

Seshasayee, A.S., Fraser, G.M. and Luscombe, N.M. (2010). Comparative genomics of cyclic-di-GMP signalling in bacteria: post-translational regulation and catalytic activity. *Nucleic Acids Res* **38,** 5970-5981.

Sexton, J.A., Miller, J.L., Yoneda, A., Kehl-Fie, T.E. and Vogel, J.P. (2004a). Legionella pneumophila DotU and IcmF are required for stability of the Dot/Icm complex. *Infect Immun* **72,** 5983-5992.

Sexton, J.A., Pinkner, J.S., Roth, R., Heuser, J.E., Hultgren, S.J. and Vogel, J.P. (2004b). The Legionella pneumophila PilT homologue DotB exhibits ATPase activity that is critical for intracellular growth. *J Bacteriol* **186,** 1658-1666.

Sexton, J.A., Yeo, H.J. and Vogel, J.P. (2005). Genetic analysis of the Legionella pneumophila DotB ATPase reveals a role in type IV secretion system protein export. *Mol Microbiol* **57,** 70-84.

Sherman, D.R., Voskuil, M., Schnappinger, D., Liao, R., Harrell, M.I. and Schoolnik, G.K. (2001). Regulation of the Mycobacterium tuberculosis hypoxic response gene encoding alpha - crystallin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98,** 7534-7539.

Shikuma, N.J., Fong, J.C. and Yildiz, F.H. (2012). Cellular levels and binding of c-di-GMP control subcellular localization and activity of the Vibrio cholerae transcriptional regulator VpsT. *PLoS Pathog* **8,** e1002719.

Shimizu, S., Narita, M. and Tsujimoto, Y. (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* **399,** 483-487.

Shin, J.S., Ryu, K.S., Ko, J., Lee, A. and Choi, B.S. (2011). Structural characterization reveals that a PilZ domain protein undergoes substantial conformational change upon binding to cyclic dimeric guanosine monophosphate. *Protein Sci* **20,** 270-277.

Shohdy, N., Efe, J.A., Emr, S.D. and Shuman, H.A. (2005). Pathogen effector protein screening in yeast identifies Legionella factors that interfere with membrane trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102,** 4866-4871.

Silveira, T.N. and Zamboni, D.S. (2010). Pore formation triggered by Legionella spp. is an Nlrc4 inflammasome-dependent host cell response that precedes pyroptosis. *Infect Immun* **78,** 1403-1413.

Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimtz, M. and Römling, U. (2004). GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol Microbiol* **53,** 1123-1134.

Simon, S., Wagner, M.A., Rothmeier, E., Müller-Taubenberger, A. and Hilbi, H. (2014). Icm/Dot-dependent inhibition of phagocyte migration by Legionella is antagonized by a translocated Ran GTPase activator. *Cell Microbiol*.

Sinha, S.C. and Sprang, S.R. (2006). Structures, mechanism, regulation and evolution of class III nucleotidyl cyclases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **157,** 105-140.

Skerker, J.M. and Berg, H.C. (2001). Direct observation of extension and retraction of type IV pili. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98,** 6901-6904.
Skerker, J.M., Prasol, M.S., Perchuk, B.S., Biondi, E.G. and Laub, M.T. (2005). Two-component signal transduction pathways regulating growth and cell cycle progression in a bacterium: a system-level analysis. *PLoS Biol* **3,** e334.
Smith, D.B. and Johnson, K.S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67,** 31-40.
Smith, K.D., Lipchock, S.V., Ames, T.D., Wang, J., Breaker, R.R. and Strobel, S.A. (2009). Structural basis of ligand binding by a c-di-GMP riboswitch. *Nat Struct Mol Biol* **16,** 1218-1223.
Smith, K.D., Lipchock, S.V., Livingston, A.L., Shanahan, C.A. and Strobel, S.A. (2010). Structural and biochemical determinants of ligand binding by the c-di-GMP riboswitch. *Biochemistry* **49,** 7351-7359.
Smith, K.D., Shanahan, C.A., Moore, E.L., Simon, A.C. and Strobel, S.A. (2011). Structural basis of differential ligand recognition by two classes of bis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate-binding riboswitches. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108,** 7757-7762.
Sockett, R.E. and Lambert, C. (2004). Bdellovibrio as therapeutic agents: a predatory renaissance? *Nat Rev Microbiol* **2,** 669-675.
Spirig, T., Tiaden, A., Kiefer, P., Buchrieser, C., Vorholt, J.A. and Hilbi, H. (2008). The Legionella autoinducer synthase LqsA produces an alpha-hydroxyketone signaling molecule. *J Biol Chem* **283,** 18113-18123.
Srivastava, D., Harris, R.C. and Waters, C.M. (2011). Integration of cyclic di-GMP and quorum sensing in the control of vpsT and aphA in Vibrio cholerae. *J Bacteriol* **193,** 6331-6341.
Srivastava, D., Hsieh, M.L., Khataokar, A., Neiditch, M.B. and Waters, C.M. (2013). Cyclic di-GMP inhibits Vibrio cholerae motility by repressing induction of transcription and inducing extracellular polysaccharide production. *Mol Microbiol* **90,** 1262-1276.
Srivastava, D. and Waters, C.M. (2012). A tangled web: regulatory connections between quorum sensing and cyclic Di-GMP. *J Bacteriol* **194,** 4485-4493.
Starkey, M., Hickman, J.H., Ma, L., Zhang, N., De Long, S., Hinz, A*., et al.* (2009). Pseudomonas aeruginosa rugose small-colony variants have adaptations that likely promote persistence in the cystic fibrosis lung. *J Bacteriol* **191,** 3492-3503.
Steinert, M., Heuner, K., Buchrieser, C., Albert-Weissenberger, C. and Glöckner, G. (2007). Legionella pathogenicity: genome structure, regulatory networks and the host cell response. *Int J Med Microbiol* **297,** 577-587.
Stelitano, V., Giardina, G., Paiardini, A., Castiglione, N., Cutruzzolà, F. and Rinaldo, S. (2013). C-di-GMP hydrolysis by Pseudomonas aeruginosa HD-GYP phosphodiesterases: analysis of the reaction mechanism and novel roles for pGpG. *PLoS One* **8,** e74920.
Stewart, C.R., Burnside, D.M. and Cianciotto, N.P. (2011). The surfactant of Legionella pneumophila Is secreted in a TolC-dependent manner and is antagonistic toward other Legionella species. *J Bacteriol* **193,** 5971-5984.
Stewart, C.R., Muthye, V. and Cianciotto, N.P. (2012). Legionella pneumophila persists within biofilms formed by Klebsiella pneumoniae, Flavobacterium sp., and Pseudomonas fluorescens under dynamic flow conditions. *PLoS One* **7,** e50560.
Stewart, C.R., Rossier, O. and Cianciotto, 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.
Stock, A.M., Robinson, V.L. and Goudreau, P.N. (2000). Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* **69,** 183-215.
Stone, B.J. and Abu Kwaik, Y. (1998). Expression of multiple pili by Legionella pneumophila: identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells. *Infect Immun* **66,** 1768-1775.

Storey, M.V., Långmark, J., Ashbolt, N.J. and Stenström, T.A. (2004). The fate of legionellae within distribution pipe biofilms: measurement of their persistence, inactivation and detachment. *Water Sci Technol* **49,** 269-275.

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

Sudarsan, N., Lee, E.R., Weinberg, Z., Moy, R.H., Kim, J.N., Link, K.H. and Breaker, R.R. (2008). Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP. *Science* **321,** 411-413.

Suh, H.Y., Lee, D.W., Lee, K.H., Ku, B., Choi, S.J., Woo, J.S*., et al.* (2010). Structural insights into the dual nucleotide exchange and GDI displacement activity of SidM/DrrA. *EMBO J* **29,** 496-504.

Sun, E.W., Wagner, M.L., Maize, A., Kemler, D., Garland-Kuntz, E., Xu, L*., et al.* (2013). Legionella pneumophila infection of Drosophila S2 cells induces only minor changes in mitochondrial dynamics. *PLoS One* **8,** e62972.

Sundriyal, A., Massa, C., Samoray, D., Zehender, F., Sharpe, T., Jenal, U. and Schirmer, T. (2014). Inherent regulation of EAL domain-catalyzed hydrolysis of second messenger c-di-GMP. *J Biol Chem*.

Sundström, C. and Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer* **17,** 565-577.

Sutherland, M.C., Binder, K.A., Cualing, P.Y. and Vogel, J.P. (2013). Reassessing the role of DotF in the Legionella pneumophila type IV secretion system. *PLoS One* **8,** e65529.

Sutherland, M.C., Nguyen, T.L., Tseng, V. and Vogel, J.P. (2012). The Legionella IcmSW complex directly interacts with DotL to mediate translocation of adaptor-dependent substrates. *PLoS Pathog* **8,** e1002910.

Svitil, A.L., Cashel, M. and Zyskind, J.W. (1993). Guanosine tetraphosphate inhibits protein synthesis in vivo. A possible protective mechanism for starvation stress in Escherichia coli. *J Biol Chem* **268,** 2307-2311.

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

Tagliabue, L., Antoniani, D., Maciag, A., Bocci, P., Raffaelli, N. and Landini, P. (2010a). The diguanylate cyclase YddV controls production of the exopolysaccharide poly-N-acetylglucosamine (PNAG) through regulation of the PNAG biosynthetic pgaABCD operon. *Microbiology* **156,** 2901-2911.

Tagliabue, L., Maciag, A., Antoniani, D. and Landini, P. (2010b). The yddV-dos operon controls biofilm formation through the regulation of genes encoding curli fibers' subunits in aerobically growing Escherichia coli. *FEMS Immunol Med Microbiol* **59,** 477-484.

Tal, R., Wong, H.C., Calhoon, R., Gelfand, D., Fear, A.L., Volman, G*., et al.* (1998). Three cdg operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in Acetobacter xylinum: genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. *J Bacteriol* **180,** 4416-4425.

Tamayo, R., Schild, S., Pratt, J.T. and Camilli, A. (2008). Role of cyclic Di-GMP during el tor biotype Vibrio cholerae infection: characterization of the in vivo-induced cyclic Di-GMP phosphodiesterase CdpA. *Infect Immun* **76,** 1617-1627.

Tamayo, R., Tischler, A.D. and Camilli, A. (2005). The EAL domain protein VieA is a cyclic diguanylate phosphodiesterase. *J Biol Chem* **280,** 33324-33330.

Tan, H., West, J.A., Ramsay, J.P., Monson, R.E., Griffin, J.L., Toth, I.K. and Salmond, G.P. (2014). Comprehensive overexpression analysis of cyclic-di-GMP signalling proteins in the phytopathogen Pectobacterium atrosepticum reveals diverse effects on motility and virulence phenotypes. *Microbiology*.

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

Taneja, N.K., Dhingra, S., Mittal, A., Naresh, M. and Tyagi, J.S. (2010). Mycobacterium tuberculosis transcriptional adaptation, growth arrest and dormancy phenotype development is triggered by vitamin C. *PLoS One* **5,** e10860.

Tao, F., He, Y.W., Wu, D.H., Swarup, S. and Zhang, L.H. (2010). The cyclic nucleotide monophosphate domain of Xanthomonas campestris global regulator Clp defines a new class of cyclic di-GMP effectors. *J Bacteriol* **192,** 1020-1029.

Tarutina, M., Ryjenkov, D.A. and Gomelsky, M. (2006). An unorthodox bacteriophytochrome from Rhodobacter sphaeroides involved in turnover of the second messenger c-di-GMP. *J Biol Chem* **281,** 34751-34758.

Taylor, B.L. and Zhulin, I.B. (1999). PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev* **63,** 479-506.

Taylor, M., Ross, K. and Bentham, R. (2009). Legionella, protozoa, and biofilms: interactions within complex microbial systems. *Microb Ecol* **58,** 538-547.

Tchigvintsev, A., Xu, X., Singer, A., Chang, C., Brown, G., Proudfoot, M*., et al.* (2010). Structural insight into the mechanism of c-di-GMP hydrolysis by EAL domain phosphodiesterases. *J Mol Biol* **402,** 524-538.

Theimer, C.A., Blois, C.A. and Feigon, J. (2005). Structure of the human telomerase RNA pseudoknot reveals conserved tertiary interactions essential for function. *Mol Cell* **17,** 671-682.

Thomas, V., Bouchez, T., Nicolas, V., Robert, S., Loret, J.F. and Lévi, Y. (2004). Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in Legionella persistence. *J Appl Microbiol* **97,** 950-963.

Thompson, A., Rolfe, M.D., Lucchini, S., Schwerk, P., Hinton, J.C. and Tedin, K. (2006). The bacterial signal molecule, ppGpp, mediates the environmental regulation of both the invasion and intracellular virulence gene programs of Salmonella. *J Biol Chem* **281,** 30112-30121.

Tiaden, A., Spirig, T., Carranza, P., Brüggemann, H., Riedel, K., Eberl, L*., et al.* (2008). Synergistic contribution of the Legionella pneumophila lqs genes to pathogen-host interactions. *J Bacteriol* **190,** 7532-7547.

Tiaden, A., Spirig, T., Sahr, T., Wälti, M.A., Boucke, K., Buchrieser, C. and Hilbi, H. (2010). The autoinducer synthase LqsA and putative sensor kinase LqsS regulate phagocyte interactions, extracellular filaments and a genomic island of Legionella pneumophila. *Environ Microbiol* **12,** 1243-1259.

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

Tischler, A.D. and Camilli, A. (2004). Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates Vibrio cholerae biofilm formation. *Mol Microbiol* **53,** 857-869.

Tischler, A.D. and Camilli, A. (2005). Cyclic diguanylate regulates Vibrio cholerae virulence gene expression. *Infect Immun* **73,** 5873-5882.

Toyohara, A. and Inaba, K. (1989). Transport of phagosomes in mouse peritoneal macrophages. *J Cell Sci* **94 (Pt 1),** 143-153.

Tran, N.T., Den Hengst, C.D., Gomez-Escribano, J.P. and Buttner, M.J. (2011). Identification and characterization of CdgB, a diguanylate cyclase involved in developmental processes in Streptomyces coelicolor. *J Bacteriol* **193,** 3100-3108.

Tseng, T.T., Tyler, B.M. and Setubal, J.C. (2009). Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiol* **9 Suppl 1,** S2.

Tuckerman, J.R., Gonzalez, G. and Gilles-Gonzalez, M.A. (2011). Cyclic di-GMP activation of polynucleotide phosphorylase signal-dependent RNA processing. *J Mol Biol* **407,** 633-639.

Tuckerman, J.R., Gonzalez, G., Sousa, E.H., Wan, X., Saito, J.A., Alam, M. and Gilles-Gonzalez, M.A. (2009). An oxygen-sensing diguanylate cyclase and phosphodiesterase couple for c-di-GMP control. *Biochemistry* **48,** 9764-9774.

Ueda, A. and Wood, T.K. (2010). Tyrosine Phosphatase TpbA of Pseudomonas aeruginosa Controls Extracellular DNA via Cyclic Diguanylic Acid Concentrations. *Environ Microbiol* **2,** 449-455.

Ulrich, L.E. and Zhulin, I.B. (2010). The MiST2 database: a comprehensive genomics resource on microbial signal transduction. *Nucleic Acids Res* **38,** D401-407.

Unger, C. and Lück, C. (2012). Inhibitory effects of silver ions on Legionella pneumophila grown on agar, intracellular in Acanthamoeba castellanii and in artificial biofilms. *J Appl Microbiol* **112,** 1212-1219.
Valle, J., Solano, C., García, B., Toledo-Arana, A. and Lasa, I. (2013). Biofilm switch and immune response determinants at early stages of infection. *Trends Microbiol* **21,** 364-371.
Valster, R.M., Wullings, B.A., van den Berg, R. and van der Kooij, D. (2011). Relationships between free-living protozoa, cultivable Legionella spp., and water quality characteristics in three drinking water supplies in the Caribbean. *Appl Environ Microbiol* **77,** 7321-7328.
Valster, R.M., Wullings, B.A. and van der Kooij, D. (2010). Detection of protozoan hosts for Legionella pneumophila in engineered water systems by using a biofilm batch test. *Appl Environ Microbiol* **76,** 7144-7153.
van der Biezen, E.A., Sun, J., Coleman, M.J., Bibb, M.J. and Jones, J.D. (2000). Arabidopsis RelA/SpoT homologs implicate (p)ppGpp in plant signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97,** 3747-3752.
van der Kooij, D., Veenendaal, H.R. and Scheffer, W.J. (2005). Biofilm formation and multiplication of Legionella in a model warm water system with pipes of copper, stainless steel and cross-linked polyethylene. *Water Res* **39,** 2789-2798.
van Schaik, E.J., Chen, C., Mertens, K., Weber, M.M. and Samuel, J.E. (2013). Molecular pathogenesis of the obligate intracellular bacterium Coxiella burnetii. *Nat Rev Microbiol* **11,** 561-573.
Vandersmissen, L., De Buck, E., Saels, V., Coil, D.A. and Anné, J. (2010). A Legionella pneumophila collagen-like protein encoded by a gene with a variable number of tandem repeats is involved in the adherence and invasion of host cells. *FEMS Microbiol Lett* **306,** 168-176.
VanRheenen, S.M., Duménil, G. and Isberg, R.R. (2004). IcmF and DotU are required for optimal effector translocation and trafficking of the Legionella pneumophila vacuole. *Infect Immun* **72,** 5972-5982.
Venkataraman, C., Haack, B.J., Bondada, S. and Abu Kwaik, Y. (1997). Identification of a Gal/GalNAc lectin in the protozoan Hartmannella vermiformis as a potential receptor for attachment and invasion by the Legionnaires' disease bacterium. *J Exp Med* **186,** 537-547.
Vincent, C.D., Friedman, J.R., Jeong, K.C., Buford, E.C., Miller, J.L. and Vogel, J.P. (2006a). Identification of the core transmembrane complex of the Legionella Dot/Icm type IV secretion system. *Mol Microbiol* **62,** 1278-1291.
Vincent, C.D., Friedman, J.R., Jeong, K.C., Sutherland, M.C. and Vogel, J.P. (2012). Identification of the DotL coupling protein subcomplex of the Legionella Dot/Icm type IV secretion system. *Mol Microbiol* **85,** 378-391.
Vincent, C.D. and Vogel, J.P. (2006b). The Legionella pneumophila IcmS-LvgA protein complex is important for Dot/Icm-dependent intracellular growth. *Mol Microbiol* **61,** 596-613.
Viner, R., Chetrit, D., Ehrlich, M. and Segal, G. (2012). Identification of two Legionella pneumophila effectors that manipulate host phospholipids biosynthesis. *PLoS Pathog* **8,** e1002988.
Vogel, J.P., Andrews, H.L., Wong, S.K. and Isberg, R.R. (1998). Conjugative transfer by the virulence system of Legionella pneumophila. *Science* **279,** 873-876.
Voskuil, M.I., Schnappinger, D., Visconti, K.C., Harrell, M.I., Dolganov, G.M., Sherman, D.R. and Schoolnik, G.K. (2003). Inhibition of respiration by nitric oxide induces a Mycobacterium tuberculosis dormancy program. *J Exp Med* **198,** 705-713.
Wadowsky, R.M. and Yee, R.B. (1983). Satellite growth of Legionella pneumophila with an environmental isolate of Flavobacterium breve. *Appl Environ Microbiol* **46,** 1447-1449.
Walker, T., Klasson, L., Sebaihia, M., Sanders, M.J., Thomson, N.R., Parkhill, J. and Sinkins, S.P. (2007). Ankyrin repeat domain-encoding genes in the wPip strain of Wolbachia from the Culex pipiens group. *BMC Biol* **5,** 39.
Wall, D. and Kaiser, D. (1999). Type IV pili and cell motility. *Mol Microbiol* **32,** 1-10.
Wang, H., Ayala, J.C., Benitez, J.A. and Silva, A.J. (2014). The LuxR-type regulator VpsT negatively controls the transcription of rpoS, encoding the general stress response regulator, in Vibrio cholerae biofilms. *J Bacteriol* **196,** 1020-1030.

Wang, L.H., He, Y., Gao, Y., Wu, J.E., Dong, Y.H., He, C.*, et al.* (2004a). A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. *Mol Microbiol* **51,** 903-912.
Wang, M., Shakhatreh, M.A., James, D., Liang, S., Nishiyama, S., Yoshimura, F.*, et al.* (2007). Fimbrial proteins of porphyromonas gingivalis mediate in vivo virulence and exploit TLR2 and complement receptor 3 to persist in macrophages. *J Immunol* **179,** 2349-2358.
Wang, X., Preston, J.F. and Romeo, T. (2004b). The pgaABCD locus of Escherichia coli promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. *J Bacteriol* **186,** 2724-2734.
Wang, Z.C., Huang, C.J., Huang, Y.J., Wu, C.C. and Peng, H.L. (2013). FimK regulation on the expression of type 1 fimbriae in Klebsiella pneumoniae CG43S3. *Microbiology* **159,** 1402-1415.
Wassmann, P., Chan, C., Paul, R., Beck, A., Heerklotz, H., Jenal, U. and Schirmer, T. (2007). Structure of BeF3- -modified response regulator PleD: implications for diguanylate cyclase activation, catalysis, and feedback inhibition. *Structure* **15,** 915-927.
Watarai, M., Derre, I., Kirby, J., Growney, J.D., Dietrich, W.F. and Isberg, R.R. (2001). Legionella pneumophila is internalized by a macropinocytotic uptake pathway controlled by the Dot/Icm system and the mouse Lgn1 locus. *J Exp Med* **194,** 1081-1096.
Waters, C.M., Lu, W., Rabinowitz, J.D. and Bassler, B.L. (2008). Quorum sensing controls biofilm formation in Vibrio cholerae through modulation of cyclic di-GMP levels and repression of vpsT. *J Bacteriol* **190,** 2527-2536.
Wayne, L.G. and Hayes, L.G. (1996). An in vitro model for sequential study of shiftdown of Mycobacterium tuberculosis through two stages of nonreplicating persistence. *Infect Immun* **64,** 2062-2069.
Weber, H., Pesavento, C., Possling, A., Tischendorf, G. and Hengge, R. (2006). Cyclic-di-GMP-mediated signalling within the sigma network of Escherichia coli. *Mol Microbiol* **62,** 1014-1034.
Weber, S.S., Ragaz, C. and Hilbi, H. (2009). The inositol polyphosphate 5-phosphatase OCRL1 restricts intracellular growth of Legionella, localizes to the replicative vacuole and binds to the bacterial effector LpnE. *Cell Microbiol* **11,** 442-460.
WebofScienceDatabase. http://apps.webofknowledge.com.gate1.inist.fr. [WWW document]. URL
Weinberg, Z., Barrick, J.E., Yao, Z., Roth, A., Kim, J.N., Gore, J.*, et al.* (2007). Identification of 22 candidate structured RNAs in bacteria using the CMfinder comparative genomics pipeline. *Nucleic Acids Res* **35,** 4809-4819.
Weinhouse, H., Sapir, S., Amikam, D., Shilo, Y., Volman, G., Ohana, P. and Benziman, M. (1997). c-di-GMP-binding protein, a new factor regulating cellulose synthesis in Acetobacter xylinum. *FEBS Lett* **416,** 207-211.
Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C. and Mattick, J.S. (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* **295,** 1487.
Whitney, J.C., Colvin, K.M., Marmont, L.S., Robinson, H., Parsek, M.R. and Howell, P.L. (2012). Structure of the cytoplasmic region of PelD, a degenerate diguanylate cyclase receptor that regulates exopolysaccharide production in Pseudomonas aeruginosa. *J Biol Chem* **287,** 23582-23593.
Wiater, L.A., Sadosky, A.B. and Shuman, H.A. (1994). Mutagenesis of Legionella pneumophila using Tn903 dlllacZ: identification of a growth-phase-regulated pigmentation gene. *Mol Microbiol* **11,** 641-653.
Wilde, A., Fiedler, B. and Börner, T. (2002). The cyanobacterial phytochrome Cph2 inhibits phototaxis towards blue light. *Mol Microbiol* **44,** 981-988.
Wilksch, J.J., Yang, J., Clements, A., Gabbe, J.L., Short, K.R., Cao, H.*, et al.* (2011). MrkH, a novel c-di-GMP-dependent transcriptional activator, controls Klebsiella pneumoniae biofilm formation by regulating type 3 fimbriae expression. *PLoS Pathog* **7,** e1002204.
Williamson, B.D., Favis, R., Brickey, D.A. and Rutherford, C.L. (1996). Isolation and characterization of glycogen synthase in Dictyostelium discoideum. *Dev Genet* **19,** 350-364.

Winkler, W.C. (2005). Riboswitches and the role of noncoding RNAs in bacterial metabolic control. *Curr Opin Chem Biol* **9,** 594-602.
Winn, W.C. (1988). Legionnaires disease: historical perspective. *Clin Microbiol Rev* **1,** 60-81.
Witte, C.E., Whiteley, A.T., Burke, T.P., Sauer, J.D., Portnoy, D.A. and Woodward, J.J. (2013). Cyclic di-AMP is critical for Listeria monocytogenes growth, cell wall homeostasis, and establishment of infection. *MBio* **4,** e00282-00213.
Witte, G., Hartung, S., Büttner, K. and Hopfner, K.P. (2008). Structural biochemistry of a bacterial checkpoint protein reveals diadenylate cyclase activity regulated by DNA recombination intermediates. *Mol Cell* **30,** 167-178.
Wolfe, A.J. and Visick, K.L. (2008). Get the message out: cyclic-Di-GMP regulates multiple levels of flagellum-based motility. *J Bacteriol* **190,** 463-475.
Woodward, J.J., Iavarone, A.T. and Portnoy, D.A. (2010). c-di-AMP secreted by intracellular Listeria monocytogenes activates a host type I interferon response. *Science* **328,** 1703-1705.
Wright, J.B., Ruseska, I., Athar, M.A., Corbett, S. and Costerton, J.W. (1989). *Legionella pneumophila* grows adherent to surfaces in vitro and in situ. . *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **10,** 408-415.
Wright, L.P. and Philips, M.R. (2006). Thematic review series: lipid posttranslational modifications. CAAX modification and membrane targeting of Ras. *J Lipid Res* **47,** 883-891.
Wu, C., Cheng, Y.Y., Yin, H., Song, X.N., Li, W.W., Zhou, X.X*., et al.* (2013a). Oxygen promotes biofilm formation of Shewanella putrefaciens CN32 through a diguanylate cyclase and an adhesin. *Sci Rep* **3,** 1945.
Wu, J., Sun, L., Chen, X., Du, F., Shi, H., Chen, C. and Chen, Z.J. (2013b). Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science* **339,** 826-830.
Wéry, N., Bru-Adan, V., Minervini, C., Delgénes, J.P., Garrelly, L. and Godon, J.J. (2008). Dynamics of Legionella spp. and bacterial populations during the proliferation of L. pneumophila in a cooling tower facility. *Appl Environ Microbiol* **74,** 3030-3037.
Xu, L., Shen, X., Bryan, A., Banga, S., Swanson, M.S. and Luo, Z.Q. (2010). Inhibition of host vacuolar H+-ATPase activity by a Legionella pneumophila effector. *PLoS Pathog* **6,** e1000822.
Yang, C.Y., Chin, K.H., Chuah, M.L., Liang, Z.X., Wang, A.H. and Chou, S.H. (2011). The structure and inhibition of a GGDEF diguanylate cyclase complexed with (c-di-GMP)(2) at the active site. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **67,** 997-1008.
Yang, F., Tian, F., Li, X., Fan, S., Chen, H., Wu, M*., et al.* (2014). The degenerate EAL-GGDEF domain protein Filp functions as a cyclic di-GMP receptor and specifically interacts with the PilZ-domain protein PXO_02715 to regulate virulence in Xanthomonas oryzae pv. oryzae. *Mol Plant Microbe Interact*.
Yang, F., Tian, F., Sun, L., Chen, H., Wu, M., Yang, C.H. and He, C. (2012). A novel two-component system PdeK/PdeR regulates c-di-GMP turnover and virulence of Xanthomonas oryzae pv. oryzae. *Mol Plant Microbe Interact* **25,** 1361-1369.
Yang, J., Wilksch, J.J., Tan, J.W., Hocking, D.M., Webb, C.T., Lithgow, T*., et al.* (2013a). Transcriptional activation of the mrkA promoter of the Klebsiella pneumoniae type 3 fimbrial operon by the c-di-GMP-dependent MrkH protein. *PLoS One* **8,** e79038.
Yang, J., Zhao, Y., Shi, J. and Shao, F. (2013b). Human NAIP and mouse NAIP1 recognize bacterial type III secretion needle protein for inflammasome activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110,** 14408-14413.
Yaradou, D.F., Raze, D., Ginevra, C., Ader, F., Doléans-Jordheim, A., Vandenesch, F*., et al.* (2007). Zinc-dependent cytoadherence of Legionella pneumophila to human alveolar epithelial cells in vitro. *Microb Pathog* **43,** 234-242.
Ye, M., Zhang, J.J., Fang, X., Lawlis, G.B., Troxell, B., Zhou, Y*., et al.* (2014). DhhP, a c-di-AMP phosphodiesterase of Borrelia burgdorferi, is essential for cell growth and virulence. *Infect Immun*.

Yeo, H.J., Savvides, S.N., Herr, A.B., Lanka, E. and Waksman, G. (2000). Crystal structure of the hexameric traffic ATPase of the Helicobacter pylori type IV secretion system. *Mol Cell* **6,** 1461-1472.

Yi, X., Yamazaki, A., Biddle, E., Zeng, Q. and Yang, C.H. (2010). Genetic analysis of two phosphodiesterases reveals cyclic diguanylate regulation of virulence factors in Dickeya dadantii. *Mol Microbiol* **77,** 787-800.

Yoshihara, S. and Ikeuchi, M. (2004). Phototactic motility in the unicellular cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803. *Photochem Photobiol Sci* **3,** 512-518.

Yu, V.L., Hansen, D.S., Ko, W.C., Sagnimeni, A., Klugman, K.P., von Gottberg, A.*, et al.* (2007). Virulence characteristics of Klebsiella and clinical manifestations of K. pneumoniae bloodstream infections. *Emerg Infect Dis* **13,** 986-993.

Yu, V.L., Plouffe, J.F., Pastoris, M.C., Stout, J.E., Schousboe, M., Widmer, A.*, et al.* (2002). Distribution of Legionella species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. *J Infect Dis* **186,** 127-128.

Zaccolo, M., Di Benedetto, G., Lissandron, V., Mancuso, L., Terrin, A. and Zamparo, I. (2006). Restricted diffusion of a freely diffusible second messenger: mechanisms underlying compartmentalized cAMP signalling. *Biochem Soc Trans* **34,** 495-497.

Zhang, J.Z., Popov, V.L., Gao, S., Walker, D.H. and Yu, X.J. (2007). The developmental cycle of Ehrlichia chaffeensis in vertebrate cells. *Cell Microbiol* **9,** 610-618.

Zhang, Y., Franco, M., Ducret, A. and Mignot, T. (2010). A bacterial Ras-like small GTP-binding protein and its cognate GAP establish a dynamic spatial polarity axis to control directed motility. *PLoS Biol* **8,** e1000430.

Zhao, X., Koestler, B.J., Waters, C.M. and Hammer, B.K. (2013). Post-transcriptional activation of a diguanylate cyclase by quorum sensing small RNAs promotes biofilm formation in Vibrio cholerae. *Mol Microbiol* **89,** 989-1002.

Zhu, W., Banga, S., Tan, Y., Zheng, C., Stephenson, R., Gately, J. and Luo, Z.Q. (2011). Comprehensive identification of protein substrates of the Dot/Icm type IV transporter of Legionella pneumophila. *PLoS One* **6,** e17638.

Zhu, W., Hammad, L.A., Hsu, F., Mao, Y. and Luo, Z.Q. (2013). Induction of caspase 3 activation by multiple Legionella pneumophila Dot/Icm substrates. *Cell Microbiol* **15,** 1783-1795.

Zhu, Y., Hu, L., Zhou, Y., Yao, Q., Liu, L. and Shao, F. (2010). Structural mechanism of host Rab1 activation by the bifunctional Legionella type IV effector SidM/DrrA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107,** 4699-4704.

Zhulin, I.B., Bespalov, V.A., Johnson, M.S. and Taylor, B.L. (1996). Oxygen taxis and proton motive force in Azospirillum brasilense. *J Bacteriol* **178,** 5199-5204.

Zielke, R.A., Simmons, R.S., Park, B.R., Nonogaki, M., Emerson, S. and Sikora, A.E. (2014). The type II secretion pathway in Vibrio cholerae is characterized by growth-phase dependent expression of exoprotein genes and is positively regulated by sigmaE. *Infect Immun*.

Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W. and Römling, U. (2001). The multicellular morphotypes of Salmonella typhimurium and Escherichia coli produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol* **39,** 1452-1463.

Zorraquino, V., García, B., Latasa, C., Echeverz, M., Toledo-Arana, A., Valle, J.*, et al.* (2013). Coordinated cyclic-di-GMP repression of Salmonella motility through YcgR and cellulose. *J Bacteriol* **195,** 417-428.

Zusman, T., Aloni, G., Halperin, E., Kotzer, H., Degtyar, E., Feldman, M. and Segal, G. (2007). The response regulator PmrA is a major regulator of the icm/dot type IV secretion system in Legionella pneumophila and Coxiella burnetii. *Mol Microbiol* **63,** 1508-1523.

Zusman, T., Degtyar, E. and Segal, G. (2008). Identification of a hypervariable region containing new Legionella pneumophila Icm/Dot translocated substrates by using the conserved icmQ regulatory signature. *Infect Immun* **76,** 4581-4591.

Zusman, T., Feldman, M., Halperin, E. and Segal, G. (2004). Characterization of the icmH and icmF genes required for Legionella pneumophila intracellular growth, genes that are present in many bacteria associated with eukaryotic cells. *Infect Immun* **72,** 3398-3409.

Zähringer, F., Lacanna, E., Jenal, U., Schirmer, T. and Boehm, A. (2013). Structure and signaling mechanism of a zinc-sensory diguanylate cyclase. *Structure* **21,** 1149-1157.

Österberg, S., Åberg, A., Herrera Seitz, M.K., Wolf-Watz, M. and Shingler, V. (2013). Genetic dissection of a motility-associated c-di-GMP signalling protein of Pseudomonas putida. *Environ Microbiol Rep* **5,** 556-565.

8 Annexes

8.1 Revue

Microbes and Infection 15 (2013) 981–988
www.elsevier.com/locate/micinf

Molecular mimicry and original biochemical strategies for the biogenesis of a *Legionella pneumophila* replicative niche in phagocytic cells

Julie Allombert [a,b,c,d,e,1], Fabien Fuche [a,b,c,d,e,1], Céline Michard [a,b,c,d,e,1], Patricia Doublet [a,b,c,d,e,*]

[a] *CIRI, Centre for Infectiology Research, Legionella Pathogenesis Team, Université de Lyon, Lyon, France*
[b] *Inserm, U1111, Lyon, France*
[c] *Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France*
[d] *Université Lyon 1, Centre International de Recherche en Infectiologie, Lyon, France*
[e] *CNRS, UMR5308, Lyon, France*

Received 8 March 2013; accepted 13 September 2013
Available online 24 October 2013

Abstract

Legionella pneumophila is a paradigm of highly adapted intravacuolar pathogens that acquired the rare ability to replicate within a phagocytic cell. Here, we review recent progress about the role of Type 4 secretion system effectors involved in the biogenesis of the replicative niche, the *Legionella* containing vacuole.
© 2013 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Intravacuolar pathogen; *Legionella* containing vacuole; Type 4 secretion system effectors; Host pathways subversion; Vesicular trafficking

1. Introduction

The development of air-conditioning systems and other man-made water aerosols created conditions for the direct access of the Gram-negative bacterium *Legionella pneumophila* to human lungs, thus making in turn legionellosis a new emerging disease. Legionellosis, also called Legionnaires' disease, was revealed during an outbreak of pneumonia that struck members of the Pennsylvania American Legion in the summer of 1976 in Philadelphia, PA [1]. Since then and despite surveillance and control measures of water reservoirs; numerous epidemic, endemic and sporadic cases of legionellosis have been described in industrialized and emerging countries; thus it makes *L. pneumophila* the second most frequent etiologic agent for pneumonia needing hospitalization, after *Streptococcus pneumoniae*. Moreover, given the high level of case-mortality rate of adequately treated Legionnaires' disease, varying from 7% to 24% [2], *L. pneumophila* is considered a bacterial pathogen of very high medical and societal relevance.

Legionella pathogenic strains (i) emerge from the environment after intracellular multiplication in protozoans, especially in amoebae; (ii) are disseminated by contaminated aerosols; and (iii) can infect alveolar macrophages of its accidental human host. Among the 56 species and 70 serogroups of *Legionella*, *L. pneumophila* serogroup 1 (sg1) is retrieved in more than 85% of legionellosis cases worldwide. However, it represents less than 30% of environmental *Legionella* [3], which suggests that this serogroup is particularly well-adapted to human infection. Within environmental phagocytic cells and human macrophages, *L. pneumophila* evades endocytic degradation and triggers the biogenesis of a *Legionella*-containing vacuole (LCV), a rough endoplasmic reticulum-like compartment permissive for its intracellular replication. After intensive intracellular replication, *L. pneumophila* re-programs its genetic expression to support the synthesis of virulence traits, such as motility and virulence factors, to promote host cell lysis and to infect other phagocytic cells.

* Corresponding author. CIRI INSERM U1111, CNRS UMR5308, bât. A. Lwoff, 10 rue Raphaël Dubois, 69622 Villeurbanne cedex, France. Tel.: +33 4 72 44 81 05; fax: +33 4 72 43 26 86.
E-mail address: patricia.doublet@univ-lyon1.fr (P. Doublet).
[1] The authors are arranged in alphabetical order.

1286-4579/$ - see front matter © 2013 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2013.09.007

LCV biogenesis is a main trait of *Legionella* intracellular fate that allows the bacteria to evade endocytic pathway and to generate a niche permissive for intracellular replication. It mobilizes complex molecular mechanisms that usually mimic host-cell mechanisms and are strictly dependent on a Type 4 Secretion System (T4SS) and its exceptionally high number of effectors. This review mainly focuses on this molecular mimicry as an efficient strategy of virulence to promote the biogenesis of a replication-permissive vacuole, thus making *Legionella* a paradigm of highly adapted intravacuolar pathogens that evolutionally acquired the rare ability for a pathogen to replicate within a phagocytic cell.

2. Intracellular fate of the vacuolar pathogen *L. pneumophila*

The molecular and cellular aspects of infection by *L. pneumophila* in both protozoa and mammalian macrophages are similar. Immediately after uptake, the LCV, derived from the host cell plasma membrane, avoids endocytic pathway maturation; pH of LCV is around 6.1 compared to less than 5 within the *Escherichia coli*-containing vacuole [4] and does not exhibit early or late endosomal and lysosomal markers such as Rab5, Rab7 and LAMP-1 [5–7] (Fig. 1). Within 15 min of uptake, the LCV is surrounded and fused with ER-derived smooth vesicles and mitochondria [8], and 4 h post-contact it is decorated by host-cell ribosomes [9,10], thus resulting in a replication-permissive vacuole (Fig. 1). In this rough ER-like compartment, *L. pneumophila* proliferates in a so-called replicative form. When vacuolar nutrients become limiting, the progeny differentiates into the transmissive phase, repressing multiplication and expressing a number of traits that allow *L. pneumophila* to kill and escape from its host cell, and to survive as planktonic cells until it is able to re-establish a replicative niche within a new phagocytic cell [11].

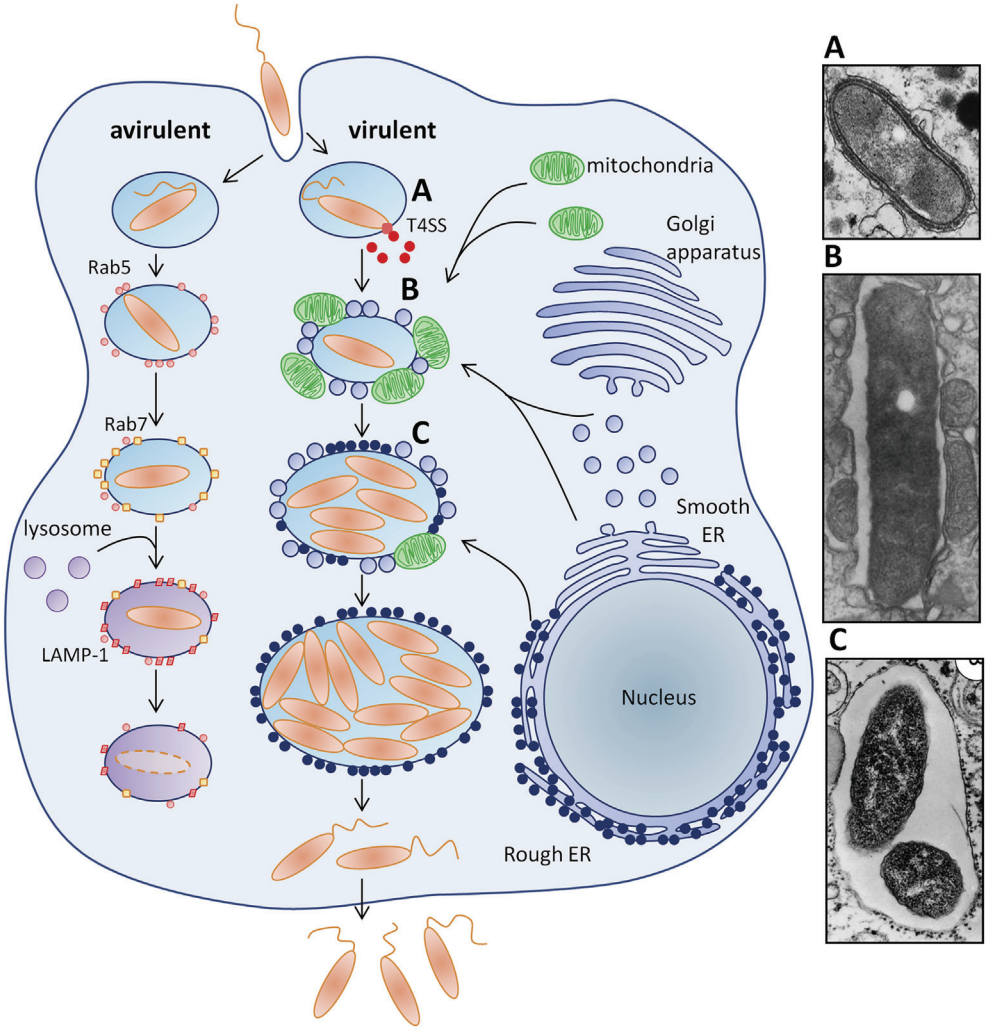


Fig. 1. LCV biogenesis during *Legionella pneumophila* infectious cycle. *L. pneumophila* is internalized within host cell and resides in a phagosome (A, from Ref. [10]). Virulent *L. pneumophila* injects T4SS effector proteins to control LCV biogenesis. Mitochondria and smooth ER-derived vesicles are rapidly recruited around LCV (B, from Ref. [8]). Later on, LCV is decorated with ribosomes (C, from Ref. [9]) and, within this ER-like vacuole, *L. pneumophila* replicates efficiently. For avirulent *L. pneumophila*, such as Dot/Icm-deficient strains, bacteria lose the ability to recruit mitochondria, ER-derived vesicles and ribosomes and are therefore cleared via endosomal pathway and fusion with lysosomes.

3. Dot/Icm type 4 secretion system

Crucial for hijacking host-cell vesicles trafficking necessary for LCV biogenesis, and subsequently for intracellular multiplication of *L. pneumophila*, is the T4SS Dot/Icm. Two initial genetic screens for Defect in organelle trafficking (Dot) and Intracellular multiplication (Icm) [12,13] identified 24 genes, clustered in two regions of the chromosome that encode (i) a multiprotein apparatus for secretion [14], (ii) coupling ATPases (DotL/IcmO; DotM/IcmP; DotN/IcmJ) [15] and (iii) chaperone proteins involved in substrate recognition for presentation to the translocon (IcmS; IcmW; LvgA) [16]. The Dot/Icm system is ancestrally related to the *tra/trb*-conjugation system and is so categorized as Type 4B secretion system [17]. Although the Dot/Icm system was first described to mediate plasmid transfer between *L. pneumophila* strains [18,19] and to *E. coli* [18], its main function is now recognized as the transport of virulence proteins, called substrates or effectors, directly from bacteria into the cytosol of *Legionella* eukaryotic host cells.

4. More than 275 Dot/Icm substrates

Given the key role of Dot/Icm T4SS in *L. pneumophila* virulence, investigative efforts have been made to identify Dot/Icm substrates mainly based on (i) bioinformatics to predict eukaryotic-like proteins [20] or the presence of a C-terminal secretion signal [21], (ii) genetic assays in yeast [22], and (iii) translocation assays with reporter activity [21,23]. Together, these studies completed with a systematic approach based on β-lactamase translocation assays of all *L. pneumophila* ORFs [24] experimentally confirmed at least 275 Dot/Icm substrates.

Temporal control of the secretion of these substrates is most likely due to substrate trafficking to the translocon by chaperone proteins, protein stability, and/or subtle translocation regulations. Indeed, the secretion apparatus Dot/Icm system is constitutively synthesized [25], and the effectors are expressed before the contact between *L. pneumophila* and its host cell [26]. Although the 275 substrates are not necessarily secreted together, and despite that they engage various host processes, the particularly large number of Dot/Icm effectors leads to functional redundancy among these proteins; the inactivation of only one effector encoding gene rarely results in intracellular growth defect [27]. This redundancy does not allow genetic studies to be conclusive, and as a result, less than 15% of the Dot/Icm substrates are functionally characterized. It is noteworthy that many Dot/Icm effectors harbor eukaryotic domains [20], such as protein–protein interaction domains and enzymatic activities-associated domains; in particular, for post-translational modifications (phosphorylation, ubiquitination, glucosylation, de-AMPylation/AMPylation, dephosphocholination/phosphocholination, prenylation) [28] and small GTPases cycling control (guanine nucleotide exchange factors (GEF)) [29]. Although the specific host cell pathways targeted have not been fully identified, these domains and activities have been demonstrated to interfere with (i) vesicular trafficking to inhibit phagosome maturation [30–33] and to trigger LCV biogenesis [29,34–56], (ii) the innate immune defence-associated pathways such as NF-κB pathway [57–61], type I interferon response [62,63] and autophagy process [64], and (iii) host apoptotic program [65,66] (Table 1).

5. Lipid remodeling of the LCV membrane

A specific aspect of the intracellular fate of *L. pneumophila* is the biogenesis of a replication-permissive vacuole. LCV membrane is characterized by (i) phosphatidylinositol 4-phosphate [PI(4)P] enrichment, (ii) recruitment of some Dot/Icm substrates, and (iii) recruitment/activation of host proteins such as GTPases, thus promoting fusion with smooth ER vesicles.

Phosphoinositides (PIs), among other cellular functions, are critical determinants of different cellular compartments. Plasma membrane predominantly contains phosphatidylinositol 4,5-biphosphate [PI(4,5)P2]; phosphatidylinositol 3-phosphate [PI(3)P] is abundant in early endosomes; and the Golgi apparatus is enriched with phosphatidylinositol 4-phosphate [PI(4)P]. The Dot/Icm substrate SidF (substrate of Icm/Dot) harbors a phosphoinositide phosphatase activity which dephosphorylates [PI(3,4,5)P3] and [PI(4,5)P2] to produce [PI(4,5)P2] and [PI(4)P] [35] (Fig. 2). SidF co-exists on the LCV surface with the host phosphoinositide phosphatase OCRL1, which binds to the LCV in association with LpnE, another Dot/Icm substrate and is specialized for dephosphorylating [PI(3,4,5)P3] and [PI(4,5)P2] [67]. Thus, SidF could act synergistically to give only [PI(4)P] as a final product. [PI(4)P] enrichment of the LCV membrane, which originally derives from plasma membrane, mimics the Golgi compartment, and consequently favors the fusion with ER-vesicles.

Another host enzyme could contribute to the [PI(4)P] enrichment of the LCV membrane, namely the PI4KIIIβ, which adds a phosphate at position 4 of PI to yield PI(4)P (Fig. 2). Indeed, knockdown of PI4KIIIβ results in decreased accumulation of PI(4)P on LCV [56]. Although the recruitment of PI4KIIIβ on the LCV or the Dot/Icm dependence of the process has not been clearly addressed; two Dot/Icm effectors, LecE and LpdA, manipulate host phospholipids biosynthesis and could be indirectly involved in PI4KIIIβ activation. Indeed, LecE and LpdA are localized to the LCV and act synergistically to produce diacylglycerol (DAG) from phosphatidylcholine [52]. LCV membrane enrichment for DAG would allow the recruitment of the protein kinase C via its two DAG binding domains, and consequently the activation of the protein kinase D, known to recruit the PI4KIIIβ to targeted membrane (Fig. 2). Surprisingly, the endosomal membrane-associated phosphoinositide [PI(3)P] has also been described in the LCV membrane. The impact of the presence of [PI(3)P] in LCV membrane on phagosome maturation still remains to be deciphered.

6. Recruitment of Dot/Icm substrates on LCV

Many Dot/Icm effectors are targeted to the LCV surface. *L. pneumophila* uses [PI(4)P] to anchor some Dot/Icm substrates

Table 1
Functionally characterized Dot/Icm effectors.

Dot/Icm effectors	Involved in	Target in host	Biochemical activity	References
SetA	Endocytic evasion?	Endosomal trafficking ?	Glycosyltransferase	[32]
VipA	Endocytic evasion?	Endosomal trafficking ?	Actin nucleator	[33]
VipD	Endocytic evasion	Endosomal trafficking, Rab5/Rab22	Rab5/Rab22 interactant	[31]
SidK	Endocytic evasion	Vacuole acidification, v-ATPase subunit VatA	Inhibition of ATP hydrolysis and proton translocation	[30]
LpdA	LCV biogenesis	Membrane PI remodeling, PI4KIIIb	Phospholipase D, phosphatidic acid synthesis	[52]
LecE	LCV biogenesis	Membrane PI remodeling, PI4KIIIb	Activates Pah1, DAG synthesis	[52]
SidF	LCV biogenesis	Membrane PI remodeling, PIP3/PIP2	Phosphoinositide phosphatase	[35]
RalF	LCV biogenesis	ER recruitment, Arf1	Arf1-GEF	[29,53]
SidC	LCV biogenesis	ER recruitment	Unknown	[36]
SidM	LCV biogenesis	ER recruitment, Rab1	Rab1-GEF, Rab1-GDF, Rab1-AMPylation	[34,37–43, 47,56]
SidD	LCV biogenesis	ER recruitment, Rab1	Rab1 deAMPylation	[44–46]
LepB	LCV biogenesis	ER recruitment, Rab1	Rab1-GAP	[39,55]
AnkX	LCV biogenesis	ER recruitment, Rab1	Rab1 phosphocholination	[47,48,54]
Lem 3	LCV biogenesis	ER recruitment, Rab1	Rab1-dephosphocholination	[48]
LidA	LCV biogenesis	ER recruitment, Rab1	Rab1 interactant	[37,49–51]
LegK1	Innate immune defense control	NF-kB pathway, IkBa	IkB kinase	[58]
LnaB	Innate immune defense control	NF-kB pathway	Unknown	[59]
Lgt1	Innate immune defense control	Protein synthesis inhibition, NF-kB pathway	eEF1A glycosidase	[57]
Lgt2	Innate immune defense control	Protein synthesis inhibition, NF-kB pathway	eEF1A glycosidase	[57]
Lgt3	Innate immune defense control	Protein synthesis inhibition, NF-kB pathway	eEF1A glycosidase	[57]
Sid I	Innate immune defense control	Protein synthesis inhibition, NF-kB pathway	eEF1A et eEF1B interactant	[60,61]
SidL	Innate immune defense control	Protein synthesis inhibition, NF-kB pathway	Unknown	[61]
SdhA	Innate immune defense control	Type I interferon response	LCV integrity	[62,63]
SdhA	Apoptose inhibition	Apoptose inhibition, caspase 1 pathway	LCV integrity	[66]
SidF	Apoptose inhibition	BCL2 protein family	Inhibition of BCL2 protein family	[65]
RavZ	Autophagy inhibition	Atg8	Atg8 deconjugation	[64]

to the cytoplasmic face of LCV. The Dot/Icm substrate SidC and its paralogue SdcA anchor to the LCV via specific binding of their 20 kDa domain near the C-terminus to [PI(4)P] [36] (Fig. 2). Anchoring SidC on LCV is required for efficient ER recruitment on the LCV; although it is dispensible for bacteria intracellular replication, and the molecular mechanism involved is not to date deciphered. A second Dot/Icm effector, SidM also called DrrA, is addressed to the LCV membrane via [PI(4)P] [56]. SidM/DrrA is a multidomain protein with a 12 kDa [PI(4)P] binding domain and three different activities-associated domains. The GEF (guanine nucleotide exchange factor), GDF (GDI-displacement factor) and AMPylation activities recruit and control the host cell Rab1 GTPase and thus promote ER vesicles recruitment on the LCV [38,43]. The Dot/Icm substrate LidA (lowered viability in the presence of *dotA*) is anchored to the LCV membrane by interacting to [PI(3)P] and with lower affinity to [PI(4)P] [56] (Fig. 2). Anchoring LidA to the LCV would promote SidM-dependent Rab1 recruitment on the vacuole.

Another way for *L. pneumophila* to address injected effectors to the LCV membrane, is the exploitation of the host cell prenylation apparatus. Prenylation is a post-translational lipid modification (e.g. farnesylation) of proteins on a conserved CAAX (C for cysteine and A for aliphatic amino acid) motif that enables anchoring of hydrophilic proteins to lipid membranes or association with other hydrophobic proteins [68]. *In silico* analysis of *L. pneumophila* genomes revealed that at least 11 genes encode CAAX motif-containing proteins, which have been so called Pel proteins for Prenylated effectors of *Legionella*. These proteins, when ectopically expressed in eukaryotic cells, are modified by the host prenylation machinery and localize to host cell membranes [69].

The Dot/Icm substrate AnkB, of strains *L. pneumophila* AA100 and Philadelphia Lp01, also contains a CAAX motif. During infection, the CAAX motif of AnkB is modified by the host farnesylation machinery [70]. Expression of a CAAX substituted-variant results in defective anchoring of AnkB to the LCV, severe defects in intracellular replication, and attenuation of intrapulmonary proliferation in a mouse model. In addition to the CAAX farnesylation motif, AnkB harbors two ankyrin (ANK) protein–protein interaction domains and a F-box domain that together could function as a platform for the docking of polyubiquitinated proteins to the LCV membrane (Fig. 2), and promote proteasome-mediated generation of free amino acids essential as energy and carbon sources for *L. pneumophila* intracellular proliferation [71]. Although AnkB is not directly involved in LCV biogenesis and despite controversial results regarding its genetic requirement and its biological function during infection [70,72,73], it directly impacts the LCV cytosolic face by recruiting ubiquitinated proteins that are enriched on LCV during infection [74].

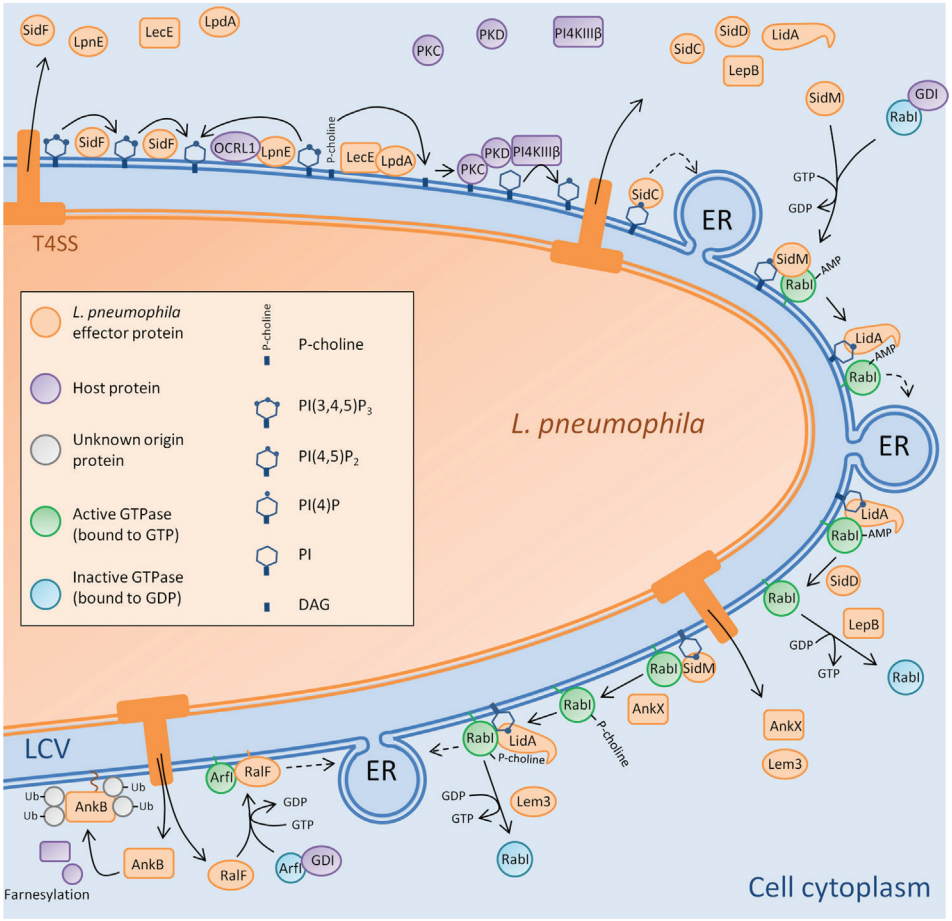


Fig. 2. Modulation of phospholipids and small GTPases by *L. pneumophila* for LCV biogenesis. LCV biogenesis is mediated by Dot/Icm effector proteins that modify PI lipids (SidF, LecE or LpdA) or recruit PI-modifying host enzymes (PI4KIIIβ or OCRL1). Lipids remodeling of the LCV membrane ([PI(4)P] enrichment) or prenylation of effectors (for AnkB recruitment) promote the binding of other effectors on the LCV. Most of them are involved in host cell small GTPases control via various enzymatic activities : GEF (SidM or RalF), GAP (LepB), AMPylase (SidM), de-AMPylase (SidD), phosphocholinase (AnkX) or de-phosphocholinase (Lem3). GDI : dissociation inhibitor.

7. Small GTPases cycling control on LCV

One main characteristic of the LCV is that it is fused with ER-derived vesicles. *L. pneumophila* is able to hijack vesicles trafficking between the ER and the Golgi apparatus, to intercept smooth ER vesicles that allow both the conversion of the plasma membrane of the LCV into membranes with ER-characteristics and provide membrane materials to expand the LCV for intracellular proliferation. The manipulation of host cell vesicular trafficking by *L. pneumophila* is strictly dependent of the Dot/Icm T4SS. In particular, some of Dot/Icm substrates target host cell small GTPases.

Small GTPases, also called Ras-like GTPases, exist in eukaryotes in two conformational and functional states: a membrane-associated GTP-bound active state and a cytosolic GDP-bound inactive state. The switch from the active to the inactive state depends on the intrinsic GTPase activity of these proteins. It is also tightly controlled by several groups of regulatory proteins: GTPase-activating proteins (GAPs) stimulate the intrinsic GTP hydrolytic activity of GTPases and result in their inactivation while guanine nucleotide exchange factors (GEFs) promote the exchange of GDP to GTP and thus activate the GTPases. Moreover, in the absence of an activating signal, cytosolic GDP-bound small GTPases are sequestered by guanine nucleotide dissociation inhibitors (GDIs), which maintain them in the inactive state. Upon appropriate signal, GDI displacement factors (GDFs) release GDP-bound GTPase from GDIs and trigger a conformational change that allows the anchoring of GTPase into the membrane of the appropriate compartment.

Two small GTPases, namely Arf1 and Rab1, essential for the regulation of vesicles trafficking between the ER and the Golgi apparatus, are activated on the LCV dependently of Dot/Icm effectors (Fig. 2). RalF (Recruitment of Arf1 to the *Legionella* phagosome), which mediates the recruitment of Arf1 on the LCV during *Legionella* infection, was the first Dot/Icm substrate identified due to its N-terminal Sec7-homology domain retrieved in eukaryotic Arf-GEFs. As expected, RalF displays Arf1-GEF activity *in vitro*, colocalizing and activating Arf1 on LCV [29]. The C-terminal domain of RalF, which modulates the Arf1-GEF activity, has been proposed to bind lipids without specificity for particular

phosphoinositides, to anchor RalF to the LCV [53]. The function of Arf1-GTP is essential for LCV biogenesis, as demonstrated by the effect of a dominant negative of Arf1 and Arf1 RNAi analysis [74]. However, inactivation of *ralF* gene does not impair intracellular replication of *Legionella*, which suggests that *L. pneumophila* encodes other Dot/Icm effectors to activate and/or inactivate Arf1 [29].

Rab1 is recruited and activated on the LCV by the above-mentioned PI(4)P-binding effector SidM. As previously described, SidM anchors to the LCV membrane by a PI(4)P-binding domain at its C-terminus [56]. Recently, the C-terminal domain of SidM has also been shown to directly interact with the plasma membrane (PM) synthexins, such as Stx3, which facilitates the localization of synthexins to the SidM-associated region of the LCV membrane [34]. Despite any homology with eukaryotic Rab-GEF, the central domain of SidM displays both GEF and GDF activities, as revealed by the structural analysis of the SidM/Rab1 complex [40–42]. Together these structural features result in SidM interaction with Rab1 on the LCV, as initially observed *in vitro* and *in vivo* [37,38], in Rab1 release from GDI [39], and in LCV membrane associated GTP-coupled Rab1 (Fig. 2). The SidM-mediated activation of Rab1 promotes (i) the tethering of ER vesicles to PM-derivated LCV, (ii) the functional association between Sec22b on ER-derivated vesicles with the PM Stx3 protein on the LCV to form a functional SNARE complex, and consequently (iii) the fusion of ER vesicles membrane with the PM-derivated membrane of the LCV [34]. An additional enzymatic activity of the multifunctional protein SidM, due to its N-terminal domain, has recently been revealed [43]. The N-terminal domain of SidM, which exhibits similarities with the catalytic domain of glutamine synthetase adenylyl transferase, modifies the tyrosine 77 of Rab1 by AMPylation or adenylylation, i.e. the addition of a AMP moiety. This post-translational modification inhibits GAP-stimulated GTP hydrolysis, thus locking Rab1 in the GTP-bound active state (Fig. 2).

The activation of Rab1 by SidM is counteracted by two others Dot/Icm effectors, SidD and LepB (Fig. 2). SidD removes AMP from Rab1 [44,45] by a protein phosphatase-like catalytic mechanism, as suggested by structural analysis [46]. DeAMPylation of Rab1 makes it accessible for GAP activities, such as that exhibited by LepB. Despite any similarity with eukaryotic Rab-GAPs, LepB harbors a Rab1-specific GAP activity that promotes GTP hydrolysis and subsequent removal of Rab1 from the LCV [39,55]. Consistent with the SidD-dependent action of LepB, the phenotype of a *lepB* mutant is similar to that of a *sidD* mutant, i.e. a prolonged localization of Rab1 on the LCV [44]. Moreover, it is worth noting that the sequential and antagonistic effects of SidM and SidD/LepB on Rab1 is supported by the genomic clustering of the three genes on the *Legionella* genome and by the sequential production of these effectors during *L. pneumophila* infection; i.e. SidD and LepB level production increases as SidM decreases.

Three additional Dot/Icm effectors target the Rab1 GTPase and participate to the temporal control of its activation during *Legionella* infection cycle. AnkX harbors a novel post-translational modification activity, namely phosphocholination, that transfers a phosphocholine moiety from CDP-choline to serine 76 of Rab1, preceding the SidM-modified tyrosine [47] (Fig. 2). Although the biological effect of this post-translational modification of Rab1 is not completely deciphered, it results in the same biochemical consequence as the SidM-mediated AMPylation, i.e. locking Rab1 in the active form. Like AMPylation, phosphocholination is reversible. The Dot/Icm effector Lem3 has been recently shown to possess an antagonistic activity to that of AnkX by removing the phosphocholine from the Ser76 of Rab1 [48,54]. Finally, LidA that is located on the surface of the LCV, binds Rab1-GTP with high affinity and promotes the SidM-dependent Rab1 recruitment on the vacuole [49]. LidA-bound Rab1-GDP exhibits a similar conformation of the Rab1-GTP form, which suggests that LidA maintains Rab1 in an active form, independently of the nucleotide [50]. LidA (i) protects Rab1 from inactivation by GAP activities and nucleotide extraction,(ii) interferes with Rab1-AMPylation and phosphocholination, and (iii) blocks deAMPylation by SidD and dephosphocholination by Lem3 [51].

Thus, Rab1 is directly targeted and its activity is controlled by at least 6 different Dot/Icm effectors, namely SidM, SidD, LepB, AnkX, Lem3 and LidA. However, inactivation of the corresponding genes does not cause strong defects in intracellular replication of *L. pneumophila* [27], which suggests that additional mechanisms than Rab1 activity control is required for LCV biogenesis. This is supported by the identification of other Dot/Icm effectors such as SidJ [75] and LegK2 [76] which, although their precise host cell target is not yet characterized, play a key role in both ER-recruitment on LCV and intracellular multiplication of *L. pneumophila*.

8. Concluding remarks

Genome sequencing of 6 distinct strains of *L. pneumophila* sg1 historically highlighted the presence of many eukaryotic-like proteins encoding genes [20]. These genes, that are thought to be acquired during the co-evolution of *L. pneumophila* with the environmental phagocytic cells, were proposed to provide efficient molecular tools for bacteria to mimick eukaryotic molecular activities in order to subvert host cell pathways. During the last decade, intense investigative efforts not only confirmed this genomic prediction but also demonstrated that some Dot/Icm effectors that exhibit no similarity with eukaryotic proteins could also harbor eukaryotic-like activities, such as small GTPase-controlling activities. Moreover, these studies provide new insights into sophisticated biochemical strategies, such as rare or novel post-translational modifications, developed by *L. pneumophila* to hijack host cell processes. Given that only a few Dot/Icm substrates are functionally characterized among the approximately 300 Dot/Icm effectors, future investigations on these effectors will undoubtedly make significant breakthroughs on the role of each effector in the intracellular fate of *L. pneumophila*. They also improve our knowledge of the cellular

processes engaged by these effectors, thus making important contributions for understanding key cellular functions such as vesicular trafficking.

Acknowledgments

We thank Dr A. Vianney for critical reading of the manuscript. We apologize to authors whose works cannot be cited here because of space limitation.

References

[1] D.W. Fraser, 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, Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia, N. Engl. J. Med. 297 (1977) 1189−1197.

[2] B. Fields, R. Benson, R. Besser, Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation, Clin. Microbiol. Rev. 15 (2002) 506−526.

[3] A. Doleans, H. Aurell, M. Reyrolle, G. Lina, J. Freney, F. Vandenesch, J. Etienne, S. Jarraud, Clinical and environmental distributions of Legionella strains in France are different, J. Clin. Microbiol. 42 (2004) 458−460.

[4] M.A. Horwitz, F.R. Maxfield, *Legionella pneumophila* inhibits acidification of its phagosome in human monocytes, J. Cell Biol. 99 (1984) 1936−1943.

[5] D.L. Clemens, B.Y. Lee, M.A. Horwitz, Deviant expression of Rab5 on phagosomes containing the intracellular pathogens *Mycobacterium tuberculosis* and *Legionella pneumophila* is associated with altered phagosomal fate, Infect. Immun. 68 (2000) 2671−2684.

[6] D.L. Clemens, B.Y. Lee, M.A. Horwitz, Mycobacterium tuberculosis and *Legionella pneumophila* phagosomes exhibit arrested maturation despite acquisition of Rab7, Infect. Immun. 68 (2000) 5154−5166.

[7] C.R. Roy, K.H. Berger, R.R. Isberg, *Legionella pneumophila* DotA protein is required for early phagosome trafficking decisions that occur within minutes of bacterial uptake, Mol. Microbiol. 28 (1998) 663−674.

[8] M.A. Horwitz, Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes, J. Exp. Med. 158 (1983) 1319−1331.

[9] C.R. Roy, L.G. Tilney, The road less traveled: transport of Legionella to the endoplasmic reticulum, J. Cell Biol. 158 (2002) 415−419.

[10] M.A. Horwitz, S.C. Silverstein, Interaction of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) with human phagocytes. I. *L. pneumophila* resists killing by polymorphonuclear leukocytes, antibody, and complement, J. Exp. Med. 153 (1981) 386−397.

[11] A. Molofsky, M. Swanson, Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle, Mol. Microbiol. 53 (2004) 29−40.

[12] K. Berger, R. Isberg, Two distinct defects in intracellular growth complemented by a single genetic locus in *Legionella pneumophila*, Mol. Microbiol. 7 (1993) 7−19.

[13] A. Marra, S.J. Blander, M.A. Horwitz, H.A. Shuman, Identification of a *Legionella pneumophila* locus required for intracellular multiplication in human macrophages, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89 (1992) 9607−9611.

[14] C.D. Vincent, J.R. Friedman, K.C. Jeong, E.C. Buford, J.L. Miller, J.P. Vogel, Identification of the core transmembrane complex of the Legionella Dot/Icm type IV secretion system, Mol. Microbiol. 62 (2006) 1278−1291.

[15] B.A. Buscher, G.M. Conover, J.L. Miller, S.A. Vogel, S.N. Meyers, R.R. Isberg, J.P. Vogel, The DotL protein, a member of the TraG-coupling protein family, is essential for viability of *Legionella pneumophila* strain Lp02, J. Bacteriol. 187 (2005) 2927−2938.

[16] J.P. Bardill, J.L. Miller, J.P. Vogel, IcmS-dependent translocation of SdeA into macrophages by the *Legionella pneumophila* type IV secretion system, Mol. Microbiol. 56 (2005) 90−103.

[17] P.J. Christie, K. Atmakuri, V. Krishnamoorthy, S. Jakubowski, E. Cascales, Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems, Annu. Rev. Microbiol. 59 (2005) 451−485.

[18] J.P. Vogel, H.L. Andrews, S.K. Wong, R.R. Isberg, Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*, Science 279 (1998) 873−876.

[19] G. Segal, M. Purcell, H.A. Shuman, Host cell killing and bacterial conjugation require overlapping sets of genes within a 22-kb region of the *Legionella pneumophila* genome, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95 (1998) 1669−1674.

[20] C. Cazalet, 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, Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity, Nat. Genet. 36 (2004) 1165−1173.

[21] D. Burstein, T. Zusman, E. Degtyar, R. Viner, G. Segal, T. Pupko, Genome-scale identification of *Legionella pneumophila* effectors using a machine learning approach, PLoS Pathog. 5 (2009) e1000508.

[22] E.M. Campodonico, L. Chesnel, C.R. Roy, 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 (2005) 918−933.

[23] Z.Q. Luo, R.R. Isberg, Multiple substrates of the *Legionella pneumophila* Dot/Icm system identified by interbacterial protein transfer, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101 (2004) 841−846.

[24] W. Zhu, S. Banga, Y. Tan, C. Zheng, R. Stephenson, J. Gately, Z.Q. Luo, Comprehensive identification of protein substrates of the Dot/Icm type IV transporter of *Legionella pneumophila*, PLoS One 6 (2011) e17638.

[25] O. Gal-Mor, T. Zusman, G. Segal, Analysis of DNA regulatory elements required for expression of the *Legionella pneumophila* Icm and Dot virulence genes, J. Bacteriol. 184 (2002) 3823−3833.

[26] X. Charpentier, J. Gabay, M. Reyes, J. Zhu, A. Weiss, H. Shuman, Chemical genetics reveals bacterial and host cell functions critical for type IV effector translocation by *Legionella pneumophila*, PLoS Pathog. 5 (2009) e1000501.

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

[28] M. Rolando, C. Buchrieser, Post-translational modifications of host proteins by *Legionella pneumophila*: a sophisticated survival strategy, Future Microbiol. 7 (2012) 369−381.

[29] H. Nagai, J.C. Kagan, X. Zhu, R.A. Kahn, C.R. Roy, A bacterial guanine nucleotide exchange factor activates ARF on Legionella phagosomes, Science 295 (2002) 679−682.

[30] L. Xu, X. Shen, A. Bryan, S. Banga, M.S. Swanson, Z.Q. Luo, Inhibition of host vacuolar H+-ATPase activity by a *Legionella pneumophila* effector, PLoS Pathog. 6 (2010) e1000822.

[31] B. Ku, K.H. Lee, W.S. Park, C.S. Yang, J. Ge, S.G. Lee, S.S. Cha, F. Shao, W. Do Heo, J.U. Jung, B.H. Oh, VipD of *Legionella pneumophila* targets activated Rab5 and Rab22 to interfere with endosomal trafficking in macrophages, PLoS Pathog. 8 (2012) e1003082.

[32] T. Jank, K.E. Böhmer, T. Tzivelekidis, C. Schwan, Y. Belyi, K. Aktories, Domain organization of Legionella effector SetA, Cell Microbiol. 14 (2012) 852−868.

[33] I.S. Franco, N. Shohdy, H.A. Shuman, The *Legionella pneumophila* effector VipA is an actin nucleator that alters host cell organelle trafficking, PLoS Pathog. 8 (2012) e1002546.

[34] K. Arasaki, D.K. Toomre, C.R. Roy, The *Legionella pneumophila* effector DrrA is sufficient to stimulate SNARE-dependent membrane fusion, Cell Host Microbe 11 (2012) 46−57.

[35] F. Hsu, W. Zhu, L. Brennan, L. Tao, Z.Q. Luo, Y. Mao, Structural basis for substrate recognition by a unique Legionella phosphoinositide phosphatase, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109 (2012) 13567−13572.

[36] C. Ragaz, H. Pietsch, S. Urwyler, A. Tiaden, S. Weber, H. Hilbi, The *Legionella pneumophila* phosphatidylinositol-4 phosphate-binding type

IV substrate SidC recruits endoplasmic reticulum vesicles to a replication-permissive vacuole, Cell Microbiol. 10 (2008) 2416–2433.
[37] M. Machner, R. Isberg, Targeting of host Rab GTPase function by the intravacuolar pathogen *Legionella pneumophila*, Dev. Cell 11 (2006) 47–56.
[38] T. Murata, A. Delprato, A. Ingmundson, D. Toomre, D. Lambright, C. Roy, The *Legionella pneumophila* effector protein DrrA is a Rab1 guanine nucleotide-exchange factor, Nat. Cell Biol. 8 (2006) 971–977.
[39] A. Ingmundson, A. Delprato, D. Lambright, C. Roy, *Legionella pneumophila* proteins that regulate Rab1 membrane cycling, Nature 450 (2007) 365–369.
[40] S. Schoebel, L.K. Oesterlin, W. Blankenfeldt, R.S. Goody, A. Itzen, RabGDI displacement by DrrA from Legionella is a consequence of its guanine nucleotide exchange activity, Mol. Cell 36 (2009) 1060–1072.
[41] H.Y. Suh, D.W. Lee, K.H. Lee, B. Ku, S.J. Choi, J.S. Woo, Y.G. Kim, B.H. Oh, Structural insights into the dual nucleotide exchange and GDI displacement activity of SidM/DrrA, EMBO J. 29 (2010) 496–504.
[42] Y. Zhu, L. Hu, Y. Zhou, Q. Yao, L. Liu, F. Shao, Structural mechanism of host Rab1 activation by the bifunctional Legionella type IV effector SidM/DrrA, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107 (2010) 4699–4704.
[43] M.P. Müller, H. Peters, J. Blümer, W. Blankenfeldt, R.S. Goody, A. Itzen, The Legionella effector protein DrrA AMPylates the membrane traffic regulator Rab1b, Science 329 (2010) 946–949.
[44] M.R. Neunuebel, Y. Chen, A.H. Gaspar, P.S. Backlund, A. Yergey, M.P. Machner, De-AMPylation of the small GTPase Rab1 by the pathogen *Legionella pneumophila*, Science 333 (2011) 453–456.
[45] Y. Tan, Z.Q. Luo, *Legionella pneumophila* SidD is a deAMPylase that modifies Rab1, Nature 475 (2011) 506–509.
[46] D.J. Rigden, Identification and modelling of a PPM protein phosphatase fold in the *Legionella pneumophila* deAMPylase SidD, FEBS Lett. 585 (2011) 2749–2754.
[47] S. Mukherjee, X. Liu, K. Arasaki, J. McDonough, J.E. Galán, C.R. Roy, Modulation of Rab GTPase function by a protein phosphocholine transferase, Nature 477 (2011) 103–106.
[48] Y. Tan, R.J. Arnold, Z.Q. Luo, *Legionella pneumophila* regulates the small GTPase Rab1 activity by reversible phosphorylcholination, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108 (2011) 21212–21217.
[49] S. Schoebel, A.L. Cichy, R.S. Goody, A. Itzen, Protein LidA from Legionella is a Rab GTPase supereffector, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108 (2011) 17945–17950.
[50] W. Cheng, K. Yin, D. Lu, B. Li, D. Zhu, Y. Chen, H. Zhang, S. Xu, J. Chai, L. Gu, Structural insights into a unique *Legionella pneumophila* effector LidA recognizing both GDP and GTP bound Rab1 in their active state, PLoS Pathog. 8 (2012) e1002528.
[51] M.R. Neunuebel, S. Mohammadi, M. Jarnik, M.P. Machner, *Legionella pneumophila* LidA affects nucleotide binding and activity of the host GTPase Rab1, J. Bacteriol. 194 (2012) 1389–1400.
[52] R. Viner, D. Chetrit, M. Ehrlich, G. Segal, Identification of two *Legionella pneumophila* effectors that manipulate host phospholipids biosynthesis, PLoS Pathog. 8 (2012) e1002988.
[53] E. Alix, L. Chesnel, B.J. Bowzard, A.M. Tucker, A. Delprato, J. Cherfils, D.O. Wood, R.A. Kahn, C.R. Roy, The capping domain in RalF regulates effector functions, PLoS Pathog. 8 (2012) e1003012.
[54] P.R. Goody, K. Heller, L.K. Oesterlin, M.P. Müller, A. Itzen, R.S. Goody, Reversible phosphocholination of Rab proteins by *Legionella pneumophila* effector proteins, EMBO J. 31 (2012) 1774–1784.
[55] E. Mihai Gazdag, A. Streller, I. Haneburger, H. Hilbi, I.R. Vetter, R.S. Goody, A. Itzen, Mechanism of Rab1b deactivation by the *Legionella pneumophila* GAP LepB, EMBO Rep. 14 (2013) 199–205.
[56] E. Brombacher, S. Urwyler, C. Ragaz, S.S. Weber, K. Kami, M. Overduin, H. Hilbi, Rab1 guanine nucleotide exchange factor SidM is a major phosphatidylinositol 4-phosphate-binding effector protein of *Legionella pneumophila*, J. Biol. Chem. 284 (2009) 4846–4856.
[57] Y. Belyi, D. Tartakovskaya, A. Tais, E. Fitzke, T. Tzivelekidis, T. Jank, S. Rospert, K. Aktories, Elongation factor 1A is the target of growth inhibition in yeast caused by *Legionella pneumophila* glucosyltransferase Lgt1, J. Biol. Chem. 287 (2012) 26029–26037.
[58] J. Ge, H. Xu, T. Li, Y. Zhou, Z. Zhang, S. Li, L. Liu, F. Shao, A Legionella type IV effector activates the NF-kappaB pathway by phosphorylating the IkappaB family of inhibitors, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106 (2009) 13725–13730.
[59] V.P. Losick, E. Haenssler, M.Y. Moy, R.R. Isberg, LnaB: a *Legionella pneumophila* activator of NF-kappaB, Cell Microbiol. 12 (2010) 1083–1097.
[60] X. Shen, S. Banga, Y. Liu, L. Xu, P. Gao, I. Shamovsky, E. Nudler, Z.Q. Luo, Targeting eEF1A by a *Legionella pneumophila* effector leads to inhibition of protein synthesis and induction of host stress response, Cell Microbiol. 11 (2009) 911–926.
[61] M.F. Fontana, S. Banga, K.C. Barry, X. Shen, Y. Tan, Z.Q. Luo, R.E. Vance, Secreted bacterial effectors that inhibit host protein synthesis are critical for induction of the innate immune response to virulent *Legionella pneumophila*, PLoS Pathog. 7 (2011) e1001289.
[62] K.M. Monroe, S.M. McWhirter, R.E. Vance, Identification of host cytosolic sensors and bacterial factors regulating the type I interferon response to *Legionella pneumophila*, PLoS Pathog. 5 (2009) e1000665.
[63] E.A. Creasey, R.R. Isberg, The protein SdhA maintains the integrity of the Legionella-containing vacuole, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109 (2012) 3481–3486.
[64] A. Choy, J. Dancourt, B. Mugo, T.J. O'Connor, R.R. Isberg, T.J. Melia, C.R. Roy, The Legionella effector RavZ inhibits host autophagy through irreversible Atg8 deconjugation, Science 338 (2012) 1072–1076.
[65] S. Banga, P. Gao, X. Shen, V. Fiscus, W.X. Zong, L. Chen, Z.Q. Luo, *Legionella pneumophila* inhibits macrophage apoptosis by targeting pro-death members of the Bcl2 protein family, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104 (2007) 5121–5126.
[66] J. Ge, Y.N. Gong, Y. Xu, F. Shao, Preventing bacterial DNA release and absent in melanoma 2 inflammasome activation by a Legionella effector functioning in membrane trafficking, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109 (2012) 6193–6198.
[67] S.S. Weber, C. Ragaz, H. Hilbi, The inositol polyphosphate 5-phosphatase OCRL1 restricts intracellular growth of Legionella, localizes to the replicative vacuole and binds to the bacterial effector LpnE, Cell Microbiol. 11 (2009) 442–460.
[68] L.P. Wright, M.R. Philips, Thematic review series: lipid posttranslational modifications. CAAX modification and membrane targeting of Ras, J. Lipid Res. 47 (2006) 883–891.
[69] S.S. Ivanov, G. Charron, H.C. Hang, C.R. Roy, Lipidation by the host prenyltransferase machinery facilitates membrane localization of *Legionella pneumophila* effector proteins, J. Biol. Chem. 285 (2010) 34686–34698.
[70] C.T. Price, S. Al-Khodor, T. Al-Quadan, M. Santic, F. Habyarimana, A. Kalia, Y.A. Kwaik, Molecular mimicry by an F-box effector of *Legionella pneumophila* hijacks a conserved polyubiquitination machinery within macrophages and protozoa, PLoS Pathog. 5 (2009) e1000704.
[71] C.T. Price, T. Al-Quadan, M. Santic, I. Rosenshine, Y. Abu Kwaik, Host proteasomal degradation generates amino acids essential for intracellular bacterial growth, Science 334 (2011) 1553–1557.
[72] A.W. Ensminger, R.R. Isberg, E3 ubiquitin ligase activity and targeting of BAT3 by multiple *Legionella pneumophila* translocated substrates, Infect. Immun. 78 (2010) 3905–3919.
[73] M. Lomma, D. Dervins-Ravault, M. Rolando, T. Nora, H.J. Newton, F.M. Sansom, T. Sahr, L. Gomez-Valero, M. Jules, E.L. Hartland, C. Buchrieser, The *Legionella pneumophila* F-box protein Lpp2082 (AnkB) modulates ubiquitination of the host protein parvin B and promotes intracellular replication, Cell Microbiol. 12 (2010) 1272–1291.
[74] M.S. Dorer, D. Kirton, J.S. Bader, R.R. Isberg, RNA interference analysis of Legionella in Drosophila cells: exploitation of early secretory apparatus dynamics, PLoS Pathog. 2 (2006) e34.
[75] Y. Liu, Z. Luo, The *Legionella pneumophila* effector SidJ is required for efficient recruitment of endoplasmic reticulum proteins to the bacterial phagosome, Infect. Immun. 75 (2007) 592–603.
[76] E. Hervet, X. Charpentier, A. Vianney, J.C. Lazzaroni, C. Gilbert, D. Atlan, P. Doublet, Protein kinase LegK2 is a type IV secretion system effector involved in endoplasmic reticulum recruitment and intracellular replication of *Legionella pneumophila*, Infect. Immun. 79 (2011) 1936–1950.

8.2 Article n°2

Allombert et al. BMC Microbiology 2014, 14:69
http://www.biomedcentral.com/1471-2180/14/69

BMC Microbiology

RESEARCH ARTICLE Open Access

Survival of taylorellae in the environmental amoeba *Acanthamoeba castellanii*

Julie Allombert[1,2,3,4,5], Anne Vianney[1,2,3,4,5], Claire Laugier[6], Sandrine Petry[6*] and Laurent Hébert[6]

Abstract

Background: *Taylorella equigenitalis* is the causative agent of contagious equine metritis, a sexually-transmitted infection of Equidae characterised in infected mares by abundant mucopurulent vaginal discharge and a variable degree of vaginitis, cervicitis or endometritis, usually resulting in temporary infertility. The second species of the *Taylorella* genus, *Taylorella asinigenitalis*, is considered non-pathogenic, although mares experimentally infected with this bacterium can develop clinical signs of endometritis. To date, little is understood about the basic molecular virulence and persistence mechanisms employed by the *Taylorella* species. To clarify these points, we investigated whether the host-pathogen interaction model *Acanthamoeba castellanii* was a suitable model for studying taylorellae.

Results: We herein demonstrate that both species of the *Taylorella* genus are internalised by a mechanism involving the phagocytic capacity of the amoeba and are able to survive for at least one week inside the amoeba. During this one-week incubation period, taylorellae concentrations remain strikingly constant and no overt toxicity to amoeba cells was observed.

Conclusions: This study provides the first evidence of the capacity of taylorellae to survive in a natural environment other than the mammalian genital tract, and shows that the alternative infection model, *A. castellanii*, constitutes a relevant alternative system to assess host-pathogen interactions of taylorellae. The survival of taylorellae inside the potential environmental reservoir *A. castellanii* brings new insight, fostering a broader understanding of taylorellae biology and its potential natural ecological niche.

Keywords: *Taylorella equigenitalis*, *Taylorella asinigenitalis*, Contagious equine metritis, *Acanthamoeba castellanii*, Endosymbiont

Background

Taylorella equigenitalis is a Gram-negative betaproteobacterium of the Alcaligenaceae family. It is the causative agent of Contagious Equine Metritis (CEM), a World Organisation for Animal Health (OIE), notifiable disease. CEM is a highly contagious sexually-transmitted infection in horses that may lead to abundant mucopurulent vaginal discharge and variable degrees of vaginitis, endometritis and cervicitis [1], causing temporary infertility and occasional abortions have been reported [2]. The presence of *T. equigenitalis* in stallions does not cause clinical signs and long-term asymptomatic carrier mares have also been reported [3]. These symptomless carrier animals are generally considered to play a key role in the dissemination of CEM during mating [4]. Unknown prior to its identification in 1977 [5,6], it is generally assumed that the worldwide dissemination of *T. equigenitalis* was the result of the shipment of carrier stallions and mares both within and between countries [2]. As a consequence, many countries implemented strict regulations and disease surveillance, making CEM one of the most regulated equine diseases worldwide [7]. CEM continues to have a major impact on the economy of the equine industry, limiting movement and trade of horses internationally [2].

The second species of taylorellae—*Taylorella asinigenitalis*—was first reported in 2001 following its isolation from the genital tract of two jacks and a mare [8,9]. Although closely related to *T. equigenitalis* phenotypically [8] and in terms of its genomic characteristics [10], *T. asinigenitalis* has never been reported to cause clinical signs of disease under natural conditions, and is thus considered non-pathogenic. It is important to note that

* Correspondence: sandrine.petry@anses.fr
[6]ANSES, Dozulé Laboratory for Equine Diseases, Bacteriology and Parasitology Unit, 14430 Goustranville, France
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2014 Allombert et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/2.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

despite this apparent lack of pathogenicity, mares experimentally infected with *T. asinigenitalis* can develop clinical signs of metritis and cervicitis [9], and that *T. asinigenitalis* can persist for a long time in donkeys [11]. We therefore consider *T. asinigenitalis* a potential emerging pathogen that needs to be monitored.

To date, the evolutionary histories of the taylorellae remain unclear. Analysis of the genomes of *T. equigenitalis* and *T. asinigenitalis* reveals that both species share a very similar gene repertoire (≈ 85% of the total genes predicted are common to both *Taylorella* species) but surprisingly, little DNA sequence identity [10,12]. The recently-described taylorellae MultiLocus Sequence Typing (MLST) scheme, which reveals the highly clonal dissemination of taylorellae (especially *T. equigenitalis*), combined with the emergence of new STs over time suggest that Equidae could be contaminated by an external source of *Taylorella* originating from an as yet unidentified natural ecological reservoir. Moreover, genome sequence analysis of Alcaligenaceae members suggests that taylorellae diverged by genome reduction from an ancestor which probably had a less specific ecological niche [13] than present day Taylorellae.

Due to the lack of a suitable host model and molecular genetic tools to manipulate taylorellae, the molecular mechanisms involved in the pathogenicity of taylorellae and their host colonisation capacity remain largely unknown. The main information available to date is (i) that *T. equigenitalis* is able to invade and replicate in equine dermal cells [14] and (ii) that several genes identified *in silico* as potentially involved in bacterium-host interactions such as genes coding for secretion systems and for proteins containing eukaryotic domains, are present in the taylorellae genomes [10,12].

Since the discovery that *Legionella pneumophila* can infect and replicate in free-living amoebae [15], there has been an increasing interest in these professional phagocytes which have been used as an alternative host model to study various aspects of host-pathogen interactions and to characterise bacterial virulence mechanisms [16]. Among the bacteria that have evolved to resist destruction by free-living amoebae (hereinafter called ARB for amoeba-resistant bacteria) [16] we can distinguish (i) true symbionts, which cohabit with the amoeba and maintain a stable host-parasite ratio over a specific period and (ii) pathogens able to lyse the amoebae [17]. As a protective environment for ARB, free-living protozoa represent a potential bacterial reservoir and may act as a vector for bacterial dissemination and colonisation of new niches [18].

In this study, we examined the potential of the bactivorous amoeba *A. castellanii* as a host model for *T. equigenitalis* and *T. asinigenitalis*. We assessed (i) the survival capacity of taylorellae in the presence of *A. castellanii*, (ii) the internalisation of taylorellae by *A. castellanii* and (iii) the impact of taylorellae on *Acanthamoeba castellanii* cultures.

Methods

Bacterial strains and growth conditions

The bacterial strains used in this study were as follows: *Escherichia coli* strain DH5α (Invitrogen), *L. pneumophila* serogroup 1 strain Lens [19] and the two recently-sequenced strains *T. equigenitalis* MCE9 [20] and *T. asinigenitalis* MCE3 [10]. The axenic *A. castellanii* strain used in this study was derived from an environmental isolate [21]. *Escherichia coli* was grown at 37°C in Luria-Bertani (LB) medium. *Legionella pneumophila* was grown at 30°C either on buffered charcoal yeast extract (BCYE) agar [10 $g.L^{-1}$ ACES (N-(2-Acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid); 10 $g.L^{-1}$ Yeast extract; 2 $g.L^{-1}$ Charcoal; 15 $g.L^{-1}$ agar; 0.4 $g.L^{-1}$ L-cystein; 0.25 $g.L^{-1}$ $FeNO_3$; pH 6.9] or in BYE liquid medium. *Taylorella equigenitalis* and *T. asinigenitalis* were grown at 37°C in 5% (v/v) CO_2 in air for 48 h and 72 h respectively on ready-to-use chocolate agar media (AES Chemunex, Combourg, France). *Acanthamoeba castellanii* cells were grown at 30°C on PYG medium [0.75% (w/v) proteose peptone, 0.75% (w/v) yeast extract and 1.5% (w/v) glucose] [22] and split once a week.

Bacterial survival following *A. castellanii* co-infection

Acanthamoeba castellanii cells were infected with *E. coli*, *L. pneumophila*, *T. equigenitalis* or *T. asinigenitalis* at an MOI (multiplicity of infection) of 50. Infections were synchronised by spinning the bacteria (880 × g, 10 min) and extracellular bacteria removed by washing. Extracellular bacteria were quantified by plating the supernatant, while amoeba-associated bacteria were quantified by plating once the amoebae were lysed (Triton X-100 0.04%, 30 min on ice and vigorous pipetting).

Bacteria uptake assay by trypan blue quenching

Escherichia coli, *T. equigenitalis, T. asinigenitalis* and *L. pneumophila* phagocytosis by *A. castellanii* was measured by trypan blue quenching as previously described [23]. Briefly, bacterial suspensions of *T. equigenitalis* or *T. asinigenitalis* prepared from plate-grown organisms, together with overnight cultures of *E. coli* and 3-day cultures of *L. pneumophila,* were labelled with 5-(and 6-) carboxyfluorescein succinimidyl ester (FSE). *Acanthamoeba castellanii* monolayers (5×10^5 cells/well) were infected with 2.5×10^7 fluorescent bacteria (MOI 50) for each species. Phagocytosis inhibitors were obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO), solubilised in DMSO and used at a concentration of 10 μM for Cytochalasin D (CytoD) and 2 μM for Wortmannin (Wort). After centrifugation (880 × g, 10 min) to initiate cell-bacterium contact, the plates were incubated at 30°C for 30 min. The medium

was then replaced by 50 μl per well of trypan blue solution to quench the fluorescence of non-internalised bacteria. After 1 min of incubation, the fluorescence of internalised bacteria was measured on an Infinite M200 Pro (Tecan, Männedorf, Germany) at an excitation level of 485 nm and an emission of 530 nm.

Cytotoxicity to *A. castellanii*

The number of viable *A. castellanii* cells remaining after infection with *E. coli*, *T. equigenitalis*, *T. asinigenitalis* or *L. pneumophila* were counted as previously described [21]. *Acanthamoeba castellanii* monolayers were infected for each bacterium with an MOI of 50. Cell-bacterium contact was initiated by centrifugation (880 × *g*, 10 min) and the plate was incubated at 37°C in 5% (v/v) CO_2 in air. At indicated time points, the monolayers were washed four times with protease-yeast (PY) extract medium, and then 100 μl of PY medium containing 10% (vol/vol) of Alamar blue (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) was added to tested wells. After a 12-hour incubation, the OD_{570} and OD_{600} values were determined. The relative degrees of amoeba mortality were calculated by the following equation: $[1 - (\text{mean}(OD_{570} - OD_{600})_{\text{infected}}/\text{mean}(OD_{570} - OD_{600})_{\text{uninfected}})] \times 100$.

Confocal laser scanning observations

Acanthamoeba castellanii cells were seeded onto sterile glass coverslips in 6-well plates at 5×10^6 per well in PY medium and allowed to adhere overnight. Monolayers were infected at an MOI of 50 with fluorescein-labelled *T. equigenitalis* or *T. asinigenitalis*. Infections were synchronised by spinning the bacteria (880 × *g*, 10 min) and extracellular bacteria were removed by washing. Following 4 h of incubation at 30°C, cells were fixed with 4% paraformaldehyde (30 min, 4°C), permeabilised with ice-cold methanol (2 min), washed three times and labelled with rhodamine phalloidin. Coverslips were examined with an inverted confocal microscope (Axiovert 200 M; Zeiss, Thornwood, NJ) equipped with a 63X phase-contrast objective lens (Plan Neofluar [Zeiss]; aperture, 1.4, oil).

Light microscope observations of *A. castellanii* infected monolayers

Acanthamoeba castellanii monolayers were infected at an MOI of 50 with *E. coli*, *L. pneumophila*, *T. equigenitalis* or *T. asinigenitalis*. Cell-bacterium contact was initiated by centrifugation (880 × *g*, 10 min) and incubated at 37°C in 5% (v/v) CO_2 in air. Monolayers were observed with a Nikon inverted microscope coupled with an Olympus camera (DP120).

Influence of heat-killed *A. castellanii* and *A. castellanii* culture supernatant on taylorellae growth

Microfiltered (0.22 μm) supernatant of *A. castellanii* cultured in PYG medium for 5 days and heat-killed *A. castellanii* cells (100°C, 30 min) were inoculated with a *T. equigenitalis* or *T. asinigenitalis* strain at an OD_{600} of 0.1, 0.2 and 0.5. These cultures were incubated for 5 days at 37°C, either in 5% (v/v) CO_2 in air in a static state or aerobically under agitation (200 rpm). Bacterial growth was measured over time by optical density measurement and plate counts.

Results

Evolution of taylorellae concentrations in co-culture with *A. castellanii*

To characterise the capacity of *T. equigenitalis* and *T. asinigenitalis* to persist within the free-living amoeba *A. castellanii*, we performed *A. castellanii*-taylorellae co-cultures and determined the evolution of extracellular (Figure 1A) and amoeba-associated (Figure 1B) bacterial concentrations over time. *Escherichia coli* was used as an amoeba-sensitive control bacterium and *L. pneumophila*, which is able to replicate and evade amoebae, was used as an amoeba-resistant control bacterium. The same evolution of *T. equigenitalis* and *T. asinigenitalis* concentrations was observed over the 7 days of co-culture with *A. castellanii*: the extracellular taylorellae concentrations decreased about one fold over the experiment period, while the amoeba-associated taylorellae concentrations remained strikingly constant throughout. By comparison, the extracellular and amoeba-associated concentrations of *L. pneumophila* rapidly rose after two days of incubation and then declined as expected up to and including day 7, due to the nutrient limitation of the culture medium. As expected, the amount of extracellular and amoeba-associated *E. coli* declined drastically over time during co-culture with *A. castellanii*. These results show that *T. equigenitalis* and *T. asinigenitalis* persist in association with *A. castellanii* over time.

Acanthamoeba castellanii-associated taylorellae are located intracellularly

To determine the location of the amoeba-associated taylorellae, confocal laser scanning micrographs of *A. castellanii* cells were performed four hours after infection with fluorescein-labelled *T. equigenitalis* (Figure 2A) or *T. asinigenitalis* (Figure 2B). For both taylorellae, we observed exclusively intracellular bacteria, mainly grouped in clusters. No bacterium was observed attached to the cell surface of the amoeba. Our data show that the persistent amoeba-associated taylorellae are located within the cytoplasm of *A. castellanii*.

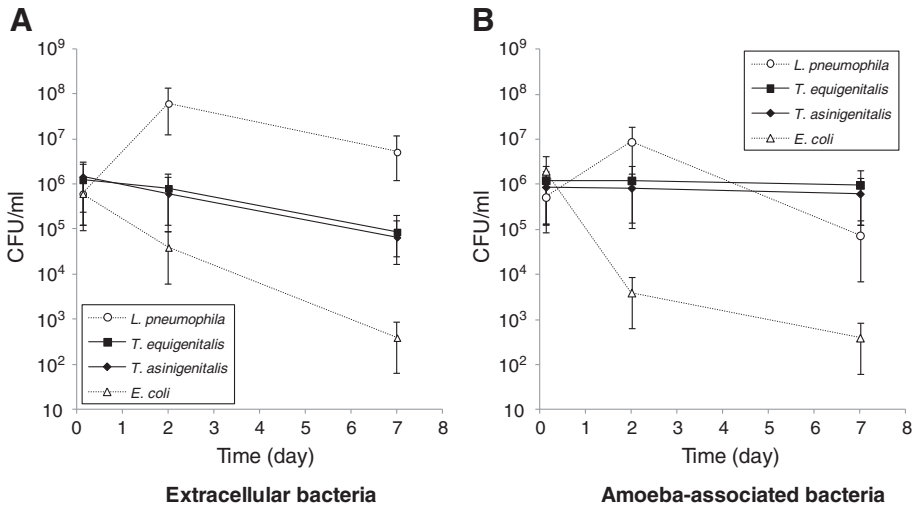


Figure 1 *Taylorella equigenitalis* and *T. asinigenitalis* persist within *A. castellanii* over time. Evolution of extracellular **(A)** and amoeba-associated **(B)** bacterial concentrations following co-cultures with *A. castellanii* of *T. equigenitalis*, *T. asinigenitalis*, *E. coli* or *L. pneumophila*. Amoebae were infected at an MOI of 50 and at indicated time, extracellular and amoeba-associated bacteria following lysis were quantified by plating. The results are expressed in CFU/ml and each bar represents the geometric mean of triplicate wells. The standard deviations are represented by error bars.

Actin polymerisation and phosphoinositide 3-kinase play a key role in taylorellae internalisation

To investigate the uptake mechanism involved in taylorellae internalisation, two chemical inhibitors were used: Cytochalasin D (CytoD), a potent inhibitor of actin polymerisation, and Wortmannin (Wort), an inhibitor of phosphoinositide 3-kinases (PI3K). Bacterial uptake in amoebae was measured by trypan blue quenching of fluorescein-labelled *T. equigenitalis*, *T. asinigenitalis*, *E. coli* or *L. pneumophila*. Fluorescein-labelled bacteria were used to infect *A. castellanii* when CytoD or Wort were present, as indicated. After contact, trypan blue was added to quench the fluorescence of non-internalised bacteria and the fluorescence, which was representative of bacterial internalisation by amoebae, was measured (Figure 3). For the four tested bacterial species, amoebae exposed to CytoD and Wort show a decrease in fluorescence compared to untreated amoebae. The decrease in fluorescence was comparable for all four bacterial species and for both phagocytosis inhibitors. These results suggest that taylorellae are internalised by an uptake mechanism such as phagocytosis, which is dependent upon actin polymerisation and PI3K.

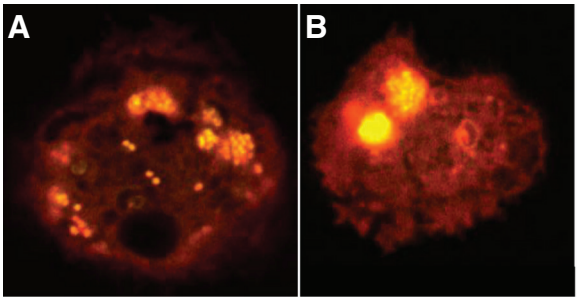


Figure 2 Location of *T. equigenitalis* and *T. asinigenitalis* within *A. castellanii*. Confocal laser scanning micrographs of *A. castellanii* cells at 4 h post-infection with fluorescein-labelled *T. equigenitalis* **(A)** or *T. asinigenitalis* **(B)**. Similar results were observed in two independent experiments.

Taylorellae do not obviously alter *A. castellanii* physiology

In order to visualise the impact of taylorellae on *A. castellanii* physiology, we monitored the evolution of *A. castellanii* morphology over a 7-day incubation period in co-culture with *T. equigenitalis*, *T. asinigenitalis*, *E. coli* or *L. pneumophila* (Figure 4). When *A. castellanii* was cultivated with the amoeba-sensitive *E. coli* bacteria, we observed that the number of amoebae remained stable and that amoeba cells conserved their typical trophozoite appearance, although they became smaller over time probably as a result of the nutrient limitation of the culture medium. In the presence of the amoeba-resistant *L. pneumophila* bacteria, we observed a sharp drop in number of amoeba and a drastic change in the surviving *A. castellanii* cell morphology, which gradually shifted to a stress-induced cyst form. The results obtained for co-cultures with taylorellae were similar to those obtained with *E. coli*, with the observation of a conserved trophozoite appearance, a relatively stable concentration of amoeba and a decrease in the size of amoebic cells. There was no evidence of amoebic cyst formation induced by the presence of *T. equigenitalis* or *T. asinigenitalis*.

To assess the toxicity of bacterial species to *A. castellanii*, amoebae were infected at an MOI of 50 with *T.*

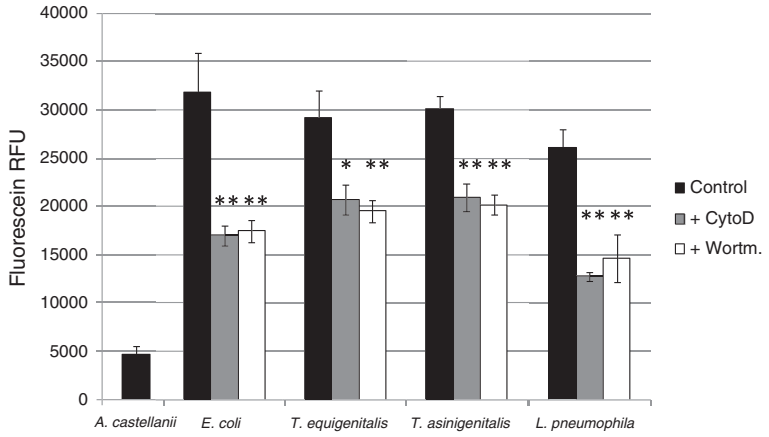


Figure 3 Taylorellae are actively phagocytised by *A. castellanii*. Bacterial uptake assay by trypan blue quenching. *Acanthamoeba castellanii* cells were infected with fluorescein-labelled *E. coli*, *T. equigenitalis*, *T. asinigenitalis* or *L. pneumophila* at an MOI of 50, in the presence, when indicated, of either 10 μM of cytochalasin D—an actin polymerization inhibitor (+CytoD)—or 2 μM of Wortmanin—a PI3K inhibitor (+Wort). After 30 min of incubation, the medium was replaced by trypan blue solution to quench the fluorescence of non-internalised bacteria. The fluorescence of internalised bacteria was measured using an excitation level of 485 nm and an emission of 530 nm. Fluorescence data were corrected for differences in labelling efficiency between the tested strains. Each bar represents the mean of triplicate wells and error bars represent the standard deviations. Significant differences from the control, determined by an unpaired tailed Student *t* test, are indicated by *($p = 0.058$) and **($p < 0.05$).

equigenitalis, *T. asinigenitalis*, *E. coli* or *L. pneumophila*. The viability of amoebic cells in infected monolayers was quantified at indicated time points by using Alamar blue dye (Figure 5). The cytotoxicity of *L. pneumophila* reached 80% after one week of incubation, whereas the cytotoxicity of *T. equigenitalis*, *T. asinigenitalis* and *E. coli* to *A. castellanii* did not exceed 10% after one week. These data reveal that taylorellae have little cytotoxicity effects on *A. castellanii*.

Taylorellae are not able to grow on dead *A. castellanii* cells

To determine the conditions which allowed taylorellae to persist in the presence of amoebae, we measured *T. equigenitalis* and *T. asinigenitalis* concentrations following 48 h incubation in the presence of either i) PYG medium, ii) PYG medium in which amoebae were previously cultured for 5 days and iii) heat-killed amoebic cells. No taylorellae growth was observed under any of these conditions (data not shown).

Discussion

Free-living amoebae are ubiquitous predators that control microbial communities and that have been isolated from various natural sources such as freshwater, soil and air [24]. Following studies on the interaction between ARB pathogens (including *Legionella* and *Chlamydia*) and free-

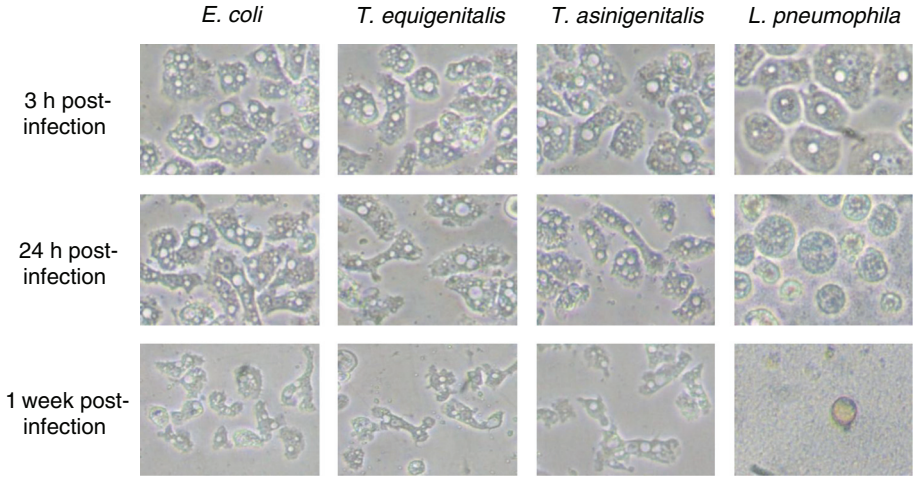


Figure 4 Evolution of *A. castellanii* monolayers following bacterial infections. Following infection with *E. coli*, *T. equigenitalis*, *T. asinigenitalis* or *L. pneumophila*, at an MOI of 50, *A. castellanii* monolayers were visualised at an indicated time with an inverted microscope.

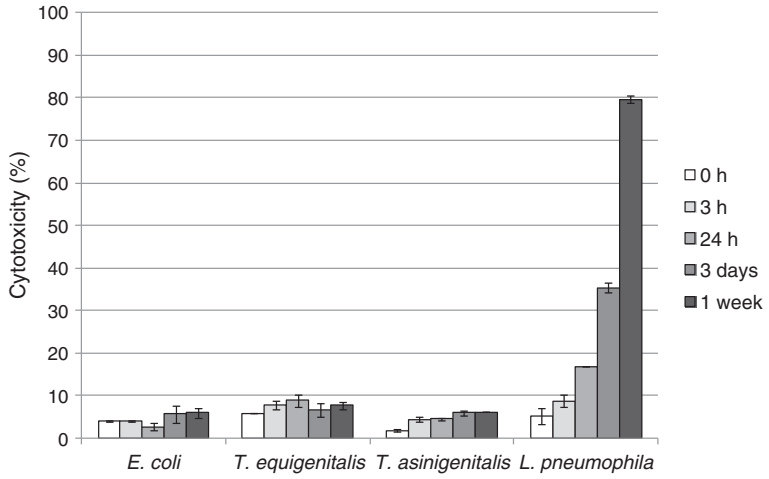


Figure 5 Taylorellae exhibit low cytotoxicity to *A. castellanii*. *Acanthamoeba castellanii* were infected with *E. coli*, *T. equigenitalis*, *T. asinigenitalis* or *L. pneumophila* with an MOI of 50. The viability of amoebic cells in infected monolayers was quantified at an indicated time using Alamar blue dye. These data are representative of two independent experiments done in triplicate. Each bar represents the mean of triplicate wells; error bars represent the standard deviations.

living amoebae, it has been suggested that ARB may use free-living amoebae as "training grounds" for the selection of mechanisms of cellular immune evasion [24,25]. In this study, we investigated the interaction of *T. equigenitalis* and *T. asinigenitalis* with the free-living amoeba, *A. castellanii* and showed that taylorellae are able to resist the microbicidal mechanisms of amoebae for a period of at least one week (Figure 1), therefore showing for the first time that taylorellae can be classified as an ARB [16]. However, our results have shown that taylorellae do not induce amoebic death (Figure 4) or cytotoxicity (Figure 5) and indicate that taylorellae are not likely to be considered as amoeba-killing organisms [16].

Confocal microscopic observations of the *A. castellanii*-taylorellae co-cultures also showed that *T. equigenitalis* and *T. asinigenitalis* are found within the cytoplasm of the amoeba (Figure 2), which indicates that taylorellae do not only evade amoebic phagocytosis, but actually persist inside the cytoplasm of this bactivorous amoeba. Moreover, the fact that the phagocytosis inhibitors Wortmannin and Cytochalasin D decrease taylorellae uptake by *A. castellanii* (Figure 3) reveals that actin polymerisation and PI3K are involved in taylorellae uptake. This suggests that the internalisation of taylorellae does not result from a specific active mechanism of entry driven by taylorellae, but rather relies on a mechanism involving the phagocytic capacity of the amoeba itself. More investigation on this subject is required to determine the precise effect of taylorellae on organelle trafficking inside the amoeba.

Despite the observed persistence of taylorellae inside amoebae, our results do not allow us to determine whether taylorellae are able to replicate inside an amoeba. During the 7 d of the *A. castellanii*-taylorellae co-cultures, we observed a strikingly constant concentration of *T. equigenitalis* and *T. asinigenitalis*. This phenomenon may be explained either by the existence of a balance between taylorellae multiplication and the bactericidal effect of the amoeba, or by a concurrent lack of taylorellae multiplication and bactericidal effect of the amoeba. Bacterial clusters observed inside *A. castellanii* could be consistent with taylorellae replication within the amoeba, but given that these photographs were taken only 4 h after the co-infection, it seems unlikely that the clusters were the result of intra-amoebic multiplication of taylorellae. Moreover, we observed similar fluorescence levels between taylorellae, whereas the progressive halving of fluorescence within daughter cells following each cell division would have generated differing fluorescence levels between bacteria if bacterial replication had occurred. It appears that this clustering phenomenon is more likely due to the presence of aggregated taylorellae prior to entry into *A. castellanii* or to a trafficking route inside the amoeba that causes gathering of taylorellae at a single location.

In this context, assuming that taylorellae are able to replicate inside amoebae, we can conclude that this phenomenon remains limited and is probably tightly regulated by taylorellae. In order to preserve the protective niche represented by the host cell for as long a duration as possible, it is important that the bacteria do not consume too many nutrients at the detriment of host survival [26]. This statement is consistent with both the limited number of carbon sources which are able to be metabolised by taylorellae [10] and with the absence of observed taylorellae growth in the presence of dead amoebae. Metabolic regulation could be involved in the asymptomatic persistence

over several years of taylorellae observed in Equidae [2,27], during which taylorellae could be concealed inside host cells as suggested by the observation of equine dermal cells invasion by *T. equigenitalis* [14]. In this regard, the fact that taylorellae do not induce lysis and that a stable host-parasite ratio remains constant over time, both suggest that taylorellae could be considered a true amoebic endosymbiont, historically defined by Büchner in 1953 as "a regulated, harmonious cohabitation of two nonrelated partners, in which one of them lives in the body of the other" [28].

As highlighted by other intracellular pathogens, protozoan hosts are now considered potential reservoirs and vectors for dissemination of pathogens to mammalian hosts. To date, the natural reservoir of taylorellae is still unknown and it is generally assumed that taylorellae have a limited capacity for survival outside the equine genital tract [29]. In this context, the survival of *T. equigenitalis* and *T. asinigenitalis* in free-living amoebae indicates that protozoa may serve as an environmental reservoir for taylorellae. The fact that this capacity is shared by both species of the *Taylorella* genus also suggests that this capacity may have been inherited from a common ancestor. It will therefore be important to broaden our comprehension of taylorellae biology to determine the role played by free-living amoebae in the persistence and dispersal of taylorellae in the environment and to determine, for example, if taylorellae could persist within amoebae during encystment and survive exposure to harsh conditions due to the protection afforded by its amoebic host. We believe that the increasing number of metagenome sequence data sets derived from various environments offer promising ways of identifying taylorellae or taylorellae-related bacteria that will contribute to a clearer understanding of taylorellae biology and to novel insights into the evolution of these microorganisms in the near future. Moreover, it appears interesting in this perspective to establish a parallel between taylorellae and the obligate intracellular chlamydiae that were long recognised only as a phylogenetically distinct, small group of closely related microorganisms before the finding that they were symbionts of free-living amoebae and other eukaryotic hosts, leading to a radical change in the perception of chlamydial diversity [30].

Lateral gene transfer (LGT) is considered a key process in the genome evolution of amoebae and amoeba-associated bacteria. The recent analysis of genes predicted to be derived from LGT in the genome of *Acanthamoeba sp.* [31] showed the presence of 28 genes potentially originating from Betaproteobacteria. Although this analysis did not reveal the presence of genes potentially from taylorellae in *Acanthamoeba*, these results underline the historical relatedness between free-living amoebae and Betaproteobacteria whose different members have been described as naturally infecting free-living amoebae [16,32,33]. On the other hand, no amoeba-related genes were identified during the analysis of taylorellae genomes [10,12]. This observation seems coherent with the plausible evolutionary path of taylorellae reported by Gosh et al., [13] which suggests that the evolution of the taylorellae genome is mainly based on a reduction in size, with very few new gene acquisitions since taylorellae's separation from the last Alcaligenaceae common ancestor [13].

The capacity of taylorellae to invade and persist inside amoebae supports the usefulness of this inexpensive and easy-to-manipulate host model to assess various aspects of host-pathogen interactions and to characterise the bacterial persistence mechanisms of taylorellae. However, it should be noted that both *T. equigenitalis* and *T. asinigenitalis* behaved in exactly the same way in relation to *A. castellanii*. It is therefore unlikely that all of the variations in virulence level observed in Equidae may be identified. Now that this model has been described, the main limitation to date when studying taylorellae host-pathogen interactions remains the absence of tools needed to genetically manipulate the taylorellae.

Conclusion

In this study, we investigated the interaction of *T. equigenitalis* and *T. asinigenitalis* with the free-living amoeba, *A. castellanii*. Taken together, our results show that both taylorellae are able to survive for a period of at least one week in amoebic vacuoles without causing overt toxicity to amoeba cells. The *A. castellanii*–taylorellae co-cultures could therefore be used as a simple and rapid model to assess host-pathogen interactions and to characterise taylorellae bacterial persistence mechanisms. Furthermore, this study provides the first evidence of the capacity of taylorellae to survive in a natural environment other than the mammalian genital tract. A full description of this capacity to interact with another eukaryotic host will undoubtedly contribute to a clearer understanding of taylorellae biology and provide new insight into the evolution of these microorganisms.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

JA Performed and designed the experiments and analyzed the data. JA, AV and LH conceived the study. SP and CL participated in the design of the study and helped to draft the manuscript. LH wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

Julie Allombert was supported by a PhD fellowship from the French Ministry of Higher Education and Research. This work was supported by grants from the European Regional Development Fund and by the Basse-Normandie Regional Council (http://www.cr-basse-normandie.fr). ANSES's Dozulé Laboratory for Equine Diseases is a member of the Hippolia Foundation. We also wish to thank Delphine Libby-Claybrough, professional translator and native English speaker, for reviewing this article prior to publication.

Author details
[1]International Center for Infectiology Research (CIRI) Legionella pathogenesis group, Université de Lyon, Lyon, France. [2]Inserm, U1111, Lyon, France. [3]Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France. [4]Université Lyon 1, Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), Lyon, France. [5]CNRS, UMR5308, Lyon, France. [6]ANSES, Dozulé Laboratory for Equine Diseases, Bacteriology and Parasitology Unit, 14430 Goustranville, France.

Received: 27 January 2014 Accepted: 13 March 2014
Published: 19 March 2014

References

1. Wakeley PR, Errington J, Hannon S, Roest HIJ, Carson T, Hunt B, Sawyer J, Heath P: **Development of a real time PCR for the detection of *Taylorella equigenitalis* directly from genital swabs and discrimination from *Taylorella asinigenitalis*.** *Vet Microbiol* 2006, **118**(3–4):247–254.
2. Timoney PJ: **Horse species symposium: contagious equine metritis: an insidious threat to the horse breeding industry in the United States.** *J Anim Sci* 2011, **89**(5):1552–1560.
3. Matsuda M, Moore JE: **Recent advances in molecular epidemiology and detection of *Taylorella equigenitalis* associated with contagious equine metritis (CEM).** *Vet Microbiol* 2003, **97**(1–2):111–122.
4. Luddy S, Kutzler MA: **Contagious equine metritis within the United States: a review of the 2008 outbreak.** *J Equine Vet Sci* 2010, **30**(8):393–400.
5. Crowhurst RC: **Genital infection in mares.** *Vet Rec* 1977, **100**(22):476.
6. Timoney PJ, Ward J, Kelly P: **A contagious genital infection of mares.** *Vet Rec* 1977, **101**(5):103.
7. Schulman ML, May CE, Keys B, Guthrie AJ: **Contagious equine metritis: artificial reproduction changes the epidemiologic paradigm.** *Vet Microbiol* 2013, **167**(1–2):2–8.
8. Jang S, Donahue J, Arata A, Goris J, Hansen L, Earley D, Vandamme P, Timoney P, Hirsh D: ***Taylorella asinigenitalis* sp. nov., a bacterium isolated from the genital tract of male donkeys (*Equus asinus*).** *Int J Syst Evol Microbiol* 2001, **51**(3):971–976.
9. Katz JB, Evans LE, Hutto DL, Schroeder-Tucker LC, Carew AM, Donahue JM, Hirsh DC: **Clinical, bacteriologic, serologic, and pathologic features of infections with atypical *Taylorella equigenitalis* in mares.** *J Am Vet Med Assoc* 2000, **216**(12):1945–1948.
10. Hébert L, Moumen B, Pons N, Duquesne F, Breuil M-F, Goux D, Batto J-M, Laugier C, Renault P, Petry S: **Genomic characterization of the *Taylorella* genus.** *PLoS One* 2012, **7**(1):e29953.
11. Donahue JM, Timoney PJ, Carleton CL, Marteniuk JV, Sells SF, Meade BJ: **Prevalence and persistence of *Taylorella asinigenitalis* in male donkeys.** *Vet Microbiol* 2012, **160**(3–4):435–442.
12. Hauser H, Richter DC, van Tonder A, Clark L, Preston A: **Comparative genomic analyses of the Taylorellae.** *Vet Microbiol* 2012, **159**(1–2):195–203.
13. Ghosh W, Alam M, Roy C, Pyne P, George A, Chakraborty R, Majumder S, Agarwal A, Chakraborty S, Majumdar S, Gupta SK: **Genome implosion elicits host-confinement in *Alcaligenaceae*: evidence from the comparative genomics of *Tetrathiobacter kashmirensis*, a pathogen in the making.** *PLoS One* 2013, **8**(5):e64856.
14. Bleumink-Pluym N, ter Laak E, Houwers D, van der Zeijst B: **Differences between *Taylorella equigenitalis* strains in their invasion of and replication in cultured cells.** *Clin Diagn Lab Immunol* 1996, **3**(1):47–50.
15. Rowbotham TJ: **Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae.** *J Clin Pathol* 1980, **33**(12):1179–1183.
16. Greub G, Raoult D: **Microorganisms resistant to free-living amoebae.** *Clin Microbiol Rev* 2004, **17**(2):413–433.
17. Taylor M, Mediannikov O, Raoult D, Greub G: **Endosymbiotic bacteria associated with nematodes, ticks and amoebae.** *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012, **64**(1):21–31.
18. Snelling WJ, Moore JE, McKenna JP, Lecky DM, Dooley JS: **Bacterial-protozoa interactions; an update on the role these phenomena play towards human illness.** *Microbes Infect* 2006, **8**(2):578–587.
19. Cazalet C, Rusniok C, Brüggemann H, Zidane N, Magnier A, Ma L, Tichit M, Jarraud S, Bouchier C, Vandenesch F, Kunst F, Etienne J, Glaser P, Buchrieser C: **Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity.** *Nat Genet* 2004, **36**(11):1165–1173.
20. Hébert L, Moumen B, Duquesne F, Breuil M-F, Laugier C, Batto J-M, Renault P, Petry S: **Genome sequence of *Taylorella equigenitalis* MCE9, the causative agent of contagious equine metritis.** *J Bacteriol* 2011, **193**(7):1785.
21. Hervet E, Charpentier X, Vianney A, Lazzaroni JC, Gilbert C, Atlan D, Doublet P: **Protein kinase LegK2 is a type IV secretion system effector involved in endoplasmic reticulum recruitment and intracellular replication of *Legionella pneumophila*.** *Infect Immun* 2011, **79**(5):1936–1950.
22. Khan NA: **Pathogenicity, morphology, and differentiation of *Acanthamoeba*.** *Curr Microbiol* 2001, **43**(6):391–395.
23. Charpentier X, Gabay JE, Reyes M, Zhu JW, Weiss A, Shuman HA: **Chemical genetics reveals bacterial and host cell functions critical for type IV effector translocation by *Legionella pneumophila*.** *PLoS Pathog* 2009, **5**(7):e1000501.
24. Molmeret M, Horn M, Wagner M, Santic M, Abu Kwaik Y: **Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens.** *Appl Environ Microbiol* 2005, **71**(1):20–28.
25. Waterfield NR, Wren BW, Ffrench-Constant RH: **Invertebrates as a source of emerging human pathogens.** *Nat Rev Microbiol* 2004, **2**(10):833–841.
26. Joseph B, Goebel W: **Life of *Listeria monocytogenes* in the host cells' cytosol.** *Microbes Infect* 2007, **9**(10):1188–1195.
27. Breuil MF, Duquesne F, Laugier C, Petry S: **Phenotypic and 16S ribosomal RNA gene diversity of *Taylorella asinigenitalis* strains isolated between 1995 and 2008.** *Vet Microbiol* 2011, **148**(2–4):260–266.
28. Büchner P: *Endosymbiose der Tiere mit Pflanzlichen Mikroorganismen.* Basel, Switzerland: Gebundene Ausgabe; 1953.
29. Timoney PJ, Harrington A, McArdle J, O'Reilly P: **Survival properties of the causal agent of contagious equine metritis 1977.** *Vet Rec* 1978, **102**(7):152.
30. Horn M: ***Chlamydiae* as symbionts in eukaryotes.** *Annu Rev Microbiol* 2008, **62**(1):113–131.
31. Clarke M, Lohan AJ, Liu B, Lagkouvardos I, Roy S, Zafar N, Bertelli C, Schilde C, Kianianmomeni A, Bürglin TR, Frech C, Turcotte B, Kopec KO, Synnott JM, Choo C, Paponov I, Finkler A, Heng Tan CS, Hutchins AP, Weinmeier T, Rattei T, Chu JS, Gimenez G, Irimia M, Rigden DJ, Fitzpatrick DA, Lorenzo-Morales J, Bateman A, Chiu CH, Tang P: **Genome of *Acanthamoeba castellanii* highlights extensive lateral gene transfer and early evolution of tyrosine kinase signaling.** *Genome Biol* 2013, **14**(2):R11.
32. Inglis TJ, Rigby P, Robertson TA, Dutton NS, Henderson M, Chang BJ: **Interaction between *Burkholderia pseudomallei* and *Acanthamoeba* species results in coiling phagocytosis, endamebic bacterial survival, and escape.** *Infect Immun* 2000, **68**(3):1681–1686.
33. Marolda CL, Hauröder B, John MA, Michel R, Valvano MA: **Intracellular survival and saprophytic growth of isolates from the *Burkholderia cepacia* complex in free-living amoebae.** *Microbiology* 1999, **145**(Pt 7):1509–1517.

doi:10.1186/1471-2180-14-69
Cite this article as: Allombert *et al.*: Survival of taylorellae in the environmental amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *BMC Microbiology* 2014 **14**:69.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- **Convenient online submission**
- **Thorough peer review**
- **No space constraints or color figure charges**
- **Immediate publication on acceptance**
- **Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar**
- **Research which is freely available for redistribution**

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

BioMed Central

Rôles des voies de signalisation à di-GMP cyclique chez *Legionella pneumophila*

Legionella pneumophila est une bactérie aquatique qui prolifère en se répliquant à l'intérieur de cellules amibiennes. Elle peut persister dans ces environnements en vivant en communauté sous forme de biofilms. L'inhalation par l'Homme d'eau contaminée, vaporisée par les réseaux d'eau chaude ou les tours aéro-réfrigérantes, peut mener à l'infection des macrophages pulmonaires qui se traduit par une grave pneumonie appelée légionellose. Le di-GMP cyclique (diGMPc) est impliqué, chez diverses espèces bactériennes, dans la transition entre les modes de vie mobiles et sessiles, et chez certains pathogènes, dans la régulation de la virulence. Mon travail de thèse vise à démontrer l'implication des voies de signalisation à diGMPc dans le contrôle de la virulence et de la formation de biofilms par *L. pneumophila*.

Cette implication a été étudiée grâce à l'inactivation systématique de chacun des gènes codant les protéines du métabolisme du diGMPc chez la souche *L. pneumophila* Lens. Notre étude a révélé que trois de ces protéines, Lpl0780, Lpl0922 et Lpl1118, sont spécifiquement requises pour le contrôle de la virulence et, plus particulièrement, pour la survie précoce lors de l'infection de cellules-hôtes via l'orchestration de la sécrétion de facteurs de virulence dans la cellule-hôte. Lpl1118 participerait également à la biogénèse de la vacuole de réplication. Cinq autres protéines, Lpl0075, Lpl0329, Lpl1054, Lpl1176 et Lpl1559, sont impliquées dans la régulation de la formation et de l'architecture des biofilms. Lpl1054 est, plus particulièrement, requise pour la formation de biofilms en présence d'oxyde nitrique. Ces résultats contribuent à une meilleure compréhension de l'organisation complexe et spécifique des voies de signalisation à diGMPc chez *L. pneumophila* et pourraient permettre d'envisager une lutte plus efficace contre ce pathogène.

Roles of cyclic di-GMP signaling pathways in *Legionella pneumophila*

Legionella pneumophila is a bacterium that proliferates in fresh water environments through the replication within amoebas. These bacteria can persist in these environments through biofilm formation. The inhalation of aerosolized contaminated water through hot water systems or cooling towers can induce the infection of human lungs, leading to a severe pneumonia called legionellosis. Cyclic di-GMP (c-di-GMP) in involved, in various bacterial species, in the motility-to-sessility transition, and in some pathogens, in virulence control. My work aims to demonstrate the involvement of signaling pathways that use c-di-GMP in virulence control and biofilm formation of *L. pneumophila*.

This involvement was investigated by systematically inactivating each gene encoding a c-di-GMP-metabolizing enzyme in *L. pneumophila* Lens strain. Our work revealed that 3 of these proteins, Lpl0780, Lpl0922 and Lpl1118 are specifically involved in virulence control and, particularly, in the early survival during host cell infection through the orchestration of virulence factors secretion within host cell. Lpl1118 is particularly required for replicative vacuole biogenesis. Five other proteins, Lpl0075, Lpl0329, Lpl1054, Lpl1176 and Lpl1559, participate in the formation and architecture of biofilms. Lpl1054 is more specifically involved in biofilm formation in the presence of nitric oxide. These results help to better understand the complexity and the specificity of c-di-GMP signaling pathways in *L. pneumophila* and should allow the exploration of more effective ways to fight this pathogen.

Discipline

Microbiologie, Génétique bactérienne, Infectiologie

Mots-clés

Relation hôte-pathogène, Virulence, *Legionella pneumophila*, Biofilms, di-GMP cyclique, Système de sécrétion de type IV, GGDEF, EAL.

Intitulé du laboratoire

Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI) Inserm U1111 – CNRS UMR5308 – ENS Lyon – UCB Lyon 1 - Equipe « Pathogénèse des légionelles »
Campus de la Doua – Bâtiment Lwoff (R+3) - 10, rue Raphaël Dubois - 69622 Villeurbanne, France