



HAL
open science

La protéine kinase LegK2 de *Legionella pneumophila* et le complexe ARP2/3 de la cellule hôte : un nouveau paradigme dans le détournement du cytosquelette d'actine par un pathogène

Céline Michard

► To cite this version:

Céline Michard. La protéine kinase LegK2 de *Legionella pneumophila* et le complexe ARP2/3 de la cellule hôte : un nouveau paradigme dans le détournement du cytosquelette d'actine par un pathogène. Microbiologie et Parasitologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français. NNT : 2015LYO10181 . tel-02967463

HAL Id: tel-02967463

<https://theses.hal.science/tel-02967463>

Submitted on 15 Oct 2020

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



THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON
délivrée par
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

DIPLÔME DE DOCTORAT

Soutenu publiquement le
14 Octobre 2015

Par **Céline MICHARD**

La protéine kinase LegK2 de *Legionella pneumophila* et le complexe ARP2/3 de la cellule hôte : un nouveau paradigme dans le détournement du cytosquelette d'actine par un pathogène

Directrice de thèse : **Patricia DOUBLET**

Jury :

Monsieur Matteo BONAZZI , Chargé de recherche, CNRS, Montpellier	rapporteur
Monsieur Pierre COSSON , Professeur, Université de Genève, Genève	rapporteur
Madame Suzana SALCEDO , Chargé de recherche, INSERM, Lyon	examinatrice
Madame Patricia DOUBLET , Professeur, Université Lyon 1, Lyon	directrice de thèse

Ecole doctorale : **Evolution, Ecosystèmes, Microbiologie, Modélisation**

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

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. 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. le Professeur 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. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier M. Matteo Bonazzi, M. Pierre Cosson et Mme. Suzana Salcedo, d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et de juger mes travaux. C'est un honneur pour moi d'être confrontée à votre expertise et j'espère que ce manuscrit et la soutenance à venir seront à la hauteur de vos attentes.

Je remercie également le programme d'Initiative d'Excellence (IdEx) de la région Rhône-Alpes qui a financé ma bourse de thèse et m'a permis de faire de l'enseignement.

Un grand merci à ma directrice de thèse, Patricia, qui m'a fait confiance et a cru en moi pour mener à bien ce projet. Malgré un emploi du temps de ministre, tu as toujours réussi à trouver un petit peu de temps pour moi... Ces 4 années ont été semées de joies, de doutes, d'espoirs et de quelques désillusions (et oui je ne sais même plus le nombre de mails de rejet que nous avons reçu) mais tu as été là dans tous ces moments pour me soutenir et tu m'as permis de grandir. J'espère que les prochains papiers du labo seront un peu plus faciles à publier...

Ensuite je souhaite remercier tout particulièrement ma « binôme », Nathalie, qui a passé ces quelques années avec les kinases. Merci pour tous tes conseils, ton aide, ta bonne humeur, tes blagues, tes marabouts, tes sacrifices,... Le partage du bureau avec toi est un réel plaisir, j'espère que je n'étais pas trop insupportable (oui oui j'ai bien compris que je pouvais avoir mauvais caractère mais j'espère que vous avez aussi remarqué que j'y travaillais...). Courage, il te reste un an avant d'être « libérée, délivrée » de moi (elle est pas mal celle là, non ?) ...

Si je reprends la file des « grands », il y a bien évidemment Anne... Je te remercie pour tous ces moments de partage plus ou moins scientifiques... Tu es toujours là si on a besoin d'aide ou juste pour discuter et tu es bien évidemment partante pour une bière de fin de journée... Tes innombrables souvenirs ont jonché mon parcours, mais que serait une discussion sans un de tes « à mon époque » ou sans ton incroyable optimiste sur les êtres humains...

Merci également à Christophe, aussi connu sous le nom de MacGyver. Heureusement que tu oses transgresser le fameux dicton de la fac « on ne bricole pas à Lyon 1 », sinon le P2 n'aurait pas supporté la canicule, les bureaux cambriolés n'auraient pas eu de porte, les centris de paille seraient cruellement manquantes... et ça c'est juste la liste des derniers mois, alors vous imaginez bien que le labo ne tournerait plus depuis longtemps sans lui... Merci aussi pour ton aide au moindre problème : manipe, informatique, administratif,....

Je ne peux décemment pas parler d'informatique sans également remercier Fabien, grand maître des imprimantes et sauveur de tout ordinateur (ou sauveur d'un rapport de M2 dans un ordinateur mort à 15 jours de la deadline (encore merci !)). Tu voles maintenant de tes propres ailes... Ça m'a fait vraiment plaisir de te revoir (oui oui encore !) et ça m'a rappelé de nombreux souvenirs mémorables : Biovision où Juju et moi-même avons commencé à t'appivoiser, la FEMS perdue au fin fond de l'Allemagne, nos petites soirées à trois... On a donc partagé de nombreux grands moments... Et ce n'est peut-être pas près de s'arrêter.... A dans 1 an !!!

Je peux également profiter du passage « Christophe » pour remercier sa thésarde non Legio... Madame Chalansonnet, ou depuis quelques mois Valoch... On ne se connaît réellement que depuis à peu près un an mais je pense que nos façons de penser et certains événements particuliers (je pense que tu comprends de quoi je veux parler) nous ont rapidement rapprochées. Je suis très contente d'avoir croisée ta route et c'était un honneur d'être invitée à ton mariage de conte de fées... J'espère que tu passeras encore un peu de temps cette année avec nous (madame est à mi-temps chez nous et l'autre partie chez Biomerieux, enfin c'est ce qu'elle dit...) ! En tout cas, tu auras tout mon soutien pour cette dernière année de thèse qui, comme tu as pu le constater, n'est pas forcément la plus simple des 3, mais je sais par avance que tu vas assurer...

Merci à AnneLise, qui a récemment intégré la partie Doua de l'équipe, pour son soutien et ces déjà nombreuses discussions.... C'est un plaisir de partager un peu de temps avec toi, j'espère qu'on aura encore l'occasion d'avoir quelques moments ensemble...

Mes remerciements aux autres membres de l'équipe Legio : Virginie, Claire, Elisabeth. J'ai partagé de très bons moments avec chacune d'entre vous... J'espère que la suite de vos aventures sera sans trop d'embuche... Merci aussi à la partie de l'équipe délocalisée à Laennec Marine, Sophie, le second Christophe, Ghislaine, Florence,... on ne se voit pas très souvent mais vos conseils et avis sont toujours très constructifs...

Un petit coucou aux compétents : Xavier, Maria, Natalia, Laëtitia et plus particulièrement à notre binôme « Jamie et Fred » ou pour les moins initiés Pierre-Alex et Rominou... L'ambiance à l'étage ne serait pas la même sans vous, et surtout certains vendredis où Cloclo, Dalida, etc, s'emparent du corps de P-A pour nous offrir des moments mémorables... Vos innombrables imitations font aussi partie intégrante de tout bon repas de labo... Qu'est ce que ça risque d'être calme une fois que vous volerez vous aussi de vos propres ailes...

Merci à toutes les autres personnes dont la présence contribue ou a contribué à la si bonne ambiance de l'étage... Jade, Marion et Lorelei (un bon courage spécial à toutes les deux pour la suite,

vous êtes des filles géniales, je ne doute pas que vous réussissiez), Aïda, Marie-Laure, Arthur, Josy, Elise, Daniel, et tous les stagiaires que j'ai pu croiser...

Je souhaite également remercier tous nos collaborateurs qui se sont impliqués dans ce projet... Mathias, Isabelle, Lawrence et je voudrais plus particulièrement remercier Pascale Cossart et Javier, qui ont cru en nous, même quand nous commençons à douter, et qui ont largement permis que ces travaux soient enfin publiés !

Ensuite, je tiens à remercier tous les gens que j'ai côtoyé au cours de mes enseignements et qui m'ont forcément aidé à un moment ou à un autre : Alexandre, Margot, Cécile, Marc,... et plus particulièrement Erwan, qui m'a appris ce qu'était réellement enseigner et avec qui j'ai vécu de grands moments comme notre magnifique M63 vert... Merci pour ton enthousiasme, ta joie de vivre et ton esprit de combativité...

À ce stade, viens la transition laboratoire/vie privée et elle est très vite trouvée en la personne de Julie ou plus couramment appelée « ma juju » ! Tu as dit dans tes remerciements que j'étais ta grande rencontre de ta thèse et bien devine... tu es également la mienne... Les quelques 300km qui nous sépare maintenant n'ont pas vraiment changé notre relation et j'en suis très contente... On a pu compter l'une sur l'autre et j'espère que ça continuera... En tous cas, sache que je serais toujours là si tu as besoin de moi et ne compte pas te débarrasser de moi comme ça...

Finalement, merci à mes poches...

A ma maman et ma sœur, pour avoir supportées mes horaires de dingue, mes conversations sur mon sujet incompréhensible, mes crises de larmes... Je sais que je n'en serais pas arrivé jusque là sans votre soutien...

Au reste de ma famille... mon père, mes oncles et tantes, ma grand-mère, mes cousins/cousines,... pour leurs encouragements tout au long de ces années... et oui, à force de chercher j'ai enfin trouvé quelque chose... mais je vous rassure, j'ai déjà recommencé à chercher...

Sommaire

Remerciements	3
Liste des figures	10
Liste des tableaux	12
Abréviations	13
Introduction	18
Contexte bibliographique	20
1. <i>Legionella pneumophila</i>	20
1.1. L'agent étiologique de la légionellose	20
1.2. Le génome de <i>L. pneumophila</i>	22
1.3. Le cycle infectieux de <i>L. pneumophila</i>	24
1.4. Le système de sécrétion de type IV Dot/Icm.....	25
1.4.1. La structure du SST4 Dot/Icm.....	25
➤ Les complexes chaperons associés aux substrats	26
➤ Les composants cytoplasmiques essentiels	26
➤ Les facteurs accessoires de la membrane interne	26
➤ Le complexe ATPase	27
➤ Les composants de fonctions inconnues.....	28
1.4.2. Les substrats du SST4 Dot/Icm	29
1.5. L'implication des effecteurs du SST4 Dot/Icm dans le cycle infectieux	30
1.5.1. L'entrée dans les cellules hôtes	30
1.5.2. L'échappement à la voie de dégradation endocytique.....	32
1.5.3. La biogénèse de la LCV	35
➤ Réorganisation de la composition lipidique de la LCV.....	35
➤ Contrôle spatio-temporelle de la présence des effecteurs Dot/Icm sur la LCV .	37
➤ Recrutement du réticulum endoplasmique sur la LCV par détournement des petites GTPases.....	39
1.5.4. La sortie des cellules hôtes.....	43
2. La manipulation du cytosquelette d'actine	46
2.1. La dynamique du cytosquelette d'actine	46
2.1.1. La polymérisation d'actine	47
2.1.1.1. Les nucléateurs.....	47
➤ Les nucléateurs avec des motifs de liaison à l'actine-G.....	47
➤ Les formines.....	49
➤ Le complexe ARP2/3	50
2.1.1.2. Les facteurs promouvant la nucléation (NPFs).....	52
2.1.1.3. Les voies d'activation de la polymérisation.....	54
2.1.2. Les composants accessoires du cytosquelette d'actine.....	56

2.2. Les interactions bactéries pathogènes/cytosquelette d'actine	58
2.2.1. Modifications de la morphologie cellulaire.....	58
2.2.2. Adhésion à la cellule hôte	59
2.2.3. Entrée dans la cellule hôte.....	61
➤ Le mécanisme zipper	61
➤ Le mécanisme trigger	62
2.2.4. Vie intracellulaire	64
➤ Vie intracellulaire cytoplasmique	65
➤ Vie intracellulaire vacuolaire	66
2.2.5. Sortie des cellules hôtes et propagation.....	68
2.2.6. Echappement à la phagocytose	72
2.3. <i>Legionella</i> et le cytosquelette d'actine.....	74
Contexte et objectifs de thèse.....	76
Résultats	79
Conclusions et Perspectives	97
Fiches techniques	101
1. Fiche technique 1 : Souches	101
2. Fiche technique 2 : Plasmides	102
3. Fiche technique 3 : Amorces	104
4. Fiche technique 4 : Milieux de culture et conditions de croissance des bactéries	105
4.1. Conditions de cultures.....	105
4.1.1. <i>Escherichia coli</i>	105
4.1.2. <i>Legionella pneumophila</i>	105
4.2. Stérilisation.....	106
4.3. Conservation.....	106
5. Fiche technique 5 : Milieux et conditions de culture des cellules eucaryotes.....	107
5.1. Milieux de culture.....	107
5.1.1. <i>Dictyostelium discoideum</i>	107
5.1.2. Cellules de mammifère : HEK293T et HeLa	107
5.1.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	107
5.2. Conditions de culture	107
6. Fiche technique 6 : Techniques de biologie moléculaire	109
6.1. Préparation de l'ADN.....	109
6.1.1. Extraction de l'ADN chromosomique chez <i>L. pneumophila</i>	109
6.1.2. Extraction de l'ADN plasmidique.....	109
6.2. Amplification de fragments d'ADN par PCR.....	110

6.2.1.	PCR avec la polymérase DreamTaq®	110
6.2.2.	PCR avec la polymérase Phusion®	110
6.3.	Mutagenèse dirigée de l'ADN plasmidique	111
6.4.	Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction	111
6.5.	Analyse électrophorétique de l'ADN sur gel d'agarose.....	111
6.6.	Purification des fragments d'ADN	112
6.7.	Ligature de fragments d'ADN	112
6.8.	Clonage par la technologie Gateway®	112
6.8.1.	Réaction « BP ».....	112
6.8.2.	Réaction « LR »	113
7.	Fiche technique 7 : Transformation des bactéries et des levures.....	114
7.1.	Transformation d' <i>E. coli</i>	114
7.1.1.	Préparation de cellules compétentes	114
7.1.2.	Transformation.....	114
7.2.	Transformation de <i>L. pneumophila</i>	114
7.2.1.	Préparation des cellules électrocompétentes	114
7.2.2.	Electroporation	115
7.3.	Analyse des transformants bactériens	115
7.4.	Transformation de levures <i>S. cerevisiae</i>	115
7.4.1.	Préparation de cellules compétentes	115
7.4.2.	Transformation.....	115
8.	Fiche technique 8 : Transfection des cellules de mammifère	116
8.1.	Transfection des cellules HEK293T	116
8.2.	Transfection des cellules HeLa	116
9.	Fiche technique 9 : Techniques biochimiques.....	117
9.1.	Surproduction et purification de protéine possédant un tag GST	117
9.1.1.	Production des protéines et extraction	117
9.1.2.	Purification des protéines	117
9.2.	Préparation d'extraits protéiques de Légionelles afin de vérifier l'expression de protéines fusions	118
9.3.	Analyse des protéines.....	118
9.3.1.	Dosage des protéines.....	118
9.3.2.	Electrophorèse en gel de polyacrylamide SDS-PAGE	118
9.3.3.	Coloration au Bleu de Coomassie	119

9.3.4.	Transfert des protéines sur membrane	119
9.3.5.	Immunorévélation de protéines sur membrane (Western Blot)	119
9.4.	Test de partenaires protéiques	120
9.4.1.	Double-hybride binaire en levure	120
9.4.2.	GST pull-down	120
9.4.3.	Co-localisation des protéines après expression en cellules de mammifère	121
9.5.	Test de phosphorylation.....	121
9.5.1.	Test de phosphorylation <i>in vitro</i>	122
9.5.2.	Test de phosphorylation <i>in cellulo</i>	122
10.	Fiche technique 10 : Caractérisation du détournement du cytosquelette d'actine cellulaire	123
10.1.	Polymérisation d'actine <i>in vitro</i> (collaboration avec L. LeClaire, Université d'Alabama, USA)	123
10.1.1.	Purification de complexes ARP2/3.....	123
10.1.2.	Déphosphorylation de complexes ARP2/3	123
10.1.3.	Test de polymérisation d'actine <i>in vitro</i>	123
10.2.	Analyse du réseau d'actine dans des cellules de mammifère transfectées	123
10.3.	Polymérisation d'actine <i>in vivo</i> (collaboration avec Javier Pizarro-Cerdá et Pascale Cossart, Institut Pasteur Paris, France)	124
10.3.1.	Culture de <i>Listeria monocytogenes</i>	124
10.3.2.	Culture de cellules HeLa CCL-2.....	124
10.3.3.	Test d'entrée et de formation des « comètes d'actine » de <i>L. monocytogenes</i> ..	124
11.	Fiche technique 11 : Caractérisation de la fonction de l'effecteur Dot/Icm LegK2 au cours du cycle infectieux de <i>L. pneumophila</i>	126
11.1.	Localisation d'effecteur Dot/Icm au cours d'infection de <i>L. pneumophila</i>	126
11.2.	Marquage du cytosquelette d'actine dans des cellules infectées.....	126
11.3.	Triple marquage de l'actine, LegK2 et <i>Legionella</i> en cours d'infection	127
11.4.	Suivi de l'échappement à la voie de dégradation endocytaire.....	127
	Références bibliographiques	128
	Annexes.....	162
1.	Revue sur la biogénèse de la vacuole de <i>L. pneumophila</i>	162
2.	Revue sur les modifications post-traductionnels réalisées par <i>L. pneumophila</i>	171

Liste des figures

- Figure 1** : Evolution du nombre de cas et du taux annuel d'incidence de la légionellose en France entre 1988 et 2013 (d'après Campèse *et al.*, 2015).
- Figure 2** : Gènes partagés et souche-spécifiques de 7 génomes de *L. pneumophila* Sg1 (Gomez-Valero & Buchrieser, 2013).
- Figure 3** : Cycle intracellulaire de *Legionella pneumophila* (d'après Allombert *et al.*, 2013).
- Figure 4** : Structure du système de sécrétion de type IV Dot/Icm de *L. pneumophila* (d'après Isberg *et al.*, 2009).
- Figure 5** : Modèle de sécrétion des effecteurs IcmS/IcmW-dépendant par DotL (d'après Sutherland *et al.*, 2012).
- Figure 6** : Structure du complexe central du SST4 Dot/Icm de *L. pneumophila* (d'après Kubori *et al.*, 2014).
- Figure 7** : Signal de sécrétion putatif à l'extrémité C-terminale des effecteurs Dot/Icm (d'après Burstein *et al.*, 2009).
- Figure 8** : Internalisation de *L. pneumophila* par "coiling phagocytosis" dans un monocyte humain (Horwitz, 1984).
- Figure 9** : Internalisation de *L. pneumophila* par macropinocytose dans des macrophages murins (Watarai *et al.*, 2001).
- Figure 10** : Co-localisation de l'actine-F et de la protéine p57/coronine-1 sur la membrane plasmique de macrophages humains au niveau des sites d'attachement de *L. pneumophila* (d'après Hayashi *et al.*, 2008).
- Figure 11** : Différents stades de maturation du phagosome au cours de la voie endocytique (d'après Flannagan *et al.*, 2009).
- Figure 12** : Dynamique des phosphoinositides membranaires durant l'infection de *D. discoideum* par *L. pneumophila* (d'après Weber *et al.*, 2014).
- Figure 13** : Remodelage des lipides de la LCV par les effecteurs de *L. pneumophila*.
- Figure 14** : Contrôle spatio-temporel des effecteurs SidE et SidH dans le cytoplasme de l'hôte par des métaeffecteurs.
- Figure 15** : Cycle d'activation et inactivation des petites GTPases.
- Figure 16** : Dynamique de Rab1 sur la LCV (d'après Hardiman & Roy, 2014).
- Figure 17** : Modèle d'attachement et de fusion de vésicules dérivées du RE avec la LCV via DrrA (d'après Arasaki *et al.*, 2012).
- Figure 18** : Mécanismes d'activation des voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose (d'après Czabotar *et al.*, 2014).
- Figure 19** : Différentes stratégies mises en place par *L. pneumophila* pour contrôler l'apoptose (d'après Isberg *et al.*, 2009).
- Figure 20** : Les trois types de filaments constituant le cytosquelette des cellules eucaryotes (d'après Mostowy & Cossart, 2012).
- Figure 21** : Principaux rôles du cytosquelette d'actine dans les cellules eucaryotes (d'après Campellone & Welch, 2010).
- Figure 22** : Cycle de l'actine.
- Figure 23** : Noyaux de nucléation d'actine formés par les nucléateurs à domaines WH2 (d'après Campellone & Welch, 2010).

Figure 24 : Représentation schématique des conformations ouvertes et fermées de formines DRF (d'après Campellone & Welch, 2010).

Figure 25 : Modèle de nucléation d'actine proposé pour les formines FMNL3 (d'après Thompson *et al.*, 2013).

Figure 26 : Modèle d'élongation des filaments d'actine par les formines (d'après Campellone & Welch, 2010).

Figure 27 : Collaboration des nucléateurs APC et mDia1 pour la formation de filaments d'actine *in vitro* (d'après Breitsprecher *et al.*, 2012).

Figure 28 : Modèle d'une jonction branchée formée par le complexe nucléateur d'actine ARP2/3 (d'après Rouiller *et al.*, 2008).

Figure 29 : Comparaison de l'activité de nucléation du complexe ARP2/3 en présence de différents facteurs promouvant la nucléation (NPFs) (d'après Uruno *et al.*, 2001).

Figure 30 : Modèle de formation d'un réseau d'actine branché stimulé par l'association du complexe ARP2/3 avec des NPFs de type I de la famille WASP aux membranes cellulaires (d'après Smith *et al.*, 2013b).

Figure 31 : Représentation schématique des conformations inactives et actives des NPFs de type I (d'après Rotty *et al.*, 2013).

Figure 32 : Mécanisme synergique d'activation du complexe ARP2/3 par les deux types de NPFs (d'après Helgeson *et al.*, 2014).

Figure 33 : Modèle de régulation de l'activation des formines Bni1 et Bnr1 par le NPF Bud6 (d'après Graziano *et al.*, 2013).

Figure 34 : Principales voies cellulaires contrôlant le cytosquelette d'actine (Ligeti *et al.*, 2012).

Figure 35 : Voies d'activation détaillées des NPFs N-WASP et WAVE (d'après Kurisu & Takenawa, 2009).

Figure 36 : Les trois arrangements du cytosquelette d'actine.

Figure 37 : Phénotype « colibri » induit par *Helicobacter pylori* (Tegtmeyer *et al.*, 2009).

Figure 38 : Mécanisme moléculaire produisant le phénotype « colibri » suite à l'infection par *Helicobacter pylori*.

Figure 39 : Piédestal formé par les souches EPEC et EHEC (Campellone, 2010).

Figure 40 : Mécanisme de formation des piédestaux par EPEC.

Figure 41 : Mécanisme de formation des piédestaux par EHEC.

Figure 42 : Schéma représentant l'entrée de type zipper (d'après Haglund & Welch, 2011).

Figure 43 : Mécanisme d'internalisation de *Listeria monocytogenes* activé par l'internaline InIA.

Figure 44 : Mécanisme d'internalisation de *Listeria monocytogenes* activé par l'internaline InIB.

Figure 45 : Schéma représentant l'entrée de type trigger (d'après Haglund & Welch, 2011).

Figure 46 : Voies cellulaires contrôlées par les effecteurs de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium permettant l'entrée de la bactérie.

Figure 47 : Rôles distincts mais complémentaires des nucléateurs cellulaires ARP2/3 et formine FHOD1 durant l'internalisation de *Salmonella Typhimurium* (d'après Truong *et al.*, 2014).

Figure 48 : Cycle de vie intracellulaire des pathogènes bactériens.

Figure 49 : Visualisation des "comètes d'actine" produites par *Listeria monocytogenes* (d'après Chong *et al.*, 2009).

Figure 50 : Représentation des différents mécanismes de formation des "comètes d'actine" employés par les bactéries pathogènes intracytosoliques.

Figure 51 : Visualisation des structures d'actine présentes sur les vacuoles des bactéries pathogènes intravacuolaires (Aguilera *et al.*, 2009; Kolonko *et al.*, 2014; Méresse *et al.*, 2001).

Figure 52 : Mécanismes de polymérisation d'actine formant le maillage d'actine présent sur les vacuoles de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

Figure 53 : Mécanismes de sortie des cellules hôtes utilisées par *Chlamydia* (d'après Hybiske & Stephens, 2007).

Figure 54 : Mécanisme moléculaire de la manipulation du cytosquelette d'actine impliquée dans l'extrusion de *Chlamydia*.

Figure 55 : Visualisation d'une structure d'actine appelée ejectosome permettant la sortie de *Mycobacterium* (Hagedorn *et al.*, 2009).

Figure 56 : Mécanisme de sortie au travers d'un ejectosome par *Mycobacterium* (d'après Hagedorn *et al.*, 2009).

Figure 57 : Visualisation des "comètes d'actine" générées par *Listeria monocytogenes* et *Shigella flexneri* pour permettre leur propagation dans les cellules voisines (d'après Gouin *et al.*, 1999).

Figure 58 : Modèle de perturbation des jonctions cellulaires par *Listeria monocytogenes* afin de permettre la formation des protrusions (d'après Ireton *et al.*, 2014).

Figure 59 : Modèle d'entrée des protrusions de *Shigella flexneri* dans les cellules adjacentes (d'après Fukumatsu *et al.*, 2012).

Figure 60 : Modifications morphologiques induites par l'infection de macrophages par *Burkholderia cenocepacia* (Flannagan *et al.*, 2012).

Figure 61 : Mécanisme d'inhibition de la phagocytose mis en place par *Yersinia spp.*.

Figure 62 : Croissance intracellulaire de mutants de *L. pneumophila* dans des amibes (d'après Hivet *et al.*, 2011).

Figure 63 : Capacité de survie du mutant $\Delta legK2$ de *L. pneumophila* (d'après Hivet *et al.*, 2011).

Figure 64 : Les profils de cinétique de sécrétion des effecteurs Dot/Icm de *L. pneumophila* varient en fonction de chaque effecteur (Allombert *et al.*, en préparation).

Figure 65 : Les effecteurs agissant séquentiellement sur la biogenèse de la LCV sont sécrétés successivement (Allombert *et al.*, en préparation).

Figure 66 : Cinétique de translocation des effecteurs LegK2 et VipA.

Figure 67 : Principe de la nouvelle technique de construction de mutants chez *L. pneumophila* par recombinaison homologue.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Répartition des facteurs favorisant des cas de légionellose en France en 2013 (InVS, 2014).

Tableau 2 : Principales caractéristiques de 7 génomes séquencés de *L. pneumophila* Sg1 (d'après Gomez-Valero & Buchrieser, 2013).

Tableau 3 : Exemples de protéines accessoires du cytosquelette d'actine.

Abréviations

Actine-F : actine-filament
Actine-G : actine-globulaire (monomérique)
ADF : actin-depolymerizing factor
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
ADP: adénosine di-phosphate
AMP : adénosine mono-phosphate
APC : adenomatous polyposis coli
ARN: acide ribonucléique
Arf : ADP-ribosylation factor
ARP : Actin-Related Protein
ARPC : ARP2/3 complex subunit
ATP: adénosine tri-phosphate
BBS : Bud6 Binding Site
Bcc : *Burkholderia cepacia* complex
BCYE: buffered charcoal yeast extract
BHI : brain heart infusion
BmBimA : *Burkholderia mallei* BimA
BpBimA : *Burkholderia pseudomallei* BimA
BSA : bovine serum albumine
C1qR : complement component 1 q receptor 1
Ca²⁺ : cation divalent calcium
CAP : capping protein
CHC : clathrin heavy chain
CK2 : casein kinase 2
CLC : clathrin light chain
CO₂: dioxyde de carbone
COPII: coat protein complex II
CRIB: Cdc42- and Rac- interactive binding (=GBD)
DAD : diaphanous-autoregulatory domain
DAG : diacylglycérol
DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole
DID : diaphanous inhibitory domain
DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO: dimethyl sulfoxide
DO: densité optique
Dot : Defect in Organelle Trafficking
DRFs : Diaphanous-Related Formins
EHEC: *Escherichia coli* entéro-hémorragique
EGFR: epithelial growth factor receptor
EEA1: early endosome antigen 1
eEF1A: eukaryotic translation elongation factor 1A
Ena/VASP : Enabled/ VASodilator-Stimulated Phosphoprotein

EPEC: *Escherichia coli* entéro-pathogénique
ERK : Extracellular signal-regulated kinase
ERM : ezrin-radixin-moesin
ESCRT: endosomal-sorting complex required for transport
FAK: focal adhesion kinase
FH1: Formin Homology 1
FH2: Formin Homology 2
GAB: G-actin binding
GAG : glycosaminoglycanes sulfatés
GAP: GTPase-Activating Protein
GBD : GTPase-binding domain
GDF: GDI Displacement Factors
GDI : guanine nucleotide dissociation inhibitor
GDP : guanosine di-phosphate
GEF: Guanine nucleotide Exchange Factor
GFP : green fluorescence protein
GI-T4SS : genomic island-associated type 4 secretion system
GPCR : G protein-coupled receptor
GST : glutathione-S-transférase
GTP : guanosine tri-phosphate
h : heure
HGF : hepatocyte growth factor
HOPS: homotypic protein sorting
HRP: horseradish peroxydase
HS1 : Haematopoietic-specific protein 1
Icm : Intracellular multiplication
IgG: immunoglobuline G
IKK : I κ B kinase
IMPA-1 : inositol-monophosphatase-1
Inl : internaline
InVS : Institut de veille sanitaire
IP: immunoprécipitation
IQGAP: IQ motif-containing GAP 1
IRSp53: Insulin Receptor Substrate protein of 53kDa
IRTKS: insulin receptor tyrosine kinase substrate
JMY : junction-mediating regulatory protein
Kb : kilo paires de bases
kDa : kilo Dalton
kV: kilo Volt
LBPA: lysobisphosphatidic acid
LAMP: lysosomal-associated membrane protein
LB: Luria Broth
LCV : *Legionella*-containing vacuole
Leg: *Legionella* eukaryotic gene
LegK : Leg kinase

LEPR: *Legionella* effector PtdIns(4)P binding region
 Lésions A/E: attaching and effacing lesions
 LGM: *Legionella* growth medium
 LIMK : (Lin-11/Isl-1/Mec-3)-domain-containing protein kinase
 LLO : listériolysine O
 LPS: lipopolysaccharide
 LRR : leucine-rich repeat
 Mb : mega paires de bases
 MEK : Mitogen-activated Protein (MAP)/Extracellular Signal-regulated Kinase(ERK) Kinase
 mg : milligramme
 Mg²⁺: cation divalent magnésium
 Min: minute
 MLCK : myosin light chain kinase
 MLC : myosin light chain
 mM : millimolaire
 MOI : multiplicity of infection
 MOMP : major outer membrane protein
 MYPT: myosin phosphatase target subunit
 NCBI : National Center for Biotechnology Information
 Nck: non catalytic region of tyrosine kinase
 NF-κB : nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells
 NIK : Nck-Interacting Kinase
 nM: nanomolaire
 NPF : Nucleation Promoting factor
 N-WASP : Neural WASP
 ORF: open Reading frame
 PAK : p21 activated kinase
 PAK1 : p21 activated kinase 1
 Pb : paire de bases
 PBS : phosphate buffered saline
 PCR : polymerase chain reaction
 pH : potentiel hydrogène
 pi : post-infection
 PI3K : phosphatidylinositol-3-kinase
 PI4KIII : phosphatidylinositol-4-kinase-III
 PKC : protéine kinase C
 PKD : protéine kinase D
 PtdIns: phosphatidylinositol
 PtdIns(3)P: phosphatidylinositol-3-phosphate
 PtdIns (3,4)P₂ : phosphatidylinositol-3,4-biphosphate
 PtdIns(3,4,5)P₃: phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
 PtdIns(4)P: phosphatidylinositol-4-phosphate
 PtdIns(4,5)P₂: phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
 PtdIns (5) P : phosphatidylinositol-5-phosphate
 PTS : phosphoenolpyruvate phosphotransferase system

PSM : poste de sécurité microbiologique
PV : vacuole parasitophore de *Coxiella burnetii*
RANBP1 : Ran-binding protein 1
RB : reticulate body
RE : réticulum endoplasmique
RILP: Rab-interacting lysosomal protein
RNase: ribonucléase
ROCK : Rho-associated kinase
RTK : receptor tyrosine kinase
SD : synthetic dextrose medium
SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Sec : seconde
Sg : séro groupe
SGEF : SH3-containing guanine nucleotide exchange factor
SH3 : Src homology 3
SHN: serum humain décomplémenté
SNARE : Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein REceptor
SPI-1 : *Salmonella* pathogenicity island 1
SPI-2 : *Salmonella* pathogenicity island 2
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
SST6 : système de sécrétion de type VI
SST7 : système de sécrétion de type VII
STPK : sérine thréonine protéines kinases
SVF: serum de veau foetal
TIRF : Total Internal Reflection Fluorescence microscope
Tm : melting temperature)
t-SNARE : target SNARE
U: unité
ULF : unit length filament
V: volt
v-ATPases : ATPases vacuolaires
VASP : Vasodilator-stimulated phosphoprotein
VCA : verprolin homology, cofilin homology, acidic
v-SNARE : vesicular SNARE
WASH: WASP and SCAR homologue
WASP: Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
WAVE: WASP family verprolin-homologous protein
WIP : WASP interacting protein
WH2: Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Homology 2
WHAMM: WASP homologue associated with actin, membranes and microtubules
WRC: WAVE regulatory complex
YPD : yeast extract, peptone, dextrose medium

μF : microfaraday
 μm : micromètre
 μM : micromolaire
 Ω : ohm

Introduction

Legionella pneumophila est une bactérie pathogène opportuniste de l'environnement qui est capable de se multiplier dans des cellules phagocytaires, les amibes, jusqu'à entraîner leur lyse. *L. pneumophila* infecte aussi accidentellement l'homme en se multipliant dans des macrophages alvéolaires suite à l'inhalation de micro-gouttelettes contaminées. Cette contamination provoque une pneumonie sévère atypique, appelée légionellose. La capacité de *L. pneumophila* à infecter ses cellules hôtes, amibes ou macrophages, est strictement dépendante du système de sécrétion de type IV (SST4) Dot/Icm, qui sécrète plus de 275 protéines bactériennes, appelées effecteurs, dans le cytoplasme de la cellule hôte. Ce système de sécrétion permet à la bactérie d'une part d'échapper à la dégradation endocytique, et d'autre part de transformer le phagosome qui la contient en une véritable niche répliquative. Néanmoins, la forte redondance fonctionnelle qui existe parmi les 275 effecteurs Dot/Icm de *Legionella* fait qu'à peine 20 % d'entre eux ont été fonctionnellement caractérisés à ce jour. La majorité des effecteurs caractérisés participent à la transformation du phagosome, et plus particulièrement au recrutement du réticulum endoplasmique (RE) sur la vacuole. Caractériser le rôle de chacun des 275 effecteurs Dot/Icm reste donc un enjeu majeur pour comprendre la base des mécanismes moléculaires de virulence de *L. pneumophila*. Mes travaux ont participé à cet objectif en caractérisant la protéine kinase LegK2 de *L. pneumophila* précédemment mise en évidence par mon équipe d'accueil. LegK2 fait partie des 5 sérine/thréonine protéines kinases fonctionnelles identifiées dans la souche épidémique *L. pneumophila* Lens. L'étude de la réplication intracellulaire des mutants délétés des gènes codant pour chacune des protéines kinases a fait apparaître un retard de réplication important pour le mutant $\Delta legK2$, révélant que cet effecteur jouait un rôle majeur au cours du cycle infectieux, et rarement observé pour les effecteurs Dot/Icm en raison de la forte redondance fonctionnelle. A mon arrivée, les résultats d'un crible double-hybride en levure identifiant les protéines humaines interagissant potentiellement avec LegK2 suggéraient que cette protéine kinase bactérienne pouvait cibler le cytosquelette d'actine des cellules hôtes.

Le cytosquelette est un constituant essentiel de toutes les cellules eucaryotes. Il se compose de 3 types de filaments : les microfilaments d'actine, les microtubules constitués de tubuline, et les filaments intermédiaires. Ces filaments forment des réseaux dynamiques et participent à de nombreuses fonctions cellulaires essentielles. Les microfilaments d'actine sont en particulier impliqués dans : la morphologie, la contraction musculaire, la division et la migration cellulaires, ou bien encore la phagocytose, l'endocytose et le trafic vésiculaire. Sous l'effet de différents stimuli, plusieurs voies de transduction du signal sont activées aboutissant à la formation d'un réseau de

microfilaments. La formation de ce réseau implique l'activation de nucléateurs, protéines déclenchant l'assemblage de molécules d'actine globulaire en filament, et la participation de multiples autres composants du cytosquelette tels que des protéines de coiffe, de stabilisation, de rupture, de liaison, etc,...

L'implication du cytosquelette d'actine dans d'importants processus cellulaires fait de ce réseau une cible privilégiée des bactéries pathogènes. Ces dernières ont, en effet, développé des stratégies impliquant soit l'expression à la surface de la bactérie de différentes protéines, soit la sécrétion d'effecteurs directement dans la cellule hôte via un système de sécrétion de type III, IV ou VI. Ces protéines interfèrent alors avec les voies de transduction du signal cellulaires qui contrôlent l'assemblage du réseau d'actine ou agissent directement sur la polymérisation de l'actine. Les bactéries manipulent ainsi le cytosquelette d'actine au profit de leur cycle infectieux, facilitant selon les cas leur adhésion sur la cellule hôte, leur entrée dans la cellule, leur multiplication intracellulaire soit intravacuolaire soit cytoplasmique, ou encore leur sortie. La manipulation de ce réseau joue ainsi un rôle essentiel dans le cycle infectieux de ces pathogènes, d'ailleurs des bactéries délétées des gènes participant à ce phénomène sont en général avirulentes.

Ce manuscrit présente, dans un premier temps, le contexte bibliographique dans lequel s'inscrivent mes travaux de thèse. Une première partie est consacrée à *L. pneumophila* et plus particulièrement à son cycle infectieux ainsi qu'aux effecteurs du système Dot/Icm qui y participent. Dans une seconde partie, nous aborderons le cytosquelette d'actine des cellules hôtes, ainsi que les différents mécanismes mis en place par les bactéries pathogènes pour le détourner. Les résultats que j'ai obtenus sont ensuite présentés sous forme d'un article scientifique publié dans le journal mBio et que j'ai signé en premier auteur. Les perspectives à ces travaux accompagnées de quelques résultats récents sont ensuite proposées. Finalement, les revues bibliographiques auxquelles j'ai participé sont intégrées en annexe de ce manuscrit.

Contexte bibliographique

1. *Legionella pneumophila*

Lors du 58^{ème} congrès des anciens combattants de la légion Américaine, qui se déroulait en juillet 1976 à Philadelphie, 182 participants ont contracté une pneumonie sévère atypique et 29 d'entre eux en sont morts. Ce n'est que quelques mois plus tard que l'agent étiologique de cette épidémie a été isolé (Fraser *et al.*, 1977; McDade *et al.*, 1977). Des analyses phénotypiques et génotypiques de ce micro-organisme ont conduit à la description d'un nouveau genre bactérien, dénommé *Legionella*, et d'une nouvelle espèce bactérienne, *Legionella pneumophila* (Brenner *et al.*, 1979; Fumarola, 1979).

Legionella pneumophila est un bacille Gram négatif mesurant 0,5 µm de largeur pour 2 µm de longueur qui se développe en condition aérobie (Winn, 1988). Cette bactérie possède un ou plusieurs flagelles en position polaire ou latérale qui lui permettent d'être mobile (Ott *et al.*, 1991). Elle est ubiquitaire dans les biotopes aquatiques (Fliermans *et al.*, 1981) et elle est en particulier capable de proliférer dans les systèmes hydriques anthropisés lorsque les conditions le lui permettent, à des températures variant entre 25 et 45°C (Fields *et al.*, 2002). *L. pneumophila* a également la capacité de vivre une vie intracellulaire dans des protozoaires. Pour survivre à ces phagocytes professionnels, elle a dû développer différents mécanismes qui lui permettent également d'infecter des hôtes accidentels tels que les macrophages et monocytes alvéolaires, ainsi que les pneumocytes humains (Copenhaver *et al.*, 2014; Harb *et al.*, 2000; Rowbotham, 1980). C'est lorsque *Legionella* arrive à atteindre les poumons humains et à les coloniser qu'elle engendre une pneumonie sévère appelée légionellose ou maladie du légionnaire.

1.1. L'agent étiologique de la légionellose

A ce jour, le genre *Legionella* compte 59 espèces (DSMZDatabase) mais 90% des légionelloses sont dues à *L. pneumophila*. Les souches de *L. pneumophila* possèdent elles-mêmes 16 sérogroupes (Sg) différents mais, là encore, une population bactérienne prédomine comme agent infectieux puisqu'en moyenne 85% des cas de légionellose correspondent au Sg1 (Beauté *et al.*, 2013; Fields *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002). Parmi les infections dues aux *L. pneumophila* de Sg1, on distingue des souches engendrant des infections sporadiques, des souches avec des cas regroupés dans le temps et l'espace, considérées comme épidémiques tandis que certaines souches telles que *L. pneumophila* Paris sont endémiques, avec des cas apparaissant de manière isolée dans la totalité du monde. En

Facteurs favorisants*	Nombre de cas	pourcentage
Cancer / hémopathie	143	11%
Corticothérapie/immunosuppresseurs	134	11%
Diabète	194	15%
Tabagisme	555	44%
Autres	238	18%
Nombre de cas avec au moins un facteur favorisant connu	931	74%

Tableau 1 : Répartition des facteurs favorisants des cas de légionellose en France en 2013 (InVS, 2014).

*non mutuellement exclusifs.

Les pourcentages ont été réalisés sur le nombre total de cas de légionellose notifiés en France pour l'année 2013, c'est-à-dire 1262 cas.

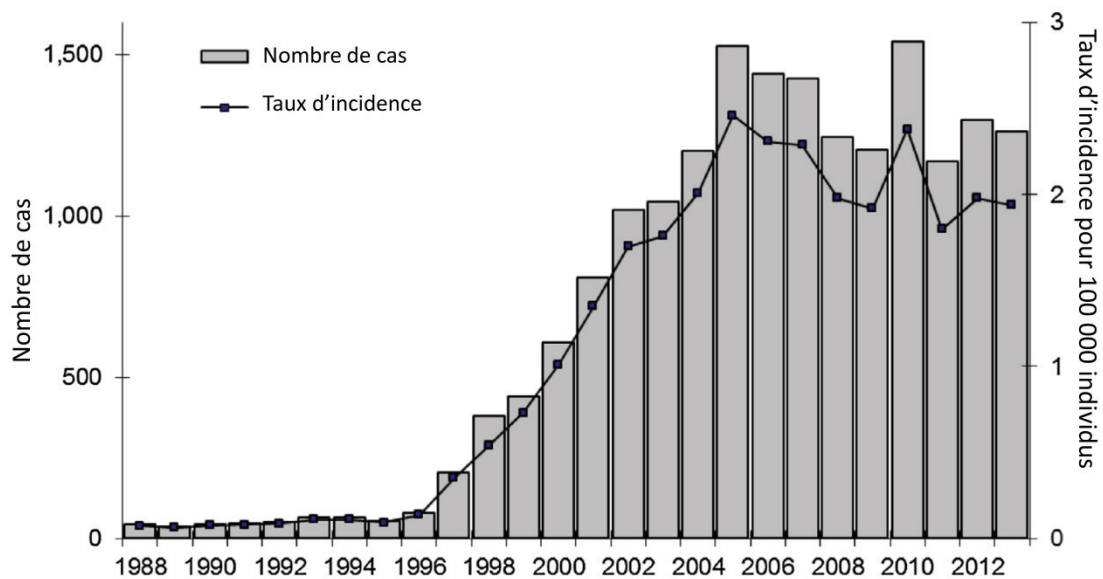


Figure 1 : Evolution du nombre de cas et du taux annuel d'incidence de la légionellose en France entre 1988 et 2013 (d'après Campèse *et al.*, 2015).

2012, les autres espèces du genre *Legionella* les plus souvent isolées chez des patients Européens étaient *L. bozemanii* (0,5%), *L. longbeachae* (0,3%), ainsi que *L. anisa*, *L. dumoffii* et *L. micdadei* (0,5% combinées) (ECDC, 2014). Il est intéressant de remarquer qu'en Australie et Nouvelle-Zélande l'épidémiologie est différente puisque 30% des cas de légionellose sont assignés à *L. longbeachae*. Cette prévalence de *L. pneumophila* et *L. longbeachae* est donc caractéristique de cette région du monde étant donné que *L. pneumophila* Sg1 prévaut dans le reste du globe (Yu *et al.*, 2002).

La contamination des poumons humains se fait par l'inhalation de gouttelettes d'eau contaminée qui sont aérosolisées par diverses technologies telles que les tours aérorefrigérantes, les climatisations, etc. Aucun cas de transmission inter-humaine n'a été mis en évidence à ce jour, ce qui laisse supposer que l'homme est un hôte accidentel pour *L. pneumophila*. L'apparition des premiers symptômes est précédée d'une période d'incubation variant de 2 à 10 jours. La légionellose affecte principalement des adultes, préférentiellement des hommes, d'un âge avancé et essentiellement des personnes présentant des facteurs de risque (Tableau 1) (Beauté *et al.*, 2013; Campese *et al.*, 2011; Campèse *et al.*, 2015). Le diagnostic clinique doit être confirmé par un des examens biologiques suivants : isolement de la bactérie dans un prélèvement bronchique, présence d'antigènes solubles dans les urines, augmentation des titres d'anticorps par 4 entre deux prélèvements successifs, PCR.

Cette maladie se manifeste par un état grippal fébrile et une toux initialement sèche. Cet état fiévreux peut s'améliorer spontanément sans atteinte pulmonaire, on parle alors d'une fièvre de Pontiac. Cet état grippal peut néanmoins s'aggraver et conduire à une pneumopathie sévère nécessitant une hospitalisation, la légionellose. Dans la majorité des cas, un traitement antibiotique (macrolides ou fluoroquinolones) permet une évolution favorable, en particulier quand il est administré rapidement après le début de l'infection. Les conséquences de cette maladie du légionnaire peuvent cependant être dramatiques : 10% des Européens atteints de légionellose en 2012 sont décédés des suites de cette infection malgré une prise en charge thérapeutique adaptée et on a même dénombré un taux de létalité moyen de 12,2% pour la France en 2013. Cette infection provoque environ 6000 cas par an en Europe dont environ 1300 signalés pour la France (ECDC, 2014; InVS, 2014; Campèse *et al.*, 2015). Il s'agit d'une maladie à déclaration obligatoire depuis 1987 dans le système de santé Français. Le nombre de cas de légionellose en France est donc connu précisément, 1262 cas pour 2013, et cela permet de constater que, malgré des mesures de prévention importantes pour les entretiens des systèmes d'eau, ce nombre reste stable depuis 2005 (figure 1) (InVS, 2014; Campèse *et al.*, 2015). De plus, depuis la découverte de *Legionella*, plusieurs épidémies importantes ont eu lieu dans le monde, certaines pouvant être de grande envergure mais de faible mortalité, comme à Murcia en Espagne en 2001 où 449 cas ont été confirmés mais 800 ont été suspectés, avec un taux de mortalité de 1%, et d'autres étant des épidémies plus restreintes, par

	Paris	Lens	Philadelphia	Corby	Alcoy	Lorraine	HL06041035
Taille du chromosome (Mb)	3,5	3,3	3,4	3,6	3,5	3,5	3,5
Proportion en G/C (%)	38	38	38	38	38	38	38
Nombre de gènes	3178	3034	3083	3290	3197	3170	3184
Nombre de gènes codant des protéines	3079	2921	2999	3193	3191	3080	3079
Densité en séquences codantes (%)	87	87	88	87	86	87	87
Plasmide	1	1	0	0	0	1	0

Tableau 2 : Principales caractéristiques de 7 génomes séquencés de *L. pneumophila* Sg1 (d'après Gomez-Valero & Buchrieser, 2013).

Les génomes de ces souches sont accessibles sur le serveur du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

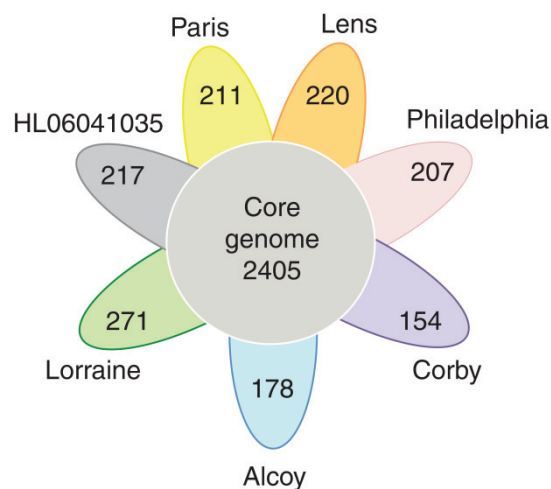


Figure 2 : Gènes partagés et souche-spécifiques de 7 génomes de *L. pneumophila* Sg1 (Gomez-Valero & Buchrieser, 2013).

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 correspond au nombre de gènes spécifiques n'ayant aucun orthologue dans les autres génomes. Les groupes d'orthologues ont été définis en utilisant le programme PanOCT (Fouts *et al.*, 2012) avec un pourcentage d'identité de 35% sur une longueur d'au moins 75 pb.

exemple au Pas-de-Calais en France où, en 2006, 104 cas de légionellose ont été notifiés dont 86 confirmés, mais cette fois-ci avec un taux de mortalité très élevé, 21% (Nguyen *et al.*, 2006; Phin *et al.*, 2014). La légionellose reste donc un problème de santé publique pour la France et le reste du monde.

1.2. Le génome de *L. pneumophila*

A ce jour, nous disposons de 13 génomes de *L. pneumophila* entièrement séquencés : Philadelphia (Sg1) (Chien *et al.*, 2004), Paris (Sg1) (Cazalet *et al.*, 2004), Lens (Sg1) (Cazalet *et al.*, 2004), Corby (Sg1) (Glöckner *et al.*, 2008), Alcoy 2300/99 (Sg1) (D'Auria *et al.*, 2010), 130b (Sg1) (Schroeder *et al.*, 2010), Lorraine (Sg1) (Gomez-Valero *et al.*, 2011), HL06041035 (Sg1) (Gomez-Valero *et al.*, 2011), ATCC43290 (Sg12) (Amaro *et al.*, 2012), LPE509 (Sg1) (Ma *et al.*, 2013), Thunder Bay (Sg6) (Khan *et al.*, 2013), Nagoya-1 (Sg4) (Okamoto *et al.*, 2014), D-5864 (Sg6) (Morrison *et al.*, 2015). Parmi ces souches, LPE509 et HL06041035 sont des isolats environnementaux. Les autres souches séquencées sont des isolats cliniques provenant de cas sporadiques pour les souches 130b, ATCC43290, Thunder Bay, Nagoya-1 et D-5864 tandis que Philadelphia, Alcoy, Corby et Lens sont considérées comme des souches épidémiques. Les souches Paris et Lorraine sont associées à des cas isolés en France et en Europe faisant d'elles des souches endémiques (Aurell *et al.*, 2005; Ginevra *et al.*, 2008).

Les principales caractéristiques des génomes de *L. pneumophila* sont conservées entre les différentes souches (Tableau 2). Chacune possède un chromosome circulaire mesurant en moyenne 3,5 Mb et présentant une proportion de GC d'environ 38%. On estime qu'environ 3000 gènes coderaient pour des protéines, ce qui impliquerait que 88% du génome soit constitué de séquences codantes (Gomez-Valero & Buchrieser, 2013). Les souches Paris, Lorraine et Lens possèdent également un plasmide naturel de 130, 150 et 60 kb, respectivement. Les différentes souches de *L. pneumophila* contiennent aussi des régions chromosomiques qui peuvent être excisées et maintenues sous forme plasmidique (Cazalet *et al.*, 2004; Chien *et al.*, 2004; D'Auria *et al.*, 2010; Doléans-Jordheim *et al.*, 2006; Glöckner *et al.*, 2008; Lautner *et al.*, 2013; Trigui *et al.*, 2013; Wee *et al.*, 2013). Le « core génome » comprend 2405 gènes et on distingue en moyenne 200 gènes spécifiques de chaque souche (figure 2). Les génomes de *L. pneumophila* 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 (Cazalet *et al.*, 2004; Chien *et al.*, 2004; Doléans-Jordheim *et al.*, 2006), l'îlot de pathogénie 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, récemment identifiée comme un GI-T4SS (genomic island-associated type 4 secretion system) (Chien *et al.*, 2004; Wee *et al.*, 2013). L'analyse et la comparaison des génomes mettent donc en évidence une grande diversité et plasticité dans l'espèce *L. pneumophila*.

La plasticité du génome de *L. 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 surprenante, avec leurs hôtes eucaryotes (Albert-Weissenberger *et al.*, 2007; de Felipe *et al.*, 2005; Lurie-Weinberger *et al.*, 2010). En effet, suite à l'analyse des génomes, il a été découvert que *L. pneumophila* avait la particularité de disposer d'un grand nombre de protéines de type eucaryote ou portant des domaines eucaryotes (Cazalet *et al.*, 2004; de Felipe *et al.*, 2005). Ces protéines ne sont pas restreintes au genre *Legionella*, elles sont également présentes chez de nombreuses bactéries se multipliant dans un hôte eucaryote (Schmitz-Esser *et al.*, 2010). Néanmoins, la quantité ainsi que la variété des protéines et domaines de type eucaryote sont exceptionnellement importantes chez *L. pneumophila* (Albert-Weissenberger *et al.*, 2007). *L. pneumophila* possède donc environ 80 protéines avec soit un domaine eucaryote dans leur séquence, soit une forte homologie de la totalité de leur séquence avec des protéines eucaryotes, correspondant alors aux protéines dites « de type eucaryote » (Gomez-Valero & Buchrieser, 2013; Gomez-Valero *et al.*, 2014). Parmi les nombreux motifs eucaryotes retrouvés chez *Legionella*, on distingue notamment des domaines impliqués dans les interactions protéine-protéine (« ankyrin repeat », « leucine-rich repeat », « coiled-coil ») et des domaines associés à des activités enzymatiques (sérine/thréonine protéine kinase, ubiquitine ligase, phospholipase,...) (Cazalet *et al.*, 2004; Chien *et al.*, 2004; Glöckner *et al.*, 2008). La présence de ces diverses protéines résulterait d'une co-évolution de *Legionella* avec ses hôtes eucaryotes environnementaux, les amibes, et d'échanges importants de matériel génétique de ces hôtes vers la bactérie.

Récemment, une étude de génomique comparative entre différentes espèces du genre *Legionella* a recherché les caractéristiques génétiques impliquées dans la virulence des espèces pathogènes vis-à-vis de l'Homme (Gomez-Valero *et al.*, 2014). Ces travaux comparent les génomes de *L. micdadei*, *L. hackeliae*, *L. fallonii*, *L. longbeachae* et *L. pneumophila*. Bien que les caractéristiques générales de ces génomes soient assez similaires, chacun possède un contenu particulier étant donné qu'environ 60% de leurs gènes sont caractéristiques de chaque espèce. Le core génome du genre *Legionella* code cependant pour divers facteurs de virulence importants dont le SST4 Dot/Icm. La conservation des substrats de ce système Dot/Icm est, quand à elle, assez faible puisque seulement 24 des 300 effecteurs connus sont retrouvés dans toutes les espèces et un tiers d'entre eux possède des motifs eucaryotes. Lorsque les auteurs ont comparé les gènes des espèces causant la légionellose (*L. pneumophila*, *L. longbeachae* et *L. micdadei*) à ceux des espèces n'ayant

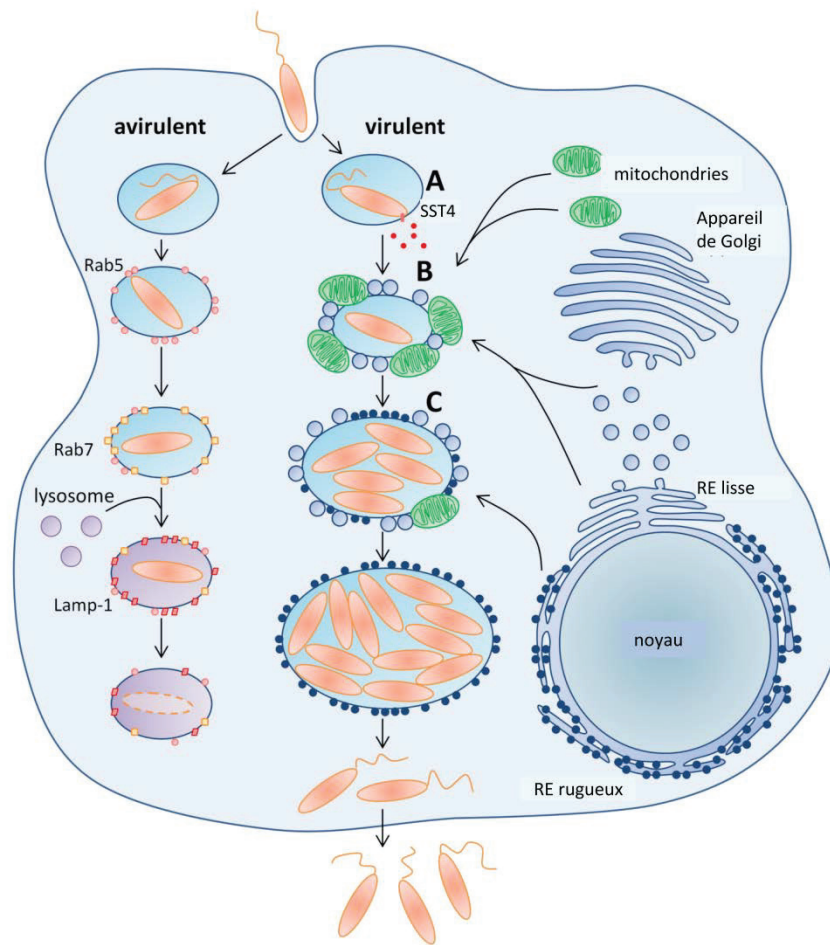


Figure 3 : Cycle intracellulaire de *Legionella pneumophila* (d'après Allombert et al., 2013).

La bactérie est internalisée par sa cellule hôte et réside dans un phagosome (A). *L. pneumophila* virulente injecte environ 300 effecteurs via son SST4 Dot/Icm dans le cytoplasme de son hôte afin de contrôler la biogénèse de sa LCV. Des mitochondries ainsi que des vésicules dérivées du RE lisse sont rapidement recrutées autour de la LCV (B). Par la suite, la LCV est décorée avec des ribosomes et c'est dans cette vacuole que la bactérie se réplique efficacement (C). Pour les *L. pneumophila* avirulentes, comme des souches dépourvues de SST4 Dot/Icm fonctionnel, les bactéries perdent la capacité à recruter des mitochondries, des vésicules dérivées du RE et des ribosomes. Elles sont alors dégradées par la voie endocytique.

pas été isolées de patient, seul un pool de 40 gènes, parmi lesquels deux codent pour des effecteurs Dot/Icm, est apparu commun aux souches pathogènes. La comparaison des 2 espèces virulentes les plus répandues, *L. pneumophila* et *L. longbeachae*, avec les autres espèces monte à 124 le nombre de gènes spécifiques aux pathogènes humains dont 38 codent pour des effecteurs Dot/Icm. Cette étude a donc clairement mis en évidence un ensemble de gènes qui semble augmenter considérablement la capacité d'infection de *Legionella* dans des cellules de mammifère.

Une différence de virulence est également présente au sein des souches de *L. pneumophila*, étant donné que le Sg1 représente environ 95% des isolats cliniques en France alors qu'il est seulement retrouvé dans 28% des isolats environnementaux (Doleans *et al.*, 2004). Une analyse de génomique comparative entre des isolats cliniques et environnementaux, par hybridation sur puce à ADN, a permis d'identifier le facteur impliqué dans cette prévalance clinique. L'espèce *L. pneumophila* possède une région de 33 kb spécifique qui est impliquée dans la biosynthèse de son lipopolysaccharide (LPS). Cette région peut être séparée en deux : une partie présente chez tous les sérogroupes de *L. pneumophila* et un ensemble de 16 gènes seulement retrouvé dans les génomes des Sg1. Il semble donc que les *L. pneumophila* de Sg1 disposent d'un groupe de gènes spécifique pour la biosynthèse de leur LPS, leur conférant un avantage majeur pour leur virulence (Cazalet *et al.*, 2008).

1.3. Le cycle infectieux de *L. pneumophila*

Le cycle de vie intracellulaire de *L. pneumophila* est très similaire entre son hôte environnemental, l'amibe, et son hôte accidentel, le macrophage humain (figure 3). La première étape de ce cycle infectieux est l'internalisation de la bactérie par la cellule hôte qui, pour *L. pneumophila*, peut se faire par des mécanismes de phagocytose ou de macropinocytose. Dès le contact avec sa cellule hôte, la bactérie injecte grâce à son système de sécrétion de type IVB (SST4B) Dot/Icm, un véritable arsenal de protéines bactériennes dans le cytoplasme de la cellule hôte. Certains de ces effecteurs inhibent d'abord la fusion entre le phagosome et les endosomes puis les lysosomes, ce qui contribue à l'échappement de la bactérie à la dégradation endocytique. En parallèle, d'autres effecteurs remodelent en plusieurs étapes la surface du phagosome, le transformant en une niche répliquative appelée LCV pour « *Legionella*-containing vacuole », propice à la multiplication très efficace de la bactérie. Le phagosome est d'abord brièvement décoré de mitochondries, puis de réticulum endoplasmique (RE) avant d'être finalement recouvert de ribosomes. La bactérie se multiplie alors activement jusqu'à la détection d'une carence nutritive intravacuolaire. Ce manque de nutriments induit une reprogrammation génétique importante chez la

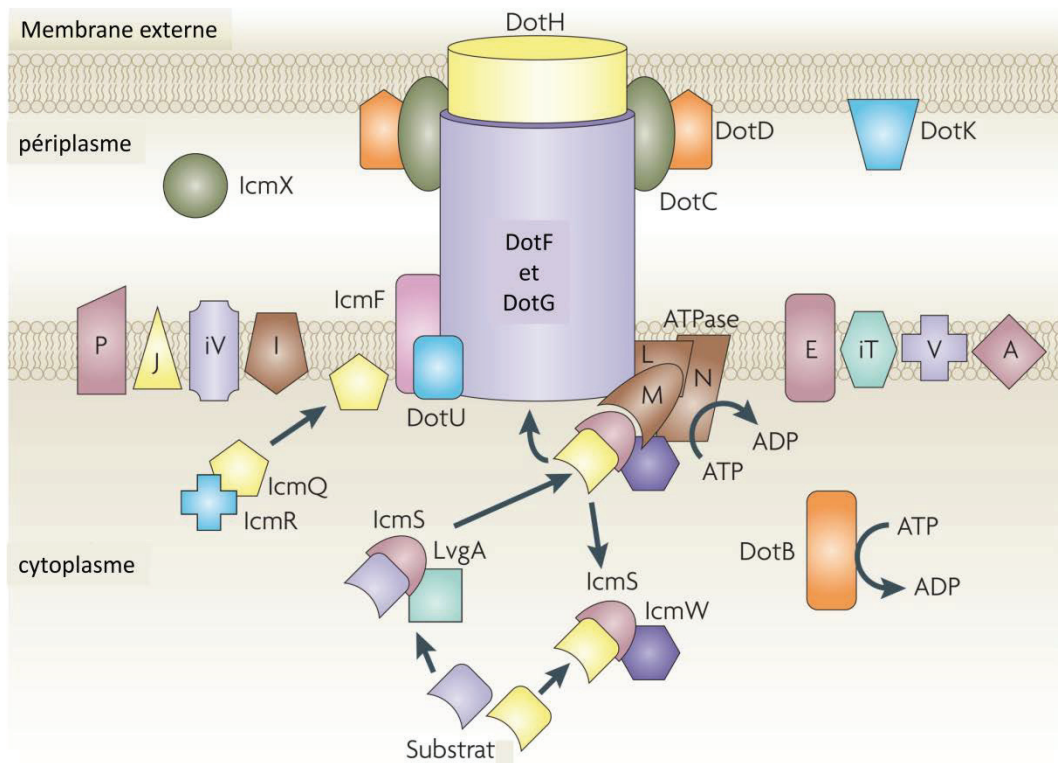


Figure 4 : Structure du système de sécrétion de type IV Dot/Icm de *L. pneumophila* (d'après Isberg et al., 2009).

Les lettres majuscules représentent les noms des protéines Dot, tandis que les lettres précédées d'un « i » indiquent les noms des protéines Icm.

bactérie, qui commence à exprimer divers gènes de virulence nécessaires pour la phase dite transmissive. Les bactéries sont finalement libérées dans le cytoplasme de la cellule hôte puis dans l'environnement extérieur où elles pourront infecter de nouveaux hôtes (Allombert *et al.*, 2013).

Bien que les amibes et les macrophages humains soient les modèles cellulaires classiques pour l'étude de la virulence de *L. pneumophila*, il apparaît que *L. pneumophila* est capable de coloniser d'autres organismes modèles tels que des lignées de cellules non phagocytaires de type HeLa (Garduño *et al.*, 1998b), les souris permissives A/J et les lignées cellulaires qui en dérivent (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 encore la drosophile *Drosophila melanogaster* (Sun *et al.*, 2013). Le fait que *L. pneumophila* soit capable de se multiplier dans des cellules phagocytaires très différentes d'un point de vue évolutif (des protistes unicellulaires aux macrophages de mammifère) révèle toute l'adresse de cette bactérie à contrôler des voies cellulaires conservées au sein de ses hôtes eucaryotes (Segal & Shuman, 1999). Cette bactérie est donc un organisme modèle parfait pour étudier les mécanismes d'échappement aux défenses de l'hôte et les stratégies pour maîtriser sa destinée intracellulaire.

1.4. Le système de sécrétion de type IV Dot/Icm

Afin de mener à bien sa vie intracellulaire, *Legionella pneumophila* met en place un facteur essentiel à sa survie, le système de sécrétion de type IVB Dot/Icm. Ce système transloque, c'est-à-dire injecte directement dans le cytoplasme de la cellule hôte, approximativement 300 protéines bactériennes appelées effecteurs ou substrats du SST4.

1.4.1. La structure du SST4 Dot/Icm

Le SST4B complet de *L. pneumophila* (figure 4) est codé par 27 gènes *dot/icm* portés par deux îlots de pathogénicité. Des mutations invalidant ce SST4B résultent en des défauts d'échappement à la dégradation par la voie endocytaire et de biogénèse de la vacuole de réplication, à l'origine de l'appellation de ce système de sécrétion Dot/Icm pour « Defect in Organelle Trafficking / IntraCellular Multiplication » (Albert-Weissenberger *et al.*, 2007; Berger *et al.*, 1994; Brand *et al.*, 1994; Marra *et al.*, 1992; Segal & Shuman, 1997; Vogel *et al.*, 1998). Bien que les protéines de ce système soient encore peu connues au niveau fonctionnel, on peut les répartir en six catégories.

➤ Les complexes chaperons associés aux substrats

Le complexe IcmS/IcmW est un hétérodimère cytoplasmique permettant une translocation efficace d'une partie des effecteurs de *L. pneumophila* (Coers *et al.*, 2000). Ce dimère présente des similarités avec les chaperonnes des systèmes de sécrétion de type III (SST3), ce qui lui a permis d'être considéré comme un adaptateur du SST4B (Bardill *et al.*, 2005; Ninio *et al.*, 2005). La protéine IcmS a également été montrée comme interagissant avec le facteur de virulence LvgA, formant ainsi un second dimère adaptateur IcmS/LvgA (Vincent & Vogel, 2006). Contrairement aux chaperonnes des SST3, ces complexes, IcmS/IcmW et IcmS/LvgA, ne participent pas à l'export d'un ou quelque substrats mais ils se lient à un grand nombre d'effecteurs bactériens. La prise en charge de certains des effecteurs par le SST4 Dot/Icm peut seulement se produire au travers des complexes chaperons (Ninio *et al.*, 2005). Le rôle spécifique de ces complexes n'est pas encore connu mais, grâce à des interactions avec le complexe ATPase DotL/DotM/DotN, ils présenteraient certains substrats au complexe central et faciliteraient le dépliement des substrats lors de leur translocation (Amyot *et al.*, 2013; Cambronne & Roy, 2007; Sutherland *et al.*, 2012). Il est également supposé que ces complexes chaperons pourraient contrôler quantitativement et/ou temporellement la translocation des effecteurs. En effet, contrairement à de nombreuses bactéries, *L. pneumophila* ne régule pas de manière transcriptionnelle l'expression de ces facteurs de virulence puisque les effecteurs Dot/Icm sont produits avant le contact avec la cellule hôte (Charpentier *et al.*, 2009).

➤ Les composants cytoplasmiques essentiels

Deux autres composants du SST4B Dot/Icm sont localisés au niveau cytoplasmique : IcmR et IcmQ. Ces deux protéines interagissent entre elles et se comportent comme un autre complexe chaperon, IcmR étant la chaperonne et IcmQ son substrat (Coers *et al.*, 2000; Duménil *et al.*, 2004). IcmQ sous forme d'oligomère s'insère dans des membranes lipidiques, formant ainsi des pores de 13 à 26 Å (Duménil *et al.*, 2004). La fixation de IcmR sur IcmQ prévient la formation de cet oligomère, ce qui permet alors de contrôler la perméabilisation de la membrane par un blocage partiel de l'association entre IcmQ et la membrane (Duménil & Isberg, 2001; Raychaudhury *et al.*, 2009). Bien que la fonction biologique de ces deux protéines reste à déterminer, il s'avère que ce sont des composants essentiels pour la sécrétion d'effecteurs (Coers *et al.*, 2000).

➤ Les facteurs accessoires de la membrane interne

Les protéines IcmF et DotU (aussi appelée IcmH) sont nécessaires pour la sécrétion des effecteurs ainsi que pour une répllication intracellulaire efficace. L'absence de ces protéines dans un mutant de *L. pneumophila* entraîne une dégradation de certains composants du système Dot/Icm,

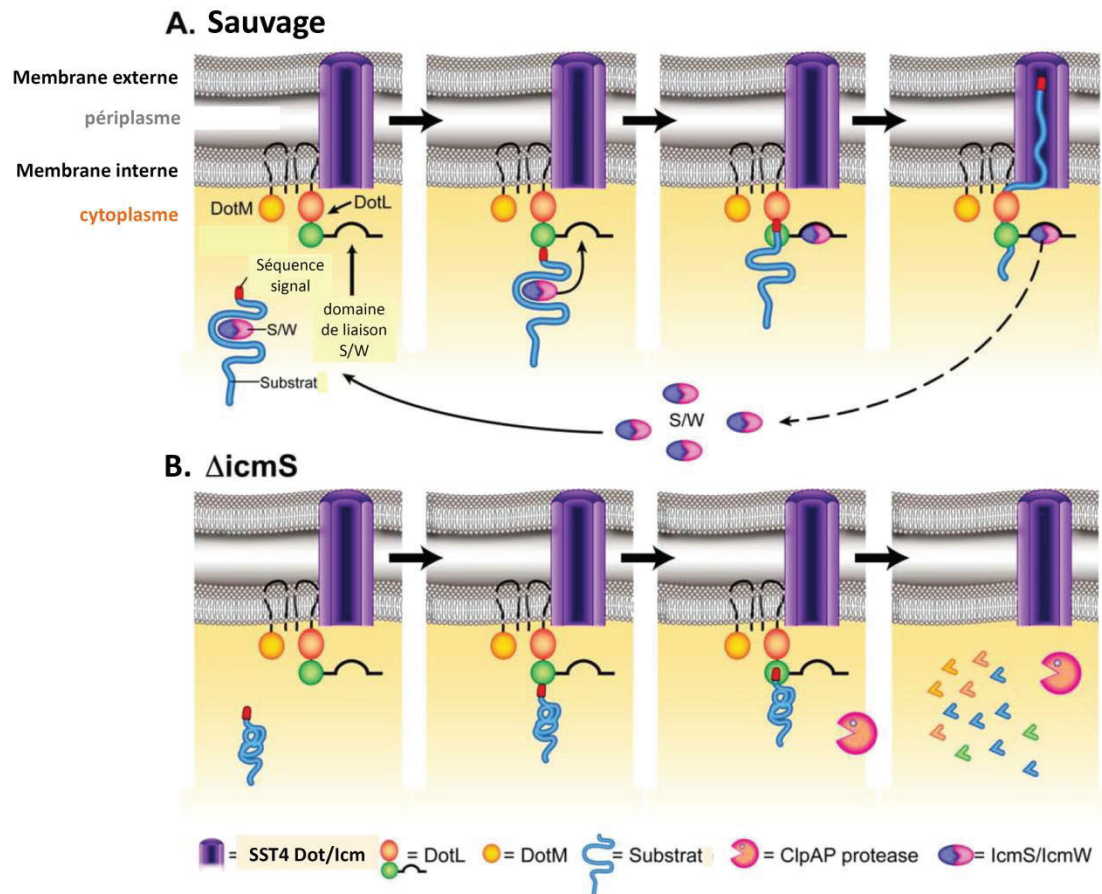


Figure 5 : Modèle de sécrétion des effecteurs IcmS/IcmW-dépendant par DotL (d'après Sutherland et al., 2012).

(A) Export d'effecteurs IcmS/W-dépendant dans une souche de *L. pneumophila*. Le substrat Dot/Icm interagit avec les adaptateurs IcmS/W dans le cytoplasme de la bactérie afin de maintenir sa forme adaptée à la translocation. L'effecteur est ciblé à la membrane interne via sa séquence signal en C-terminal et il interagit directement avec la protéine DotL. Après que l'effecteur soit engagé dans l'appareil de translocation, le complexe IcmS/W est décroché du substrat via son transfert sur son site de fixation de DotL, tandis que l'effecteur est activement transloqué à l'extérieur. Par la suite, le complexe IcmS/W se dissocie de DotL et de la membrane interne, retournement ainsi dans le cytoplasme bactérien afin de prendre en charge de nouveaux effecteurs pour leur translocation. **(B)** Export d'effecteurs IcmS/W-dépendant dans une souche de *L. pneumophila* déficiente pour IcmS. Le substrat Dot/Icm interagit avec DotL via sa séquence signal. Cependant, le substrat est bloqué au moment de sa translocation par une mauvaise conformation due à l'absence d'IcmS/W. L'encombrement du SST4 engendre un stress qui entraîne la dégradation de DotL via la protéase ClpAP.

notamment DotH, DotG et DotF, au moment de la transition entre la phase exponentielle et la phase stationnaire de croissance (Sexton *et al.*, 2004a; VanRheenen *et al.*, 2004; Zusman *et al.*, 2004). A ce jour, plusieurs rôles sont envisagés pour ces protéines accessoires : l'aide à l'assemblage d'un système de sécrétion Dot/Icm fonctionnel, le maintien du complexe Dot/Icm assemblé sous une forme stable et active, le contrôle du passage de l'état inactif à actif du complexe suivant les phases de croissance, le recyclage du SST4B.

➤ Le complexe ATPase

Le complexe ATPase est un élément indispensable pour la translocation d'effecteur via le SST4. Dans le système de sécrétion Dot/Icm de *L. pneumophila*, ce complexe se compose de trois protéines : DotL, DotM et DotN. La protéine de membrane interne DotL (ou IcmO) possède un domaine de fixation au nucléotide et présente des similarités de séquences avec une famille d'ATPases, les protéines couplées au SST4 (T4CP), dont fait partie la protéine VirD4 d'*Agrobacterium tumefaciens* (de Paz *et al.*, 2005). Il a été proposé que ce type de protéines fonctionne comme des pompes moléculaires sécrétant les effecteurs grâce à l'hydrolyse d'ATP (Gomis-Rüth *et al.*, 2004). Ce type d'ATPase forme un anneau hexamérique qui s'ouvre en un canal par lequel les substrats passent pendant le transfert. Les phénomènes d'ouverture et fermeture de ce passage sont dépendants de la fixation d'ATP et de la libération d'ADP (Yeo *et al.*, 2000). DotL interagit directement avec DotM et DotN dans la membrane interne de la bactérie et est ainsi stabilisée par ces deux protéines (Vincent *et al.*, 2006). Ce complexe DotL/DotM/DotN se lie avec le complexe adaptateur IcmS/IcmW pour à encore stabiliser la protéine DotL. En effet, sans la présence du complexe IcmS/IcmW, les substrats dont la sécrétion est dépendante des chaperonnes seraient bloqués au niveau du complexe ATPase, déclenchant ainsi une réponse au stress ClpAP-dépendante qui finalement aboutirait à la dégradation de DotL (figure 5) (Sutherland *et al.*, 2012; Vincent *et al.*, 2012).

➤ Le complexe central de la membrane bactérienne

Le complexe central correspond au cœur du système de sécrétion puisqu'il permet de relier les membranes interne et externe de la bactérie, formant alors un canal par lequel les effecteurs passeront pour atteindre le cytoplasme de la cellule hôte. Le complexe central du SST4 Dot/Icm est composé de cinq protéines : les protéines de la membrane interne DotG, DotF et les protéines de la membrane externe DotC, DotD et DotH (Vincent *et al.*, 2006). Récemment, une structure en anneau correspondant au SST4 a pu être observée à la surface de *L. pneumophila*, aidant ainsi à la compréhension de la structure du complexe central (figure 6). Les protéines DotC, DotD et DotH sont essentielles pour la formation du SST4. Ces 3 protéines forment un sous-complexe au niveau de la membrane externe (Kubori *et al.*, 2014). DotC et DotD sont des lipoprotéines qui assisteraient DotH

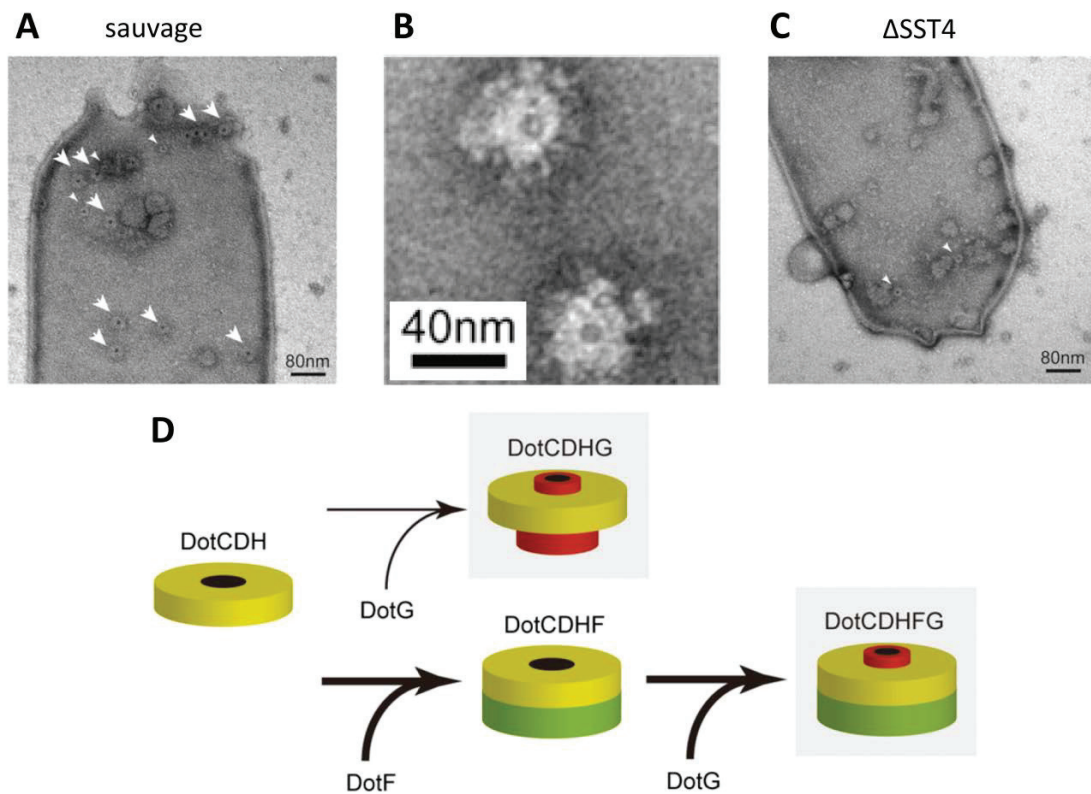


Figure 6 : Structure du complexe central du SST4 Dot/Icm de *L. pneumophila* (d'après Kubori *et al.*, 2014).

(A, B, C) Structure native du système Dot/Icm observé à la surface de *L. pneumophila* par microscopie électronique à transmission. Les différents types d'anneaux observés sont notés par des petites ou grandes pointes de flèches pour les petits et grands anneaux respectivement. **(A)** Cliché d'une souche de *L. pneumophila* sauvage où on observe la présence de grands et petits anneaux. **(B)** Cliché de grands anneaux purifiés de *L. pneumophila*. **(C)** Cliché d'une souche de *L. pneumophila* dépourvue de SST4 Dot/Icm où seul les petits anneaux sont observés. **(D)** Modèle d'assemblage du complexe central du SST4 Dot/Icm. Les complexes grisés sont des SST4 actifs. En l'absence de DotF, le sous-complexe de la membrane externe (DotCDH) peut former un sous-complexe fonctionnellement actif contenant DotG (DotCDHG) mais de faible efficacité. DotF facilite le procédé d'intégration de DotG dans le sous-complexe de la membrane externe en agissant comme une chaperonne intra-complexe, résultant dans la formation robuste d'un complexe central actif (DotCDHFG).

dans sa localisation afin qu'elle forme le pore du complexe (Vincent *et al.*, 2006). La protéine DotG traverse les membranes interne et externe de la bactérie de manière adjacente au canal formé par le reste des protéines. Elle n'est pas essentielle pour la formation du SST4 puisque des structures en anneau ont pu être observées avec un mutant $\Delta dotG$ mais elle est nécessaire pour que le SST4 soit fonctionnel (Kubori *et al.*, 2014). Par son homologie avec VirB10 d'*A. tumefaciens*, il a été suggéré que DotG soit impliquée dans le transfert d'énergie depuis la membrane interne vers DotH (Vincent *et al.*, 2006). DotF avait d'abord été envisagée comme récepteur cytoplasmique des effecteurs (Luo & Isberg, 2004). Il s'est avéré que cette protéine n'est pas un composant absolument nécessaire pour la translocation ainsi que pour la réplication intracellulaire et qu'elle n'interagit qu'avec certains substrats du SST4, contredisant ainsi sa fonction présumée de récepteur (Sutherland *et al.*, 2013). DotF serait finalement impliqué dans l'assemblage ou la stabilité d'un complexe central fonctionnel contenant DotG (Kubori *et al.*, 2014).

➤ Les composants de fonctions inconnues

Les autres protéines Dot/Icm n'ont pas encore été fonctionnellement caractérisées et leurs relations avec les autres composants du SST4 restent également à élucider. Toutefois, ces protéines sont généralement essentielles pour la formation de la vacuole de réplication et la croissance intracellulaire. Différentes études ont ainsi mis en évidence quelques éléments.

La protéine IcmX est la seule protéine périplasmique du SST4 Dot/Icm de *L. pneumophila*. Elle n'a aucun orthologue connu dans les autres SST4s (Matthews & Roy, 2000). La protéine IcmT, localisée dans la membrane interne des bactéries, est bifonctionnelle : sa région N-terminale est nécessaire à la réplication intracellulaire alors que sa partie C-terminale, cytoplasmique, est essentielle dans la formation de pores à travers la membrane de la cellule hôte, afin de libérer les bactéries (Bitar *et al.*, 2005; Molmeret *et al.*, 2002). La protéine DotB est une ATPase présentant des similarités avec les membres de la famille PilT connus pour contrôler la rétractation du pilus de type IV. Son activité ATPase est nécessaire à sa fonction ainsi qu'à sa localisation cytoplasmique. DotB participe à la translocation des effecteurs, elle pourrait être impliquée dans l'apport d'énergie nécessaire au SST4 via l'hydrolyse de nucléotides (Sexton *et al.*, 2004b; Sexton *et al.*, 2005). Enfin, la protéine DotA est un composant de la membrane cytoplasmique retrouvé également secrété dans les surnageants de culture de manière dépendante du SST4 Dot/Icm (Nagai & Roy, 2001). Cette protéine est nécessaire à la réplication intracellulaire de *L. pneumophila* étant donné qu'un mutant $\Delta dotA$ est déficient pour tous les mécanismes de virulence impliquant le SST4 Dot/Icm (Berger *et al.*, 1994; Roy & Isberg, 1997; Roy *et al.*, 1998). Ce mutant est donc couramment utilisé comme témoin d'avirulence.

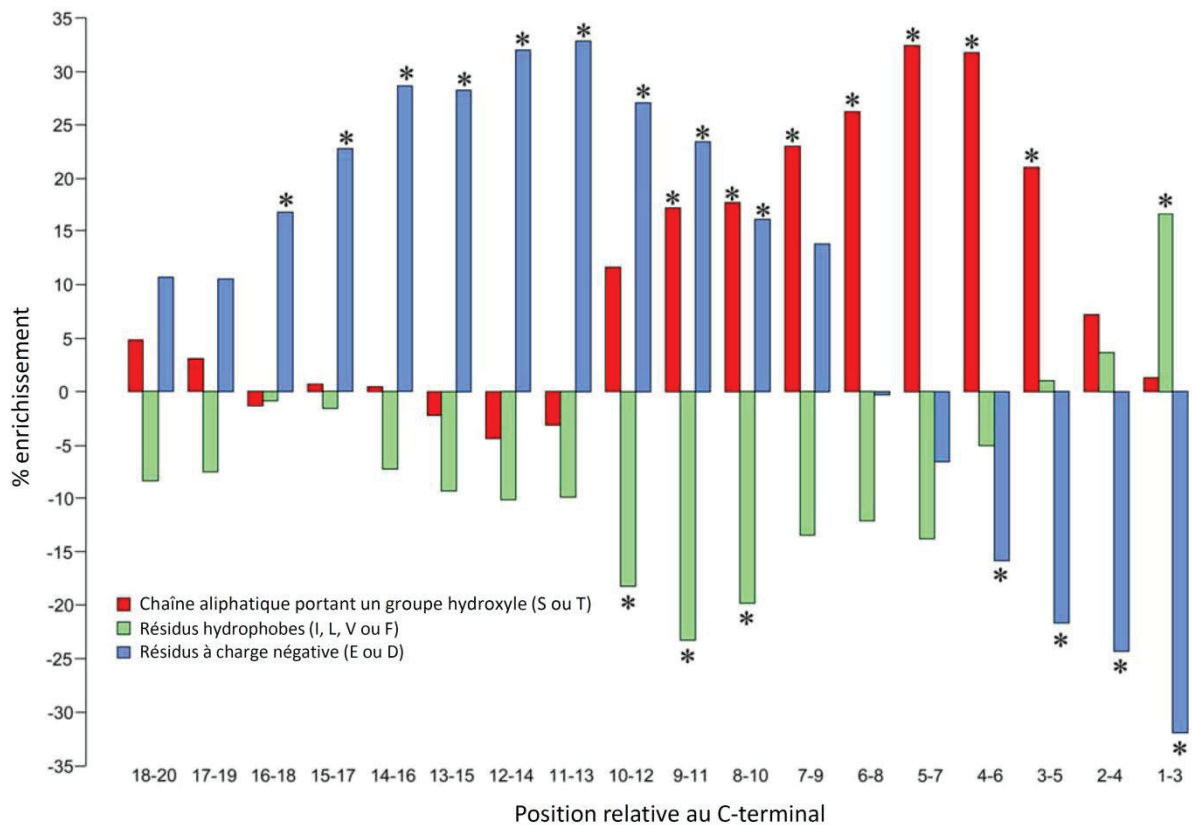


Figure 7 : Signal de sécrétion putatif à l'extrémité C-terminale des effecteurs Dot/Icm (d'après Burstein *et al.*, 2009).

Comparaison de l'enrichissement en différents groupes d'acides aminés dans les 20 derniers résidus C-terminaux d'effecteurs par rapport à des protéines non-effectrices. Les acides aminés avec une chaîne aliphatique portant un groupement hydroxyle (S ou T) sont rouges, les résidus hydrophobes (I, L, V ou F) sont verts et les acides aminés chargés négativement (E ou D) sont bleus.

1.4.2. Les substrats du SST4 Dot/Icm

L'importance du SST4 Dot/Icm dans le cycle infectieux de *L. pneumophila* est très vite apparue à la communauté scientifique et de nombreux travaux ont été entrepris afin d'identifier les substrats de ce système. On peut globalement séparer ces différentes études en 2 catégories : des approches bioinformatiques et des approches expérimentales.

Concernant les approches bioinformatiques, deux méthodes ont été majoritairement utilisées. Tout d'abord, différentes équipes ont recherché des homologies de séquences avec des domaines eucaryotes (Brüggemann *et al.*, 2006; Cazalet *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2004; de Felipe *et al.*, 2005). Ces études ont mis en évidence un grand nombre de gènes codant pour des protéines dites de type eucaryote, appelés *leg* pour « *Legionella* eukaryotic gene ». D'autre part, grâce à la caractérisation de quelques effecteurs et notamment RalF, un signal de sécrétion en position C-terminale a pu être identifié (figure 7) (Kubori *et al.*, 2008; Nagai *et al.*, 2005). Bien que ce signal de sécrétion ne soit pas une séquence consensus clairement établie, il a permis la caractérisation de nouveaux effecteurs (Burststein *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2011; Kubori *et al.*, 2008). Les caractéristiques du signal de sécrétion n'ont cessé d'être affinées et, de nouvelles modélisations mathématiques sur ce signal permettent actuellement l'identification de nouveaux substrats (Lifshitz *et al.*, 2013).

Pour les approches expérimentales, un moyen d'identifier certains effecteurs a consisté à exprimer les substrats putatifs chez la levure et à vérifier si l'expression de ces protéines bactériennes perturbait la croissance ou certaines voies cellulaires de la levure (Campodonico *et al.*, 2005; de Felipe *et al.*, 2008; Heidtman *et al.*, 2009; Shohdy *et al.*, 2005). Enfin, la méthode la plus utilisée pour déterminer les effecteurs sécrétés par le SST4 Dot/Icm a été une technique directe de tests de translocation. Ces tests sont basés sur la production de protéines fusion entre une enzyme avec une activité rapportrice en N-terminal (adénylate cyclase ou β -lactamase) et l'effecteur putatif en C-terminal. Si la protéine hybride est bien composée d'un effecteur, alors elle est transloquée dans le cytoplasme de la cellule hôte où on la détectera en mesurant l'activité de l'enzyme rapportrice. De nombreuses études ont utilisé ce système, soit pour confirmer les effecteurs hypothétiques soit pour les rechercher avec, par exemple, un crible systématique des ORF de plus de 300 pb présentes sur le génome de *L. pneumophila* (de Felipe *et al.*, 2005; de Felipe *et al.*, 2008; Ge *et al.*, 2009; Kubori *et al.*, 2008; Nagai *et al.*, 2005; Pan *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2011).

L'ensemble de ces travaux a permis d'identifier approximativement 300 protéines de *L. pneumophila* comme effecteurs du SST4 Dot/Icm.

Très récemment, une étude a démontré la complexité du contrôle de la sécrétion de certains effecteurs. En effet, Jeong *et al.* ont analysé en détail le mécanisme de sécrétion de l'effecteur SidJ, protéine indispensable à la réplication intracellulaire. Des tests de translocation de différentes parties de SidJ ont révélé que SidJ possédait deux séquences signal d'export. Cet effecteur possède en effet un signal de sécrétion en position C-terminale qui lui assure une translocation précoce au cours de l'infection. Cet effecteur a également une séquence signal interne qui lui permet, cette fois-ci, d'être sécrété à des temps plus tardifs. Finalement, l'ensemble de ces deux modes de sécrétion font que SidJ est constamment sécrété au cours d'une infection. Les deux modes de sécrétion utilisés par SidJ sont cependant distincts puisque seule la sécrétion via la séquence signal interne est dépendante des protéines chaperonnes IcmS/IcmW. De plus, ces deux modes de sécrétion pourraient avoir des rôles distincts dans le cycle infectieux puisque seule la sécrétion via la séquence signal interne est requise pour une croissance intracellulaire optimale (Jeong *et al.*, 2015b).

1.5. L'implication des effecteurs du SST4 Dot/Icm dans le cycle infectieux

Parmi les 300 effecteurs de *L. pneumophila*, il existe une forte redondance fonctionnelle : l'inactivation d'un substrat Dot/Icm conduit rarement à un défaut de virulence significatif, indiquant que plusieurs protéines ciblent une même voie cellulaire de l'hôte (Bardill *et al.*, 2005; de Felipe *et al.*, 2005; Shohdy *et al.*, 2005). Malgré d'importants efforts d'investigation, cette forte redondance fait que seule une cinquantaine d'effecteurs a été fonctionnellement caractérisée à ce jour.

1.5.1. L'entrée dans les cellules hôtes

L'entrée de *L. pneumophila* dans ses cellules hôtes se compose d'une première étape d'adhésion des bactéries à la surface de la cellule, déclenchant une cascade de signalisation qui génère, dans un second temps, l'internalisation.

L. pneumophila possède plusieurs adhésines à sa surface, lui permettant de se lier spécifiquement à ses différents hôtes. Par exemple, les protéines RtxA et Pile_L participent à l'attachement aux cellules de mammifère ainsi qu'aux amibes alors que EnhC, Hsp60, LadC et LaiA n'ont, à ce jour, été montrées déterminantes que pour l'adhésion aux cellules de mammifère, macrophages et/ou cellules épithéliales (Chang *et al.*, 2005; Cirillo *et al.*, 2000; Cirillo *et al.*, 2002; Fuche *et al.*, 2015; Garduño *et al.*, 1998a; Newton *et al.*, 2008; Stone & Abu Kwaik, 1998). Certains couples adhésine/récepteur cellulaire ont également pu être déterminés. En effet, il est maintenant

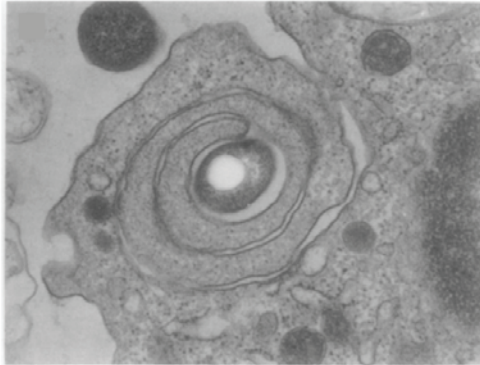


Figure 8 : Internalisation de *L. pneumophila* par "coiling phagocytosis" dans un monocyte humain (Horwitz, 1984).

Cliché de microscopie électronique à transmission, grossissement $\times 28500$.

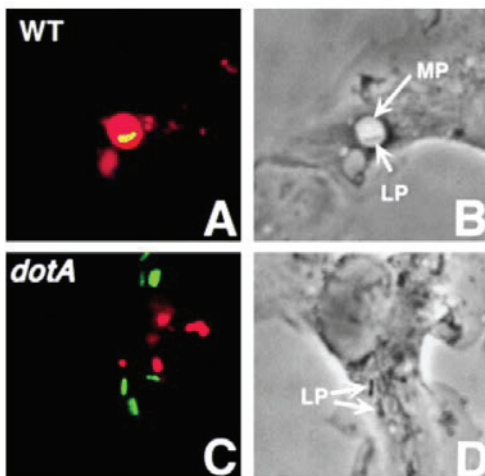


Figure 9 : Internalisation de *L. pneumophila* par macropinocytose dans des macrophages murins (Watarai *et al.*, 2001).

Des macrophages dérivés de souris A/J sont incubés en présence du marqueur de phase fluide TRITC-Dextran et de *L. pneumophila* produisant de la GFP pendant 10 min. Les infections sont ensuite fixées et analysées par microscopie optique ou à fluorescence. **(A, B)** Infection avec *L. pneumophila* sauvage. **(C, D)** Infection avec *L. pneumophila* dépourvue d'un SST4 Dot/Icm fonctionnel ($\Delta dotA$). LP : *L. pneumophila* ; MP : macrophagosome.

connu que la protéine bactérienne Lcl est capable d'interagir avec le récepteur du complément C1q (C1qR) ainsi qu'avec les glycosaminoglycanes sulfatés (GAG) présents à la surface des cellules de mammifère (Duncan *et al.*, 2011; Vandersmissen *et al.*, 2010). L'adhésion à l'amibe *Hartmannella vermiformis* est à ce jour la mieux caractérisée. Bien qu'on ne connaisse pas l'adhésine de *Legionella* impliquée, la bactérie se lie à l'amibe via les lectines Gal/GalNAc, ce qui déphosphoryle des résidus tyrosine du récepteur ainsi que de diverses protéines présentes au niveau de la membrane amibienne, engendrant probablement un désassemblage du cytosquelette d'actine (Venkataraman *et al.*, 1997; Venkataraman & Kwai, 2000). Bien que différentes protéines bactériennes et récepteurs cellulaires aient été découverts, les mécanismes moléculaires de l'adhésion sont encore loin d'être clairement définis.

Une fois la bactérie adhérente à la surface de son hôte, elle pénètre dans la cellule. Deux modes d'internalisation ont pu être détectés pour *L. pneumophila* : la « coiling phagocytosis » et la macropinocytose. Les premières observations microscopiques de cette étape de l'infection décrivaient un mécanisme de phagocytose par enroulement, la « coiling phagocytosis », où un long pseudopode encerclait la bactérie extracellulaire (figure 8) (Horwitz, 1984). Ce phénomène s'est avéré être dépendant des conditions de culture des légionelles puisque l'utilisation de milieux de culture commerciaux, tel que le BCYE (buffered charcoal yeast extract), a réduit la visualisation de ce phénomène (Edelstein, 1981). En effet, Cirillo *et al.* ont montré qu'il y avait moins de 40% de « coiling phagocytosis » après croissance sur BCYE alors que ce taux était de 100% après une culture en amibes, comparable à la culture sur embryons d'œufs de poule réalisée par Horwitz (Cirillo *et al.*, 1999). De nos jours, l'utilisation prépondérante de milieux commerciaux fait que le modèle de « coiling phagocytosis » est remplacé par un processus de phagocytose classique. *L. pneumophila* a également été décrite pour pénétrer dans les cellules de mammifère via un mécanisme de macropinocytose. Effectivement, par microscopie confocale, les bactéries ont pu être localisées dans de larges vacuoles concentriques, dont la morphologie et la composition correspondaient aux macropinosomes (figure 9) (Watarai *et al.*, 2001). Ce mécanisme a aussi été visualisé plus récemment lors de l'internalisation des légionelles dans l'amibe *Dictyostelium discoideum* (Peracino *et al.*, 2010).

Ces mécanismes d'internalisation de *L. pneumophila* sont dépendants du cytosquelette d'actine de la cellule hôte. En effet, différentes études ont montré une accumulation d'actine et de protéines associées, telle que la coronine, au niveau du site d'entrée (figure 10). La nécessité du cytosquelette d'actine a été analysé à l'aide de différents inhibiteurs chimiques de la polymérisation d'actine, qui se sont avérés bloquer l'entrée des légionelles (Coxon *et al.*, 1998; Fajardo *et al.*, 2004; Hayashi *et al.*, 2008; Lu & Clarke, 2005).

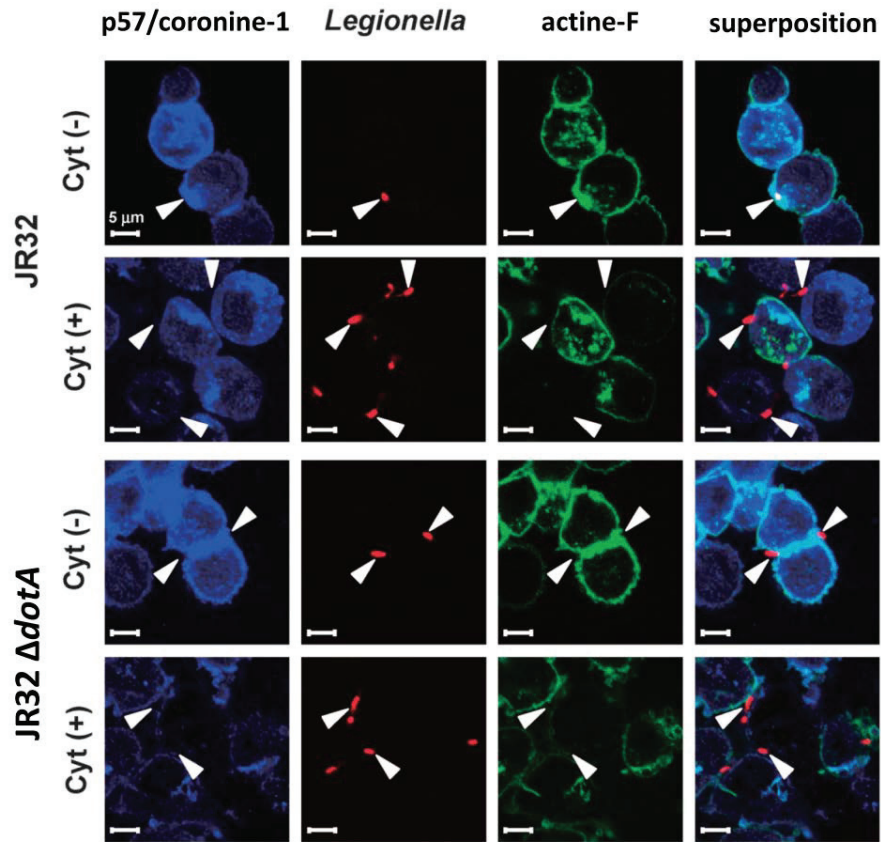


Figure 10 : Co-localisation de l'actine-F et de la protéine p57/coronine-1 sur la membrane plasmique de macrophages humains au niveau des sites d'attachement de *L. pneumophila* (d'après Hayashi *et al.*, 2008).

Avant l'infection, les monocytes U937 différenciés en macrophages sont prétraités avec de la cytochalasine-D (Cyt(+)) ou avec du DMSO (Cyt(-)) pendant 1h. Les cellules sont ensuite infectées avec une souche sauvage de *L. pneumophila* (JR32) ou avec une souche avirulente (JR32 $\Delta dotA$) pendant 5 min. L'actine polymérisée (actine-F) est marquée avec de la phalloïdine conjuguée à l'AlexaFluor 488 (vert). La protéine p57/coronine-1 est visualisée avec un anticorps anti-p57/coronine-1 de souris et un anticorps secondaire de chèvre anti-souris conjugué avec Cy5 (bleu). Les bactéries extracellulaires sont observées avec un anticorps de lapin anti-*Legionella* et un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin conjugué à l'AlexaFluor 546 (rouge).

Enfin, l'internalisation de *L. pneumophila* dans ses cellules hôte serait un mécanisme dépendant de son SST4 Dot/Icm (Hilbi *et al.*, 2001; Watarai *et al.*, 2001). Des souches mutées dans les gènes *dot/icm*, c'est-à-dire avec un système de translocation non fonctionnel, pénètrent significativement moins bien dans une cellule hôte qu'une souche sauvage. Néanmoins, il faut noter que la présence ou non du SST4 Dot/Icm n'oriente pas l'internalisation des bactéries vers un mécanisme particulier. Actuellement, il est donc proposé que *L. pneumophila* injecte un ou plusieurs effecteurs grâce à son SST4 Dot/Icm dès le contact entre la bactérie et sa cellule hôte. Cette sécrétion précoce permettrait ainsi de stimuler l'entrée de la bactérie dans son hôte (Hilbi *et al.*, 2001). A ce jour, seul un effecteur s'est avéré être impliqué dans l'entrée de *L. pneumophila*, l'adhésine LaiA (ou SdeA) (Chang *et al.*, 2005). Les substrats Dot/Icm participant aux mécanismes d'entrée restent donc à caractériser.

1.5.2. L'échappement à la voie de dégradation endocytique

La voie de dégradation endocytique est un mécanisme des cellules eucaryotes permettant la destruction de micro-organismes. Après l'internalisation de la bactérie, un processus de maturation du phagosome se déclenche, fusionnant ainsi la vacuole de phagocytose avec des endosomes précoces, des endosomes tardifs puis des lysosomes. Les différents stades de maturation sont finement contrôlés par la cellule hôte, notamment via la famille des Rab GTPases. Les événements séquentiels de fusion/fission avec les protéines endocytiques modifient la composition du phagosome aussi bien au niveau membranaire que dans son contenu, engendrant ainsi la libération d'un véritable arsenal d'enzymes hydrolytiques, oxydatives et d'acidification, fatal pour la bactérie (figure 11) (Fairn & Grinstein, 2012; Flannagan *et al.*, 2009).

La première étape de la voie de dégradation endocytique consiste en la formation d'un phagosome précoce, par fusion entre le phagosome et les endosomes précoces (figure 11a). Ce stade préliminaire est caractérisé par un enrichissement de la membrane du phagosome en phosphatidylinositol-3-phosphate (PtdIns(3)P) et la présence des protéines Rab5 et EEA1 (early endosome antigen 1). Rab5 est le facteur clé de cette étape puisqu'il contrôle le passage au stade du phagosome tardif. En effet, Rab5, activée par la protéine RABEX-5, recrute et active Vsp34, une phosphatidylinositol-3-kinase de classe 3. Cette protéine kinase génère du PtdIns(3)P au niveau de la membrane du phagosome permettant ainsi la fixation et l'activation de différentes protéines de maturation telle que EEA1. EEA1 ancrée au phagosome facilite la fusion avec de nouveaux endosomes précoces. Le phagosome précoce devient alors intermédiaire, étape où il perd les caractéristiques du stade précoce et acquiert les marqueurs du phagosome tardif (figure 11b).

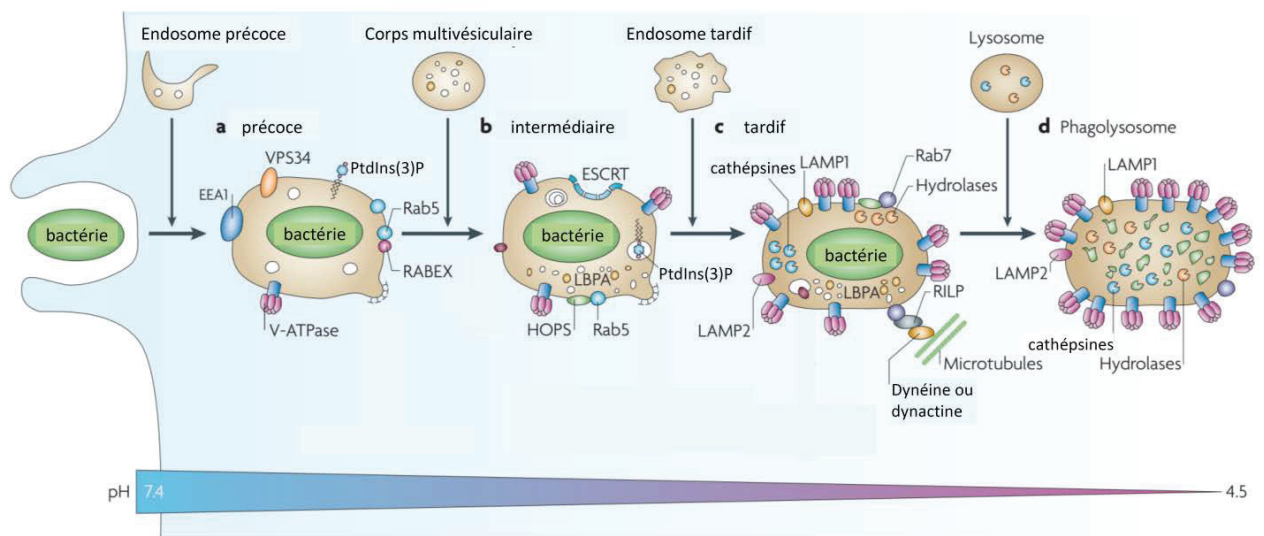


Figure 11 : Différents stades de maturation du phagosome au cours de la voie endocytique (d'après Flannagan *et al.*, 2009).

Rapidement après l'entrée d'une bactérie, le phagosome subit une série de transformations qui résulte d'interactions séquentielles avec les sous-compartiments de la voie endocytique. Différents stades de maturation sont observés : phagosome précoce (a) ; intermédiaire (b), tardif (c) qui aboutissent à la formation d'un phagolysosome (d). Durant la maturation, le phagosome acquiert diverses hydrolases et subit une progressive acidification causée par l'apport de protons via les v-ATPases.

EEA1 : early endosome antigen 1 ; ESCRT : endosomal-sorting complex required for transport ; HOPS: homotypic protein sorting; LAMP: lysosomal-associated membrane protein; LBPA: lysobisphosphatidic acid; PtdIns(3)P: phosphatidylinositol-3-phosphate; RABEX : Rab exchange factor ; RILP : Rab-interacting lysosomal protein ; VPS34 : vesicular protein sorting 34.

Durant cette phase, le phagosome ne fusionne non plus avec des endosomes précoces mais avec des corps multivésiculaires, notamment grâce à EEA1. Un remodelage de la membrane du phagosome est donc nécessaire et se fait via les lipides LBPA (lysobisphosphatidic acid) et le complexe ESCRT (endosomal-sorting complex required for transport). Ces systèmes éliminent les protéines non nécessaires de la membrane phagosomale par bourgeonnement de vésicules intraluminales, afin de détruire ou recycler les diverses protéines. Le phagosome intermédiaire devient alors tardif grâce à l'implication du complexe HOPS (homotypic protein sorting). En effet, HOPS sert de médiateur entre les marqueurs Rab5 et Rab7, ce dernier étant le facteur principal du stade tardif. Le phagosome tardif provient de la fusion du phagosome avec les endosomes tardifs (figure 11c). Ce stade est notamment caractérisé par une acidification du pH du phagosome via l'apport de pompes à proton, les v-ATPases. La membrane phagosomale s'enrichit également de protéines LAMPs (lysosomal-associated membrane proteins) et Rab7. Rab7 est essentiel puisqu'il permet, d'une part la fusion avec les endosomes tardifs et, d'autre part le recrutement de diverses protéines dont RILP (Rab-interacting lysosomal protein). RILP lie le phagosome à des moteurs moléculaires du cytosquelette de microtubules, des dynéines ou dynactines, le déplaçant vers les lysosomes. La dernière étape de la maturation du phagosome est sa fusion avec les lysosomes grâce à Rab7, engendrant alors un phagolysosome (figure 11d). Ce dernier compartiment présente un pH encore plus acide que précédemment, via l'apport de nouvelles v-ATPases, et dispose de nombreuses enzymes telles que des cathépsines et des hydrolases qui dégradent la bactérie (Fairn & Grinstein, 2012; Flannagan *et al.*, 2009). On peut noter qu'en plus des microtubules, le cytosquelette d'actine participe à la maturation du phagosome, d'une part en participant à la motilité des endosomes et lysosomes par propulsion sur de courtes distances et, d'autre part en contribuant aux fusions des endosomes tardifs et lysosomes avec les phagosomes et aux fissions recyclant les composants endocytiques (Fehrenbacher *et al.*, 2003; Granger *et al.*, 2014; Kjekken *et al.*, 2004; Marion *et al.*, 2011).

Legionella pneumophila, une fois internalisée, contrôle la destinée de son phagosome et échappe à la voie de dégradation endocytique. En effet, dès les premières années d'études sur ce pathogène, la communauté scientifique s'est rendu compte que le phagosome de *Legionella* ne fusionnait pas avec les lysosomes (Horwitz, 1983). Il semble cependant, que le phagosome de *Legionella* n'échappe pas complètement à la voie endocytique au vu de la présence de certains marqueurs des endosomes précoces et tardifs, tels que Rab5 et Rab7, à sa surface (Hoffmann *et al.*, 2014a). Par la suite, l'implication des effecteurs du SST4 Dot/Icm dans cet échappement a été mise en évidence (Berger & Isberg, 1993). La plupart des effecteurs Dot/Icm participant à cette étape ont été identifiés via des cribles d'expression en levures afin de déterminer s'ils altéraient le trafic vésiculaire

(Campodonico *et al.*, 2005; de Felipe *et al.*, 2008; Shohdy *et al.*, 2005). Cependant, seuls quelques effecteurs ont été caractérisés au niveau cellulaire et moléculaire.

Les effecteurs LegC2 (aussi appelé YlfB), LegC3 et LegC7 (YlfA) perturbent le trafic de la voie endolysosomale des levures (de Felipe *et al.*, 2008). Bien que LegC2 n'ait pas été plus étudié à ce jour, LegC3 apparait bloquer indirectement la formation de complexes SNARE nécessaire à la fusion entre deux membranes. Ce blocage permettrait à *Legionella* d'inhiber le trafic tardif de la voie de dégradation endocytique, notamment d'éviter la fusion avec les lysosomes (Bennett *et al.*, 2013). LegC7 inhibe, quand à lui, le trafic précoce de la voie endosomale. La toxicité de cet effecteur, chez la levure, est réduite par la délétion de la protéine Vsp27, membre de complexes ESCRT. Cependant, le lien entre Vsp27, LegC7 et l'altération du trafic endosomal n'est pas encore clair (O'Brien *et al.*, 2015). Un crible d'altération du trafic des membranes chez la levure a également mis en évidence les effecteurs VipA, VipD et VipF (Shohdy *et al.*, 2005). Au cours de l'infection, le rôle de VipA n'est pas clairement élucidé mais il apparait co-localiser avec le marqueur endocytique EEA1, laissant envisager une action sur les endosomes précoces (Franco *et al.*, 2012). Au contraire, la fonction de VipD durant le cycle infectieux de *Legionella* est maintenant clairement établie. VipD bloque la maturation du phagosome par deux voies différentes : d'une part, le domaine C-terminal de VipD interagit avec les GTPases Rab5 et Rab22 activées, présentes sur les endosomes précoces, bloquant ainsi leur activités; et d'autre part, VipD dégrade le PtdIns(3)P de la membrane des endosomes via une activité phospholipase A1 portée par son extrémité N-terminale, altérant alors la composition lipidique et consécutivement protéique des membranes endosomales (Gaspar & Machner, 2014; Lucas *et al.*, 2014). Les effecteurs SetA, SidP et Lpg0393 sont aussi impliqués dans le détournement de la maturation du phagosome, préférentiellement au niveau des étapes précoces. SetA se lie aux PtdIns(3)P membranaires et co-localise avec les marqueurs Rab5/EEA1 à la suite de transfection en cellules de mammifère ou avec la LCV au cours d'une infection. Cet effecteur présente des activités glucohydrolase et glucosyltransférase dans sa partie N-terminale mais la cible de ces activités n'est pas connue (Jank *et al.*, 2012). Récemment, l'effecteur SidP a été décrit comme étant une phosphoinositide-3-phosphatase active *in vitro* et *in vivo* en levures. Son activité enzymatique laisse penser que SidP est capable de déphosphoryler le PtdIns(3)P de la LCV, évitant ainsi la fusion entre le phagosome et les endosomes (Toulabi *et al.*, 2013).

De façon plus surprenante, *Legionella* semble également posséder des protéines activatrices des Rab endocytiques. En effet, l'effecteur Lpg0393 a une forte similarité structurale avec la protéine RABEX-5 et cette ressemblance va même au-delà de la structure puisqu'il s'agit également d'homologues fonctionnels. Lpg0393 est en effet capable d'activer les GTPases Rab5, Rab21 et Rab22 via une activité GEF. Le rôle de ces activations n'a cependant pas été identifié et, au vu de la

localisation de Lpg0393 au niveau de l'appareil de Golgi après transfection en cellules de mammifère, la fonction de Lpg0393 s'avère difficile à établir (Sohn *et al.*, 2015).

Finalement, deux autres effecteurs permettent l'échappement de *L. pneumophila* de la voie de dégradation, LtpD et SidK. LtpD se lie aux PtdIns(3)P et semble moduler le trafic global de la voie endocytaire puisqu'il co-localise avec les marqueurs des endosomes précoces (Rab5, Rab4 et EEA1), tardifs (Rab7) et des lysosomes (LAMP-2). Cet effecteur est aussi capable d'interagir avec la protéine IMPA-1, génératrice d'inositol utilisé pour la synthèse des phosphatidylinositides membranaires. Par contre, l'interaction entre ces deux protéines ne module pas directement l'activité de déphosphorylation d'IMAP-1, laissant penser que d'autres partenaires peuvent être impliqués dans cette relation afin de moduler le métabolisme des lipides de l'hôte (Harding *et al.*, 2013). L'acidification des phagosomes est également contrôlée par *Legionella* et, plus précisément, est inhibée par l'effecteur SidK. En effet, SidK interagit directement avec la sous-unité VatA de la v-ATPase, inhibant alors l'hydrolyse de l'ATP ce qui, par conséquent, bloque l'apport de protons dans la LCV (Xu *et al.*, 2010).

1.5.3. La biogénèse de la LCV

En parallèle à l'échappement à la voie de dégradation endocytaire, *L. pneumophila* transforme sa vacuole en une véritable niche répliquative, la LCV. Cette transition se caractérise principalement par le recrutement et la fusion de vésicules du réticulum endoplasmique (RE) avec la LCV, ce qui aboutit d'une part à l'apport de membranes qui permet l'élargissement de la vacuole, et d'autre part à la restructuration complète de la surface du phagosome, camouflant ainsi le pathogène vis-à-vis de son hôte. La biogénèse de la LCV met en œuvre 3 étapes : (i) la réorganisation de la composition lipidique de la vacuole afin de l'enrichir en phosphatidylinositol-4-phosphate (PtdIns(4)P), (ii) le recrutement d'effecteurs Dot/Icm à la surface du phagosome par le biais du remodelage lipidique et enfin (iii) le recrutement et l'activation de diverses protéines de l'hôte conduisant à la fusion entre le phagosome et le RE.

➤ Réorganisation de la composition lipidique de la LCV

Les phosphatidylinositols (PtdIns) sont des marqueurs membranaires importants, caractérisant les différents compartiments cellulaires ainsi que les flux membranaires. La membrane plasmique contient majoritairement du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PtdIns(4,5)P₂). Le phosphatidylinositol-3-phosphate (PtdIns(3)P) est retrouvé principalement au niveau des membranes

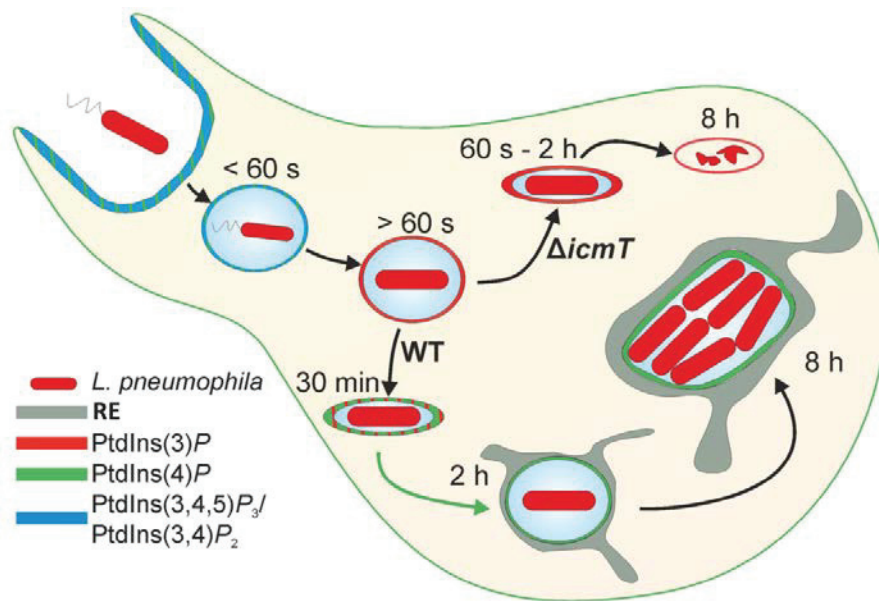


Figure 12 : Dynamique des phosphoinositides membranaires durant l'infection de *D. discoideum* par *L. pneumophila* (d'après Weber et al., 2014).

L. pneumophila entre dans son hôte par formation d'une coupe phagocytaire riche en PtdIns(3,4,5)P₃ et PtdIns(4)P. La bactérie est alors internalisée dans une vacuole où le PtdIns(3,4,5)P₃, le PtdIns(3,4)P₂ et le PtdIns(4)P persiste pendant moins de 60 sec en moyenne. En 60 sec, le phagosome a acquis une riche couche de PtdIns(3)P. À partir de là, la lumière du phagosome rétrécit et la souche sauvage de *L. pneumophila* accumule du PtdIns(4)P sur sa LCV « étroite ». Au cours des 2 premières heures, la concentration en PtdIns(4)P augmente, et la lumière de la LCV s'agrandit. Le PtdIns(3)P est lentement perdu, condensé et exclu de la LCV maturée. La LCV maintenant « spacieuse » maintient un discret pool de PtdIns(4)P séparé du RE entourant la vacuole, qui a été acquis 30 à 60 min après l'entrée. Après 8h d'infection, les bactéries ont réalisé quelques cycles de réplication. Le manteau de PtdIns(4)P sur la membrane de la LCV persiste et peut encore être discerné comme séparé du réseau de RE entourant la vacuole. Concernant le mutant avirulent $\Delta icmT$, le phagosome riche en PtdIns(3)P rétrécit et reste étroitement associé à la bactérie. Le marqueur endocytique PtdIns(3)P persiste au-delà de 2h, et le phagosome n'acquiert jamais de PtdIns(4)P à sa surface. À 8h post-entrée, la dégradation du mutant $\Delta icmT$ a eu lieu.

des endosomes précoces tandis que l'appareil de Golgi présente une abondante quantité de phosphatidylinositol-4-phosphate (PtdIns(4)P) (Allombert *et al.*, 2013).

La visualisation de l'évolution morphologique de la LCV, issue de la membrane plasmique et dérivant vers une membrane de RE très tôt après l'internalisation, témoigne des modifications lipidiques nécessaires à la formation de la LCV durant l'infection (Tilney *et al.*, 2001). Récemment, Weber *et al.* ont réussi à suivre en temps réel les différentes catégories de PtdIns durant l'infection de *Legionella*, démontrant ainsi la dynamique de la composition lipidique de la LCV (figure 12) (Weber *et al.*, 2014). Suite à l'entrée de *Legionella* dans sa cellule hôte, la bactérie se retrouve transitoirement entourée de phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PtdIns(3,4,5)P₃) et PtdIns(4)P provenant d'un enrichissement dû à la coupe phagocytaire formée à la membrane plasmique pour l'internalisation de la bactérie. La vacuole commence alors le processus de maturation de la voie de dégradation endocytaire en acquérant du PtdIns(3)P. À partir de cette étape, le remodelage lipidique de la LCV se poursuit selon deux voies distinctes, dépendantes de la présence du SST4 Dot/Icm. Un mutant présentant un système de translocation Dot/Icm non fonctionnel, comme le mutant $\Delta icmT$, continue d'accumuler du PtdIns(3)P à sa membrane avant d'être dégradé. Au contraire, une souche sauvage de *L. pneumophila* perd lentement le PtdIns(3)P de sa LCV et acquiert graduellement du PtdIns(4)P. La présence de PtdIns(4)P sur la LCV permet alors le recrutement de RE autour de la vacuole ainsi que la multiplication de la bactérie (Weber *et al.*, 2014).

L. pneumophila module la composition lipidique de sa LCV par le biais d'effecteurs Dot/Icm modifiant directement les PtdIns, mais aussi d'effecteurs recrutant les enzymes de modifications lipidiques de l'hôte (figure 13). Le PtdIns(3)P de la LCV peut être enlevé par l'effecteur SidP. En effet, SidP est une phosphoinositide-3-phosphatase hydrolysant le PtdIns(3)P en PtdIns, *in vitro* et chez la levure (Toulabi *et al.*, 2013). Une perte lente du PtdIns(3)P serait nécessaire pour que divers effecteurs puissent l'utiliser comme point d'ancrage et ainsi mener à bien le cycle infectieux de *Legionella* (Weber *et al.*, 2014). Concernant l'importante accumulation de PtdIns(4)P sur la vacuole, plusieurs mécanismes ont été mis en évidence. L'effecteur SidF, localisé sur la membrane de la LCV, possède une activité phosphoinositide phosphatase qui déphosphoryle les PtdIns(3,4,5)P₃ et PtdIns(4,5)P₂ pour produire des PtdIns(4,5)P₂ et PtdIns(4)P (Hsu *et al.*, 2012). Au cours de l'infection, l'effecteur LpnE est aussi retrouvé sur la LCV mais, au lieu d'agir directement sur les PtdIns, il recrute l'enzyme OCRL1 de l'hôte. La phosphatase OCRL1 se retrouve donc sur la vacuole, où elle déphosphoryle le PtdIns(3,4,5)P₃ et le PtdIns(4,5)P₂ donnant ainsi, respectivement, du PtdIns(3,4)P₂ et du PtdIns(4)P (Weber *et al.*, 2009). Une autre famille d'enzymes de l'hôte contribue à l'enrichissement de la LCV en PtdIns(4)P, les PI4KIII. Ces enzymes sont des phosphoinositide kinases qui catalysent l'ajout d'un groupement phosphate en position 4 sur le PtdIns, générant ainsi du

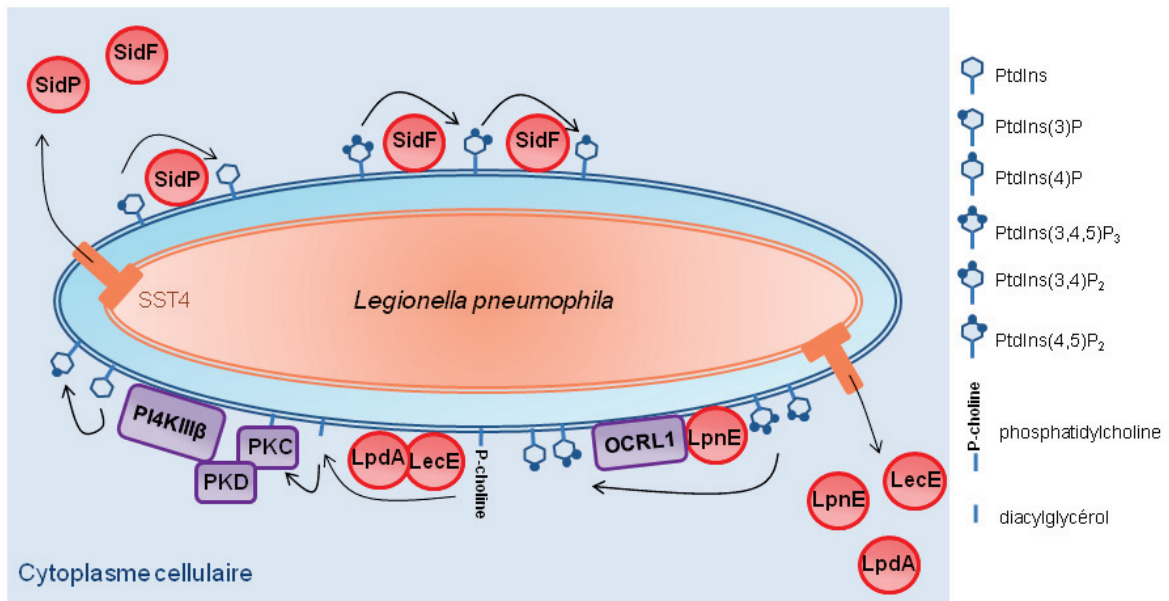


Figure 13 : Remodelage des lipides de la LCV par les effecteurs de *L. pneumophila*.

L. pneumophila injecte dans le cytoplasme de sa cellule hôte plusieurs effecteurs Dot/Icm capables de modifier la composition lipidique de la LCV. Certains effecteurs modifient directement les phosphoinositides à la surface de la vacuole (SidP, SidF) tandis que d'autres recrutent directement ou indirectement la machinerie de l'hôte pour réaliser cette modification (LpnE, LecE, LpdA). Ce remodelage de la composition lipidique de la LCV aboutit à son enrichissement en PtdIns(4)P, protégeant ainsi la bactérie et créant des points d'ancrage pour d'autres effecteurs Dot/Icm.

PtdIns(4)P. L'absence de la PI4KIII β ou de la PI4KIII α diminue la quantité de PtdIns(4)P présent sur la membrane de la LCV (Brombacher *et al.*, 2009; Hubber *et al.*, 2014). Les mécanismes participant à cette voie ne sont pas encore clairement identifiés. Néanmoins, il semble qu'un duo d'effecteur, LecE et LpdA, pourrait indirectement participer au recrutement de la protéine kinase PI4KIII β . En effet, LecE et LpdA se localisent sur la LCV où ils agissent de manière synergique afin de transformer la phosphatidylcholine membranaire en diacylglycérol (DAG). La forte concentration en DAG de la membrane de la vacuole recruterait alors les protéines kinases C et D (PKC et PKD) de l'hôte. La PKC activerait la PKD par phosphorylation aboutissant ainsi au recrutement de la phosphoinositide kinase PI4KIII β sur la LCV (Viner *et al.*, 2012).

Finalement, l'ensemble de ces protéines, bactériennes ou cellulaires, modifie la composition lipidique de la vacuole de *Legionella*, la faisant passer d'une membrane plasmique à une membrane riche en PtdIns(4)P similaire à celle de l'appareil de Golgi. *Legionella* utilise alors cette ressemblance à son avantage, en détournant le trafic vésiculaire entre l'appareil de Golgi et le RE pour décorer sa LCV avec ce dernier. De plus, le remodelage lipidique de la LCV permet le recrutement et l'ancrage de nombreux effecteurs Dot/Icm à sa surface.

➤ Contrôle spatio-temporelle de la présence des effecteurs Dot/Icm sur la LCV

Au cours de l'infection, de nombreux effecteurs Dot/Icm sont présents à la surface de la LCV. Certains d'entre eux semblent être capables de s'insérer directement dans la membrane de la vacuole, comme cela a été récemment montré pour RalF. En effet, RalF possède un groupe d'acides aminés aromatiques dans son domaine de « coiffe », domaine bloquant l'accès au domaine enzymatique, qui contrôle sa localisation durant l'infection. Ce motif s'insérerait dans la membrane de la LCV changeant ainsi la conformation de l'effecteur et libérant son domaine catalytique (Folly-Klan *et al.*, 2013).

Certains effecteurs lient le PtdIns(3)P de la LCV, comme c'est le cas pour LidA, SetA, LpnE, LtpD et RidL. L'effecteur LidA est ancré à la LCV via majoritairement du PtdIns(3)P mais il est aussi capable de fixer du PtdIns(4)P avec une affinité plus faible (Brombacher *et al.*, 2009). L'effecteur SetA possède un domaine de liaison au PtdIns(3)P dans sa région C-terminale ainsi qu'une activité glycosyltransférase à son autre extrémité (Jank *et al.*, 2012). LpnE se lie au PtdIns(3)P de la LCV contribuant ainsi au recrutement de l'enzyme OCRL1 de l'hôte (Weber *et al.*, 2009). LtpD est un substrat Dot/Icm ancré à la surface du phagosome via le PtdIns(3)P et qui est aussi capable d'interagir avec la phosphatase IMPA-1 de l'hôte (Harding *et al.*, 2013). Finalement, l'effecteur RidL fixe aussi le PtdIns(3)P de la LCV empêchant alors la formation des complexes rétromère par

compétition, complexes régulateurs du trafic rétrograde remontant l'appareil de Golgi pour délivrer des protéines au RE (Finsel *et al.*, 2013).

Un ensemble d'effecteurs de *Legionella* s'ancre à la surface de la LCV non par le PtdIns(3)P, mais via le PtdIns(4)P. SidC et son paralogue SdcA font notamment partie de cette famille. En effet, l'association de SidC et SdcA aux PtdIns(4)P se produit grâce à leurs domaines C-terminaux qui ne possèdent aucune homologie avec les domaines déjà connus pour lier ce PtdIns, et ont été référencés comme domaine P4C (Ragaz *et al.*, 2008). Un troisième effecteur, SidM (aussi appelé DrrA), s'est avéré s'attacher à la LCV grâce à une interaction entre son domaine C-terminal et le PtdIns(4)P. Bien que se soit la même partie des effecteurs qui interagisse, le domaine de liaison au PtdIns(4)P de SidM ne présente là encore aucune homologie avec les domaines déjà connus pour lier ce type de PtdIns, y compris avec SidC, aboutissant à la dénomination du domaine de SidM P4M (Brombacher *et al.*, 2009). Récemment, une étude a mis en évidence que deux effecteurs de *L. pneumophila* possédaient des régions C-terminales avec une forte similarité pour le domaine P4M de SidM. Ces substrats Dot/Icm, Lpg1101 et Lpg2603, sont également capables de se fixer sur le PtdIns(4)P de la LCV, et constituent une nouvelle famille de domaine liant le PtdIns(4)P : les domaines LEPR pour « *Legionella* effector PtdIns(4)P binding region » (Hubber *et al.*, 2014). Cette étude a aussi mis en évidence une régulation de la présence des effecteurs plus fine que la simple fixation au PtdIns(4)P. Effectivement, il semble que les effecteurs avec un domaine LEPR ne se lient pas au même PtdIns(4)P que l'effecteur SidC puisque l'inhibition de la protéine kinase PI4KIII α réduit le recrutement de SidM sur la LCV, alors que la présence de SidC est diminuée par une inhibition de la protéine PI4KIII β . Cette hypothèse est cohérente avec la rapide dissociation de SidM de la LCV une fois que la réplique a commencé, tandis que SidC reste localisé sur la vacuole mature (Weber *et al.*, 2006). Il apparaît donc qu'il pourrait exister une régulation spatio-temporelle des effecteurs de *Legionella* via leur domaine de fixation au PtdIns(4)P (Hubber *et al.*, 2014).

L. pneumophila utilise également le détournement d'une modification post-traductionnelle de la cellule hôte afin d'ancrer ses effecteurs à la surface de la LCV. En effet, l'effecteur AnkB doit être prénylé pour se lier à la membrane de la vacuole (Price *et al.*, 2010a). La prénylation correspond à une modification lipidique consistant à l'ajout d'un acide gras, un groupement farnesyl (C15) ou geranyl-geranyl (C20), au niveau d'un domaine CAAX de la région C-terminale d'une protéine (Michard & Doublet, 2015). Cette modification permet l'ancrage d'une protéine hydrophile à la bicouche lipidique des membranes, contrôlant ainsi sa localisation cellulaire. Concernant AnkB, on sait maintenant que cet effecteur est sécrété dès l'attachement de *Legionella* à sa cellule hôte. AnkB est alors prénylé par la machinerie de l'hôte, ce qui conduit l'effecteur à s'ancre à la membrane plasmique sous le site d'attachement de la bactérie, et à participer ainsi au recrutement de la

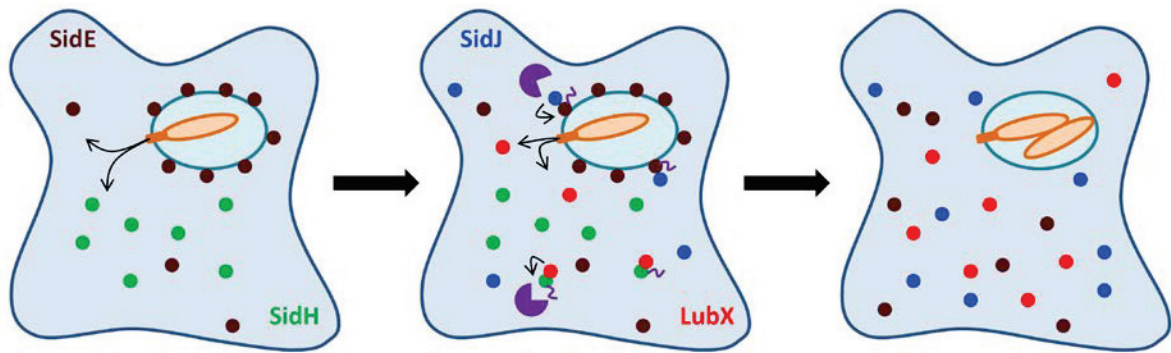


Figure 14 : Contrôle spatio-temporel des effecteurs SidE et SidH dans le cytoplasme de l'hôte par des métaeffecteurs.

Après infection d'une cellule par *L. pneumophila*, les effecteurs SidH et SidE sont injectés dans le cytoplasme de l'hôte via le SST4 Dot/Icm. Ces deux effecteurs sont régulés par les métaeffecteurs LubX et SidJ respectivement. LubX, sécrété plus tardivement au cours du cycle infectieux, participe directement à la poly-ubiquitination de SidH, engendrant ainsi sa dégradation par le protéasome de l'hôte. SidJ est lui aussi sécrété plus tardivement durant l'infection. Il permet indirectement la dégradation de SidE par le protéasome, mais il régule uniquement le pool de SidE présent sur la LCV et non le pool au niveau des organelles cellulaires.

machinerie de prénylation de l'hôte au niveau de la vacuole naissante (Bruckert *et al.*, 2014). De façon intéressante, des approches bioinformatiques ont identifié 12 gènes codants pour des protéines à domaine CAAX dans les génomes de *L. pneumophila*. Ces différents effecteurs, parmi lesquels LegG1, sont prénylés par la machinerie de l'hôte, ce qui les localise au niveau des membranes suite à une expression ectopique en cellules de mammifère. Ces études laissent supposer que AnkB n'est pas le seul substrat Dot/Icm capable de se lier à la LCV grâce à la prénylation (Ivanov *et al.*, 2010; Price *et al.*, 2010b).

L. pneumophila a donc mis en place divers moyens de contrôler la localisation de ses effecteurs dans la cellule hôte, après sécrétion, et il semble également qu'elle réussisse à établir un contrôle temporel de leur présence. En effet, des analyses génomiques ont révélé que *L. pneumophila* possédait des effecteurs avec des domaines F-box ou U-box connus pour leur participation à la machinerie d'ubiquitination de la cellule (Cazalet *et al.*, 2004; de Felipe *et al.*, 2005). La bactérie pourrait manipuler le protéasome cellulaire pour permettre la dégradation de protéines spécifiques au cours de l'infection, et notamment des effecteurs. Deux exemples ont démontré la validité de cette hypothèse en identifiant des métaeffecteurs, c'est-à-dire des effecteurs régulant la fonction d'autres effecteurs au cours de l'infection (figure 14). La première étude portait sur LubX, un substrat Dot/Icm avec deux domaines U-box et donc une activité ubiquitine ligase similaire aux ubiquitine ligases de la voie d'ubiquitination cellulaire (Kubori *et al.*, 2008). LubX interagit avec et polyubiquitine l'effecteur SidH qui est alors dégradé par le protéasome au cours de l'infection (Kubori *et al.*, 2010). SidJ s'est révélé être lui aussi un métaeffecteur via son action sur SidE. Effectivement, SidE est enlevé de la LCV par SidJ via un mécanisme encore inconnu mais impliquant au final le protéasome. Contrairement à LubX, SidJ contrôle négativement la présence de SidE uniquement sur la vacuole, il ne régule pas le second pool de SidE présent aux organelles cellulaires (Jeong *et al.*, 2015a).

L'ensemble de ces mécanismes semblent donc contrôler spécifiquement la présence et/ou la localisation des divers effecteurs de *Legionella* au cours de l'infection. Au vu de la complexité des données connues à ce jour, il apparaît que la compréhension de la régulation spatio-temporelle des effecteurs est probablement loin d'être complète.

➤ Recrutement du réticulum endoplasmique sur la LCV par détournement des petites GTPases

Le trafic vésiculaire des cellules eucaryotes est régulé par la famille des petites GTPases. Ces protéines sont présentes sous deux formes : une forme inactive, cytoplasmique, liée au GDP ; et une forme active, membranaire, liée au GTP. Le passage de l'état actif à inactif de ces différentes GTPases est orchestré par quatre groupes de protéines régulatrices (figure 15). Les GAP (GTPase-Activating-Proteins) stimulent l'activité intrinsèque des GTPases, inactivant ainsi les protéines par hydrolyse du

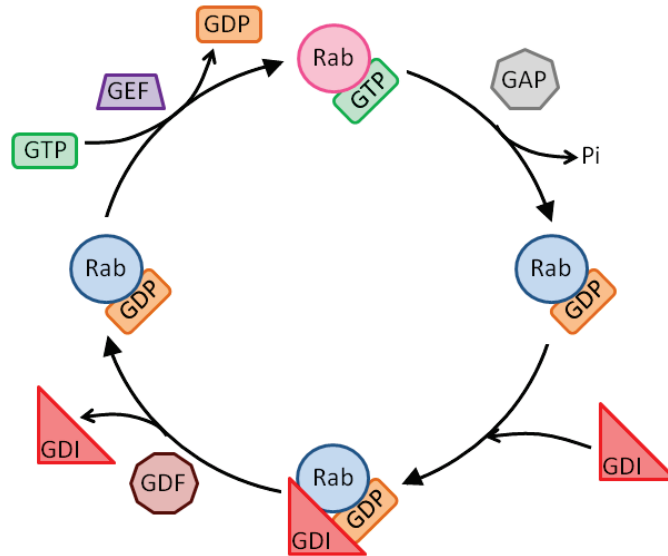


Figure 15 : Cycle d'activation et inactivation des petites GTPases.

GEF : Guanine Exchange Factor ; GAP : GTPase Activating Protein ; GDI : Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor ; GDF : GDI Displacement Factor.

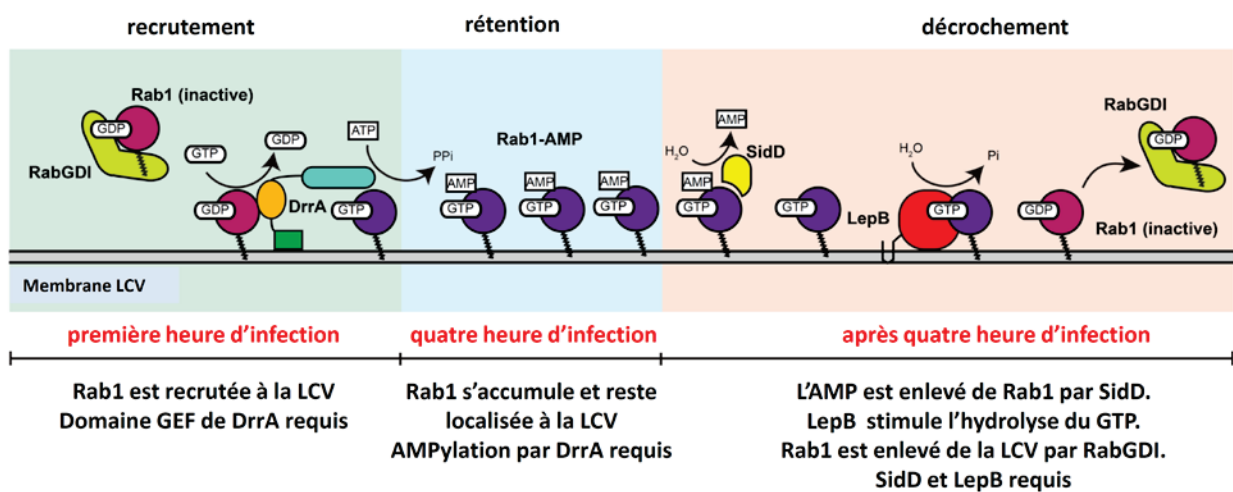


Figure 16 : Dynamique de Rab1 sur la LCV (d'après Hardiman & Roy, 2014).

La localisation de Rab1 sur la membrane de la LCV est temporellement contrôlée en 3 étapes distinctes. Le recrutement de Rab1 se fait dans la première heure d'infection par le domaine GEF de DrrA (aussi appelé SidM). La protéine Rab1 active, associée à la membrane, est AMPylée par DrrA, permettant ainsi sa rétention et son accumulation sur la membrane de la LCV au cours des heures suivantes. Après 4h, l'activité de déAMPylation de SidD stimule la génération de Rab1 non-modifiée, qui est alors inactivée par LepB via l'hydrolyse du GTP. La protéine Rab1 inactive est enlevée de la LCV et séquestrée dans le cytoplasme cellulaire par la protéine RabGDI.

GTP. Au contraire, les GEF (Guanine nucleotide-Exchange Factors) activent les petites GTPases en favorisant l'échange de GDP en GTP. En absence de signal activateur, les GTPases cytoplasmiques sont séquestrées par des GDI (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor), les bloquant ainsi dans leur forme inactive. Lorsque qu'un signal activateur se produit, les GDF (GDI Displacement Factors) dissocient les GTPases des GDI, leur conférant alors une conformation adéquate à leur ancrage dans la membrane du compartiment cellulaire approprié (Bhuin & Roy, 2014; Chavrier & Goud, 1999).

L. pneumophila est capable de manipuler le trafic vésiculaire de la cellule hôte à son avantage, transformant ainsi le phagosome naissant en une LCV. En effet, différents effecteurs Dot/Icm détournent les petites GTPases afin de manipuler le transport, la reconnaissance et la fusion de vésicules dérivées du RE à la LCV.

Parmi les GTPases ciblées par *Legionella*, Ran est détournée par l'effecteur LegG1 au niveau de la LCV, afin de déplacer le phagosome et de probablement contrôler son transport jusqu'aux vésicules de RE. En effet, LegG1 est ancré à la membrane de la LCV par l'ajout d'un groupement lipidique via la prénylation (Ivanov *et al.*, 2010; Rothmeier *et al.*, 2013). Il permet alors l'accumulation de protéines RANBP1 (Ran-binding protein 1) sur la vacuole qui, via leur domaine liant la forme active de Ran, assiste LegG1 pour activer les Ran déjà présentes sur la LCV. Au cours de l'infection, l'activation des Ran par LegG1/RANBP1 stabilise/polymérise des microtubules, permettant le déplacement de la LCV sur ce réseau cellulaire pour finalement aboutir à une réplication intracellulaire optimale de la bactérie. Cette mobilité sur le cytosquelette des microtubules pourrait éloigner la LCV des membranes cellulaires et/ou la rapprocher des compartiments cellulaires cibles comme par exemple le RE (Rothmeier *et al.*, 2013).

La principale GTPase régulatrice du trafic vésiculaire entre le RE et le Golgi, Rab1, est une cible majeure des effecteurs de *L. pneumophila*. Effectivement, pas moins de six substrats Dot/Icm contrôlent directement Rab1 au cours de l'infection (figure 16). Tout d'abord, *Legionella* transloque dans le cytoplasme de la cellule hôte SidM (aussi appelé DrrA) qui se localise sur la LCV via une interaction avec le PtdIns(4)P (Brombacher *et al.*, 2009). L'effecteur SidM recrute et active la petite GTPase Rab1 sur la LCV, via un domaine GEF, libérant la GTPase des protéines GDI et échangeant le GDP en GTP (Hardiman & Roy, 2014; Ingmundson *et al.*, 2007; Machner & Isberg, 2006; Murata *et al.*, 2006; Schoebel *et al.*, 2009). Le domaine N-terminal de SidM possède également une activité enzymatique d'AMPylation qui ajoute un groupement AMP sur la tyrosine 77 de Rab1 (Müller *et al.*, 2010). Cette modification post-traductionnelle protège Rab1 des différentes protéines à activité GAP, permettant ainsi son accumulation et son maintien sous forme active à la surface de la vacuole (Hardiman & Roy, 2014; Müller *et al.*, 2010). L'effecteur LidA, ancrée à la LCV, n'a pas d'activité GAP

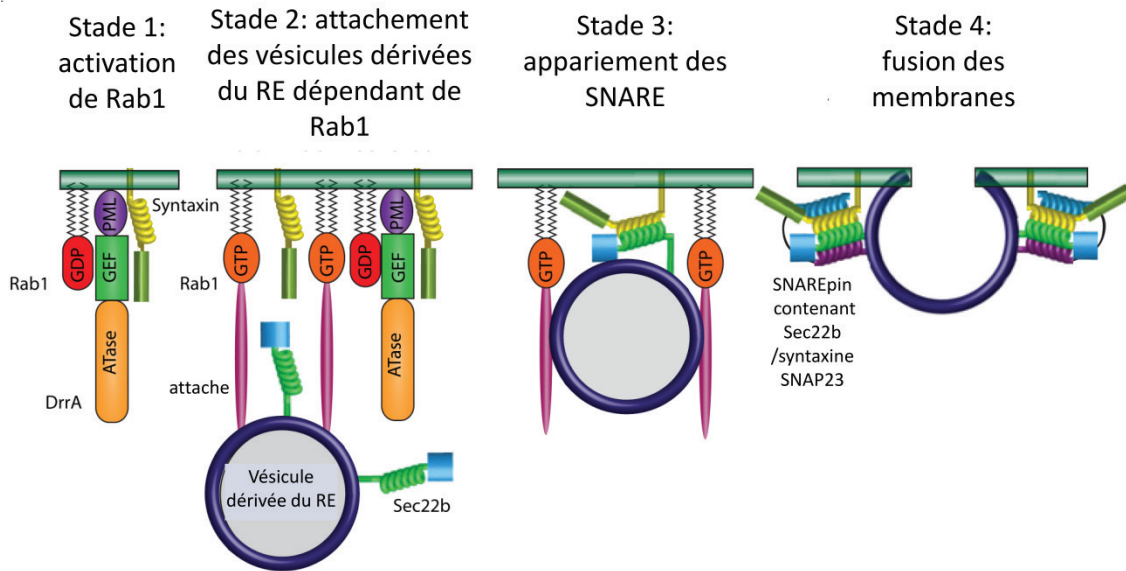


Figure 17 : Modèle d'attachement et de fusion de vésicules dérivées du RE avec la LCV via DrrA (d'après Arasaki *et al.*, 2012).

La première étape montre DrrA (aussi appelé SidM) recrutant la petite GTPase Rab1-GDP à la membrane et s'associant avec la syntaxine Stx3. Dans la seconde étape, l'activité GEF de DrrA active Rab1 sur la vacuole dérivée de la membrane plasmique et Rab1 activée est requise pour l'association des vésicules dérivées du RE possédant Sec22b. Un facteur d'attachement qui lie Rab1 activée est prédit pour être impliqué. Dans un troisième temps, les interactions entre les protéines Sec22b et Stx3 résultent dans l'attachement des vésicules. Puis finalement, la fusion des vésicules dérivées du RE avec la vacuole dérivée de la membrane plasmique se fait par l'assemblage d'un complexe SNARE fonctionnel (SNAREpin) consistant de la v-SNARE Sec22b et de la t-SNARE comprenant Stx3 et SNAP23.

ou GEF mais il est capable de lier Rab1 sous ses formes active et inactive, et la présence d'un groupement AMP ou phosphocholine (voir ci-après) ne gêne pas cette interaction (Cheng *et al.*, 2012; Machner & Isberg, 2006). Peu de choses sont connues sur la fonction de LidA. Cependant, il a été suggéré qu'au cours de l'infection, LidA interagisse avec Rab1 afin de la protéger de la déAMPylation et/ou de la déphosphocholination (voir ci-après), la maintenant ainsi dans une conformation active (Neunuebel *et al.*, 2012). L'activation de la petite GTPase Rab1 à la surface de la LCV favorise alors l'attachement de vésicules du RE à la vacuole. Suite à ce rapprochement, une fusion entre les deux compartiments se produit.

Chez les organismes eucaryotes, les événements de fusion membranaire impliquent des protéines SNARE (soluble NSF attachment protein receptor) : les v-SNARE présentes sur la vésicule interagissent avec les t-SNARE portées par l'organelle cible. Cette étape est encore peu documentée dans le détournement du RE par *L. pneumophila*. Néanmoins, une première étude d'Arasaki *et al.* a montré que les événements de fusion pour former la LCV impliquaient la v-SNARE Sec22b sur les vésicules du RE et les complexes t-SNARE syntaxine de la membrane plasmique (Arasaki & Roy, 2010). De plus, le même groupe a mis en évidence que SidM pouvait également intervenir dans cette étape. SidM interagit avec la syntaxine-3 de la membrane plasmique présente sur la vacuole, par l'intermédiaire de Rab1. Cette interaction est suffisante pour générer l'assemblage d'un complexe syntaxine/Sec22b engendrant ainsi la fusion entre des vésicules du RE et la LCV (figure 17) (Arasaki *et al.*, 2012). Récemment, il a été découvert que *L. pneumophila* possédait aussi ses propres SNARE. L'effecteur LseA est une t-SNARE similaire à la syntaxine-6 cellulaire. Ce substrat Dot/Icm interagit avec les protéines SNARE de l'hôte et se localise au niveau des membranes cellulaires associées au Golgi par une farnesylation. Le rôle de cette SNARE bactérienne n'a cependant pas encore été élucidé (King *et al.*, 2014).

Par la suite, la petite GTPase Rab1 est désactivée et éliminée de la surface de la LCV par, là encore, une fine orchestration des effecteurs de *Legionella*. SidD possède une activité déAMPylase, enlevant ainsi le groupement AMP de Rab1 (Neunuebel *et al.*, 2011; Tan & Luo, 2011). La dé-AMPylation de Rab1 la rend accessible à LepB. L'effecteur LepB a une activité GAP qui lui permet de stimuler l'hydrolyse du GTP en GDP. La petite GTPase est alors inactivée et décrochée de la membrane de la LCV (Hardiman & Roy, 2014; Ingmundson *et al.*, 2007).

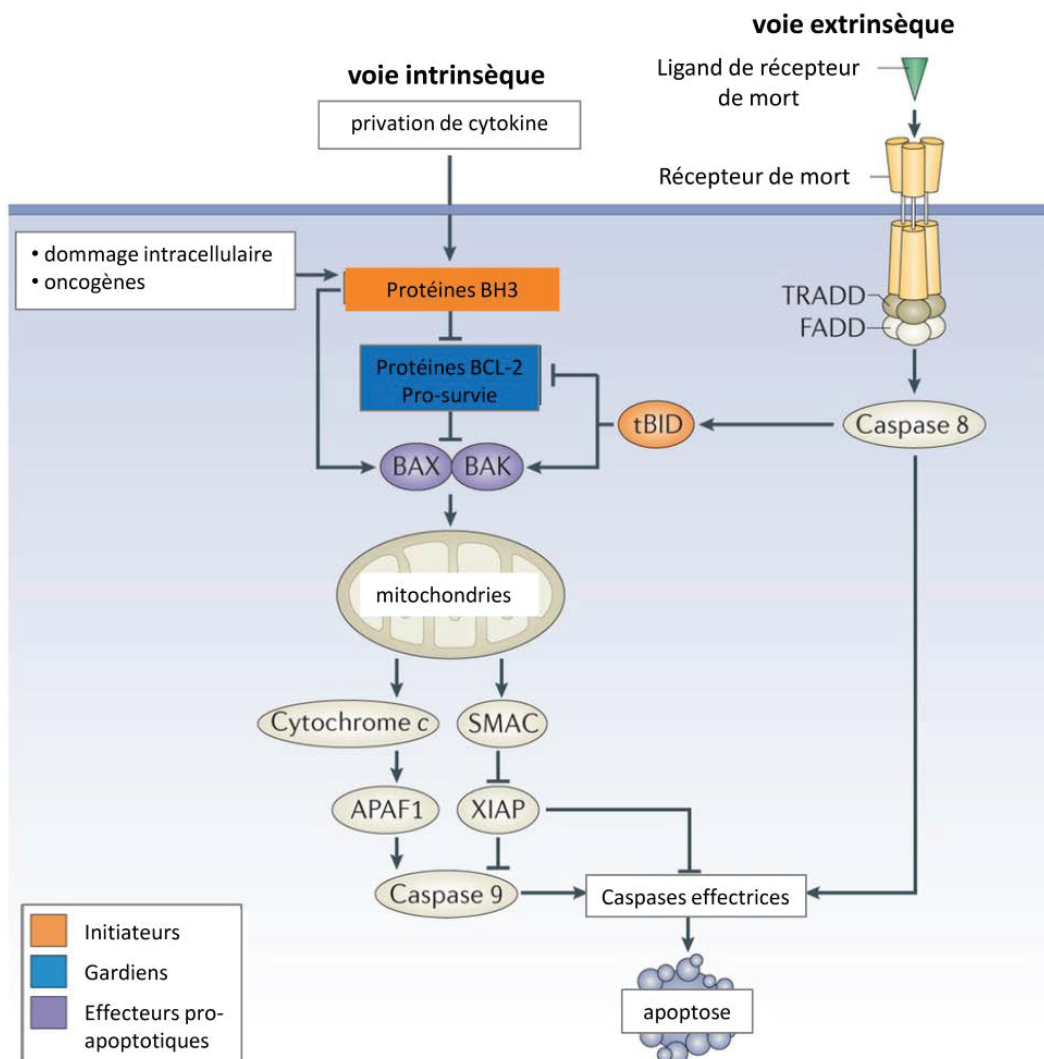
En plus de l'action séquentielle et antagoniste de SidM, SidD et LepB sur Rab1, deux autres effecteurs ciblent cette petite GTPase, conférant là encore à *Legionella* la capacité de contrôler Rab1, probablement dans un but différent de la fusion entre le RE et la LCV. AnkX possède une nouvelle activité de modification post-traductionnelle, la phosphocholination. Cette activité enzymatique

ajoute un groupement phosphocholine sur la serine 76 de Rab1 (Mukherjee *et al.*, 2011). Cette modification bloque Rab1 sous sa forme active, comme précédemment observé pour l'AMPylation par SidM, et rend la GTPase inaccessible au GAP. Néanmoins, il a récemment été montré que la phosphocholination ne peut se faire à la place de l'AMPylation et, considérant que AnkX n'est pas adressé sur la LCV, il a été proposé que AnkX régule la fonction de Rab1 au niveau d'autre organelle cellulaire (Hardiman & Roy, 2014). Similairement à l'AMPylation, la phosphocholination est un mécanisme réversible contrôlé par l'effecteur Lem3 (Goody *et al.*, 2012; Tan *et al.*, 2011).

Une autre GTPase impliquée dans le trafic entre le RE et l'appareil de Golgi, est détournée par *L. pneumophila*, il s'agit d'Arf1. L'effecteur RalF recrute et active Arf1 sur la LCV via une activité GEF portée par son extrémité N-terminale, homologue au domaine Sec7 (Nagai *et al.*, 2002). La partie C-terminale de RalF est un domaine de « coiffe » régulant l'activité GEF de la protéine par blocage de l'accès à son domaine catalytique (Alix *et al.*, 2012). Bien qu'il ait d'abord été envisagé que RalF se fixe sur la LCV via des PtdIns, il a récemment été montré que le domaine de « coiffe » de RalF possédait un groupe d'acides aminés aromatiques capable de s'insérer directement dans la membrane (Folly-Klan *et al.*, 2013). RalF s'insère donc spécifiquement à la surface de la LCV, ce qui régulerait efficacement l'activation ciblée d'Arf1. La délétion du gène *ralF* n'altère pas la croissance intracellulaire de *L. pneumophila*, bien que le rôle d'Arf1 soit essentiel à la biogénèse de la LCV (Dorer *et al.*, 2006; Nagai *et al.*, 2002). Il semble donc que d'autres effecteurs de *Legionella* contrôlent également la petite GTPase Arf1.

De plus, il s'avère que SidC et son paralogue SdcA participent au recrutement du RE sur la LCV (Ragaz *et al.*, 2008). Ces deux effecteurs ont été récemment caractérisés comme des ubiquitine E3 ligases. L'activité enzymatique de SidC est essentielle pour le recrutement du RE, potentiellement au travers d'Arf1 et de protéines ubiquitinilées au niveau de la LCV. Il apparaît aussi que SidC et SdcA peuvent indirectement mono-ubiquitiniler Rab1, mais le mécanisme n'est pas encore connu (Horenkamp *et al.*, 2014; Hsu *et al.*, 2014).

Finalement, *L. pneumophila* détourne au moins trois petites GTPases cellulaires, et il est facilement envisageable que ce ne soit pas les seules puisqu'une croissance intracellulaire optimale de la bactérie nécessite par exemple Rab6, Rab8A, Rab10 ou encore Rab32 (Chen & Machner, 2013; Hoffmann *et al.*, 2014a). La GTPase SAR1 a aussi un rôle critique lors de la biogénèse de la LCV, qui correspondrait à l'attachement des vésicules de RE à la vacuole (Kagan & Roy, 2002; Robinson & Roy, 2006). Par ailleurs, d'autres effecteurs Dot/Icm, tel que le métaeffecteur SidJ, participent également à la biogénèse de la LCV mais le mécanisme impliqué n'est pas encore décrit (Liu & Luo, 2007).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure 18 : Mécanismes d'activation des voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose (d'après Czabotar *et al.*, 2014).

Divers stimuli cytotoxiques déclenchent la voie intrinsèque, aussi appelée voie mitochondriale, qui est régulée par les membres de la famille BCL-2. Ces stimuli engendrent l'altération de l'intégrité de la membrane externe mitochondriale via l'activation des effecteurs pro-apoptotiques BAX et BAK. La libération des composés mitochondriaux active la caspase 9. La voie extrinsèque, via des récepteurs de mort, est activée quand des ligands de la famille des TNF se fixent sur les récepteurs de la membrane plasmique, entraînant l'activation de la caspase 8. Les 2 voies convergent alors à l'activation des caspases effectrices (caspases 3, 6 et 7). Ces dernières provoquent ainsi la mort cellulaire par apoptose.

1.5.4. La sortie des cellules hôtes

En plus de détourner les différentes voies de trafic vésiculaire de son hôte, *L. pneumophila* est capable de contrôler la destinée de la cellule. En effet, la bactérie maintient tout d'abord en vie la cellule pour établir sa vacuole répliquative et se multiplier. Ensuite, lorsque la réplication est achevée, le pathogène déclenche la mort de son hôte afin d'être libéré dans l'environnement et ainsi pouvoir infecter de nouvelles cellules. De multiples effecteurs Dot/Icm ont été caractérisés comme régulant la mort cellulaire de l'hôte mais le mécanisme global reste encore mal connu.

L'apoptose est un des mécanismes de mort cellulaire utilisé par les cellules eucaryotes. Il s'agit d'un processus actif, programmé et autonome de démantèlement cellulaire sans activation de l'inflammation. Ce mécanisme peut être initié par deux voies de signalisation distinctes : la voie extrinsèque, déclenchée par la fixation de ligands pro-apoptotiques sur des récepteurs de mort; et la voie intrinsèque, due à des stress intracellulaires et dans lequel les mitochondries jouent un rôle important, notamment via la libération de cytochrome *c*. L'apoptose implique aussi des protéases spécifiques, appelées caspases, que l'on peut répartir en deux groupes : les caspases dites initiatrices, correspondant aux caspases 2, 8, 9 et 10, activent des caspases effectrices, les caspases 3, 6 et 7. Ces dernières clivent différents substrats, aboutissant alors au fractionnement cellulaire (figure 18). Le démantèlement cellulaire engendre des changements morphologiques caractéristiques et spécifiques avec une condensation nucléaire et cytoplasmique, ainsi que la formation de corps apoptotiques (Fink & Cookson, 2005).

Bien que *L. pneumophila* déclenche l'activation de la caspase 3 au cours des premiers stades de l'infection, l'apoptose n'est finalement provoquée qu'à des stades tardifs (Abu-Zant *et al.*, 2005). Ce retard d'activation de la mort cellulaire par apoptose est dû à la mise en place d'une balance anti-apoptotique par *Legionella* grâce à diverses stratégies (figure 19). L'effecteur SidF inactive les facteurs Bcl-Rambo et BNIP3, deux membres de la famille pro-apoptotique Bcl-2. L'interaction entre SidF et ces deux protéines permet donc d'augmenter la résistance apoptotique, mais la délétion du gène *sidF* a démontré que cette action n'est nécessaire que tardivement durant l'infection (Banga *et al.*, 2007). Un autre moyen pour *Legionella* d'arrêter l'apoptose est l'activation indirecte de l'expression de gènes anti-apoptotiques via le facteur de transcription NF- κ B (Abu-Zant *et al.*, 2007; Losick & Isberg, 2006). Une fois la voie NF- κ B activée, les kinases IKK phosphorylent les protéines inhibitrices de la famille I κ B, ce qui conduit à la libération du facteur NF- κ B et à sa translocation dans le noyau de la cellule (Hayden & Ghosh, 2008). L'effecteur bactérien LnaB induit fortement cette voie cellulaire mais son mode d'action n'a pas encore été identifié (Losick *et al.*, 2010). Contrairement à LnaB, le mécanisme d'activation de la voie NF- κ B par le substrat Dot/Icm LegK1 a été élucidé.

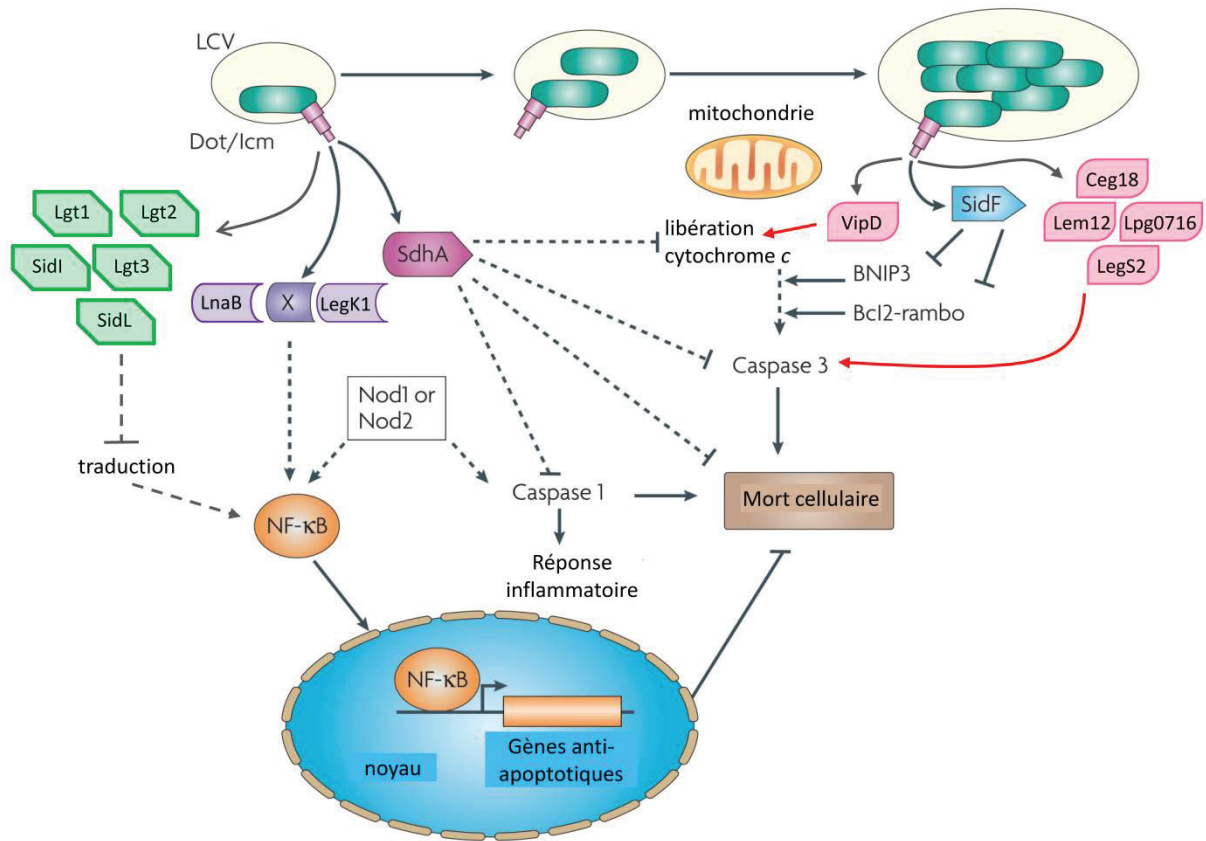


Figure 19 : Différentes stratégies mises en place par *L. pneumophila* pour contrôler l'apoptose (d'après Isberg *et al.*, 2009).

L. pneumophila transloque différents effecteurs afin de réguler l'apoptose de sa cellule hôte. Certains d'entre eux inhibent l'apoptose pour permettre à la bactérie de former sa vacuole répliquative et de se multiplier (Lgt1, Lgt2, Lgt3, SidI, SidL, LnaB, LegK1, SdhA, SidF). Ils ciblent principalement la voie anti-apoptotique NF-κB. D'autres effecteurs vont plutôt intervenir à la fin du cycle infectieux, déclenchant ainsi l'apoptose pour libérer les bactéries dans le milieu extérieur (Ceg18, Lem12, Lpg0716, LegS2 et VipD) (activités représentées par une flèche rouge).

Effectivement, Ge *et al.* ont montré que LegK1 mimait les protéines kinases IKK en phosphorylant l'inhibiteur IκB, libérant ainsi le facteur de transcription (Ge *et al.*, 2009). Les effecteurs Lgt1, Lgt2, Lgt3, SidI et SidL sont également connus pour cibler cette voie par une inhibition de la machinerie de traduction de l'hôte, diminuant la production d'IκB (Fontana *et al.*, 2011; Shen *et al.*, 2009). On peut noter que l'inhibition de la traduction se fait, en partie, grâce à une modification post-traductionnelle, la glycosylation du facteur d'élongation eEF1A (Belyi *et al.*, 2006). Il a récemment été démontré qu'une autre modification post-traductionnelle pouvait modifier l'expression de gènes immunitaires, la méthylation de l'histone H3 par l'effecteur RomA / LegAS4 (Li *et al.*, 2013; Rolando *et al.*, 2013). De plus, l'effecteur SdhA contribue à la maintenance de l'intégrité de la LCV et est impliqué dans la prévention de la mort cellulaire (Laguna *et al.*, 2006). En l'absence de *sdhA*, la phospholipase bactérienne PlaA n'est plus régulée ce qui libère précocement les bactéries dans le cytoplasme des cellules hôtes, déclenchant alors des réponses immunitaires de types caspases et la mort cellulaire par pyroptose (Creasey & Isberg, 2012; Ge *et al.*, 2012).

Finalement, *L. pneumophila* stimule l'apoptose des cellules via différents effecteurs, favorisant ainsi sa sortie de la cellule hôte. Il semble que la bactérie procède en deux étapes : dans un premier temps, les légionelles rompent la membrane de la LCV et se retrouvent dans le cytoplasme de la cellule. Elles continuent alors à se multiplier avant d'acquérir les traits de virulence de la phase transmissive et d'être libérées dans l'environnement extérieur (Molmeret *et al.*, 2004; Molmeret *et al.*, 2010). Des observations par microscopie électronique ont révélé que la fin du cycle infectieux se caractérisait par une condensation de la chromatine des cellules, faisant donc état d'une mort cellulaire par apoptose (Molmeret *et al.*, 2004). Une équipe a récemment criblé la totalité des effecteurs de *Legionella* vis-à-vis de l'activation de la caspase 3, identifiant ainsi Ceg18, Lpg0716, Lem12, LegS2 et VipD (Zhu *et al.*, 2013). Bien que la plupart des effecteurs identifiés se localisent aux mitochondries, seul VipD a vu son mécanisme d'activation de la caspase 3 finement détaillé. Le substrat Dot/Icm VipD déstabilise la membrane des mitochondries au moyen de son activité phospholipase A, libérant alors le cytochrome *c* qui active la voie apoptotique (Zhu *et al.*, 2013). *L. pneumophila* module donc finement l'apoptose cellulaire, l'inhibant ou l'activant suivant l'étape du cycle infectieux en cours (figure 19).

Il est également admis que *L. pneumophila* pourrait lyser ses cellules hôtes à l'aide de protéines secrétées. En effet, il a été proposé que la bactérie détruise activement la membrane de la LCV et la membrane plasmique grâce à la formation de pores (Molmeret *et al.*, 2002). La découverte de mutants incapables de lyser leur hôte, se retrouvant piégés dans le cytoplasme après une multiplication efficace, appuie fortement cette hypothèse (Alli *et al.*, 2000). L'activité cytolitique de *Legionella* proviendrait de diverses protéines secrétées telles que des phospholipases (Hoffmann *et*

al., 2014b). Par exemple, la phospholipase PlcC, substrat Dot/Icm, hydrolyse une large gamme de composés membranaires lipidiques ce qui, au cours de l'infection, pourrait probablement déstabiliser les différentes membranes cellulaires (Aurass *et al.*, 2013). Ce modèle de lyse par formation de pore est cependant assez controversé puisque qu'une étude a révélé que la libération dans le cytoplasme ne dépendait pas de ce mécanisme et que la lyse de la membrane plasmique ferait uniquement intervenir l'apoptose (Molmeret *et al.*, 2010).

Finalement, *L. pneumophila* pourrait sortir de ses hôtes protozoaires par un processus non lytique où la membrane de la LCV fusionnerait avec la membrane plasmique (Chen *et al.*, 2004). Il a été proposé que les effecteurs LepA et LepB soient impliqués dans ce phénomène, en raison de leur similarité avec les protéines de fusion membranaire SNARE. Néanmoins, le mécanisme moléculaire mis en place reste à élucider et particulièrement le rôle de LepB, déjà connu pour cibler la petite GTPase Rab1 (Ingmundson *et al.*, 2007).

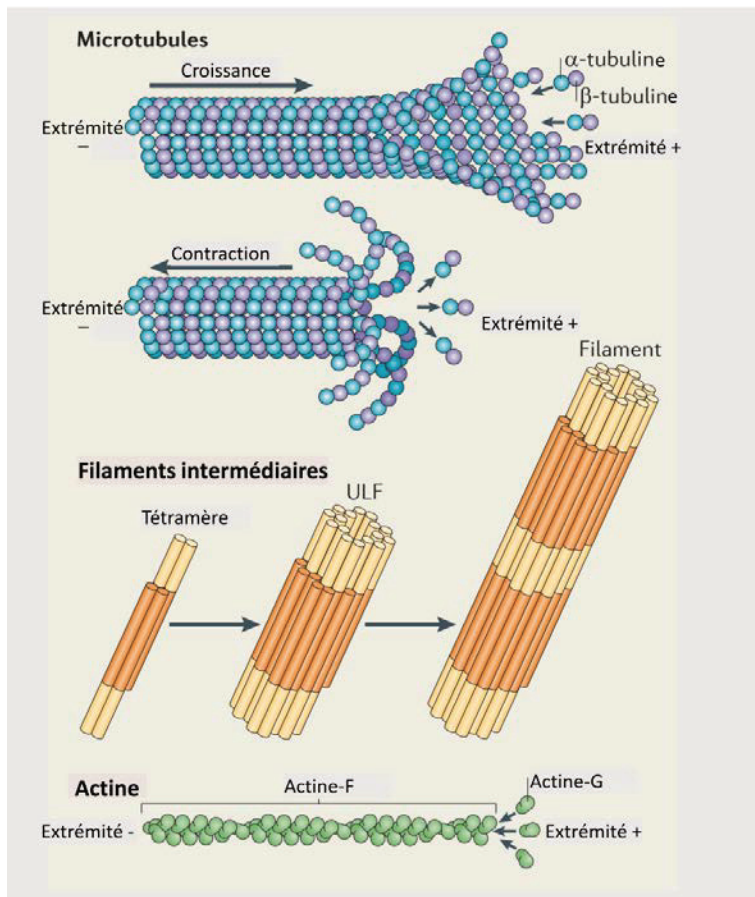


Figure 20 : Les trois types de filaments constituant le cytosquelette des cellules eucaryotes (d'après Mostowy & Cossart, 2012).

Les microtubules, les filaments intermédiaires et les microfilaments d'actine forment chacun un réseau de filaments constituant le cytosquelette cellulaire.

ULF : unit length filament

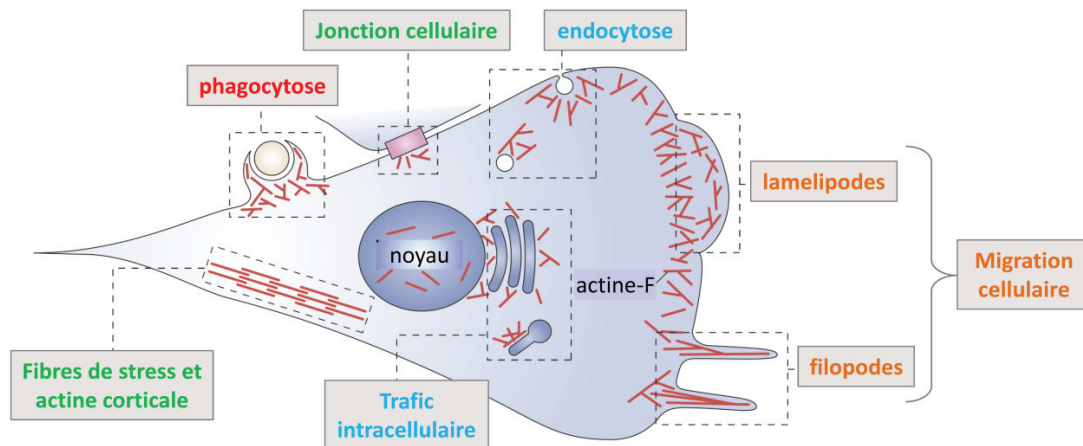


Figure 21 : Principaux rôles du cytosquelette d'actine dans les cellules eucaryotes (d'après Campellone & Welch, 2010).

Le cytosquelette d'actine est impliqué dans un nombre important de processus cellulaires, ces derniers étant pour la plupart essentiels à la cellule. Le cytosquelette d'actine participe au maintien de la forme cellulaire (en vert). Il génère également des structures particulières afin de permettre la migration des cellules (en orange). Le cytosquelette d'actine peut produire d'autres types de renflements membranaires, permettant un mécanisme d'internalisation appelé phagocytose (en rouge). L'actine joue un rôle majeur dans le trafic vésiculaire (en bleu)

2. La manipulation du cytosquelette d'actine

Le cytosquelette des cellules eucaryotes se compose de trois types de filaments essentiels, les microtubules, les filaments intermédiaires et les microfilaments d'actine (figure 20)(Mostowy & Cossart, 2012). Les microtubules possèdent une structure cylindrique constituée de proto-filaments d'hétérodimères d' α et β tubuline. Les microtubules sont polaires, ils se forment et se désassemblent spontanément à partir de l'extrémité + du filament. Les filaments intermédiaires se composent de tétramères formés à partir de dimères anti-parallèles de protéines fibreuses différentes suivant le type cellulaire, par exemple de kératines pour les cellules épithéliales. Les tétramères s'assemblent en filaments de taille unitaire (ULF), qui eux-mêmes s'associent bout-à-bout pour finalement former des filaments. Les microfilaments d'actine contribuent également à constituer le cytosquelette par des assemblages de monomères d'actine en filaments hélicoïdaux. Comme pour les microtubules, les filaments d'actine sont orientés, avec une extrémité sur laquelle s'auto-assemblent les monomères d'actine et l'autre extrémité à partir de laquelle le filament se dissocie.

Le réseau d'actine est la cible de certaines bactéries pathogènes. Il joue ainsi un rôle fondamental dans la relation hôte-pathogène, en particulier au cours de l'adhésion, de l'entrée et/ou de la vie intracellulaire des pathogènes concernés. Cette revue bibliographique a pour objectifs (i) de rappeler les mécanismes moléculaires de la polymérisation du réseau d'actine, et (ii) de faire l'état de l'art, au travers d'exemples choisis, du rôle de ce réseau dans les différentes étapes du cycle infectieux de diverses bactéries pathogènes.

2.1. La dynamique du cytosquelette d'actine

Les microfilaments ont comme unité de base l'actine, une protéine globulaire de 42 kDa très abondante et conservée parmi les eucaryotes. Dans les cellules, cette protéine se trouve sous forme de monomères (actine-G) ou de microfilaments (actine-F) linéaires ou branchés. Les filaments d'actine forment alors un réseau nécessaire à de nombreux événements cellulaires (figure 21) (Burianek & Soderling, 2013; Campellone & Welch, 2010; Firat-Karalar & Welch, 2011; Kühn & Geyer, 2014). Le cytosquelette d'actine est impliqué dans le maintien de la forme cellulaire via les jonctions cellulaires, les fibres de stress et l'actine corticale. Il participe aussi à des phénomènes plus actifs tels que la contraction musculaire, la division cellulaire, le développement embryonnaire ou neuronal. Il permet la migration cellulaire grâce à la formation de filopodes et lamellipodes. Le phénomène d'extensions membranaires est également utilisé dans la phagocytose pour la création des pseudopodes. L'actine joue un rôle majeur dans le trafic vésiculaire, notamment dans l'endocytose et

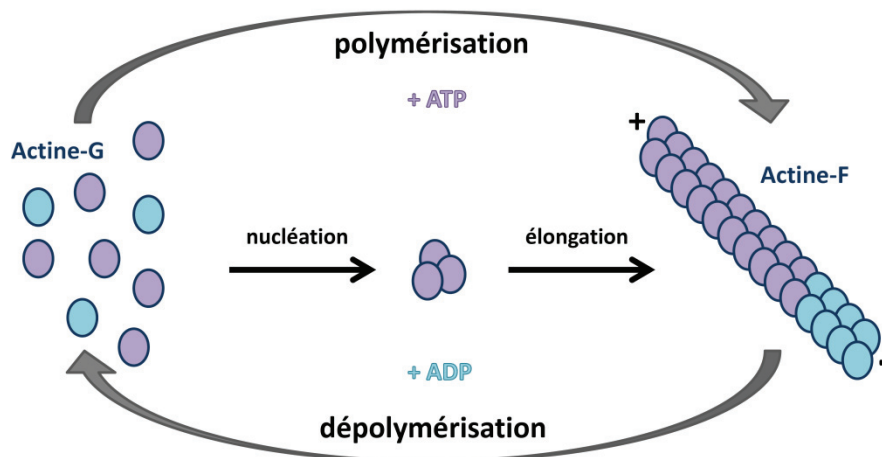


Figure 22 : Cycle de l'actine.

L'actine peut se trouver sous deux formes : l'actine monomérique (actine-G), et l'actine associée en filament (actine-F). La formation d'un microfilament d'actine se produit lorsque l'actine-G est associée à de l'ATP (rond violet). Elle se fait alors en deux étapes : tout d'abord, il y a une étape de nucléation permettant la formation d'un noyau de 2 ou 3 monomères d'actine, puis une étape d'élongation où de l'actine-G s'assemble rapidement sur le noyau d'actine. Le filament formé présente alors une extrémité + où l'actine-G s'assemble, et une extrémité - où l'actine associée à de l'ADP (rond bleu) à la suite de l'hydrolyse de l'ATP est désassemblée. Il existe un équilibre entre l'actine-G soluble et l'actine-F.

le trafic entre l'appareil de Golgi et le RE. Le nombre élevé et l'importance des fonctions du cytosquelette d'actine font que la cellule doit finement contrôler dans l'espace et dans le temps ce réseau. Pour ce faire, la cellule régule à la fois la formation des filaments d'actine, c'est-à-dire la polymérisation de l'actine monomérique, et le désassemblage des filaments.

2.1.1. La polymérisation d'actine

L'état monomérique ou filamenteux de l'actine est contrôlé par son activité ATPase, la liaison à l'ATP étant propice à la formation des filaments et l'hydrolyse en ADP provoquant leur dissociation. Sous sa forme liée à l'ATP, l'actine polymérise en microfilaments suivant deux étapes ; la nucléation qui consiste en l'assemblage de 2 à 3 molécules d'actine-G servant de noyau pour la polymérisation, puis l'élongation qui crée véritablement le nouveau filament. Ces deux étapes résultent en la formation d'un filament orienté qui possède une extrémité barbée (+) sur laquelle sont ajoutés les monomères d'actine, et une extrémité pointue (-) qui constitue le point de départ de la dépolymérisation. L'hydrolyse de l'ATP en ADP déstabilise ainsi la structure et dissocie les molécules d'actine donnant de nouveau des monomères d'actine-G (figure 22). L'actine peut spontanément polymériser, notamment *in vitro*. Cependant, dans un contexte *in vivo*, l'étape de nucléation est limitée par l'instabilité du dimère d'actine mais surtout par des protéines séquestrant l'actine-G, nécessitant alors d'autres protéines cellulaires, appelées nucléateurs, afin d'amorcer la polymérisation (Campellone & Welch, 2010; Firat-Karalar & Welch, 2011).

2.1.1.1. Les nucléateurs

Dans le but de surmonter la barrière cinétique de la nucléation, les cellules eucaryotes disposent de différents nucléateurs d'actine. Ces protéines peuvent être séparées en trois catégories suivant leur mécanisme d'action : les nucléateurs avec des motifs de liaison à l'actine-G, la famille des formines qui intervient aussi dans l'élongation, et le complexe ARP2/3 (actin-related protein 2/3).

➤ Les nucléateurs avec des motifs de liaison à l'actine-G

Le groupe des nucléateurs avec des motifs de liaison à l'actine-G est le plus récemment identifié. Il inclut les nucléateurs Spire, Cordon-bleu, la famille musculaire des leiomodines, JMY (junction-mediating regulatory protein) et APC (adenomatous polyposis coli). Ce groupe est caractérisé par la présence d'au moins trois domaines WH2 (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein

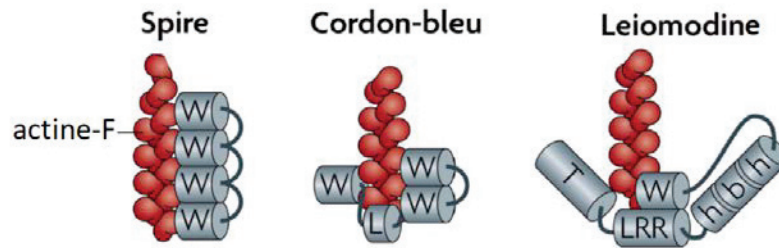


Figure 23 : Noyaux de nucléation d'actine formés par les nucléateurs à domaines WH2 (d'après Campellone & Welch, 2010).

Spire, Cordon et Leiomodine, des nucléateurs à domaines WH2, assemblent directement des monomères d'actine afin de constituer le noyau de nucléation permettant la formation des filaments. La façon de former le noyau d'actine est cependant propre à chacun.

h-b-h : helix-basic-helix; L : linker; LRR : Leu-rich repeats; T : tropomyosin- and actin-binding helices; W : WH2 domain.

(WASP) Homology 2) qui lient chacun un monomère d'actine-G. Ces différents nucléateurs peuvent également posséder d'autres motifs de liaison à l'actine monomérique tels que des peptides polyproline, des hélices de liaison actine/tropomyosine, des régions LRR (leucine-rich repeat) (Campellone & Welch, 2010; Firat-Karalar & Welch, 2011).

Cette famille semble obéir à un modèle de polymérisation d'actine commun où chaque domaine WH2 du nucléateur lie un monomère d'actine, rapproche ces monomères les uns des autres pour permettre la formation du noyau de nucléation. La région contenant les domaines WH2 est suffisante pour l'activité de nucléation. Rasson *et al.* ont récemment mis en évidence que l'ordre et les séquences des domaines WH2 avaient une importance dans leur activité et ils ont notamment révélé que certains domaines WH2 pouvaient avoir un rôle prédominant, comme c'est le cas pour le troisième domaine WH2 de Spire dénommé Sc (Quinlan *et al.*, 2005; Rasson *et al.*, 2015). Il semble que d'une manière générale cette famille de nucléateurs ne positionne pas les monomères d'actine dans une orientation similaire à ce qui est observé dans les filaments. Cependant, il est admis que chaque nucléateur pourrait arranger différemment les monomères formant le noyau de nucléation, soit en les associant d'une manière longitudinale, soit en les associant « cote-à-cote » formant la base du filament hélicoïdal (figure 23) (Chen *et al.*, 2013; Ducka *et al.*, 2010). Ces nucléateurs aboutissent à la formation d'un réseau de filaments parallèles.

Ces nucléateurs sont aussi des protéines multifonctionnelles puisque Spire est également connu pour déstabiliser les filaments d'actine et avoir une importante activité de séquestration des monomères (Chen *et al.*, 2012; Quinlan *et al.*, 2005).

Il est à noter qu'une autre famille de protéines cellulaires, les Ena/VASP (Enabled/VASodilator-Stimulated Phosphoprotein), semble également faire partie de ce groupe de nucléateurs. Ces protéines possèdent des domaines WH2 plus couramment appelés GAB (G-actin binding) dans leur cas. Bien qu'une récente étude ait montré que la protéine Ena accélère significativement l'assemblage des monomères d'actine *in vitro*, leur activité de nucléation est largement controversée dans un contexte physiologique. Cette famille de protéine possède néanmoins une forte activité d'élongation qui, suite à une tétramérisation de l'élongateur, arrive à allonger plusieurs filaments en même temps, les protégeant en plus de la fixation de protéines de coiffe qui stopperaient leur polymérisation (Breitsprecher *et al.*, 2011; Hansen & Mullins, 2010; Havrylenko *et al.*, 2015; Winkelman *et al.*, 2014).

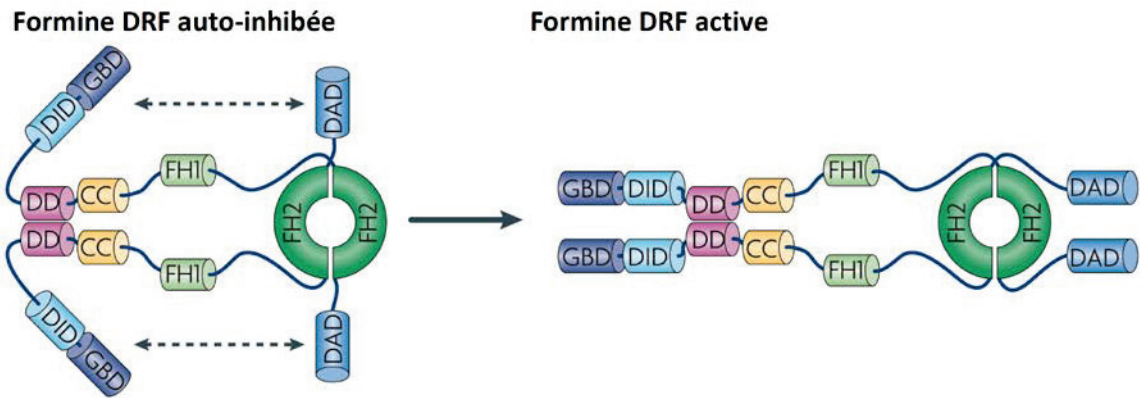


Figure 24 : Représentation schématique des conformations ouvertes et fermées de formines DRF (d'après Campellone & Welch, 2010).

Les nucléateurs formines s'assemblent sous forme de dimère pour exercer leurs activités de nucléation et d'élongation. Ces dimères sont présents sous deux formes : une forme auto-inhibée, où les domaines régulateurs DID et DAD interagissent pour camoufler les domaines FH2 ; et une forme active, où l'anneau de dimère FH2 est accessible aux monomères ou filament d'actine.

CC: coiled coil; DAD: diaphanous-autoinhibitory-domain; DD: dimerization domain; DID: diaphanous inhibitory domain ; FH1: Formin Homology 1; FH2: Formin Homology 2 ; GBD: GTPase-binding domain.

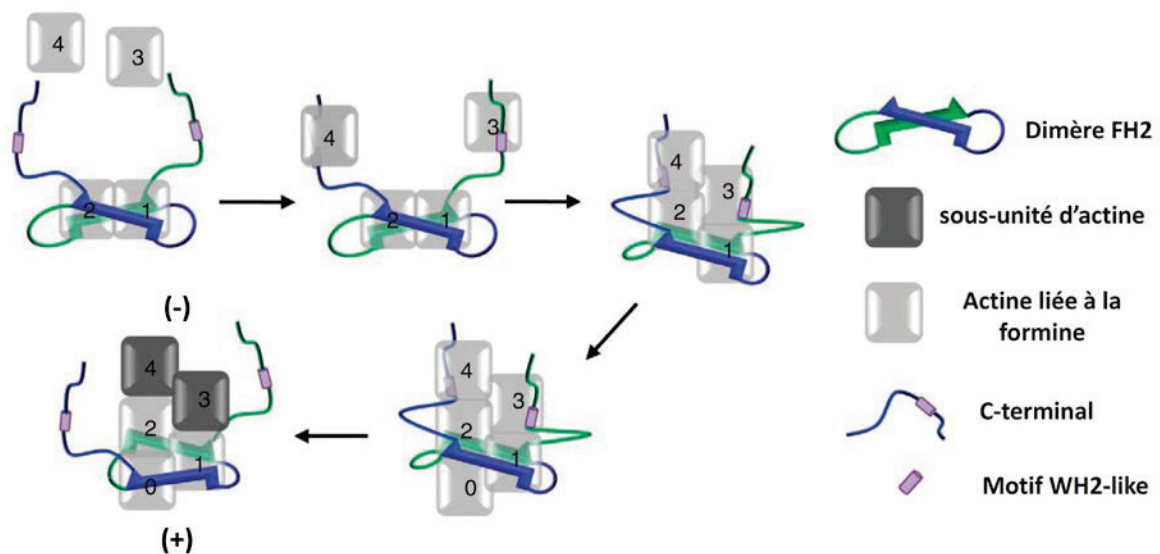


Figure 25 : Modèle de nucléation d'actine proposé pour les formines FMNL3 (d'après Thompson et al., 2013).

Les domaines FH2 de formines FMNL3 dimérisées fixent 2 molécules d'actine-G (actine 1 et 2). La région C-terminale des formines est capable de directement lier des monomères d'actine au travers d'un motif « WH2-like » (actine 3 et 4). Ces motifs permettent de positionner de nouveaux monomères d'actine au niveau des actine-G liées aux domaines FH2, favorisant ainsi la formation du noyau de nucléation. Finalement, les motifs « WH2-like » libèrent leurs monomères d'actine pour permettre ensuite le processus d'élongation commençant avec l'assemblage de l'actine 0.

➤ Les formines

Une seconde famille de nucléateurs génère des réseaux de filaments d'actine linéaires non-branchés, il s'agit des formines. Ces protéines sont caractérisées par la présence de domaines FH1 et FH2 (Formin Homology 1 et 2) qui lient respectivement des complexes de séquestration profiline/actine-G et des monomères d'actine. Les domaines FH2 forment des dimères arrangés tête-bêche qui ressemblent alors à un anneau. Les formines peuvent être divisées en deux grands groupes suivant les domaines régulateurs qu'elles portent. Les formines DRFs (Diaphanous-Related Formins) se distinguent par la présence de domaines GBD (GTPase-binding domain) et DID (diaphanous inhibitory domain) dans leur moitié N-terminale et d'un domaine DAD (diaphanous-autoregulatory domain) en C-terminal (figure 24). Les formines non-DRFs diffèrent de l'autre groupe par l'absence de certains ou de la totalité de ces domaines régulateurs. Ces différents domaines régulateurs permettent aux formines d'être finement contrôlées. En effet, les DRFs inactives sont dans une conformation auto-inhibitrice où le domaine DAD est lié au domaine DID, camouflant ainsi FH2. L'activation de la formine engendre un changement conformationnel qui libère le domaine FH2, rendant alors possible les activités de nucléation et d'élongation (Campellone & Welch, 2010; Truong *et al.*, 2014).

La nucléation d'actine par les formines est supposée se faire en stabilisant la formation du noyau de nucléation, mais le mécanisme fonctionnel précis n'est pas encore identifié (figure 25) (Pring *et al.*, 2003; Thompson *et al.*, 2013). Certaines données laissent tout de même entrevoir des éléments essentiels à ce mécanisme. En effet, le domaine FH2 est nécessaire et suffisant pour déclencher une nucléation *in vitro* (Pruyne *et al.*, 2002). La queue des formines est nécessaire pour une nucléation efficace au travers de son interaction avec l'actine-G (Thompson *et al.*, 2013; Vizcarra *et al.*, 2014). Le domaine régulateur DAD de la queue de certaines formines a d'ailleurs été montré comme possédant une double activité, d'une part il participe à l'auto-inhibition, et d'autre part il permet le recrutement d'actine-G, ce qui augmente fortement l'activité de nucléation de FH2 (Gould *et al.*, 2011). Le niveau de nucléation des formines peut également être augmenté via l'interaction avec des NPFs (Nucleation Promoting factors), comme cela a été récemment montré pour les formines Bni1 et Bnr1 de la levure. En effet, il s'avère que le NPF Bud6 amplifie l'activité de nucléation via un apport d'actine-G par interaction directe pour Bni1 ou via l'aide de Bil1 pour Bnr1 (Graziano *et al.*, 2013).

De plus, les formines participent à l'étape d'élongation du filament d'actine en restant accrochées au niveau de l'extrémité grandissante (figure 26). Pour ce faire, le dimère de formine se fixe par ses domaines FH2 sur l'extrémité barbée du filament en l'entourant. Le dimère alterne alors

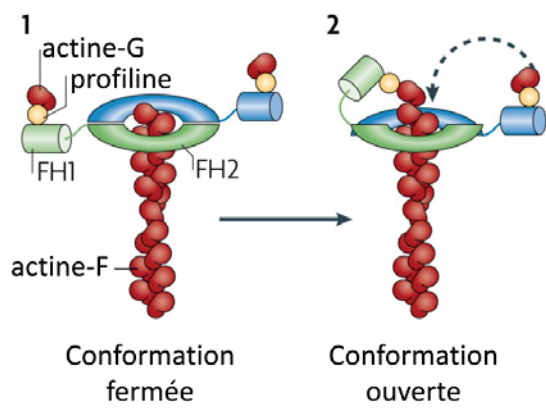


Figure 26 : Modèle d'élongation des filaments d'actine par les formines (d'après Campellone & Welch, 2010).

Un homodimère de formines se fixe par ses domaines FH2 sur l'extrémité barbée (+) d'un filament d'actine existant et les domaines FH1 recrutent des complexes profiline/actine-G (1). La conformation ouverte permet l'assemblage des monomères d'actine-G par un mécanisme d'empilage successif réalisé par les domaines FH1 (2).

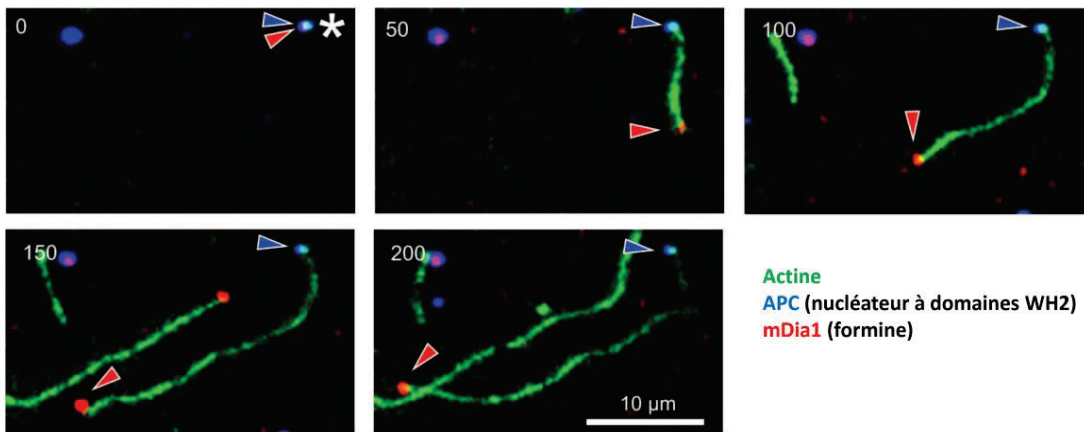


Figure 27 : Collaboration des nucléateurs APC et mDia1 pour la formation de filaments d'actine *in vitro* (d'après Breitsprecher *et al.*, 2012).

Triple marquage, visualisé par microscopie TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence microscopy), de l'assemblage d'actine (OG-actine : vert) en présence de mDia1 (SNAP-549-mDia1-C : rouge), d'APC (SNAP-647-APC-C : bleu), de protéines de coiffe CapZ et de profilines. L'astérisque indique un complexe de nucléation APC/mDia1/actine. Les pointes de flèches marquent la présence de mDia1 (rouge) et APC (bleu) aux extrémités d'un filament d'actine. Des clichés successifs ont été pris au temps en secondes indiqué en haut à gauche de chaque photo.

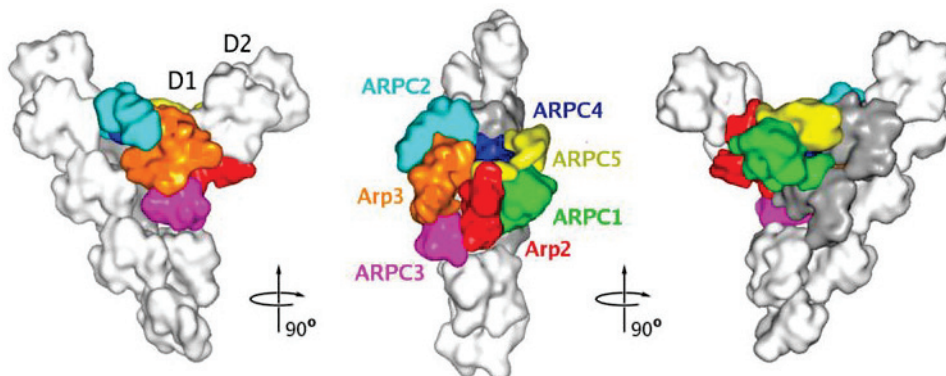


Figure 28 : Modèle d'une jonction branchée formée par le complexe nucléateur d'actine ARP2/3 (d'après Rouiller *et al.*, 2008).

Modèle structural du complexe ARP2/3 au niveau d'un embranchement de filament d'actine, basé sur des expériences de tomographie électronique. Les monomères d'actine sont marqués en blancs ou gris. Les sous-unités du complexe ARP2/3 sont chacune représentées dans une couleur différente. D1 et D2 correspondent aux 2 premiers monomères d'actine du filament-fille.

entre sa conformation ouverte et fermée permettant ainsi l'incorporation des monomères d'actine. Dans sa conformation fermée, chaque domaine FH2 est en contact avec les dernières sous-unités du filament et les domaines FH1 recrutent des complexes profiline/actine-G. La conformation ouverte libère un des domaines FH2 de son association au filament, ce qui permet l'assemblage des monomères d'actine par un mécanisme d'empilage successif réalisé par les domaines FH1 (Campellone & Welch, 2010; Pring *et al.*, 2003; Thompson *et al.*, 2013). L'élongation est une étape indépendante de la queue C-terminale des formines (Vizcarra *et al.*, 2014). La fixation des formines aux extrémités barbées prévient également l'attachement de protéines de coiffe qui stopperait la polymérisation d'actine.

Finalement, le rôle biologique des formines en tant que nucléateurs d'actine est remis en question au vu de la coopération qui a été mise en évidence entre la famille des formines et la famille des nucléateurs à domaines WH2. Les travaux de Breitsprecher *et al.* ont révélé qu'un dimère du nucléateur APC recrutait des monomères d'actine et se liait à la queue de la formine mDia pour former un complexe de nucléation tripartite. Dès le début de la polymérisation d'actine, le complexe se dissocie laissant APC associé à l'extrémité pointue (-) du filament, tandis que mDia est propulsée sur l'extrémité barbée (+) grandissante. Le nucléateur APC joue alors un rôle clé dans l'assemblage du noyau de nucléation tandis que la formine sert de catalyseur de l'élongation (figure 27) (Breitsprecher *et al.*, 2012). Cette synergie entre les familles de nucléateurs a également été largement répertoriée pour les protéines Spire (Dietrich *et al.*, 2013).

➤ Le complexe ARP2/3

Le complexe ARP2/3 est le nucléateur d'actine le mieux caractérisé à ce jour. Il se compose de sept sous-unités : ARP2 et ARP3, appartenant à la famille des ARPs (Actin-Related Proteins), sont structurellement apparentées à l'actine, mimant ainsi un dimère nucléateur de microfilament ; les cinq autres sous-unités sont référencées comme ARPC1 (avec les isoformes ARPC1A et ARPC1B), ARPC2, ARPC3, ARPC4 et ARPC5, et permettent le bon positionnement des sous-unités ARPs à l'extrémité d'un microfilament naissant, dit filament-fille (figure 28) (Rotty *et al.*, 2013; Rouiller *et al.*, 2008).

Le complexe ARP2/3 présente la particularité de former des réseaux d'actine branchés. En effet, ce nucléateur se fixe sur le côté d'un filament déjà existant, appelé filament-mère, et polymérise un nouveau microfilament correspondant au filament-fille, dans un angle de 70°. Le complexe ARP2/3 seul présente une faible activité de polymérisation qui peut être largement augmentée suite à l'activation du complexe (Mullins *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2013a). Plusieurs facteurs interviennent dans cette activation (figure 29). Tout d'abord, le complexe ARP2/3 doit se lier

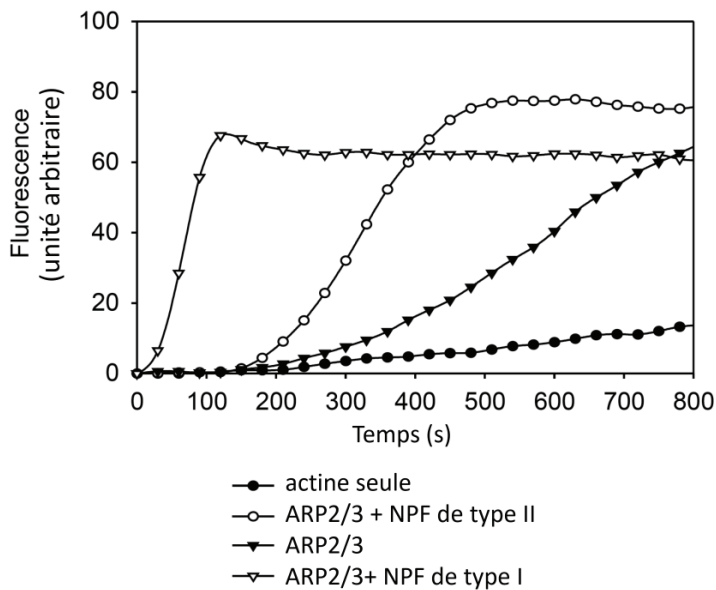


Figure 29 : Comparaison de l'activité de nucléation du complexe ARP2/3 en présence de différents facteurs promouvant la nucléation (NPFs) (d'après Uruno *et al.*, 2001).

Test de polymérisation d'actine *in vitro* avec de l'actine marquée au pyrène, composé fluorescent, en présence de complexe ARP2/3 et selon les cas de cortactine (NPF de type II) ou de domaines VCA (NPF de type I). Les augmentations de fluorescence observée correspondent à une accumulation de filaments d'actine et reflètent donc la capacité de nucléation des composants cellulaires présents dans les différentes conditions.

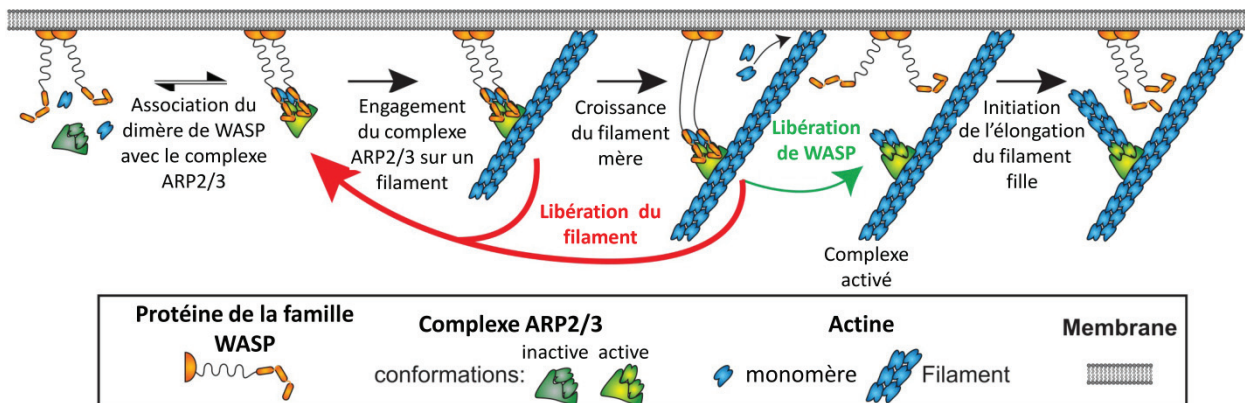


Figure 30 : Modèle de formation d'un réseau d'actine branché stimulé par l'association du complexe ARP2/3 avec des NPFs de type I de la famille WASP aux membranes cellulaires (d'après Smith *et al.*, 2013b).

Dans les cellules, les NPFs WASPs activés sont principalement attachés aux membranes. Deux WASPs se lient au complexe ARP2/3 via leur domaine VCA. L'association du complexe ARP2/3 avec les WASPs promeut la fixation du complexe nucléateur d'actine sur un filament déjà existant, mais ce processus est facilement réversible, libérant donc fréquemment le filament-mère. Dans certains cas, les WASPs se détachent du complexe ARP2/3 activé, toujours associé au filament existant. Le complexe ARP2/3 activé est détaché de la membrane, libérant ainsi le noyau de nucléation entravé par les WASPs. L'élongation du filament-fille peut alors démarrer pour former un nouveau filament.

ARP2/3: actin-related protein 2/3 ; WASP : Wiskott-Aldrich Syndrome Protein.

à un filament existant, ARPC2 et ARPC4 étant les principales sous-unités en contact avec le filament-mère (Rouiller *et al.*, 2008). Récemment, il a aussi été montré qu'ARP2/3 devait être phosphorylé pour avoir une pleine activité de nucléation (LeClaire *et al.*, 2008). En effet, la phosphorylation des thréonines 237 et 238 de la sous-unité ARP2 par la Sérine/Thréonine protéine kinase NIK (Nck-Interacting Kinase) induit les changements conformationnels appropriés du complexe. Ces phosphorylations déstabilisent un réseau d'interactions ioniques auto-inhibitrices entre ARP2, ARP3 et ARPC4, ce qui réoriente ARP2 par rapport à ARP3, positionnant ainsi le complexe ARP2/3 pour l'activation (LeClaire *et al.*, 2015; Narayanan *et al.*, 2011). Par ailleurs, la phosphorylation de la thréonine 21 de la sous-unité ARPC1B par la kinase PAK1 (p21-activated kinase 1) permet son intégration dans le complexe nucléateur d'actine, favorisant ainsi une motilité optimale des cellules (Vadlamudi *et al.*, 2004). Enfin, l'interaction entre le complexe ARP2/3 et des facteurs promouvant la nucléation (NPFs) est requise pour son activation (figure 29) (Goley *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2013a). Les NPFs sont divisés en deux catégories, chacune activant ARP2/3 par un mécanisme distinct. Les NPFs de type I se lient sur deux sites du complexe ARP2/3, au niveau des sous-unités ARP3/ARPC3 et ARP2/ARPC1, chacun possédant une fonction particulière et engendrant finalement un changement conformationnel qui active le complexe (Goley *et al.*, 2004; Padrick *et al.*, 2011). Ce type de NPFs doit ensuite être dissocié du complexe ARP2/3 pour éviter le blocage des extrémités barbées des monomères recrutés et permettre ainsi la croissance d'un filament (figure 30) (Smith *et al.*, 2013b). Les NPFs de type II ne se lient qu'au niveau d'un seul site d'ARP2/3 et engendrent un changement conformationnel non-activateur (Goley *et al.*, 2004; Padrick *et al.*, 2011). Il semble également que les deux types de NPFs puissent coopérer pour activer synergiquement le complexe ARP2/3 (Helgeson & Nolen, 2013). Le complexe ARP2/3 activé présente une conformation caractéristique où les sous-unités ARP2 et ARP3 liées à de l'ATP sont rapprochées de manière à servir de dimère de nucléation pour une polymérisation efficace d'un nouveau filament (Goley *et al.*, 2004; Rouiller *et al.*, 2008). Cette polymérisation via ARP2/3 est donc un mécanisme auto-catalytique puisque le complexe produit de nouveaux filaments d'actine qui serviront à leur tour de filaments-mère pour la création de nouveaux microfilaments (Smith *et al.*, 2013a).

Récemment, Wagner *et al.* ont montré que le complexe ARP2/3 pouvait aussi générer de manière importante des filaments non-branchés via une interaction directe avec un nouveau type de NPFs, correspondant à la famille WISH/DIP/SPIN90 (Wagner *et al.*, 2013).

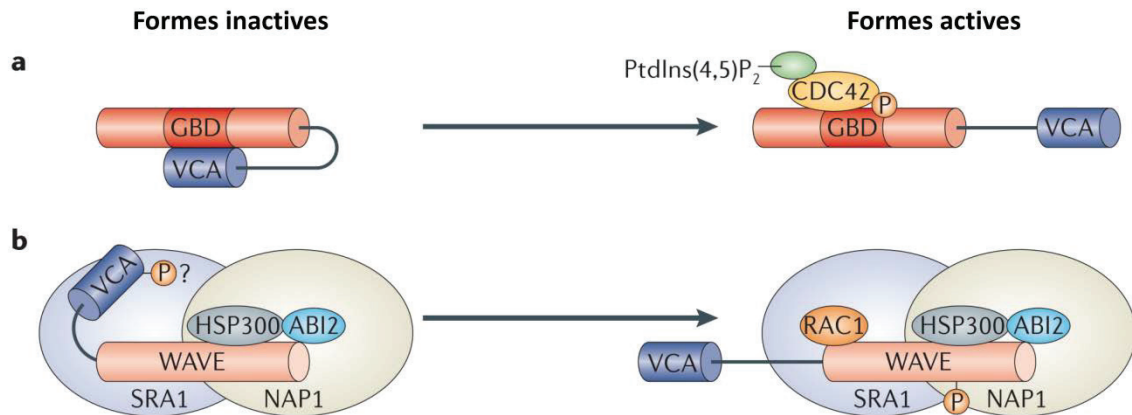


Figure 31 : Représentation schématique des conformations inactives et actives des NPFs de type I (d'après Rotty *et al.*, 2013).

La partie (a) représente le modèle de conformations des NPFs WASP et N-WASP. Ces NPFs sont inhibés par une liaison de leur domaine régulateur GBD au domaine d'activité de nucléation VCA. La conformation de ces NPFs peut être ouverte par la GTPase Cdc42 ou d'autres stimuli. La partie (b) montre les conformations du NPF WAVE. La forme inactive se caractérise par le camouflage du domaine VCA de WAVE dans un complexe WRC, composé de SRA1, NAP1, HSP300 et ABI2. Des stimuli, tels que la GTPase Rac1, sont capables d'engendrer une modification de la conformation du complexe, libérant ainsi le domaine VCA.

GBD: GTPase-binding domain; P: résidu phosphorylé; VCA : verprolin homology, cofilin homology, acidic ; WAVE: WASP family verprolin-homologous protein ; WRC : WAVE regulatory complex.

2.1.1.2. Les facteurs promouvant la nucléation (NPFs)

Indissociable de l'activité d'ARP2/3, les NPFs participant à la formation d'un réseau branché sont répartis en deux classes suivant leur mode d'activation du complexe.

Les NPF de types I sont caractérisés par la présence d'un domaine VCA, aussi appelé WCA, à leur région C-terminale. Ce domaine se compose de trois motifs distincts : la région V (Verprolin homology), qui contient un ou plusieurs domaine(s) WH2 sur laquelle des monomères d'actine se fixent, une région C centrale (ou connectrice) et une région A correspondant à un motif acide, qui ensemble lient le complexe ARP2/3. Ce groupe de NPFs se compose des protéines WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein), N-WASP (Neural WASP), WAVE (WASP family verprolin-homologous protein, aussi connues comme SCAR), WASH (WASP and SCAR homologue), WHAMM (WASP homologue associated with actin, membranes and microtubules) mais aussi de JMY qui a la particularité de posséder une double activité : NPF-like et nucléateur d'actine (Zuchero *et al.*, 2009). L'ensemble de ces protéines se trouve sous une forme inactive dans les cellules, soit à cause d'une conformation auto-inhibitrice, où le domaine VCA est bloqué par un domaine GBD, comme par exemple pour les WASP et N-WASP, soit par une séquestration du NPF dans un complexe camouflant le domaine VCA comme pour WAVE et WASH. L'activation de ces différentes protéines est principalement régulée par des GTPases (figure 31) (Burianek & Soderling, 2013; Rotty *et al.*, 2013). Le domaine VCA est essentiel pour l'activité des NPFs de type I (Machesky *et al.*, 1999). Il stimule deux aspects du mécanisme de polymérisation; d'une part il promeut l'association du complexe ARP2/3 avec des filaments-mère, et d'autre part il augmente les événements de liaison produisant de nouveaux filaments (Smith *et al.*, 2013a). L'activation du complexe ARP2/3 par les NPFs de type I peut aussi être augmentée via des interactions spécifiques. En effet, les protéines WIP (WASP interacting protein) et Ena/VASP sont capables de se lier aux WASP et WAVE respectivement, augmentant ainsi l'assemblage d'actine par ARP2/3 (Havrylenko *et al.*, 2015; Ramesh *et al.*, 1997). Récemment, Urbanek *et al.* ont aussi démontré qu'une région polyproline de WASP et Las17, un homologue de WASP chez la levure, augmentait le niveau de polymérisation d'actine sans autre protéine intermédiaire, et que Las17 était même capable de promouvoir la nucléation indépendamment d'ARP2/3. Les auteurs suggèrent que le NPF Las17 ait deux fonctions essentielles *in vivo* : Las17 générerait les premiers filaments-mère indépendamment d'ARP2/3, ce qui lui permettrait ensuite d'activer le complexe ARP2/3, contrôlant donc à lui seul l'initiation de la formation d'un réseau d'actine (Urbanek *et al.*, 2013).

Les NPFs de type II ne possèdent pas de domaines VCA entiers mais ils ont la région acide A au niveau de leur région N-terminale, permettant ainsi leur fixation sur le complexe ARP2/3. De plus,

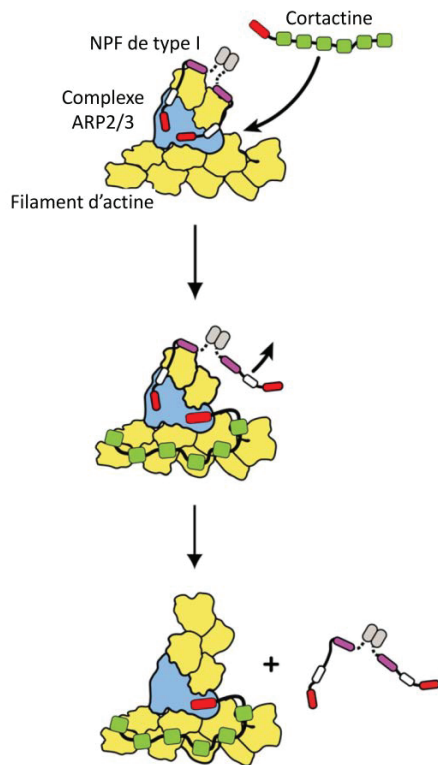


Figure 32 : Mécanisme synergique d'activation du complexe ARP2/3 par les deux types de NPFs (d'après Helgeson *et al.*, 2014).

Les NPFs de type I possédant des domaines VCA doivent être libérés de la jonction branchée naissante pour permettre la polymérisation du nouveau filament. La cortactine lie le complexe ARP2/3 de la jonction naissante au niveau d'un des deux sites de fixation de NPF, déplaçant ainsi le domaine VCA d'un des NPFs de type I liés au complexe. Ce déplacement accélère le détachement des NPFs de type I, permettant ainsi l'élongation du noyau de nucléation formé.

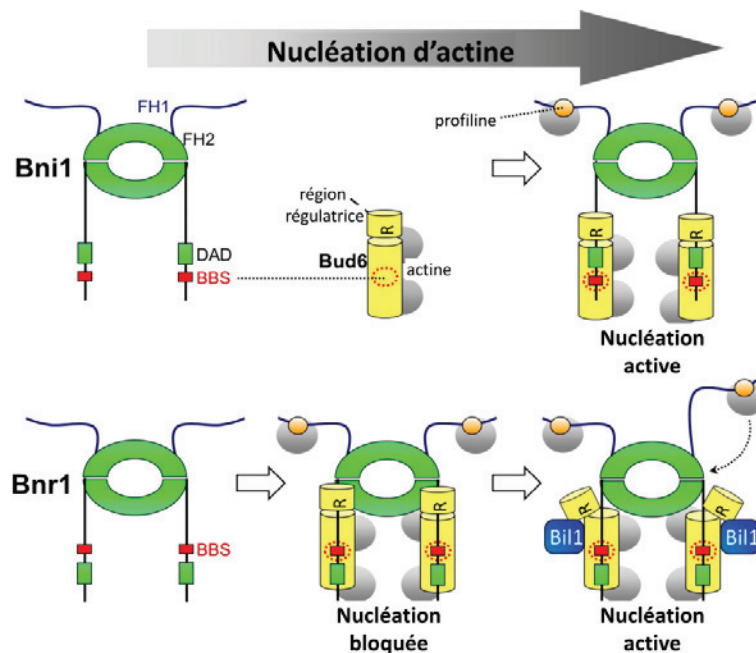


Figure 33 : Modèle de régulation de l'activation des formines Bni1 et Bnr1 par le NPF Bud6 (d'après Graziano *et al.*, 2013).

Le NPF bud6 (jaune) lié à des monomères d'actine (gris) interagit avec le site de liaison Bud6 (BBS, Bud6 binding site) présent sur les formines (vertes). En raison des différences de position des sites BBS dans les formines Bni1 et Bnr1, l'interaction de Bud6 entraîne des effets fonctionnels distincts. Dans le cas de Bni1, la fixation de Bud6 résulte dans une augmentation de l'activité de nucléation d'actine, tandis que dans le cas de Bnr1, la liaison de Bud6 bloque la nucléation à cause de la proximité entre la région régulatrice R de Bud6 et le domaine FH2 de Bnr1. La liaison de Bil1 (bleu) au niveau de la région régulatrice de Bud6 enlève le blocage, déclenchant une importante nucléation d'actine.

on distingue cette catégorie de NPFs par la présence de répétitions qui lient non pas l'actine-G, mais l'actine-F. La protéine la mieux caractérisée de cette famille est la cortactine, mais on peut également citer la protéine HS1 (Haematopoietic-specific protein 1) (Campellone & Welch, 2010; Uruno *et al.*, 2001). Les domaines de liaison à l'actine-F et au complexe ARP2/3 sont essentiels pour l'activité de la cortactine (Uruno *et al.*, 2001). Il est à noter que la cortactine a une activité de nucléation plus faible que les NPFs de type I, probablement en raison de la prise en charge unique de l'actine-F. Cette protéine a également la particularité de former un réseau d'actine distinct de celui des N-WASPs grâce à son activité de regroupement des filaments (Helgeson *et al.*, 2014). De la même manière que pour les NPFs de type I, l'activation du complexe ARP2/3 par la cortactine peut être améliorée par une interaction avec WIP (Kinley *et al.*, 2003).

De plus, il existe un mécanisme synergique d'activation du complexe ARP2/3 par les deux types de NPFs. Le complexe ARP2/3 est tout d'abord recruté sur un filament-mère et activé par un NPF de type I. La cortactine cible alors la jonction naissante où elle décroche le NPF de type I par compétition grâce à son site de fixation pour ARP2/3. Le domaine acide NtA de la cortactine est essentiel dans ce mécanisme de compétition. Il arbore des caractéristiques structurales uniques impliquées distinctement dans l'activité intrinsèque ou synergique de la cortactine. Le complexe ARP2/3 libéré du NPF de type I, mais toujours lié à la cortactine, peut alors nucléer et allonger un nouveau filament d'actine (figure 32). Ce mécanisme permet une dissociation plus rapide de l'interaction entre ARP2/3 et les NPFs de type I, augmentant d'une manière significative le taux de polymérisation du complexe ARP2/3 (Helgeson & Nolen, 2013; Helgeson *et al.*, 2014).

Récemment, il a aussi été constaté que des NPFs pouvaient participer à la nucléation réalisée par des formines. En effet, le mécanisme de bourgeonnement des levures implique les formines Bni1 et Bnr1, toutes deux stimulées par le NPF Bud6. Bni1 lie directement Bud6 sur sa queue C-terminale, augmentant ainsi le taux de nucléation de la formine. Bnr1 interagit aussi directement avec Bud6 mais sur un site proche de son domaine FH2, ce qui bloque l'activité de la formine. La protéine cellulaire Bil1 est alors recrutée sur la région régulatrice de Bud6, supprimant le blocage et permettant ainsi l'amplification de la nucléation par Bnr1 (figure 33) (Graziano *et al.*, 2013).

Enfin, un nouveau type de NPFs a dernièrement été identifié, la famille des WISH/DIP/SPIN90. L'étude de Dip1 a révélé que ce NPF activait directement le complexe ARP2/3 par un nouveau mécanisme, sans implication d'un domaine VCA ni d'un filament-mère, et sans liaison à de l'actine-G ou F. L'activation d'ARP2/3 par Dip1 induit une plus forte augmentation de l'activité de nucléation que celle induite par les NPFs de type I et, de manière originale, elle crée des filaments non-branchés (Wagner *et al.*, 2013).

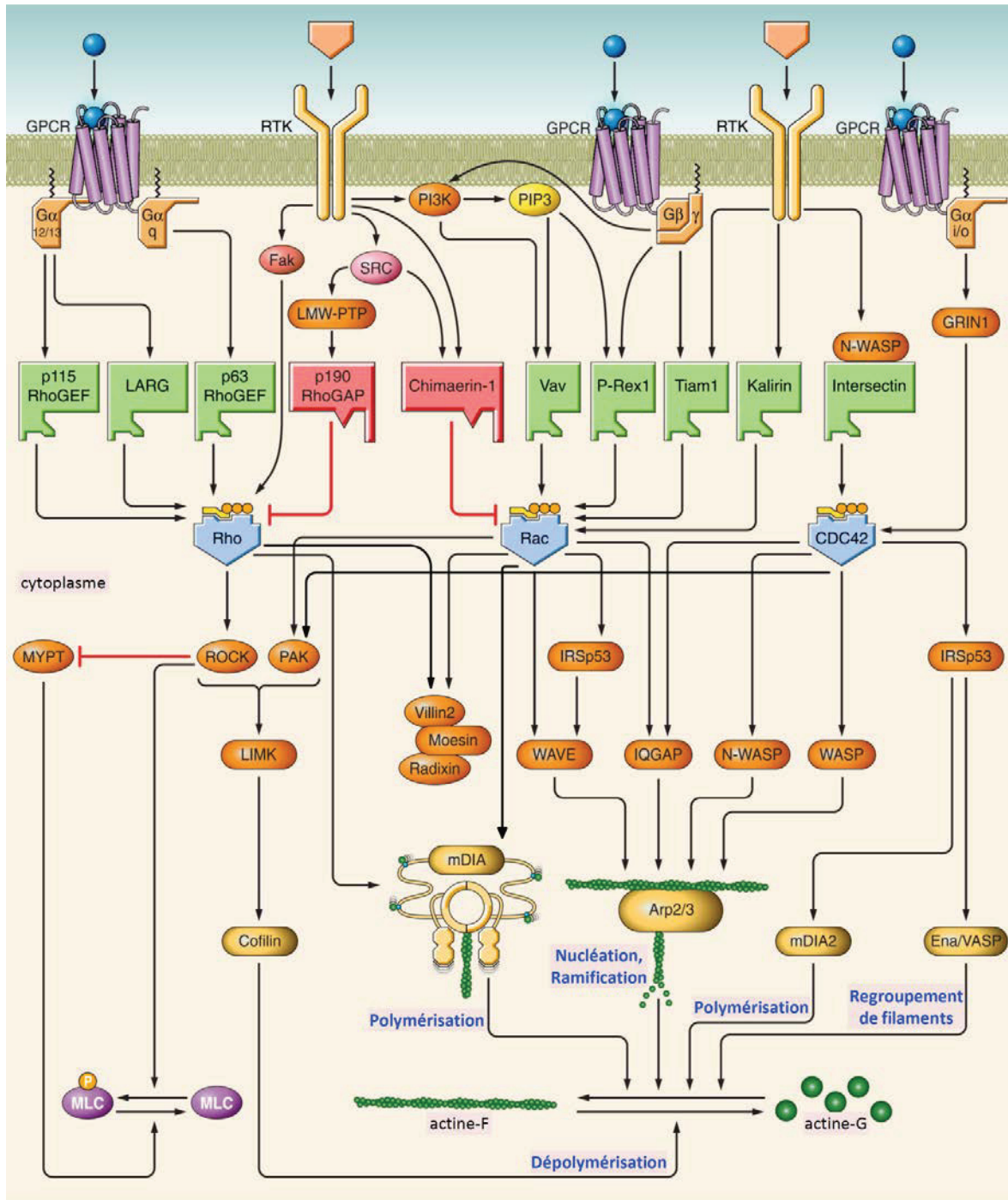


Figure 34 : Principales voies cellulaires contrôlant le cytosquelette d'actine (Ligeti *et al.*, 2012).

Rho, Rac et Cdc42 sont les principaux régulateurs du cytosquelette d'actine, en utilisant de nombreuses cascades de signalisation se chevauchant afin d'adresser les composants clés de la polymérisation d'actine. Ces GTPases sont elles-mêmes régulées par un ensemble de protéines avec des activités GEF (en vert) et GAP (en rouge) (voir le texte pour plus de détails).

ARP2/3: actin related protein 2/3 ; Ena/VASP: enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein; Fak: focal adhesion kinase; GPCR: G protein coupled receptor; IRSp53: insulin receptor substrate p53; IQGAP: IQ motif-containing GAP 1; LIMK: LIM (lin-11, Isl-1, mec-3) kinase; MLC: myosin light chain; MYPT: myosin phosphatase targeting; PAK: p21 activated kinase; PI3K: phosphatidylinositol-3-kinase; PIP3: phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate; ROCK: Rho-associated kinase; RTK: receptor tyrosine kinase; WASP: Wiskott-Aldrich syndrome protein; WAVE: WASP-family verlooprolin-homologous protein.

2.1.1.3. Les voies d'activation de la polymérisation

Le réseau d'actine est finement contrôlé par un ensemble de protéines cellulaires permettant la polymérisation et dépolymérisation de microfilaments à un temps donné et à une localisation précise (figure 34). La polymérisation d'actine peut être déclenchée par différents stimuli extracellulaires, parmi lesquels la fixation de molécules solubles telles que des cytokines, facteurs de croissance, hormones, ou par l'adhésion cellule/cellule ou cellule/support. Les récepteurs ou protéines transmembranaires liés régulent principalement l'activité de différentes protéines à activité GAP et GEF afin d'activer l'élément central de chacune de ces voies de signalisation, c'est-à-dire une protéine de la famille des Rho GTPases, en particulier Rac1, Cdc42 et RhoA. Chacune de ces GTPases contrôlent différentes protéines effectrices régulant le cytosquelette d'actine dont les principaux modes d'action sont détaillés dans la figure 34 et ci-dessous (Burianek & Soderling, 2013; Higgs & Pollard, 2000; Kühn & Geyer, 2014; Lebensohn & Kirschner, 2009; Rohatgi *et al.*, 2000; Sit & Manser, 2011).

La GTPase RhoA régule la formation des adhésions focales en liant le cytosquelette d'actine aux protéines des adhésions. RhoA est impliquée dans la formation de fibres de stress et dans la contraction. En effet, RhoA est capable d'activer les formines mDia, générant ainsi des filaments d'actine linéaires. RhoA active ROCK (Rho-associated kinase) qui d'une part phosphoryle directement la chaîne légère des myosines (MLC), et d'autre part inhibe la phosphatase associée aux myosines (MYPT), engendrant ainsi un regroupement et une contraction des fibres d'actine linéaires par les myosines II. L'activation de ROCK par RhoA active également LIMK ((Lin-11/Isl-1/Mec-3)-domain-containing protein kinase) par phosphorylation régulant ainsi le turnover de l'actine en contrôlant la dépolymérisation par la cofiline.

La GTPase Rac1 active les formines mDia. Rac1 génère également des filaments d'actine branchés par le complexe ARP2/3 via différentes protéines effectrices. Rac1 active tout d'abord le complexe ARP2/3 en activant directement le NPF WAVE. Rac1 contrôle également ce NPF par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice IRSp53 (Insulin Receptor Substrate protein of 53kDa). Rac1 peut aussi se lier à la protéine adaptatrice IQGAP (IQ-motif-containing GAP). Cette interaction semble moduler l'activité de Rac1 et est capable d'activer directement ou via le NPF N-WASP le complexe ARP2/3. Rac1 participe à l'attachement des fibres d'actine aux diverses membranes cellulaires par activation des protéines de la famille des ERM (Ezrin-Radixin-Moesin). Cette GTPase est finalement impliquée dans le turnover du cytosquelette en activant des membres de la famille des protéines kinases PAK (p21 activated kinase) qui contrôlent la dépolymérisation de l'actine par la cofiline.

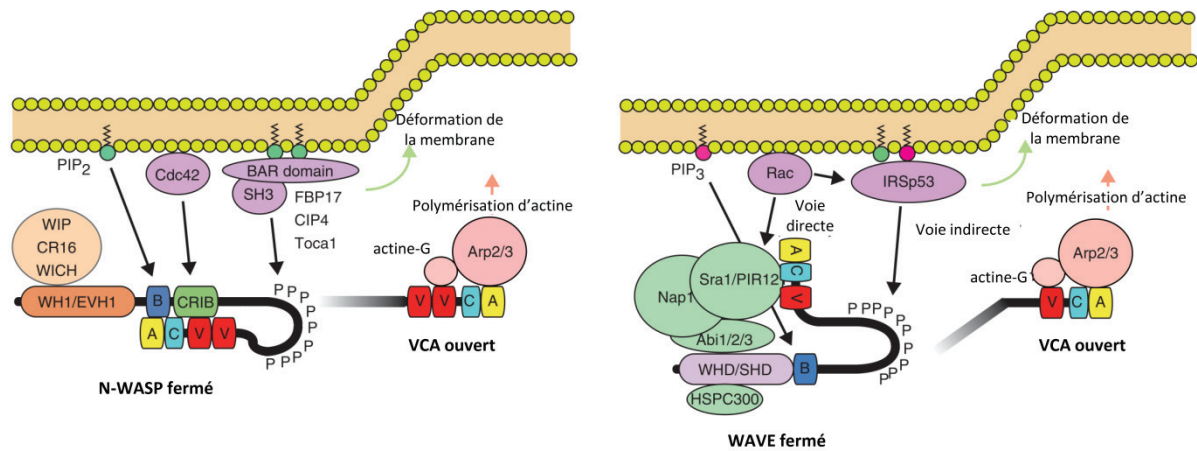


Figure 35 : Voies d'activation détaillées des NPFs N-WASP et WAVE (d'après Kurisu & Takenawa, 2009).

N-WASP est dans une conformation auto-inhibitrice au travers d'une interaction entre ces domaines GBD/CRIB et la région VCA. Le PtdIns(4,5)P₂ et Cdc42 activé lie les domaines B et GBD/CRIB (CRIB : Cdc42- and Rac-interactive binding (=GBD)), respectivement, résultant en une activation synergique de N-WASP. Des interactions avec des domaines SH3 peuvent indépendamment rentrer en compétition avec l'interaction auto-inhibitrice, et donc activer N-WASP. Les protéines contenant des domaines SH3 qui interagissent et potentiellement activent N-WASP incluent la cortactine, WISH, Nck, Grb2, Crk, FBP17, CIP4, Toca1, Abi1, Endophiline A et Sorting nexine 9. Dans les cellules, WAVE existe sous forme de complexe pentamérique appelé WRC. WAVE est recruté à la membrane via des interactions avec le PtdIns(3,4,5)P₃ et le régulateur IRSp53. L'affinité de WAVE pour IRSp53 est augmentée quand Rac activée lie le domaine RCB/MIM d'IRSp53. IRSp53 est aussi capable d'augmenter la capacité de WAVE à stimuler la polymérisation d'actine via ARP2/3. Rac peut également activer directement WAVE au travers d'une interaction avec la sous-unité Sra1 du complexe WRC.

La GTPase Cdc42 participe aussi de manière importante à la polymérisation d'actine de réseaux branchés. Cdc42 active les NPFs N-WASP et WASP pour contrôler le complexe ARP2/3. La protéine adaptatrice IQGAP fait également partie des cibles de Cdc42 pour activer ARP2/3. Cdc42 se lie à la protéine IRSp53 mais, contrairement à l'interaction avec Rac, IRSp53 active cette fois-ci les formines mDia, générant des filaments parallèles, et les protéines Ena/VASP, allongeant et regroupant des microfilaments. Cdc42 contrôle elle-aussi le turnover du cytosquelette d'actine en activant PAK, régulant ainsi l'activité de la protéine de dépolymérisation d'actine cofiline.

On peut noter que l'activation de certaines protéines du cytosquelette d'actine, telles que les NPFs WASP/N-WASP et WAVE, par les GTPases cellulaires nécessitent d'autres facteurs cellulaires et peut également se faire via d'autres voies. L'activation de ces NPFs est due à la rupture de leur conformation auto-inhibitrice. Ces protéines à l'état inactif sont sous une forme auto-inhibitrice où les domaines nécessaires à leur activité de polymérisation sont camouflés, soit par une interaction avec un autre domaine de la protéine comme par exemple pour les WASP, soit par une séquestration dans un complexe protéique comme c'est le cas pour WAVE (figure 35). L'activation de ces NPFs est étroitement liée à leur recrutement à la membrane plasmique. La forme active de Cdc42, liée à la membrane, interagit avec le domaine GBD (ou CRIB (Cdc42- and Rac-interactive binding)) de N-WASP, modifiant sa conformation auto-inhibitrice. Le recrutement de N-WASP à la membrane permet également la liaison de son domaine basique (B) au PtdIns(4,5)P₂ membranaire, augmentant de manière synergique son activation. De plus, des protéines possédant des domaines SH3 (Src homology 3), telles que Toca-1 et CIP4, sont capables de lier la région riche en proline de N-WASP, libérant ainsi sa conformation inhibitrice et l'activant. Les protéines kinases de la famille Src participent aussi à l'activation de N-WASP en phosphorylant des résidus tyrosine au niveau du domaine GBD/CRIB afin d'ouvrir N-WASP sous sa forme active. *In vivo*, le NPF WAVE est séquestré dans un complexe protéique appelé WRC (WAVE Regulatory Complex) composé de Sra1, Nap1, HSPC300 et Abi-1. Le recrutement de WRC à la membrane se fait non pas par la fixation de WAVE au PtdIns(4,5)P₂ mais via le PtdIns(3,4,5)P₃. La forme active de Rac, liée à la membrane, modifie la conformation inhibitrice du complexe WRC, soit en interagissant avec la sous-unité Sra1 du complexe WRC, soit au travers de la protéine adaptatrice IRSp53. De plus, la phosphorylation de WAVE ou de Abi-1 par les protéines kinases Src, Abl ou ERK semble nécessaire à la libération du domaine VCA activant le complexe ARP2/3. Il apparaît donc que la régulation de certaines protéines du cytosquelette soit plus complexe qu'un simple contrôle par les GTPases, permettant ainsi une régulation fine de la polymérisation d'actine (Burianek & Soderling, 2013; Higgs & Pollard, 2000; Kühn & Geyer, 2014; Lebensohn & Kirschner, 2009; Rohatgi *et al.*, 2000; Sit & Manser, 2011).

Protéines de séquestration	profiline
	β -thymosine
Protéines de coiffe	CAP (Capping protein) (extrémité (+))
	Gelsoline (extrémité (+) après cassure)
	Tropomoduline (extrémité (-))
Protéines de réticulation	Fimbrine (faisceau)
	α -actinine (faisceau)
	Fascine (faisceau)
	Filamine (réseau)
	Spectrine (réseau)
	ERM (Ezrine, Radixine, Moesine) (membrane)
	Zyxine (membrane)
	Dystrophine (membrane)
	Vinculline (membrane)
	Annexine (membrane)
Plectine (cytosquelette)	
Protéines de stabilisation	tropomyosine
	nebuline
Protéines de « destruction »	gelsoline
	ADF (actin-depolymerizing factor)
	cofiline
Moteurs moléculaires	myosines

Tableau 3 : Exemples de protéines accessoires du cytosquelette d'actine.

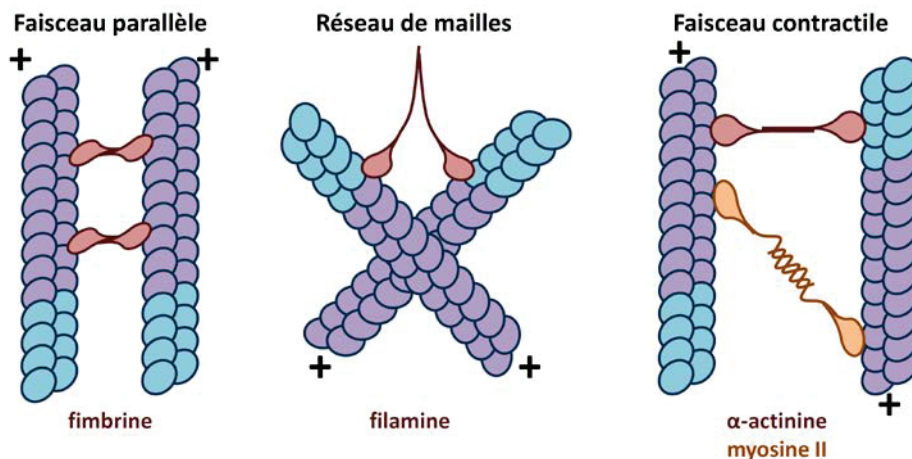


Figure 36 : Les trois arrangements du cytosquelette d'actine.

Les filaments d'actine sont maintenus sous forme de réseaux par des protéines de réticulation. On distingue alors des faisceaux parallèles, des réseaux de mailles et des faisceaux contractiles.

Actine-G(ADP) : bleu ; actine-G(ATP) : violet.

2.1.2. Les composants accessoires du cytosquelette d'actine

En plus des mécanismes de formation de l'actine-F présentés ci-dessus, le cytosquelette doit continuellement être désassemblé afin de maintenir un stock d'actine-G disponible pour la formation des structures d'actine. La dynamique de la formation/destruction des microfilaments est contrôlée par de nombreuses protéines accessoires du cytosquelette. Ces protéines peuvent être séparées en six catégories suivant leur fonction cellulaire (Tableau 3) (Winder & Ayscough, 2005).

Tout d'abord, on peut distinguer des protéines de séquestration d'actine qui régulent la polymérisation. En effet, ces protéines se lient à l'actine-G monomérique, empêchant ainsi la polymérisation spontanée de microfilaments et maintenant un pool d'actine-G disponible dans la cellule. Les deux principales protéines connues pour posséder cette fonction sont la β -thymosine et la profiline qui se différencient par leur capacité à échanger ou non le nucléotide lié au monomère d'actine. La profiline possède notamment un rôle majeur dans le cytosquelette d'actine. Cette protéine facilite l'échange de l'ADP en ATP de l'actine et livre les monomères à l'extrémité barbée (+) de nouveaux filaments pour faciliter leur incorporation par des nucléateurs (Blanchoin *et al.*, 2014; Xue & Robinson, 2013). Elle régule également l'homéostasie du réseau d'actine en favorisant l'élongation par les formines (Suarez *et al.*, 2015).

La croissance des microfilaments est ensuite contrôlée par des protéines de coiffe ou « capping proteins ». On distingue les protéines de cette famille suivant l'extrémité du filament à laquelle elles se fixent. Certaines se fixent sur l'extrémité barbée (+) des filaments et bloquent l'addition de nouveaux monomères, évitant ainsi l'allongement de la taille des filaments et générant donc un réseau de filaments courts. La fixation de protéine de coiffe sur l'extrémité barbée peut être évitée par la présence de protéines des familles formine ou Ena/VASP qui sont elles-mêmes fixées sur ces extrémités afin de les protéger et de les allonger par des activités d'élongation. D'autres protéines se fixent au contraire sur l'extrémité pointue (-) et empêchent la perte d'actine-G, permettant une rapide extension des filaments. Les exemples les plus représentatifs de ces deux groupes sont les protéines CAP et la tropomoduline, respectivement (Winder & Ayscough, 2005; Xue & Robinson, 2013).

Par ailleurs, le cytosquelette d'actine est organisé en différents réseaux via l'association de protéines de réticulation aux filaments. La taille ainsi que la flexibilité de ces protéines leur permettent de générer des faisceaux parallèles, des réseaux de mailles ou encore des faisceaux contractiles (figure 36). La formation de faisceaux parallèles est due à de petites protéines de réticulation telles que la fimbrine qui connectent des filaments d'actine orientés dans la même direction, de manière proche. Les réseaux orthogonaux, ou en mailles, sont formés par des protéines

de réticulation plus longues et surtout plus flexibles, comme les filamines, permettant un arrangement des filaments de manière perpendiculaire. Finalement, les réseaux contractiles correspondent à des filaments maintenus dans une orientation opposée avec un espacement plus lâche par des protéines telles que l' α -actinine. Ces filaments ont la particularité de pouvoir engendrer une contraction par glissement des fibres via la présence de myosines. De plus, des protéines peuvent lier les réseaux d'actine à la membrane ou à des protéines de membrane, comme par exemple la vinculine et des annexines, participant notamment aux adhésions cellulaires. Un petit groupe de protéines lie également les différents éléments du cytosquelette cellulaire. La plectine lie par exemple l'actine avec les microtubules et les filaments intermédiaires (Blanchoin *et al.*, 2014; Winder & Ayscough, 2005).

La famille des protéines de stabilisation, correspondant principalement aux tropomyosines, se fixe le long des filaments d'actine. Cette interaction stabilise les microfilaments contre la dépolymérisation spontanée et les protège également des protéines de « destruction ». Ces dernières peuvent être séparées en deux catégories : les protéines de fragmentation et les protéines de dépolymérisation. Les protéines de fragmentation, parmi lesquelles la gelsoline, se lient aux filaments d'actine existants ce qui affaiblit les liaisons entre les sous-unités d'actine, causant une cassure du filament. Après cette cassure, la gelsoline reste attachée à l'extrémité barbée (+) du filament. Le filament ne peut alors pas s'allonger et le réseau d'actine est désassemblé par dépolymérisation des filaments d'actine courts formés. Les protéines ADF (actin depolymerizing factor) /cofiline appartiennent aux deux types de protéines de « destruction », faisant probablement varier leur activité suivant le contexte cellulaire. ADF/cofiline peut d'une part lier deux sous-unités d'actine associées de manière longitudinale dans un filament, modifiant ainsi localement la torsion du filament ce qui casse les interactions entre les deux sous-unités et donc rompt le filament; et d'autre part, elle peut désassembler les extrémités pointues (-) des filaments, libérant l'actine associée à des GDP comme monomères pour leur recyclage (Blanchoin *et al.*, 2014; Revenu *et al.*, 2004; Winder & Ayscough, 2005; Xue & Robinson, 2013).

Enfin, une dernière classe importante de protéines associées au cytosquelette d'actine est la famille des myosines qui sont des moteurs moléculaires. Les myosines se composent d'une partie globulaire, appelée tête, qui lie les filaments d'actine et d'une partie queue qui est spécifique de chaque myosine, leur conférant leur rôle cellulaire. Ces protéines se déplacent le long des filaments d'actine grâce à une activité ATPase présente au niveau de la tête des myosines. En effet, la myosine liée à de l'ATP présente une plus faible affinité pour l'actine que la myosine liée à de l'ADP, engendrant un mouvement répétitif de décrochement/accrochement sur le filament d'actine qui déplace la myosine. La grande majorité de ces protéines se dirigent vers l'extrémité barbée (+) des

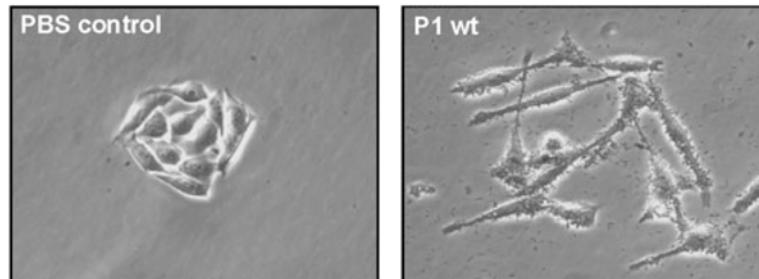


Figure 37 : Phénotype « colibri » induit par *Helicobacter pylori* (Tegtmeyer *et al.*, 2009).
 (PBS control) représente des cellules épithéliales gastriques AGS avant une infection par *H. pylori*. (P1 wt) correspond à une infection par la souche sauvage P1 d'*H. pylori*.

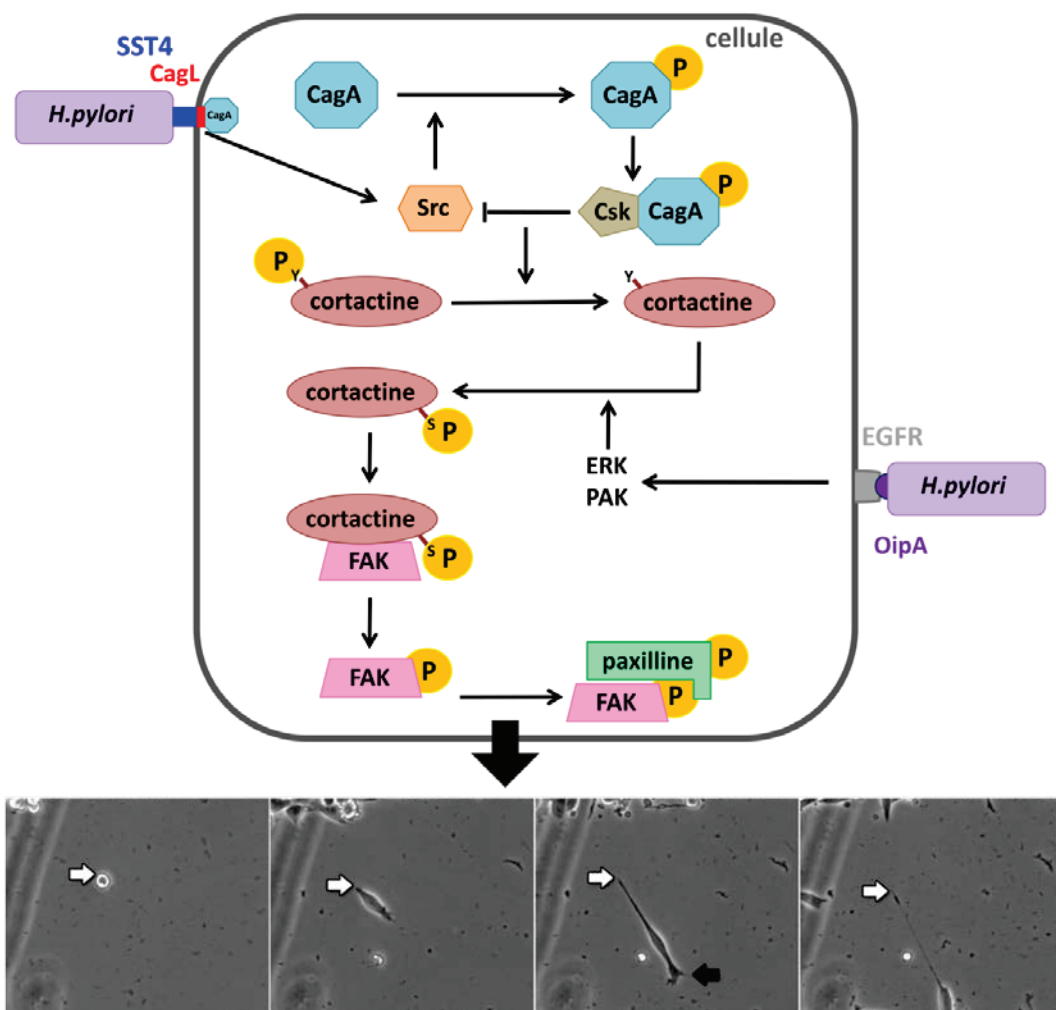


Figure 38 : Mécanisme moléculaire produisant le phénotype « colibri » suite à l'infection par *Helicobacter pylori*.

H. pylori, via son effecteur de SST4 CagA, induit un switch de l'état de phosphorylation de la protéine cellulaire cortactine, passant de résidus tyrosine phosphorylés à sérine phosphorylés. Ce changement de modification post-traductionnelle sur la cortactine perturbe les adhésions focales des cellules, engendrant un défaut de rétraction des adhésions (flèche blanche sur les photos) ce qui allonge la cellule lorsqu'elle se déplace (Bourzac *et al.*, 2007) (voir le texte pour plus de détails).

microfilaments. Le déplacement des myosines permet le transport de nombreux composants cellulaires, aussi bien de vésicules ou membranes participant aux trafics intracellulaires que de filaments d'actine, engendrant ainsi un glissement opposé de filaments qui contribue à la contraction cellulaire ou musculaire (Hartman & Spudich, 2012).

2.2. Les interactions bactéries pathogènes/cytosquelette d'actine

Au vu des rôles essentiels du cytosquelette d'actine dans différentes fonctions de la cellule eucaryote, il n'est pas surprenant que certaines bactéries pathogènes aient mis en place des moyens d'exploiter ce composant cellulaire à leur avantage. Cependant, il est remarquable que des pathogènes aussi bien extracellulaires qu'intracellulaires en soient capables. Cette partie bibliographique reprend, au travers d'exemples choisis, les différents mécanismes mis en place par les bactéries pathogènes afin de détourner le cytosquelette d'actine de leur cellule hôte. Ce cytosquelette est ainsi manipulé de façon à induire des changements globaux ou des modifications locales pour faciliter l'adhésion de la bactérie à la cellule hôte, son entrée dans la cellule, sa multiplication intracellulaire et sa sortie, ainsi que l'inhibition de la phagocytose pour échapper aux cellules du système immunitaire.

2.2.1. Modifications de la morphologie cellulaire

Certaines bactéries pathogènes, parmi lesquelles *Helicobacter pylori*, modifient de manière drastique le cytosquelette d'actine cellulaire, conduisant à des modifications majeures de la morphologie globale des cellules. Ce faisant, les bactéries peuvent induire la transformation de cellules épithéliales en cellules cancéreuses.

L'infection de cellules épithéliales gastriques par *Helicobacter pylori* entraîne une modification majeure de la morphologie des cellules qui conduit au phénotype dit « colibri », correspondant à des extensions cellulaires en forme de bec de colibri (figure 37). La protéine CagA, qui est le seul effecteur connu à ce jour pour être transloqué dans la cellule hôte par le SST4 d'*H. pylori*, induit cette morphologie atypique en interférant avec les plaques d'adhésion focale nécessaires à l'adhésion des cellules et dont la formation est dépendante du cytosquelette d'actine (figure 38). Pour cela, CagA participe à un mécanisme complexe qui aboutit à la phosphorylation de la cortactine sur des résidus sérine, au dépend de résidus tyrosine, qui sont les sites de phosphorylation endogène régulant négativement cette protéine. Plus précisément, CagA, une fois

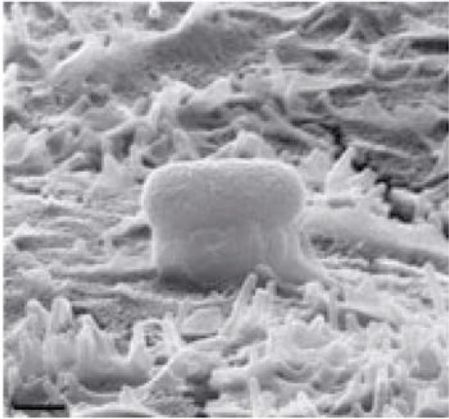


Figure 39 : Piédestal formé par les souches EPEC et EHEC (Campellone, 2010).

Photo de microscopie électronique à balayage montrant une bactérie EPEC ayant généré un piédestal sur une cellule épithéliale polarisée. Barre d'échelle 0,5 μm .

injectée dans le cytoplasme de la cellule hôte, est phosphorylée par la tyrosine kinase cellulaire Src, préalablement activée par la protéine du SST4 CagL (Kwok *et al.*, 2007; Selbach *et al.*, 2002). CagA phosphorylée sur des tyrosines interagit avec l'inhibiteur de Src, Csk, ce qui aboutit à l'inactivation de Src et donc à un rétrocontrôle de cette kinase (Tsutsumi *et al.*, 2003). L'inactivation de Src ne permet plus la phosphorylation des tyrosines de ses substrats, en particulier de la cortactine (Selbach *et al.*, 2003). En parallèle, une autre voie, induite probablement par la protéine de surface OipA d'*H. pylori* via le récepteur cellulaire EGFR (epithelial growth factor receptor), active les kinases ERK (Extracellular signal-regulated kinase) et PAK1 qui phosphorylent des résidus sérine de la cortactine (Tabassam *et al.*, 2008; Tegtmeyer *et al.*, 2009; Tegtmeyer *et al.*, 2011). Après phosphorylation de ces résidus, cette dernière lie et active FAK (focal adhesion kinase). FAK activée se lie et phosphoryle alors la paxilline pour permettre la formation de fibres de stress et perturber les adhésions cellulaires : la cellule présente un défaut dans la rétractation des adhésions lors de ses déplacements, ce qui allonge la cellule en créant ces élongations en forme d'aiguille (Bourzac *et al.*, 2007; Tabassam *et al.*, 2011; Tegtmeyer *et al.*, 2011). Les modifications morphologiques des cellules gastriques induites par *H. pylori* génèrent des cellules avec des propriétés de cellules souches cancéreuses, c'est-à-dire des cellules avec des marqueurs cancéreux présentant une plus importante motilité et générant des structures tumorales. Ces propriétés font de *H. pylori* le seul pathogène bactérien carcinogène décrit à ce jour (Bessède *et al.*, 2014).

2.2.2. Adhésion à la cellule hôte

L'adhésion d'un pathogène à un tissu est la première étape d'une infection réussie. Les souches pathogènes d'*Escherichia coli* entéro-hémorragique (EHEC) et entéro-pathogénique (EPEC) manipulent le cytosquelette d'actine des cellules épithéliales des muqueuses intestinales pour former une structure appelée « piédestal » (figure 39), qui leur permet d'adhérer très efficacement à leur cellule cible, et qui aboutit à la formation de lésions A/E (« attaching and effacing lesions »). Pour cela, elles injectent via un Système de Sécrétion de Type 3 (SST3) la protéine Tir qui s'intègre dans la membrane cellulaire et interagit avec les « intimines » présentes à la surface bactérienne. Ensuite, les bactéries provoquent la réorganisation locale du cytosquelette d'actine en utilisant deux mécanismes distincts (figure 40 et 41).

EPEC insert dans la membrane cellulaire des protéines Tir qui, suite à l'interaction avec les intimines de la bactérie, se regroupent en cluster et sont phosphorylées sur le résidu tyrosine 474, ainsi que dans une moindre mesure sur le résidu tyrosine 454, par différentes protéines kinases cellulaires (Kenny *et al.*, 1997; Kenny, 1999; Swimm *et al.*, 2004). La région entourant le résidu 474

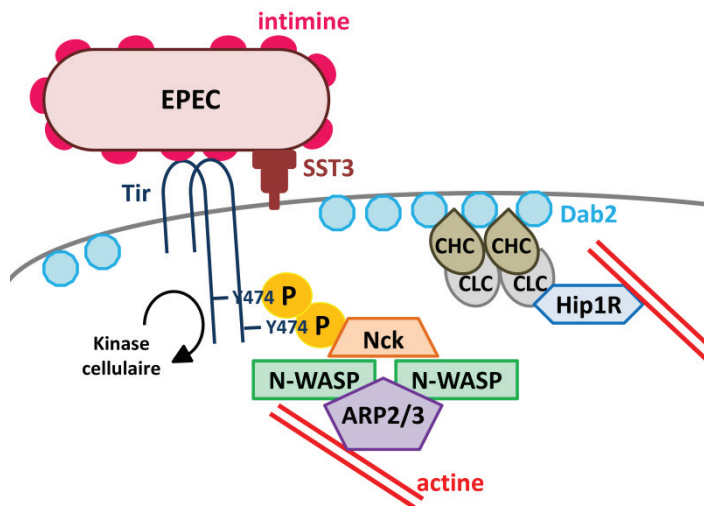


Figure 40 : Mécanisme de formation des piédestaux par EPEC.

EPEC utilise son effecteur de SST3 Tir inséré dans la membrane plasmique des cellules eucaryotes afin d'induire une polymérisation d'actine générant les piédestaux. EPEC détourne l'adaptateur cellulaire Nck pour recruter le complexe ARP2/3 au travers des NPFs N-WASPs. La formation des piédestaux des EPEC fait également intervenir le réseau de clathrines.

CHC : clathrin heavy chain; CLC : clathrin light chain; P : résidu phosphorylé.

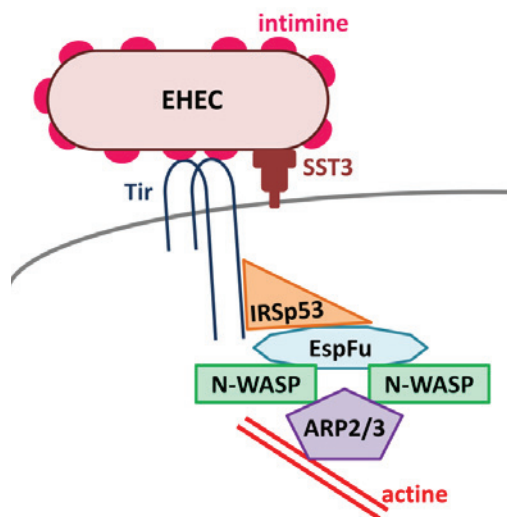


Figure 41 : Mécanisme de formation des piédestaux par EHEC.

EHEC utilise 2 effecteurs de son SST3 afin d'induire les piédestaux. EHEC insère tout d'abord l'effecteur Tir dans la membrane cellulaire. Tir recrute IRSp53 qui elle-même interagit avec le second effecteur bactérien, EspFu. Ce dernier engendre une polymérisation d'actine via l'activation des N-WASPs et du complexe ARP2/3.

phosphorylé lie directement l'adaptateur cellulaire Nck (Non catalytic region of tyrosine kinase) (Campellone *et al.*, 2004a). Ce dernier recrute et active le NPF N-WASP permettant ainsi une polymérisation d'actine via le complexe ARP2/3 (Gruenheid *et al.*, 2001). La formation des piédestaux est complétée par l'activation du réseau de clathrines. En effet, la polymérisation d'actine pour former les piédestaux est également dépendante du recrutement séquentiel de l'adaptateur Dab2, des chaînes lourdes et légères des clathrines (CHC et CLC), du régulateur clé du recrutement d'actine Hip1R, et d'autres protéines de la machinerie d'endocytose dépendante des clathrines, à la suite de l'engagement de Nck (Bonazzi *et al.*, 2011; Guttman *et al.*, 2010). Ces deux voies engendrent ainsi les structures riches en actine que sont les piédestaux. La formation des piédestaux par la souche EPEC peut également se faire par d'autres voies, notamment Nck-indépendante, mais la contribution de ces voies reste mineure (Campellone & Leong, 2005).

EHEC, quant à elle, a besoin d'un deuxième effecteur bactérien nommé EspFu (ou TccP) pour activer également les N-WASPs. Après insertion de Tir dans la membrane plasmique et liaison aux intimines, Tir recrute la protéine cellulaire IRSp53 ou un membre de la même famille IRTKS (insulin receptor tyrosine kinase substrate), des régulateurs du remodelage du cytoquelette d'actine à la membrane plasmique, indépendamment de la phosphorylation de ses tyrosines (DeVinney *et al.*, 1999; Vingadassalom *et al.*, 2009; Weiss *et al.*, 2009). Les domaines SH3 de ces protéines cellulaires interagissent alors avec des répétitions riches en proline d'EspFu. Il est à noter qu'EspFu présente des motifs PxxP similaires aux interactants cellulaires d'IRSp53 et IRTKS. Cependant, la substitution d'une alanine en tryptophane au niveau de l'effecteur bactérien augmente son affinité pour IRSp53/IRTKS, favorisant ainsi cette interaction au détriment des interactants cellulaires (Aitio *et al.*, 2012). La protéine EspFu ainsi recrutée lie et active des N-WASPs par compétition avec le domaine activateur de N-WASP pour le domaine auto-inhibiteur, ce qui active le complexe ARP2/3 et finalement la polymérisation d'actine pour la formation du piédestal (Campellone *et al.*, 2004b; Sallee *et al.*, 2008). Une voie indépendante de N-WASP a également été mise en évidence mais elle n'est pas prédominante pour la formation des piédestaux (Vingadassalom *et al.*, 2010).

La liaison étroite des bactéries à la membrane cellulaire via la formation des piédestaux contribue à la virulence de ces souches en favorisant la colonisation des muqueuses intestinales, particulièrement au niveau du colon pour EHEC (Mallick *et al.*, 2014).

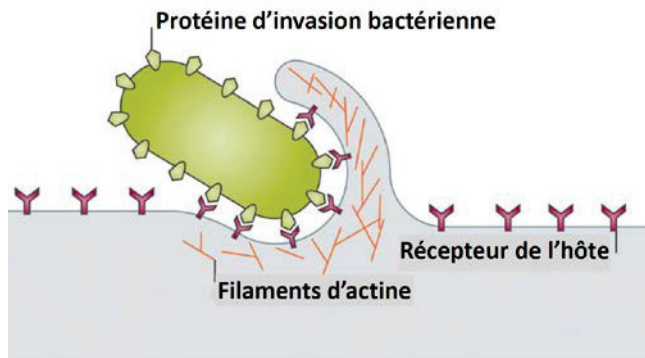


Figure 42 : Schéma représentant l'entrée de type zipper (d'après Haglund & Welch, 2011).

Les bactéries utilisant le mécanisme d'entrée zipper « s'enfoncent » dans leur cellule hôte suite à des interactions entre des protéines de leur surface et des récepteurs présents à la surface cellulaire.

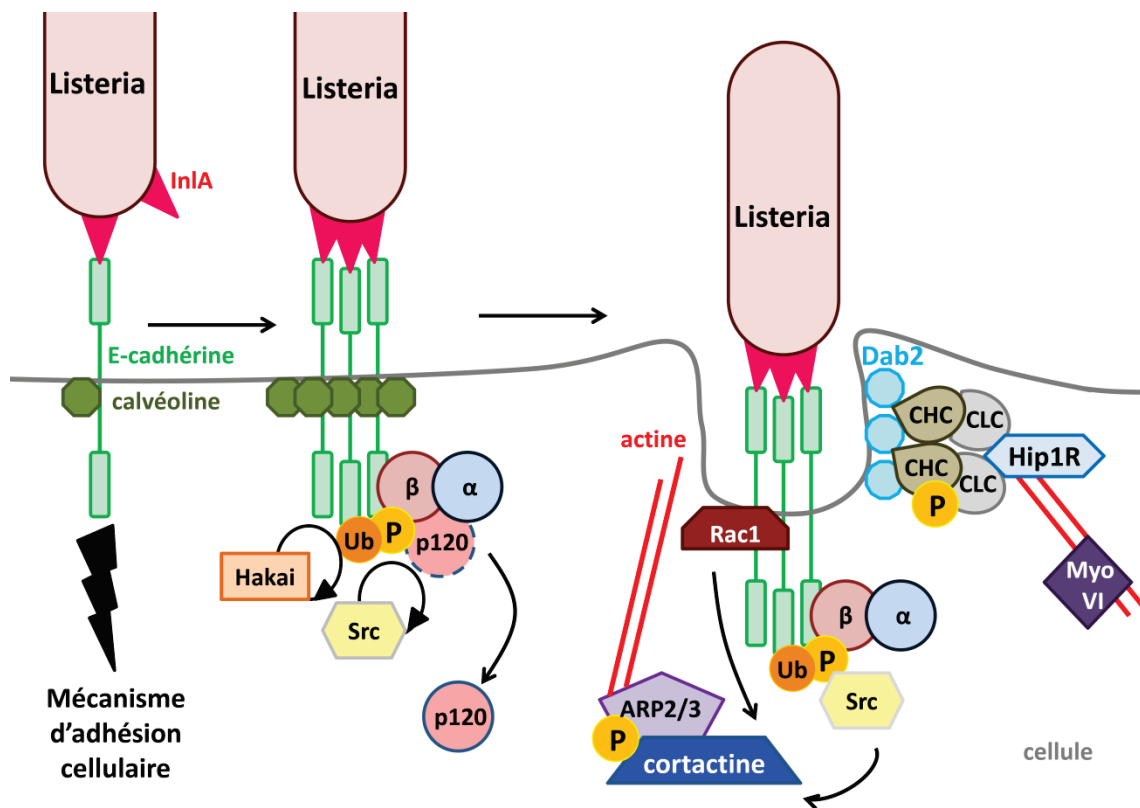


Figure 43 : Mécanisme d'internalisation de *Listeria monocytogenes* activé par l'internaline InlA.

L. monocytogenes peut induire son internalisation grâce à sa protéine de surface InlA. La bactérie se fixe sur les protéines transmembranaires E-cadhérine, déclenchant ainsi les mécanismes d'adhésion cellulaire qu'elle détourne afin de permettre son entrée. Deux voies sont utilisées par *L. monocytogenes* : d'une part la machinerie d'endocytose clathrine dépendante qui permet d'utiliser l'actine pour « tracter » la bactérie à l'intérieur de la cellule; et d'autre part, une polymérisation accrue de filaments d'actine par le détournement du NPF cortactine (voir le texte pour plus de détails).

β : caténine β ; α : caténine α ; CHC : clathrin heavy chain; CLC : clathrin light chain; Myo VI : myosine VI; p : résidu phosphorylé; p120 : caténine p120; Ub : résidu ubiquitinilé.

2.2.3. Entrée dans la cellule hôte

Après l'adhésion à leurs cellules cibles, les pathogènes intracellulaires facultatifs déclenchent une étape d'internalisation pour pénétrer dans ces cellules. Deux mécanismes d'entrée sont décrits, le mécanisme zipper et le mécanisme trigger.

➤ Le mécanisme zipper

Le mécanisme zipper correspond à la liaison d'une protéine de surface bactérienne spécifique à un récepteur de la membrane plasmique de la cellule hôte (figure 42). Suite à cette interaction, la bactérie « s'enfonce » dans sa cellule hôte. Ce procédé est notamment utilisé par *Listeria monocytogenes* pour envahir les cellules épithéliales intestinales, et ce mécanisme est le mieux caractérisé à ce jour.

L'internalisation de *L. monocytogenes* est régulée par deux internalines bactériennes, InIA et InIB, agissant soit de manière indépendante, soit synergiquement, suivant le type cellulaire infecté. Néanmoins, il a récemment été mis en évidence par Gessain *et al.* que l'internaline InIA serait nécessaire et suffisante pour passer la barrière épithéliale intestinale, alors que le passage de la barrière placentaire requerrait l'action conjuguée d'InIA et InIB. Cette différence serait due à une faible ou forte activité PI3K (phosphatidyl-inositol 3 kinase) basale dans les cellules ciblées, InIB étant nécessaire lors d'une trop faible activité, pour recruter la PI3K et ainsi augmenter son activité (Gessain *et al.*, 2015).

L'internaline InIA se lie aux molécules d'E-cadhérine présentes à la surface cellulaire, détournant ainsi les mécanismes d'adhésion cellulaire (figure 43) (Bonazzi *et al.*, 2012). Cette interaction entraîne le recrutement des caténines β et α , et consécutivement celui de la protéine kinase Src, qui une fois active, phosphoryle le récepteur E-cadhérine (Lecuit *et al.*, 2000). Dans le même temps, la calvéoline cellulaire regroupe les récepteurs E-cadhérine au site d'attachement de la bactérie, amplifiant le signal d'internalisation. Une fois phosphorylée, l'E-cadhérine recrute Hakai, qui ubiquitine le récepteur. Les récepteurs ubiquitinés déclenchent le recrutement de la machinerie « clathrine », c'est-à-dire le recrutement séquentiel de l'adaptateur Dab2, puis des chaînes lourdes et légères des clathrines ; les chaînes lourdes phosphorylées par Src permettent ensuite l'arrivée d'Hip1R puis de l'actine qui en présence de myosine VI fournit une force de traction nécessaire à l'internalisation du récepteur (Bonazzi *et al.*, 2008; Bonazzi *et al.*, 2011). Des renflements cellulaires sont également produits via le complexe ARP2/3. En effet, Src avec l'aide la GTPase Rac1, active le NPF de type II cortactine. La cortactine phosphorylée active le complexe ARP2/3, polymérisant ainsi des filaments d'actine (Sousa *et al.*, 2007). D'autres protéines du cytosquelette d'actine ont été

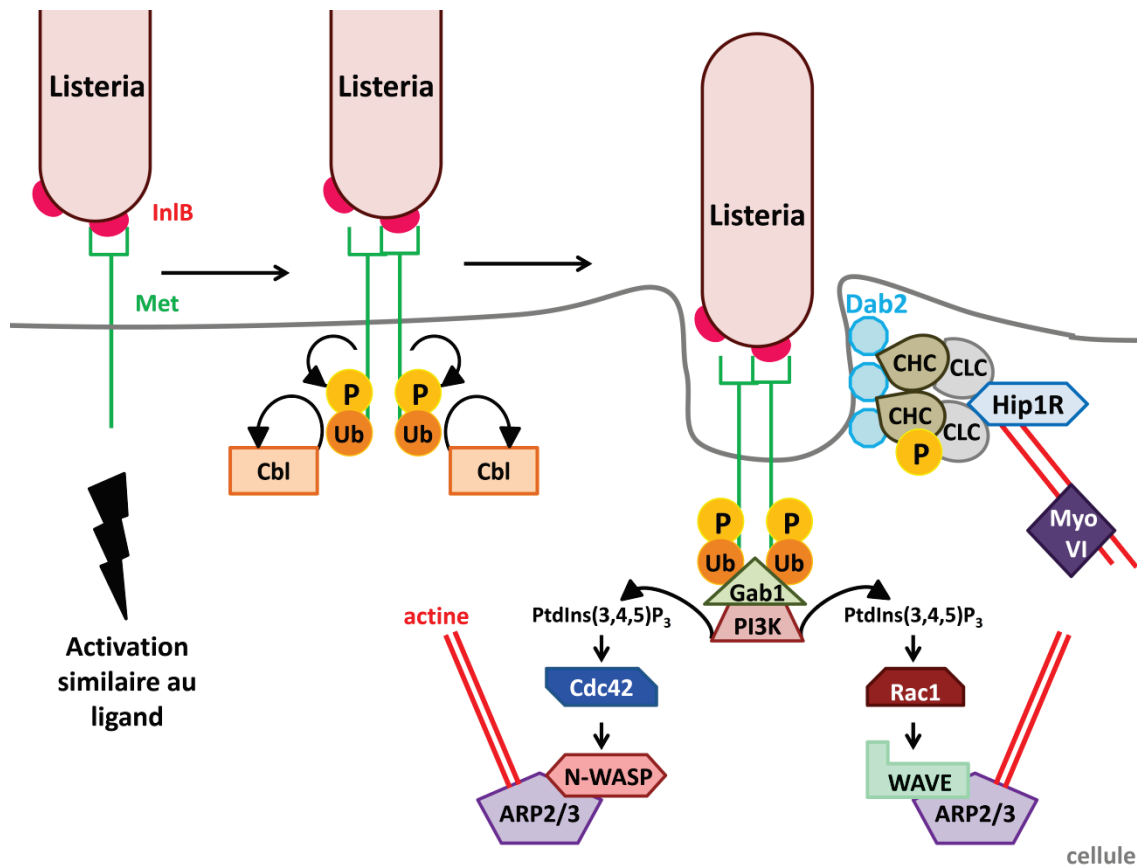


Figure 44 : Mécanisme d'internalisation de *Listeria monocytogenes* activé par l'internaline InlB.

L. monocytogenes peut induire son entrée dans les cellules eucaryotes grâce à une seconde protéine de surface, InlB. InlB permet à la bactérie de se fixer sur les récepteurs cellulaires c-Met, activant alors ces derniers. L'internalisation de *L. monocytogenes* se produit grâce à l'activation de la machinerie d'endocytose clathrine-dépendante et via une polymérisation d'actine par le complexe ARP2/3 qui est activé par un détournement des signaux d'activation en amont, notamment par activation des GTPases Cdc42 et Rac1 (voir le texte pour plus de détails).

CHC : clathrin heavy chain; CLC : clathrin light chain; Myo VI : myosine VI; p : résidu phosphorylé; Ub : résidu ubiquitinilé.

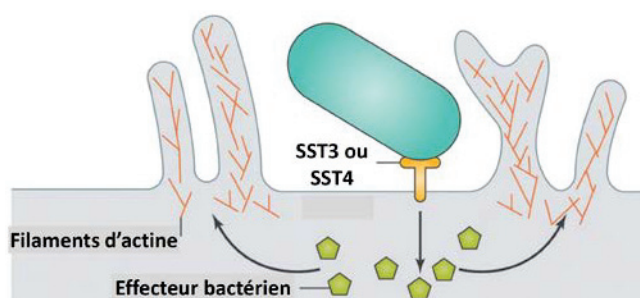


Figure 45 : Schéma représentant l'entrée de type trigger (d'après Haglund & Welch, 2011).

Les bactéries utilisant le mécanisme d'entrée trigger sont internalisées dans leur cellule hôte suite à la formation d'extensions membranaires créées après injection d'effecteurs bactériens via un système de sécrétion de type 3 ou 4.

identifiées comme éléments participant à l'entrée de *Listeria*, telles que la myosine VIIa et la vezatine, mais leurs rôles précis restent inconnus (Sousa *et al.*, 2004).

L'internaline InIB cible, quant à elle, le récepteur tyrosine kinase Met, mimant ainsi l'activation endogène du récepteur par les facteurs de croissance hépatique (HGF) (figure 44) (Li *et al.*, 2005). L'interaction InIB/Met induit la dimérisation ainsi que l'autophosphorylation du récepteur. Le récepteur phosphorylé recrute la protéine cellulaire Cbl qui l'ubiquitine. Similairement à l'interaction InIA/E-cadhérine, Met ubiquitiné recrute la machinerie d'endocytose dépendante des clathrines afin d'être internalisé. Il y a donc recrutement, au site d'entrée de la bactérie, de l'adaptateur Dab2, conduisant à l'apport des chaînes lourdes et légères des clathrines. Une fois phosphorylée, la chaîne lourde des clathrines recrute l'adaptateur Hip1R qui lui-même se lie à l'actine. La myosine VI fournit, là encore, la force nécessaire à une traction intracellulaire (Bonazzi *et al.*, 2011; Veiga & Cossart, 2005). Dans le même temps, il y a également génération de renflements membranaires. En effet, le récepteur Met phosphorylé recrute et phosphoryle des protéines adaptatrices telles que Gab1, Cbl et Shc, formant alors un complexe avec la PI3 Kinase. Les PtdIns(3,4,5)P₃ générés par cette dernière activent les GTPases cellulaires Rac1 et/ou Cdc42. Suivant le type cellulaire infecté, Rac1 promeut l'activation de WAVE, alors que Cdc42 active N-WASP, aboutissant toutes deux à une polymérisation d'actine via le complexe ARP2/3 (Bierne *et al.*, 2005; Bosse *et al.*, 2007; Ireton *et al.*, 1999; Seveau *et al.*, 2007).

L. monocytogenes détourne donc les cascades de signalisation en aval des récepteurs cellulaires E-cadhérine et Met, mais également les voies de recyclage de ces récepteurs afin de pénétrer dans ses cellules hôtes. Ce mode d'entrée est aussi utilisé par d'autres bactéries pathogènes telles que *Yersinia ssp.*, ou *Neisseria*.

➤ Le mécanisme trigger

Le second mécanisme mis en place par les bactéries pathogènes afin de pénétrer dans leurs cellules hôtes est le mécanisme trigger. Il repose sur l'injection dans les cellules cibles, par un SST3 ou SST4, de protéines effectrices qui interfèrent avec les composants du cytosquelette d'actine afin de former des extensions membranaires englobant la bactérie (figure 45). Ce mécanisme permet notamment à *Salmonella enterica* d'être internalisée par les cellules épithéliales intestinales.

Salmonella enterica serovar Typhimurium n'utilise pas moins de six effecteurs substrats du SST3 SPI-1 (*Salmonella* pathogenicity island 1) pour permettre son entrée dans les cellules eucaryotes. En effet, la bactérie contrôle le cytosquelette d'actine cellulaire pour son internalisation via SopE, SopE2, SopB, SipC, SipA et SptP (figure 46). SopE et son paralogue SopE2 sont des protéines

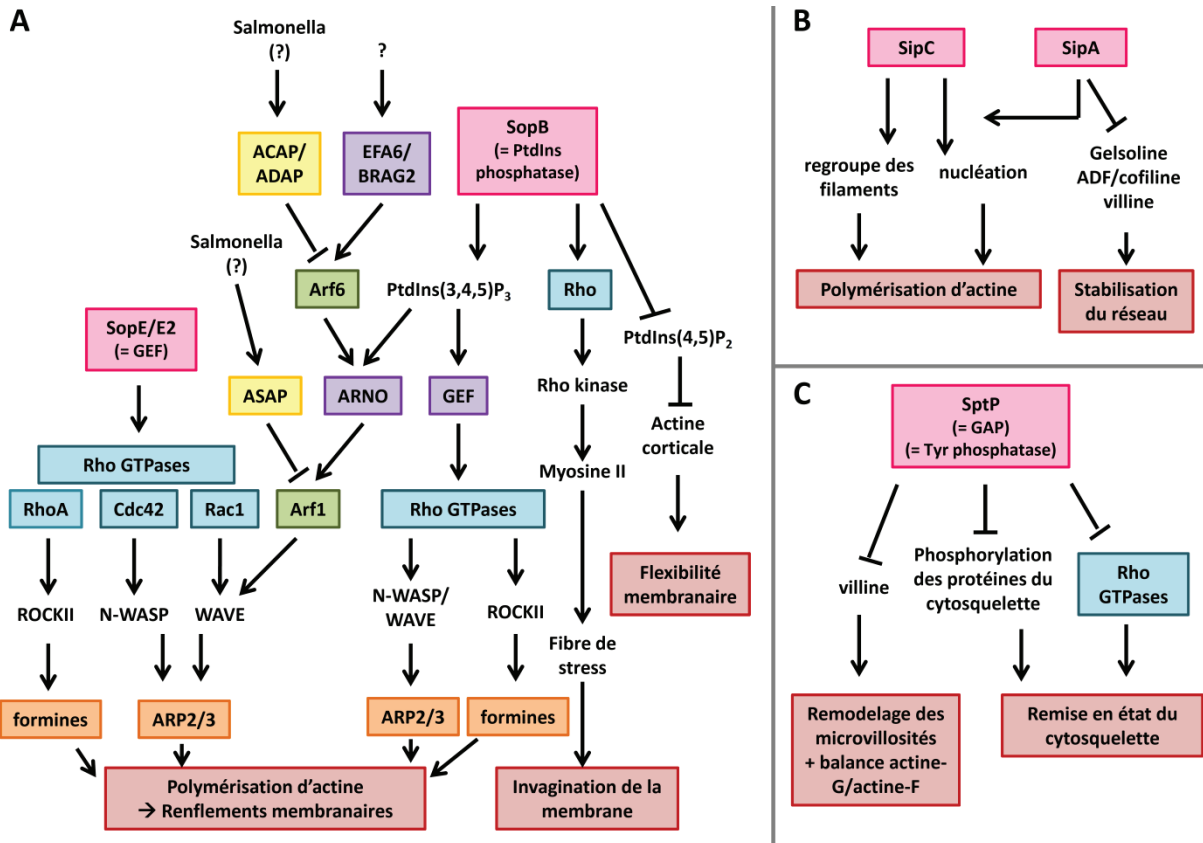


Figure 46 : Voies cellulaires contrôlées par les effecteurs de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium permettant l'entrée de la bactérie.

S. enterica serovar Typhimurium injecte dans la cellule hôte un ensemble de 6 effecteurs (SopE, SopE2, SopB, SipC, SipA et StpP) permettant son internalisation. Les principales cibles directes ou indirectes de ces effecteurs sont les Rho GTPases cellulaires. Le contrôle des GTPases permet à *Salmonella* d'activer ou d'inhiber les nucléateurs d'actine cellulaire, ce qui lui permet tout d'abord d'induire des renflements membranaires provoquant son entrée (A), et ensuite de rétablir l'état initial du cytosquelette d'actine (C). *Salmonella* utilise également d'autres voies cellulaires afin de permettre son internalisation, parmi lesquelles le réseau d'actine contractile avec les myosines II, ou la flexibilité membranaire avec les PtdIns. Elle peut aussi contrôler directement la polymérisation d'actine via son effecteur nucléateur SipC, stabilisant ainsi le réseau d'actine pour son entrée (B) (voir le texte pour plus de détails).

effecteurs bactériens : roses ; Rho GTPases : bleues ; nucléateurs : oranges ; protéines à activité GAP : jaunes ; protéines à activité GEF : violettes ; Arf GTPases : vertes ; but de la voie activée : rouge.

à activité GEF provoquant l'échange de nucléotides et donc l'activation de différentes GTPases telles que RhoG, RhoA, Cdc42 et Rac1 (figure 46A) (Friebel *et al.*, 2001; Hardt *et al.*, 1998; Stender *et al.*, 2000). Bien que l'activation de RhoG par SopE/E2 n'ait pas été finement caractérisée à ce jour, les voies cellulaires activées par ces effecteurs au travers des trois autres GTPases ont fait l'objet de différentes études. RhoA activée par SopE/E2 régule la protéine kinase ROCKII, phosphorylant ainsi la formine FOHD1. FODH1 phosphorylée est alors activée et engendre une polymérisation d'actine participant à la formation des renflements cellulaires (Truong *et al.*, 2013). Bien qu'il ne s'agisse pas d'une voie de signalisation majeure pour l'internalisation de *Salmonella*, l'activation de Cdc42 par SopE/E2 recrute et active le NPF N-WASP, polymérisant des filaments d'actine au travers du complexe ARP2/3. SopE/E2 cible également le complexe ARP2/3 par l'activation de Rac1 qui recrute et active le complexe WRC contenant le NPF WAVE (Humphreys *et al.*, 2012; Patel & Galán, 2006). L'activation de WAVE fait aussi intervenir indirectement l'effecteur SopB. SopB est une phosphoinositide phosphatase modulant la composition des membranes cellulaires, notamment au niveau des renflements d'internalisation, où elle génère indirectement du PtdIns(3,4,5)P₃, probablement via la production de phosphatidylinositol-5-phosphate (PtdIns(5)P) activatrice de PI3-kinase (Mallo *et al.*, 2008). Le PtdIns(3,4,5)P₃ généré participe à la voie d'activation d'Arf1, petite GTPase Arf nécessaire à l'activation de WAVE. L'activation d'Arf1 est contrôlée par une cascade de protéines possédant des activités GAP et GEF, impliquant une régulation d'activation/inhibition cyclique auquel participent également d'autres protéines encore non identifiées de *Salmonella* (Davidson *et al.*, 2015; Humphreys *et al.*, 2012; Humphreys *et al.*, 2013). Le contrôle de la composition membranaire en phosphoinositides permet également à SopB de contrôler indirectement différentes GTPases, telles que RhoG contrôlée via son activateur SGEF (Patel & Galán, 2006; Zhou *et al.*, 2001). Les GTPases activées par SopB induisent alors une polymérisation d'actine au travers du complexe ARP2/3 ou via les formines (Truong *et al.*, 2013). De plus, SopB active Rho, puis les Rho kinases et les myosines II, provoquant la polymérisation de fibres de stress. SopB génère ainsi une force contractile qui conduit à l'invagination des membranes pour l'entrée de *Salmonella* (Hänisch *et al.*, 2010; Hänisch *et al.*, 2011). Ce mécanisme d'entrée indépendant des renflements membranaires est également renforcé par une activation du complexe ARP2/3 par WASH (Hänisch *et al.*, 2010). Finalement, l'activité phosphatase de SopB permet d'éliminer le PtdIns(4,5)P₂ de la membrane plasmique, décrochant ainsi l'actine corticale. Ce faisant, l'activité de SopB augmente la flexibilité membranaire nécessaire à la formation des renflements (Terebiznik *et al.*, 2002). Les renflements membranaires permettant l'internalisation de *Salmonella* sont donc contrôlés par les effecteurs SopE/E2 et SopB (figure 46A). La formation de ces renflements se fait via des polymérisations d'actine distinctes mais complémentaires par le complexe ARP2/3 et les formines cellulaires (figure 47) (Truong *et al.*, 2013). L'implication de ces différentes voies contrôlées par

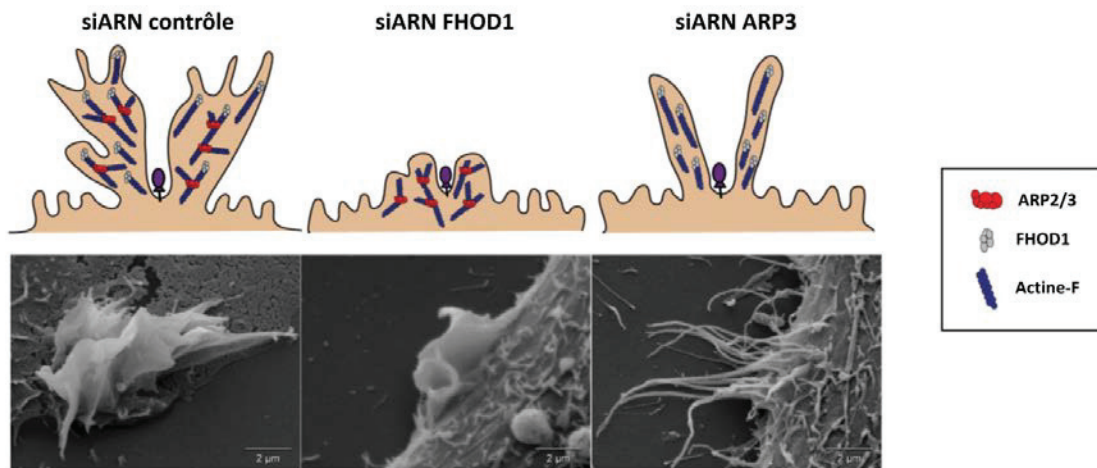


Figure 47 : Rôles distincts mais complémentaires des nucléateurs cellulaires ARP2/3 et formine FHOD1 durant l'internalisation de *Salmonella Typhimurium* (d'après Truong *et al.*, 2014).

FHOD1 et ARP2/3 se localisent aux renflements membranaires produits par *Salmonella* et contribuent à leurs formations (à gauche). La déplétion de FHOD1 par siARN entraîne un retard des renflements d'invasion qui sont également de petites tailles (au centre). La déplétion du complexe ARP2/3 par un siARN ARP3 induit des renflements d'invasion longs et fins, similaires à des filopodes.

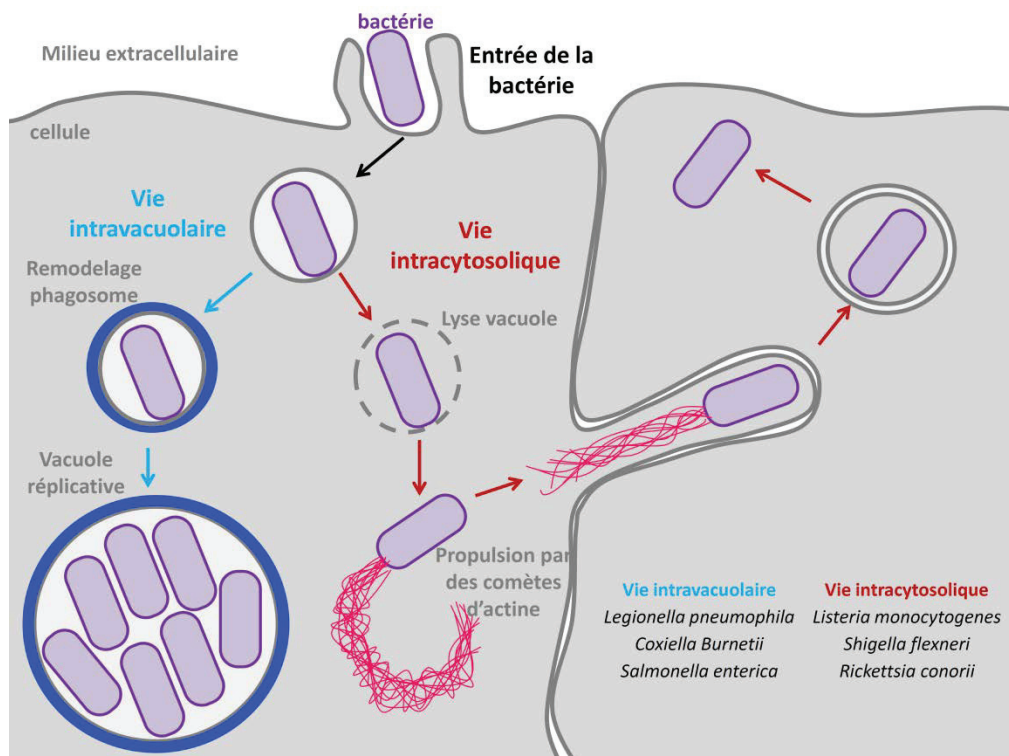


Figure 48 : Cycle de vie intracellulaire des pathogènes bactériens.

Une fois internalisées dans leur cellule hôte, les bactéries pathogènes se trouvent dans une vacuole où 2 cycles de vie vont se différencier. Certaines bactéries lysent leur vacuole d'internalisation afin d'être libérées dans le cytoplasme de leur hôte. Ces pathogènes se multiplient et se déplacent dans le cytoplasme de leur hôte via la polymérisation de « comètes » d'actine. La formation des « comètes » d'actine leur permet également de se propager de cellule en cellule. D'autres bactéries restent quant à elle dans leur vacuole d'internalisation. Ces vacuoles sont modifiées afin d'éviter la dégradation endocytique et de former une niche répliative. Une fois que ces bactéries se sont multipliées, elles se propagent dans l'environnement extérieur par lyse de leur cellule hôte.

SopE/E2 et SopB semble être spécifique du type cellulaire ciblé par la bactérie. Par ailleurs, l'effecteur SipC favorise le regroupement des filaments d'actine en faisceaux et possède une activité de nucléation d'actine, ces deux phénomènes pouvant être facilités par l'effecteur SipA (Hayward & Koronakis, 1999; McGhie *et al.*, 2001). SipA participe également à la stabilisation du réseau d'actine formé puisque cet effecteur inhibe le désassemblage des microfilaments par la gelsoline, le complexe ADF/cofiline et la villine (figure 46B) (McGhie *et al.*, 2004). Le contrôle de la villine par SipA mais aussi par SptP permet à *Salmonella* d'une part le remodelage des microvillosités intestinales et d'autre part une balance entre la polymérisation et le fractionnement des filaments d'actine (Lhocine *et al.*, 2015). Finalement, une fois la bactérie internalisée, le cytosquelette d'actine cellulaire est remis dans son état initial par SptP (figure 46C). SptP possède une activité GAP, inactivant les Rho GTPases précédemment activées par SopE/E2 et SopB (Fu & Galán, 1999). SptP a aussi une activité tyrosine phosphatase qui permet d'inhiber la phosphorylation de protéines du cytosquelette de l'hôte, rétablissant alors l'intégrité cellulaire (Murli *et al.*, 2001).

Salmonella enterica serovar Typhimurium orchestre donc finement son internalisation par les cellules hôtes à l'aide d'un groupe de six effecteurs. Ce mode d'entrée est aussi utilisé par d'autres bactéries pathogènes telles que *Shigella flexneri*, *Chlamydia trachomatis*, ou encore *Campylobacter jejuni*. On peut cependant noter d'importantes différences dans le mécanisme trigger de certains de ces pathogènes ; par exemple *Chlamydia trachomatis* utilise uniquement l'effecteur TraP qui mime la protéine cellulaire paxilline afin de détourner le cytosquelette d'actine via la formation d'adhésions focales (Thwaites *et al.*, 2014).

2.2.4. Vie intracellulaire

Une fois que les bactéries ont été internalisées par leurs cellules hôtes, deux modes de vie s'offrent à elles : certaines bactéries telles que *Listeria* s'échappent de la vacuole d'endocytose et résident alors librement dans le cytosol de leur hôte ; d'autres pathogènes comme *Salmonella* se multiplient dans une vacuole dont la composition est modifiée par des effecteurs bactériens afin de la transformer en niche répliquative (figure 48). Ces deux types de vie intracellulaire impliquent que les bactéries manipulent différentes voies de l'hôte, en particulier le cytosquelette d'actine, pour assurer leur survie et se propager.

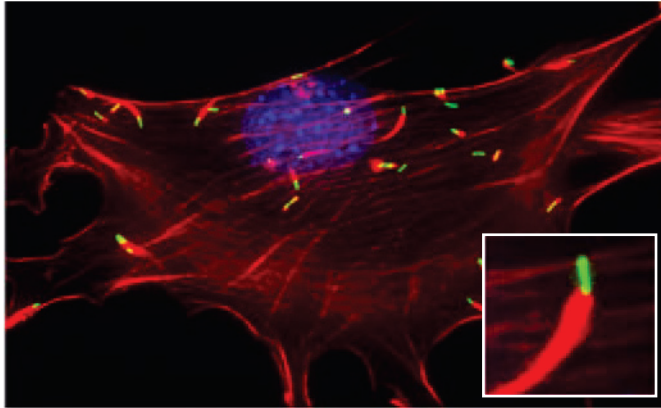
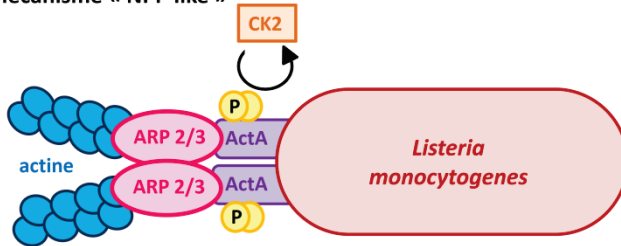


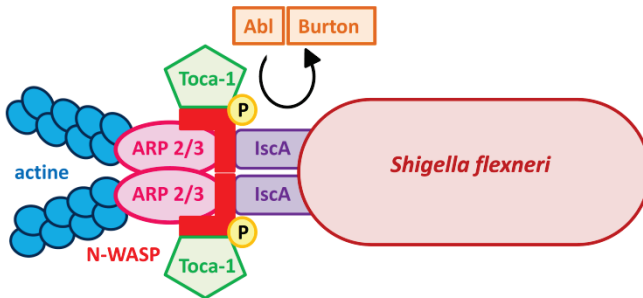
Figure 49 : Visualisation des "comètes d'actine" produites par *Listeria monocytogenes* (d'après Chong et al., 2009).

L. monocytogenes exprimant la GFP est marquée en vert. Le noyau cellulaire marqué au DAPI apparaît bleu et les filaments d'actine marqués à la phalloïdine sont visualisés en rouge.

A. Mécanisme « NPF-like »



B. Mécanisme de détournement des NPFs cellulaires



C. Mécanisme « nucléateur-like »

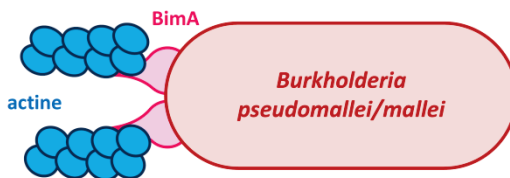


Figure 50 : Représentation des différents mécanismes de formation des "comètes d'actine" employés par les bactéries pathogènes intracytosoliques.

Afin de former les « comètes d'actine » nécessaires à leurs déplacements intracellulaires, les bactéries pathogènes ont mis en place 3 mécanismes distincts. (A) *L. monocytogenes* utilise sa protéine de surface ActA afin de mimer les NPFs cellulaires, recrutant et activant ainsi le complexe ARP2/3. (B) La protéine IscA de *S. flexneri* mime les signaux d'activation des NPFs, recrutant et activant les N-WASPs. Les NPFs recrutent et activent à leur tour le complexe ARP2/3. (C) Les espèces *Burkholderia pseudomallei* et *mallei* utilisent leur propre protéine de surface BimA afin de polymériser des filaments d'actine.

P : résidu phosphorylé.

➤ Vie intracellulaire cytoplasmique

À la suite de leur internalisation, certaines bactéries sont capables de vivre et de se multiplier dans le cytoplasme de leurs cellules hôtes après s'être échappées de leur vacuole d'endocytose. Ainsi, *Listeria monocytogenes* détruit la vacuole endocytique dans laquelle elle se trouve grâce à une toxine connue sous le nom de listériolysine O (LLO), dont l'action est potentialisée par deux phospholipases bactériennes, PI-PLC et PC-PLC (Seveau, 2014). Elle vit alors libre dans le cytoplasme cellulaire où elle met en place un système lui permettant de se déplacer et d'échapper à la dégradation par le protéasome ou l'autophagie (Perrin *et al.*, 2004; Yoshikawa *et al.*, 2009). Ce mode de déplacement intracellulaire, partagé par de nombreuses bactéries pathogènes cytoplasmiques, est basé sur une polymérisation d'actine localisée à un pôle de la bactérie, aboutissant à la formation de structures appelées « comètes d'actine », qui propulse le pathogène (figure 49). A ce jour, trois mécanismes différents permettant la formation de ces structures ont été décrits (figure 50).

Listeria monocytogenes, *Rickettsia* spp. et *Burkholderia thailandensis* forment leurs « comètes d'actine » grâce à une protéine de surface bactérienne mimant les NPFs cellulaires, qui activent le complexe nucléateur d'actine ARP2/3 (figure 50A). En effet, ActA de *Listeria*, RickA de *Rickettsia* et BimA de *Burkholderia thailandensis* possèdent des homologies de séquence avec les régions C et A des domaines VCA des protéines WASPs/WAVEs. Ces différentes protéines de surface se comportent comme les NPFs de type I, c'est-à-dire qu'elles recrutent et activent le complexe ARP2/3, déclenchant une polymérisation d'actine au pôle de la bactérie (Gouin *et al.*, 2004; Sitthidet *et al.*, 2010; Skoble *et al.*, 2000). Dans les cas de *L. monocytogenes*, il a été démontré que le recrutement du complexe ARP2/3 était dépendant de la phosphorylation d'ActA sur les résidus sérine 155 et 157 par la protéine kinase cellulaire CK2 (casein kinase 2). L'étude de Chong *et al.* a également révélé que des sites de phosphorylation putatifs de CK2 étaient présents à proximité des régions C de WASP et WAVE de divers organismes eucaryotes ainsi que dans la séquence de RickA de *Rickettsia*, laissant ainsi envisager que ces protéines bactériennes répondent aux signaux cellulaires modulant l'activité des NPFs (Chong *et al.*, 2009).

Les mouvements intracellulaires de *Shigella flexneri* et de *Mycobacterium marinum* sont, quant à eux, la conséquence du détournement de la signalisation cellulaire (figure 50B). En effet, ces deux bactéries miment les signaux d'activation des NPFs cellulaires afin de former leurs « comètes d'actine ». IscA, protéine de surface de *Shigella*, recrute le NFP N-WASP à un pôle de la bactérie, l'activant de manière similaire à la GTPase Cdc42 (Egile *et al.*, 1999). Cette interaction est favorisée par la phosphorylation de N-WASP via les tyrosines kinases Abl et Burton (Dragoi *et al.*, 2013). *Shigella* utilise alors un effecteur de son SST3 encore non identifié pour recruter la protéine cellulaire

Toca-1 au niveau d'IcsA. Toca-1 libère le NPF N-WASP de sa conformation auto-inhibitrice, recrutant et activant ainsi le complexe ARP2/3 (Leung *et al.*, 2008). La protéine de *Mycobacterium marinum* impliquée dans ses déplacements intracellulaires n'a pas encore été identifiée. Cependant, le mécanisme de polymérisation d'actine utilisé par cette bactérie est déjà connu. En effet, *M. marinum* recrute et active directement les WASPs et N-WASPs par leur domaine de fixation au PtdIns(4,5)P₂. Ces NPFs recrutent et activent à leur tour le nucléateur d'actine ARP2/3 qui polymérise ainsi un réseau de microfilaments propulsant la bactérie (Stamm *et al.*, 2005).

Très récemment, un nouveau mécanisme utilisé par les espèces pathogènes *Burkholderia pseudomallei* (Bp) et *mallei* (Bm) a été mis en évidence. Contrairement à *Burkholderia thailandensis* qui active le complexe ARP2/3 en mimant un NPF, ces deux espèces ont copié directement l'activité de nucléateur d'actine de type Ena/VASP via leur protéine de surface BimA (figure 50C). BpBimA et BmBimA possèdent en effet une activité de nucléation d'actine, indépendante du complexe ARP2/3, qui génère des filaments non branchés. Ces protéines restent également liées aux extrémités grandissantes des filaments, participant ainsi à leur élongation et les protégeant des protéines de coiffe. Elles sont aussi capables de regrouper plusieurs filaments, promouvant leurs élongations simultanées. Toutes ces activités miment non pas un NPF mais un nucléateur cellulaire (Benanti *et al.*, 2015).

Finalement, d'autres protéines du cytosquelette d'actine cellulaire sont également impliquées dans la motilité intracellulaire des bactéries. En effet, la reconstitution *in vitro* de la formation des comètes d'actine par ActA et IcsA a révélé que la présence de protéines de coiffe et de dépolymérisation était requise pour la motilité. Ces protéines permettent de maintenir un pool d'actine-G disponible pour une polymérisation d'actine continue (Loisel *et al.*, 1999). De plus, *Listeria* utilise les protéines cellulaires VASP afin d'augmenter l'élongation des filaments de sa « comète d'actine » ainsi que sa motilité par apport de complexes actine-G/profiline au niveau d'ActA (Laurent *et al.*, 1999).

➤ Vie intracellulaire vacuolaire

Contrairement aux bactéries vivant dans le cytosol de leur hôte, d'autres pathogènes, tels que *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, restent dans la vacuole produite à la suite de leur internalisation. Ces bactéries contrôlent alors le devenir de leur vacuole afin d'éviter leur dégradation par la voie endocytique, et de constituer une niche répliquative. Même si les mécanismes moléculaires impliqués ne sont pas tous identifiés, des SST3 ou SST4 et leur substrats jouent en général un rôle majeur dans la biogénèse d'une vacuole propice à la multiplication bactérienne intravacuolaire (Chakravorty *et al.*, 2005). Pour maîtriser l'avenir de leur vacuole, les pathogènes

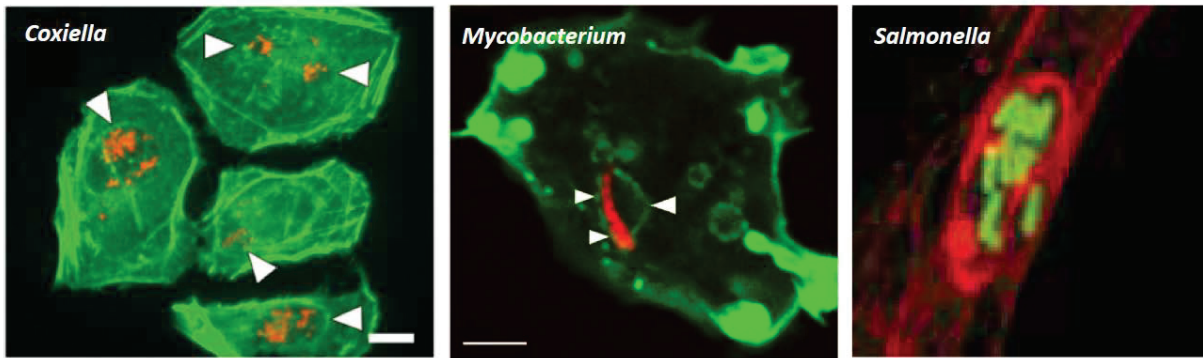


Figure 51 : Visualisation des structures d'actine présentes sur les vacuoles des bactéries pathogènes intravacuolaires (Aguilera *et al.*, 2009; Kolonko *et al.*, 2014; Méresse *et al.*, 2001). Les premier et second clichés représentent des infections de *Coxiella burnetii* et *Mycobacterium marinum*, respectivement. Les bactéries sont visualisées en rouge et les filaments d'actine sont marqués par de la phalloïdine en vert. Les pointes de flèches blanches indiquent les structures d'actine présentes sur les vacuoles des pathogènes. Le troisième cliché montre une infection de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Dans ce cas, les bactéries sont marquées en vert et l'actine polymérisée est visualisée grâce à de la phalloïdine rouge.

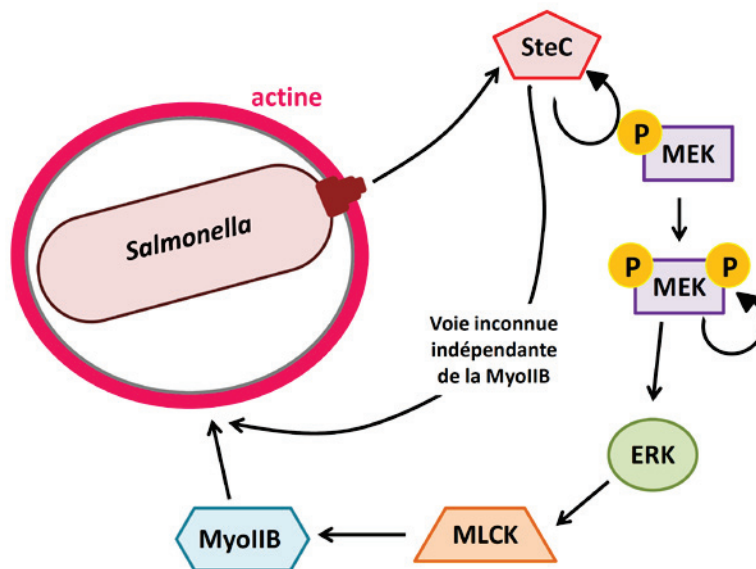


Figure 52 : Mécanismes de polymérisation d'actine formant le maillage d'actine présent sur les vacuoles de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

La formation du maillage d'actine présent sur les vacuoles de *S. enterica* est strictement dépendante de la présence dans le cytoplasme cellulaire de l'effecteur bactérien SteC. SteC induit une polymérisation d'actine par 2 voies cellulaires, d'une part via l'activation de la myosine IIB générant des fibres de stress, et d'autre part via une voie encore inconnue mais indépendante des myosines II. L'activité protéine kinase de SteC est nécessaire pour la formation du maillage d'actine.

ERK : Extracellular Signal-regulated Kinase; MEK: Mitogen-activated Protein (MAP)/Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) Kinase; MLCK : myosin light chain kinase; MyoIIB: myosine IIB; P: résidu phosphorylé.

contrôlent en effet de nombreuses voies cellulaires, dont le cytosquelette d'actine. Ce détournement implique soit la formation, soit la dégradation de structures d'actine au niveau des vacuoles (figure 51).

Coxiella burnetii, l'agent pathogène de la fièvre Q, possède la particularité de former de grandes vacuoles parasitophores (PV) résultant de la fusion membranaire entre différents phagosomes contenant des bactéries. Des filaments d'actine ont été observés sous forme de patches, ou plus rarement d'anneaux, au niveau de ces PVs (Aguilera *et al.*, 2009). La polymérisation d'actine au niveau des phagosomes est essentielle pour la formation des PVs puisque l'inhibition de cette polymérisation engendre un nombre plus élevé de vacuoles de petites tailles contenant des coxielles. Bien que le mécanisme permettant cette polymérisation d'actine n'ait pas encore été élucidé, le recrutement des GTPases RhoA et Cdc42 activées a été mis en évidence au niveau des PVs (Aguilera *et al.*, 2009). Le réseau d'actine cellulaire est donc important pour la mise en place du cycle infectieux de *C. burnetii*.

Les différentes espèces de *Mycobacterium* semblent également moduler la présence d'actine polymérisée sur leur vacuole mais le rôle de cette polymérisation est controversé. Il a en effet été proposé d'une part que cette polymérisation participerait à l'inhibition de la maturation endocytaire des phagosomes, et d'autre part qu'elle provoquerait au contraire la dégradation endocytaire. Deux études indépendantes soutiennent l'hypothèse selon laquelle les vacuoles de *Mycobacterium* présentant de l'actine sont ciblées par la voie endocytaire et que les espèces pathogènes de *Mycobacterium* sont capables de structurer ce réseau de microfilaments afin de prévenir la dégradation bactérienne (Anes *et al.*, 2003; Guérin & de Chastellier, 2000). Le mécanisme mis en place pour rompre les réseaux d'actine n'a pas encore été identifié. Récemment, l'étude de Kolonko *et al.* a remis en question cette vision du détournement d'actine par *Mycobacterium*. En effet, Kolonko *et al.* ont démontré que la polymérisation d'actine dépendante du NPF WASH se produisait sur les vacuoles des espèces pathogènes *M. marinum* et *M. tuberculosis*. L'actine polymérisée sur les vacuoles préviendrait l'acidification et l'activité bactéricide des vacuoles, en empêchant la fusion avec les lysosomes apportant des pompes V-ATPases (Kolonko *et al.*, 2014). Le réseau d'actine semble donc, dans les deux hypothèses, jouer un rôle important pour la survie de *Mycobacterium*.

Contrairement à ce qui a pu être observé pour *Coxiella* et *Mycobacterium*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium forme un véritable maillage d'actine autour de ses vacuoles (Mérése *et al.*, 2001). La polymérisation d'actine formant ce réseau est due à la protéine kinase bactérienne SteC, substrat du SST3 SPI-2 (*Salmonella* Pathogenicity Island 2) (figure 52) (Poh *et al.*, 2008). En effet, SteC phosphoryle la protéine kinase cellulaire MEK (Mitogen-activated Protein

(MAP)/Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) Kinase) sur la sérine 200. Cette phosphorylation engendre un changement conformationnel qui permet l'autophosphorylation et l'activation concomitante de MEK. MEK déclenche alors l'activation de la voie de signalisation impliquant ERK, MLCK (myosin light chain kinase) et la myosine IIB. Cette voie aboutit à la polymérisation de fibres de stress entourant la vacuole de *Salmonella*. SteC pourrait également utiliser une autre voie encore non identifiée, indépendante de la myosine II, pour le remodelage du cytosquelette d'actine. Bien que le rôle de ce maillage d'actine ne soit pas encore clairement défini, il semble interférer avec la croissance intracellulaire de *Salmonella* (Odendall *et al.*, 2012).

Finalement, le dernier genre bactérien pathogène pour l'homme, connu pour moduler le cytosquelette d'actine pour sa vie vacuolaire, est *Chlamydia*. *Chlamydia* possède un cycle de vie intracellulaire particulier où la vacuole d'internalisation se transforme en compartiment spécialisé, appelé inclusion, permettant la multiplication des formes bactériennes répliquatives et non-infectieuses dénommées RB (reticulate body). Les inclusions réalisées par le pathogène *Chlamydia trachomatis* sont recouvertes d'un maillage d'actine environ 20 heures après le début de l'infection et ce réseau augmente progressivement jusqu'à la fin du cycle infectieux. Le maillage d'actine présent sur les inclusions de *Chlamydia* est dû à des effecteurs de son SST3 encore non identifiés. L'assemblage de ce réseau d'actine dynamique requiert la GTPase RhoA qui est recrutée au niveau de l'inclusion, indépendamment de son état d'activation. D'autres protéines régulant le cytosquelette d'actine sont également impliquées dans ce phénomène, mais plus tardivement dans le cycle infectieux comme par exemple les formines, les septines, la myosine II et les protéines kinases de la famille Src. Ce maillage d'actine est considéré comme un élément essentiel au bon déroulement du cycle de *Chlamydia*. En effet, ce réseau permet d'une part le maintien de la morphologie et de l'intégrité de l'inclusion, et d'autre part la libération des *Chlamydia* dans le milieu extracellulaire par le mécanisme d'extrusion, décrit dans la partie suivante (Chin *et al.*, 2012; Kumar & Valdivia, 2008).

2.2.5. Sortie des cellules hôtes et propagation

La sortie des cellules hôtes ou la propagation de certaines bactéries peut nécessiter le détournement du cytosquelette d'actine cellulaire. En effet, plusieurs pathogènes ont mis en place des mécanismes utilisant le cytosquelette d'actine pour permettre leur sortie ou propagation sans altérer leur cellule hôte. A ce jour, trois de ces mécanismes ont été identifiés : l'extrusion de *Chlamydia*, l'ejectosome de *Mycobacterium* et les protrusions de *Listeria*, *Shigella* et *Rickettsia*.

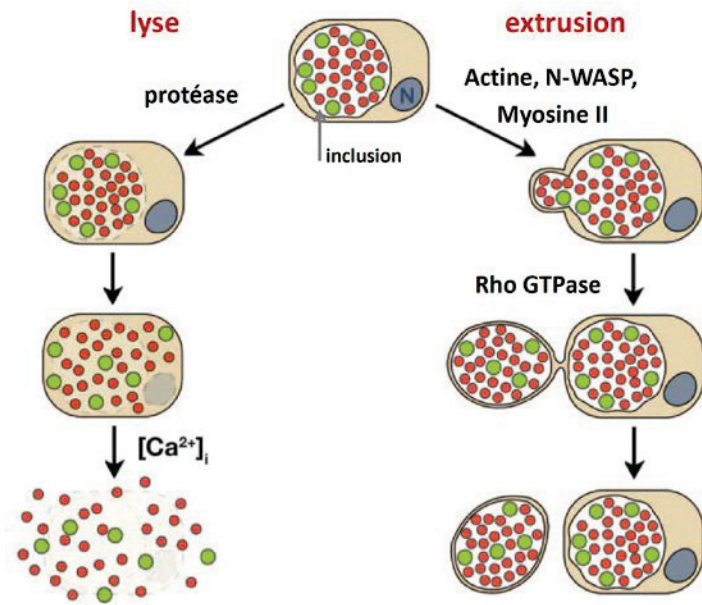


Figure 53 : Mécanismes de sortie des cellules hôtes utilisées par *Chlamydia* (d'après Hybiske & Stephens, 2007).

Deux mécanismes de sortie des cellules hôtes ont été décrits pour *Chlamydia*, la lyse impliquant des protéases et l'extrusion nécessitant la manipulation du cytosquelette d'actine.

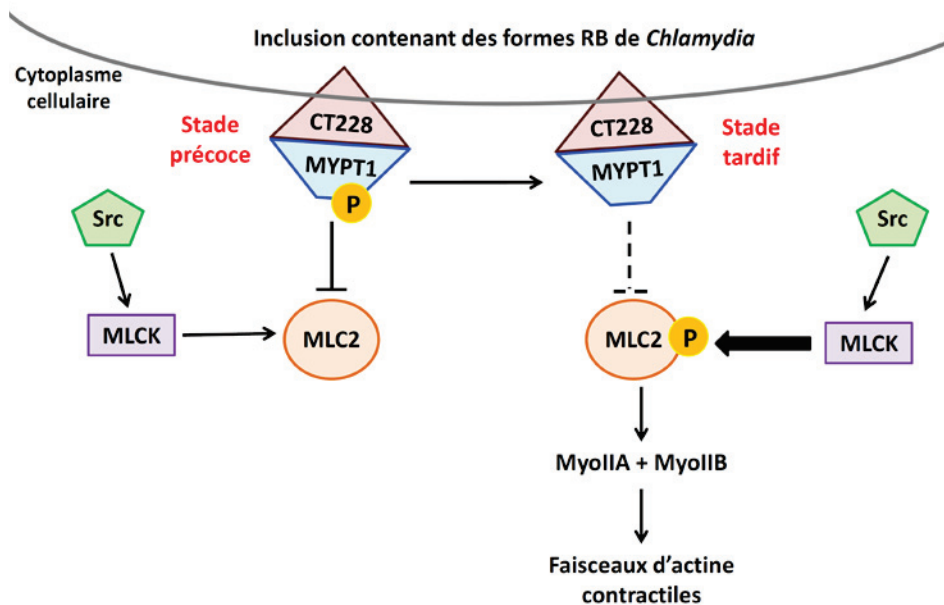


Figure 54 : Mécanisme moléculaire de la manipulation du cytosquelette d'actine impliquée dans l'extrusion de *Chlamydia*.

La sortie par extrusion nécessite l'activation de la polymérisation d'actine cellulaire, selon un mécanisme similaire au mécanisme de bourgeonnement des levures. Une des voies du cytosquelette d'actine impliquée dans ce mécanisme nécessite l'effecteur CT228 du SST3 de *Chlamydia*. Cet effecteur permet de contrôler l'activation des myosines II, permettant ainsi la formation de faisceaux d'actine contractiles.

MLC2 : myosin light chain 2 ; MLCK : myosin light chain kinase ; MyoIIA: myosin IIA; MyoIIB: myosin IIB; MYPT1: myosin phosphatase target subunit 1 ; P: résidu phosphorylé; RB : reticulate body.

Les différentes espèces de *Chlamydia* possèdent deux voies indépendantes de sortie de leur cellule hôte. Ces bactéries peuvent être libérées dans l'environnement extérieur par la lyse successive de leur inclusion et de la membrane plasmique cellulaire. Elles peuvent également sortir de leur cellule hôte par un mécanisme appelé extrusion (figure 53). Ce procédé correspond à la séparation du corps cellulaire et de l'inclusion de *Chlamydia* intacte par formation d'une sorte de protubérance/bourgeonnement, libérant ainsi l'inclusion entourée de membrane plasmique dans le milieu extérieur (Hybiske & Stephens, 2007). Le manteau d'actine dynamique présent sur l'inclusion au cours du cycle de *Chlamydia* est indispensable à ce mode de sortie (Chin *et al.*, 2012). Le mécanisme précis impliqué dans ce processus n'est pas encore connu. Cependant, le NPF N-WASP et la myosine II sont impliqués dès le début du mécanisme alors que les Rho GTPases sont nécessaires pour l'étape de pincement de la protubérance (Hybiske & Stephens, 2007). Lutter *et al.* ont analysé la voie de signalisation de la myosine II participant à ce phénomène (figure 54). La myosine phosphatase MYPT1 (myosin phosphatase target subunit 1) semble être l'initiatrice de l'activation de cette voie. En effet, MYPT1 est recrutée au niveau de l'inclusion, dès les premiers stades de son développement, par l'effecteur CT228 du SST3 de *Chlamydia* inséré dans la membrane vacuolaire. Cette myosine phosphatase est d'abord trouvée sous sa forme active phosphorylée avant d'être détectée sous sa forme non phosphorylée et donc inactive au stade tardif du cycle de *Chlamydia*. MYPT1 inactive ne contrebalance alors plus la protéine kinase MLCK, elle-même activée par les protéines kinases de la famille Src présentes sur l'inclusion. MLCK active à son tour MLC2 qui peut ainsi interagir avec les myosines IIA et IIB, entraînant la formation de faisceaux d'actine contractiles (Lutter *et al.*, 2013). Le remodelage du cytosquelette d'actine nécessaire à l'extrusion se fait donc via le détournement des myosines II, mais également via une autre voie dépendante de la polymérisation d'actine, impliquant probablement les N-WASPs (Hybiske & Stephens, 2007; Lutter *et al.*, 2013).

Une fois internalisées, *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium marinum* se retrouvent dans des vacuoles dont elles contrôlent la maturation afin de les transformer en vacuoles répliquatives. Avant d'être libérées dans l'environnement extérieur, il a été montré que ces deux espèces bactériennes pouvaient résider temporairement dans le cytoplasme de leur hôte. Récemment, ce bref passage cytoplasmique s'est révélé utile à la mise en place d'un nouveau mécanisme de sortie des cellules hôte. Cela permet également une transmission d'une cellule donneuse à une cellule receveuse dans l'amibe *Dictyostelium discoideum*. En effet, ces bactéries peuvent être éjectées de leur cellule hôte au travers de structures riches en actine appelées ejectionosomes (figure 55). Ce mécanisme est contrôlé par la bactérie qui pousse la membrane plasmique de son hôte (figure 56). Cette dernière est alors rompue à l'extrémité de la bactérie et

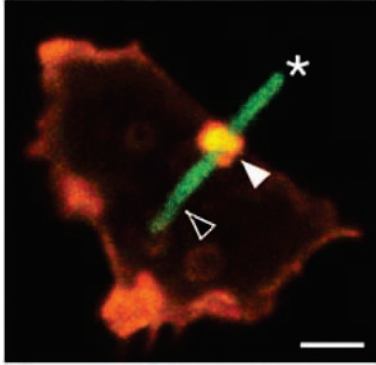


Figure 55 : Visualisation d'une structure d'actine appelée ejectosome permettant la sortie de *Mycobacterium* (Hagedorn *et al.*, 2009).

Mycobacterium marinum exprimant la GFP est marquée en vert. Les filaments d'actine sont visualisés par de la phalloïdine en rouge. L'astérisque indique la partie de la bactérie sortie dans l'environnement extérieur. La pointe de flèche blanche montre l'ejectosome. La pointe de flèche noire indique la partie intracellulaire de la bactérie. Barre d'échelle 1 μm .

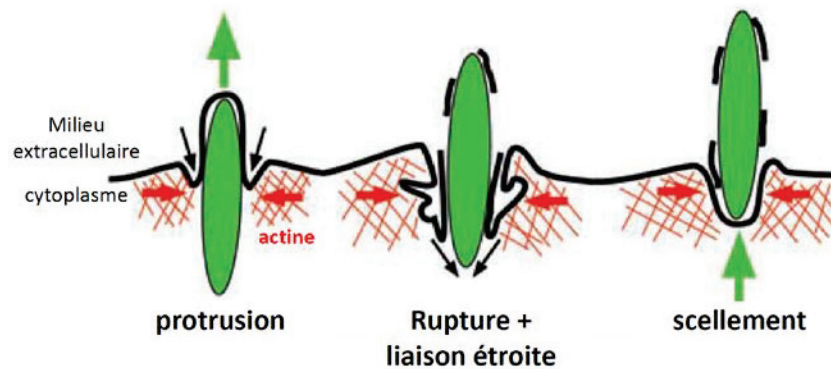


Figure 56 : Mécanisme de sortie au travers d'un ejectosome par *Mycobacterium* (d'après Hagedorn *et al.*, 2009).

Mycobacterium peut sortir de sa cellule hôte en poussant la membrane plasmique. Durant le mouvement vers l'extérieur de la bactérie, un anneau d'actine exerce une contraction (flèches rouges) autour de la bactérie. La membrane plasmique invaginée se referme derrière la bactérie (flèches noires) malgré sa précédente rupture.

reste étroitement liée à la surface du pathogène via un réseau dense d'actine. La membrane se referme finalement à la partie postérieure de *Mycobacterium*, empêchant la fuite de composants cellulaires ainsi que la mort de la cellule. Le mécanisme moléculaire engendrant cette voie de transmission inter-cellule n'a pas encore été identifié. On sait cependant que l'effecteur bactérien ESAT-6, sécrété par le système de sécrétion de type VII ESX-1, et la GTPase cellulaire RacH sont requis pour la formation de ces structures, et que les ejectosomes sont enrichis en myosine IB et coronine mais pas, ou faiblement, en myosine II ou en complexe ARP2/3 (Hagedorn *et al.*, 2009). L'activité de transmission de cellule à cellule de l'ejectosome implique également la machinerie d'autophagie, engendrant une vacuole autour de l'extrémité intracellulaire de la bactérie éjectée, mais sans pour autant avoir d'impact sur la formation des structures riches en actine (Gerstenmaier *et al.*, 2015). Certaines espèces pathogènes de *Mycobacterium* détournent donc le cytosquelette d'actine afin de sortir dans le milieu extérieur. Ce mode de sortie favorise également la transmission de cellule à cellule des bactéries protégées de l'environnement extérieur.

Finalement, les pathogènes vivant librement dans le cytoplasme de leur cellule hôte sont capables d'utiliser leurs « comètes d'actine » afin de se propager de cellule en cellule. *Listeria*, *Shigella* et *Rickettsia* utilisent cette stratégie qui consiste à pousser la membrane plasmique des cellules hôtes grâce à l'impulsion générée par la polymérisation des « comètes d'actine », créant ainsi des protubérances qui s'insèrent dans les cellules adjacentes (Tilney & Portnoy, 1989). Dans ce but, *Listeria* module également la tension du cytosquelette d'actine cortical pour faciliter son passage. De manière remarquable, ces trois bactéries mettent en place différents mécanismes pour former les « comètes d'actine » qui servent à leur motilité intra- ou inter-cellulaire.

Rickettsia emploie deux mécanismes distincts pour générer des « comètes d'actine », chacun intervenant à un stade particulier de l'infection. Au stade précoce, c'est-à-dire à 15-30 min post-infection, *Rickettsia* utilise sa protéine de surface RickA afin d'assurer sa motilité via une polymérisation d'actine par ARP2/3, comme détaillée dans la partie « Vie intracellulaire cytoplasmique » de cette revue bibliographique. De plus, *Rickettsia* utilise sa protéine de surface Sca2 pour polymériser ses « comètes d'actine » aux temps tardifs de l'infection, à 24-48 h post-infection (Reed *et al.*, 2014). Sca2 possède sa propre activité de nucléation et reste liée aux extrémités barbées des filaments, les protégeant ainsi des protéines de coiffe et les allongeant grâce à une activité d'élongation (Haglund *et al.*, 2010). Bien que cette protéine bactérienne possède des activités similaires aux formines, elle se différencie de ces dernières par son mécanisme, impliquant la coopération de ses domaines N et C-terminaux d'une forme monomérique, avec une structure générale ressemblant aux dimères de formines (Madasu *et al.*, 2013). Reed *et al.* ont également

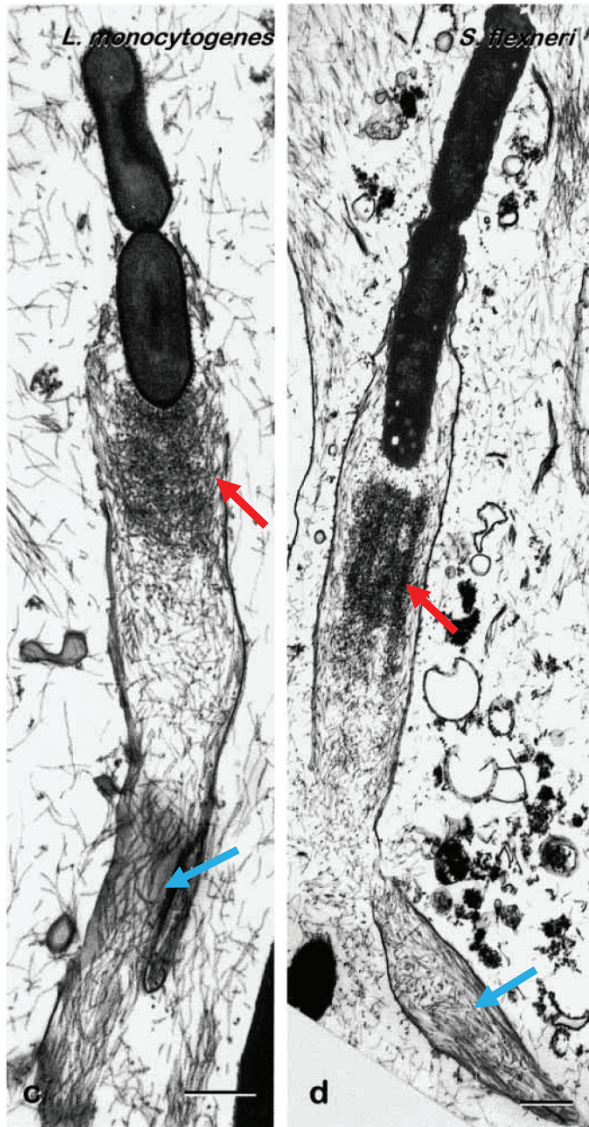


Figure 57 : Visualisation des "comètes d'actine" générées par *Listeria monocytogenes* et *Shigella flexneri* pour permettre leur propagation dans les cellules voisines (d'après Gouin *et al.*, 1999).

Microscopie électronique de protrusions formées par *L. monocytogenes* (à gauche) et *S. flexneri* (à droite) dans des cellules Hep2. Les « comètes d'actine » sont visualisées par un marquage myosine S1. Barre d'échelle 0,5 μ m.

Les filaments courts et branchés à la base des bactéries sont signalés par une flèche rouge. Les filaments d'actine longs et parallèles sont indiqués par une flèche bleue.

démontré que, bien que la polymérisation d'actine au travers de RickA participe à la propagation, Sca2 semble jouer un rôle majeur dans la dissémination intercellulaire (Reed *et al.*, 2014).

Shigella mobilise aussi différentes polymérisations d'actine cellulaire pour ses déplacements intra et inter-cellulaires. Ses « comètes d'actine » pour les mouvements intra-cytosoliques sont constituées d'un réseau d'actine angulaire alors que les microfilaments présents aux extrémités des bactéries dans les protrusions, au cours du passage intercellulaire, sont angulaires puis parallèles (figure 57) (Gouin *et al.*, 1999). Les « comètes d'actine » générées par *Shigella* pour sa propagation intercellulaire sont dépendantes du détournement des formines cellulaires Dia1 et Dia2. Le recrutement de ces nucléateurs est indépendant du SST3 de *Shigella* et ne passe pas par l'activation de la GTPase RhoA (Heindl *et al.*, 2010). La myosine X est impliquée dans la propagation de cellule en cellule de *Shigella*. Ce moteur moléculaire sert de lien entre les filaments d'actine polymérisée par la bactérie et la membrane des protrusions. La déplétion de la myosine X ne modifie pas la fréquence des protrusions de *Shigella* mais diminue significativement leurs tailles et change leurs morphologies. L'activité de moteur moléculaire de la myosine X servirait alors à maintenir la forme des protrusions mais, également, à transporter de la membrane cellulaire aux extrémités des protrusions afin de permettre leur élongation et de favoriser ainsi la propagation (Bishai *et al.*, 2013). La myosine II et sa kinase régulatrice MLCK semblent aussi être importantes pour la propagation inter-cellulaire de *Shigella* mais leur rôle n'est pas encore connu (Lum & Morona, 2014).

Les « comètes d'actine » générées par *Listeria* pour former les protrusions présentent également une architecture atypique avec à la base de la bactérie des filaments d'actine courts et branchés tandis que le reste de la protrusion est composé de longs filaments parallèles (figure 57) (Gouin *et al.*, 1999). Deux mécanismes de polymérisation d'actine sont nécessaires à la formation des protrusions. La protéine de surface bactérienne ActA génère les filaments courts au pôle de la bactérie au travers de l'activation du complexe ARP2/3, similairement au mécanisme mis en place pour sa motilité cytoplasmique (Kocks *et al.*, 1992; Skoble *et al.*, 2000). La machinerie de désassemblage du cytosquelette d'actine est nécessaire pour « recycler » le complexe ARP2/3 à partir du réseau distal et l'incorporer dans le réseau nouvellement formé au pôle de la bactérie (Talman *et al.*, 2014). *Listeria* produit ensuite les longs filaments parallèles de sa « comète d'actine » en détournant les formines mDia1, mDia2 et mDia3. Ce détournement pourrait se faire par une régulation des Rho GTPases puisque Rac1, Cdc42, RhoA, RhoC et RhoD participent à la propagation inter-cellulaire de *Listeria*. Les formines cellulaires sont impliquées dans la taille des protrusions formées et sont donc requises pour une propagation efficace de *Listeria* (Fattouh *et al.*, 2015). La myosine X participe également à cette voie de dissémination, avec probablement le même rôle d'apport de membrane que pour les protrusions de *Shigella* (Bishai *et al.*, 2013). De manière

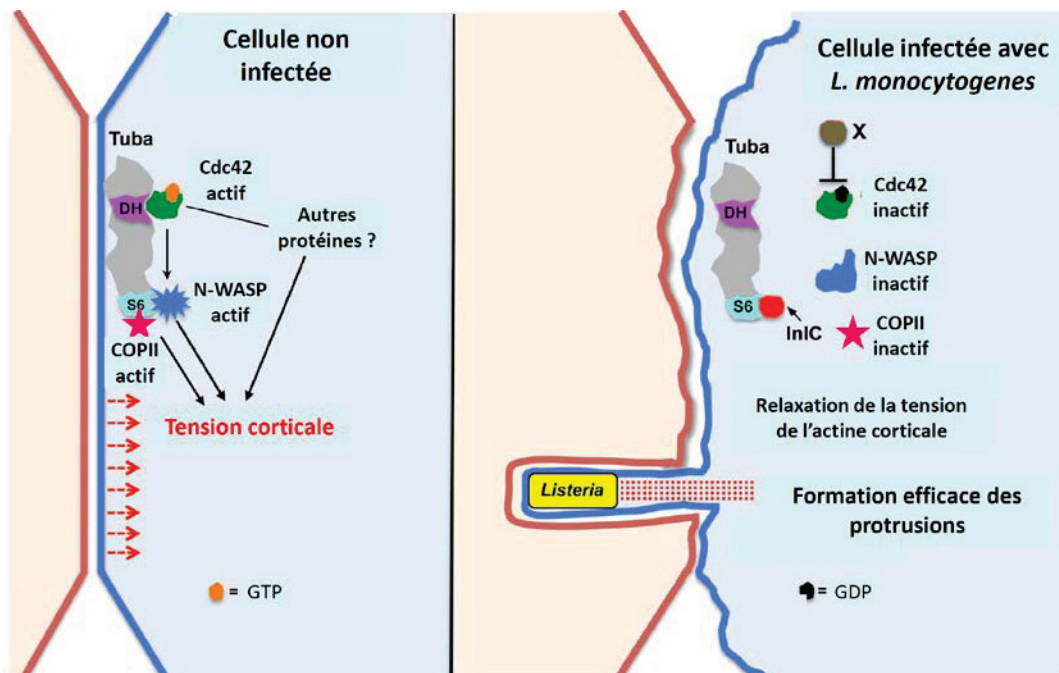


Figure 58 : Modèle de perturbation des jonctions cellulaires par *Listeria monocytogenes* afin de permettre la formation des protrusions (d'après Ireton *et al.*, 2014).

Dans les cellules épithéliales polarisées non infectées (à gauche), les protéines Tuba, N-WASP et Cdc42 induisent une tension corticale, probablement via l'activation de Cdc42 et de N-WASP par Tuba. Dans les cellules infectées avec une souche sauvage de *L. monocytogenes* (à droite), la tension corticale est diminuée par l'effecteur bactérien InIC, empêchant la fixation de N-WASP sur Tuba, mais aussi par un autre effecteur encore non identifié (X) qui inactive Cdc42. L'inhibition de la tension corticale permet la formation efficace de protrusions par les bactéries.

intéressante, il a été démontré que la formation de protrusions par *Listeria* dans des cellules eucaryotes possédant des jonctions cellulaires nécessitait la sécrétion de la protéine bactérienne InIC dans le cytoplasme de l'hôte (figure 58) (Rajabian *et al.*, 2009). InIC interagit et ainsi antagonise la protéine cellulaire adaptatrice Tuba. InIC bloque la formation des complexes Tuba/N-WASP et Tuba/COPII, COPII étant un complexe régulateur du trafic entre le RE et l'appareil de Golgi, au niveau des jonctions cellulaires. La tension corticale produite par ces complexes est alors supprimée, permettant donc une génération efficace des protrusions (Gianfelice *et al.*, 2015; Rajabian *et al.*, 2009). La GTPase Cdc42 est aussi ciblée par un facteur bactérien non identifié. Cdc42 est alors inhibée par *Listeria*, réduisant ainsi d'une autre manière la tension corticale des cellules hôtes (Rigano *et al.*, 2014). La diminution de la tension corticale des cellules par *Listeria* favorise la propagation de cellule en cellule de ce pathogène, en relâchant la membrane cellulaire, ne s'opposant ainsi plus à la force exercée vers l'extérieur par les bactéries motiles.

Les protrusions formées par *Listeria*, *Shigella* et *Rickettsia* sont finalement internalisées par les cellules voisines. Cette étape, faisant également intervenir le cytosquelette d'actine, a récemment été détaillée pour *Shigella*, qui se propage de cellule en cellule en ciblant les jonctions tricellulaires, c'est-à-dire les points d'intersection entre trois ou quatre cellules (Fukumatsu *et al.*, 2012). Les protrusions formées au niveau de ces jonctions détournent la voie d'endocytose clathrine-dépendante des cellules voisines afin d'être englobées (figure 59). En effet, les protrusions activent la PI3K autour de leurs sites d'entrée dans les cellules voisines prochainement infectées. L'activité de la PI3K recrute l'adaptateur Espine-1 autour des protrusions, permettant ainsi l'accumulation de clathrine (Fukumatsu *et al.*, 2012). Les bactéries se retrouvent donc finalement dans des vacuoles à double membrane qu'elles lysent afin de recommencer leurs cycles infectieux dans le cytoplasme de leurs nouvelles cellules hôte.

2.2.6. Echappement à la phagocytose

Afin de se protéger de la dégradation et de la présentation de leurs antigènes au système immunitaire, certaines bactéries pathogènes ont mis en place différents mécanismes inhibant leur internalisation par les phagocytes professionnels tels que les macrophages. Plusieurs bactéries, parmi lesquelles *Burkholderia cenocepacia* et l'espèce *Yersinia*, injectent des effecteurs bactériens dans le cytoplasme des phagocytes, leur permettant un contrôle du cytosquelette d'actine cellulaire impliqué dans la phagocytose. La manipulation du réseau d'actine altère ainsi la fonction de phagocytose des macrophages soit en modifiant la morphologie globale des cellules, soit en inhibant la formation des pseudopodes.

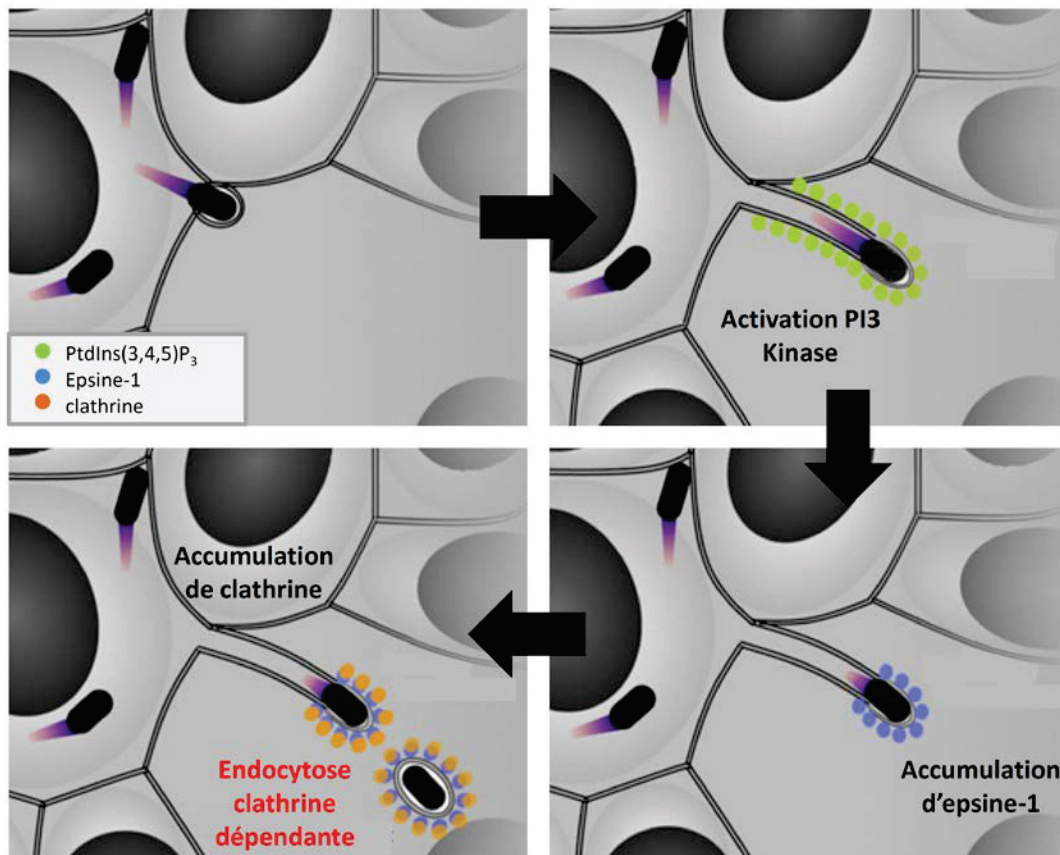


Figure 59 : Modèle d'entrée des protrusions de *Shigella flexneri* dans les cellules adjacentes (d'après Fukumatsu *et al.*, 2012).

Lorsque *Shigella* se déplace d'une cellule à l'autre, elle forme des protrusions au niveau de jonctions tricellulaires. La cellule voisine, dans laquelle vient s'insérer la protrusion, déclenche la voie d'endocytose clathrine-dépendante par l'activation de la PI3-kinase, ce qui permet à la cellule nouvellement infectée d'englober la protrusion.

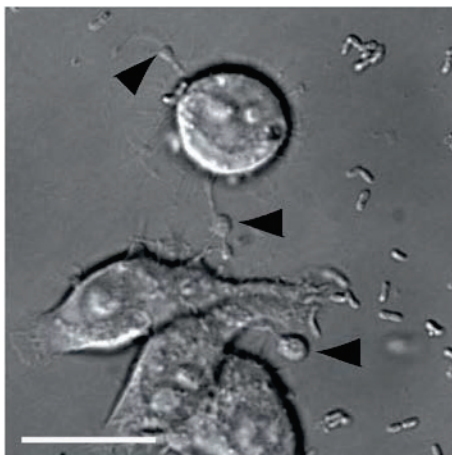


Figure 60 : Modifications morphologiques induites par l'infection de macrophages par *Burkholderia cenocepacia* (Flannagan *et al.*, 2012).

Macrophages RAW infectés avec des bactéries *B. cenocepacia* observés par microscopie optique (DIC). Les pointes de flèche indiquent des structures perlées connectées aux macrophages arrondis.

Burkholderia cenocepacia fait partie du complexe *Burkholderia cepacia* (Bcc) qui participe aux infections bactériennes associées à la mucoviscidose. Cette espèce est considérée comme la plus dangereuse du complexe Bcc puisqu'elle entraîne fréquemment une pneumonie nécrosante fatale (Drevinek & Mahenthiralingam, 2010). Cette bactérie est capable de survivre dans les cellules épithéliales des poumons mais également dans les macrophages alvéolaires. Lors de l'infection de macrophages, *B. cenocepacia* module la maturation du phagosome pour éviter sa dégradation. De plus, une caractéristique de cette infection est une modification drastique de la morphologie des phagocytes, avec un arrondissement du corps des cellules ainsi que la présence de structures perlées connectées aux cellules (figure 60). Il s'avère que cette modification morphologique est dépendante du SST6 de *B. cenocepacia* (Flannagan et al., 2012). Des effecteurs de ce système encore non identifiés altèrent le réseau d'actine des macrophages en inactivant les régulateurs des GTPases Rac et Cdc42, rendant ainsi ces dernières inactives et donc inhibant la polymérisation d'actine, notamment corticale. Le réseau d'actine sous-membranaire apparaît alors réduit et des structures d'actine-F sont retrouvées dans le cytoplasme des cellules, provenant probablement de regroupement d'actine-F détachée des membranes (Flannagan et al., 2012). Cette altération de la morphologie des macrophages induite par *B. cenocepacia* réduit significativement les activités de phagocytose et de macropinocytose des cellules, ce qui pourrait permettre à la bactérie de protéger les autres bactéries vis-à-vis du macrophage, dans une sorte de sacrifice pour le bien de la communauté. Il a également été suggéré que cette modification morphologique pourrait réduire la réponse immunitaire en évitant le trafic vésiculaire impliqué dans la présentation des antigènes et la migration de ces phagocytes, deux processus connus pour être actine dépendant (Flannagan et al., 2012). Bien que la base de ce mécanisme soit connue, d'autres études seront nécessaires pour affiner la compréhension de l'inhibition de la phagocytose par *B. cenocepacia*.

Le genre *Yersinia* contient trois espèces pathogènes pour l'homme, *Y. pestis*, *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis*. Bien que ces bactéries engendrent diverses infections, elles ont toutes trois mis en place un jeu d'effecteurs de SST3 commun qui bloque les différentes voies d'activation de la polymérisation d'actine associées à la phagocytose (figure 61) (Grosdent et al., 2002). Tout d'abord, YopH inhibe la formation des adhésions focales sous-jacente à la fixation de la bactérie sur des récepteurs cellulaires. En effet, YopH, grâce à son activité tyrosine phosphatase, déphosphoryle différentes protéines cellulaires telles que FAK et p130^{Cas}, bloquant ainsi une des cascades de signalisation induite pour l'internalisation de la bactérie (Persson et al., 1997). Deux autres effecteurs de *Yersinia*, YopE et YopT, interviennent dans l'inhibition de la phagocytose en manipulant des petites GTPases impliquées dans la polymérisation d'actine. YopE possède une activité GAP qui inactive les GTPases Rac1, Cdc42, RhoA et RhoG. Ces GTPases sont ainsi toujours présentes au niveau

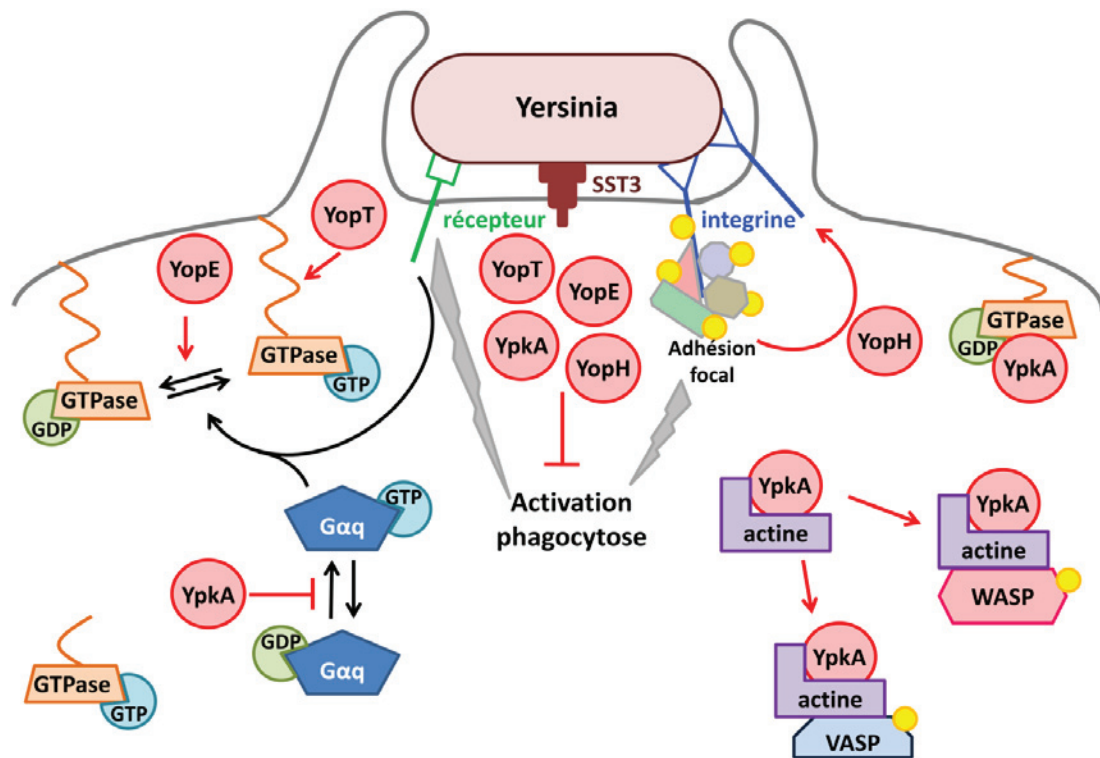


Figure 61 : Mécanisme d'inhibition de la phagocytose mis en place par *Yersinia spp.*

Yersinia spp. utilise un groupe de 4 effecteurs (YopE, YopT, YopH, YpkA) de son SST3 afin d'inhiber la polymérisation d'actine générant les pseudopodes d'internalisation des macrophages. Les principales cibles de ces effecteurs sont les GTPases cellulaires régulant les nucléateurs d'actine. *Yersinia* peut également contrôler le niveau de phosphorylation de différentes protéines cellulaires impliquées dans le cytosquelette d'actine, soit par une déphosphorylation via YopH, soit par une phosphorylation via YpkA (voir le texte pour plus de détails).

YopE : effecteur à activité GAP ; YopT : effecteur à activité prenyl-cystéine endoprotéase ; YopH : effecteur à activité tyrosine phosphatase ; YpkA: effecteur à activité GDI et sérine/thréonine protéine kinase.

Effecteurs de *Yersinia* : rouge; GDP : vert foncé ; GTP : bleu clair ; résidu phosphorylé : jaune; Rho GTPases : orange.

de la membrane plasmique mais sous une forme inactive, inhibant la polymérisation d'actine sous le site d'attachement de la bactérie (Black & Bliska, 2000; Mohammadi & Isberg, 2009). YopT, quant à lui, est une prenyl-cystéine endoprotéase clivant Rac1, Cdc42, RhoA et RhoG en amont du résidu cystéine prénylé. Le clivage des GTPases les décroche de la membrane plasmique, les entraînant alors sous forme active au niveau du noyau ou du cytosol cellulaire (Mohammadi & Isberg, 2009; Shao & Dixon, 2003). YopE et YopT ciblent donc les GTPases cellulaires en générant deux formes différentes de ces dernières qui cohabitent durant l'infection (Wong & Isberg, 2005). Enfin, l'effecteur multifonctionnel YpkA (ou YopO) joue un rôle majeur dans l'inhibition de la phagocytose par *Yersinia*. D'une part, YpkA possède un domaine GDI inhibant l'échange de nucléotide de Rac1 et RhoA. Les GTPases bloquées sous leur forme inactive ne permettent plus la formation des fibres de stress (Barz *et al.*, 2000; Prehna *et al.*, 2006). YpkA possède également un domaine kinase fonctionnel qui est impliqué dans ses deux autres fonctions. Ce domaine permet la phosphorylation de la protéine G Gαq, phosphorylation qui empêche la fixation de GTP au niveau de la protéine G et donc qui inhibe son activation. La protéine Gαq inactive n'induit alors plus de signaux d'activation pour la GTPase RhoA, ce qui bloque cette dernière en configuration inactive (Navarro *et al.*, 2007). Il est à noter que l'activité kinase d'YpkA est dépendante de la fixation d'une molécule d'actine-G (Juris *et al.*, 2000). Récemment, il a été montré que YpkA utilise la fixation de cette molécule d'actine-G comme « proie » pour recruter des protéines du cytosquelette d'actine. Les protéines ainsi recrutées sont phosphorylées par YpkA, modulant leur fonction cellulaire, comme par exemple pour VASP dont l'activité d'élongation est diminuée. YpkA parvient donc également à contrôler la polymérisation du réseau d'actine qui induit la phagocytose des bactéries par une régulation directe des protéines effectrices du cytosquelette (Lee *et al.*, 2015).

2.3. *Legionella* et le cytosquelette d'actine

Legionella pneumophila utilise le cytosquelette d'actine cellulaire pour son internalisation. Comme présenté précédemment, la bactérie semble stimuler son entrée à l'aide de son SST4 mais les effecteurs ou mécanismes impliqués ne sont pas encore identifiés. Ces dernières années, deux études ont révélé que *Legionella* était également capable de détourner le cytosquelette d'actine à d'autres fins que pour son entrée.

Tout d'abord, Franco *et al.* ont partiellement caractérisé VipA, le premier effecteur de *Legionella* interagissant avec l'actine. Cet effecteur avait précédemment été identifié lors d'un crible de gènes de *L. pneumophila* perturbant le trafic cellulaire des levures. En effet, son expression dans la levure *S. cerevisiae* inhibait le trafic des protéines lysosomales (Shohdy *et al.*, 2005). Dans l'étude de

Franco *et al.*, VipA est capable de provoquer à lui seul une nucléation de filaments d'actine *in vitro*, bien que cette activité soit plus faible que celles des nucléateurs d'actine cellulaire ARP2/3 et mDia. D'ailleurs, l'expression ectopique de VipA dans des cellules de mammifère ne provoque pas de réarrangement majeur du cytosquelette. Durant l'infection de macrophage, VipA est localisé au niveau de structures riches en actine et semble également colocalisé avec les endosomes précoces. Ces localisations ne sont pas dépendantes d'autres effecteurs de *Legionella* puisqu'elles sont également observées suite à l'expression ectopique de VipA dans des levures et des cellules de mammifère. La localisation endosomale ainsi que la fonction de régulateur d'actine a permis de proposer que VipA jouerait un rôle dans l'altération du trafic vésiculaire permettant l'échappement à la dégradation endocytaire. Cependant, VipA n'est pas essentiel à la réplication intracellulaire de *Legionella*, aussi bien dans son hôte environnemental, l'amibe, que dans les macrophages humains (Franco *et al.*, 2012).

Guo *et al.* ont également identifié un effecteur régulant le cytosquelette d'actine cellulaire, qui aurait cette fois un effet inhibiteur sur la polymérisation d'actine. En effet, Ceg14, aussi connu sous le nom SidL, a d'abord été montré comme présentant une forte cytotoxicité puisque l'expression ectopique de cet effecteur était toxique pour les levures et cellules de mammifère. Cette toxicité est supprimée par la co-expression de la profiline, protéine sequestratrice des monomères d'actine-G, mais uniquement chez la levure. La relation entre le cytosquelette d'actine et Ceg14 a alors été analysée. Ceg14 est capable de modifier la distribution du réseau d'actine des levures et d'empêcher ainsi le bourgeonnement de ces dernières. Ceg14 lie directement l'actine, empêchant la polymérisation spontanée des filaments d'actine par blocage de leur croissance. Cet effecteur n'est, là encore, pas essentiel à la réplication intracellulaire de *Legionella* et un double mutant $\Delta ceg14\Delta vipA$ ne présente également pas de défaut de croissance durant l'infection de *Dictyostelium discoideum*. Des expériences complémentaires sont donc nécessaires pour déterminer le rôle et le mécanisme contrôlé par Ceg14 (Guo *et al.*, 2014).

Contexte et objectifs de thèse

Legionella pneumophila est une bactérie opportuniste qui émerge de l'environnement après multiplication dans des amibes. A la suite d'une inhalation de microgouttelettes contaminées, elle peut infecter accidentellement les macrophages alvéolaires humains, provoquant une pneumonie sévère, la légionellose. La capacité de *L. pneumophila* à échapper à la dégradation endocytaire et à former une vacuole répliquative dans ses cellules hôtes, amibes ou macrophages, est strictement dépendante du SST4 Dot/Icm, qui sécrète un large répertoire d'effecteurs dans le cytosol de l'hôte. Des analyses génomiques ont révélé que la co-évolution de *L. pneumophila* avec les amibes lui avait permis d'acquérir l'information génétique permettant d'introduire de nombreux domaines protéiques de type eucaryote au sein de ces effecteurs, tels que des domaines protéines kinases de type eucaryote.

L. pneumophila possède différents types de kinases, puisque que les organismes procaryotes, tout comme les organismes eucaryotes, régulent plusieurs de leurs processus cellulaires grâce à la phosphorylation de protéines catalysée par des protéines kinases. Trois systèmes de phosphorylation différents, caractérisés par la nature du donneur de phosphate et les acides aminés modifiés, ont été identifiés chez les bactéries (Mijakovic & Macek, 2012) :

- Les systèmes à deux composants, ou phosphorelais, propres aux bactéries. Ils font intervenir deux protéines : sous l'effet d'un signal extracellulaire, la protéine kinase senseur est phosphorylée sur une histidine aux dépens de l'ATP, puis transfère le phosphate sur un aspartate de la protéine régulatrice. La protéine régulatrice phosphorylée module l'expression de gènes cibles en réponse aux signaux extracellulaires déclencheurs.
- Le système sucre / phosphoénolpyruvate phosphotransférase ou PTS. Ce complexe multienzymatique est impliqué dans l'importation de nombreux sucres et régule ainsi leurs concentrations intracellulaires en fonction des besoins de la bactérie et des ressources du milieu. Les protéines mises en jeu sont modifiées sur une histidine puis sur une cystéine au dépend du phosphoénolpyruvate.
- Les protéines kinases proches des protéines kinases eucaryotes. Ces enzymes transfèrent le groupement phosphate en position γ de l'ATP sur un nombre restreint d'acides aminés comme la sérine, la thréonine et la tyrosine.

Le premier exemple clairement établi de phosphorylation d'une protéine bactérienne sur l'un de ses résidus Ser/Thr/Tyr a été découvert en 1979, 25 ans après la découverte de la phosphorylation des protéines chez les Eucaryotes (Garnak & Reeves, 1979). Depuis lors, le séquençage des génomes a

révéla que ces enzymes étaient codées par plus d'une centaine d'espèces bactériennes différentes. Alors que les tyrosine kinases bactériennes semblent constituer une famille particulière, caractérisée par des séquences conservées entre elles, les sérine/thréonine protéines kinases (STPKs) bactériennes possèdent des domaines présentant de fortes homologues de séquence et de structure tridimensionnelle avec le domaine catalytique des protéines kinases eucaryotes.

A ce jour, le rôle biologique des STPKs bactériennes n'a pu être établi que pour un nombre restreint d'entre elles. Sur la base de leur fonction biologique, elles peuvent être séparées en deux groupes : les STPKs impliquées dans le contrôle du métabolisme bactérien, avec principalement une régulation de la division bactérienne et de la synthèse de l'enveloppe, et les STPKs participant à la virulence bactérienne (Pereira *et al.*, 2011). Dans ce dernier groupe, les STPKs peuvent soit moduler le métabolisme bactérien afin que la bactérie s'adapte aux conditions d'infection, soit directement contrôler, après sécrétion, des fonctions de leur cellule hôte. Le contrôle des voies de signalisation de la cellule hôte par les STPKs bactériennes est au centre des stratégies d'infection de plusieurs bactéries pathogènes. Le cytosquelette d'actine et la voie anti-apoptotique NF- κ B sont notamment les cibles privilégiées des STPKs bactériennes (Canova & Molle, 2014). Ainsi, YpkA de *Yersinia* spp. est un effecteur d'un SST3 qui, une fois sécrété et en présence d'actine-G, phosphoryle la petite protéine G α q, ce qui conduit à l'inhibition de la fixation de GTP sur G α q et donc à l'inactivation de cette protéine indispensable au contrôle de la GTPase RhoA. De la même manière, YpkA phosphoryle différentes protéines du cytosquelette d'actine aboutissant au final à l'inhibition de la polymérisation d'actine nécessaire à la phagocytose de la bactérie (Lee *et al.*, 2015; Navarro *et al.*, 2007). A l'inverse, la protéine kinase SteC de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium promeut la polymérisation d'actine autour de sa vacuole de phagocytose. SteC est sécrétée par le SST3 SPI-2 et phosphoryle la MAP kinase MEK, ce qui provoque un changement conformationnel activant cette kinase cellulaire et la voie de signalisation associée (Odendall *et al.*, 2012; Poh *et al.*, 2008). Par ailleurs, la protéine kinase OspG de *Shigella* spp., sécrétée elle aussi par un SST3, inhibe la voie d'activation canonique NF- κ B (Grishin *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2005). En effet, il a été montré qu'elle interagissait avec les enzymes E2 cellulaires, telles que Ubch7 et Ubch5, inhibant ainsi leur activité d'ubiquitination et bloquant par conséquent la dégradation des protéines cellulaires par le protéasome. OspG diminue en particulier la dégradation d'I κ B, ce qui conduit à la séquestration de NF- κ B dans le cytoplasme cellulaire, inhibant la transcription NF- κ B-dépendante. De même, les protéines kinases NleH1 et NleH2 des EPEC et des EHEC interagissent avec RPS3, une protéine cellulaire connue pour contrôler l'affinité de NF- κ B pour ces gènes cibles. Bien que seul l'interaction avec NleH1 ait montré diminuer la disponibilité de RPS3 dans le noyau et donc la transcription NF- κ B-dépendante, ces deux effecteurs bactériens sont impliqués dans l'inhibition de l'activité NF- κ B (Gao *et al.*, 2009; Royan *et al.*, 2010).

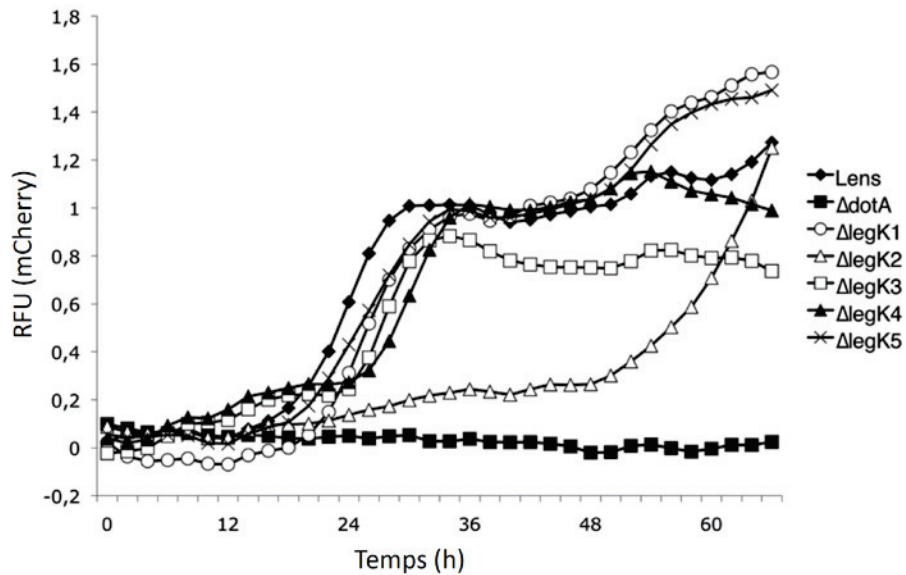


Figure 62 : Croissance intracellulaire de mutants de *L. pneumophila* dans des amibes (d'après Hervet *et al.*, 2011).

Des amibes *Acanthamoeba castellanii* sont infectées à une MOI de 10 par des bactéries *L. pneumophila* exprimant la protéine fluorescente mCherry à partir d'un plasmide. La multiplication des bactéries est automatiquement suivie par mesure de la fluorescence de la mCherry, à une excitation de 587 nm et une émission de 610 nm, toutes les 2 h pendant 66 h.

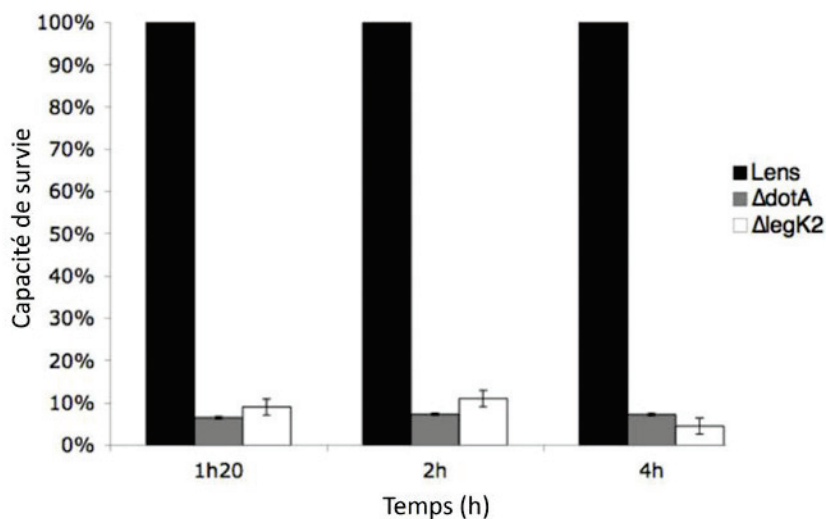


Figure 63 : Capacité de survie du mutant $\Delta legK2$ de *L. pneumophila* (d'après Hervet *et al.*, 2011).

Des amibes *Acanthamoeba castellanii* sont infectées à une MOI de 10 par la souche sauvage, le mutant avirulent $\Delta dotA$ et le mutant $\Delta legK2$ de *L. pneumophila*. Après différentes périodes de contact avec *L. pneumophila*, la monocouche de cellules est traitée pour 1 h avec de la gentamicine afin de tuer les bactéries extracellulaires adhérentes, et elle est ensuite lysée par 0,04% de TritonX100. Les bactéries intracellulaires viables sont diluées et étalées sur des boîtes BCYE afin de dénombrer les colonies. Les résultats sont exprimés en valeur relative (%) comparé au contrôle d'invasion avec la souche sauvage.

Au contraire, *Legionella pneumophila* induit la voie NF- κ B via sa protéine kinase LegK1, sécrétée par son SST4 Dot/Icm. LegK1 phosphoryle I κ B afin de libérer le facteur transcriptionnel, copiant ainsi le mécanisme cellulaire employé par IKK (Ge *et al.*, 2009).

La caractérisation du rôle des STPKs bactériennes est donc un enjeu majeur pour comprendre la virulence bactérienne. Mes travaux de thèse participent à cet objectif en caractérisant fonctionnellement la protéine kinase LegK2 de *Legionella pneumophila*. Cette étude fait suite à des travaux précédemment réalisés au laboratoire par Eva Hervet, visant à identifier et caractériser les protéines kinases de *L. pneumophila* (Hervet *et al.*, 2011). Eva a démontré que la souche Lens de cette bactérie codait cinq STPKs fonctionnelles, LegK1-5. Les quatre premières protéines kinases sont des effecteurs du SST4 Dot/Icm de *Legionella* et sont retrouvées chez les cinq souches de *L. pneumophila* séquencées à l'époque. LegK5 est, quant à elle, présente uniquement chez la souche Lens et elle ne serait pas sécrétée par le SST4 Dot/Icm. L'analyse du contexte génomique du gène *legK5* permet de proposer qu'il ait été acquis récemment par la souche Lens à la suite d'un transfert horizontal. Eva a étudié l'implication de chacune des protéines kinases au cours du cycle infectieux de *L. pneumophila*. La construction de mutant simple délété pour chacun des gènes codant une protéine kinase a révélé que LegK2 jouait un rôle clé dans la virulence de *Legionella*. Le mutant Δ *legK2* présente en effet un important retard de répllication intracellulaire, ce qui est assez rare pour les mutants de gènes d'effecteurs, en raison de leur forte redondance fonctionnelle (figure 62) (Hervet *et al.*, 2011). L'étape du cycle infectieux altérée pour le mutant Δ *legK2* a ensuite été caractérisée. La protéine kinase LegK2 ne participe pas à l'étape d'entrée de la bactérie, mais semble indispensable à sa survie précoce (figure 63). La présence de LegK2 est également nécessaire au recrutement du RE sur la vacuole de *Legionella*. Un crible double hybride en levure contre une banque d'ADNc de cellules humaines a finalement été réalisé pour identifier la ou les cibles cellulaires de LegK2. Une vingtaine de protéines ont ainsi été identifiées, parmi lesquelles des protéines du cytosquelette d'actine. Des interactants identifiés de façon reproductible et indépendante étaient les sous-unités ARPC1B et ARP3 du complexe ARP2/3. Par ailleurs, des essais de phosphorylation *in vitro* sur des puces protéiques regroupant 9000 protéines recombinantes humaines ont révélé que LegK2 était capable de phosphoryler la sous-unité ARPC1B. Mes travaux ont donc consisté à établir si le complexe nucléateur d'actine ARP2/3, et donc le cytosquelette d'actine, pouvaient être ciblés par la protéine kinase LegK2 de *Legionella pneumophila* au cours de son cycle infectieux.

Résultats

Afin d'identifier la ou les cibles de la protéine kinase LegK2 de *L. pneumophila*, un crible double-hybride en levure avait été entrepris avant mon arrivée. Les protéines humaines retrouvées le plus fréquemment à la suite de ce crible étaient les sous-unités ARPC1B et ARP3 du complexe nucléateur d'actine ARP2/3. Mon but était donc d'étudier une potentielle régulation du complexe ARP2/3 par LegK2, permettant ainsi à *Legionella* un détournement du cytosquelette d'actine cellulaire. Ces travaux, résumés ci-dessous, ont fait l'objet d'une publication dans le journal mBio (Michard *et al.*, 2015).

Tout d'abord, la validation des interactions entre LegK2 et les sous-unités ARPC1B et ARP3 du complexe ARP2/3 a été réalisée par double-hybride binaire en levure, ainsi que par co-localisation et GST pull-down après expression ectopique en cellules de mammifère (figure 1 de la publication). La récente découverte du contrôle de l'activité du complexe ARP2/3 par phosphorylation nous a ensuite incités à regarder si le complexe ARP2/3 était un substrat de la protéine kinase LegK2. Des tests de phosphorylation *in vitro* de complexe ARP2/3 purifié à partir d'amibe *Acanthamoeba castellanii*, et des tests de phosphorylation *in vivo* après co-transfection de cellules de mammifère HEK293T avec des vecteurs exprimant respectivement les sous-unités ARPC1B ou ARP3 et LegK2, ont en effet démontré que la protéine kinase bactérienne LegK2 était capable de phosphoryler le complexe ARP2/3 (figure 2 de la publication). Une collaboration avec le Dr. Lawrence L. LeClaire (Université de South Alabama, USA) a été mise en place afin de tester l'effet de la phosphorylation LegK2-dépendante sur l'activité nucléatrice d'actine du complexe ARP2/3. Aucun changement, *i.e.* ni stimulation ni inhibition, de l'activité du complexe n'a été observé *in vitro* en présence de LegK2 (figure S1 de la publication). Ce résultat est peut-être lié au fait que seule une faible proportion du complexe ARP2/3 était phosphorylée dans nos conditions expérimentales, comme l'a révélé une analyse en spectrométrie de masse. A l'inverse, un effet de LegK2 sur ARP2/3 a pu être observé *in vivo*. En effet, LegK2 inhibe la polymérisation des fibres d'actine de cellules de mammifère transfectées avec un vecteur exprimant la kinase bactérienne, et cet effet est lié à l'activité kinase de LegK2 puisque des cellules exprimant un mutant catalytique de LegK2, ne présentent pas le même phénotype (figures 3A et 3B de la publication). Afin d'établir si cet effet de LegK2 sur le cytosquelette d'actine était dépendant du complexe ARP2/3, nous avons, en collaboration avec l'équipe du Pr. Pascale Cossart (Institut Pasteur, Paris, France), observé l'effet de LegK2 sur l'entrée et la formation des « comètes d'actine » de *Listeria monocytogenes*, deux évènements connus pour impliquer ce nucléateur d'actine. Pour cela, des cellules HeLa ont été transfectées avec un vecteur exprimant la protéine kinase LegK2 active ou son mutant catalytique, puis infectées par *L. monocytogenes*. Nous

avons alors observé que l'activité kinase de LegK2 inhibait drastiquement ces deux évènements (figures 3C, 3D et 3F de la publication). Enfin, l'inhibition du complexe ARP2/3 par LegK2 a été établie au cours du cycle infectieux de *L. pneumophila*. Nous avons en effet observé que LegK2, une fois sécrété par le SST4 Dot/Icm, se localisait à la surface de la vacuole contenant les légionelles (LCV) à 15 min post-infection, et qu'elle inhibait la polymérisation locale d'actine autour des LCVs (figure 4 de la publication). Au vu du défaut de survie précoce du mutant $\Delta legK2$ observé par Eva Hervet, et du rôle largement décrit du cytosquelette d'actine dans le trafic endocytique, nous avons émis l'hypothèse que le blocage de la polymérisation d'actine sur la LCV pouvait induire une inhibition de la fusion des endosomes avec la LCV. Un marquage de la V-ATPase a ainsi révélé que LegK2 empêchait, au moins en partie, la fusion de la LCV avec les composants endocytiques, évitant donc la dégradation de la bactérie (figure 5 de la publication). Finalement, nous avons confirmé que l'inhibition de la polymérisation d'actine sur les LCVs et de la fusion des endosomes était bien ARP2/3-dépendante. Nous avons en effet observé qu'un inhibiteur chimique spécifique de l'activité nucléatrice d'actine d'ARP2/3 conduisait à la réversion des phénotypes observés au cours de l'infection par le mutant $\Delta legK2$ (figure 6 de la publication).

The *Legionella* Kinase LegK2 Targets the ARP2/3 Complex To Inhibit Actin Nucleation on Phagosomes and Allow Bacterial Evasion of the Late Endocytic Pathway

Céline Michard,^{a,b,c,d,e} Daniel Sperandio,^{a,b,c,d,e} Nathalie Baillo,^{a,b,c,d,e} Javier Pizarro-Cerdá,^{g,h,i} Lawrence LeClaire,^j Elise Chadeau-Argaud,^{b,c,d,e,f} Isabel Pombo-Grégoire,^{b,c,d,e,f} Eva Hervet,^{a,b,c,d,e} Anne Vianney,^{a,b,c,d,e} Christophe Gilbert,^{a,b,c,d,e} Mathias Faure,^{b,c,d,e,f} Pascale Cossart,^{g,h,i} Patricia Doublet^{a,b,c,d,e}

CIRI, International Center for Infectiology Research, Legionella Pathogenesis Group, Université de Lyon, Lyon, France^a; INSERM, U1111, Lyon, France^b; École Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France^c; Université Lyon 1, Centre International de Recherche en Infectiologie, Lyon, France^d; CNRS, UMR5308, Lyon, France^e; CIRI, International Center for Infectiology Research, Autophagy Infections Immunity Group, Université de Lyon, Lyon, France^f; Institut Pasteur, Unité des Interactions Bactéries-Cellules, Paris, France^g; INSERM, U604, Paris, France^h; INRA, USC2020, Paris, Franceⁱ; Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of South Alabama, Mobile, Alabama, USA^j

ABSTRACT *Legionella pneumophila*, the etiological agent of legionellosis, replicates within phagocytic cells. Crucial to biogenesis of the replicative vacuole is the Dot/Icm type 4 secretion system, which translocates a large number of effectors into the host cell cytosol. Among them is LegK2, a protein kinase that plays a key role in *Legionella* infection. Here, we identified the actin nucleator ARP2/3 complex as a target of LegK2. LegK2 phosphorylates the ARPC1B and ARP3 subunits of the ARP2/3 complex. LegK2-dependent ARP2/3 phosphorylation triggers global actin cytoskeleton remodeling in cells, and it impairs actin tail formation by *Listeria monocytogenes*, a well-known ARP2/3-dependent process. During infection, LegK2 is addressed to the *Legionella*-containing vacuole surface and inhibits actin polymerization on the phagosome, as revealed by legK2 gene inactivation. Consequently, LegK2 prevents late endosome/lysosome association with the phagosome and finally contributes to remodeling of the bacterium-containing phagosome into a replicative niche. The inhibition of actin polymerization by LegK2 and its effect on endosome trafficking are ARP2/3 dependent since it can be phenocopied by a specific chemical inhibitor of the ARP2/3 complex. Thus, LegK2-ARP2/3 interplay highlights an original mechanism of bacterial virulence with an unexpected role in local actin remodeling that allows bacteria to control vesicle trafficking in order to escape host defenses.

IMPORTANCE Deciphering the individual contribution of each Dot/Icm type 4 secretion system substrate to the intracellular life-style of *L. pneumophila* remains the principal challenge in understanding the molecular basis of *Legionella* virulence. Our finding that LegK2 is a Dot/Icm effector that inhibits actin polymerization on the *Legionella*-containing vacuole importantly contributes to the deciphering of the molecular mechanisms evolved by *Legionella* to counteract the endocytic pathway. Indeed, our results highlight the essential role of LegK2 in preventing late endosomes from fusing with the phagosome. More generally, this work is the first demonstration of local actin remodeling as a mechanism used by bacteria to control organelle trafficking. Further, by characterizing the role of the bacterial protein kinase LegK2, we reinforce the concept that posttranslational modifications are key strategies used by pathogens to evade host cell defenses.

Received 3 March 2015 Accepted 8 April 2015 Published 5 May 2015

Citation Michard C, Sperandio D, Baillo N, Pizarro-Cerdá J, LeClaire L, Chadeau-Argaud E, Pombo-Grégoire I, Hervet E, Vianney A, Gilbert C, Faure M, Cossart P, Doublet P. 2015. The *Legionella* kinase LegK2 targets the ARP2/3 complex to inhibit actin nucleation on phagosomes and allow bacterial evasion of the late endocytic pathway. *mBio* 6(3): e00354-15. doi:10.1128/mBio.00354-15.

Editor Michele S. Swanson, University of Michigan

Copyright © 2015 Michard et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution-Noncommercial-ShareAlike 3.0 Unported license](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/), which permits unrestricted noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Address correspondence to Patricia Doublet, patricia.doublet@univ-lyon1.fr.

Legionella pneumophila is the most common etiological agent of severe legionellosis pneumonia in humans. Pathogenic *Legionella* strains emerge in the environment after intracellular multiplication in amoebae. Bacteria are disseminated by water aerosols and, when inhaled into the lungs, engulfed by alveolar macrophages. Within environmental phagocytic cells and human macrophages, a functional Dot/Icm type 4 secretion system (T4SS) and the approximately 300 proteins it secretes (1) are absolutely required for *Legionella* to reroute its phagosome and trigger the biogenesis of a *Legionella*-containing vacuole (LCV), a rough en-

doplasmic reticulum-like compartment permissive for its intracellular replication (2–4). Recently, important investigative efforts have begun to decipher the individual contributions of protein effectors to the *Legionella* intracellular life-style. Most of this work has relied on the construction of deletion mutants for the corresponding T4SS substrates. However, because of functional redundancy between effectors, single gene deletions very rarely result in a virulence defect; consequently, to date, only a few T4SS effectors have been functionally characterized (for reviews, see references 5 to 9). Among these are proteins that interfere with

small GTPases of the early secretory cellular pathway (10–17), the endocytic pathway (18), or the retrograde vesicle trafficking (19) or target the innate immune response and host cell apoptosis pathways (7, 20, 21).

Many Dot/Icm-secreted effectors display distinctive eukaryotic domains that include protein kinase domains (22, 23). *In silico* analysis of effector sequences and *in vitro* phosphorylation assays with purified proteins identified five functional protein kinases, designated LegK1 to -5, that are encoded by the epidemic *L. pneumophila* Lens strain (24). All of the *Legionella* protein kinases except LegK5 are Dot/Icm effectors. Of these kinases, LegK1 has been shown to induce activation of the NF- κ B transcription factor and, consequently, genes with antiapoptotic functions (25). *In vitro* and cell-free reconstitution assays have shown that LegK1 phosphorylates the NF- κ B inhibitor I κ B. However, it is noteworthy that despite the role of LegK1 in activating the NF- κ B pathway, a legK1 deletion mutant does not present a virulence defect. In contrast to LegK1, we previously reported that inactivation of the legK2 gene resulted in a significant decrease in *L. pneumophila* virulence toward amoeba and macrophages, highlighting the key role of this effector in *Legionella* virulence. More precisely, the legK2 mutant poorly evades endocytic degradation and results in delayed intracellular replication. Because a kinase-dead legK2 mutant exhibits the same virulence defects as the deletion mutant, we concluded that the protein kinase activity of LegK2 is directly involved in evading host cell defenses and in the establishment of a replicative niche (24).

Here, we aimed to determine the precise function of LegK2-dependent protein phosphorylation during *L. pneumophila* infection. We show that LegK2 interacts with the ARPC1B and ARP3 subunits of the actin nucleator ARP2/3 complex. We demonstrate that LegK2 phosphorylates these subunits *in vitro* and in cells. Finally, we establish that the LegK2-ARP2/3 interplay inhibits actin polymerization on the LCV and interferes with late endosome/lysosome trafficking toward the LCV. Thus, we show for the first time that host cell actin remodeling is essential for *Legionella* to perturb host cell endocytic vesicle trafficking and allow bacteria to escape cell defenses.

RESULTS

LegK2 specifically interacts with host cell ARP2/3 complex subunits. To identify host cell proteins that interact with LegK2, we performed yeast two-hybrid screening. The construct pGBKT7-legK2, which encodes LegK2 fused to the DNA binding domain of GAL4 (GAL4BD-LegK2), was transformed into *Saccharomyces cerevisiae* strain AH109. The toxicity/self-activation of this construct was evaluated by mating yeast strain AH109(pGBKT7-legK2) and reporting yeast strain Y187 for histidine auxotrophy, transformed by the empty vector pACT2. While no toxicity was detected, as indicated by the growth of the diploid (Fig. 1A, SD-W-L, lane 6), self-activation was observed. Therefore, we made use of a competitive inhibitor of the reporter *HIS3* gene product 3-aminotriazole (3AT). When AH109(pGBKT7-legK2) was grown in the presence of 3AT, self-activation was decreased but not completely abolished (Fig. 1A, SD-W-L-H+3AT, lane 6). The Y187 yeast strain transformed by a human normalized cDNA spleen library cloned into pACT2 was mated with AH109(pGBKT7-legK2), and diploids were screened for histidine auxotrophy in the presence of 10 mM 3AT. DNA sequences fused to the transcription-activating domain of GAL4 in vector pACT2 in the

selected clones were amplified by PCR and sequenced. Reproducibly, several candidates for interaction with LegK2 were proteins involved in actin cytoskeleton assembly. Because the legK2 mutant phenotype alters host cell vesicle trafficking during infection, particular attention was given to proteins of this family, which included ARP3 and ARPC1B subunits of the actin filament nucleator ARP2/3 complex.

To confirm that ARP3 and ARPC1B interact with LegK2, cDNAs from each of these two genes, named ACTR3 and ARPC1B, respectively, were cloned into vector pACT2 and transformed into reporting yeast strain Y187. Y187(pACT2-ACTR3) and Y187(pACT2-ARPC1B) were mated with AH109(pGBKT7-legK2), and diploids were assayed for histidine auxotrophy in the presence of 10 mM 3AT. Both diploids were able to grow without histidine (Fig. 1A, SD-W-L-H+3AT, lanes 2 and 4), which confirms the interactions between LegK2 and ARP3 and ARPC1B subunits. To determine if the interactions between LegK2 and ARP3 or ARPC1B subunits are specific, similar binary yeast two-hybrid assays were performed with LegK1 from *L. pneumophila*, which is known to subvert the host cell NF- κ B pathway independently of ARP3/ARPC1B subunits. The AH109(pGBKT7-legK1) strain was constructed and then mated with Y187(pACT2-ACTR3) and Y187(pACT2-ARPC1B). Diploids could not grow without histidine (Fig. 1A, SD-W-L-H+3AT, lanes 1 and 3), which indicates that LegK1 does not interact with these ARP2/3 complex subunits. Together, these results strongly suggest that LegK2 interactions with ARP3 and ARPC1B subunits are specific.

Next, we investigated interactions between LegK2 and ARP3/ARPC1B subunits in mammalian cells by affinity copurification. Vectors pDEST27-legK2 and pCI-Neo3Flag-ACTR3 or -ARPC1B were constructed to express N-terminally glutathione S-transferase (GST)-tagged LegK2 and N-terminally Flag-tagged ARP3 or ARPC1B, respectively, in mammalian cells. HEK293T cells were cotransfected with these vectors, and GST-LegK2 was purified with a glutathione-agarose matrix. We found that GST-LegK2 (90 kDa) was expressed and detected 24 h posttransfection and that Flag-tagged ARPC1B (45 kDa), but not Flag-tagged ARP3, was copurified with the *Legionella* protein kinase (Fig. 1B). The same experiment was performed with a vector expressing the kinase-dead variant GST-LegK2_{K112M}, where the invariant lysine essential for donor-ATP binding is substituted. As expected, ARPC1B was also copurified with this catalytic variant of LegK2. As ARPC1B was not purified with GST, these data confirm that LegK2 specifically interacts with the ARPC1B subunit of the ARP2/3 complex in mammalian cells. Regarding ARP3, we propose that the interaction between LegK2 and ARP3 is too weak and/or transient to be detected by affinity copurification under our conditions.

The subcellular localization of the bacterial protein kinase LegK2 and ARP2/3 subunits was analyzed after transfection into HEK293T cells. pDEST27-legK2- or -legK1- and pCI-Neo3Flag-ACTR3- or -ARPC1B-cotransfected fibroblasts were stained with anti-GST and anti-Flag antibodies to detect GST-LegK2/LegK1 and Flag-ARP3/ARPC1B, respectively (Fig. 1C). Both antibodies labeled the cytoplasm and periphery of cells with similar staining patterns when cells were cotransfected with pDEST27-legK2 and pCI-Neo3Flag-ACTR3 or -ARPC1B, while anti-GST labeling in cells cotransfected with the empty vector or the LegK1 expressing vector was diffused in the cell. These observations suggest that LegK2 specifically colocalizes with ARPC1B and ARP3. To quan-

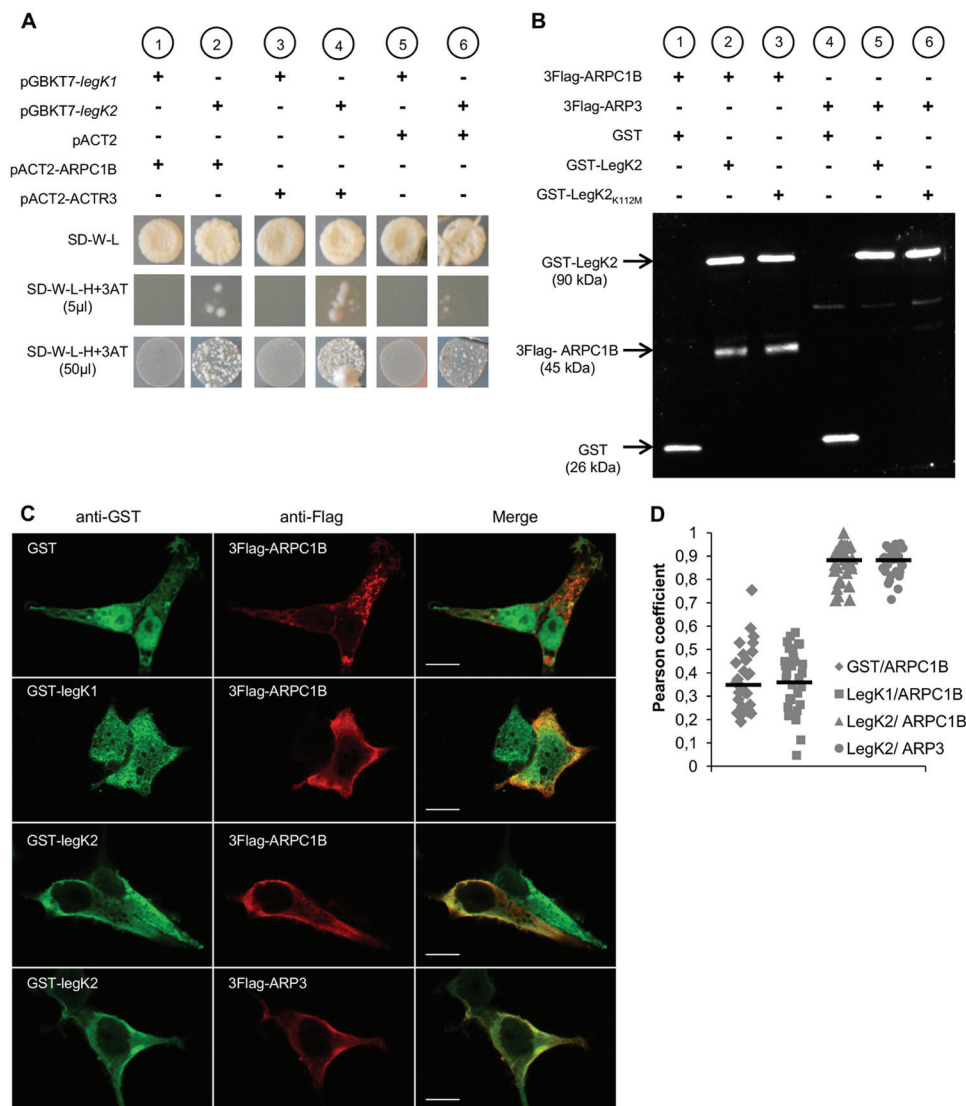


FIG 1 LegK2 interacts with ARPC1B and ARP3 subunits of the ARP2/3 complex. (A) Yeast two-hybrid assays of *L. pneumophila* protein kinase LegK1/LegK2 and ARPC1B/ARP3 subunits of the human ARP2/3 complex. Diploids from the mating of AH109(pGBKT7-*legK1*) or AH109(pGBKT7-*legK2*) with Y187(pACT2), Y187(pACT2-ARPC1B), or Y187(pACT2-ACTR3) were grown on SD medium without tryptophan (-W) or leucine (-L). Histidine auxotrophy was tested by plating 5 or 50 µl of diploids on SD-W-L medium without histidine (-H) in the presence of 10 mM 3-AT. (B) Affinity copurification of Flag-tagged ARP2/3 subunits with GST-tagged LegK2 protein. HEK293T cells were cotransfected with pDEST27, pDEST27-*legK2*, or pDEST27-*legK2*_{K112M} and pCI-Neo3Flag-ARPC1B or -ACTR3. GST, GST-tagged LegK2, or LegK2_{K112M} was purified on glutathione-agarose 4B, and purified fractions were immunoblotted with both anti-GST and anti-Flag antibodies. (C) Cellular localization of ARPC1B/ARP3 and LegK2/LegK1 proteins in HEK293T cells cotransfected with pDEST27, pDEST27-*legK2*, or -*legK1* and pCI-Neo3Flag-ARPC1B or -ACTR3. The GST, GST-LegK2, and GST-LegK1 proteins were detected by immunofluorescence with anti-GST antibodies (green), and 3Flag-ARPC1B and 3Flag-ARP3 were detected with anti-Flag antibodies (red). Scale bars, 10 µm. (D) Quantitation of colocalization by Pearson coefficient. The Pearson coefficient was determined with the JACoP plugin of the ImageJ software and is expressed as the mean value calculated for 30 cells.

to quantify the degree of colocalization of GST-tagged LegK2 and Flag-tagged ARP3/ARPC1B, we calculated the Pearson overlap coefficient for each antibody. Pearson coefficients of 0.87 for both ARPC1B and ARP3 support colocalization with LegK2 and are consistent with a physiological relevance of the interactions between LegK2 and the ARP2/3 complex subunits in mammalian cells (Fig. 1D).

Bacterial protein kinase LegK2 phosphorylates ARP3 and ARPC1B subunits. Because LegK2 specifically interacts with ARP3 and ARPC1B subunits and as ARP3 and ARPC1B had been

previously described to be phosphorylated on threonine residues in mammalian cells (26–28), we investigated whether either protein is a substrate of the bacterial protein kinase LegK2. The ARP2/3 complex was purified from the amoeba *Acanthamoeba castellanii* (Fig. 2A, lanes 1 and 6) and dephosphorylated by the dual-specificity Antarctic phosphatase (Fig. 2A, lanes 2 and 7). The dephosphorylated ARP2/3 complex was then incubated in the presence of ATP with purified recombinant GST-LegK2 or its kinase-dead variant GST-LegK2_{K112M}. Proteins were separated by SDS-PAGE and probed with antiphosphothreonine antibodies.

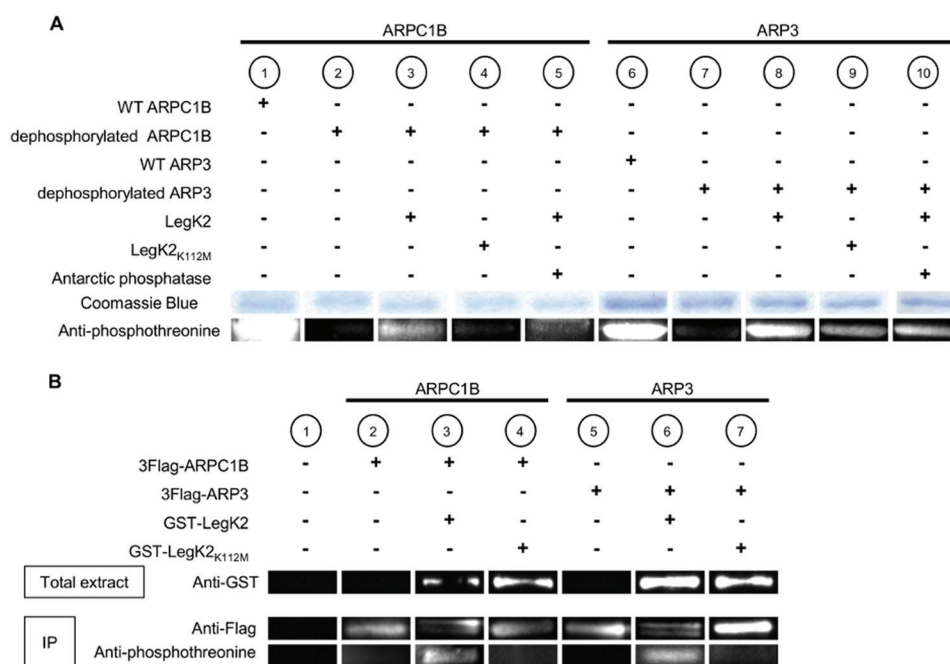


FIG 2 Protein kinase LegK2 phosphorylates ARPC1B and ARP3 subunits. (A) *In vitro* phosphorylation assays of ARPC1B and ARP3 subunits by LegK2 detected by Western blot assay with antiphosphothreonine antibodies. The ARP2/3 complex purified from *A. castellanii* (lanes 1 and 6) and dephosphorylated (lanes 2 to 5 and 7 to 10) was incubated with purified GST-LegK2 (lanes 3, 5, and 8, 10) or its catalytic variant GST-LegK2_{K112M} (lanes 4 and 9) in the presence of 100 μ M ATP. Where indicated (lanes 5 and 10), ARP2/3 was further incubated with dual-specificity Antarctic phosphatase. ARP2/3 complex subunits were separated by SDS-PAGE, stained with Coomassie blue, or detected with antiphosphothreonine antibodies. (B) *In vivo* phosphorylation assays of ARPC1B and ARP3 subunits by LegK2. HEK293T cells were transfected with pCI-Neo3Flag-ARPC1B or -ACTR3 or cotransfected with pCI-Neo3Flag-ARPC1B or -ACTR3 and pDEST27-legK2 or -legK2_{K112M}. 3Flag-ARPC1B and 3Flag-ARP3 were immunoprecipitated with anti-Flag antibodies. Expression of GST-LegK2 and GST-LegK2_{K112M} in the total extract was checked by Western blot assay with anti-GST antibodies (lanes 3 and 4 and lanes 6 and 7). Immunoprecipitation (IP) of 3Flag-ARPC1B and 3Flag-ARP3 was checked by Western blot assay with anti-Flag antibodies (lanes 2 to 7). The phosphorylation level of 3Flag-ARPC1B and 3Flag-ARP3 was detected with antiphosphothreonine antibodies. Protein bands have been cut to present samples in an order that matches our comments in the text.

Western blot assays revealed that both ARP3 and ARPC1B were phosphorylated *in vitro* by the catalytically active enzyme GST-LegK2 (Fig. 2A, lanes 3 and 8), while no or weak phosphorylation was observed with the kinase-dead mutant (Fig. 2A, lanes 4 and 9). Antiphosphothreonine immunolabeling of ARP3 and ARPC1B subunits decreased after incubation of the complex with Antarctic phosphatase, thus demonstrating that ARP3 and ARPC1B were *in vitro* modified by LegK2-catalyzed phosphorylation (Fig. 2A, lanes 5 and 10).

In order to confirm the physiological relevance of ARP2/3 subunit phosphorylation, the ARP3 and ARPC1B phosphorylation states were analyzed in mammalian cells ectopically expressing the legK2 gene or the kinase-dead variant. HEK293T cells were cotransfected with pDEST27-legK2 or -legK2_{K112M} and pCI-Neo3Flag-ACTR3 or -ARPC1B. The GST-tagged protein kinases were well expressed at 24 h posttransfection, as revealed by immunoblot assays of whole-cell extracts with anti-GST antibodies (Fig. 2B, lanes 3 and 4 and lanes 6 and 7). Flag-tagged ARP2/3 subunits were immunoprecipitated with anti-Flag antibodies and then detected with anti-Flag or antiphosphothreonine antibodies. In immunoblot assays, we found that the ARP3 and ARPC1B proteins, well expressed and immunopurified in all of the samples, appeared as two bands with close apparent molecular weights in cells expressing LegK2 kinase (Fig. 2B, lanes 3 and 6). We next examined whether these two bands represent two distinct phosphorylation states of ARP3 and ARPC1B. We found that in the

presence of LegK2, antibodies to phosphothreonine labeled ARP3 and ARPC1B (Fig. 2B, lanes 3 and 6). When cells were cotransfected with the LegK2_{K112M}-expressing vector, a single Flag-tagged band was detected with anti-Flag antibodies while phosphorylated forms of ARP3 and ARPC1B were not detected with antiphosphothreonine antibodies (Fig. 2B, lanes 4 and 7). Thus, the bacterial protein kinase LegK2 is able to phosphorylate ARP3 and ARPC1B subunits of the ARP2/3 complex in mammalian cells.

LegK2 is an inhibitor of the ARP2/3 complex *in vivo*. The effect of LegK2-dependent ARP2/3 phosphorylation on the actin nucleation activity of the complex was first investigated by measuring actin polymerization *in vitro* with the purified ARP2/3 complex and in mammalian cells. Proteins named nucleation-promoting factors (NPFs) are recognized as the primary activators of the ARP2/3 complex for actin nucleation. However, a recently identified requirement for activation of nucleation is phosphorylation of ARP2/3 subunits, in particular, the ARPC1B and ARP2 subunits (26–28). We used pyrenyl actin assembly assays to measure actin polymerization in the presence of the purified dephosphorylated ARP2/3 complex and GST-LegK2. No significant increase in actin polymerization was detected (see Fig. S1 in the supplemental material). On the basis of this finding, we hypothesized that LegK2 does not phosphorylate the sites of ARP2/3 subunits shown to activate the complex. To detect a putative inhibitory effect of LegK2-dependent ARP2/3 phosphorylation on actin nucleation, actin polymerization was then assessed in the presence

of the purified endogenous phosphorylated ARP2/3 complex and GST-LegK2. Our data showed that rates of actin nucleation and polymerization were not modulated by LegK2 (see Fig. S1). Importantly, mass spectrometry analysis of the *in vitro* phosphorylated ARP2/3 samples did not allow the detection of phosphorylated peptides; these data highlight that only a very small fraction of the ARP2/3 complex was phosphorylated under these conditions, which could explain the lack of *in vitro* effect of LegK2-dependent ARP2/3 phosphorylation on actin ARP2/3 nucleation activity.

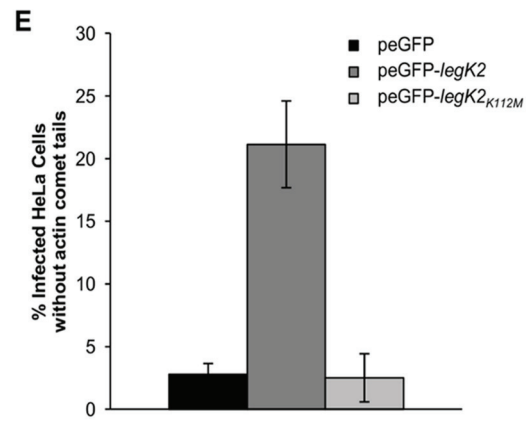
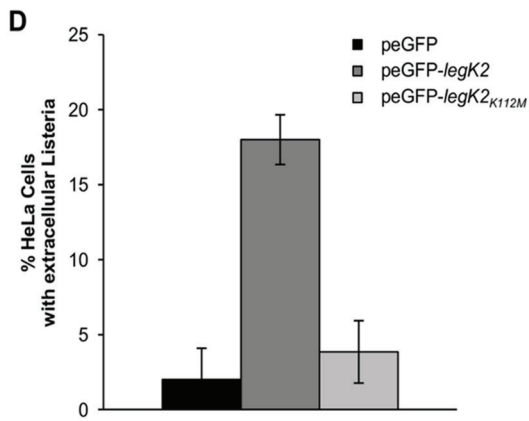
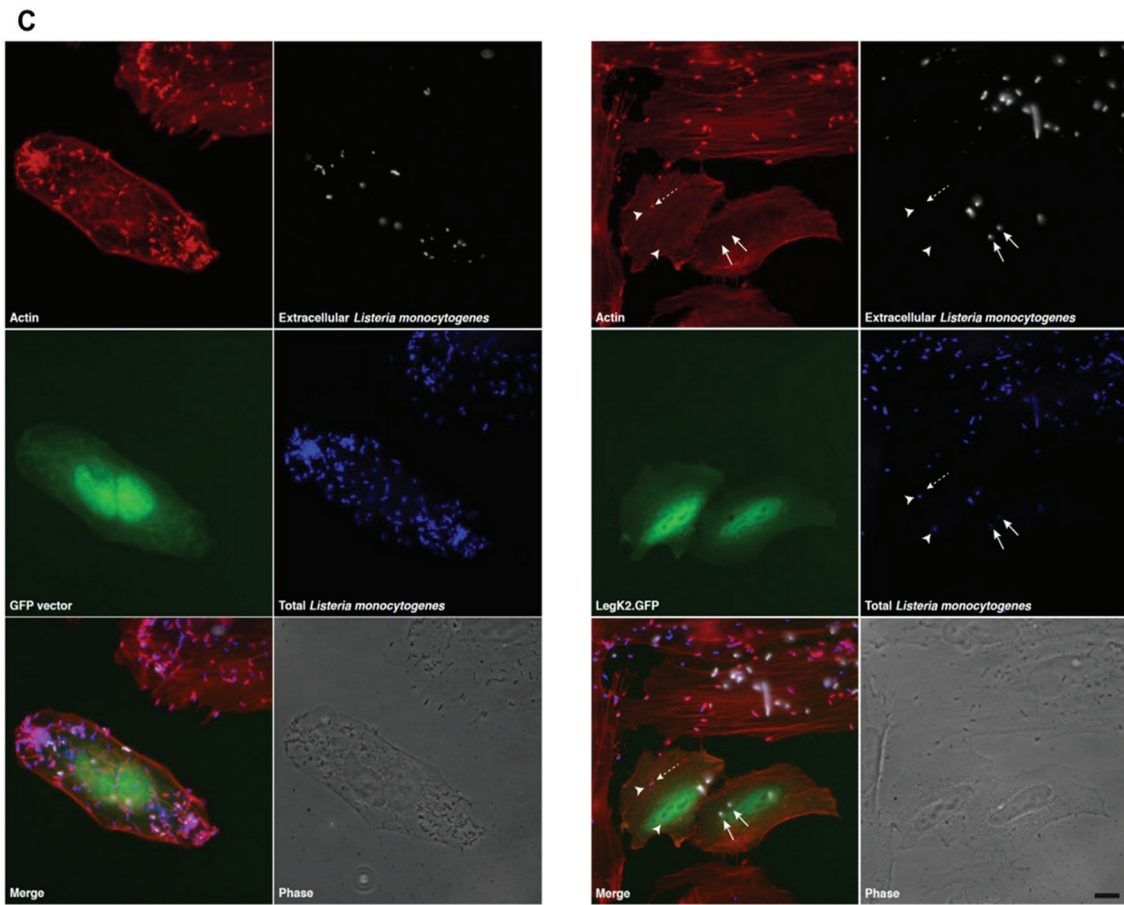
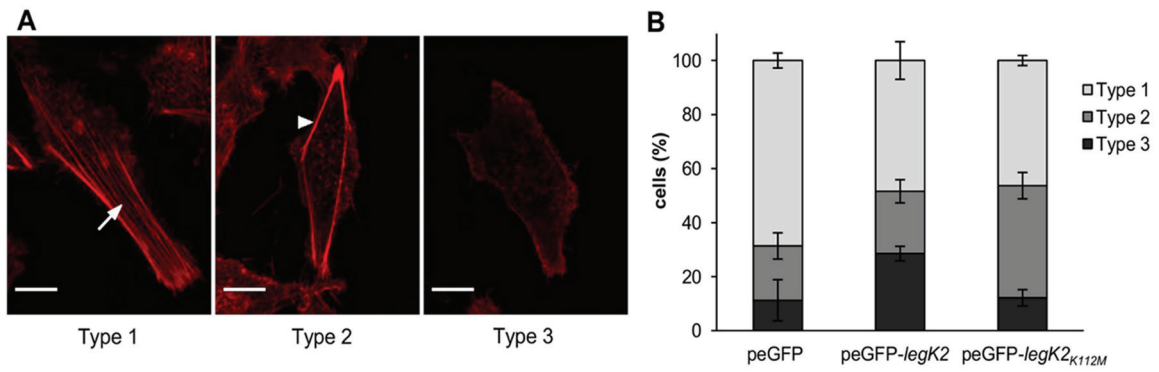
To address whether actin nucleation could be controlled by LegK2-dependent ARP2/3 phosphorylation in an *in vivo* context, actin polymerization was analyzed in human epithelial HeLa cells transfected with the empty vector peGFP or the peGFP-legK2 or peGFP-legK2_{K112M} vector, which encodes GFP and an N-terminally GFP-fused LegK2 protein or its kinase-dead variant, respectively. Transfected cells were analyzed by confocal microscopy for F-actin labeling. Three types of cell labeling were categorized according to actin filament distribution: with long, straight actin fibers that are contained within the body of the cell (type 1), with reduced actin fibers that localize only at the periphery of the cell (type 2), and without noticeable actin fibers (type 3) (Fig. 3A). A total of 27.8% of the GFP-LegK2-expressing cells exhibited a type 3 phenotype, which is more than the 11 and 12% of type 3 phenotype observed among cells transfected with the empty vector and the vector expressing kinase-dead variant GFP-LegK2_{K112M}, respectively (Fig. 3B). Thus, expression of active LegK2 protein kinase in mammalian cells inhibits actin fiber polymerization. Interestingly, expression of the kinase-dead variant resulted in an intermediate phenotype of reduced actin fibers, since cells transfected with the kinase-dead variant are characterized by a shift from type 1 to type 2, unlike empty-vector-transfected cells (41.5% of the cells are type 2 for the catalytic variant versus 20% for the empty vector). As previously proposed for other protein kinases (29–32), it can be assumed that the inactive form of LegK2 is still able to interact with ARP2/3 and that overexpression of this inactive variant results in the titration of its substrate, thus interfering with the cell actin cytoskeleton dynamic. Together, these data strongly support the notions that expression of LegK2 in mammalian cells inhibits the formation of actin stress fibers and that the protein kinase activity of LegK2 is partially responsible for this inhibition.

To establish whether LegK2 inhibits actin polymerization in an ARP2/3-dependent manner, we monitored the effect of LegK2 on two well-known ARP2/3-dependent processes, namely, cell invasion and actin comet tail formation by *Listeria*. Mammalian cells transfected with the empty peGFP vector or the peGFP-legK2 vector were infected with *Listeria monocytogenes* for 5 h. Actin was labeled with fluorescent phalloidin, and cells were processed for a differential immunolabeling protocol in which extracellular bacteria were differentiated from total ones (Fig. 3C). Cell transfection with peGFP does not hamper bacterial invasion, as reflected by the low number of extracellular versus intracellular bacteria (Fig. 3C, white versus blue channels). When quantified, only 2% of the cells displayed extracellular bacteria (Fig. 3D). Actin comet tail formation also takes place efficiently in GFP-expressing cells (Fig. 3C, red channel), since less than 3% of the infected cells do not exhibit these actin structures (Fig. 3E). In contrast, expression of GFP-LegK2 increases the number of extracellular bacteria (Fig. 3C, arrows) and reduces the number of intracellular ones

(Fig. 3C, arrowhead), resulting in about 18% of the cells displaying extracellular *L. monocytogenes* (Fig. 3D). Moreover, in >20% of the infected GFP-LegK2-expressing cells, no actin comet tails are detected (Fig. 3E). These effects depend on the protein kinase activity of LegK2, since expression of the kinase-dead variant resulted in only 3.8% of the cells displaying extracellular bacteria (Fig. 3D) and 2.5% of the infected cells exhibiting no actin comet tail (Fig. 3E), which is not significantly different from what is observed in cells transfected with the empty vector peGFP. Together, these results therefore indicate that ectopic expression of active LegK2 protein kinase in mammalian cells inhibits ARP2/3-dependent cell invasion and actin comet tail formation by *L. monocytogenes*, leading to the conclusion that in cells, the protein kinase activity of LegK2 is an inhibitor of the actin nucleation activity of the ARP2/3 complex.

LegK2 localizes to the LCV. To get insight into the role of LegK2 during *Legionella* infection, we first analyzed the dynamics of LegK2 localization in infected cells, i.e., after translocation into the host cell cytosol. To examine LegK2 localization, the amoeba *Dictyostelium discoideum* was infected with an *L. pneumophila* legK2 mutant strain transformed with a vector encoding N-terminally hemagglutinin (HA)-tagged LegK2. This strain does not encode the endogenous LegK2 protein that might compete with tagged LegK2 for translocation, localization, or function. Bacteria were immunolabeled with an antibody directed against the major outer membrane protein (MOMP) of *L. pneumophila*, and HA-tagged LegK2 protein was revealed with an anti-HA antibody at 0, 5, 10, 15, 20, 30, and 60 min after bacterium-amoeba contact (Fig. 4A and B). As a control, *D. discoideum* amoebae were also infected with the *L. pneumophila* dotA mutant strain transformed with the same vector encoding HA-tagged LegK2. As expected, HA-tagged LegK2 protein was not detected when amoebae were infected with the dotA mutant strain, confirming that LegK2 translocation is Dot/Icm dependent (Fig. 4A). In contrast, HA-tagged LegK2 protein was found on the legK2 mutant strain LCVs immediately after bacterial entry and with an increased frequency up to 15 min postcontact before disappearance and was only slightly detectable 20 min postcontact (Fig. 4B). This time-dependent decrease may be due to rapid proteolytic degradation. These results suggest that upon *L. pneumophila* infection, LegK2 function is very transient and localized mostly on LCVs. Because the ARP2/3 complex was identified by proteomic analysis on the nascent *Legionella*-containing phagosome (33–35), the transient localization of LegK2 on the LCV supports a direct effect of LegK2 on ARP2/3 activity and consequently on actin polymerization on the LCV.

LegK2 inhibits actin polymerization on the LCV. To address the question of actin cytoskeleton remodeling during *Legionella* infection, the amoeba *D. discoideum* was infected with the mCherry-producing *L. pneumophila* Lens strain and the dotA and legK2 deletion mutant strains and polymerized actin was visualized with phalloidin-fluorescein isothiocyanate (FITC) at 15 min postinfection (Fig. 4C). Infection with *L. pneumophila* does not trigger significant cytoskeleton reorganization in host cells but most likely induces local actin remodeling on the LCV. While less than 2% of the wild-type (WT) bacterium-containing vacuoles were labeled with phalloidin, more than 20% of the dotA mutant-containing vacuoles were actin positive (Fig. 4D). Strikingly, 14.8% of the legK2 mutant-containing vacuoles were labeled with phalloidin, a percentage that is significantly higher than that for



WT LCVs (Fig. 4D). To confirm that this effect is due to the legK2 deletion, a legK2 gene-expressing vector was introduced into the bacterium and found to complement the deletion. In complemented cells, only 3.4% of the LCVs were phalloidin positive. In contrast, the kinase-dead legK2-expressing vector (plegK2cat) did not complement the legK2 deletion since 13.8% of the LCVs were phalloidin positive (Fig. 4D). Thus, LCVs containing an avirulent mutant impaired for the T4SS, such as the dotA mutant or the kinase-dead and legK2 deletion mutants, are decorated with polymerized actin. It is noteworthy that neither WT nor dotA or legK2 mutant LCVs are phalloidin positive when actin labeling is performed immediately after uptake. This is consistent with previous observations that cortical actin associated with the bacterial entry sites during phagocytosis disassemble from the *Legionella*-containing phagosome less than 1 min after engulfment of the bacteria (36). To further check that inhibition of actin polymerization is correlated with the presence of LegK2 on the LCV, *D. discoideum* amoebae were infected with an *L. pneumophila* strain transformed with a vector encoding HA-tagged LegK2. They were costained 15 min postinfection for LegK2 and actin with anti-HA antibodies and phalloidin-FITC, respectively (Fig. 4E). We observed that LegK2-positive vacuoles (red labeling) were not labeled with phalloidin (green labeling), while LCVs that did not exhibit LegK2 (blue labeling) were clearly actin positive (Fig. 4E). When quantified on 50 LCVs from two independent experiments, 100% of the LegK2-positive vacuoles lacked actin labeling. Together, these data support the hypothesis that LegK2 is translocated by the Dot/Icm T4SS into the host cell cytosol and its protein kinase activity triggers local inhibition of actin polymerization on the LCV after bacterial uptake.

LegK2 interferes with late endosome/lysosome trafficking to the LCV. Actin-based intracellular movements of endosomes and phagosomes are dependent on a driving force provided by the ARP2/3 complex (37), and actin assembly on phagosome or late endocytic organelles provides tracks for fusion partner organelles to facilitate vesicle fusion (38). Taking into account (i) actin-dependent endosome trafficking, (ii) the localization of LegK2 and its role in the inhibition of actin polymerization on the LCV, and (iii) that a legK2 deletion mutant poorly evades endocytic degradation since only 10% of mutated bacteria survive after cell uptake (24), we hypothesized that LegK2 could be involved in the control of phagosome maturation, in particular, by inhibiting the fusion of the LCV with late endosomes.

D. discoideum was infected with the mCherry-labeled *L. pneumo-*

phila Lens strain or the dotA or legK2 deletion mutant, and the late endosomal or lysosomal vacuolar H⁺-ATPase (V-ATPase) was labeled at 1 h postinfection by immunofluorescence with anti-VatA antibodies (Fig. 5A). As a control, we observed that while the WT Lens strain interferes with phagosome maturation, as demonstrated by only 11.8% VatA-positive LCVs, a T4SS-impaired dotA mutant strain is less able to inhibit the endocytic pathway since around 45% of the dotA mutant-containing vacuoles are labeled with VatA (Fig. 5B). About 28% of the legK2 mutant-containing vacuoles were also VatA positive, which is significantly higher than the 11.8% obtained in the case of WT LCVs. Transforming the legK2 mutant with a WT LegK2-encoding vector partially complements this endocytic pathway evasion defect by decreasing the percentage of VatA-positive vacuoles to 18.4% of the LCVs. In contrast, the kinase-dead LegK2-expressing vector (plegK2cat) did not complement the legK2 deletion since 33.9% of the LCVs were VatA positive (Fig. 5B). Thus, the protein kinase activity of LegK2 contributes to the blocking of late endosomal trafficking toward the LCV and consequently allows bacteria to escape the late endocytic pathway.

LegK2-ARP2/3 interplay controls actin polymerization on the LCV to evade LCV-late endosome fusion. The data presented above demonstrate that LegK2 interacts with and phosphorylates two subunits of the actin filament nucleator ARP2/3, and it localizes to the LCV to inhibit both actin polymerization and late endosome fusion with the LCV, thus contributing to escape of the bacteria from the late endocytic pathway. In order to establish whether these two major events controlled by LegK2 are related, i.e., whether LegK2 inhibits ARP2/3 nucleation activity to control actin polymerization on the LCV, *D. discoideum* was infected with the mCherry-labeled legK2 mutant strain in the presence of 100 μM CK-666, a specific inhibitor of the ARP2/3 complex shown to block *Listeria* actin tail formation (39). Pharmacological inhibition of ARP2/3 activity was preferred to ACTR3 and ARPC1B silencing in order to temporally control ARP2/3 inhibition and consequently avoid a pleiotropic effect of this inhibition. Infected cells were labeled with phalloidin, and vacuoles positive for polymerized actin were scored (Fig. 6A). The presence of CK-666 reverts the legK2 deletion mutant phenotype; i.e., it strongly decreases the presence of actin on the LCVs so that the percentage of actin-positive LCVs was similar to that obtained with WT LCVs. Moreover, when infected cells were immunolabeled with anti-VatA antibodies (Fig. 6B), addition of CK-666 resulted in a significant decrease in VatA-positive vacuoles, suggesting that

FIG 3 LegK2 protein kinase activity inhibits actin polymerization in an ARP2/3-dependent manner. (A) Actin filament distribution in GFP-LegK2-expressing HeLa cells. Polymerized actin was labeled with Alexa Fluor 594 phalloidin (red). Type 1 cells exhibit long and straight fibers in the body of the cell (arrow); type 2 is characterized by reduced and peripheral actin fibers (arrowhead); in type 3, neither central nor peripheral actin fibers are detected. Scale bars, 10 μm. (B) Quantitation of actin filament distribution in transfected HeLa cells. HeLa cells were transfected with the empty vector pGFP or vector pGFP-legK2 or pGFP-legK2_{K112M}. The actin network was evaluated in 40 cells transfected with each vector. These data are representative of three independent experiments, and the error bars represent the standard deviations. (C) Cell invasion by *Listeria* and *Listeria* comet tail formation in GFP-LegK2-expressing mammalian cells. HeLa cells transfected with the vector pGFP or pGFP-legK2 were infected for 5 h at an MOI of 5 with *L. monocytogenes* and then processed for differential immunolabeling, in which extracellular bacteria were differentiated from total bacteria. Extracellular bacteria were labeled by a rabbit-derived polyclonal serum (R11) and an Alexa Fluor 647-conjugated secondary antibody (white labeling); cells were then permeabilized, and total bacteria were labeled with the same R11 serum and an Alexa Fluor 350-coupled secondary antibody (blue labeling). Actin was labeled with Alexa Fluor 546 phalloidin (red labeling). In the right panel, arrows indicate two extracellular bacteria, the dashed arrow highlights an intracellular bacterium with a short actin tail, and arrowheads point toward intracellular bacteria without actin comet tails. Bar, 5 μm. (D) Quantitation of cells with extracellular bacteria. pGFP-, pGFP-legK2-, or pGFP-legK2_{K112M}-transfected HeLa cells (>100 for each transfection) with only extracellular bacteria were counted and compared to the total number of transfected cells with intracellular and extracellular bacteria. Results are expressed as the percentage of HeLa cells displaying only extracellular *L. monocytogenes*. These data are representative of three independent experiments, and the error bars represent the standard deviations. (E) Quantitation of infected cells without actin comet tails. Cells were processed as indicated for panel C, and the number of infected HeLa cells in which actin tails were not detectable was determined and expressed as a percentage of the total. These data are representative of three independent experiments, and the error bars represent the standard deviations.

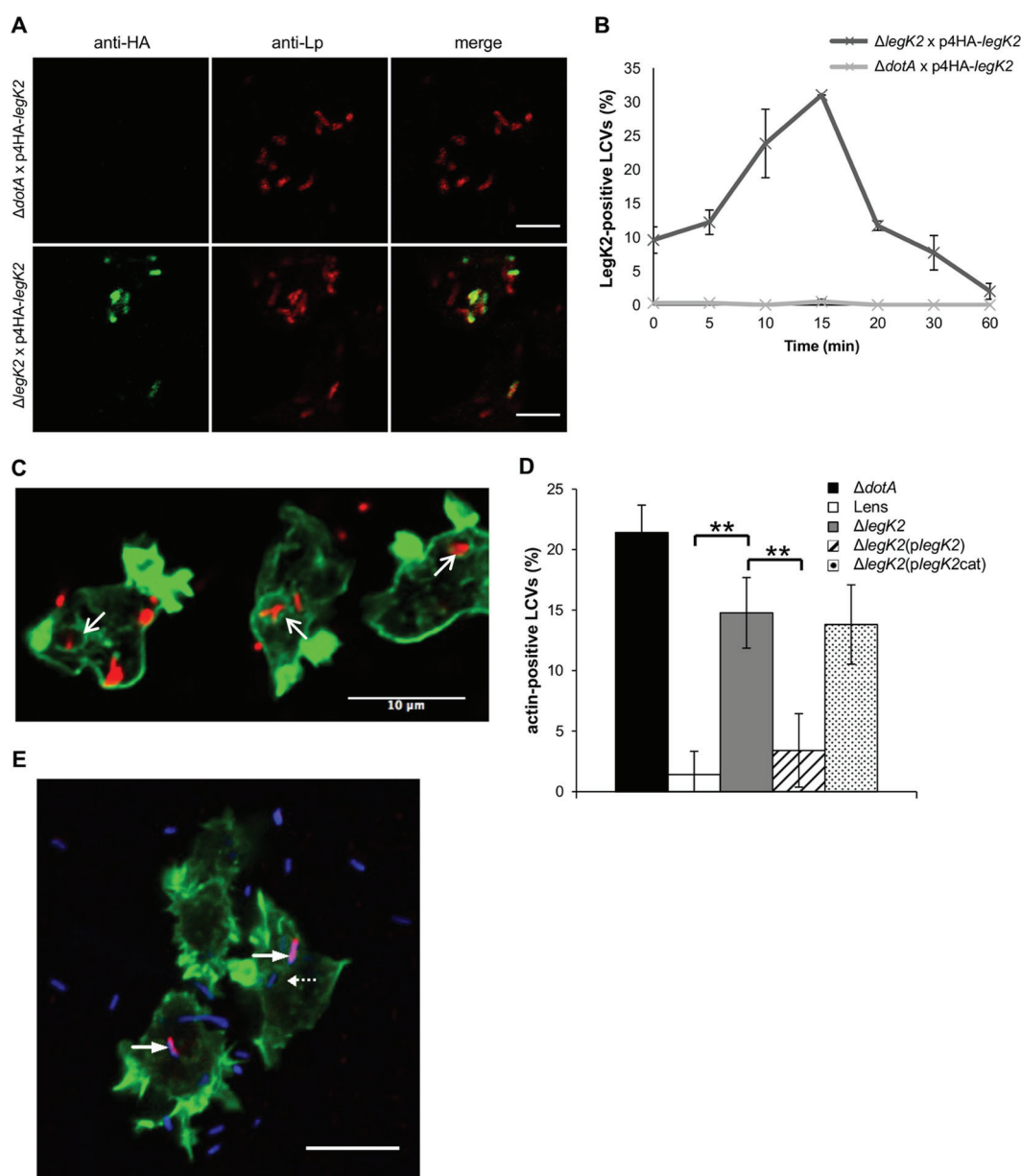


FIG 4 LegK2 inhibits actin polymerization on the LCV. (A) HA-LegK2 detection on LCVs. *D. discoideum* was infected for 15 min at an MOI of 100 with *dotA* or *legK2* mutant *L. pneumophila* transformed with a vector encoding N-terminally HA-tagged LegK2. The presence of bacteria was detected by an immunofluorescence assay with anti-MOMP antibodies (anti-Lp, red labeling), and the HA-LegK2 fusion is labeled with anti-HA antibodies (anti-HA, green labeling). Scale bars, 5 μ m. (B) HA-LegK2 detection during LCV biogenesis. *D. discoideum* was infected at an MOI of 100 with *legK2* mutant *L. pneumophila* transformed with a vector encoding N-terminally HA-tagged LegK2. HA-LegK2-positive LCVs were counted at 0, 5, 10, 15, 20, 30, and 60 min after bacterium-amoeba contact (>100 LCVs per time point). These data are representative of three independent experiments, and the error bars represent the standard deviations. (C) Actin polymerization on LCVs during *Legionella* infection. *D. discoideum* was infected for 15 min at an MOI of 100 with mCherry-labeled *legK2* mutant *L. pneumophila*. Polymerized actin on LCVs was detected by labeling with phalloidin-FITC. Arrows show examples of actin-positive LCVs. Scale bar, 10 μ m. (D) Detection of polymerized actin in *legK2* mutant-containing vacuoles. Actin-positive vacuoles ($n > 100$) were counted for amoeba infected with WT *L. pneumophila* strain Lens, the derivative *dotA* and *legK2* mutants, and the transformed *legK2(plegK2)* and *legK2(plegK2cat)* mutants. These data are representative of three independent experiments, and the error bars represent the standard deviations. **, $P < 0.01$. (E) Exclusive detection of LegK2 and actin on LCVs. *D. discoideum* was infected for 15 min at an MOI of 100 with *L. pneumophila* transformed with a vector encoding HA-tagged LegK2. Bacteria were detected with anti-Lp1 serum and an anti-rabbit secondary antibody (blue labeling), HA-LegK2 on the LCVs was labeled with an anti-HA antibody and an anti-mouse secondary antibody (red labeling), and actin was stained with phalloidin-FITC (green labeling). Arrows indicate LegK2-positive LCVs (without actin labeling), and the dotted arrow indicates an LCV without LegK2 on its surface that was consequently stained for actin. Scale bar, 10 μ m. This micrograph is representative of 50 LCVs observed in two independent experiments.

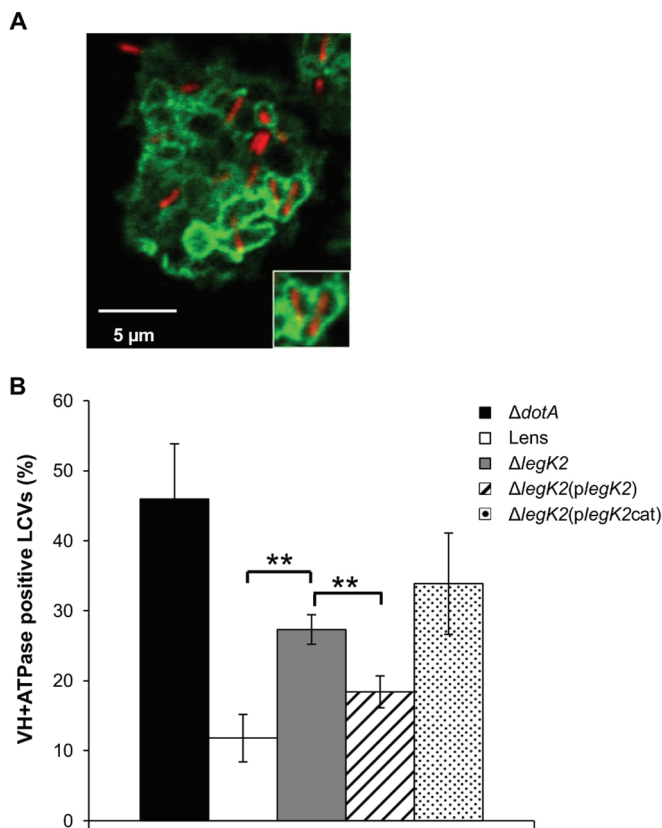


FIG 5 LegK2 inhibits late endosome trafficking to LCVs. (A) Acquisition of vacuolar proton ATPase on LCVs. *D. discoideum* was infected for 1 h at an MOI of 100 with mCherry-labeled legK2 mutant *L. pneumophila*. The presence of vacuolar H⁺-ATPase on LCVs was detected by an immunofluorescence assay with anti-VatA antibodies. The inset shows typical VatA-positive vacuoles. (B) Acquisition of vacuolar proton ATPase in legK2 mutant-containing vacuoles. VatA-positive vacuoles ($n = >100$) in amoebae infected with WT *L. pneumophila* Lens, the derivative dotA and legK2 mutants, and the transformed legK2(plegK2) and legK2(plegK2cat) mutants were counted. These data are representative of three independent experiments, and the error bars represent the standard deviations. **, $P < 0.01$.

CK-666 partially reverts the legK2 deletion mutant phenotype for the endocytic pathway evasion defect. Thus, chemical inhibition of the actin nucleator activity of ARP2/3 phenocopies the effect of LegK2 protein kinase, which suggests that LegK2 acts on ARP2/3 by inhibiting its normal actin nucleation activity. Together, these data show that the LegK2-ARP2/3 interplay results in inhibition of both actin polymerization on the LCV and late endosome trafficking toward the LCV and that these events contribute to bacteria evasion of the endocytic pathway.

DISCUSSION

Host cell pathways targeted by the *Legionella* protein kinase LegK2 were screened by a two-hybrid assay in yeast cells, and several human proteins were identified as putative candidates for interaction with LegK2. As the legK2 mutant prevents evasion of endocytic degradation (24), we focused our studies on proteins involved in host cell organelle trafficking and cytoskeleton remodeling. Using biochemical and tissue culture assays, we demonstrated that LegK2 interacts with and phosphorylates the ARP3 and ARPC1B subunits of the actin filament nucleator ARP2/3

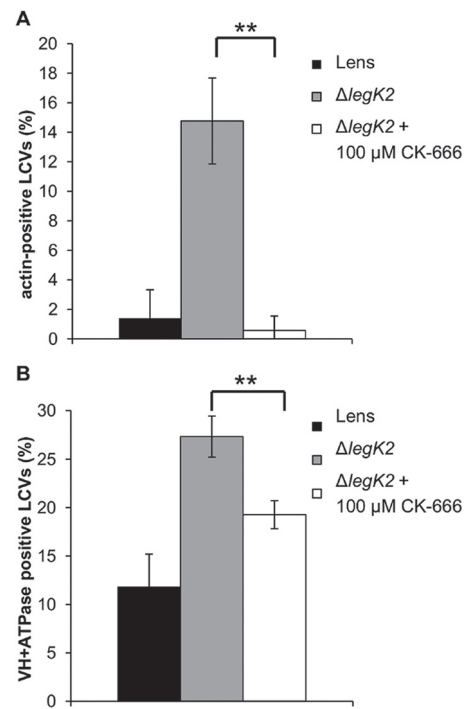


FIG 6 ARP2/3 chemical inhibition complements a legK2 gene deletion defect. (A) Actin polymerization on LCVs in the presence of CK-666. More than 100 LCVs were scored from each sample of phalloidin-FITC-labeled *D. discoideum* infected at an MOI of 100 with mCherry-labeled *L. pneumophila* Lens or the legK2 mutant in the absence or presence of 100 μM CK-666. These data are representative of three independent experiments, and the error bars represent the standard deviations. (B) Acquisition of vacuolar proton ATPase on LCVs in the presence of CK-666. More than 100 LCVs were scored for VatA immunolabeling in each sample of *D. discoideum* infected at an MOI of 100 with mCherry-labeled *L. pneumophila* Lens or the legK2 mutant in the absence or presence of 100 μM CK-666. These data are representative of three independent experiments, and the error bars represent the standard deviations. **, $P < 0.01$.

complex. These data highlight ARP2/3 phosphorylation as a mechanism for controlling ARP2/3 complex activity (26–28). Expression of active LegK2 inhibits host cell invasion and actin comet tail formation during *Listeria* infection, i.e., two well-documented ARP2/3-dependent actin polymerization processes, while the kinase-dead variant is unable to do so. Thus, we have robustly demonstrated that LegK2 is a potent inhibitor of the ARP2/3 complex and that the protein kinase activity of LegK2 is essential for this property.

During *Legionella* infection, rather than changing the overall level of actin polymerization, we observed that LegK2 interferes with local actin remodeling, most likely by being targeted to the LCV and inhibiting actin polymerization in this compartment. This local effect on actin polymerization is ARP2/3 dependent since it can be phenocopied by a specific chemical inhibitor of the ARP2/3 complex. Inhibition of actin polymerization on the LCV is consistent with comparative proteomics of phagosomes containing highly virulent *L. pneumophila* Corby versus the less virulent species *L. hackeliae*. These studies revealed that phagosomes containing nonreplicative *L. hackeliae* displayed more polymerized actin than those containing the virulent *Legionella* species (33). The authors of that study proposed that this change in virulence was due to actin degradation on the LCV containing the

virulent *L. pneumophila* strain, but it also could result from inhibition of actin polymerization on the LCV. Moreover, it is noteworthy that the ARP2/3 complex, along with other actin cytoskeleton-associated proteins, is transiently enriched in the proteome of the nascent *Legionella*-containing phagosome without any significant changes between virulent and avirulent bacteria (33). These observations are consistent with our finding that LegK2 could control the activity of the ARP2/3 complex on the LCV rather than the recruitment of the actin nucleator complex.

Our finding that LegK2 is a key Dot/Icm T4SS effector of the control of actin polymerization remodeling on the LCV gives important insights to help understand the molecular mechanisms by which *L. pneumophila* evade endocytic degradation. We demonstrated that LegK2 contributes to *L. pneumophila* evasion of endosome trafficking toward the LCV and that this role is dependent on the interplay between LegK2 and ARP2/3 to inhibit actin polymerization on the LCV. Although *Legionella* evasion of the endocytic pathway is a main virulence-related event of the infection cycle of *L. pneumophila*, the molecular mechanisms involved in hijacking this pathway are limited to the demonstration that *L. pneumophila* secretes SidK, which inhibits V-ATPase activity, to decrease LCV acidification (18). Here, our results highlight the essential role of LegK2 activity in the inhibition of actin polymerization on the LCV, thus preventing fusion with late endosomes and finally rerouting the phagosome to a replicative niche.

Actin polymerization has recently been identified as a host cell target of two other Dot/Icm substrates, VipA (40) and Ceg14 (Lpg0437) (41). The *Legionella* VipA effector binds actin *in vitro* and directly polymerizes microfilaments without the requirement of additional proteins, a property distinct from those of other bacterial actin nucleators. Microscopy studies have revealed that VipA localizes to actin patches and early endosomes during macrophage infection (40). The *Legionella* effector Ceg14 cosediments with filamentous actin and inhibits *in vitro* actin polymerization. Ceg14 is toxic to yeast, and this toxicity can be alleviated by overexpression of the cytoskeleton-related protein profilin. Despite its molecular effect on actin polymerization, the role of Ceg14 in *Legionella* infection is still not documented (41). In future studies, it will be interesting to decipher whether LegK2, Ceg14, and VipA display synergic or antagonistic activities to temporally control actin polymerization on the LCV in order to control LCV biogenesis. Interestingly, whatever the precise mechanism controlled by each of these T4SS effectors, LegK2 function seems to be predominant since a legK2 single mutant is affected in virulence while a vipA or ceg14 mutant is altered neither for entry nor for replication in amoebae and macrophages, like most of the Dot/Icm effector mutants. Noteworthy, an unanswered question is whether the growth defect of the legk2 mutant is due only to its failure to inhibit actin nucleation around the phagosome. Nevertheless, VipA, Ceg14, and LegK2 effectors highlight the host cell actin cytoskeleton as a major target of *Legionella*, and we demonstrate here for the first time that actin remodeling is a critical determinant of an effective cycle of *L. pneumophila* infection.

Actin cytoskeleton remodeling is known to be targeted by numerous extra- and intracellular bacteria in order to (i) trigger bacterial uptake by nonphagocytic cells (42), (ii) move within the host cell cytosol and spread from cell to cell (43), or (iii) decorate the phagocytic vacuole with a polymerized actin meshwork (44). To date, actin remodeling targeted by bacteria to alter host cell organelle trafficking for successful infection, as we propose LegK2

to do, has not been described. Moreover, the ARP2/3 complex has been shown only to be hijacked by recruiting or mimicking NPFs but not shown to be modified by phosphorylation to control ARP2/3-dependent actin nucleation activity. Thus, both the role of actin remodeling and the molecular mechanism controlled by the *Legionella* effector LegK2 are unique and novel.

It is noteworthy that the atypical protein kinase SteC from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is required for F-actin meshwork formation around the *Salmonella*-containing vacuole (45). Although SteC has recently been shown to target another actin cytoskeleton effector protein, namely, the MAP kinase MEK (46), we note the similarity of both the enzymatic activities of the bacterial protein kinases LegK2 and SteC to the host cell actin cytoskeleton remodeling pathway targeted by these kinases. Similarly, the *Yersinia pseudotuberculosis* T3SS effector YpkA is an essential virulence determinant that disrupts the host actin cytoskeleton and inhibits phagocytosis. In the presence of actin, the kinase YpkA phosphorylates $G\alpha_q$, which impairs guanine nucleotide binding by $G\alpha_q$ and results in the inhibition of multiple $G\alpha_q$ signaling pathways, among which are Rho GTPase activation and consequently actin stress fiber assembly (47). Although the molecular mechanisms controlled by these protein kinases are different in each case, the role of protein phosphorylation in the control of host cell actin remodeling emerges as a paradigm in bacterial pathogenesis.

MATERIALS AND METHODS

Cells, bacteria, and plasmids. For the bacterial strains, cells, and plasmids used in this study, see Table S1 in the supplemental material.

L. pneumophila strains were grown at 30°C either on buffered charcoal yeast extract (BCYE) agar or in BYE liquid medium. Each medium was supplemented with 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ chloramphenicol when appropriate. *L. monocytogenes* strain EGDe.PrfA* (BUG 3057) was cultured in brain heart infusion broth at 37°C. *Escherichia coli* strains were grown at 37°C in LB medium supplemented with 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ampicillin, 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ kanamycin, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ spectinomycin, and 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ chloramphenicol. *E. coli* strains XL1-Blue and DH5 α were used to maintain plasmids, and *E. coli* strain BL21(DE3)(pREP4-groESL) was used for recombinant protein overproduction.

S. cerevisiae strains AH109 and Y187 were grown at 30°C in rich YPD (yeast extract, peptone, dextrose) medium or in SD (synthetic dextrose) medium supplemented with the appropriate amino acids.

The WT amoeba *D. discoideum* strain AX2 (DBS0235534) was obtained from the Dicty Stock Center (<http://dictybase.org>). *D. discoideum* cells were grown axenically in HL5 medium at 22°C with 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ streptomycin and 66 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ penicillin G.

Human HEK293T fibroblasts and human epithelial HeLa cells (gift from INSERM U1111, Lyon, France) were maintained at 37°C in 5% CO₂ in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) and 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ gentamicin. HeLa CCL-2 cells (American Type Culture Collection) were cultured at 37°C in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FCS in a 10% CO₂ atmosphere.

General DNA techniques and Gateway cloning. For the oligonucleotides used in this study, see Table S2 in the supplemental material.

DNA constructions were performed with the Gateway recombinational cloning system as recommended by the manufacturer (Invitrogen) or by restriction-ligation molecular cloning. Plasmid DNA from *E. coli* was prepared by Plasmid Midi and Mini kits (Qiagen). PCR amplifications were carried out with Phusion polymerase as recommended by the manufacturer (Finnzymes). Site-directed mutagenesis experiments were performed with the QuikChange II site-directed mutagenesis kit (Stratagene). To obtain the kinase-dead mutant protein LegK2_{K112M} defective

in phosphate donor ATP binding and the kinase-dead mutant protein LegK2_{K112M/D209N} defective in both phosphate donor ATP binding and phosphate transfer, nucleotide substitutions in the legK2 gene were performed with primer pairs 1/2 and 3/4 (see Table S2).

Vector construction. The DNA fragments corresponding to the legK1 (lpl1545) and legK2 (lpl2066) coding sequences were PCR amplified by using genomic DNA of *L. pneumophila* Lens as the template and oligonucleotide pairs 5/6 and 7/8 (see Table S2), respectively. The coding sequences were inserted into the Gateway pDONR207 vector (Invitrogen) by *in vitro* recombination. The LegK1- and LegK2-encoding genes were then transferred from pDONR207 to pGBKT7 (Clontech), thus producing LegK proteins fused to the DNA binding domain of the GAL4 transcriptional activator in yeast cells. The LegK2-encoding gene was also transferred by Gateway cloning from pDONR207-legK2 to vectors pDEST27 and pEGFP (Invitrogen) to produce GST-tagged LegK2 and N-terminally GFP-fused LegK2 proteins in mammalian cells, respectively. The legK2 gene from pXDC61-legK2 (gift from J. Allombert in our lab) was ligated into plasmid pMMB207c-HA*4 at the BamHI and KpnI restriction sites (gift from G. Frankel, London, United Kingdom [48]) to encode N-terminally HA-tagged LegK2 upon isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) induction in *L. pneumophila* cells. The mutated legK2_{K112M/D209N} gene was ligated into the SphI restriction site of pXDC50 to encode kinase-dead LegK2 under the control of its own promoter in *L. pneumophila* cells.

ARPC1B and ACTR3 cDNAs were obtained from the human ORFeome resource (hORFeome v3.1) in the pDONR223 Gateway vector. cDNAs were transferred by *in vitro* recombination from pDONR into yeast vector pACT2 (Clontech) to produce proteins fused with the transcriptional activator domain of GAL4. ARPC1B and ACTR3 cDNAs were *in vitro* recombined from pDONR223 vectors to the pCI-Neo3Flag vector (Invitrogen), thus producing 3Flag-tagged ARP2/3 complex subunits in mammalian cells.

Yeast two-hybrid screening and binary assays. Vectors pGBKT7-legK1 and -legK2, which encode LegK proteins fused to the DNA binding domain of the GAL4 transcriptional activator, were transformed into bait yeast strain AH109. Bait cells were screened against a human normalized cDNA spleen library for systematic screening or against ACTR3 and ARPC1B for binary assays cloned into vector pACT2 transformed into prey yeast strain Y187, which produces human proteins fused to the transcriptional activator domain of GAL4. AH109(pGBKT7-legK) and Y187(pACT2-human cDNA), Y187(pACT2-ACTR3), or Y187(pACT2-ARPC1B) yeast cells were mated and subsequently plated onto a selective medium lacking histidine and supplemented with 10 mM 3AT to test the interaction-dependent transactivation of the HIS3 reporter gene.

Affinity copurification. HEK293T cells were cotransfected with pDEST27, pDEST27-legK2, or pDEST27-legK2_{K112M} and pCI-Neo3Flag-ARPC1B or -ACTR3 by using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Transfected cells were lysed at 24 h posttransfection in modified RIPA buffer (50 mM Tris HCl [pH 7.4], 100 mM NaCl, 10% glycerol, 1% NP-40), and GST-tagged LegK2 or LegK2_{K112M} was purified on glutathione-agarose 4B (Macherey-Nagel). Purified fractions were immunoblotted with both anti-GST (13-6700; Invitrogen) and anti-Flag (clone M2; Sigma) antibodies to detect GST or GST-tagged LegK2 protein and Flag-tagged ARP2/3 subunits, respectively.

Protein localization in transfected mammalian cells. HEK293T cells were transfected or cotransfected with empty pDEST27 or pDEST27-legK2/legK1 and/or pCI-Neo3Flag-ARPC1B/ACTR3 by using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). At 24 h posttransfection, cells were fixed with 3.7% formaldehyde and permeabilized with 0.1% Triton X-100. Flag-tagged ARPC1B and ARP3 proteins were immunolabeled with mouse anti-Flag antibodies conjugated with the fluorochrome Cy3 (A9594; Sigma). GST, GST-LegK2, or GST-LegK1 protein was labeled with a rabbit anti-GST antibody (A7340; Sigma) and detected with an anti-rabbit secondary antibody conjugated with the fluorochrome Alexa Fluor 488 (A11034; Molecular Probes). Microscopy was carried out with a

confocal laser scanning microscope (LSM510 Meta; Zeiss). Quantitation of images was performed with ImageJ software (National Institutes of Health). The Pearson coefficient was determined with a JACoP plugin (49) and expressed as the mean value calculated for 30 cells.

ARP2/3 complex *in vitro* phosphorylation assays. GST-LegK2 and GST-LegK2_{K112M} were overproduced in and purified from *E. coli* as previously described (24). The ARP2/3 complex was purified from *A. castellanii* as previously described (26, 50). Where indicated, ARP2/3 was dephosphorylated with the dual-specificity Antarctic phosphatase (New England Biolabs Inc.) as previously described (26). *In vitro* phosphorylation of 7.2 μ g of the purified ARP2/3 complex was performed in the presence of 1 μ g of GST-LegK2 or GST-LegK2_{K112M} for 30 min at 37°C in 20 μ l of a buffer containing 25 mM Tris HCl (pH 7.5), 5 mM MnCl₂, 5 mM dithiothreitol, and 100 mM ATP. Reactions were stopped by the addition of an equal volume of 2 \times Laemmli loading buffer (51). Where indicated, the reaction was further incubated in the presence of 10 U of Antarctic phosphatase for 1 h at 30°C before the addition of Laemmli buffer. Proteins were then separated by SDS-PAGE and immunoblotted with an antiphosphothreonine monoclonal antibody (clone PTR-8; Sigma).

ARPC1B and ARP3 *in cellulo* phosphorylation assays. HEK293T cells were transfected or cotransfected with vectors pCI-Neo3Flag-ARPC1B/ACTR3 and pDEST27-legK2 or -legK2_{K112M} by using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Protein A/G resin was cross-linked with 10 μ g of anti-Flag antibodies by using a Pierce Cross-link immunoprecipitation kit (Thermo Scientific). Transfected cells were lysed at 24 h posttransfection, and Flag-tagged ARP2/3 subunits were immunoprecipitated as recommended by the manufacturer. Immunoprecipitation supernatants were then incubated with glutathione-agarose 4B (Macherey-Nagel) and analyzed by Western blot assay with anti-GST antibodies to check the expression of the GST-tagged LegK2 and LegK2_{K112M} protein kinases. Immunoprecipitated proteins were immunoblotted with both anti-Flag (clone M2; Sigma) and antiphosphothreonine (clone PTR-8; Sigma) antibodies to check the immunoprecipitation and phosphorylation level of the ARP2/3 subunits, respectively.

***In vitro* actin polymerization assays.** *In vitro* actin polymerization assays were performed with 5 μ M monomeric actin containing 10% pyrene-labeled actin in KMEI (50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 10 mM imidazole [pH 7.0]). Polymerization was determined in the absence or presence of the ARP2/3 complex at 50 nM, the VCA domain of N-WASP at 500 nM, and recombinant WT LegK2. Fluorescence was measured with a BioTek Synergy 2 plate reader with 365-nm excitation and 407-nm emission filters at 10-s intervals. The purified ARP2/3 complex was dephosphorylated by treatment with 1 U of Antarctic phosphatase (New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA) in Tris-HipH buffer (50 mM Tris [pH 8.0], 1 mM MgCl₂, 0.1 mM ZnCl₂) for 1 h at 30°C. The activation and inhibition of the ARP2/3 complex by LegK2 were tested on the dephosphorylated and phosphorylated ARP2/3 complex, respectively.

Actin polymerization in transfected mammalian cells. HeLa cells were transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions with a vector encoding pEGFP alone or fused with legK2 or legK2_{K112M}. At 24 h posttransfection, cells were fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 5 min at room temperature (RT), and stained with Alexa Fluor 594 phalloidin (Molecular Probes). Microscopy was carried out with a confocal laser scanning microscope (LSM510 Meta; Zeiss).

Listeria comet actin tail formation. HeLa CCL-2 cells grown on coverslips were transfected for 18 h with the empty vector pEGFP or with the pEGFP-legK2 vector with the FuGENE transfection reagent (Roche) at a ratio of 2 μ g of DNA to 6 μ l of FuGENE per treatment. Bacteria were grown overnight at 37°C in a shaking device, and on the following day, 1 ml of bacterial culture was washed three times with 1 ml of phosphate-buffered saline (PBS) and the optical density at 600 nm was measured to estimate bacterial numbers. HeLa cells were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 5 for 1 h in DMEM supplemented with 1% FCS, and

then extracellular bacteria were killed by adding DMEM supplemented with 10% FCS and gentamicin at $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. After 5 h of infection, HeLa cells were fixed with 4% paraformaldehyde and extracellular *L. monocytogenes* bacteria were labeled by adding a rabbit-derived polyclonal serum (R11) and an Alexa Fluor 647-conjugated secondary antibody (Molecular Probes). Cells were then permeabilized for 4 min with 0.1% Triton X-100 in PBS, and total bacteria were labeled with the same R11 serum and an Alexa Fluor 350-conjugated secondary antibody (Molecular Probes). Actin was labeled with phalloidin Alexa Fluor 546-coupled reagent (Molecular Probes). Images were acquired with a $100\times$ objective installed on an inverted wide-field Axiovert 200M microscope (Zeiss) equipped with an electron multiplication charge-coupled device Neo camera (Andor) and the MetaMorph imaging software (Molecular Devices).

***D. discoideum* infection by *L. pneumophila* for microscopic analysis.** *D. discoideum* cells were seeded onto sterile glass in MB (7.15 g · liter⁻¹ yeast extract, 14.3 g · liter⁻¹ peptone, 20 mM MES [pH 6.9]). Monolayers were infected at an MOI of 100 with bacteria grown for 4 days at 30°C. The plates were spun at $880 \times g$ for 10 min and further treated for microscopic analysis.

LegK2 protein localization during infection. *D. discoideum* cells were seeded onto sterile glass coverslips in MB. The *L. pneumophila* dotA or legK2 mutant strain encoding N-terminally HA-tagged LegK2 protein was grown for 21 h at 37°C. Two hours before use, HA-tagged LegK2 protein production was induced by the addition of 2 mM IPTG. Monolayers were infected at an MOI of 100. The plates were spun at $880 \times g$ for 10 min, and cells were immediately fixed or incubated for 5, 10, 15, 20, 30, or 60 min at 25°C. Monolayers were fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized with 100% ice-cold methanol. The coverslips were then stained with anti-HA antibodies (3724S; Cell Signaling) and visualized with an Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibody (A11034; Molecular Probes). Bacteria were immunolabeled with a rhodamine-conjugated anti-MOMP antibody (52). Microscopy was carried out with a confocal laser scanning microscope (LSM510 Meta; Zeiss).

Actin polymerization in infected cells. *D. discoideum* on sterile glass coverslips was infected with *Legionella* as described above in the absence or presence of 100 μM CK-666, and cells were immediately fixed or incubated for 15 min at 25°C. Monolayers were fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 5 min at RT. The coverslips were then stained with phalloidin-FITC (P5282; Sigma). Microscopy was carried out with a confocal laser scanning microscope (LSM510 Meta; Zeiss).

Detection of LegK2 and actin on LCVs. *D. discoideum* on sterile glass coverslips was infected with *Legionella* as described above, and cells were incubated for 15 min at 25°C. Monolayers were fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 5 min at RT. The coverslips were then stained with mouse anti-HA antibodies (gift from S. Salcedo, Lyon, France) and visualized with a Dylight 594 (115-515-003; Jackson)-conjugated secondary antibody. Bacteria were immunolabeled with anti-Lp1 Paris/Lens strain serum and an Alexa Fluor 547-conjugated anti-rabbit secondary antibody (A21245; Molecular Probes), and actin was stained with phalloidin-FITC (P5282; Sigma). Microscopy was carried out with a confocal laser scanning microscope (LSM510 Meta; Zeiss).

Maturation of *Legionella*-containing phagosomes. *D. discoideum* on sterile glass coverslips was infected with *Legionella* as described above. CK-666 (100 μM) was added 5 min after amoeba-*Legionella* contact, and plates were incubated for 1 h at 25°C. Monolayers were fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with 100% ice-cold methanol for 2 min at RT. The coverslips were then stained with anti-VatA antibodies (221-35-2; gift of F. Letourneur, Lyon, France) and visualized with an Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibody (A11029; Molecular Probes). Microscopy was carried out with a confocal laser scanning microscope (LSM510 Meta; Zeiss).

Statistical analysis. The results were statistically analyzed with Student's *t* test. The results obtained correspond to a comparison of the

values obtained with the legK2 mutant and those obtained with the parental strain under the same conditions or of the values obtained in the absence or presence of CK-666, the ARP2/3 complex inhibitor.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material for this article may be found at <http://mbio.asm.org/lookup/suppl/doi:10.1128/mBio.00354-15/-/DCSupplemental>.

Figure S1, TIF file, 0.9 MB.

Table S1, PDF file, 0.1 MB.

Table S2, PDF file, 0.05 MB.

Text S1, PDF file, 0.01 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to F. Letourneur for helpful discussions about *D. discoideum* manipulations and for the gift of anti-VatA antibody and to G. Frankel for the gift of plasmid pMMB207c-HA*4. We thank the Dicty Stock Center for *D. discoideum* strains.

This work was performed within the framework of the LABEX ECO-FECT (ANR-11-LABX-0042) of the Université de Lyon, within the program Investissements d'avenir (ANR-11-IDEX-0007) operated by the French National Research Agency (ANR). This work was funded by the Centre National de la Recherche Scientifique (UMR 5308), the Institut National de la Recherche Médicale (U1111 and U604), the Université Lyon 1, the Fondation FINOVI, the Pasteur Institute, the European Research Council (advanced grant 233348), and the Institut National de la Recherche Agronomique (USC2020). The Ph.D. grant to C.M. was provided by the Programme Avenir Lyon Saint-Etienne (ANR-11-IDEX-0007) of the Université de Lyon, within the program Investissements d'avenir operated by the ANR. P.C. is a Howard Hughes Medical Institute senior international research scholar.

REFERENCES

- Zhu W, Banga S, Tan Y, Zheng C, Stephenson R, Gately J, Luo ZQ. 2011. Comprehensive identification of protein substrates of the Dot/Icm type IV transporter of *Legionella pneumophila*. *PLoS One* 6:e17638. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0017638>.
- Andrews HL, Vogel JP, Isberg RR. 1998. Identification of linked *Legionella pneumophila* genes essential for intracellular growth and evasion of the endocytic pathway. *Infect Immun* 66:950–958.
- Berger KH, Isberg RR. 1993. Two distinct defects in intracellular growth complemented by a single genetic locus in *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* 7:7–19. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01092.x>.
- Segal G, Purcell M, Shuman HA. 1998. Host cell killing and bacterial conjugation require overlapping sets of genes within a 22-kb region of the *Legionella pneumophila* genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:1669–1674. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.95.4.1669>.
- Isberg RR, O'Connor TJ, Heidtman M. 2009. The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cozy niche inside host cells. *Nat Rev Microbiol* 7:13–24. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1967>.
- Xu L, Luo ZQ. 2013. Cell biology of infection by *Legionella pneumophila*. *Microbes Infect* 15:157–167. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2012.11.001>.
- 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>.
- Hubber A, Roy CR. 2010. Modulation of host cell function by *Legionella pneumophila* type IV effectors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 26:261–283. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100109-104034>.
- Allombert J, Fuche F, Michard C, 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2013.09.007>.
- 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>.
- Machner MP, Isberg RR. 2007. A bifunctional bacterial protein links GDI displacement to Rab1 activation. *Science* 318:974–977. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1149121>.
- Mukherjee S, Liu X, Arasaki K, McDonough J, Galán JE, Roy CR. 2011.

- Modulation of Rab GTPase function by a protein phosphocholine transferase. *Nature* 477:103–106. <http://dx.doi.org/10.1038/nature10335>.
13. Murata T, Delprato A, Ingmundson A, Toomre DK, Lambright DG, Roy CR. 2006. The *Legionella pneumophila* effector protein DrrA is a Rab1 guanine nucleotide-exchange factor. *Nat Cell Biol* 8:971–977. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1463>.
 14. Nagai H, Kagan JC, Zhu X, Kahn RA, Roy CR. 2002. A bacterial guanine nucleotide exchange factor activates ARF on *Legionella* phagosomes. *Science* 295:679–682. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1067025>.
 15. Tan Y, Arnold RJ, Luo ZQ. 2011. *Legionella pneumophila* regulates the small GTPase Rab1 activity by reversible phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:21212–21217. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1114023109>.
 16. Tan Y, Luo ZQ. 2011. *Legionella pneumophila* SidD is a deAMPyase that modifies Rab1. *Nature* 475:506–509. <http://dx.doi.org/10.1038/nature10307>.
 17. Tan Y, Luo ZQ. 2011. Take it and release it: the use of the Rab1 small GTPase at a bacterium's will. *Cell Logist* 1:125–127. <http://dx.doi.org/10.4161/cl.1.4.17870>.
 18. Xu L, Shen X, Bryan A, Banga S, Swanson MS, Luo ZQ. 2010. Inhibition of host vacuolar H⁺-ATPase activity by a *Legionella pneumophila* effector. *PLoS Pathog* 6:e1000822. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000822>.
 19. Finsel I, Ragaz C, Hoffmann C, Harrison CF, Weber S, van Rahden VA, Johannes L, Hilbi H. 2013. The *Legionella* effector RidL inhibits retrograde trafficking to promote intracellular replication. *Cell Host Microbe* 14:38–50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2013.06.001>.
 20. Ge J, Shao F. 2011. Manipulation of host vesicular trafficking and innate immune defence by *Legionella* Dot/Icm effectors. *Cell Microbiol* 13:1870–1880. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01710.x>.
 21. Lippmann J, Müller HC, Naujoks J, Tabeling C, Shin S, Witznath M, Hellwig K, Kirschning CJ, Taylor GA, Barchet W, Bauer S, Suttrop N, Roy CR, Opitz B. 2011. Dissection of a type I interferon pathway in controlling bacterial intracellular infection in mice. *Cell Microbiol* 13:1668–1682. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01646.x>.
 22. Lurie-Weinberger MN, Gomez-Valero L, Merault N, Glöckner G, Buchrieser C, Gophna U. 2010. The origins of eukaryotic-like proteins in *Legionella pneumophila*. *Int J Med Microbiol* 300:470–481. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.04.016>.
 23. Nora T, Lomma M, Gomez-Valero L, Buchrieser C. 2009. Molecular mimicry: an important virulence strategy employed by *Legionella pneumophila* to subvert host functions. *Future Microbiol* 4:691–701. <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.09.47>.
 24. 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>.
 25. Ge J, Xu H, Li T, Zhou Y, Zhang Z, Li S, Liu L, Shao F. 2009. A *Legionella* type IV effector activates the NF- κ B pathway by phosphorylating the I κ B α family of inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:13725–13730. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0907200106>.
 26. LeClaire LL, Baumgartner M, Iwasa JH, Mullins RD, Barber DL. 2008. Phosphorylation of the Arp2/3 complex is necessary to nucleate actin filaments. *J Cell Biol* 182:647–654. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200802145>.
 27. Narayanan A, LeClaire LL, Barber DL, Jacobson MP. 2011. Phosphorylation of the Arp2 subunit relieves auto-inhibitory interactions for Arp2/3 complex activation. *PLOS Comput Biol* 7:e1002226. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002226>.
 28. Vadlamudi RK, Li F, Barnes CJ, Bagheri-Yarmand R, Kumar R. 2004. p41-Arc subunit of human Arp2/3 complex is a p21-activated kinase-1-interacting substrate. *EMBO Rep* 5:154–160. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.embor.7400079>.
 29. Lebrin F, Chambaz EM, Bianchini L. 2001. A role for protein kinase CK2 in cell proliferation: evidence using a kinase-inactive mutant of CK2 catalytic subunit alpha. *Oncogene* 20:2010–2022. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1204307>.
 30. Alarcon CM, Heitman J, Cardenas ME. 1999. Protein kinase activity and identification of a toxic effector domain of the target of rapamycin TOR proteins in yeast. *Mol Biol Cell* 10:2531–2546. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.10.8.2531>.
 31. Vantaggiato C, Formentini I, Bondanza A, Bonini C, Naldini L, Brambilla R. 2006. ERK1 and ERK2 mitogen-activated protein kinases affect Ras-dependent cell signaling differentially. *J Biol* 5:14. <http://dx.doi.org/10.1186/jbiol38>.
 32. Ohtoshi A, Miyake T, Arai K, Masai H. 1997. Analyses of *Saccharomyces cerevisiae* Cdc7 kinase point mutants: dominant-negative inhibition of DNA replication on overexpression of kinase-negative Cdc7 proteins. *Mol Genet* 254:562–570. <http://dx.doi.org/10.1007/s004380050452>.
 33. Shevchuk O, Batzilla C, Hägele S, Kusch H, Engelmann S, Hecker M, Haas A, Heuner K, Glöckner G, Steinert M. 2009. Proteomic analysis of *Legionella*-containing phagosomes isolated from *Dictyostelium*. *Int J Med Microbiol* 299:489–508. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.03.006>.
 34. Urwyler S, Nyfeler Y, Ragaz C, Lee H, Mueller LN, Aebersold R, Hilbi H. 2009. Proteome analysis of *Legionella* vacuoles purified by magnetic immunoseparation reveals secretory and endosomal GTPases. *Traffic* 10:76–87. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00851.x>.
 35. Hoffmann C, Finsel I, Otto A, Pfaffinger G, Rothmeier E, Hecker M, Becher D, Hilbi H. 2014. Functional analysis of novel Rab GTPases identified in the proteome of purified *Legionella*-containing vacuoles from macrophages. *Cell Microbiol* 16:1034–1052. <http://dx.doi.org/10.1111/cmi.12256>.
 36. Lu H, Clarke M. 2005. Dynamic properties of *Legionella*-containing phagosomes in *Dictyostelium amoebae*. *Cell Microbiol* 7:995–1007. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00528.x>.
 37. Fehrenbacher KL, Boldogh IR, Pon LA. 2003. Taking the A-train: actin-based force generators and organelle targeting. *Trends Cell Biol* 13:472–477. [http://dx.doi.org/10.1016/S0962-8924\(03\)00174-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0962-8924(03)00174-0).
 38. Kjeker R, Egeberg M, Habermann A, Kuehnel M, Peyron P, Floetenmeyer M, Walther P, Jahraus A, Defacque H, Kuznetsov SA, Griffiths G. 2004. Fusion between phagosomes, early and late endosomes: a role for actin in fusion between late, but not early endocytic organelles. *Mol Biol Cell* 15:345–358. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E03-05-0334>.
 39. Nolen BJ, Tomasevic N, Russell A, Pierce DW, Jia Z, McCormick CD, Hartman J, Sakowicz R, Pollard TD. 2009. Characterization of two classes of small molecule inhibitors of Arp2/3 complex. *Nature* 460:1031–1034. <http://dx.doi.org/10.1038/nature08231>.
 40. Franco IS, Shohdy N, Shuman HA. 2012. The *Legionella pneumophila* effector VipA is an actin nucleator that alters host cell organelle trafficking. *PLoS Pathog* 8:e1002546. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002546>.
 41. Guo Z, Stephenson R, Qiu J, Zheng S, Luo ZQ. 2014. A *Legionella* effector modulates host cytoskeletal structure by inhibiting actin polymerization. *Microbes Infect* 16:225–236. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2013.11.007>.
 42. Cossart P, Sansonetti PJ. 2004. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* 304:242–248. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1090124>.
 43. Gouin E, Welch MD, Cossart P. 2005. Actin-based motility of intracellular pathogens. *Curr Opin Microbiol* 8:35–45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2004.12.013>.
 44. Unsworth KE, Way M, McNiven M, Machesky L, Holden DW. 2004. Analysis of the mechanisms of *Salmonella*-induced actin assembly during invasion of host cells and intracellular replication. *Cell Microbiol* 6:1041–1055. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00417.x>.
 45. Poh J, Odendall C, Spanos A, Boyle C, Liu M, Freemont P, Holden DW. 2008. SteC is a *Salmonella* kinase required for SPI-2-dependent F-actin remodelling. *Cell Microbiol* 10:20–30. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01010.x>.
 46. Odendall C, Rolhion N, Förster A, Poh J, Lamont DJ, Liu M, Freemont PS, Catling AD, Holden DW. 2012. The *Salmonella* kinase SteC targets the MAP kinase MEK to regulate the host actin cytoskeleton. *Cell Host Microbe* 12:657–668. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2012.09.011>.
 47. Navarro L, Koller A, Nordfelth R, Wolf-Watz H, Taylor S, Dixon JE. 2007. Identification of a molecular target for the *Yersinia* protein kinase A. *Mol Cell* 26:465–477. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2007.04.025>.
 48. Dolezal P, Aili M, Tong J, Jiang JH, Marobbio CM, Lee SF, Schuelein R, Belluzzo S, Binova E, Mousnier A, Frankel G, Giannuzzi G, Palmieri F, Gabriel K, Naderer T, Hartland EL, Lithgow T. 2012. *Legionella pneumophila* secretes a mitochondrial carrier protein during infection. *PLoS Pathog* 8:e1002459. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002459>.
 49. Bolte S, Cordelières FP. 2006. A guided tour into subcellular colocaliza-

- tion analysis in light microscopy. *J Microsc* 224:213–232. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x>.
50. Zalevsky J, Lempert L, Kranitz H, Mullins RD. 2001. Different WASP family proteins stimulate different Arp2/3 complex-dependent actin-nucleating activities. *Curr Biol* 11:1903–1913. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00603-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00603-0).
51. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685. <http://dx.doi.org/10.1038/227680a0>.
52. Hilbi H, Segal G, Shuman HA. 2001. Icm/dot-dependent upregulation of phagocytosis by *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* 42:603–617. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02645.x>.

Supplemental material

Les tableaux S1 et S2 indiqués dans cet article correspondent aux tableaux présentés dans les fiches techniques 1, 2 et 3 de ce manuscrit.

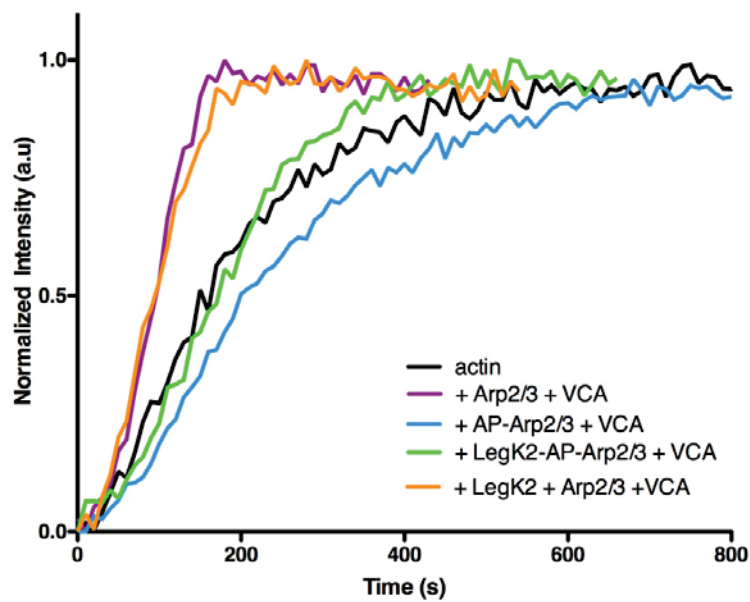


Figure S1 : LegK2 has no direct impact on ARP2/3 activity.

Pyrene actin polymerization assays show that the ARP2/3 complex in the presence of 500 nM N-WASP-VCA (purple trace) nucleates actin faster than actin alone (black trace). The ARP2/3 complex dephosphorylated with dual-specificity Antarctic phosphatase (AP-ARP2/3) does not nucleate actin filaments in the presence of N-WASP-VCA (blue trace). The ARP2/3 complex phosphorylated by LegK2 (LegK2 + ARP2/3, orange trace) nucleated actin filaments at rates similar to those of the untreated ARP2/3 complex (purple trace). The nucleation activity of the phosphatase-treated ARP2/3 complex was not restored by LegK2 phosphorylation (LegK2 + AP-ARP2/3) (green trace).

Supplemental References

- Amrein, K., Takacs, B., Stieger, M., Molnos, J., Flint, N. and Burn, P. (1995). Purification and characterization of recombinant human p50csk protein-tyrosine kinase from an *Escherichia coli* expression system overproducing the bacterial chaperones GroES and GroEL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1048-1052.
- Cazalet, C., Rusniok, C., Bruggemann, 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. *Nature Genetics* 36, 1165-1173.
- Dolezal, P., Aili, M., Tong, J., Jiang, J.H., Marobbio, C.M., Lee, S.F., et al. (2012). *Legionella pneumophila* secretes a mitochondrial carrier protein during infection. *PLoS Pathog* 8, e1002459.
- Ferhat, M., Atlan, D., Vianney, A., Lazzaroni, J., Doublet, P. and Gilbert, C. (2009). The TolC protein of *Legionella pneumophila* plays a major role in multi-drug resistance and the early steps of host invasion. *PLoS One* 4, e7732.
- Hervet, E., Charpentier, X., Vianney, A., Lazzaroni, J.C., Gilbert, C., Atlan, D. and Doublet, P. (2011). Protein kinase LegK2 is a type IV secretion system effector involved in endoplasmic reticulum recruitment and intracellular replication of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 79, 1936-1950.
- Watts, D.J. and Ashworth, J.M. (1970). Growth of myxameobae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Biochem J* 119, 171-174.

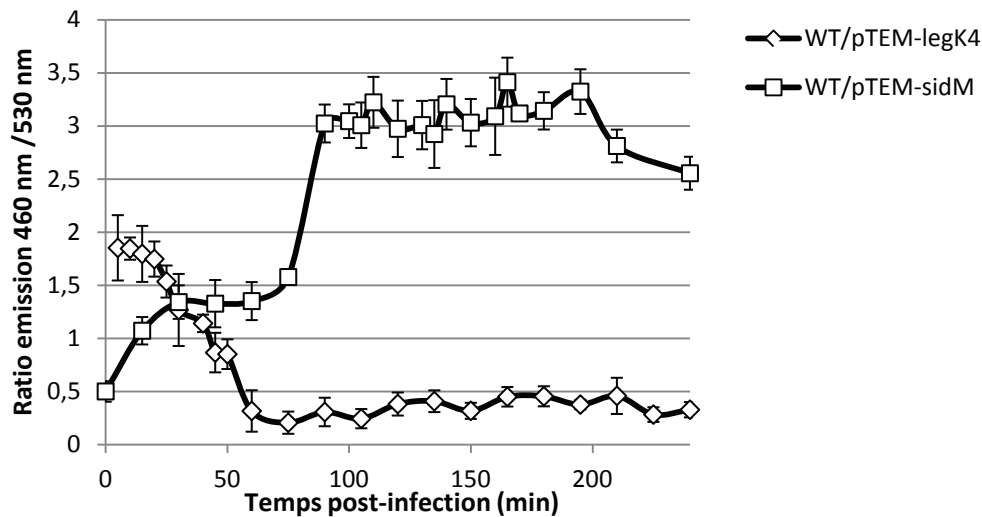


Figure 64 : Les profils de cinétique de sécrétion des effecteurs Dot/Icm de *L. pneumophila* varient en fonction de chaque effecteur (Allombert *et al.*, en préparation).

Les tests de suivi de translocation mis au point au laboratoire sont basés sur la sécrétion par *L. pneumophila* d'un effecteur (ici LegK4 et SidM) fusionné à l'enzyme β -lactamase (TEM) qui, une fois injecté dans le cytoplasme de la cellule hôte, coupe un substrat fluorescent, le faisant passer d'une fluorescence verte à bleue. La variation de cette fluorescence est alors quantifiée au cours de l'infection de macrophages. Ces tests ont permis de révéler que les effecteurs Dot/Icm de *L. pneumophila* pouvaient être sécrétés dès le contact bactérie /cellule (LegK4) ou après plusieurs heures d'infection (SidM). Ces effecteurs sont également sécrétés de manière brève (LegK4) ou sur une plus longue période (SidM).

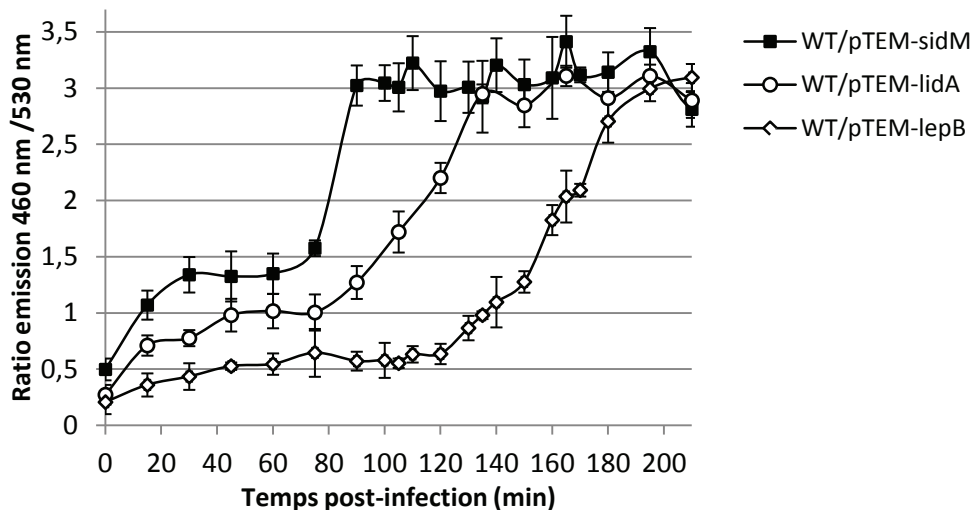


Figure 65 : Les effecteurs agissant séquentiellement sur la biogenèse de la LCV sont sécrétés successivement (Allombert *et al.*, en préparation).

Au cours du cycle infectieux de *L. pneumophila*, les effecteurs SidM, LidA et LepB contrôlent séquentiellement la petite GTPase cellulaire Rab1 afin de permettre le recrutement de RE sur la LCV (contexte bibliographique chap. 1.5.3.). Les cinétiques de translocation de ces effecteurs montrent la même séquentialité au niveau de leur sécrétion, corrélant ainsi leurs fonctions et l'ordre de leur translocation dans le cytosol de la cellule hôte.

Conclusions et Perspectives

Cette étude est la première démonstration concrète du détournement du cytosquelette d'actine cellulaire par la bactérie pathogène *Legionella pneumophila* au profit de son cycle infectieux. En effet, deux groupes ont montré au cours de ma thèse que des effecteurs du SST4 Dot/Icm de *Legionella* pouvaient moduler *in vitro* la polymérisation d'actine, plus précisément VipA en l'activant, et Ceg14/SidL en l'inhibant (Franco *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2014). Cependant, aucun d'entre eux n'a démontré ces activités au cours du cycle infectieux de la bactérie, ni identifié l'étape du cycle infectieux contrôlée par ces activités. Nos travaux apportent eux l'évidence d'une inhibition de la polymérisation d'actine du complexe ARP2/3 au niveau des LCVs, via l'activité kinase de l'effecteur LegK2, afin d'empêcher la fusion des endosomes/lysosomes avec la vacuole.

Il serait maintenant intéressant d'étudier la relation, synergique ou antagoniste, qui pourrait exister entre LegK2, VipA et Ceg14/SidL. Tout d'abord, la cinétique de translocation de chacun des trois effecteurs devra être établie. Récemment, il a été montré au laboratoire que la sécrétion des effecteurs par le SST4 Dot/Icm est très finement contrôlée, s'étalant de quelques minutes à plusieurs heures post-infection en fonction des effecteurs concernés, et que cette cinétique de sécrétion pouvait être corrélée à la fonction et à l'étape du cycle infectieux contrôlée par l'effecteur considéré (figure 64 et 65). Nous pourrions donc déterminer si LegK2, VipA et Ceg14/SidL sont sécrétés en même temps, ce qui serait en faveur d'un rôle dans le contrôle de la même étape du cycle infectieux. Des données préliminaires semblent au contraire suggérer des rôles dans des étapes différentes en ce qui concerne LegK2 et VipA, étant donné qu'ils semblent sécrétés respectivement de manière précoce et tardive (figure 66). De plus, nous observerons en microscopie confocale la localisation de ces effecteurs après sécrétion dans le cytoplasme de la cellule hôte. Alors que nous avons démontré au cours de ma thèse que LegK2 était adressé à la surface de la LCV à 15 min post-infection, VipA a été décrit comme co-localisant avec les endosomes précoces et non avec la LCV à 8 h post-infection (Franco *et al.*, 2012), et aucune donnée n'est actuellement disponible concernant la localisation de Ceg14/SidL au cours du cycle infectieux. Par ailleurs, l'étude de simple, double et triple mutants délétés des gènes codant ces protéines sera primordiale pour explorer une éventuelle redondance ou synergie fonctionnelle entre ces effecteurs, à la fois pour la répllication intracellulaire des souches correspondantes et pour le contrôle du réseau d'actine des cellules hôtes. Les simples, doubles et triples mutants ont d'ores et déjà été construits grâce à une nouvelle stratégie de recombinaison homologue développée au laboratoire, basée sur l'inactivation du gène par insertion d'une cassette de résistance à un antibiotique, ensuite éliminée pour aboutir à la délétion totale et sans cicatrice des gènes correspondants (figure 67). Cette technique présente l'avantage supplémentaire de

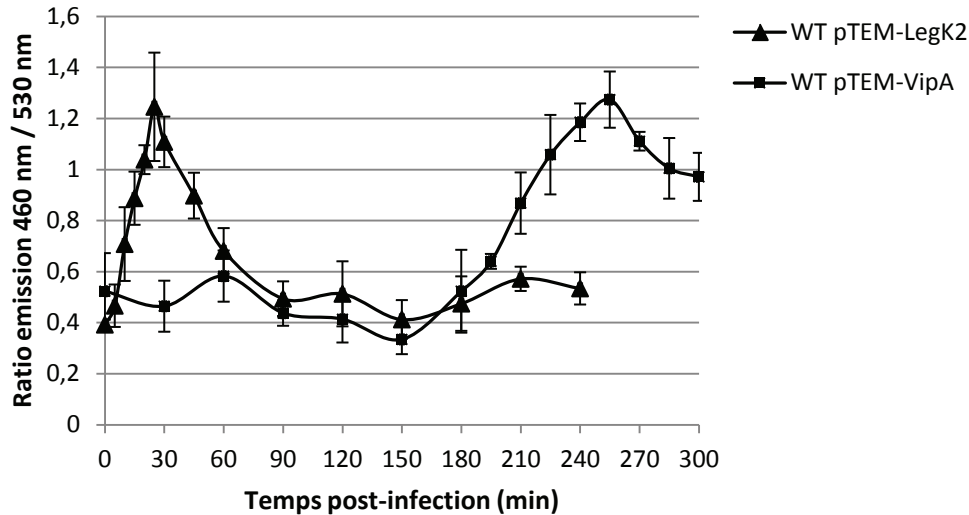


Figure 66 : Cinétique de translocation des effecteurs LegK2 et VipA.

Suivi de la translocation en temps réel des effecteurs LegK2 et VipA fusionnés à la β -lactamase lors d'infection de macrophages U397 par *L. pneumophila*.

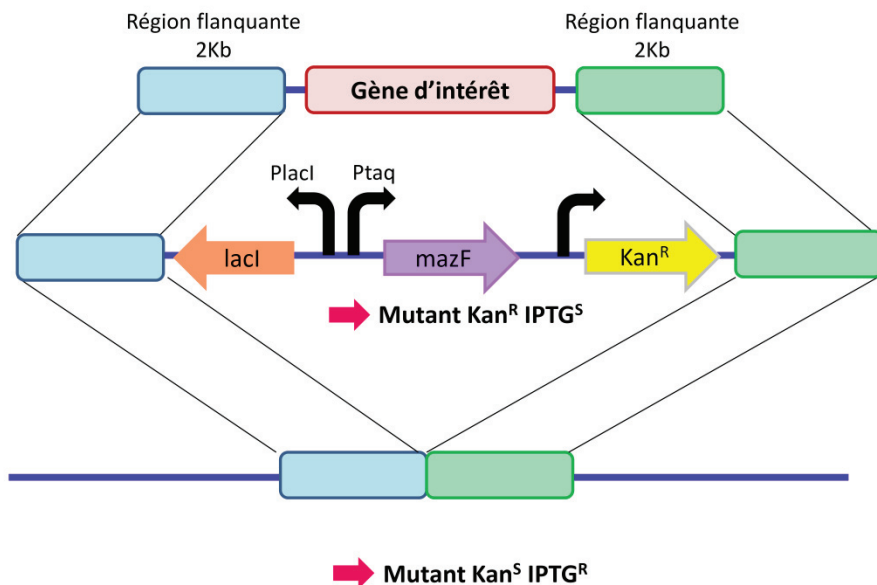


Figure 67 : Principe de la nouvelle technique de construction de mutants chez *L. pneumophila* par recombinaison homologue.

La technique de construction de mutants mise au point au laboratoire repose sur la sélection successive de deux événements de recombinaison homologue : dans un premier temps, sont sélectionnés les événements d'insertion d'une cassette contenant un gène suicide *mazF* sous le contrôle d'un promoteur inducible *Ptac* et un gène conférant une résistance à un antibiotique (ici la kanamycine) à la place du gène que l'on souhaite déléter ; puis, dans un second temps, sont sélectionnés les événements d'excision de la cassette précédemment insérée. Cette excision ne laisse pas de cicatrice sur le chromosome.

permettre de réintroduire le gène sauvage ou muté au site d'inactivation, afin de réaliser des tests de complémentation fonctionnelle chromosomique. Les différentes souches correspondantes à la complémentation des simples, doubles ou triples mutants sont en cours de construction. La multiplication intracellulaire des mutants et des souches complémentées sera tout d'abord suivie. Compte tenu du rôle que nous avons établi pour LegK2 dans l'échappement à la voie endocytaire, mais également de la co-localisation décrite de VipA avec les endosomes précoces, une attention particulière sera apportée à la capacité de ces mutants à échapper à la dégradation par la voie endosomale. Nous analyserons également en détail les propriétés des LCVs générées par ces mutants, en particulier la présence d'actine polymérisée à leur surface.

Il est également important de rappeler que *L. pneumophila* sécrète approximativement trois cents effecteurs dont moins de 20% ont été fonctionnellement caractérisés à ce jour. Il est donc possible que *Legionella* sécrète d'autres effecteurs ciblant le cytosquelette d'actine. Cette hypothèse est à envisager dans la mesure où un double mutant $\Delta ceg14\Delta vipA$ construit dans une des études précédentes ne présente pas de défaut de répllication intracellulaire (Guo *et al.*, 2014). Ce résultat suggère soit que ces effecteurs interviennent dans le contrôle de la même voie que celle contrôlée par LegK2, et que LegK2 joue un rôle majeur dans ce contrôle, soit qu'ils interviennent sur une autre voie et/ou à une autre étape du cycle infectieux impliquant éventuellement d'autres effecteurs. Les phénotypes que nous observerons pour le triple mutant $\Delta legK2\Delta ceg14\Delta vipA$ seront déterminants pour trancher entre ces différentes hypothèses.

Nos travaux présentent le premier effecteur bactérien connu pour inhiber le complexe nucléateur d'actine ARP2/3, et ce, par le biais d'une modification post-traductionnelle majeure, la phosphorylation. LegK2 s'ajoute donc à la liste encore peu documentée des STPKs bactériennes qui interfèrent avec les voies cellulaires au bénéfice de la bactérie, et pour lesquelles la cible cellulaire a été clairement identifiée. En effet, seules les cibles cellulaires de YpkA de *Yersinia* spp. (Lee *et al.*, 2015; Navarro *et al.*, 2007), SteC de *S. enterica* serovar Typhimurium (Odendall *et al.*, 2012; Poh *et al.*, 2008), OspG de *Shigella* spp. (Grishin *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2005), NleH1 et NleH2 des EPEC et EHEC (Gao *et al.*, 2009; Royan *et al.*, 2010), et enfin LegK1 de *L. pneumophila* (Ge *et al.*, 2009) ont été identifiées. De façon frappante, mais peut-être fortuite en raison du petit nombre d'exemples disponibles, ces effecteurs, y compris LegK2, ciblent soit le cytosquelette d'actine, soit la voie NF- κ B. Analyser les propriétés fonctionnelles de LegK2 pourrait contribuer de façon importante à la connaissance de ces STPKs bactériennes, mais également à la compréhension des mécanismes moléculaires, comme la phosphorylation, qui contrôlent l'activité du complexe ARP2/3. A ce jour, seuls les sites de phosphorylation de la sous-unité ARP2 par la protéine kinase cellulaire NIK, et de la sous-unité ARPC1B par la protéine kinase cellulaire PAK1, ont été identifiés (LeClaire *et al.*, 2015;

Vadlamudi *et al.*, 2004). Dans les deux cas, leur phosphorylation favorise l'activation de la fonction nucléatrice d'actine du complexe. Nos différentes tentatives visant à identifier les acides aminés d'ARP2/3 phosphorylés par LegK2 n'ont pas abouti, probablement en raison de la faible proportion de complexe phosphorylé dans nos conditions expérimentales. Afin d'affiner notre compréhension de la relation entre LegK2 et ARP2/3, une étude structure/fonction sera réalisée en collaboration avec le Pr. M. Cygler (Université de Saskatchewan, Saskatoon, Canada). La détermination de la structure tridimensionnelle de LegK2 a été initiée. Nous n'avons pas réussi à obtenir de cristaux de la protéine entière. Par contre, le domaine non catalytique C-terminal de LegK2 a été cristallisé et sa structure a été obtenue. Ce domaine ne présente aucune homologie de séquence avec une protéine connue, ce qui ne nous permet pas de prédire sa fonction. Très prochainement, nous allons établir le rôle de ce domaine dans l'interaction de LegK2 avec le complexe ARP2/3 et dans l'adressage de LegK2 à la LCV au cours de l'infection. Nous avons également initié des essais de cristallisation du domaine catalytique de LegK2. La détermination de la structure tridimensionnelle de ce domaine kinase apporterait de nombreuses informations sur l'évolution des STPKs chez les bactéries pathogènes.

LegK2 est également à ce jour le premier effecteur bactérien remodelant le cytosquelette d'actine cellulaire pour échapper à la dégradation endocytaire. En effet, même si d'autres études ont proposé que *Mycobacterium* modulait le réseau d'actine à cette fin, aucune protéine bactérienne n'a encore été impliquée. De plus, il persiste une forte controverse sur l'effet de cette manipulation du cytosquelette d'actine par *Mycobacterium* concernant l'échappement de la bactérie à la voie endocytaire (Guérin & de Chastellier, 2000; Kolonko *et al.*, 2014). Par ailleurs, le nombre important d'interactants potentiels générés par le crible double-hybride contre LegK2 laisse penser que LegK2 pourrait jouer d'autres rôles au cours du cycle infectieux. L'idée d'une double fonction pour LegK2 est cohérente avec de récentes données démontrant que la protéine bactérienne ActA assume de nombreux rôles au cours du cycle infectieux de *Listeria monocytogenes*. En plus d'être un facteur clé pour la formation des « comètes d'actine » des bactéries, ActA permet l'agrégation des bactéries participant ainsi à la formation des biofilms et à la colonisation intestinale, et elle est aussi impliquée dans l'échappement à l'autophagie (Travier *et al.*, 2013; Yoshikawa *et al.*, 2009). Le crible double-hybride avec LegK2 met notamment en avant une autre voie des cellules eucaryotes qui pourrait être la cible de la kinase bactérienne, la régulation de l'apoptose. Il serait donc intéressant de déterminer si LegK2, en plus de son activité d'inhibition de la voie endocytaire par ARP2/3, serait capable de moduler la mort cellulaire par apoptose. Une approche similaire à celle réalisée dans cette étude pourrait ainsi être entreprise dans ce but.

Finalement, bien que la délétion des gènes codant les autres protéines kinases de *L. pneumophila* n'ait pas entraîné de défaut marqué de réplication intracellulaire, il serait intéressant de mener à bien des études similaires à celle réalisée pour LegK2 afin de caractériser ces autres STPKs (Hervet *et al.*, 2011). Le très grand nombre d'effecteurs du SST4 Dot/Icm aboutit à une redondance fonctionnelle importante entre ces effecteurs, et il est donc courant que l'inactivation d'un seul gène d'effecteur n'aboutisse à aucun phénotype de croissance intracellulaire. Cela a notamment été le cas pour la kinase LegK1, dont le mutant de délétion ne présente aucun défaut de virulence mais qui a été montré comme activant l'expression de gènes anti-apoptotiques via l'activation de la voie NF- κ B (Ge *et al.*, 2009). Les rôles de LegK3 et LegK4 restent donc à caractériser pour mieux comprendre le rôle joué par les STPKs de *Legionella pneumophila*.

Fiches techniques

1. Fiche technique 1 : Souches

Souches	Génotypes	références
<i>Dictyostelium discoideum</i>		
DBS0235534	AX2-214	(Watts & Ashworth, 1970)
<i>Acanthamoeba castellanii</i>		
	Isolat environnemental	
Cellules de mammifère		
HEK293T		INSERM U1111, Lyon, France
HeLa		INSERM U1111, Lyon, France
HeLa CCL-2		ATCC
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
AH109	<i>MATα, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1UAS-GAL1TATA-HS3, MEL1 GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2, URA3::MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ</i>	Clontech
Y187	<i>MATα, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, met-, gal80Δ, MEL1, URA3::GAL1UAS-GAL1TATA-lacZ</i>	Clontech
<i>Escherichia coli</i>		
XL1-Blue	<i>endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F' [::Tn10 proAB+ lacIq Δ(lacZ)M15] hsdR17(rK- mK+)</i>	Stratagene
BL21(DE3)(pREP4-groESL)	<i>F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])</i>	(Amrein et al., 1995)
NEB 5-alpha (High Efficiency)	<i>fhuA2Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	BioLabs
<i>Legionella pneumophila</i>		
CIP 108286	Virulent <i>L. pneumophila</i> serogroup 1, strain Lens	(Cazalet et al., 2004)
Δ dotA	Lens <i>lpl2613::Km</i>	(Ferhat et al., 2009)
Δ legK2	Lens <i>lpl2066::Km</i>	(Hervet et al., 2011)
<i>Listeria monocytogenes</i>		
EGDe.PrfA*		BUG 3057

2. Fiche technique 2 : Plasmides

Plasmides	Caractéristiques	Références
Vecteurs donneurs pour la technologie Gateway		
pDONR TM 207	vecteur donneur Gateway	Invitrogen
pDONR TM 207- <i>legK1</i>	vecteur donneur Gateway avec insertion du gène <i>lpl1545</i>	Cette étude
pDONR TM 207- <i>legK2</i>	vecteur donneur Gateway avec insertion du gène <i>lpl2066</i>	Cette étude
pDONR TM 223-ARPC1B	vecteur donneur Gateway avec insertion du gène ARPC1B humain	INSERM U1111, Lyon, France
pDONR TM 223-ACTR3	vecteur donneur Gateway avec insertion du gène ACTR3 humain	INSERM U1111, Lyon, France
Vecteurs d'expression Gateway pour les levures		
pGBKT7	Vecteur d'expression Gateway pour les levures permettant la surexpression d'une protéine fusionnée à BD	Clontech
pGBKT7- <i>legK1</i>	pGBKT7 avec insertion du gène <i>lpl1545</i> pour surexpression de la protéine fusion BD-LegK1	Cette étude
pGBKT7- <i>legK2</i>	pGBKT7 avec insertion du gène <i>lpl2066</i> pour surexpression de la protéine fusion BD-LegK2	Cette étude
pACT2	Vecteur d'expression Gateway pour les levures permettant la surexpression d'une protéine fusionnée à AD	Clontech
pACT2-ARPC1B	pACT2 avec insertion du gène ARPC1B humain pour surexpression de la protéine fusion AD-ARPC1B	Cette étude
pACT2-ACTR3	pACT2 avec insertion du gène ACTR3 humain pour surexpression de la protéine fusion AD-ACTR3	Cette étude
Vecteurs d'expression Gateway pour les cellules de mammifères (HEK293T, HeLa et HeLa CCL-2)		
pDEST27	Vecteur d'expression Gateway pour les cellules de mammifère permettant la surexpression d'une protéine fusionnée au tag GST	Invitrogen
pDEST27- <i>legK2</i>	pDEST27 avec insertion du gène <i>lpl2066</i> pour surexpression de la protéine fusion GST-LegK2	Cette étude
pDEST27- <i>legK2</i> _{K112M}	pDEST27 avec insertion du gène <i>lpl2066</i> _{K112M} pour surexpression de la protéine fusion GST-LegK2 _{K112M}	Cette étude
pCI-Neo3Flag	Vecteur d'expression Gateway pour les cellules de mammifère permettant la surexpression d'une protéine fusionnée au tag 3flag	Invitrogen
pCI-Neo3Flag-ARPC1B	pCI-Neo3Flag avec insertion du gène ARPC1B humain pour surexpression de la protéine fusion 3Flag-ARPC1B	Cette étude
pCI-Neo3Flag-ACTR3	pCI-Neo3Flag avec insertion du gène ACTR3 humain pour surexpression de la protéine fusion 3Flag-ARP3	Cette étude
peGFP	Vecteur d'expression Gateway pour les cellules de mammifère permettant la surexpression d'une protéine fusionnée au tag eGFP	INSERM U1111, Lyon, France
peGFP- <i>legK2</i>	peGFP avec insertion du gène <i>lpl2066</i> pour surexpression de la protéine fusion GFP-LegK2	Cette étude
peGFP- <i>legK2</i> _{K112M}	peGFP avec insertion du gène <i>lpl2066</i> _{K112M} pour surexpression de la protéine fusion GFP-LegK2 _{K112M}	Cette étude
Plasmides d' <i>E. coli</i> permettant la surproduction de protéines taggées		

pGEX- <i>legK2</i>	pGEX-6P-3 avec le gene <i>lpl2066</i> inséré dans les sites BamHI-Sall pour surproduction de la protéine fusion GST-LegK2	(Hervet et al., 2011)
Plasmides de <i>L. pneumophila</i>		
pXDC50	Plasmide d'expression pour <i>L. pneumophila</i> permettant la surexpression de la protéine fluorescente mCherry	(Hervet et al., 2011)
<i>plegK2</i>	pXDC50 avec le gène <i>lpl2066</i> inséré sous le contrôle de son propre promoteur (400 bp) dans les sites SphI	(Hervet et al., 2011)
<i>plegK2cat</i>	pXDC50 avec le gène <i>lpl2066</i> _{K112M/D209N} inséré sous le contrôle de son propre promoteur (400 bp) dans les sites SphI	Cette étude
pMMB207c-HA*4	Plasmide d'expression pour <i>L. pneumophila</i> dérivé du pXDC61 avec le gène <i>blaM</i> remplacé par le tag 4HA	(Dolezal et al., 2012)
p4HA- <i>legK2</i>	pMMB207c-HA*4 avec insertion du gène <i>lpl2066</i> dans les sites BamHI-KpnI pour coder une protéine fusion HA-LegK2	Cette étude

3. Fiche technique 3 : Amorces

Amorces utilisées pour la création des mutants catalytiques de LegK2

	Nom	Séquence	Description
1	<i>legK2</i> _{K112M} ⁻ sens	CCCAAAGAGAATATACTGATGGTTTTATATCAAATTTTAGTAATGTCG	Insertion de la mutation K112M dans le gène <i>legK2</i>
2	<i>legK2</i> _{K112M} ⁻ rev	CGACATTACTAAAATTTTGATATAAAACCATCAGTATATTCTCTTTGGG	
3	<i>legK2</i> _{D209N} ⁻ sens	CATAACAAAGGCTACGCCCATGGCAATTTAACTTTCAAAATATTTTATA	Insertion de la mutation D209N dans le gène <i>legK2</i>
4	<i>legK2</i> _{D209N} ⁻ rev	TATAAAATATTTTGGAAAGTTAAATTGCCATGGGCGTAGCCTTTGTTATG	

Amorces utilisées pour la création des vecteurs donneurs Gateway

	Nom	Séquence	Description
5	GW5- <i>legK1</i>	GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCATGCCTCGTACAATGTTTTTTCC	Insertion de <i>legK1</i> dans le vecteur pDONR207
6	GW3- <i>legK1</i>	GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGTACTCAGCCACTAACCATAAGGC	
7	GW5- <i>legK2</i>	GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCATGGTTTATTACATAAATTTGAAGG	Insertion de <i>legK2</i> dans le vecteur pDONR207
8	GW3- <i>legK2</i>	GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGTTAGCTTGGGCCTCGCATC	

4. Fiche technique 4 : Milieux de culture et conditions de croissance des bactéries

4.1. Conditions de cultures

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 µg.mL⁻¹), en ampicilline (100 µg.mL⁻¹), en spectinomycine (100 µg.mL⁻¹) ou en kanamycine (50 µg.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.

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.

- ~ 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) 10g.L⁻¹; extrait de levure (Merck 1.03753.0500) 10g.L⁻¹; Agar (Bacto Agar 20768.292) 15g.L⁻¹; charbon (Sigma C3790) 2g.L⁻¹; L-cystéine (Roth 1693-2) 0,4g.L⁻¹ et nitrate de fer (Sigma 10111572) 0,25g.L⁻¹, ajusté à pH 6.9 avec du KOH 10M.

Les milieux CYE, LGM 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 (24 h 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).

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 suppléments en nitrate de fer et cystéine des milieux CYE sont stérilisés par filtration sur une membrane Millipore 0.45 µm.

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 liquideensemencée la veille.
- ~ *L. pneumophila* : Les différentes souches *L. pneumophila* Lens construites sont conservées à -80°C dans des cryotubes à billes (Roti-store, Carl Roth).

5. Fiche technique 5 : Milieux et conditions de culture des cellules eucaryotes

5.1. Milieux de culture

5.1.1. Dictyostelium discoideum

Les amibes *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, Na₂HPO₄.12H₂O 0.64 g.L⁻¹, KH₂PO₄ 0.48 g.L⁻¹, ajusté à pH6.5).

Lors des cultures d'entretien de routine au laboratoire, l'ajout d'un mélange d'antibiotiques (pénicilline 66 µg.mL⁻¹ et streptomycine 100 µg.mL⁻¹ (Gibco)) permet d'obtenir des cultures axéniques (c'est-à-dire dépourvues de germes).

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.

La stérilisation de ces deux milieux se fait par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

5.1.2. Cellules de mammifère : HEK293T et HeLa

Les cellules de mammifère sont cultivées en milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Gibco) supplémenté en sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté à hauteur de 10%.

Lors des cultures d'entretien des HEK293T et HeLa, l'ajout de gentamycine (50 µg.mL⁻¹) évite les contaminations bactériennes.

5.1.3. Saccharomyces cerevisiae

Les souches de levure *S. cerevisiae* AH109 et Y187 sont cultivées en milieu riche YPD (Yeast extract, Peptone, Dextrose : extrait de levure 1 % ; peptone 2 % ; glucose 2 % ; adénine 0,004 %) ou en milieu synthétique SD (Synthetic Dextrose : yeast nitrogen base 1,7 g.L⁻¹ ; (NH₄)₂SO₄ 5 g.L⁻¹). L'utilisation du milieu SD nécessite l'ajout d'acides aminés appropriés à la manipulation réalisée. Ces milieux peuvent être utilisés sous forme de milieu liquide ou sous forme de milieu gélosé par ajout d'agar.

La stérilisation des milieux YPD et SD se fait par autoclave à 120°C pendant 20 min. Les acides aminés sont stérilisés par filtration et ajoutés au milieu SD une fois qu'il est redescendu vers les 65°C.

5.2. Conditions de culture

Toutes les cultures de cellules eucaryotes sont réalisées en laboratoire L2 sous PSM.

Les cultures de *D. discoideum* se font dans des boîtes 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 boîte de Pétri contenant 10 mL de milieu HL5.

Les cultures de cellules adhérentes HEK293T et HeLa sont réalisées dans des flasques contenant 10 ou 25 mL de DMEM supplémenté en SVF décomplémenté à hauteur de 10% à une température de 37°C et dans une atmosphère contenant 5% de CO₂ pour les HEK293T et HeLa. L'entretien de ces cellules est effectué deux à trois fois par semaine, suivant la confluence des tapis cellulaires observée au microscope inversé. Lorsque les cellules ont atteint une confluence minimum de 70-80%, le milieu est délicatement retiré de la flasque. Les cellules sont précautionneusement rincées avec du PBS incomplet (sans Ca²⁺ et Mg²⁺) en faisant attention à ne pas les décoller. Les cellules sont ensuite décollées par une incubation de 5 min à 37°C sous 5% de CO₂ avec de la trypsine 1X. Les cellules sont récoltées dans un falcon contenant du milieu DMEM-10% SVF afin de neutraliser les effets de la trypsine, avant d'être centrifugées 5 min à 300g. Le culot de cellules est repris dans 5 mL de DMEM-10% SVF et 1 mL de cette préparation de cellules est placé dans une nouvelle flasque contenant 25 mL de DMEM-10%SVF.

Les cultures liquides de levures sont effectuées sous agitation en aérobiose à 30°C. Les cultures sur milieux gélosés sont également incubées à 30°C. La durée d'incubation varie suivant les expériences menées (24 h à 5 jours).

Les amibes et cellules de mammifère sont dénombrées à l'aide d'une cellule de Malassez dans le but de calibrer précisément la quantité de cellules utilisées pour chaque expérience.

6. Fiche technique 6 : Techniques de biologie moléculaire

6.1. Préparation de l'ADN

6.1.1. Extraction de l'ADN chromosomique chez *L. pneumophila*

L'extraction chromosomique est effectuée à partir d'une culture obtenue sur un quart de boîte 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 chromosomique 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.

6.1.2. Extraction 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 µg.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 incubés 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.

Les ADNs plasmidiques utilisés pour les transfections de cellules de mammifère ont été extraits avec les kits de purification de plasmides Qiagen, « Plasmid or Cosmid Midi and Maxi kits »

ou « Plasmid or DNA purification using QIAGEN plasmid Cosmid DNA purification using QIAGEN plasmid Mini kit », en fonction de la taille de l'échantillon. Ce système repose sur la fixation de l'ADN à une colonne de silice, évitant ainsi toute trace de phénol dans les échantillons.

6.2. Amplification de fragments d'ADN 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 egradient ».

6.2.1. PCR avec la polymérase DreamTag®

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 MgCl₂.

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 T_m correspond à la température d'hybridation calculée sur le site de finnzymes (https://www.finnzymes.fi/tm_determination.html). La température d'hybridation (T_m-5°C) doit être comprise entre 60°C et 72°C.

6.2.2. 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	
	Elongation	30 sec/kb	72°C	
Elongation finale		10 min	72°C	1

Le T_m correspond à la température d'hybridation calculée sur le site de finzymes (https://www.finzymes.fi/tm_determination.html). La température d'hybridation ($T_m+3^\circ\text{C}$) doit être comprise entre 60°C et 72°C .

6.3. Mutagenèse dirigée de l'ADN plasmidique

La mutagenèse dirigée est réalisée grâce au kit « QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit » (Stratagene). Des amplifications par PCR utilisant les paires d'amorces 1/2 ou 3/4 sur les plasmides parentaux matrices permettent la synthèse de plasmides mutés codant pour la protéine-kinase LegK2 substituée sur la lysine invariable K112 et/ou sur l'aspartate D209. Les plasmides parentaux méthylés sont éliminés grâce à une digestion par l'enzyme de restriction DpnI. Le mélange de digestion est utilisé pour transformer des cellules compétentes d'*E. coli* XL1-blue fournies dans le kit. La présence de la mutation sur les plasmides des transformants est vérifiée par séquençage.

6.4. 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 $20\ \mu\text{L}$. Ces digestions ont été réalisées sur de l'ADN plasmidique ou sur des produits de PCR.

Pour cela, 2 à $5\ \mu\text{L}$ d'ADN sont ajoutés à un mélange comprenant $1\ \mu\text{L}$ d'enzyme appropriée à $10\ \text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ (Fermentas ou Biolabs) et $2\ \mu\text{L}$ de tampon adéquat (fourni avec l'enzyme). Dans le cas d'une double digestion, le tampon doit être compatible avec les deux enzymes utilisées ($1\ \mu\text{L}$ 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.

6.5. 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 ($1\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 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 $5\ \mu\text{L}$ 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, $5\ \mu\text{L}$ 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. Purification des fragments d'ADN

La purification permet d'éliminer les sels, les nucléotides et les enzymes 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 amplification et digestion avant la ligation). 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.

6.7. Ligation 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 ligation 10X (fourni avec l'enzyme), des deux solutions à ligaturer (rapport 1 pour 5 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.

6.8. Clonage par la technologie Gateway®

La technologie Gateway® (Invitrogen) s'appuie sur les propriétés de recombinaison homologue du bactériophage λ au niveau des sites spécifiques *att*, qu'il utilise naturellement pour s'intégrer dans le génome d'*E. coli* (Landy, 1989). Ce système permet de réaliser des clonages en s'affranchissant des étapes de restriction-ligation obligatoires lors d'un clonage classique. Il permet également l'obtention de clones contenant forcément le gène d'intérêt correctement orienté. Cette technique est composée de deux réactions, avec tout d'abord la construction d'un vecteur donneur par une réaction dite « BP », qui sert ensuite à transférer le gène d'intérêt dans les vecteurs d'expression désirés via une réaction « LR ». Cette technique est réalisée en suivant les recommandations du fournisseur (Invitrogen).

6.8.1. Réaction « BP »

La réaction « BP » nécessite préalablement d'avoir amplifié par PCR le gène d'intérêt, comme précédemment décrit, avec des amorces spécifiques portant les séquences *attB* adéquates aux séquences *attP* du plasmide donneur utilisé (amorces 5/6 et 7/8).

La réaction « BP » permet le transfert du gène d'intérêt amplifié dans un vecteur donneur d'entrée. Elle est réalisée en mélangeant 150 ng de produit PCR *attB-legK* avec 150 ng de vecteur

d'entrée pDONR™207, en présence de 2 µL d'enzyme Gateway® BP Clonase® II Enzyme Mix, dans un volume final de 10 µL de tampon TE pH8. Ce mix est incubé 1h à 25°C. Ensuite, 1 µL de ce mix incubé est utilisé pour transformer des bactéries *E. coli* DH5α ultracompétentes (Biolabs) par choc thermique. Les clones recombinants sont sélectionnés et les constructions réalisées sont purifiées et vérifiées par séquençage.

6.8.2. Réaction « LR »

La réaction « LR » permet le transfert de l'insert du vecteur d'entrée vers le vecteur d'expression de destination. Cette réaction se fait en mélangeant 150 ng de vecteur d'entrée (pDONR-gène) avec 150 ng de vecteur de destination (pGBKT7 ou pACT2 ou pDEST27 ou pCI-Neo3Flag ou pEGFP), en présence de 2 µL d'enzyme Gateway® LR Clonase® II Enzyme Mix, dans un volume final de 10 µL de tampon TE pH8. Elle est incubée 1h à 25°C avant que 1 µL ne soit utilisé pour transformer des bactéries *E. coli* DH5α ultracompétentes (Biolabs). Les clones recombinants sont sélectionnés et les vecteurs d'expression sont amplifiés par préparation d'ADN plasmidique.

7. Fiche technique 7 : Transformation des bactéries et des levures

7.1. Transformation d'*E. coli*

7.1.1. Préparation de cellules compétentes

Les cellules compétentes d'*E. coli* sont obtenues par traitement au CaCl₂.

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 CaCl₂ 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 CaCl₂ 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.

7.1.2. Transformation

La transformation des bactéries traitées au CaCl₂ est réalisée avec 150µL de bactéries compétentes, décongelées sur la glace, et 15µL 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.

La transformation des bactéries ultracompetentes de Biolabs (C2987H) est réalisée avec un tube de 50 µL de bactéries ultracompetentes, décongelées sur glace et 1 µL de réaction Gateway. Le mélange est incubé 30 min dans la glace avant de subir un choc thermique de 30 sec à 42°C. Suite à une nouvelle incubation de 5 min dans la glace, les bactéries transformées sont reprises dans 950 µL de milieu SOC afin d'effectuer une culture d'expression d'1h à 37°C sous forte agitation. Les transformants sont sélectionnés par étalement sur un milieu GL supplémenté avec les antibiotiques adaptés.

7.2. Transformation de *L. pneumophila*

7.2.1. Préparation des cellules électrocompétentes

Trois jours à l'avance, *L. pneumophila* (Lens ou Paris) estensemencée 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 électrocompétentes ainsi obtenue est répartie par 100µL. Les aliquots sont congelés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

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 soumise 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.

7.3. Analyse des transformants bactériens

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 (paragraphe 6.1.2 et 6.4).

7.4. Transformation de levures *S. cerevisiae*

7.4.1. Préparation de cellules compétentes

A partir d'une préculture saturée, les levures sont ensemencées à $DO_{600} = 0,2$ dans 50 mL de milieu YPD et mises en culture à 30°C jusqu'à ce que la DO_{600} atteigne une valeur comprise entre 0,6 et 0,8. Les cellules sont récoltées par centrifugation 3 min à 1300 g et lavées dans 10 mL d'eau stérile. Le culot est ensuite repris dans 5 mL d'une solution LiAc/TE (LiAc 100 mM ; EDTA 1 mM ; Tris HCl 10 mM pH 7,5) et centrifugé 3 min à 1300 g. Le culot final est concentré dans 1 mL de LiAc 1 M.

7.4.2. Transformation

La transformation de 80 µL de levures compétentes est réalisée par addition de 5 µL d'ADN dénaturé de sperme de saumon, de 1 à 2 µg (≤ 4 µl) de vecteur, 6 µL de DMSO et 300 µL de LiAc/TE/PEG (LiAc/TE ; PEG 4000 40 %). Après mélange par inversion, les tubes sont incubés 30 min à 30°C puis soumis à un choc thermique 15 min à 42°C. La totalité des cellules transformées est étalée sur milieu SD dépourvu des acides aminés adéquats puis incubée 2 à 3 jours à 30°C. La souche AH109 est utilisée pour la transformation avec les vecteurs pGBKT7 et la souche Y187 est transformée par les vecteurs pACT2.

8. Fiche technique 8 : Transfection des cellules de mammifère

8.1. Transfection des cellules HEK293T

La veille de la transfection, 200 000 cellules pour la microscopie ou 1 500 000 cellules pour des IP sont déposées sur des lamelles de verres préalablement stérilisées ou directement dans des puits de plaque 6 puits contenant 2 mL de DMEM-10% SVF. 2 puits de 1 500 000 fibroblastes HEK293T sont utilisés pour chaque condition de l'IP. Après l'incubation d'une nuit à 37°C sous 5% de CO₂, un mélange de transfection préalablement préparé est ajouté aux cellules. Le mélange de transfection est composé d'un mix d'ADN et d'un mix de lipofectamine2000. Le mix d'ADN correspond à la dilution de 1500 ng de chaque vecteur à transférer dans un volume final de 250 µL de milieu OPTIMEM. Le mix lipofectamine2000 est composé de 5 µL de lipofectamine 2000 (Invitrogen) dilué dans 245 µL d'OPTIMEM. Les deux mix sont délicatement mélangés et homogénéisés avant d'être incubé 20 min à température ambiante. Le mélange des deux mix est finalement ajouté directement et délicatement dans les puits contenant les cellules à transfectées. Après 4 h d'incubation à 37°C sous 5% de CO₂, le milieu de culture est changé pour limiter la cytotoxicité de la lipofectamine 2000. Les fibroblastes sont ensuite incubés 20 h pour l'expression des différentes protéines.

8.2. Transfection des cellules HeLa

La veille de la transfection, 150 000 cellules HeLa sont déposées sur des lamelles de verres préalablement stérilisées dans des puits de plaque 6 puits contenant 2 mL de DMEM-10% SVF. Après l'incubation d'une nuit à 37°C sous 5% de CO₂, un mélange de transfection préalablement préparé est ajouté aux cellules. Le mélange de transfection est composé d'un mix d'ADN et d'un mix de lipofectamine2000. Le mix d'ADN correspond à la dilution de 2 µg de vecteur à transférer dans un volume final de 250 µL de milieu OPTIMEM. Le mix lipofectamine2000 est composé de 5 µL de lipofectamine 2000 (Invitrogen) dilué dans 245 µL d'OPTIMEM. Chaque mix est soigneusement homogénéisé et incubé 5 min à température ambiante. Les deux mix sont ensuite délicatement mélangés et homogénéisés avant d'être incubé 20 min à température ambiante. Le mélange des deux mix est finalement ajouté aux cellules à transfectées préalablement passées en milieu OPTIMEM. Après 4 h d'incubation à 37°C sous 5% de CO₂, les cellules sont rincées avec du PBS incomplet (-Ca²⁺ et -Mg²⁺). Les cellules transfectées sont finalement incubées 20 h en DMEM-10% SVF pour l'expression des différentes protéines.

9. Fiche technique 9 : Techniques biochimiques

9.1. Surproduction et purification de protéine possédant un tag GST

Les bactéries BL21 (pREP4*groESL*) qui contiennent un plasmide dérivé de pGEX-6P-3 permettent la surproduction de protéines recombinantes contenant un tag GST en N-terminal des protéines. Elles surproduisent également des protéines chaperonnes GroES et GroEL favorisant le repliement des protéines surproduites.

9.1.1. Production des protéines et extraction

Une colonie isolée est utilisée pour inoculer une préculture dans 5mL de LB contenant de l'ampicilline (sélection du pGEX) 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 1/50^{ème} 100mL de milieu LB +ampicilline + kanamycine. La croissance s'effectue jusqu'en phase de croissance exponentielle ($DO_{600nm} \approx 0.7$).

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. L'incubation des bactéries est alors poursuivie sous agitation pendant 4 h à 20°C. Après la nouvelle incubation, l'équivalent de 3.10^8 bactérie est prélevé et traité comme précédemment (extrait protéique total induit). Le reste des cellules est récupéré par centrifugation à 6000 g pendant 10 min à 4°C.

Le culot de cellules est lavé avec 10mL d'eau distillée froide puis les cellules sont resuspendues dans du PBS. Elles sont ensuite lysées par deux passages à la Presse de French. Les extraits sont ensuite centrifugés 30 min à 14 000 g à 4°C 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.

9.1.2. Purification des protéines

La purification s'effectue par une incubation de 4h à 4°C de l'extrait protéique (surnageant du paragraphe précédent) avec une résine de glutathion-agarose-4B (Macherey-Nagel) préalablement équilibrée avec du PBS. Les protéines non retenues sont éliminées par trois rinçages avec du PBS. L'élution de la protéine d'intérêt est réalisée avec un tampon (Tris HCl 50 mM pH 8,0 ; GSH 10 mM). 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 fractions contenant la protéine fusion d'intérêt 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 HCl 50 mM pH 7,5 ; NaCl 150mM, glycérol 10%) pendant une nuit à 4°C.

9.2. Préparation d'extraits protéiques de Légionelles afin de vérifier l'expression de protéines fusions

Des cultures de souches de *L. pneumophila* avec les plasmides dont on veut tester l'expression sont lancées à $DO_{600}=0,1$ en LGM + antibiotique et incubées 16h à 37°C sous agitation. L'expression du gène codant pour la protéine d'intérêt est alors induite par ajout d'IPTG à une concentration finale de 2 mM et les cultures sont de nouveau incubées à 37°C sous agitation pour 2h. Les DO_{600} des cultures sont mesurées puis ajustées à $DO_{600}=2$ avant de prélever 3 mL de chacune, permettant ainsi d'avoir une concentration bactérienne identique entre les échantillons. Les cultures prélevées sont centrifugées 10 min à 4500 rpm à température ambiante. Les culots de bactéries sont rincés 4 fois avec 30 mL d'eau distillée. Les culots sont finalement repris dans 250 μ L d'eau distillée et 250 μ L de tampon de dépôt SDS-PAGE 2X. Les échantillons sont conservés à -20°C avant analyse par SDS-PAGE et Western Blot avec des anticorps anti-HA.

9.3. Analyse des protéines

9.3.1. Dosage des protéines

Les protéines sont dosées par spectrophotométrie au Nanodrop 2000 (Thermo) à DO_{280nm} .

9.3.2. 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 leurs 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). 10 μ L de tampon de dépôt SDS-PAGE 2X sont ajoutés à 10 μ L d'échantillon protéique à analyser. Les protéines sont ensuite dénaturées par chauffage 5 min 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.

9.3.3. Coloration au Bleu de Coomassie

Les protéines sont fixées et colorées sur le gel par immersion de celui-ci pendant 20 min sous agitation douce dans une solution de coloration (acide acétique 10%, éthanol 40%, Bleu de Coomassie Brilliant 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%).

9.3.4. 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.

9.3.5. Immunorévélation de protéines sur membrane (Western Blot)

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 peroxydase 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 peroxydase. 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-GST	primaire	souris	1/3 000	/	13-6700 Invitrogen
Anti-Flag	primaire	souris	1/1 000	/	F1804 Sigma
Anti-phosphothéronine	primaire	souris	1/500	/	P6623 Sigma
Anti-HA	primaire	lapin	1/1 000	/	#3724 Cell Signalling
Anti-IgG de souris	secondaire	chèvre	1/5 000	Peroxidase	A0168 Sigma
Anti-IgG de lapin	secondaire	chèvre	1/5 000	Peroxidase	A-0545 Sigma

9.4. Test de partenaires protéiques

9.4.1. Double-hybride binaire en levure

Le double-hybride est basé sur une reconstitution d'un facteur transcriptionnel à la suite d'une interaction entre deux protéines. La séquence codant pour une protéine appât fusionnée au domaine de fixation à l'ADN d'un facteur de transcription est clonée dans un premier vecteur. Un second vecteur porte la séquence codant pour une protéine proie fusionnée au domaine d'activation du même facteur de transcription. Les deux constructions plasmidiques sont chacune transformées dans une souche de levure qui sont ensuite croisées pour obtenir des levure diploïdes avec les deux constructions. L'éventuelle interaction entre les protéines appât et proie permet la reconstitution du facteur de transcription fonctionnel qui peut activer la transcription d'un gène rapporteur tel que le gène histidine.

Les DO_{600} de précultures saturées de levures AH109(pGBKT7-*legK1* ou *-legK2*) et Y187(pACT2-ARPC1B/-ACTR3) ou (pACT2) sont ajustées à une valeur de 0,2. Les suspensions sont mélangées dans un rapport pGBKT7/pACT2 de 1 :1 (v/v). 5 μ L de ce mélange sont ensuite déposés sur milieu YPD gélosé et incubés la nuit à 30°C. Une réplique est réalisée sur milieu SD dépourvu de tryptophane et leucine (SD-W-L) pour la sélection des diploïdes et incubée une nuit à 30°C. Les diploïdes sont ensuite cultivés en culture liquide SD-W-L. Après une nuit d'incubation à 30°C, les DO_{600} des cultures de diploïdes sont ajustées à une valeur de 0,2 et 5 ou 50 μ L de ces dilutions sont déposés sur milieu SD-W-L et sur SD-W-L dépourvu d'histidine (SD-W-L-H) et supplémenté de 10 mM de 3-aminotriazole (3-AT), un inhibiteur compétitif du produit du gène HIS3, afin de tester l'auxotrophie des diploïdes envers l'histidine, retranscrivant le niveau d'interaction entre les protéines LegK et les sous-unités du complexe ARP2/3.

9.4.2. GST pull-down

Le GST-pull down est réalisé sur des cellules HEK293T co-transfectées avec les vecteurs pDEST27 ou pDEST27-*legK2* ou *-legK2*_{K112M} et pCI-Neo3Flag-ARPC1B ou -ACTR3, comme décrit dans le paragraphe 8.1. Après 24 h d'expression, les cellules sont rincées deux fois avec du PBS incomplet (-Ca²⁺, -Mg²⁺). La lyse cellulaire est ensuite réalisée par 15 min d'incubation à froid dans du tampon RIPA modifié froid (Tris pH7,4 50 mM ; NaCl 100 mM ; glycerol 10% ; NP40 1% ; inhibiteur de protéases). Les lysats cellulaires sont centrifugés 15 min à 4°C à 13 000 g afin de séparer les protéines membranaires et les protéines cytoplasmiques. Les lysats cellulaires sont incubés 4 h à 4°C sous agitation rotative sur des résines de glutathione-agarose-4B (Macherey-Nagel) préalablement

équilibrées en PBS. Les protéines non fixées sont éliminées par centrifugation de 2 min à 1000 g et les résines sont lavées 2 fois avec du PBS. Les protéines fixées sont directement décrochées et dénaturées des résines par ajout de 50 µL de tampon de dépôt SDS-PAGE 2X. Les fractions sont conservées à -20°C avant d'être analysées par SDS-PAGE et Western Blot avec des anticorps anti-GST pour détecter la forme active et la forme catalytique de LegK2 et des anticorps anti-Flag afin d'analyser l'interaction avec les sous-unités ARP-3Flag.

9.4.3. Co-localisation des protéines après expression en cellules de mammifère

La co-localisation par immunofluorescence est réalisée sur des cellules HEK293T transfectées ou co-transfectées avec les vecteurs pDEST27 ou pDEST27-*legK2/legK1* et/ou pCI-Neo3Flag-ARPC1B ou -ACTR3, comme décrit dans le paragraphe 8.1. 24 h post-transfection, les fibroblastes HEK293T déposés sur lamelles de verre sont lavés 2 fois en PBS, fixés 20 min à température ambiante avec du formaldéhyde 3,7% puis de nouveau lavés 3 fois en PBS1X. Une étape de saturation des groupements aldéhydiques libres est réalisée en incubant les cellules 2 fois pendant 10 min dans du PBS-0,1% glycine. Les cellules sont encore lavées en PBS avant de les perméabilisées avec du PBS-0.1% Triton X-100 durant 5 min. Après un nouveau lavage en PBS, les sites non spécifiques sont saturés pendant 15 min en PBS-1% BSA-3% SHN (sérum humain décomplémenté). Les lamelles sont incubées avec les anticorps primaires en PBS-1% BSA-3% SHN pendant 1 h. Les protéines 3Flag-ARPC1B et 3Flag-Arp3 sont visualisées avec des anticorps de souris anti-Flag couplés au fluorochrome Cy3 (Sigma A9594, 1/500). La protéine GST-LegK2 est marquée avec des anticorps de lapin anti-GST (Sigma A7340, 1/500). Les lamelles sont lavées 3 fois en PBS puis incubées avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-lapin couplé au fluorochrome AlexaFluor488 (Molecular Probes, A11034) au 1/1000^{ème} pendant 30 min afin de visualiser GST-LegK2. Après 3 nouveaux lavages, les lamelles sont montées dans du Dabco/Mowiol. Les observations sont réalisées sur un microscope confocal inversé (LSM510 Meta, Zeiss).

Les clichés de microscopie obtenus sont ensuite analysés avec le logiciel ImageJ (Institut national de santé). La co-localisation des marquages GST et 3Flag est évaluée en déterminant le coefficient de Pearson pour chaque cellule grâce au plugin JACoP. Ce coefficient de corrélation évalue à quel point les valeurs des pixels entre les 2 canaux d'une image varient ensemble ou en d'autres termes, détermine la relation linéaire qui existe entre l'intensité des pixels de ces 2 canaux. Ces valeurs sont comprises entre -1 et 1, sachant que 1 est une parfaite co-localisation des signaux détectés dans une cellule. Les signaux de 30 cellules par condition sont traités dans notre analyse et la conformité des coefficients obtenus est validée par une randomisation de Coste de 100%.

9.5. Test de phosphorylation

Les tests de phosphorylation réalisés dans cette étude sont basés sur une analyse par Western Blot avec un anticorps anti-phosphothréonine pour détecter la présence de résidus thréonine phosphorylés sur les protéines.

9.5.1. Test de phosphorylation *in vitro*

La protéine kinase LegK2 et son mutant catalytique sont surproduites et purifiées d'*E.coli* comme décrit dans la fiche technique 9.1. Le complexe ARP2/3 est purifié à partir d'amibes *Acanthamoeba castellanii* par Lawrence LeClaire (fiche technique 10.1.1). Les tests de phosphorylation *in vitro* sont effectués dans un milieu de phosphorylation (milieu 10X: Tris HCl 25 mM pH 7,5, MnCl₂ 5 mM, DTT 5 mM, cocktail inhibiteur de protéases) avec 100 µM d'ATP pour un volume final de réaction de 20 µL. 1 µg de GST-LegK2 ou GST-LegK2_{K112M} est ajouté pour phosphoryler 7,2 µg de complexe ARP2/3 préalablement déphosphorylé ou non par la phosphatase antarctique (fiche technique 10.1.2). Les réactions sont incubées 30 min à 37°C avant d'être arrêtée par du tampon de dépôt SDS-PAGE 5X ou d'être déphosphorylée par l'ajout de 10 U de phosphatase antarctique avec son tampon HipH (Tris 50 mM pH 8,0, Mg₂Cl₂ 1 mM, ZnCl₂ 0,1 mM). Cette nouvelle réaction est incubée 1 h à 30°C avant d'être arrêtée par du tampon de dépôt SDS-PAGE 5X. Les réactions sont analysées par Western Blot avec un anticorps anti-phosphothréonine pour détecter le niveau de phosphorylation des protéines.

9.5.2. Test de phosphorylation *in cellulo*

Les tests de phosphorylation *in cellulo* sont réalisés sur des cellules HEK293T transfectées uniquement avec les vecteurs pCI-neo3Flag-ARPC1B et -ACTR3 ou co-transfectées avec les vecteurs pCI-neo3Flag-ARPC1B ou -ACTR3 et pDEST27-*legK2* ou -*legK2*_{K112M}, comme décrit dans le paragraphe 8.1. Une immunoprécipitation des sous-unités d'ARP2/3 couplées 3-Flag est d'abord réalisée avec le kit Pierce® Crosslink Immunoprecipitation (Thermo scientific). Après 24 h d'expression, la lyse des cellules est réalisée en suivant le protocole I du kit. La même quantité de protéines totales est incubée durant une nuit à 4°C sur des résines A/G préalablement couplées avec 10 µg d'anticorps anti-Flag suivant les recommandations du fournisseur. Les lavages et éluions des résines anti-flag sont réalisés en suivant également les instructions fournies dans le kit. Les surnageants des immunoprécipitations sont ensuite mis en contact 3 h à 4°C sous agitation douce avec des résines de glutathion-agarose-4B (Macherey-Nagel), préalablement équilibrées en PBS, pour vérifier la présence des kinases taggées GST. Les protéines non fixées sont éliminées par centrifugation de 2 min à 1000 g et les résines sont lavées avec 2 fois 1 mL de PBS. Les protéines fixées sont décrochées par un tampon d'éluion contenant 10 mM de glutathion. L'ensemble des échantillons récoltés est supplémenté avec du tampon de dépôt SDS-PAGE 2X. L'expression des protéines kinases est contrôlée par Western Blot des éluats du GST pull-down avec des anticorps anti-GST. Les éluats d'immunoprécipitation sont analysés par Western Blot anti-Flag et anti-phosphothréonine pour valider l'immunoprécipitation et détecter le niveau de phosphorylation des sous-unités d'ARP2/3, respectivement.

10. Fiche technique 10 : Caractérisation du détournement du cytosquelette d'actine cellulaire

10.1. Polymérisation d'actine *in vitro* (collaboration avec L. LeClaire, Université d'Alabama, USA)

10.1.1. Purification de complexes ARP2/3

Le complexe ARP2/3 d'amibes *Acanthamoeba castellanii* est purifié par une combinaison d'une chromatographie conventionnelle et d'une chromatographie d'affinité. Les amibes sont lysées par « nitrogen cavitation » dans un tampon de lyse sucrose (DTT 5mM, ATP 1 mM, EGTA 2mM, benzamidine 0,5 mM, PMSF 1 mM, sucrose 0,2M, Tris (pH8) 20 mM), centrifugées à faible (10 000g- 15 min) et forte (140 000g- 1 h) vitesses, et passées séquentiellement sur des chromatographies cellulose DEAE (Whatman) et C-200(m) (Millipore) préalablement équilibrées avec du tampon (Tris(pH8) 10 mM, DTT 0,5 mM, ATP 1mM et CaCl₂ 0,1 mM). Le complexe ARP2/3 ne se lie pas à une résine à pH8 donc la fraction cellulaire est chargée sur une résine d'affinité réalisée en couplant des domaines VA des NPF N-WASP taggés 6His sur une matrice CH-Sepharose par une méthode standard. La colonne est lavée avec 20 à 50 fois son volume et est éluée avec 0,5 M de KCl. L'éluât est ensuite passé sur une résine phenyl-Sepharose pour enlever les contaminants restants.

10.1.2. Déphosphorylation de complexes ARP2/3

Lorsque cela est mentionnée, le complexe ARP2/3 est déphosphorylé avec de l'enzyme Antarctique Phosphatase (New England Biolabs, Inc.). Le complexe est dilué dans un ratio 1:1 avec 2 mM de Tris (pH8) et combiné avec du tampon HipH (Tris(pH8) 50mM, Mg₂Cl₂ 1mM, ZnCl₂ 0,1 mM) contenant 1 U d'enzyme Antarctique phosphatase. Ce mix est incubé 1h -1h30 à 30°C avant que le complexe ARP2/3 ne soit de nouveau purifié par affinité en utilisant de la résine CH-Sepharose (GE Healthcare) couplée à des domaines VCA des N-WASP.

10.1.3. Test de polymérisation d'actine *in vitro*

Les tests de polymérisation d'actine *in vitro* sont réalisés avec 5 µM d'actine monomérique contenant 10% d'actine marquée au pyrène, dans du tampon KMEI (KCl 50mM, MgCl₂ 1mM, EGTA 1mM, imidazole (pH7) 10mM). La polymérisation est déterminée en présence ou absence de 50 nM de complexe ARP2/3 déphosphorylé ou non (purification décrite dans le fiche technique 10.1.1 et déphosphorylation dans la fiche 10.1.2), de 500 nM de domaine VCA des NPF N-WASP et de la protéine kinase recombinante GST-LegK2 (purification décrite dans la fiche technique 9.1). La fluorescence due à l'actine marquée au pyrène est mesurée avec un lecteur de plaque Bio Tek Synergy 2 avec les filtres d'excitation à 365nm et d'émission à 407nm dans des intervalles de 10 sec. L'activation et l'inhibition du complexe ARP2/3 par LegK2 sont testées sur du complexe ARP2/3 déphosphorylé et phosphorylé, respectivement.

10.2. Analyse du réseau d'actine dans des cellules de mammifère transfectées

La visualisation du réseau d'actine suite à une transfection permettant l'expression d'une protéine recombinante d'intérêt dans des cellules de mammifère est réalisée sur des cellules HeLa transfectées avec les vecteurs peGFP, peGFP-*legk2* ou peGFP-*legk2*_{K112M}, comme décrit dans la fiche technique 8.1. Après 24 h d'expression, les cellules HeLa sont lavées 2 fois en PBS, fixées 20 min à

température ambiante avec du paraformaldéhyde 4% puis de nouveau lavées 2 fois en PBS. Les cellules sont perméabilisées avec du PBS-0.1% TritonX100 durant 5 min à température ambiante. Après un nouveau lavage en PBS, les sites non spécifiques sont saturés pendant 30 min en PBS-1% BSA-3% SHN. Le cytosquelette d'actine est ensuite marqué avec de la phalloïdine-AlexaFluor 594 (Molecular Probes, 1/20) via une incubation de 30 min en solution de saturation. Après 3 nouveaux lavages en PBS, les lamelles sont montées dans du Dabco/Mowiol. Les observations sont réalisées sur un microscope confocal inversé (LSM510 Meta, Zeiss).

10.3. Polymérisation d'actine *in vivo* (collaboration avec Javier Pizarro-Cerdá et Pascale Cossart, Institut Pasteur Paris, France)

Afin de déterminer si l'effet de LegK2 sur la polymérisation d'actine se fait au travers du complexe nucléateur ARP2/3, des expériences analysant l'effet de LegK2 sur l'entrée et la formation des « comètes d'actine » de *Listeria monocytogenes*, deux étapes du cycle infectieux de *Listeria* dépendantes du complexe ARP2/3, ont été entreprises.

10.3.1. Culture de *Listeria monocytogenes*

La souche EGDe.Prfa*(BUG3057) de *Listeria monocytogenes* est cultivée en milieu BHI (Brain Heart Infusion) à 37°C.

10.3.2. Culture de cellules HeLa CCL-2

Les cellules HeLa CCL-2 (provenant de l'ATCC) sont cultivées en milieu DMEM supplémenté à hauteur de 10% en SVF décomplémenté. Ces cellules eucaryotes adhérentes sont incubées à 37°C dans une atmosphère enrichie à 10% en CO₂.

10.3.3. Test d'entrée et de formation des « comètes d'actine » de *L. monocytogenes*

Les cellules HeLa CCL-2 déposées sur des lamelles de verre sont transfectées pour 18 h avec les vecteurs peGFP ou peGFP-*legK2* ou peGFP-*legK2*_{K112M} par le réactif de transfection FuGENE (Roche) à un ratio de 2 µg d'ADN pour 6 µL de FuGENE par condition. Les bactéries sont cultivées une nuit à 37°C sous agitation. Le jour suivant, 1 mL de la culture bactérienne est lavé 3 fois avec 1 mL de PBS et la densité optique à 600nm est mesurée afin d'estimer le nombre de bactéries. Les cellules HeLa sont infectées à une multiplicité d'infection (MOI) de 5 pour 1 h en DMEM supplémenté avec 1% de SVF. Les bactéries extracellulaires sont ensuite tuées en ajoutant du DMEM-10% SVF contenant 10 µg.mL⁻¹ de gentamycine. Après 5 h d'infection, les cellules HeLa sont fixées avec du paraformaldéhyde 4% et les bactéries extracellulaires sont marquées par du sérum (R11) polyclonal dérivé de lapin avec un anticorps secondaire anti-lapin conjugué au fluorophore Alexa Fluor 647 (Molecular Probes). Les cellules sont ensuite perméabilisées par une incubation de 4 min avec 0,1% de Triton-X100 dans du PBS. La totalité des bactéries est cette fois-ci marquée avec le même sérum R11 et un anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor 350 (Molecular Probes). Les filaments d'actine sont visualisés par un marquage à la phalloïdine-Alexa Fluor 546 (Molecular Probes). Les images sont acquises avec un objectif ×100 installé sur un microscope Axiovert 200M inversé (Zeiss) équipé d'une

caméra EMCCD Neo (dispositif à charge couplée avec multiplication d'électrons) (Andor) et avec le logiciel d'imagerie MetaMorph (Molecular Devices).

11. Fiche technique 11 : Caractérisation de la fonction de l'effecteur Dot/Icm LegK2 au cours du cycle infectieux de *L. pneumophila*

11.1. Localisation d'effecteur Dot/Icm au cours d'infection de *L. pneumophila*

La localisation d'un effecteur Dot/Icm sécrété au cours de l'infection de cellule hôte est basée sur un double marquage immuno-fluorescent permettant de visualiser l'effecteur, grâce à un marquage contre son tag HA, et les bactéries.

Des amibes *Dictyostelium discoideum* sont déposées sur des lamelles de verre stériles à hauteur de $5 \cdot 10^6$ cellules/puit (dans une plaque 6 puits) dans du milieu MB. Les cellules sont incubées une nuit à 22°C pour permettre leur adhésion. Les souches de *L. pneumophila* possédant le plasmide codant l'effecteur d'intérêt couplé au tag HA en N-terminal (ici $\Delta dotA \times p4HA-legK2$ et $\Delta legK2 \times p4HA-legK2$) sont cultivées 21h à 37°C sous agitation en LGM supplémenté en chloramphénicol pour garder une pression de sélection maintenant le plasmide. Deux heures avant l'utilisation des cultures bactériennes, la production des effecteurs recombinants est induite par ajout de 2mM d'IPTG. Les monocouches d'amibes sont ensuite infectées à une MOI de 100 et les infections sont synchronisées par une centrifugation de 10 min à 880 g. Les cellules sont alors immédiatement fixées ou incubées à 25°C suivant les temps désirés (5, 10, 15, 20, 30, 60 min). Les monocouches de *D. discoideum* infectées sont fixées avec du paraformaldéhyde 4% puis lavées 2 fois avec du PBS. Les cellules sont ensuite perméabilisées par une incubation de 2 min dans du méthanol glacé. Les cellules sont lavées avec du PBS avant de saturer les sites aspécifiques par une incubation d'1 h en PBS-1% BSA. Les lamelles sont alors incubées avec un anticorps anti-HA (3724S, Cell Signaling, 1/500) une nuit à 4°C. Après 3 lavages en PBS, un anticorps secondaire couplé au fluorophore Alexa Fluor 488 (A11034, Molecular Probes, 1/1000) est incubé pour 1 h. Après 3 nouveaux lavages, les bactéries sont immunomarquées avec un anticorps anti-MOMP (Major Outer Membrane Protein) conjugué à la Rhodamine (don de X. Charpentier, 1/100). Les cellules sont lavées 3 fois puis finalement les lamelles sont montées avec du Dabco/Mowiol. Les observations sont réalisées sur un microscope confocal inversé (LSM510 Meta, Zeiss).

11.2. Marquage du cytosquelette d'actine dans des cellules infectées

Le marquage du cytosquelette d'actine dans des cellules infectées est un marquage de l'actine polymérisé par de la phalloïdine dans des amibes *D. discoideum* qui sont infectées avec des souches de *L. pneumophila* produisant une protéine fluorescente rouge, la mCherry.

Des amibes *Dictyostelium discoideum* sont déposées sur des lamelles de verre stériles à hauteur de $5 \cdot 10^6$ cellules/puit (dans une plaque 6 puits) dans du milieu MB. Les cellules sont incubées une nuit à 22°C pour permettre leur adhésion. Les monocouches de cellules sont infectées à une MOI de 100 avec des *L. pneumophila* cultivées 4 jours à 30°C en milieu LGM sous agitation, qui produisent la protéine mCherry. Lorsque cela est nécessaire, les infections sont réalisées en présence de 100 μ M de CK-666, un inhibiteur de l'activité de nucléation du complexe ARP2/3. Les infections sont synchronisées par une centrifugation de 10 min à 880g. Les cellules sont immédiatement fixées ou incubées pendant 15 min à 25°C. Les monocouches infectées sont fixées avec du paraformaldéhyde 4% avant d'être lavées 2 fois par du PBS. Les amibes sont ensuite perméabilisées par une incubation à température ambiante de 5 min dans du Triton X-100 0,1% et du PBS. Les cellules sont lavées puis les sites aspécifiques sont saturés avec du PBS-0,2% BSA. Après un nouveau lavage, les lamelles sont marquées avec de la phalloïdine-FITC (p5282, Sigma, 1/1000) pendant 30 min. les lamelles sont

lavées 3 fois avant d'être montées avec du Dabco/Mowiol. Les observations sont réalisées sur un microscope confocal inversé (LSM510 Meta, Zeiss).

11.3. Triple marquage de l'actine, LegK2 et *Legionella* en cours d'infection

5.10⁶ *D. discoideum* sont déposées dans des puits de plaque 6 puits en milieu MB et elles sont incubées la nuit à 22°C pour permettre leur adhérence. La souche sauvage de *L. pneumophila* possédant le plasmide codant LegK2 couplé au tag HA (WT × p4HA-*legK2*) est cultivée 21h à 37°C sous agitation en LGM supplémenté en chloramphénicol pour garder une pression de sélection maintenant le plasmide. Deux heures avant l'utilisation la culture bactérienne, la production de HA-LegK2 est induite par ajout de 2mM d'IPTG. Les monocouches d'amibes sont ensuite infectées à une MOI de 100 et les infections sont synchronisées par une centrifugation de 10 min à 880 g. Les cellules sont incubées 15 min à 25°C. Les amibes infectées sont fixées avec du paraformaldéhyde 4% puis lavées avec du PBS. Les cellules sont alors perméabilisées par une incubation de 5 min à température ambiante dans du Triton-X100 0,1%. Après un lavage, les sites aspécifiques sont saturés pendant 1 h dans du PBS-0,2% BSA. Une première incubation avec les anticorps primaires est réalisée, comprenant un anticorps anti-HA de souris (don de S. Salcedo, 1/1000) et un sérum anti-Lp1 Paris/Lens de lapin (1/1000), pendant une nuit à 4°C. Les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS. Un anticorps secondaire conjugué au fluorophore Dylight 594 (115-515-003, Jackson, 1/250), un anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor 647 (A21245, Molecular Probes, 1/1000) et de la phalloïdine-FITC (P5282, Sigma, 1/1000) sont ensuite incubés 1 h pour marquer l'effecteur HA-LegK2, les bactéries et l'actine polymérisée, respectivement. Après 3 nouveaux lavages, les lamelles sont montées avec du Dabco/Mowiol. Les observations sont réalisées sur un microscope confocal inversé (LSM510 Meta, Zeiss).

11.4. Suivi de l'échappement à la voie de dégradation endocytaire

Le suivi de l'échappement à la voie endocytaire est réalisé par un immunomarquage de la sous-unité Vata de la pompe v-ATPase, suite à l'infection d'amibes *D. discoideum* par des bactéries *L. pneumophila* exprimant la protéine de fluorescence mCherry. Ce marquage permet de visualiser les phagosomes fusionnés avec les endosomes tardifs et/ou lysosomes.

5.10⁶ *D. discoideum* sontensemencées en milieu MB sur des lamelles de verre stérilisées dans des plaques 6 puits, avant d'être incubées une nuit à 22°C pour leur permettre d'adhérer. Les monocouches de cellules sont infectées à une MOI de 100 avec des *L. pneumophila* produisant la mCherry, cultivées 4 jours à 30°C. Les plaques sont centrifugées 10 min à 880g. Les infections sont ensuite incubées 1 h à 25°C et pour certaine condition, 100 µM de l'inhibiteur CK-666 est ajouté après 5 min d'incubation. Les cellules infectées sont fixées avec du paraformaldéhyde 4%. Deux lavages en PBS sont réalisés avant de perméabiliser les cellules par un traitement de 2 min au méthanol glacé. Après un nouveau lavage, les sites aspécifiques sont bloqués par du PBS avec 0,2% de BSA. Les lamelles sont incubées avec l'anticorps primaire anti-Vata (221-35-2, don de F. Letourneur, pure) pendant 1 h à température ambiante. Les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS. Le marquage anti-Vata est visualisé grâce à un anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor 488 (A11029, Molecular probes, 1/ 300) incubé 1 h. Trois derniers lavages sont réalisés avant de monter les lamelles avec du Dabco/Mowiol. Les observations sont réalisées sur un microscope confocal inversé (LSM510 Meta, Zeiss).

Références bibliographiques

Abu-Zant, A., Santic, M., Molmeret, M., Jones, S., Helbig, J. & Abu Kwaik, Y. (2005). Incomplete activation of macrophage apoptosis during intracellular replication of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* **73**, 5339-5349.

Abu-Zant, A., Jones, S., Asare, R., Suttles, J., Price, C., Graham, J. & Kwaik, Y. A. (2007). Anti-apoptotic signalling by the Dot/Icm secretion system of *L. pneumophila*. *Cell Microbiol* **9**, 246-264.

Aguilera, M., Salinas, R., Rosales, E., Carminati, S., Colombo, M. I. & Berón, W. (2009). Actin dynamics and Rho GTPases regulate the size and formation of parasitophorous vacuoles containing *Coxiella burnetii*. *Infect Immun* **77**, 4609-4620.

Aitio, O., Hellman, M., Skehan, B., Kesti, T., Leong, J. M., Saksela, K. & Permi, P. (2012). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* exploits a tryptophan switch to hijack host f-actin assembly. *Structure* **20**, 1692-1703.

Albert-Weissenberger, C., Cazalet, C. & Buchrieser, C. (2007). *Legionella pneumophila* - a human pathogen that co-evolved with fresh water protozoa. *Cell Mol Life Sci* **64**, 432-448.

Alix, E., Chesnel, L., Bowzard, B. J., Tucker, A. M., Delprato, A., Cherfils, J., Wood, D. O., Kahn, R. A. & Roy, C. R. (2012). The capping domain in RalF regulates effector functions. *PLoS Pathog* **8**, e1003012.

Alli, O. A., Gao, L. Y., Pedersen, L. L., Zink, S., Radulic, M., Doric, M. & Abu Kwaik, Y. (2000). Temporal pore formation-mediated egress from macrophages and alveolar epithelial cells by *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* **68**, 6431-6440.

Allombert, J., Fuche, F., Michard, C. & 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.

Amaro, F., Gilbert, J. A., Owens, S., Trimble, W. & Shuman, H. A. (2012). Whole-genome sequence of the human pathogen *Legionella pneumophila* serogroup 12 strain 570-CO-H. *J Bacteriol* **194**, 1613-1614.

Amrein, K., Takacs, B., Stieger, M., Molnos, J., Flint, N. & Burn, P. (1995). Purification and characterization of recombinant human p50^{csk} protein-tyrosine kinase from an *Escherichia coli* expression system overproducing the bacterial chaperones GroES and GroEL. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 1048-1052.

Amyot, W. M., deJesus, D. & Isberg, R. R. (2013). Poison domains block transit of translocated substrates via the *Legionella pneumophila* Icm/Dot system. *Infect Immun* **81**, 3239-3252.

Anes, E., Kühnel, M. P., Bos, E., Moniz-Pereira, J., Habermann, A. & Griffiths, G. (2003). Selected lipids activate phagosome actin assembly and maturation resulting in killing of pathogenic mycobacteria. *Nat Cell Biol* **5**, 793-802.

Arasaki, K. & Roy, C. R. (2010). Legionella pneumophila promotes functional interactions between plasma membrane syntaxins and Sec22b. *Traffic* **11**, 587-600.

Arasaki, K., Toomre, D. K. & Roy, C. R. (2012). The Legionella pneumophila effector DrrA is sufficient to stimulate SNARE-dependent membrane fusion. *Cell Host Microbe* **11**, 46-57.

Aurass, P., Schlegel, M., Metwally, O., Harding, C. R., Schroeder, G. N., Frankel, G. & Flieger, A. (2013). The Legionella pneumophila Dot/Icm-secreted effector PlcC/CegC1 together with PlcA and PlcB promotes virulence and belongs to a novel zinc metallophospholipase C family present in bacteria and fungi. *J Biol Chem* **288**, 11080-11092.

Aurell, H., Farge, P., Meugnier, H., Gouy, M., Forey, F., Lina, G., Vandenesch, F., Etienne, J. & Jarraud, S. (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.

Banga, S., Gao, P., Shen, X., Fiscus, V., Zong, W. X., Chen, L. & 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.

Bardill, J. P., Miller, J. L. & Vogel, J. P. (2005). IcmS-dependent translocation of SdeA into macrophages by the Legionella pneumophila type IV secretion system. *Mol Microbiol* **56**, 90-103.

Barz, C., Abahji, T. N., Trülsch, K. & Heesemann, J. (2000). The Yersinia Ser/Thr protein kinase YpkA/YopO directly interacts with the small GTPases RhoA and Rac-1. *FEBS Lett* **482**, 139-143.

Beauté, J., Zucs, P., de Jong, B. & Network, E. L. D. S. (2013). Legionnaires disease in Europe, 2009-2010. *Euro Surveill* **18**, 20417.

Belyi, Y., Niggeweg, R., Opitz, B., Vogelsang, M., Hippenstiel, S., Wilm, M. & Aktories, K. (2006). Legionella pneumophila glucosyltransferase inhibits host elongation factor 1A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 16953-16958.

Benanti, E. L., Nguyen, C. M. & Welch, M. D. (2015). Virulent burkholderia species mimic host actin polymerases to drive actin-based motility. *Cell* **161**, 348-360.

Bennett, T. L., Kraft, S. M., Reaves, B. J., Mima, J., O'Brien, K. M. & Starai, V. J. (2013). LegC3, an effector protein from *Legionella pneumophila*, inhibits homotypic yeast vacuole fusion in vivo and in vitro. *PLoS One* **8**, e56798.

Berger, K. & Isberg, R. (1993). Two distinct defects in intracellular growth complemented by a single genetic locus in *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* **7**, 7-19.

Berger, K. H., Merriam, J. J. & Isberg, R. R. (1994). Altered intracellular targeting properties associated with mutations in the *Legionella pneumophila* dotA gene. *Mol Microbiol* **14**, 809-822.

Bessède, E., Staedel, C., Acuña Amador, L. A., Nguyen, P. H., Chambonnier, L., Hatakeyama, M., Belleannée, G., Mégraud, F. & Varon, C. (2014). *Helicobacter pylori* generates cells with cancer stem cell properties via epithelial-mesenchymal transition-like changes. *Oncogene* **33**, 4123-4131.

Bhuin, T. & Roy, J. K. (2014). Rab proteins: the key regulators of intracellular vesicle transport. *Exp Cell Res* **328**, 1-19.

Bierne, H., Miki, H., Innocenti, M., Scita, G., Gertler, F. B., Takenawa, T. & Cossart, P. (2005). WASP-related proteins, Abi1 and Ena/VASP are required for *Listeria* invasion induced by the Met receptor. *J Cell Sci* **118**, 1537-1547.

Bishai, E. A., Sidhu, G. S., Li, W., Dhillon, J., Bohil, A. B., Cheney, R. E., Hartwig, J. H. & Southwick, F. S. (2013). Myosin-X facilitates *Shigella*-induced membrane protrusions and cell-to-cell spread. *Cell Microbiol* **15**, 353-367.

Bitar, D. M., Molmeret, M. & Kwai, 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.

Black, D. S. & Bliska, J. B. (2000). The RhoGAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. *Mol Microbiol* **37**, 515-527.

Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C. & Plastino, J. (2014). Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol Rev* **94**, 235-263.

Bonazzi, M., Veiga, E., Pizarro-Cerdá, J. & Cossart, P. (2008). Successive post-translational modifications of E-cadherin are required for InlA-mediated internalization of *Listeria monocytogenes*. *Cell Microbiol* **10**, 2208-2222.

Bonazzi, M., Vasudevan, L., Mallet, A. & other authors (2011). Clathrin phosphorylation is required for actin recruitment at sites of bacterial adhesion and internalization. *J Cell Biol* **195**, 525-536.

Bonazzi, M., Kühbacher, A., Toledo-Arana, A., Mallet, A., Vasudevan, L., Pizarro-Cerdá, J., Brodsky, F. M. & Cossart, P. (2012). A common clathrin-mediated machinery co-ordinates cell-cell adhesion and bacterial internalization. *Traffic* **13**, 1653-1666.

Bosse, T., Ehinger, J., Czuchra, A. & other authors (2007). Cdc42 and phosphoinositide 3-kinase drive Rac-mediated actin polymerization downstream of c-Met in distinct and common pathways. *Mol Cell Biol* **27**, 6615-6628.

Bourzac, K. M., Botham, C. M. & Guillemin, K. (2007). Helicobacter pylori CagA induces AGS cell elongation through a cell retraction defect that is independent of Cdc42, Rac1, and Arp2/3. *Infect Immun* **75**, 1203-1213.

Brand, B. C., Sadosky, A. B. & 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., Edelstein, P. H., Garduno, R. A. & Hoffman, P. S. (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. & Sifri, C. D. (2010). Caenorhabditis is a metazoan host for Legionella. *Cell Microbiol* **12**, 343-361.

Breitsprecher, D., Kiesewetter, A. K., Linkner, J., Vinzenz, M., Stradal, T. E., Small, J. V., Curth, U., Dickinson, R. B. & Faix, J. (2011). Molecular mechanism of Ena/VASP-mediated actin-filament elongation. *EMBO J* **30**, 456-467.

Breitsprecher, D., Jaiswal, R., Bombardier, J. P., Gould, C. J., Gelles, J. & Goode, B. L. (2012). Rocket launcher mechanism of collaborative actin assembly defined by single-molecule imaging. *Science* **336**, 1164-1168.

Brenner, D. J., Steigerwalt, A. G. & 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. & 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., Urwyler, S., Ragaz, C., Weber, S. S., Kami, K., Overduin, M. & Hilbi, H. (2009). Rab1 Guanine Nucleotide Exchange Factor SidM Is a Major Phosphatidylinositol 4-Phosphate-binding Effector Protein of Legionella pneumophila. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 4846-4856.

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

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

Burianek, L. E. & Soderling, S. H. (2013). Under lock and key: spatiotemporal regulation of WASP family proteins coordinates separate dynamic cellular processes. *Semin Cell Dev Biol* **24**, 258-266.

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.

Cambronne, E. D. & Roy, C. R. (2007). The *Legionella pneumophila* IcmSW complex interacts with multiple Dot/Icm effectors to facilitate type IV translocation. *PLoS Pathog* **3**, e188.

Campellone, K. G., Rankin, S., Pawson, T., Kirschner, M. W., Tipper, D. J. & Leong, J. M. (2004a). Clustering of Nck by a 12-residue Tir phosphopeptide is sufficient to trigger localized actin assembly. *J Cell Biol* **164**, 407-416.

Campellone, K. G., Robbins, D. & Leong, J. M. (2004b). EspFU is a translocated EHEC effector that interacts with Tir and N-WASP and promotes Nck-independent actin assembly. *Dev Cell* **7**, 217-228.

Campellone, K. G. & Leong, J. M. (2005). Nck-independent actin assembly is mediated by two phosphorylated tyrosines within enteropathogenic *Escherichia coli* Tir. *Mol Microbiol* **56**, 416-432.

Campellone, K. G. (2010). Cytoskeleton-modulating effectors of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: Tir, EspFU and actin pedestal assembly. *FEBS J* **277**, 2390-2402.

Campellone, K. G. & Welch, M. D. (2010). A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 237-251.

Campese, C., Bitar, D., Jarraud, S., Maine, C., Forey, F., Etienne, J., Desenclos, J. C., Saura, C. & Che, D. (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. & 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.

- Campèse, C., Descours, G., Lepoutre, A., Beraud, L., Maine, C., Che, D. & Jarraud, S. (2015).** Legionnaires' disease in France. *Med Mal Infect* **45**, 65-71.
- Canova, M. J. & Molle, V. (2014).** Bacterial serine/threonine protein kinases in host-pathogen interactions. *J Biol Chem* **289**, 9473-9479.
- Cazalet, C., Rusniok, C., Brüggemann, H. & other authors (2004).** Evidence in the Legionella pneumophila genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. *Nat Genet* **36**, 1165-1173.
- Cazalet, C., Jarraud, S., Ghavi-Helm, Y., Kunst, F., Glaser, P., Etienne, J. & 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.
- Chakravorty, D., Rohde, M., Jäger, L., Deiwick, J. & Hensel, M. (2005).** Formation of a novel surface structure encoded by Salmonella Pathogenicity Island 2. *EMBO J* **24**, 2043-2052.
- Chang, B., Kura, F., Amemura-Maekawa, J., Koizumi, N. & Watanabe, H. (2005).** Identification of a novel adhesion molecule involved in the virulence of Legionella pneumophila. *Infect Immun* **73**, 4272-4280.
- Charpentier, X., Gabay, J. E., Reyes, M., Zhu, J. W., Weiss, A. & 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.
- Chavrier, P. & Goud, B. (1999).** The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 466-475.
- Chen, C. K., Sawaya, M. R., Phillips, M. L., Reisler, E. & Quinlan, M. E. (2012).** Multiple forms of Spire-actin complexes and their functional consequences. *J Biol Chem* **287**, 10684-10692.
- Chen, J., de Felipe, K. S., Clarke, M., Lu, H., Anderson, O. R., Segal, G. & Shuman, H. A. (2004).** Legionella effectors that promote nonlytic release from protozoa. *Science* **303**, 1358-1361.
- Chen, X., Ni, F., Tian, X., Kondrashkina, E., Wang, Q. & Ma, J. (2013).** Structural basis of actin filament nucleation by tandem W domains. *Cell Rep* **3**, 1910-1920.
- Chen, Y. & Machner, M. P. (2013).** Targeting of the small GTPase Rab6A¹ by the Legionella pneumophila effector LidA. *Infect Immun* **81**, 2226-2235.
- Cheng, W., Yin, K., Lu, D. & other authors (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. & other authors (2004). The genomic sequence of the accidental pathogen *Legionella pneumophila*. *Science* **305**, 1966-1968.

Chin, E., Kirker, K., Zuck, M., James, G. & Hybiske, K. (2012). Actin recruitment to the Chlamydia inclusion is spatiotemporally regulated by a mechanism that requires host and bacterial factors. *PLoS One* **7**, e46949.

Chong, R., Swiss, R., Briones, G., Stone, K. L., Gulcicek, E. E. & Agaisse, H. (2009). Regulatory mimicry in *Listeria monocytogenes* actin-based motility. *Cell Host Microbe* **6**, 268-278.

Cirillo, J. D., Cirillo, S. L., Yan, L., Bermudez, L. E., Falkow, S. & Tompkins, L. S. (1999). Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* **67**, 4427-4434.

Cirillo, S. L., Lum, J. & 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. & Cirillo, J. D. (2002). Role of the *Legionella pneumophila* rtxA gene in amoebae. *Microbiology* **148**, 1667-1677.

Coers, J., Kagan, J. C., Matthews, M., Nagai, H., Zuckman, D. M. & 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.

Copenhaver, A. M., Casson, C. N., Nguyen, H. T., Fung, T. C., Duda, M. M., Roy, C. R. & Shin, S. (2014). Alveolar macrophages and neutrophils are the primary reservoirs for *Legionella pneumophila* and mediate cytosolic surveillance of type IV secretion. *Infect Immun* **82**, 4325-4336.

Coxon, P. Y., Summersgill, J. T., Ramirez, J. A. & Miller, R. D. (1998). Signal transduction during *Legionella pneumophila* entry into human monocytes. *Infect Immun* **66**, 2905-2913.

Creasey, E. A. & Isberg, R. R. (2012). The protein SdhA maintains the integrity of the *Legionella*-containing vacuole. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 3481-3486.

Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A. & Adams, J. M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 49-63.

D'Auria, G., Jiménez-Hernández, N., Peris-Bondia, F., Moya, A. & Latorre, A. (2010). *Legionella pneumophila* pangenome reveals strain-specific virulence factors. *BMC Genomics* **11**, 181.

Davidson, A. C., Humphreys, D., Brooks, A. B., Hume, P. J. & Koronakis, V. (2015). The Arf GTPase-activating protein family is exploited by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to invade nonphagocytic host cells. *MBio* **6**.

de Felipe, K. S., Pampou, S., Jovanovic, O. S., Pericone, C. D., Ye, S. F., Kalachikov, S. & Shuman, H. A. (2005). Evidence for acquisition of *Legionella* type IV secretion substrates via interdomain horizontal gene transfer. *J Bacteriol* **187**, 7716-7726.

de Felipe, K. S., Glover, R. T., Charpentier, X., Anderson, O. R., Reyes, M., Pericone, C. D. & Shuman, H. A. (2008). *Legionella* eukaryotic-like type IV substrates interfere with organelle trafficking. *PLoS Pathog* **4**, e1000117.

de Paz, H. D., Sangari, F. J., Bolland, S., García-Lobo, J. M., Dehio, C., de la Cruz, F. & Llosa, M. (2005). Functional interactions between type IV secretion systems involved in DNA transfer and virulence. *Microbiology* **151**, 3505-3516.

DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D., Abe, A., Ruschkowski, S. & Finlay, B. B. (1999). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 produces Tir, which is translocated to the host cell membrane but is not tyrosine phosphorylated. *Infect Immun* **67**, 2389-2398.

Dietrich, S., Weiß, S., Pleiser, S. & Kerkhoff, E. (2013). Structural and functional insights into the Spir/formin actin nucleator complex. *Biol Chem* **394**, 1649-1660.

Doleans, A., Aurell, H., Reyrolle, M., Lina, G., Freney, J., Vandenesch, F., Etienne, J. & Jarraud, S. (2004). Clinical and environmental distributions of *Legionella* strains in France are different. *J Clin Microbiol* **42**, 458-460.

Dolezal, P., Aili, M., Tong, J. & other authors (2012). *Legionella pneumophila* secretes a mitochondrial carrier protein during infection. *PLoS Pathog* **8**, e1002459.

Doléans-Jordheim, A., Akermi, M., Ginevra, C. & other authors (2006). Growth-phase-dependent mobility of the *lvh*-encoding region in *Legionella pneumophila* strain Paris. *Microbiology* **152**, 3561-3568.

Dorer, M. S., Kirton, D., Bader, J. S. & Isberg, R. R. (2006). RNA interference analysis of *Legionella* in *Drosophila* cells: exploitation of early secretory apparatus dynamics. *PLoS Pathog* **2**, e34.

Dragoi, A. M., Talman, A. M. & Agaisse, H. (2013). Bruton's tyrosine kinase regulates *Shigella flexneri* dissemination in HT-29 intestinal cells. *Infect Immun* **81**, 598-607.

Drevinek, P. & Mahenthiralingam, E. (2010). *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis: epidemiology and molecular mechanisms of virulence. *Clin Microbiol Infect* **16**, 821-830.

DSMZDatabase: <https://www.dsmz.de/bacterial-diversity/prokaryotic-nomenclature-up-to-date.html>

(30/12/2014)

Ducka, A. M., Joel, P., Popowicz, G. M., Trybus, K. M., Schleicher, M., Noegel, A. A., Huber, R., Holak, T. A. & Sitar, T. (2010). Structures of actin-bound Wiskott-Aldrich syndrome protein homology 2 (WH2) domains of Spire and the implication for filament nucleation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 11757-11762.

Duménil, G. & 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. & 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. & 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.

ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control. Legionnaires' disease in Europe, 2012. Stockholm: ECDC; 2014. doi 10.2900/21087.

Edelstein, P. H. (1981). Improved semiselective medium for isolation of Legionella pneumophila from contaminated clinical and environmental specimens. *J Clin Microbiol* **14**, 298-303.

Egile, C., Loisel, T. P., Laurent, V., Li, R., Pantaloni, D., Sansonetti, P. J. & Carlier, M. F. (1999). Activation of the CDC42 effector N-WASP by the Shigella flexneri IcsA protein promotes actin nucleation by Arp2/3 complex and bacterial actin-based motility. *J Cell Biol* **146**, 1319-1332.

Fairn, G. D. & Grinstein, S. (2012). How nascent phagosomes mature to become phagolysosomes. *Trends Immunol* **33**, 397-405.

Fajardo, M., Schleicher, M., Noegel, A., Bozzaro, S., Killinger, S., Heuner, K., Hacker, J. & Steinert, M. (2004). Calnexin, calreticulin and cytoskeleton-associated proteins modulate uptake and growth of Legionella pneumophila in Dictyostelium discoideum. *Microbiology* **150**, 2825-2835.

Fattouh, R., Kwon, H., Czuczman, M. A., Copeland, J. W., Pelletier, L., Quinlan, M. E., Muise, A. M., Higgins, D. E. & Brumell, J. H. (2015). The diaphanous-related formins promote protrusion formation and cell-to-cell spread of Listeria monocytogenes. *J Infect Dis* **211**, 1185-1195.

Fehrenbacher, K. L., Boldogh, I. R. & Pon, L. A. (2003). Taking the A-train: actin-based force generators and organelle targeting. *Trends Cell Biol* **13**, 472-477.

Ferhat, M., Atlan, D., Vianney, A., Lazzaroni, J., Doublet, P. & Gilbert, C. (2009). The TolC protein of *Legionella pneumophila* plays a major role in multi-drug resistance and the early steps of host invasion. *PLoS One* **4**, e7732.

Fields, B. S., Benson, R. F. & Besser, R. E. (2002). Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev* **15**, 506-526.

Fink, S. L. & Cookson, B. T. (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun* **73**, 1907-1916.

Finsel, I., Ragaz, C., Hoffmann, C., Harrison, C. F., Weber, S., van Rahden, V. A., Johannes, L. & Hilbi, H. (2013). The Legionella effector RidL inhibits retrograde trafficking to promote intracellular replication. *Cell Host Microbe* **14**, 38-50.

Firat-Karalar, E. N. & Welch, M. D. (2011). New mechanisms and functions of actin nucleation. *Curr Opin Cell Biol* **23**, 4-13.

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

Flannagan, R. S., Jaumouillé, V., Huynh, K. K., Plumb, J. D., Downey, G. P., Valvano, M. A. & Grinstein, S. (2012). Burkholderia cenocepacia disrupts host cell actin cytoskeleton by inactivating Rac and Cdc42. *Cell Microbiol* **14**, 239-254.

Fliermans, C. B., Cherry, W. B., Orrison, L. H., Smith, S. J., Tison, D. L. & Pope, D. H. (1981). Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Appl Environ Microbiol* **41**, 9-16.

Folly-Klan, M., Alix, E., Stalder, D. & other authors (2013). A novel membrane sensor controls the localization and ArfGEF activity of bacterial RalF. *PLoS Pathog* **9**, e1003747.

Fontana, M. F., Banga, S., Barry, K. C., Shen, X., Tan, Y., Luo, Z. Q. & Vance, R. E. (2011). Secreted bacterial effectors that inhibit host protein synthesis are critical for induction of the innate immune response to virulent *Legionella pneumophila*. *PLoS Pathog* **7**, e1001289.

Fouts, D. E., Brinkac, L., Beck, E., Inman, J. & Sutton, G. (2012). PanOCT: automated clustering of orthologs using conserved gene neighborhood for pan-genomic analysis of bacterial strains and closely related species. *Nucleic Acids Res* **40**, e172.

Franco, I. S., Shohdy, N. & Shuman, H. A. (2012). The *Legionella pneumophila* effector VipA is an actin nucleator that alters host cell organelle trafficking. *PLoS Pathog* **8**, e1002546.

Fraser, D. W., Tsai, T. R., Orenstein, W. & other authors (1977). Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med* **297**, 1189-1197.

Friebel, A., Ilchmann, H., Aepfelbacher, M., Ehrbar, K., Machleidt, W. & Hardt, W. D. (2001). SopE and SopE2 from *Salmonella typhimurium* activate different sets of RhoGTPases of the host cell. *J Biol Chem* **276**, 34035-34040.

Fu, Y. & Galán, J. E. (1999). A salmonella protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature* **401**, 293-297.

Fuche, F., Vianney, A., Andrea, C., Doublet, P. & Gilbert, C. (2015). Functional type 1 secretion system involved in *Legionella pneumophila* virulence. *J Bacteriol* **197**, 563-571.

Fukumatsu, M., Ogawa, M., Arakawa, S., Suzuki, M., Nakayama, K., Shimizu, S., Kim, M., Mimuro, H. & Sasakawa, C. (2012). *Shigella* targets epithelial tricellular junctions and uses a noncanonical clathrin-dependent endocytic pathway to spread between cells. *Cell Host Microbe* **11**, 325-336.

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.

Gao, X., Wan, F., Mateo, K. & other authors (2009). Bacterial effector binding to ribosomal protein s3 subverts NF- κ B function. *PLoS Pathog* **5**, e1000708.

Garduño, R. A., Garduño, E. & Hoffman, P. S. (1998a). Surface-associated hsp60 chaperonin of *Legionella pneumophila* mediates invasion in a HeLa cell model. *Infect Immun* **66**, 4602-4610.

Garduño, R. A., Quinn, F. D. & Hoffman, P. S. (1998b). HeLa cells as a model to study the invasiveness and biology of *Legionella pneumophila*. *Can J Microbiol* **44**, 430-440.

Garnak, M. & Reeves, H. C. (1979). Phosphorylation of Isocitrate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Science* **203**, 1111-1112.

Gaspar, A. H. & Machner, M. P. (2014). VipD is a Rab5-activated phospholipase A1 that protects *Legionella pneumophila* from endosomal fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 4560-4565.

Ge, J., Xu, H., Li, T., Zhou, Y., Zhang, Z., Li, S., Liu, L. & Shao, F. (2009). A *Legionella* type IV effector activates the NF- κ B pathway by phosphorylating the I κ B family of inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 13725-13730.

Ge, J., Gong, Y. N., Xu, Y. & Shao, F. (2012). 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**, 6193-6198.

Gerstenmaier, L., Pilla, R., Herrmann, L. & other authors (2015). The autophagic machinery ensures nonlytic transmission of mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E687-692.

Gessain, G., Tsai, Y. H., Travier, L., Bonazzi, M., Grayo, S., Cossart, P., Charlier, C., Disson, O. & Lecuit, M. (2015). PI3-kinase activation is critical for host barrier permissiveness to *Listeria monocytogenes*. *J Exp Med* **212**, 165-183.

Gianfelice, A., Le, P. H., Rigano, L. A. & other authors (2015). Host endoplasmic reticulum COPII proteins control cell-to-cell spread of the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes*. *Cell Microbiol* **17**, 876-892.

Ginevra, C., Forey, F., Campèse, C., Reyrolle, M., Che, D., Etienne, J. & Jarraud, S. (2008). Lorraine strain of *Legionella pneumophila* serogroup 1, France. *Emerg Infect Dis* **14**, 673-675.

Glöckner, G., Albert-Weissenberger, C., Weinmann, E., Jacobi, S., Schunder, E., Steinert, M., Hacker, J. & Heuner, K. (2008). Identification and characterization of a new conjugation/type IVA secretion system (*trb/tra*) of *Legionella pneumophila* Corby localized on two mobile genomic islands. *Int J Med Microbiol* **298**, 411-428.

Goley, E. D., Rodenbusch, S. E., Martin, A. C. & Welch, M. D. (2004). Critical conformational changes in the Arp2/3 complex are induced by nucleotide and nucleation promoting factor. *Mol Cell* **16**, 269-279.

Gomez-Valero, L., Rusniok, C., Jarraud, S., Vacherie, B., Rouy, Z., Barbe, V., Medigue, C., Etienne, J. & Buchrieser, C. (2011). Extensive recombination events and horizontal gene transfer shaped the *Legionella pneumophila* genomes. *BMC Genomics* **12**, 536.

Gomez-Valero, L. & Buchrieser, C. (2013). Genome Dynamics in *Legionella*: The Basis of Versatility and Adaptation to Intracellular Replication. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **3**.

Gomez-Valero, L., Rusniok, C., Rolando, M. & other authors (2014). Comparative analyses of *Legionella* species identifies genetic features of strains causing Legionnaires' disease. *Genome Biol* **15**, 505.

Gomis-Rüth, F. X., Solà, M., de la Cruz, F. & Coll, M. (2004). Coupling factors in macromolecular type-IV secretion machineries. *Curr Pharm Des* **10**, 1551-1565.

Goody, P. R., Heller, K., Oesterlin, L. K., Müller, M. P., Itzen, A. & Goody, R. S. (2012). Reversible phosphocholination of Rab proteins by *Legionella pneumophila* effector proteins. *EMBO J* **31**, 1774-1784.

Gouin, E., Gantelet, H., Egile, C., Lasa, I., Ohayon, H., Villiers, V., Gounon, P., Sansonetti, P. J. & Cossart, P. (1999). A comparative study of the actin-based motilities of the pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* and *Rickettsia conorii*. *J Cell Sci* **112** (Pt **11**), 1697-1708.

Gouin, E., Egile, C., Dehoux, P., Villiers, V., Adams, J., Gertler, F., Li, R. & Cossart, P. (2004). The RickA protein of *Rickettsia conorii* activates the Arp2/3 complex. *Nature* **427**, 457-461.

Gould, C. J., Maiti, S., Michelot, A., Graziano, B. R., Blanchoin, L. & Goode, B. L. (2011). The formin DAD domain plays dual roles in autoinhibition and actin nucleation. *Curr Biol* **21**, 384-390.

Granger, E., McNee, G., Allan, V. & Woodman, P. (2014). The role of the cytoskeleton and molecular motors in endosomal dynamics. *Semin Cell Dev Biol* **31**, 20-29.

Graziano, B. R., Jonasson, E. M., Pullen, J. G., Gould, C. J. & Goode, B. L. (2013). Ligand-induced activation of a formin-NPF pair leads to collaborative actin nucleation. *J Cell Biol* **201**, 595-611.

Grishin, A. M., Condos, T. E., Barber, K. R., Campbell-Valois, F. X., Parsot, C., Shaw, G. S. & Cygler, M. (2014). Structural basis for the inhibition of host protein ubiquitination by *Shigella* effector kinase OspG. *Structure* **22**, 878-888.

Grosdent, N., Maridonneau-Parini, I., Sory, M. P. & Cornelis, G. R. (2002). Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis. *Infect Immun* **70**, 4165-4176.

Gruenheid, S., DeVinney, R., Bladt, F., Goosney, D., Gelkop, S., Gish, G. D., Pawson, T. & Finlay, B. B. (2001). Enteropathogenic *E. coli* Tir binds Nck to initiate actin pedestal formation in host cells. *Nat Cell Biol* **3**, 856-859.

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

Guttman, J. A., Lin, A. E., Veiga, E., Cossart, P. & Finlay, B. B. (2010). Role for CD2AP and other endocytosis-associated proteins in enteropathogenic *Escherichia coli* pedestal formation. *Infect Immun* **78**, 3316-3322.

Guérin, I. & de Chastellier, C. (2000). Disruption of the actin filament network affects delivery of endocytic contents marker to phagosomes with early endosome characteristics: the case of phagosomes with pathogenic mycobacteria. *Eur J Cell Biol* **79**, 735-749.

Hagedorn, M., Rohde, K. H., Russell, D. G. & Soldati, T. (2009). Infection by tubercular mycobacteria is spread by nonlytic ejection from their amoeba hosts. *Science* **323**, 1729-1733.

Haglund, C. M., Choe, J. E., Skau, C. T., Kovar, D. R. & Welch, M. D. (2010). *Rickettsia Sca2* is a bacterial formin-like mediator of actin-based motility. *Nat Cell Biol* **12**, 1057-1063.

Haglund, C. M. & Welch, M. D. (2011). Pathogens and polymers: Microbe-host interactions illuminate the cytoskeleton. *J Cell Biol* **195**, 7-17.

Hansen, S. D. & Mullins, R. D. (2010). VASP is a processive actin polymerase that requires monomeric actin for barbed end association. *J Cell Biol* **191**, 571-584.

Harb, O. S., Gao, L. Y. & 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.

Hardiman, C. A. & Roy, C. R. (2014). AMPylation is critical for Rab1 localization to vacuoles containing *Legionella pneumophila*. *MBio* **5**, e01035-01013.

Harding, C. R., Schroeder, G. N., Reynolds, S., Kosta, A., Collins, J. W., Mousnier, A. & Frankel, G. (2012). *Legionella pneumophila* pathogenesis in the *Galleria mellonella* infection model. *Infect Immun* **80**, 2780-2790.

Harding, C. R., Mattheis, C., Mousnier, A., Oates, C. V., Hartland, E. L., Frankel, G. & 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.

Hardt, W. D., Chen, L. M., Schuebel, K. E., Bustelo, X. R. & Galán, J. E. (1998). *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell* **93**, 815-826.

Hartman, M. A. & Spudich, J. A. (2012). The myosin superfamily at a glance. *J Cell Sci* **125**, 1627-1632.

Havrylenko, S., Noguera, P., Abou-Ghali, M., Manzi, J., Faqir, F., Lamora, A., Guérin, C., Blanchoin, L. & Plastino, J. (2015). WAVE binds Ena/VASP for enhanced Arp2/3 complex-based actin assembly. *Mol Biol Cell* **26**, 55-65.

Hayashi, T., Miyake, M., Fukui, T. & other authors (2008). Exclusion of actin-binding protein p57/coronin-1 from bacteria-containing phagosomes in macrophages infected with *Legionella*. *Biol Pharm Bull* **31**, 861-865.

Hayden, M. S. & Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* **132**, 344-362.

Hayward, R. D. & Koronakis, V. (1999). Direct nucleation and bundling of actin by the SipC protein of invasive *Salmonella*. *EMBO J* **18**, 4926-4934.

Heidtman, M., Chen, E. J., Moy, M. Y. & 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.

Heindl, J. E., Saran, I., Yi, C. R., Lesser, C. F. & Goldberg, M. B. (2010). Requirement for formin-induced actin polymerization during spread of *Shigella flexneri*. *Infect Immun* **78**, 193-203.

Helgeson, L. A. & Nolen, B. J. (2013). Mechanism of synergistic activation of Arp2/3 complex by cortactin and N-WASP. *Elife* **2**, e00884.

Helgeson, L. A., Prendergast, J. G., Wagner, A. R., Rodnick-Smith, M. & Nolen, B. J. (2014). Interactions with actin monomers, actin filaments, and Arp2/3 complex define the roles of WASP family proteins and cortactin in coordinately regulating branched actin networks. *J Biol Chem* **289**, 28856-28869.

Hervet, E., Charpentier, X., Vianney, A., Lazzaroni, J. C., 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.

Higgs, H. N. & Pollard, T. D. (2000). Activation by Cdc42 and PIP(2) of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) stimulates actin nucleation by Arp2/3 complex. *J Cell Biol* **150**, 1311-1320.

Hilbi, H., Segal, G. & Shuman, H. A. (2001). Icm/dot-dependent upregulation of phagocytosis by *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* **42**, 603-617.

Hoffmann, C., Finsel, I., Otto, A., Pfaffinger, G., Rothmeier, E., Hecker, M., Becher, D. & Hilbi, H. (2014a). Functional analysis of novel Rab GTPases identified in the proteome of purified *Legionella*-containing vacuoles from macrophages. *Cell Microbiol* **16**, 1034-1052.

Hoffmann, C., Harrison, C. F. & Hilbi, H. (2014b). The natural alternative: protozoa as cellular models for *Legionella* infection. *Cell Microbiol* **16**, 15-26.

Horenkamp, F. A., Mukherjee, S., Alix, E., Schauder, C. M., Hubber, A. M., Roy, C. R. & Reinisch, K. M. (2014). *Legionella pneumophila* subversion of host vesicular transport by SidC effector proteins. *Traffic* **15**, 488-499.

Horwitz, M. A. (1983). The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *J Exp Med* **158**, 2108-2126.

Horwitz, M. A. (1984). Phagocytosis of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil. *Cell* **36**, 27-33.

Hsu, F., Zhu, W., Brennan, L., Tao, L., Luo, Z. Q. & Mao, Y. (2012). Structural basis for substrate recognition by a unique Legionella phosphoinositide phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 13567-13572.

Hsu, F., Luo, X., Qiu, J., Teng, Y. B., Jin, J., Smolka, M. B., Luo, Z. Q. & Mao, Y. (2014). The Legionella effector SidC defines a unique family of ubiquitin ligases important for bacterial phagosomal remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 10538-10543.

Huang, L., Boyd, D., Amyot, W. M. & other authors (2011). The E Block motif is associated with Legionella pneumophila translocated substrates. *Cell Microbiol* **13**, 227-245.

Hubber, A., Arasaki, K., Nakatsu, F., Hardiman, C., Lambright, D., De Camilli, P., Nagai, H. & Roy, C. R. (2014). The machinery at endoplasmic reticulum-plasma membrane contact sites contributes to spatial regulation of multiple Legionella effector proteins. *PLoS Pathog* **10**, e1004222.

Humphreys, D., Davidson, A., Hume, P. J. & Koronakis, V. (2012). Salmonella virulence effector SopE and Host GEF ARNO cooperate to recruit and activate WAVE to trigger bacterial invasion. *Cell Host Microbe* **11**, 129-139.

Humphreys, D., Davidson, A. C., Hume, P. J., Makin, L. E. & Koronakis, V. (2013). Arf6 coordinates actin assembly through the WAVE complex, a mechanism usurped by Salmonella to invade host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 16880-16885.

Hybiske, K. & Stephens, R. S. (2007). Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium Chlamydia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 11430-11435.

Hänisch, J., Ehinger, J., Ladwein, M. & other authors (2010). Molecular dissection of Salmonella-induced membrane ruffling versus invasion. *Cell Microbiol* **12**, 84-98.

Hänisch, J., Kölm, R., Wozniczka, M., Bumann, D., Rottner, K. & Stradal, T. E. (2011). Activation of a RhoA/myosin II-dependent but Arp2/3 complex-independent pathway facilitates Salmonella invasion. *Cell Host Microbe* **9**, 273-285.

Ingmundson, A., Delprato, A., Lambright, D. G. & Roy, C. R. (2007). Legionella pneumophila proteins that regulate Rab1 membrane cycling. *Nature* **450**, 365-369.

InVS, Bilan des cas de légionellose survenus en France en 2013 (30/12/2014)

<http://www.invs.sante.fr/fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Infections-respiratoires/Legionellose/Donnees/Bilan-des-cas-de-legionellose-survenus-en-France-en-2013>.

Ireton, K., Payraastre, B. & Cossart, P. (1999). The *Listeria monocytogenes* protein InlB is an agonist of mammalian phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* **274**, 17025-17032.

Ireton, K., Rigano, L. A., Polle, L. & Schubert, W. D. (2014). Molecular mechanism of protrusion formation during cell-to-cell spread of *Listeria*. *Front Cell Infect Microbiol* **4**, 21.

Isberg, R. R., O'Connor, T. J. & Heidtman, M. (2009). The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells. *Nat Rev Microbiol* **7**, 13-24.

Ivanov, S. S., Charron, G., Hang, H. C. & Roy, C. R. (2010). Lipidation by the host prenyltransferase machinery facilitates membrane localization of *Legionella pneumophila* effector proteins. *J Biol Chem* **285**, 34686-34698.

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

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

Jeong, K. C., Sutherland, M. C. & Vogel, J. P. (2015b). Novel export control of a *Legionella* Dot/Icm substrate is mediated by dual, independent signal sequences. *Mol Microbiol* **96**, 175-188.

Juris, S. J., Rudolph, A. E., Huddler, D., Orth, K. & Dixon, J. E. (2000). A distinctive role for the *Yersinia* protein kinase: actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9431-9436.

Kagan, J. C. & Roy, C. R. (2002). *Legionella* phagosomes intercept vesicular traffic from endoplasmic reticulum exit sites. *Nat Cell Biol* **4**, 945-954.

Kenny, B., DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D. J., Frey, E. A. & Finlay, B. B. (1997). Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* **91**, 511-520.

Kenny, B. (1999). Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications. *Mol Microbiol* **31**, 1229-1241.

Khan, M. A., Knox, N., Prashar, A. & other authors (2013). Comparative Genomics Reveal That Host-Innate Immune Responses Influence the Clinical Prevalence of *Legionella pneumophila* Serogroups. *PLoS One* **8**, e67298.

Kim, D. W., Lenzen, G., Page, A. L., Legrain, P., Sansonetti, P. J. & Parsot, C. (2005). The Shigella flexneri effector OspG interferes with innate immune responses by targeting ubiquitin-conjugating enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 14046-14051.

King, N. P., Newton, P., Schuelein, R. & other authors (2014). Soluble NSF attachment protein receptor molecular mimicry by a Legionella pneumophila Dot/Icm effector. *Cell Microbiol*.

Kinley, A. W., Weed, S. A., Weaver, A. M., Karginov, A. V., Bissonette, E., Cooper, J. A. & Parsons, J. T. (2003). Cortactin interacts with WIP in regulating Arp2/3 activation and membrane protrusion. *Curr Biol* **13**, 384-393.

Kjeken, R., Egeberg, M., Habermann, A. & other authors (2004). Fusion between phagosomes, early and late endosomes: a role for actin in fusion between late, but not early endocytic organelles. *Mol Biol Cell* **15**, 345-358.

Kocks, C., Gouin, E., Tabouret, M., Berche, P., Ohayon, H. & Cossart, P. (1992). L. monocytogenes-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. *Cell* **68**, 521-531.

Kolonko, M., Geffken, A. C., Blumer, T., Hagens, K., Schaible, U. E. & Hagedorn, M. (2014). WASH-driven actin polymerization is required for efficient mycobacterial phagosome maturation arrest. *Cell Microbiol* **16**, 232-246.

Kubori, T., Hyakutake, A. & 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. & Nagai, H. (2010). Legionella metaeffector exploits host proteasome to temporally regulate cognate effector. *PLoS Pathog* **6**, e1001216.

Kubori, T., Koike, M., Bui, X. T., Higaki, S., Aizawa, S. & Nagai, H. (2014). Native structure of a type IV secretion system core complex essential for Legionella pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 11804-11809.

Kumar, Y. & Valdivia, R. H. (2008). Actin and intermediate filaments stabilize the Chlamydia trachomatis vacuole by forming dynamic structural scaffolds. *Cell Host Microbe* **4**, 159-169.

Kwok, T., Zabler, D., Urman, S. & other authors (2007). Helicobacter exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature* **449**, 862-866.

Kühn, S. & Geyer, M. (2014). Formins as effector proteins of Rho GTPases. *Small GTPases* **5**, e29513.

Kurusu, S. & Takenawa, T. (2009). The WASP and WAVE family proteins. *Genome Biol* **10**, 226.

Laguna, R. K., Creasey, E. A., Li, Z., Valtz, N. & Isberg, R. R. (2006). A Legionella pneumophila-translocated substrate that is required for growth within macrophages and protection from host cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 18745-18750.

Laurent, V., Loisel, T. P., Harbeck, B., Wehman, A., Gröbe, L., Jockusch, B. M., Wehland, J., Gertler, F. B. & Carlier, M. F. (1999). Role of proteins of the Ena/VASP family in actin-based motility of Listeria monocytogenes. *J Cell Biol* **144**, 1245-1258.

Lautner, M., Schunder, E., Herrmann, V. & Heuner, K. (2013). Regulation, integrase-dependent excision, and horizontal transfer of genomic islands in Legionella pneumophila. *J Bacteriol* **195**, 1583-1597.

Lebensohn, A. M. & Kirschner, M. W. (2009). Activation of the WAVE complex by coincident signals controls actin assembly. *Mol Cell* **36**, 512-524.

LeClaire, L. L., Baumgartner, M., Iwasa, J. H., Mullins, R. D. & Barber, D. L. (2008). Phosphorylation of the Arp2/3 complex is necessary to nucleate actin filaments. *J Cell Biol* **182**, 647-654.

LeClaire, L. L., Rana, M., Baumgartner, M. & Barber, D. L. (2015). The Nck-interacting kinase NIK increases Arp2/3 complex activity by phosphorylating the Arp2 subunit. *J Cell Biol* **208**, 161-170.

Lecuit, M., Hurme, R., Pizarro-Cerda, J., Ohayon, H., Geiger, B. & Cossart, P. (2000). A role for alpha- and beta-catenins in bacterial uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10008-10013.

Lee, W. L., Grimes, J. M. & Robinson, R. C. (2015). Yersinia effector YopO uses actin as bait to phosphorylate proteins that regulate actin polymerization. *Nat Struct Mol Biol* **22**, 248-255.

Leung, Y., Ally, S. & Goldberg, M. B. (2008). Bacterial actin assembly requires toca-1 to relieve N-wasp autoinhibition. *Cell Host Microbe* **3**, 39-47.

Lhocine, N., Arena, E. T., Bomme, P., Ubelmann, F., Prévost, M. C., Robine, S. & Sansonetti, P. J. (2015). Apical invasion of intestinal epithelial cells by Salmonella typhimurium requires villin to remodel the brush border actin cytoskeleton. *Cell Host Microbe* **17**, 164-177.

Li, N., Xiang, G. S., Dokainish, H., Ireton, K. & Elferink, L. A. (2005). The Listeria protein internalin B mimics hepatocyte growth factor-induced receptor trafficking. *Traffic* **6**, 459-473.

Li, T., Lu, Q., Wang, G., Xu, H., Huang, H., Cai, T., Kan, B., Ge, J. & Shao, F. (2013). SET-domain bacterial effectors target heterochromatin protein 1 to activate host rDNA transcription. *EMBO Rep* **14**, 733-740.

Lifshitz, Z., Burstein, D., Peeri, M., Zusman, T., Schwartz, K., Shuman, H. A., 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**, E707-715.

Ligeti, E., Welti, S. & Scheffzek, K. (2012). Inhibition and termination of physiological responses by GTPase activating proteins. *Physiol Rev* **92**, 237-272.

Liu, Y. & 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.

Loisel, T. P., Boujemaa, R., Pantaloni, D. & Carlier, M. F. (1999). Reconstitution of actin-based motility of Listeria and Shigella using pure proteins. *Nature* **401**, 613-616.

Losick, V. P. & Isberg, R. R. (2006). NF-kappaB translocation prevents host cell death after low-dose challenge by Legionella pneumophila. *J Exp Med* **203**, 2177-2189.

Losick, V. P., Haenssler, E., Moy, M. Y. & Isberg, R. R. (2010). LnaB: a Legionella pneumophila activator of NF-kappaB. *Cell Microbiol* **12**, 1083-1097.

Lu, H. & Clarke, M. (2005). Dynamic properties of Legionella-containing phagosomes in Dictyostelium amoebae. *Cell Microbiol* **7**, 995-1007.

Lucas, M., Gaspar, A. H., Pallara, C., Rojas, A. L., Fernández-Recio, J., Machner, M. P. & Hierro, A. (2014). Structural basis for the recruitment and activation of the Legionella phospholipase VipD by the host GTPase Rab5. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, E3514-3523.

Lum, M. & Morona, R. (2014). Myosin IIA is essential for Shigella flexneri cell-to-cell spread. *Pathog Dis* **72**, 174-187.

Luo, Z. Q. & Isberg, R. R. (2004). Multiple substrates of the Legionella pneumophila Dot/Icm system identified by interbacterial protein transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 841-846.

Lurie-Weinberger, M., Gomez-Valero, L., Merault, N., Glöckner, G., Buchrieser, C. & Gophna, U. (2010). The origins of eukaryotic-like proteins in Legionella pneumophila. *Int J Med Microbiol*.

Lutter, E. I., Barger, A. C., Nair, V. & Hackstadt, T. (2013). Chlamydia trachomatis inclusion membrane protein CT228 recruits elements of the myosin phosphatase pathway to regulate release mechanisms. *Cell Rep* **3**, 1921-1931.

Ma, J., He, Y., Hu, B. & Luo, Z. Q. (2013). Genome Sequence of an Environmental Isolate of the Bacterial Pathogen Legionella pneumophila. *Genome Announc* **1**.

Machesky, L. M., Mullins, R. D., Higgs, H. N., Kaiser, D. A., Blanchoin, L., May, R. C., Hall, M. E. & Pollard, T. D. (1999). Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3739-3744.

Machner, M. P. & Isberg, R. R. (2006). Targeting of host Rab GTPase function by the intravacuolar pathogen *Legionella pneumophila*. *Dev Cell* **11**, 47-56.

Madasu, Y., Suarez, C., Kast, D. J., Kovar, D. R. & Dominguez, R. (2013). Rickettsia Sca2 has evolved formin-like activity through a different molecular mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, E2677-2686.

Mallick, E. M., Garber, J. J., Vanguri, V. K. & other authors (2014). The ability of an attaching and effacing pathogen to trigger localized actin assembly contributes to virulence by promoting mucosal attachment. *Cell Microbiol* **16**, 1405-1424.

Mallo, G. V., Espina, M., Smith, A. C., Terebiznik, M. R., Alemán, A., Finlay, B. B., Rameh, L. E., Grinstein, S. & Brumell, J. H. (2008). SopB promotes phosphatidylinositol 3-phosphate formation on *Salmonella* vacuoles by recruiting Rab5 and Vps34. *J Cell Biol* **182**, 741-752.

Marion, S., Hoffmann, E., Holzer, D., Le Clairche, C., Martin, M., Sachse, M., Ganeva, I., Mangeat, P. & Griffiths, G. (2011). Ezrin promotes actin assembly at the phagosome membrane and regulates phago-lysosomal fusion. *Traffic* **12**, 421-437.

Marra, A., Blander, S. J., Horwitz, M. A. & 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.

Matthews, M. & 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.

McDade, J. E., Shepard, C. C., Fraser, D. W., Tsai, T. R., Redus, M. A. & 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.

McGhie, E. J., Hayward, R. D. & Koronakis, V. (2001). Cooperation between actin-binding proteins of invasive *Salmonella*: SipA potentiates SipC nucleation and bundling of actin. *EMBO J* **20**, 2131-2139.

McGhie, E. J., Hayward, R. D. & Koronakis, V. (2004). Control of actin turnover by a *Salmonella* invasion protein. *Mol Cell* **13**, 497-510.

Michard, C. & Doublet, P. (2015). Post-translational modifications are key players of the Legionella pneumophila infection strategy. *Front Microbiol* **6**, 87.

Michard, C., Sperandio, D., Bailo, N. & other authors (2015). The Legionella Kinase LegK2 Targets the ARP2/3 Complex To Inhibit Actin Nucleation on Phagosomes and Allow Bacterial Evasion of the Late Endocytic Pathway. *MBio* **6**, e00354-00315.

Mijakovic, I. & Macek, B. (2012). Impact of phosphoproteomics on studies of bacterial physiology. *FEMS Microbiol Rev* **36**, 877-892.

Mohammadi, S. & Isberg, R. R. (2009). Yersinia pseudotuberculosis virulence determinants YopE, YopE, and YopT modulate RhoG activity and localization. *Infect Immun* **77**, 4771-4782.

Molmeret, M., Alli, O. A., Zink, S., Flieger, A., Cianciotto, N. P. & Kwaik, Y. A. (2002). icmT is essential for pore formation-mediated egress of Legionella pneumophila from mammalian and protozoan cells. *Infect Immun* **70**, 69-78.

Molmeret, M., Bitar, D. M., Han, L. & Kwaik, Y. A. (2004). 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. & 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.

Morrison, S. S., Kozak-Muiznieks, N. A., Sammons, S., Rowe, L. A., Frace, M. & Winchell, J. M. (2015). Draft Genome Sequence of Legionella pneumophila D-5864, a Serogroup 6 Strain. *Genome Announc* **3**.

Mostowy, S. & Cossart, P. (2012). Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 183-194.

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

Mullins, R. D., Heuser, J. A. & Pollard, T. D. (1998). The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6181-6186.

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

Murli, S., Watson, R. O. & Galán, J. E. (2001). Role of tyrosine kinases and the tyrosine phosphatase SptP in the interaction of Salmonella with host cells. *Cell Microbiol* **3**, 795-810.

Méresse, S., Unsworth, K. E., Habermann, A., Griffiths, G., Fang, F., Martínez-Lorenzo, M. J., Waterman, S. R., Gorvel, J. P. & Holden, D. W. (2001). Remodelling of the actin cytoskeleton is essential for replication of intravacuolar Salmonella. *Cell Microbiol* **3**, 567-577.

Müller, M. P., Peters, H., Blümer, J., Blankenfeldt, W., Goody, R. S. & Itzen, A. (2010). The Legionella effector protein DrrA AMPylates the membrane traffic regulator Rab1b. *Science* **329**, 946-949.

Nagai, H. & 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.

Nagai, H., Kagan, J., Zhu, X., Kahn, R. & Roy, C. (2002). A bacterial guanine nucleotide exchange factor activates ARF on Legionella phagosomes. *Science* **295**, 679-682.

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

Narayanan, A., LeClaire, L. L., Barber, D. L. & Jacobson, M. P. (2011). Phosphorylation of the Arp2 subunit relieves auto-inhibitory interactions for Arp2/3 complex activation. *PLoS Comput Biol* **7**, e1002226.

Navarro, L., Koller, A., Nordfelth, R., Wolf-Watz, H., Taylor, S. & Dixon, J. E. (2007). Identification of a molecular target for the Yersinia protein kinase A. *Mol Cell* **26**, 465-477.

Neunuebel, M. R., Chen, Y., Gaspar, A. H., Backlund, P. S., Yergey, A. & Machner, M. P. (2011). De-AMPylation of the small GTPase Rab1 by the pathogen Legionella pneumophila. *Science* **333**, 453-456.

Neunuebel, M. R., Mohammadi, S., Jarnik, M. & Machner, M. P. (2012). Legionella pneumophila LidA affects nucleotide binding and activity of the host GTPase Rab1. *J Bacteriol* **194**, 1389-1400.

Newton, H. J., Sansom, F. M., Dao, J., Cazalet, C., Bruggemann, H., Albert-Weissenberger, C., Buchrieser, C., Cianciotto, N. P. & Hartland, E. L. (2008). Significant role for ladC in initiation of Legionella pneumophila infection. *Infect Immun* **76**, 3075-3085.

Nguyen, T. M., Ilf, D., Jarraud, S. & other authors (2006). A community-wide outbreak of legionnaires disease linked to industrial cooling towers--how far can contaminated aerosols spread? *J Infect Dis* **193**, 102-111.

Ninio, S., Zuckman-Cholon, D. M., Cambronne, E. D. & Roy, C. R. (2005). The Legionella IcmS-IcmW protein complex is important for Dot/Icm-mediated protein translocation. *Mol Microbiol* **55**, 912-926.

O'Brien, K. M., Lindsay, E. L. & Starai, V. J. (2015). The Legionella pneumophila effector protein, LegC7, alters yeast endosomal trafficking. *PLoS One* **10**, e0116824.

Odendall, C., Rolhion, N., Förster, A., Poh, J., Lamont, D. J., Liu, M., Freemont, P. S., Catling, A. D. & Holden, D. W. (2012). The Salmonella kinase SteC targets the MAP kinase MEK to regulate the host actin cytoskeleton. *Cell Host Microbe* **12**, 657-668.

Okamoto, A., Lee, H., Yabutani, M., Yamada, K. & Ohta, M. (2014). Draft Genome Sequence of a Legionella pneumophila Serogroup 4 Strain Causing Legionellosis. *Genome Announc* **2**.

Ott, M., Messner, P., Heesemann, J., Marre, R. & Hacker, J. (1991). Temperature-dependent expression of flagella in Legionella. *J Gen Microbiol* **137**, 1955-1961.

Padrick, S. B., Doolittle, L. K., Brautigam, C. A., King, D. S. & Rosen, M. K. (2011). Arp2/3 complex is bound and activated by two WASP proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, E472-479.

Pan, X., Lührmann, A., Satoh, A., Laskowski-Arce, M. A. & Roy, C. R. (2008). Ankyrin repeat proteins comprise a diverse family of bacterial type IV effectors. *Science* **320**, 1651-1654.

Patel, J. C. & Galán, J. E. (2006). Differential activation and function of Rho GTPases during Salmonella-host cell interactions. *J Cell Biol* **175**, 453-463.

Peracino, B., Balest, A. & Bozzaro, S. (2010). Phosphoinositides differentially regulate bacterial uptake and Nramp1-induced resistance to Legionella infection in Dictyostelium. *J Cell Sci* **123**, 4039-4051.

Pereira, S. F., Goss, L. & Dworkin, J. (2011). Eukaryote-like serine/threonine kinases and phosphatases in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **75**, 192-212.

Perrin, A. J., Jiang, X., Birmingham, C. L., So, N. S. & Brumell, J. H. (2004). Recognition of bacteria in the cytosol of Mammalian cells by the ubiquitin system. *Curr Biol* **14**, 806-811.

Persson, C., Carballeira, N., Wolf-Watz, H. & Fällman, M. (1997). The PTPase YopH inhibits uptake of Yersinia, tyrosine phosphorylation of p130Cas and FAK, and the associated accumulation of these proteins in peripheral focal adhesions. *EMBO J* **16**, 2307-2318.

Phin, N., Parry-Ford, F., Harrison, T., Stagg, H. R., Zhang, N., Kumar, K., Lortholary, O., Zumla, A. & Abubakar, I. (2014). Epidemiology and clinical management of Legionnaires' disease. *Lancet Infect Dis* **14**, 1011-1021.

- Poh, J., Odendall, C., Spanos, A., Boyle, C., Liu, M., Freemont, P. & Holden, D. W. (2008).** SteC is a Salmonella kinase required for SPI-2-dependent F-actin remodelling. *Cell Microbiol* **10**, 20-30.
- Prehna, G., Ivanov, M. I., Bliska, J. B. & Stebbins, C. E. (2006).** Yersinia virulence depends on mimicry of host Rho-family nucleotide dissociation inhibitors. *Cell* **126**, 869-880.
- Price, C. T., Al-Quadani, T., Santic, M., Jones, S. C. & Abu Kwaik, Y. (2010a).** 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., Jones, S. C., Amundson, K. E. & Kwaik, Y. A. (2010b).** Host-mediated post-translational prenylation of novel dot/icm-translocated effectors of legionella pneumophila. *Front Microbiol* **1**, 131.
- Pring, M., Evangelista, M., Boone, C., Yang, C. & Zigmond, S. H. (2003).** Mechanism of formin-induced nucleation of actin filaments. *Biochemistry* **42**, 486-496.
- Pruyne, D., Evangelista, M., Yang, C., Bi, E., Zigmond, S., Bretscher, A. & Boone, C. (2002).** Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science* **297**, 612-615.
- Quinlan, M. E., Heuser, J. E., Kerkhoff, E. & Mullins, R. D. (2005).** Drosophila Spire is an actin nucleation factor. *Nature* **433**, 382-388.
- Ragaz, C., Pietsch, H., Urwyler, S., Taden, A., Weber, S. S. & 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.
- Rajabian, T., Gavicherla, B., Heisig, M., Müller-Altrock, S., Goebel, W., Gray-Owen, S. D. & Ireton, K. (2009).** The bacterial virulence factor InlC perturbs apical cell junctions and promotes cell-to-cell spread of Listeria. *Nat Cell Biol* **11**, 1212-1218.
- Ramesh, N., Antón, I. M., Hartwig, J. H. & Geha, R. S. (1997).** WIP, a protein associated with wiskott-aldrich syndrome protein, induces actin polymerization and redistribution in lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14671-14676.
- Rasson, A. S., Bois, J. S., Pham, D. S., Yoo, H. & Quinlan, M. E. (2015).** Filament assembly by Spire: key residues and concerted actin binding. *J Mol Biol* **427**, 824-839.
- Raychaudhury, S., Farelli, J. D., Montminy, T. P. & other authors (2009).** Structure and function of interacting IcmR-IcmQ domains from a type IVb secretion system in Legionella pneumophila. *Structure* **17**, 590-601.

Reed, S. C., Lamason, R. L., Risca, V. I., Abernathy, E. & Welch, M. D. (2014). Rickettsia actin-based motility occurs in distinct phases mediated by different actin nucleators. *Curr Biol* **24**, 98-103.

Revenu, C., Athman, R., Robine, S. & Louvard, D. (2004). The co-workers of actin filaments: from cell structures to signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 635-646.

Rigano, L. A., Dowd, G. C., Wang, Y. & Ireton, K. (2014). *Listeria monocytogenes* antagonizes the human GTPase Cdc42 to promote bacterial spread. *Cell Microbiol* **16**, 1068-1079.

Robinson, C. G. & Roy, C. R. (2006). Attachment and fusion of endoplasmic reticulum with vacuoles containing *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol* **8**, 793-805.

Rohatgi, R., Ho, H. Y. & Kirschner, M. W. (2000). Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Cell Biol* **150**, 1299-1310.

Rolando, M., Sanulli, S., Rusniok, C., Gomez-Valero, L., Bertholet, C., Sahr, T., Margueron, R. & Buchrieser, C. (2013). *Legionella pneumophila* effector RomA uniquely modifies host chromatin to repress gene expression and promote intracellular bacterial replication. *Cell Host Microbe* **13**, 395-405.

Rothmeier, E., Pfaffinger, G., Hoffmann, C. & other authors (2013). Activation of Ran GTPase by a *Legionella* effector promotes microtubule polymerization, pathogen vacuole motility and infection. *PLoS Pathog* **9**, e1003598.

Rotty, J. D., Wu, C. & Bear, J. E. (2013). New insights into the regulation and cellular functions of the ARP2/3 complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**, 7-12.

Rouiller, I., Xu, X. P., Amann, K. J. & other authors (2008). The structural basis of actin filament branching by the Arp2/3 complex. *J Cell Biol* **180**, 887-895.

Rowbotham, T. J. (1980). Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol* **33**, 1179-1183.

Roy, C. R. & Isberg, R. R. (1997). Topology of *Legionella pneumophila* DotA: an inner membrane protein required for replication in macrophages. *Infect Immun* **65**, 571-578.

Roy, C. R., Berger, K. H. & 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.

Royan, S. V., Jones, R. M., Koutsouris, A. & other authors (2010). Enteropathogenic *E. coli* non-LEE encoded effectors NleH1 and NleH2 attenuate NF- κ B activation. *Mol Microbiol* **78**, 1232-1245.

Sallee, N. A., Rivera, G. M., Dueber, J. E., Vasilescu, D., Mullins, R. D., Mayer, B. J. & Lim, W. A. (2008). The pathogen protein EspF(U) hijacks actin polymerization using mimicry and multivalency. *Nature* **454**, 1005-1008.

Schmitz-Esser, S., Tischler, P., Arnold, R., Montanaro, J., Wagner, M., Rattei, T. & 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.

Schoebel, S., Oesterlin, L. K., Blankenfeldt, W., Goody, R. S. & 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. & other authors (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.

Segal, G. & Shuman, H. A. (1997). Characterization of a new region required for macrophage killing by Legionella pneumophila. *Infect Immun* **65**, 5057-5066.

Segal, G. & Shuman, H. A. (1999). Legionella pneumophila utilizes the same genes to multiply within Acanthamoeba castellanii and human macrophages. *Infect Immun* **67**, 2117-2124.

Selbach, M., Moese, S., Hauck, C. R., Meyer, T. F. & Backert, S. (2002). Src is the kinase of the Helicobacter pylori CagA protein in vitro and in vivo. *J Biol Chem* **277**, 6775-6778.

Selbach, M., Moese, S., Hurwitz, R., Hauck, C. R., Meyer, T. F. & Backert, S. (2003). The Helicobacter pylori CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation. *EMBO J* **22**, 515-528.

Seveau, S., Tham, T. N., Payrastre, B., Hoppe, A. D., Swanson, J. A. & Cossart, P. (2007). A FRET analysis to unravel the role of cholesterol in Rac1 and PI 3-kinase activation in the InIB/Met signalling pathway. *Cell Microbiol* **9**, 790-803.

Seveau, S. (2014). Multifaceted activity of listeriolysin O, the cholesterol-dependent cytolysin of Listeria monocytogenes. *Subcell Biochem* **80**, 161-195.

Sexton, J. A., Miller, J. L., Yoneda, A., Kehl-Fie, T. E. & 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. & 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. & 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.

Shao, F. & Dixon, J. E. (2003). YopT is a cysteine protease cleaving Rho family GTPases. *Adv Exp Med Biol* **529**, 79-84.

Shen, X., Banga, S., Liu, Y., Xu, L., Gao, P., Shamovsky, I., Nudler, E. & Luo, Z. Q. (2009). Targeting eEF1A by a *Legionella pneumophila* effector leads to inhibition of protein synthesis and induction of host stress response. *Cell Microbiol* **11**, 911-926.

Shohdy, N., Efe, J. A., Emr, S. D. & 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.

Sit, S. T. & Manser, E. (2011). Rho GTPases and their role in organizing the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* **124**, 679-683.

Sitthidet, C., Stevens, J. M., Field, T. R., Layton, A. N., Korbsrisate, S. & Stevens, M. P. (2010). Actin-based motility of *Burkholderia thailandensis* requires a central acidic domain of BimA that recruits and activates the cellular Arp2/3 complex. *J Bacteriol* **192**, 5249-5252.

Skoble, J., Portnoy, D. A. & Welch, M. D. (2000). Three regions within ActA promote Arp2/3 complex-mediated actin nucleation and *Listeria monocytogenes* motility. *J Cell Biol* **150**, 527-538.

Smith, B. A., Daugherty-Clarke, K., Goode, B. L. & Gelles, J. (2013a). Pathway of actin filament branch formation by Arp2/3 complex revealed by single-molecule imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 1285-1290.

Smith, B. A., Padrick, S. B., Doolittle, L. K., Daugherty-Clarke, K., Corrêa, I. R., Xu, M. Q., Goode, B. L., Rosen, M. K. & Gelles, J. (2013b). Three-color single molecule imaging shows WASP detachment from Arp2/3 complex triggers actin filament branch formation. *Elife* **2**, e01008.

Sohn, Y. S., Shin, H. C., Park, W. S. & other authors (2015). Lpg0393 of *Legionella pneumophila* is a Guanine-Nucleotide Exchange Factor for Rab5, Rab21 and Rab22. *PLoS One* **10**, e0118683.

Sousa, S., Cabanes, D., El-Amraoui, A., Petit, C., Lecuit, M. & Cossart, P. (2004). Unconventional myosin VIIa and vezatin, two proteins crucial for *Listeria* entry into epithelial cells. *J Cell Sci* **117**, 2121-2130.

Sousa, S., Cabanes, D., Bougnères, L., Lecuit, M., Sansonetti, P., Tran-Van-Nhieu, G. & Cossart, P. (2007). Src, cortactin and Arp2/3 complex are required for E-cadherin-mediated internalization of *Listeria* into cells. *Cell Microbiol* **9**, 2629-2643.

Stamm, L. M., Pak, M. A., Morisaki, J. H., Snapper, S. B., Rottner, K., Lommel, S. & Brown, E. J. (2005). Role of the WASP family proteins for Mycobacterium marinum actin tail formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 14837-14842.

Stender, S., Friebel, A., Linder, S., Rohde, M., Miroid, S. & Hardt, W. D. (2000). Identification of SopE2 from Salmonella typhimurium, a conserved guanine nucleotide exchange factor for Cdc42 of the host cell. *Mol Microbiol* **36**, 1206-1221.

Stone, B. J. & 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.

Suarez, C., Carroll, R. T., Burke, T. A., Christensen, J. R., Bestul, A. J., Sees, J. A., James, M. L., Sirotkin, V. & Kovar, D. R. (2015). Profilin regulates F-actin network homeostasis by favoring formin over Arp2/3 complex. *Dev Cell* **32**, 43-53.

Sun, E. W., Wagner, M. L., Maize, A., Kemler, D., Garland-Kuntz, E., Xu, L., Luo, Z. Q. & Hollenbeck, P. J. (2013). Legionella pneumophila infection of Drosophila S2 cells induces only minor changes in mitochondrial dynamics. *PLoS One* **8**, e62972.

Sutherland, M. C., Nguyen, T. L., Tseng, V. & Vogel, J. P. (2012). The Legionella IcmSW complex directly interacts with DotL to mediate translocation of adaptor-dependent substrates. *PLoS Pathog* **8**, e1002910.

Sutherland, M. C., Binder, K. A., Cuaing, P. Y. & Vogel, J. P. (2013). Reassessing the role of DotF in the Legionella pneumophila type IV secretion system. *PLoS One* **8**, e65529.

Swimm, A., Bommarius, B., Li, Y., Cheng, D., Reeves, P., Sherman, M., Veach, D., Bornmann, W. & Kalman, D. (2004). Enteropathogenic Escherichia coli use redundant tyrosine kinases to form actin pedestals. *Mol Biol Cell* **15**, 3520-3529.

Tabassam, F. H., Graham, D. Y. & Yamaoka, Y. (2008). OipA plays a role in Helicobacter pylori-induced focal adhesion kinase activation and cytoskeletal re-organization. *Cell Microbiol* **10**, 1008-1020.

Tabassam, F. H., Graham, D. Y. & Yamaoka, Y. (2011). Paxillin is a novel cellular target for converging Helicobacter pylori-induced cellular signaling. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **301**, G601-611.

Talman, A. M., Chong, R., Chia, J., Svitkina, T. & Agaisse, H. (2014). Actin network disassembly powers dissemination of Listeria monocytogenes. *J Cell Sci* **127**, 240-249.

- Tan, Y., Arnold, R. J. & Luo, Z. Q. (2011).** Legionella pneumophila regulates the small GTPase Rab1 activity by reversible phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 21212-21217.
- Tan, Y. & Luo, Z. Q. (2011).** Legionella pneumophila SidD is a deAMPylase that modifies Rab1. *Nature* **475**, 506-509.
- Tegtmeyer, N., Zabler, D., Schmidt, D., Hartig, R., Brandt, S. & Backert, S. (2009).** Importance of EGF receptor, HER2/Neu and Erk1/2 kinase signalling for host cell elongation and scattering induced by the Helicobacter pylori CagA protein: antagonistic effects of the vacuolating cytotoxin VacA. *Cell Microbiol* **11**, 488-505.
- Tegtmeyer, N., Wittelsberger, R., Hartig, R., Wessler, S., Martinez-Quiles, N. & Backert, S. (2011).** Serine phosphorylation of cortactin controls focal adhesion kinase activity and cell scattering induced by Helicobacter pylori. *Cell Host Microbe* **9**, 520-531.
- Terebiznik, M. R., Vieira, O. V., Marcus, S. L., Slade, A., Yip, C. M., Trimble, W. S., Meyer, T., Finlay, B. B. & Grinstein, S. (2002).** Elimination of host cell PtdIns(4,5)P(2) by bacterial SigD promotes membrane fission during invasion by Salmonella. *Nat Cell Biol* **4**, 766-773.
- Thompson, M. E., Heimsath, E. G., Gauvin, T. J., Higgs, H. N. & Kull, F. J. (2013).** FMNL3 FH2-actin structure gives insight into formin-mediated actin nucleation and elongation. *Nat Struct Mol Biol* **20**, 111-118.
- Thwaites, T., Nogueira, A. T., Campeotto, I., Silva, A. P., Grieshaber, S. S. & Carabeo, R. A. (2014).** The Chlamydia effector TarP mimics the mammalian leucine-aspartic acid motif of paxillin to subvert the focal adhesion kinase during invasion. *J Biol Chem* **289**, 30426-30442.
- Tilney, L. G. & Portnoy, D. A. (1989).** Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, Listeria monocytogenes. *J Cell Biol* **109**, 1597-1608.
- Tilney, L. G., Harb, O. S., Connelly, P. S., Robinson, C. G. & Roy, C. R. (2001).** How the parasitic bacterium Legionella pneumophila modifies its phagosome and transforms it into rough ER: implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane. *J Cell Sci* **114**, 4637-4650.
- Toulabi, L., Wu, X., Cheng, Y. & Mao, Y. (2013).** Identification and structural characterization of a Legionella phosphoinositide phosphatase. *J Biol Chem* **288**, 24518-24527.
- Travier, L., Guadagnini, S., Gouin, E. & other authors (2013).** ActA promotes Listeria monocytogenes aggregation, intestinal colonization and carriage. *PLoS Pathog* **9**, e1003131.
- Trigui, H., Dudyk, P., Sum, J., Shuman, H. A. & Faucher, S. P. (2013).** Analysis of the transcriptome of Legionella pneumophila hfq mutant reveals a new mobile genetic element. *Microbiology* **159**, 1649-1660.

- Truong, D., Brabant, D., Bashkurov, M. & other authors (2013).** Formin-mediated actin polymerization promotes Salmonella invasion. *Cell Microbiol* **15**, 2051-2063.
- Truong, D., Copeland, J. W. & Brumell, J. H. (2014).** Bacterial subversion of host cytoskeletal machinery: hijacking formins and the Arp2/3 complex. *Bioessays* **36**, 687-696.
- Tsutsumi, R., Higashi, H., Higuchi, M., Okada, M. & Hatakeyama, M. (2003).** Attenuation of Helicobacter pylori CagA x SHP-2 signaling by interaction between CagA and C-terminal Src kinase. *J Biol Chem* **278**, 3664-3670.
- Urbanek, A. N., Smith, A. P., Allwood, E. G., Booth, W. I. & Ayscough, K. R. (2013).** A novel actin-binding motif in Las17/WASP nucleates actin filaments independently of Arp2/3. *Curr Biol* **23**, 196-203.
- Uruno, T., Liu, J., Zhang, P., Fan Yx, Egile, C., Li, R., Mueller, S. C. & Zhan, X. (2001).** Activation of Arp2/3 complex-mediated actin polymerization by cortactin. *Nat Cell Biol* **3**, 259-266.
- Vadlamudi, R. K., Li, F., Barnes, C. J., Bagheri-Yarmand, R. & Kumar, R. (2004).** p41-Arc subunit of human Arp2/3 complex is a p21-activated kinase-1-interacting substrate. *EMBO Rep* **5**, 154-160.
- Vandersmissen, L., De Buck, E., Saels, V., Coil, D. A. & 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. & 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.
- Veiga, E. & Cossart, P. (2005).** Listeria hijacks the clathrin-dependent endocytic machinery to invade mammalian cells. *Nat Cell Biol* **7**, 894-900.
- Venkataraman, C., Haack, B. J., Bondada, S. & 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.
- Venkataraman, C. & Kwaik, Y. A. (2000).** Signal transduction in the protozoan host Hartmannella vermiformis upon attachment to Legionella pneumophila. *Microbes Infect* **2**, 867-875.
- Vincent, C. D., Friedman, J. R., Jeong, K. C., Buford, E. C., Miller, J. L. & Vogel, J. P. (2006).** Identification of the core transmembrane complex of the Legionella Dot/Icm type IV secretion system. *Mol Microbiol* **62**, 1278-1291.

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

Vincent, C. D., Friedman, J. R., Jeong, K. C., Sutherland, M. C. & 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.

Viner, R., Chetrit, D., Ehrlich, M. & Segal, G. (2012). Identification of two Legionella pneumophila effectors that manipulate host phospholipids biosynthesis. *PLoS Pathog* **8**, e1002988.

Vingadassalom, D., Kazlauskas, A., Skehan, B., Cheng, H. C., Magoun, L., Robbins, D., Rosen, M. K., Saksela, K. & Leong, J. M. (2009). Insulin receptor tyrosine kinase substrate links the E. coli O157:H7 actin assembly effectors Tir and EspF(U) during pedestal formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 6754-6759.

Vingadassalom, D., Campellone, K. G., Brady, M. J. & other authors (2010). Enterohemorrhagic E. coli requires N-WASP for efficient type III translocation but not for EspFU-mediated actin pedestal formation. *PLoS Pathog* **6**, e1001056.

Vizcarra, C. L., Bor, B. & Quinlan, M. E. (2014). The role of formin tails in actin nucleation, processive elongation, and filament bundling. *J Biol Chem* **289**, 30602-30613.

Vogel, J. P., Andrews, H. L., Wong, S. K. & Isberg, R. R. (1998). Conjugative transfer by the virulence system of Legionella pneumophila. *Science* **279**, 873-876.

Wagner, A. R., Luan, Q., Liu, S. L. & Nolen, B. J. (2013). Dip1 defines a class of Arp2/3 complex activators that function without preformed actin filaments. *Curr Biol* **23**, 1990-1998.

Watarai, M., Derre, I., Kirby, J., Growney, J. D., Dietrich, W. F. & 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.

Watts, D. J. & Ashworth, J. M. (1970). Growth of myxameobae of the cellular slime mould Dictyostelium discoideum in axenic culture. *Biochem J* **119**, 171-174.

Weber, S., Ragaz, C., Reus, K., Nyfeler, Y. & Hilbi, H. (2006). Legionella pneumophila exploits PI(4)P to anchor secreted effector proteins to the replicative vacuole. *PLoS Pathog* **2**, e46.

Weber, S., Wagner, M. & Hilbi, H. (2014). Live-cell imaging of phosphoinositide dynamics and membrane architecture during Legionella infection. *MBio* **5**, e00839-00813.

Weber, S. S., Ragaz, C. & 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.

Wee, B. A., Woolfit, M., Beatson, S. A. & Petty, N. K. (2013). A distinct and divergent lineage of genomic island-associated Type IV Secretion Systems in Legionella. *PLoS One* **8**, e82221.

Weiss, S. M., Ladwein, M., Schmidt, D. & other authors (2009). IRSp53 links the enterohemorrhagic E. coli effectors Tir and EspFU for actin pedestal formation. *Cell Host Microbe* **5**, 244-258.

Winder, S. J. & Ayscough, K. R. (2005). Actin-binding proteins. *J Cell Sci* **118**, 651-654.

Winkelman, J. D., Bilancia, C. G., Peifer, M. & Kovar, D. R. (2014). Ena/VASP Enabled is a highly processive actin polymerase tailored to self-assemble parallel-bundled F-actin networks with Fascin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 4121-4126.

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

Wong, K. W. & Isberg, R. R. (2005). Yersinia pseudotuberculosis spatially controls activation and misregulation of host cell Rac1. *PLoS Pathog* **1**, e16.

Xu, L., Shen, X., Bryan, A., Banga, S., Swanson, M. S. & Luo, Z. Q. (2010). Inhibition of host vacuolar H⁺-ATPase activity by a Legionella pneumophila effector. *PLoS Pathog* **6**, e1000822.

Xue, B. & Robinson, R. C. (2013). Guardians of the actin monomer. *Eur J Cell Biol* **92**, 316-332.

Yeo, H. J., Savvides, S. N., Herr, A. B., Lanka, E. & Waksman, G. (2000). Crystal structure of the hexameric traffic ATPase of the Helicobacter pylori type IV secretion system. *Mol Cell* **6**, 1461-1472.

Yoshikawa, Y., Ogawa, M., Hain, T. & other authors (2009). Listeria monocytogenes ActA-mediated escape from autophagic recognition. *Nat Cell Biol* **11**, 1233-1240.

Yu, V. L., Plouffe, J. F., Pastoris, M. C. & other authors (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.

Zhou, D., Chen, L. M., Hernandez, L., Shears, S. B. & Galán, J. E. (2001). A Salmonella inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization. *Mol Microbiol* **39**, 248-259.

Zhu, W., Banga, S., Tan, Y., Zheng, C., Stephenson, R., Gately, J. & 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. & Luo, Z. Q. (2013). Induction of caspase 3 activation by multiple *Legionella pneumophila* Dot/Icm substrates. *Cell Microbiol* **15**, 1783-1795.

Zuchero, J. B., Coutts, A. S., Quinlan, M. E., Thangue, N. B. & Mullins, R. D. (2009). p53-cofactor JMY is a multifunctional actin nucleation factor. *Nat Cell Biol* **11**, 451-459.

Zusman, T., Feldman, M., Halperin, E. & 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.

Annexes

1. Revue sur la biogénèse de la vacuole de *L. pneumophila*

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.

LCV biogenesis is a main trait of *Legionella pneumophila* 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 pneumophila* 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].

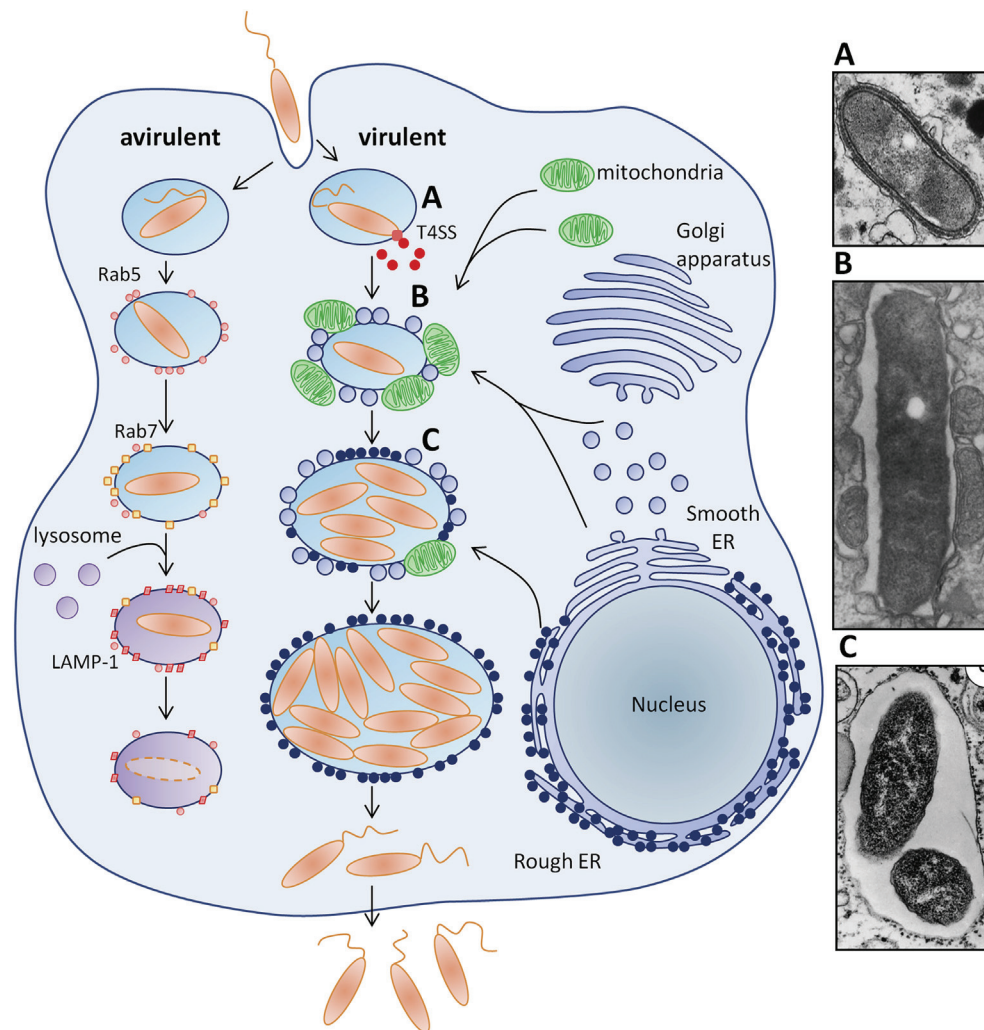


Fig. 1. LCV biogenesis during *Legionella pneumophila* infectious cycle. *L. pneumophila* is internalized within host cell and resides in a phagosome (A, from Ref. [10]). Virulent *L. pneumophila* injects T4SS effector proteins to control LCV biogenesis. Mitochondria and smooth ER-derived vesicles are 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- κ B 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-bisphosphate [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 PI4KIII β , which adds a phosphate at position 4 of PI to yield PI(4)P (Fig. 2). Indeed, knockdown of PI4KIII β results in decreased accumulation of PI(4)P on LCV [56]. Although the recruitment of PI4KIII β 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 PI4KIII β 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 PI4KIII β 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 dispensable 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].

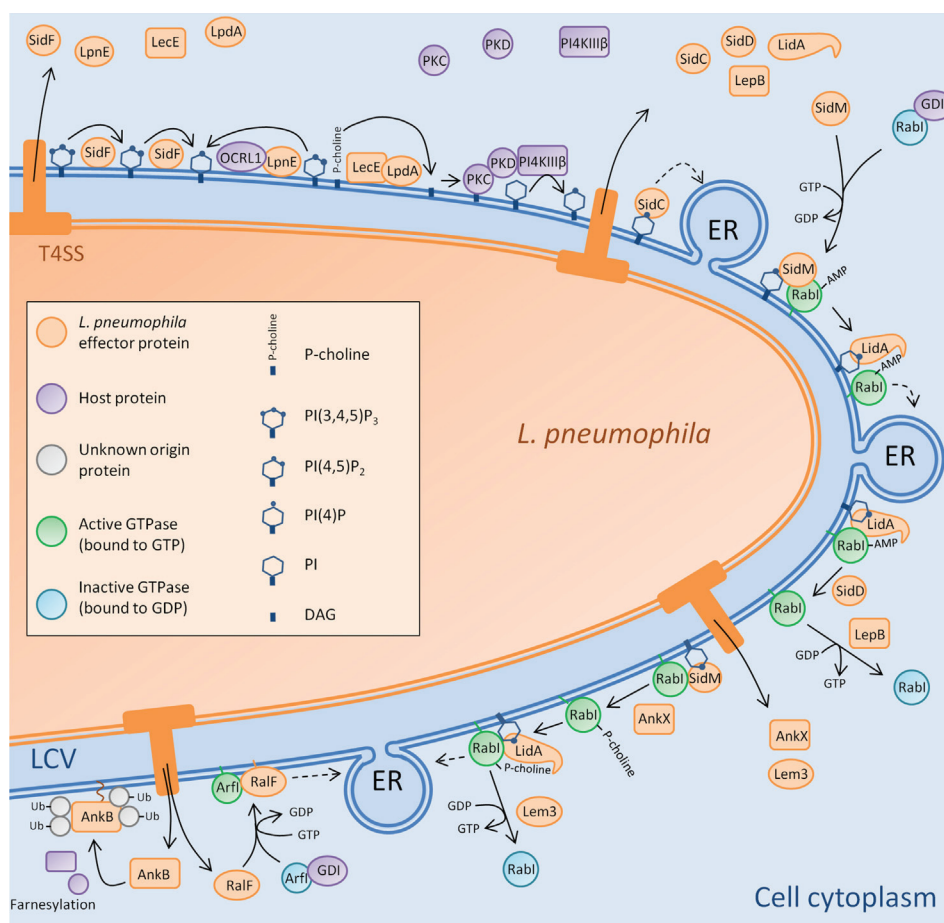


Fig. 2. Modulation of phospholipids and small GTPases by *L. pneumophila* for LCV biogenesis. LCV biogenesis is mediated by Dot/Icm effector proteins that modify PI lipids (SidF, LecE or LpdA) or recruit PI-modifying host enzymes (PI4KIIIβ or OCRL1). Lipids remodeling of the LCV membrane ([PI(4)P] enrichment) 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 dephosphocholinase (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-derived LCV, (ii) the functional association between Sec22b on ER-derived 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-derived 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 adenylation, 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 mimic 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 phosphorylation, *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 phospholipid 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- κ B pathway by phosphorylating the I κ B 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- κ B, *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-Quadri, 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-Quadri, 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.

2. Revue sur les modifications post-traductionnels réalisées par *L. pneumophila*



Post-translational modifications are key players of the *Legionella pneumophila* infection strategy

Céline Michard^{1,2,3,4,5} and Patricia Doublet^{1,2,3,4,5} *

¹ Legionella Pathogenesis Group, International Center for Infectiology Research, Université de Lyon, Lyon, France

² INSERM U1111, Lyon, France

³ Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France

⁴ Centre International de Recherche en Infectiologie, Université Lyon 1, Lyon, France

⁵ Centre National de la Recherche Scientifique, UMR5308, Lyon, France

Edited by:

Christophe Grangeasse, Centre National de la Recherche Scientifique, France

Reviewed by:

Buchrieser Carmen, Institut Pasteur, France

Nelson Cruz Soares, University of Cape Town, South Africa

*Correspondence:

Patricia Doublet, Legionella Pathogenesis Group, International Center for Infectiology Research, Université de Lyon, Bat A. Lwoff, 10 rue Dubois, 69622 Villeurbanne cedex, Lyon, France
e-mail: patricia.doublet@univ-lyon1.fr

Post-translational modifications (PTMs) are widely used by eukaryotes to control the enzymatic activity, localization or stability of their proteins. Traditionally, it was believed that the broad biochemical diversity of the PTMs is restricted to eukaryotic cells, which exploit it in extensive networks to fine-tune various and complex cellular functions. During the last decade, the advanced detection methods of PTMs and functional studies of the host–pathogen relationships highlight that bacteria have also developed a large arsenal of PTMs, particularly to subvert host cell pathways to their benefit. *Legionella pneumophila*, the etiological agent of the severe pneumonia legionellosis, is the paradigm of highly adapted intravacuolar pathogens that have set up sophisticated biochemical strategies. Among them, *L. pneumophila* has evolved eukaryotic-like and rare/novel PTMs to hijack host cell processes. Here, we review recent progress about the diversity of PTMs catalyzed by *Legionella*: ubiquitination, prenylation, phosphorylation, glycosylation, methylation, AMPylation, and de-AMPylation, phosphocholination, and de-phosphocholination. We focus on the host cell pathways targeted by the bacteria catalyzed PTMs and we stress the importance of the PTMs in the *Legionella* infection strategy. Finally, we highlight that the discovery of these PTMs undoubtedly made significant breakthroughs on the molecular basis of *Legionella* pathogenesis but also lead the way in improving our knowledge of the eukaryotic PTMs and complex cellular processes that are associated to.

Keywords: post-translational modification, *Legionella pneumophila*, Dot/Icm effectors, host cell pathways hijacking, *Legionella* virulence

INTRODUCTION

Post-translational modifications (PTMs) are widely used by eukaryotes to control quickly, locally and specifically the enzymatic activity, localization or stability of their proteins, and thus to fine-tune key factors of the cellular biology to environmental changes. Eukaryotic PTMs involve diverse modifications of specific residues of the protein by the covalent addition of simple or complex chemical groups; they include the addition of chemical group (e.g., phosphate, methyl, or acetate), more complex molecules (e.g., carbohydrates or lipids), the covalent linkage of small proteins (e.g., ubiquitin), and the irreversible hydrolysis of a specific peptide bond between two amino acids, or proteolysis (for review, see Walsh et al., 2005). PTMs are catalyzed by specific enzymes and most of them are reversed by antagonistic catalytic activities. Traditionally, it was believed that the broad biochemical diversity of the PTMs is restricted to complex eukaryotic cells, which exploit it in extensive networks to control various and complex cellular functions. During the last decade, the advanced detection methods of PTMs, including the modified peptides enrichment combined with high accuracy mass spectrometry, the pathogen genomes sequencing that predicts PTMs activities, and the functional studies of the host–pathogen relationships highlight that bacteria have also developed

a large arsenal of PTMs, particularly to subvert host cell pathways to their benefit, to escape to the host defences, and finally to promote their replication (for review, see Ribet and Cossart, 2010a,b).

Legionella pneumophila, the etiological agent of the severe pneumonia legionellosis, is a paradigm of highly adapted intravacuolar pathogens that have set up sophisticated biochemical strategies to hijack host cell processes. *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. Within environmental phagocytic cells and human macrophages, *L. pneumophila* evades endocytic degradation (Horwitz and Maxfield, 1984; Clemens et al., 2000), controls the innate immune response, especially the NF- κ B pathway (Schmeck et al., 2007; Shin et al., 2008), and triggers the biogenesis of a *Legionella*-containing vacuole (LCV), a rough endoplasmic reticulum-like compartment permissive for its intracellular replication (Horwitz, 1983; Kagan and Roy, 2002). Crucial for hijacking host cell vesicle trafficking necessary for LCV biogenesis, and subsequently for intracellular multiplication of *L. pneumophila*, is the Dot/Icm Type 4 Secretion System (T4SS; Marra et al., 1992; Andrews et al., 1998) that

translocates into the host cell cytosol over 275 bacterial proteins, named effectors (Zhu et al., 2011). Many Dot/Icm effectors harbor eukaryotic domains (Cazalet et al., 2004), such as protein–protein interaction domains and enzymatic activity-associated domains, in particular for PTMs such as methylation, phosphorylation, ubiquitination, and glycosylation, which support that *L. pneumophila* has evolved eukaryotic-like PTMs to hijack host cell processes.

Here, we review recent progress about the diversity of PTMs catalyzed by *Legionella*. We focus on the host cell pathways targeted by the bacteria-catalyzed PTMs and we stress the importance of the PTMs in the *Legionella* infection strategy.

DIVERSITY OF PTMs CATALYZED BY *L. pneumophila*

A key finding of the *L. pneumophila* genome analysis was the identification of a large number of proteins similar to eukaryotic proteins. The wide variety of these proteins includes enzymatic activity-associated domains for various PTMs such as phosphorylation, glycosylation, methylation, prenylation, ubiquitination, reversible AMPylation, and phosphocholination of host cell proteins to modulate cellular functions (Table 1).

PROTEIN PHOSPHORYLATION

Phosphorylation–dephosphorylation of proteins represents a powerful regulatory mechanism of cellular activity. Indeed, intensive research has revealed that eukaryotes contain numerous interconnected signal transduction networks in which protein phosphorylation plays a dominant role for controlling essential functions, such as growth, cell cycle and apoptosis, in response to extracellular stimuli and stresses. It consists in the reversible covalent addition of a phosphate group, from the phosphate donor ATP, to specific residues of a target protein, the most frequent being hydroxyl groups of serine, threonine or tyrosine residues. The phosphoester bond is catalyzed by eukaryotic protein kinases that share a common catalytic domain characterized by 11 conserved Hanks's subdomains (Hanks, 2003). Conversely, phosphatases hydrolyze the phosphoester bond, thereby releasing the phosphate group and restoring the acceptor amino acid in its unphosphorylated form.

The genomes of the six sequenced *L. pneumophila* strains, Philadelphia, Lens, Paris, Corby, Alcoy, and 130b, have been reported to encode four putative eukaryotic-like serine/threonine kinases, named LegK1–LegK4 (Cazalet et al., 2004; de Felipe et al., 2005; D'Auria et al., 2010; Schroeder et al., 2010). Alignment with several eukaryotic protein kinases revealed residues that are highly conserved in the Hanks' subdomains, including the glycine-rich loop and the invariant lysine in subdomains I and II, which are essential for binding and correct orientation of the phosphate donor ATP. *In vitro* phosphorylation assays confirmed that these kinases were functional for autophosphorylation and/or phosphorylation of the classical substrate for eukaryotic kinases Myelin-basic protein (Hervet et al., 2011; Table 1).

PROTEIN ALKYLATION

Protein alkylation consists in the addition of alkyl substituents on specific amino acids. The common alkyl groups transferred are the methyl (C1) or the C15 (farnesyl)/C20 (geranyl–geranyl) isoprenyl

groups, leading to protein methylation and protein prenylation, respectively.

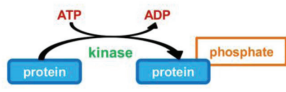

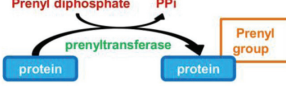



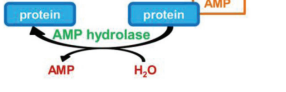
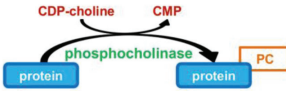

Protein methylation typically takes place on arginine or lysine residues in the protein sequence. Arginine can be methylated once or twice, with either both methyl groups on one terminal nitrogen (asymmetric dimethylated arginine) or one on both nitrogens (symmetric dimethylated arginine) by peptidylarginine methyltransferases (PRMTs). Lysine can be methylated once, twice, or three times by lysine methyltransferases (Walsh et al., 2005). Protein methylation has been extensively studied in the histones. The transfer of methyl groups from S-adenosyl methionine (SAM) to histones is catalyzed by SET domain-containing proteins. This protein family is characterized by an ~130 amino acid-long SET domain that possesses catalytic activity toward the ϵ -amino group of lysine residues. *In vivo*, lysine methylation can be dynamically regulated by the opposing actions of lysine methyltransferases and lysine demethylases (Herz et al., 2013). *L. pneumophila* genome analysis revealed that all the five strains Philadelphia, Lens, Paris, Corby, and Alcoy encode each an orthologous protein encoding a SET domain that show 95–100% sequence identity over the entire length (Cazalet et al., 2004). *In vitro* assays recently demonstrated that Lpp1683 in Paris strain and Lpg1718 in Philadelphia strain, display histone methyltransferase activity toward the histone H3 substrate (Li et al., 2013; Rolando et al., 2013b; Table 1).

Prenylation, i.e., addition of a farnesyl (C15) or a geranyl–geranyl (C20) group, is a PTM that covalently links a lipid moiety at the cysteine residue of the CAAX motif in the C-terminal region of proteins (where C represents cysteine and A an aliphatic amino acids). The Ras GTPases, Rab small GTPases, and protein kinases superfamilies have members that can be prenylated on cysteine thiolate side chains. The lipid anchors drive the modified proteins to partition more to membranes, thus controlling their subcellular localization (Walsh et al., 2005). Interestingly, bioinformatic approaches identified 11–12 (depending on the strains) different *Legionella* proteins containing a CAAX motif in the C terminus, which have been so called Pel proteins for Prenylated effectors of *Legionella* (Ivanov et al., 2010; Price et al., 2010a,b). Six of these proteins had highly conserved homologs across all *Legionella* strains, whereas four of the proteins were unique for either the Philadelphia or Lens strain. Host farnesyltransferase and class I geranylgeranyltransferase were both involved in the lipidation of the *Legionella* CAAX motif proteins, among which AnkB from *L. pneumophila* AA100 and Philadelphia Lp01 (Ivanov et al., 2010; Price et al., 2010a,b; Table 1).

PROTEIN UBIQUITINATION

Ubiquitination consists in the addition of one or several ubiquitins on a target protein, most frequently on lysine residue, although linkages on cysteine, serine or threonine, or on the N-terminal amino group have also been reported. Ubiquitin is a small protein of 9 kDa, which contains itself seven lysines; all of these lysine residues can be used as a target for the addition of another ubiquitin moiety, thus leading to polyubiquitination. Polyubiquitin chains built up through Lys48 side chains are commonly associated with proteasome binding and degradation of the modified protein, whereas chains tethered through

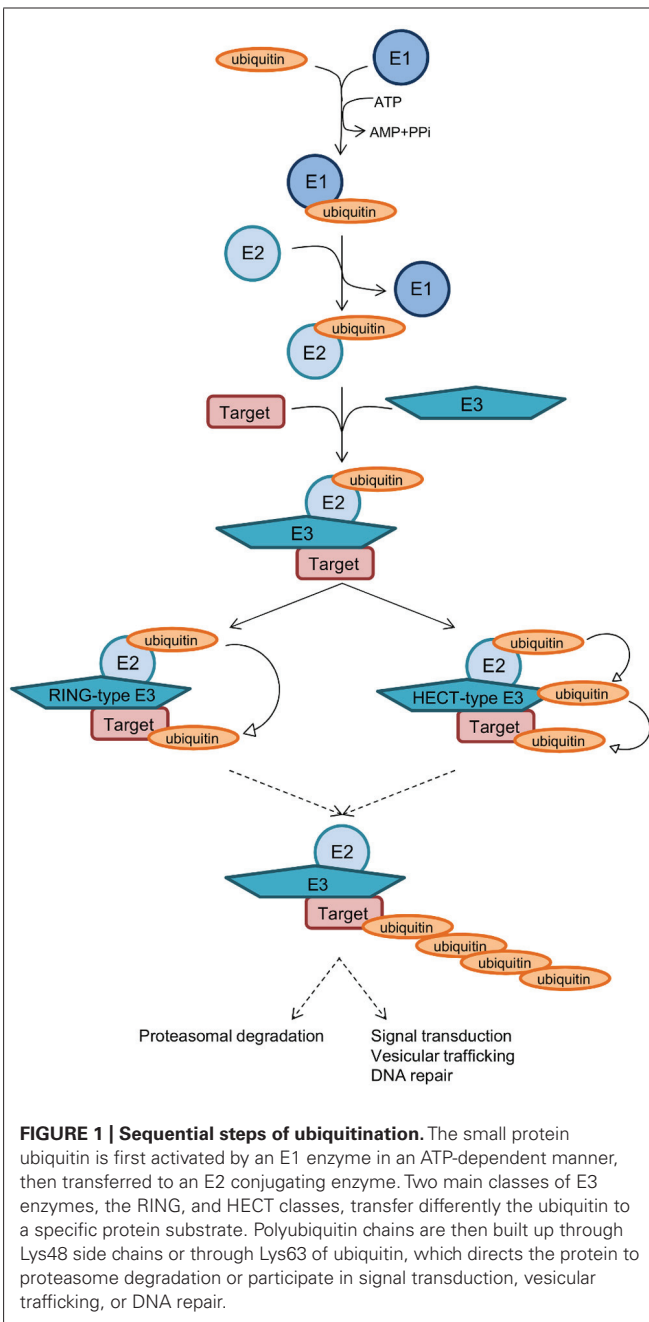
Table 1 | Diversity of PTMs catalyzed by Dot/Icm effectors of *Legionella pneumophila*.

PTMs	Mechanism	Effector name	Motif	Target	Reference
Phosphorylation		LegK1 LegK2 LegK3 LegK4	STPK	IκB	Ge et al. (2009), Hervet et al. (2011) Hervet et al. (2011) Hervet et al. (2011) Hervet et al. (2011)
Methylation		LegAS4/RomA	SET domain	H3	Li et al. (2013), Rolando et al. (2013b)
Prenylation		AnkB /LegAU13 /Ceg27	CAAX		Price et al. (2010a)
Ubiquitination		LubX /LegU2 AnkB /LegAU13 /Ceg27 LegU1 SidC	U-box F-box F-box	Clk1 /SidH Skp1/ParvB BAT3	Kubori et al. (2008) Price et al. (2009), Lomma et al. (2010) Ensminger and Isberg (2010) Hsu et al. (2014)
Glycosylation		Lgt1 Lgt2 Lgt3 /Legc5 SetA	Coiled-coil Coiled-coil Coiled-coil	eEF1A eEF1A eEF1A	Belyi et al. (2006) Belyi et al. (2008), Aktories (2011) Belyi et al. (2008), Aktories (2011) Heidtman et al. (2009)
AMPylation		SidM /DrrA		Rab1	Müller et al. (2010)
DeAMPylation		SidD		Rab1	Neunuebel et al. (2011), Tan et al. (2011)
Phosphocholination		AnkX /AnkN /LegA8	Ankyrin	Rab1	Mukherjee et al. (2011)
Dephosphocholination		Lem3		Rab1	Tan et al. (2011)

STPK, Ser/Thr protein kinase.

Lys63 participate in signal transduction, vesicular trafficking or DNA repair (Hochstrasser, 2009). The conjugation of ubiquitin requires different enzymes (Figure 1): E1 activating enzymes that bind ubiquitin in a ATP dependent manner; E2 conjugation enzymes that bind ubiquitin in a thioester bond; E3 ubiquitin ligases are then required to catalyze the efficient transfer of the

activated ubiquityl protein tag to Lys side chains of target proteins. There are two different families of E3 ubiquitin ligases, the HECT family and the RING/U-Box family. In the RING family, some of the enzyme 3 are multicomponent catalysts, such as the SCF E3s that consist in four subunits: the invariable subunit Skp1, the central core component Cullin, the RING finger



protein Rbx1/Roc1 and the variable F-Box protein that serves as a receptor for the target protein, such providing selectivity for a given protein (Lorick et al., 1999). There are several 100 isoforms of such E3 ubiquitin ligases in higher eukaryotes, which allow subtle discrimination among many target proteins selected for ubiquitination.

Genome analysis of the *L. pneumophila* strains Paris and Philadelphia revealed they encode a protein, named LubX, containing two U-box domains similar to eukaryotic E3 ubiquitin ligases (Cazalet et al., 2004). Indeed, *in vitro* and in host cells, LubX functions as an ubiquitin ligase (Kubori et al., 2008). Moreover, *L. pneumophila* encodes several proteins with predicted

F-Box motifs (de Felipe et al., 2005). The best characterized is the AnkB protein, that is conserved in the five sequenced *L. pneumophila* strains (Table 1). Genome sequence of *L. pneumophila* Philadelphia reveals the presence of at least another four F-box containing proteins (Price and Kwaik, 2010). These include Lpg2224 (PpgA), Lpg2525 (MavK), LicA, and LegU1. Finally, the Dot/Icm effector SidC has been recently reported to define a unique family of ubiquitin ligase (Hsu et al., 2014). While the amino acid sequence of SidC does not exhibit significant homology with any known protein, the crystal structure of its N-terminal domain revealed a canonical catalytic triad C46-H444-D446 found in cysteine-based proteases and deubiquitinases. Unexpectedly, *in vitro* assays demonstrated that SidC exhibits ubiquitin ligase rather than protease or deubiquitinase activity. More precisely, SidC catalyzes the formation of high-molecular-weight ubiquitinated conjugates in a manner that is dependent on the catalytic residue C46. Authors further showed that the SidC paralog SdcA has also ubiquitin ligase activity (Hsu et al., 2014; Table 1).

PROTEIN GLYCOSYLATION

O-glycosylation and N-glycosylation of proteins are very common in eukaryotes but only O-glycosylation has been described to date in the two major groups of bacterial toxins. O-glycosylation consists in the modification of serine or threonine residues. A 60 kDa protein that exhibited UDP-glycosyltransferase activity toward a 50 kDa protein from HeLa cell lysates was firstly purified from *L. pneumophila* (Belyi et al., 2003). This protein, named Lgt1 (for *Legionella* glycosyltransferase 1) contains a DXD motif, which is conserved in many prokaryotic and eukaryotic glucosyltransferases. In *L. pneumophila* strains Philadelphia, Lens, Paris, and Corby, two other proteins very similar to Lgt1 were then identified; they were thus called Lgt2 and Lgt3 and were shown to exhibit the same glycosylase activity (Belyi et al., 2008; Aktories, 2011). An additional protein, namely SetA, possesses a functional glycosyltransferase domain (Heidtman et al., 2009). However, its target in the host cell has not been yet identified (Table 1).

REVERSIBLE PROTEIN AMPylation

AMPylation or adenylation is the addition of an adenosine monophosphate (AMP) group from ATP onto a threonine, tyrosine, or serine residue of a protein. This PTM was first and recently discovered on host cell proteins infected by *Vibrio parahaemolyticus* and *Histophilus somni* (Worby et al., 2009; Yarbrough et al., 2009). This activity involves a conserved domain, called Fic domain (for filamentation induced by cAMP domain), which was originally described in *Escherichia coli* as a stress response protein associated with filamentous bacterial growth in the presence of cAMP (Komano et al., 1991). The Fic domain is also found in eukaryotic proteins, and AMPylation has now been shown to be naturally occurring in eukaryotic cells (Kinch et al., 2009; Roy and Mukherjee, 2009; Worby et al., 2009; Yarbrough and Orth, 2009; Yarbrough et al., 2009). Despite the lack of a consensus Fic domain on its sequence and that its amino acid sequence did not suggest its function, the protein SidM from *L. pneumophila* has been recently shown to possess AMPylase activity (Müller et al., 2010). More precisely, its N-terminal domain

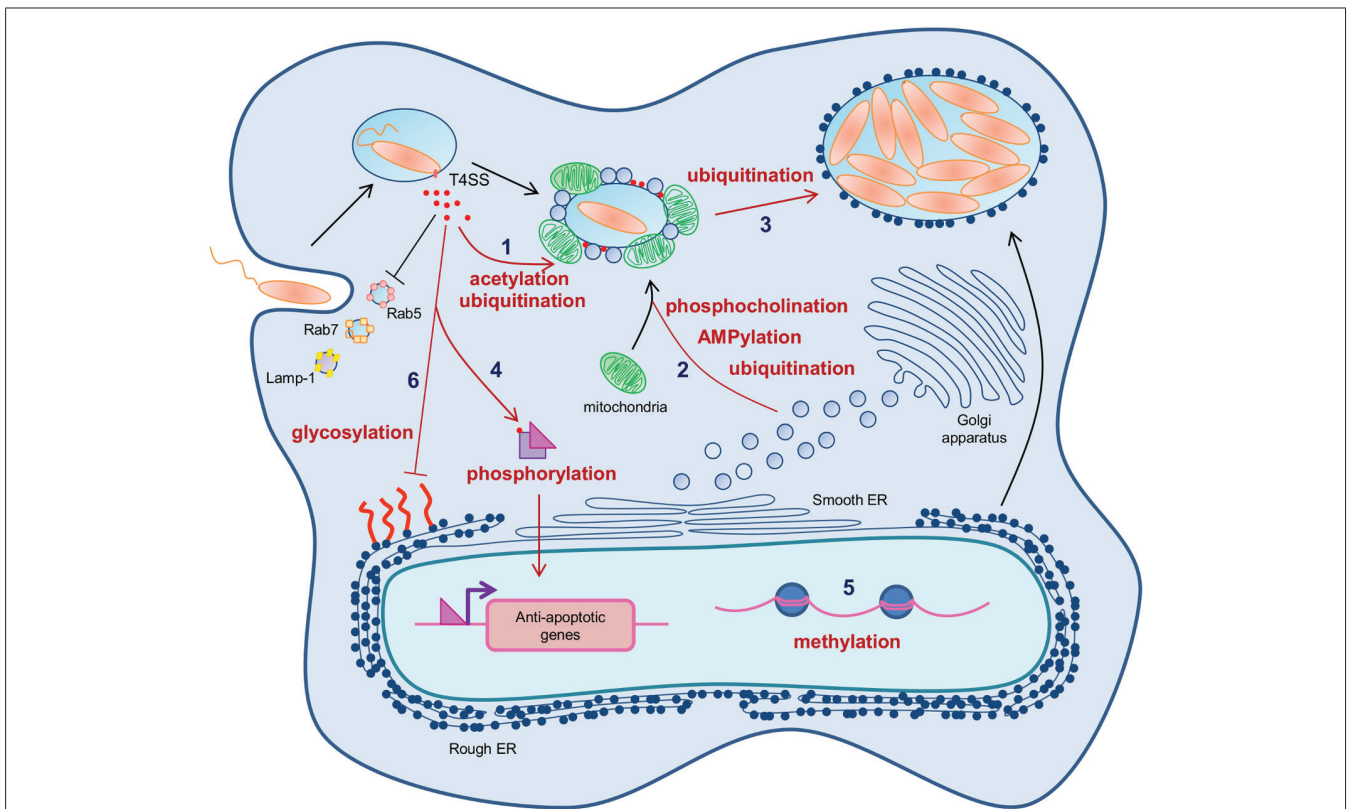


FIGURE 2 | Post-translational modifications controlling various infectious cycle steps of *Legionella pneumophila*. Immediately after uptake of the bacteria, *L. pneumophila* secretes a high number of Dot/lcm effectors into the host cell cytosol. (1) *L. pneumophila* exploits the host prenylation apparatus to alkylate some of these effectors and target them to the LCV surface. The effector LubX is able to ubiquitinate some effectors thus addressing them to proteasomal degradation and controlling their temporal presence on the LCV during infection. (2) Four Dot/lcm effectors reversibly AMPylate and phosphocholinate the host Rab1 small GTPase, thus controlling its activity to promote ER recruitment on the LCV, a prerequisite feature to make the phagosome a replicative niche. SidC and its paralog SdcA monoubiquitinate Rab1 and catalyze

polyubiquitin chains formation necessary for ER recruitment on the LCV. (3) The Dot/lcm effector AnkB functions as a platform for the docking of polyubiquitinated proteins to the LCV membrane, thus promoting proteasome-mediated generation of free amino acids essential as energy and carbon sources for *L. pneumophila* intracellular proliferation. (4) The Dot/lcm effector LegK1 phosphorylates IκB thus mimicking the host IKKs, and triggering the activation of the NF-κB pathway and the transcription of NF-κB dependent genes. (5) The Dot/lcm effector LegAS4/RomA trigger the methylation of the histone H3, thus inducing epigenetic changes and subsequent transcriptional control of host genes. (6) Several Dot/lcm effectors exhibit glycosidase activity toward eEF1A, thus inhibiting the host cell translation.

exhibits structural similarities with the C-terminal domain of the glutamine synthase adenylyl transferase, which leads the authors to speculate that the N-terminal region of SidM might have AMPylase activity toward the small GTPase Rab1, the substrate of its GEF domain. Indeed, *in vitro* assays and mass spectrometry analysis demonstrates that SidM, more precisely its N-terminal domain, AMPylates Rab1 on the Tyr77 residue (Müller et al., 2010; Table 1).

AMPylation is a reversible process. Two independent groups simultaneously identified SidD from *L. pneumophila* as the first protein exhibiting a deAMPylase activity, by using two distinct approaches. Neunuebel et al. (2011) observed that a whole cell lysate from *L. pneumophila* but not from *E. coli* efficiently removes *in vitro* radiolabeled AMP from AMPylated Rab1. Given that genes of functionally linked proteins tend to be clustered on bacterial genomes, they deleted the immediately nearby *sidM* gene, namely *sidD* gene, and they observed that the whole cell lysate from the *sidD* mutant was not able anymore to deAMPylate SidM

(Neunuebel et al., 2011). On the other hand, Tan and Luo identified SidD as a protein capable of suppressing the toxicity of the AMPylase SidM to yeast (Tan and Luo, 2011). Both groups demonstrated that SidD removes the AMP moiety from Tyr77 of Rab1, thus reversing the effect of SidM on this small GTPase activity (Table 1).

REVERSIBLE PHOSPHOCHOLINATION

As mentioned above, the Fic domain is associated to enzymes that trigger AMPylation of target proteins. *In silico* analysis revealed that another protein from *L. pneumophila*, namely AnkX, contains a Fic domain. However, mass spectrometry demonstrated that AnkX promotes a novel PTM, namely phosphocholination rather than AMPylation (Mukherjee et al., 2011). Phosphocholination consists in the covalent link of a phosphocholine group to a serine residue (Table 1). More precisely, AnkX catalyzes the phosphocholination of Ser76 of the small GTPase Rab1, immediately upstream the Tyr77 AMPylated by SidM (Mukherjee et al., 2011).

Like AMPylation, phosphocholination is a reversible PTM. Tan et al. (2011) recently identified the Dot/Icm effector Lem3 as a protein capable to rescue the growth of yeast transformed by AnkX expression vector, which suggested that Lem3 was able to antagonize the activity of phosphocholination of AnkX. Indeed, *in vitro* assays demonstrated that Lem3 reverses the AnkX-dependent phosphocholination of Rab1 by removing the phosphocholine moiety from Rab1 (Tan et al., 2011; **Table 1**).

PTMs FOR *Legionella* CONTAINING VACUOLE BIOGENESIS

Legionella-containing vacuole biogenesis is a main trait of *Legionella* intracellular fate that allows the bacteria to generate a niche permissive for intracellular replication. Within 15 min of uptake, the LCV is surrounded and fused with ER-derived smooth vesicles and mitochondria (Horwitz, 1983), and 4 h post-contact it is decorated by host cell ribosomes (Horwitz and Silverstein, 1981; Roy and Tilney, 2002), thus resulting in a replication-permissive vacuole (**Figure 2**). *Legionella*-containing vacuole biogenesis mobilizes complex molecular mechanisms that are strictly dependent on the Dot/Icm T4SS and its exceptionally high number of effectors. PTMs of both host cell proteins and Dot/Icm effectors play a key role in the fine-tuned orchestration of this infection step.

Dot/Icm EFFECTORS ACETYLATION AND UBIQUITINATION SPATIO-TEMPORALLY CONTROL THEIR RECRUITMENT ON THE LCV

Given the high number of effectors, it could be assumed that both translocation into the host cell cytosol, organelles addressing, and degradation of each effector must be controlled such that it could sequentially participate to the LCV biogenesis. Many Dot/Icm effectors are targeted to the LCV surface. *L. pneumophila* uses [PI(4)P] to anchor some Dot/Icm substrates, such as SidC and SidM to the cytoplasmic face of LCV (Ragaz et al., 2008; Brombacher et al., 2009). Another way for *L. pneumophila* to address injected effectors to the LCV membrane, is the exploitation of the host cell prenylation apparatus (Ivanov et al., 2010; Price et al., 2010a). The Dot/Icm substrate AnkB, of strains *L. pneumophila* AA100 and Philadelphia Lp01, contains a CAAX motif. During infection, the CAAX motif of AnkB is modified by the host farnesylation machinery (Ivanov et al., 2010; Price et al., 2010a). 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, thus demonstrating that the farnesyl-dependent vacuolar location of AnkB is essential to its role in the infectious cycle of *L. pneumophila* (Price et al., 2009).

In addition to the appropriate addressing of Dot/Icm effectors, a specific temporal control of their stability in the host cell is carried out during *L. pneumophila* infection. In that purpose, *L. pneumophila* interferes with the ubiquitin system to address some effectors to proteasomal degradation. LubX is a Dot/Icm effector containing two U-box domains and functions as a E3 ubiquitin ligase toward the cellular Clk1 protein. However, cellular consequences of ubiquitination of Clk1 remain unknown (Kubori et al., 2008). LubX was also shown to bind and polyubiquitinate *in vitro* SidH, another Dot/Icm effector. It mediates proteasomal

degradation of SidH in infected cells. Thus, LubX is considered like a metaeffector that controls in space and time, the presence of another effector, by using ubiquitination PTM (Kubori et al., 2010).

AMPYLATION AND PHOSPHOCHOLINATION CONTROLS THE GTPase Rab1 ACTIVATION FOR ER RECRUITMENT ON THE LCV

One main characteristic of the LCV is that it is fused with ER-derived vesicles. 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. Among them, the effector SidM interacts with Rab1, and its GEF and GDF activities result in Rab1 release from GDI (Ingmundson et al., 2007), and in LCV membrane associated GTP-coupled Rab1 (Arasaki et al., 2012), respectively (**Figure 3**). An additional PTM-associated enzymatic activity of the multifunctional protein SidM has recently been revealed. The N-terminal domain of SidM, which exhibits similarities with the catalytic domain of glutamin synthetase adenylyl transferase, modifies the tyrosine 77 of Rab1 by AMPylation or adenylylation, i.e., the addition of a AMP moiety (Müller et al., 2010). This PTM inhibits GAP-stimulated GTP hydrolysis, thus locking Rab1 in the GTP-bound active state, and finally allows ER recruitment at the surface of the LCV (**Figure 3**).

The activation of Rab1 by SidM is counteracted by two others Dot/Icm effectors, SidD and LepB (**Figure 3**). SidD removes AMP from Tyr77 of Rab1 (Neunuebel et al., 2011; Tan and Luo, 2011) by a protein phosphatase-like catalytic mechanism, as suggested by structural analysis (Rigden, 2011). 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 (Ingmundson et al., 2007; Mihai Gazdag et al., 2013). 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 (Neunuebel et al., 2011).

Two additional Dot/Icm effectors target the Rab1 GTPase for PTM and participate to the temporal control of its activation during *Legionella* infection cycle. AnkX harbors a novel PTM activity, namely phosphocholination, that transfers a phosphocholine moiety from CDP-choline to serine 76 of Rab1, preceding the SidM-modified tyrosine (Mukherjee et al., 2011; **Figure 3**). Although the biological effect of this PTM 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 (Tan et al., 2011; Goody et al., 2012). Thus, Rab1 is directly targeted and its activity is controlled by four different Dot/Icm effectors that catalyze different PTMs.

It is noteworthy that ubiquitination, mediated by the Dot/Icm effectors SidC and SdcA, could also participate to ER recruitment on the LCV. The Dot/Icm effector SidC and its paralog SdcA were

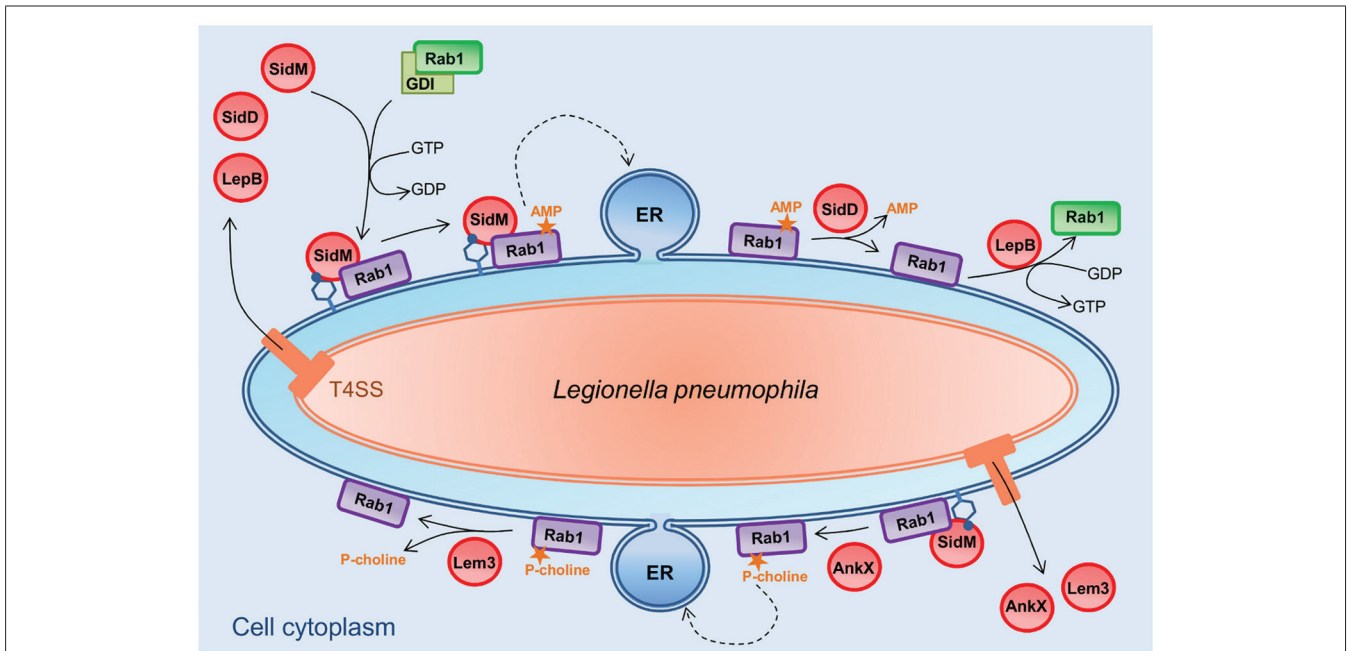


FIGURE 3 | Post-translational modifications of small GTPase Rab1 by *L. pneumophila* for LCV biogenesis. The ER recruitment on the LCV is orchestrated by four Dot/Icm effectors-mediated PTMs. SidM releases Rab1 from GDI with its GEF activity. SidM then modifies Rab1 by AMPylation, i.e., the addition of a AMP moiety. This PTM locks Rab1 in the GTP-bound active state, and finally allows ER recruitment at the surface of the LCV. SidD removes AMP from Rab1, making it accessible

for GAP activities, such as that exhibited by LepB. LepB promotes GTP hydrolysis of Rab1, removing it from the LCV. AnkX harbors a novel PTM activity, the phosphocholination, that transfers a phosphocholine moiety to Rab1, resulting in the same effect that the SidM-mediated AMPylation, i.e., locking Rab1 in the active form. The Dot/Icm effector Lem3 possesses an antagonistic activity to that of AnkX by removing the phosphocholine from Rab1.

proposed to function as vesicle fusion tethering factors involved in the recruitment of ER vesicles on the LCV (Luo and Isberg, 2004; Ragaz et al., 2008). Recently, infection by a WT *L. pneumophila* strain was shown to mediate the mono-ubiquitination of Rab1 on lysine 187 (Horenkamp et al., 2014). Given that cells infected with the double mutant *sdcA-sidC* did not exhibit this Rab1 PTM, it was assumed that Rab1 ubiquitination required the Dot/Icm effectors SidC and SdcA. However, ectopic expression of SidC or SdcA alone in HEK293 cells did not result in Rab1 ubiquitination, which suggests that neither SidC nor SdcA are E3 ubiquitin ligases. By contrast, another study demonstrated that the N-terminal domain of SidC exhibits ubiquitin ligase activity that catalyzes polyubiquitin chains formation and is necessary for ER recruitment on the LCV (Hsu et al., 2014). According to the authors, SidC does not seem to directly target Rab1 but more likely triggers a remodeling of proteins composition at the surface of the LCV. Although the mono-ubiquitination of Rab1 would be mediated by an indirect unknown mechanism and that the substrates and impact of the SidC/SdcA-catalyzed polyubiquitination remains unclear, both these studies highlight the role of ubiquitination in ER recruitment on the LCV.

UBIQUITINATION OF BAT3 COULD MITIGATE THE EFFECTS OF DISRUPTING NORMAL VESICULAR TRAFFICKING

Legionella pneumophila co-opts host vesicular trafficking during infection, in particular to recruit ER on the LCV. It can be assumed that some Dot/Icm substrates are translocated to protect

host cells against the cytotoxic stress generated by the ER traffic hijacking. Among them, the Dot/Icm effector LegU1 contains an F-box domain and interferes with ubiquitin signaling. It can be integrated into the functional SCF1 complex that confers E3 ubiquitin ligase activity. It specifically targets the host chaperone protein BAT3, a key regulator of the ER stress response. LegU1 associates with BAT3 and mediates its polyubiquitination *in vitro* (Ensminger and Isberg, 2010). Moreover, another translocated *L. pneumophila* protein, Lpg2160, plays a role in this complex by binding both the SCF complex and BAT3. These results suggest that this multicomplex formation leads to BAT3 ubiquitination, probably to modulate the ER stress response during infection (Ensminger and Isberg, 2010).

PTMs FOR SUSTAINING *Legionella* INTRACELLULAR REPLICATION

In the rough ER-like compartment of the LCV, *L. pneumophila* proliferates in a so-called replicative form until vacuolar nutrients become limiting. Polyubiquitination of host cell proteins mediated by a *Legionella* effector has been recently proposed to be a bacterial strategy dedicated to generate sources of carbon and energy needed for microbial proliferation *in vivo* (Price et al., 2011). Indeed, in addition to the CAAX farnesylation motif described above, AnkB from *L. pneumophila* Philadelphia strain harbors two ankyrin (ANK) protein-protein interaction domains and a F-box domain. In both macrophages and protozoa, AnkB functions as a bona fide F-box protein where it recruits Skp1,

thus subverting the host SCF1 complex and functioning as a platform for the docking of polyubiquitinated proteins to the LCV membrane. The polyubiquitinated proteins assembled by AnkB on the LCV are preferentially enriched for Lys48-linked polyubiquitinated proteins, which is a hallmark for proteasomal degradation, that generate 2–24 amino acid peptides (Price et al., 2011). Interestingly, substitution of Lys48 to Arg abolishes the decoration of the LCV with polyubiquitinated proteins and blocks intracellular proliferation. Moreover, inhibition of proteasome, or host amino- and oligo-peptidases that degrade the short peptides generated by proteasomal degradation, blocks intracellular proliferation (Price et al., 2011). However, both inhibitions are bypassed by excess amino acid supplementation. Together these data strongly support that AnkB promotes proteasome-mediated generation of free amino acids essential as energy and carbon sources for *L. pneumophila* intracellular proliferation (Figure 2).

It is noteworthy that in some *L. pneumophila* strains such as the strain Paris, AnkB does not contain the CAAX motif. Given they do not localize to the LCV, these AnkB homologues might not be key effectors of *L. pneumophila* that generate nutrients for intracellular growth. A yeast two-hybrid screen and co-immunoprecipitation analysis identified ParvB as one target of the *L. pneumophila* F-box protein AnkB encoded by strain Paris. ParvB, or affixin, is known to play important roles in focal adhesion, cell spreading and motility. Surprisingly, expression of AnkB led to a decrease of ubiquitination of ParvB. Thus, it was proposed that *L. pneumophila* modulates ubiquitination of ParvB by competing with eukaryotic E3 ligases for the specific protein–protein interaction site of ParvB. However, the role of AnkB in the infectious cycle of *L. pneumophila* strain Paris remains unknown (Lomma et al., 2010).

PTMs FOR CONTROLLING HOST CELL GENES EXPRESSION

PHOSPHORYLATION OF I κ B FOR CONTROLLING THE NF- κ B DEPENDENT GENES TRANSCRIPTION

After phagocytosis, *L. pneumophila* resides and replicates in the LCV within the host cytosol. Consequently, survival of the host cell is necessary for successful replication. To prevent cell death, some Dot/Icm translocated substrates interfere with pro-death pathways (Laguna et al., 2006; Banga et al., 2007). A second mechanism of preventing host cell death during infection is to stimulate the NF- κ B pathway, which results in up-regulation of genes encoding anti-apoptotic proteins (Karin and Lin, 2002). NF- κ B homo- and heterodimers are master transcription regulators of the mammalian innate immune response that control the expression of almost 400 genes (Karin and Lin, 2002; Ahn and Aggarwal, 2005; Hayden and Ghosh, 2008). NF- κ B activation can result from sensing of pathogen associated molecular patterns (PAMPs) by the pattern recognition receptors (PRRs), which leads to activation of I κ B kinases (IKKs). Once activated, IKKs phosphorylate I κ B family members, inhibitory proteins that are bound to NF- κ B subunits in the cell cytoplasm, thus triggering I κ B ubiquitination, I κ B degradation, and subsequent translocation of NF- κ B into the nucleus (Hayden and Ghosh, 2008). *L. pneumophila* infection results in increased Dot/Icm-dependent transcription of NF- κ B subunits as well as NF- κ B regulated genes

including pro-inflammatory cytokines and antagonists of apoptosis (Losick and Isberg, 2006; Abu-Zant et al., 2007; Shin et al., 2008). Besides the engagement of PRRs with PAMPs, direct targeting of the pathway by a Dot/Icm effector, namely LegK1, has been demonstrated (Ge et al., 2009; Figure 2). LegK1 efficiently phosphorylates I κ B on Ser-32 and Ser-36 both *in vitro* and in cells, thus mimicking the host IKKs. Ectopic expression of the protein in mammalian cells results in activation of an NF- κ B-dependent promoter. The kinase activity is necessary for this activation, as a point mutation in the ATP binding domain or a catalytic residue abolishes NF- κ B activity (Ge et al., 2009; Losick et al., 2010), and cell-free reconstitution revealed that LegK1 stimulated NF- κ B activation in the absence of IKKs (Ge et al., 2009).

METHYLATION OF HISTONES FOR CONTROLLING HOST CELL GENE TRANSCRIPTION

Legionella-containing vacuoles are studded with an increasing number of ribosomes during the first 8 h after bacterial internalization, after which the bacteria start to replicate in the vacuole. Besides, transcription of rRNA genes (rDNAs) in the nucleolus is known to be regulated by epigenetic chromatin modifications including histone H3 lysine (de)methylation. Recently, the Dot/Icm LegAS4 from *L. pneumophila* Philadelphia strain was shown to localize in the host nucleolus and promoted rDNA transcription (Li et al., 2013; Figure 2). LegAS4 contains an active SET-domain-sharing 35% sequence identity with eukaryotic NSD2/3 Lys Histone Methyltransferases of the SET2 family. *In vitro* studies on histone H3 substrate, using methylation-specific H3 antibodies, show that LegAS4 catalyses dimethylation of histone H3 on Lys4 (H3K4me2). Consistently, ectopic expression of LegAS4 in human cells is associated with increased levels of H3K4me2 at rDNA promoters and the activation of the transcription of these genes. LegAS4's association with rDNA chromatin is mediated by interaction with host HP1a/c. Docking of LegAS4 to these regions through binding to HP1, and subsequent methylation of H3K4, might convert the epigenetically silent state of rDNA genes to an active state methylated H3. Stimulation of rDNA transcription might contribute to bacterial replication in two flavors. The enforced higher proliferation potential of infected cells, resulting from activation of rDNA transcription, could provide a better niche for bacterial replication. On the other hand, intracellular bacteria could exploit host ribosome activity for its own survival advantages (Li et al., 2013).

Interestingly, mass spectrometry analysis revealed that the equivalent effector of LegAS4 from the *L. pneumophila* strain Paris, named RomA (for regulator of methylation A) trimethylates *in vitro* Lys14 of H3 (H3K14me3), a histone mark not previously described in mammals (Rolando et al., 2013b). This epigenetic mark was confirmed by systematic site-directed mutagenesis of the lysine residues in the N-terminal tail of H3. It is noteworthy that while H3 methylation was almost completely decreased when H3 was mutated on K14, RomA enzymatic activity appeared to be also reduced on H3 carrying a mutated K4. However, no H3K4 methylation was revealed in western-blot probed with anti-H3K4me2 or H3K4me3 antibodies, thus suggesting that RomA

only targets K14 of H3 and that H3K4 methylation could influence H3K14 methylation by being part of the motif required by RomA to bind to its substrate (Rolando et al., 2013b). By promoting a burst of H3K14me3, RomA decreases H3K14 acetylation, which is an activating mark, thus leading to repression of host gene expression. In addition, ChIP-seq analysis identified 4,870 H3K14 methylated promoter regions, including at innate immune genes, during *Legionella* infection.

Recently, the H3K14-specific methylation was shown to be conserved in cells infected by seven different strains of *L. pneumophila*, including the Philadelphia 1 (Lp02) strain (Rolando and Buchrieser, 2014). Thus, there is more likely no different specificity of the methylation activities of LegAS4 and RomA, and despite slight discrepancies about the biochemistry and the biological effect of these effectors, both these studies highlight the key role of histone PTMs during *Legionella* infection (Figure 2).

GLYCOSYLATION OF EF1A FOR INHIBITING THE HOST CELL TRANSLATION

In addition to controlling the host cell gene transcription, *L. pneumophila* is able to inhibit the overall host cell translation. *L. pneumophila* encodes three Dot/Icm effectors, namely Lgt1, Lgt2, and Lgt3, that monoglycosylate the serine residue Ser53 of the GTPase domain of the host translational factor eEF1A (eukaryotic Elongation Factor 1A), leading to the inhibition of protein synthesis, and consequently to the death of the host cell (Belyi et al., 2006). Although EF1A glycosylation seems to promote *L. pneumophila* pathogenesis, the biological role of this PTM remains to be addressed. Because their activities cause the host cell death, glycosyltransferases are usually considered like bacterial toxins rather than molecular tools that hijack host cell pathways to the benefit of the bacteria. However, it can be assumed that the inhibition of host cell protein synthesis leads to the overall decrease of the host metabolism, which promotes the ability of the bacteria to overcome the cellular response and consequently to replicate (Belyi et al., 2011). Moreover, it has been recently shown that Lgt1, Lgt2, Lgt3 plus two others Dot/Icm effectors, SidI and SidL that respectively, interacts with eEF1A and eEF1B (Shen et al., 2009) and inhibit protein synthesis by an unknown mechanism, are critical to control the host cell transcription response to *Legionella* infection (Fontana et al., 2011). In fact, these Dot/Icm effectors decrease the overall translation of host cell proteins, among which the NF- κ B inhibitor I κ B, thus promoting the activation of the NF- κ B pathway. In that way, glycosylation of eEF1A by these effectors and thus inhibition of host cell translation could potentiate the activation of the NF- κ B pathway, already controlled by the I κ B phosphorylation by LegK1, as described above.

CONCLUSION

Given PTMs play key roles in the cellular biology, it is not surprising that interference with host PTMs is a strategy widely used by bacterial pathogens to not only escape from host cell defences but also to hijack host cell pathways to their benefit. However, recent technological progresses in the detection of PTMs and advanced functional studies of the host–bacteria relationship highlighted an unexpected diversity of the PTMs triggered by bacteria and the

complexity of these processes in host–pathogen interactions, thus making studies of bacteria-mediated PTMs an emerging field of research.

Legionella pneumophila is a paradigm of a pathogenic bacteria that evolved sophisticated biochemical strategies to successfully infect and replicate into professional bacteria killer phagocytic cells. In fact, *L. pneumophila* is a unique example for the co-evolution of a bacterium with environmental hosts, namely amoeba, that results in the acquisition of many genes encoding proteins that can be secreted by the Dot/Icm T4SS and trigger diverse PTMs into the host cells. Indeed, the large repertoire of Dot/Icm effectors enables the bacteria to phosphorylate, alkylate, ubiquitinate, glycosylate, AMPylate, and phosphocholinate specific host cell proteins. Noteworthy, *L. pneumophila* also catalyze PTMs of its own proteins, namely some of Dot/Icm effectors, to control their localization and/or their stability in the host cell, and subsequently their activity during the infection. Importantly, despite PTMs are usually catalyzed by eukaryotic-like proteins, some of them are performed by enzymes that do not exhibit similarity with their eukaryotic counterparts. More interestingly, research on Dot/Icm effectors functional roles lead to the discovery of a new PTM, namely the reversible phosphocholination, that may also be used by eukaryotic cells to modulate cellular functions, as previously suggested by studies that detected phosphoryl-choline substituted peptides secreted by nematodes and from mammalian cells residing in the placenta (Lovell et al., 2007; Grabitzki et al., 2008). AMPylation had been also discovered by studying infections by *V. parahaemolyticus* and *H. somni*, a human pathogen and the causal agent of septicemia in cattle, respectively (Worby et al., 2009; Yarbrough et al., 2009). These discoveries reveal that studies of the relationship between pathogenic bacteria and their host cells could lead the way to improve our knowledge of the eukaryotic PTMs and complex cellular processes that are associated to.

Interestingly, *L. pneumophila* targets host proteins that have been already described to be preferential targeted for bacterial-induced PTMs. This is the case of regulators of the NF- κ B pathway, which allows the bacteria to control both anti-apoptotic genes and host immune response, like previously demonstrated for *Shigella flexneri* (Kim et al., 2005), *Salmonella typhimurium* (Le Negrate et al., 2008), *L. monocytogenes* (Gouin et al., 2010), and *Yersinia* species (Mittal et al., 2006). Moreover, *L. pneumophila* joins those bacteria that secrete effectors manipulating PTMs at histones tails, allowing a fine-tuned regulation of host genes transcription (Hamon and Cossart, 2008; Bierne, 2013; Rolando et al., 2013a). These recent insights highlight the key role of both these processes and their control by PTMs in the pathogenic bacteria–host relationships.

ACKNOWLEDGMENTS

The Ph.D. grant of Céline Michard was provided by the Programme Avenir Lyon Saint-Etienne (ANR-11-IDEX-0007) of Université de Lyon, within the program “Investissements d’Avenir” operated by the French National Research Agency (ANR). We apologize to authors whose works cannot be cited here because of space limitations.

REFERENCES

- Abu-Zant, A., Jones, S., Asare, R., Suttles, J., Price, C., Graham, J., et al. (2007). Anti-apoptotic signalling by the Dot/Icm secretion system of *L. pneumophila*. *Cell Microbiol.* 9, 246–264. doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00785.x
- Ahn, K. S., and Aggarwal, B. B. (2005). Transcription factor NF- κ B: a sensor for smoke and stress signals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1056, 218–233. doi: 10.1196/annals.1352.026
- Aktories, K. (2011). Bacterial protein toxins that modify host regulatory GTPases. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 487–498. doi: 10.1038/nrmicro2592
- Andrews, H. L., Vogel, J. P., and Isberg, R. R. (1998). Identification of linked *Legionella pneumophila* genes essential for intracellular growth and evasion of the endocytic pathway. *Infect. Immun.* 66, 950–958.
- 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. doi: 10.1016/j.chom.2011.11.009
- Banga, S., Gao, P., Shen, X., Fiscus, V., Zong, W. X., Chen, L., et al. (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. doi: 10.1073/pnas.0611030104
- Belyi, I., Popoff, M. R., and Cianciotto, N. P. (2003). Purification and characterization of a UDP-glucosyltransferase produced by *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 71, 181–186. doi: 10.1128/IAI.71.1.181-186.2003
- Belyi, Y., Jank, T., and Aktories, K. (2011). Effector glycosyltransferases in *Legionella*. *Front. Microbiol.* 2:76. doi: 10.3389/fmicb.2011.00076
- Belyi, Y., Niggeweg, R., Opitz, B., Vogelsgesang, M., Hippenstiel, S., Wilm, M., et al. (2006). *Legionella pneumophila* glucosyltransferase inhibits host elongation factor 1A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 16953–16958. doi: 10.1073/pnas.0601562103
- Belyi, Y., Tabakova, I., Stahl, M., and Aktories, K. (2008). Lgt: a family of cytotoxic glucosyltransferases produced by *Legionella pneumophila*. *J. Bacteriol.* 190, 3026–3035. doi: 10.1128/JB.01798-07
- Bierne, H. (2013). Nuclear microbiology—bacterial assault on the nucleolus. *EMBO Rep.* 14, 663–664. doi: 10.1038/embor.2013.105
- Brombacher, E., Urwyler, S., Ragaz, C., Weber, S. S., Kami, K., Overduin, M., et al. (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. doi: 10.1074/jbc.M807505200
- Cazalet, C., Rusniok, C., Bruggemann, 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. doi: 10.1038/ng1447
- Clemens, D. L., Lee, B. Y., and Horwitz, M. A. (2000). *Mycobacterium tuberculosis* and *Legionella pneumophila* phagosomes exhibit arrested maturation despite acquisition of Rab7. *Infect. Immun.* 68, 5154–5166. doi: 10.1128/IAI.68.9.5154-5166.2000
- 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. doi: 10.1186/1471-2164-11-181
- de Felipe, K. S., Pampou, S., Jovanovic, O. S., Pericone, C. D., Ye, S. F., Kalachikov, S., et al. (2005). Evidence for acquisition of *Legionella* type IV secretion substrates via interdomain horizontal gene transfer. *J. Bacteriol.* 187, 7716–7726. doi: 10.1128/JB.187.22.7716-7726.2005
- 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. doi: 10.1128/IAI.00344-10
- Fontana, M. F., Banga, S., Barry, K. C., Shen, X., Tan, Y., Luo, Z. Q., et al. (2011). Secreted bacterial effectors that inhibit host protein synthesis are critical for induction of the innate immune response to virulent *Legionella pneumophila*. *PLoS Pathog.* 7:e1001289. doi: 10.1371/journal.ppat.1001289
- Ge, J., Xu, H., Li, T., Zhou, Y., Zhang, Z., Li, S., et al. (2009). A *Legionella* type IV effector activates the NF- κ B pathway by phosphorylating the I κ B family of inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 13725–13730. doi: 10.1073/pnas.0907200106
- 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. doi: 10.1038/emboj.2012.16
- Gouin, E., Adib-Conquy, M., Balestrino, D., Nahori, M. A., Villiers, V., Colland, F., et al. (2010). The *Listeria monocytogenes* InlC protein interferes with innate immune responses by targeting the I κ B kinase subunit IKK α . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 17333–17338. doi: 10.1073/pnas.1007765107
- Grabitzki, J., Ahrend, M., Schachter, H., Geyer, R., and Lochnit, G. (2008). The PCome of *Caenorhabditis elegans* as a prototypic model system for parasitic nematodes: identification of phosphorylcholine-substituted proteins. *Mol. Biochem. Parasitol.* 161, 101–111. doi: 10.1016/j.molbiopara.2008.06.014
- Hamon, M. A., and Cossart, P. (2008). Histone modifications and chromatin remodeling during bacterial infections. *Cell Host Microbe* 4, 100–109. doi: 10.1016/j.chom.2008.07.009
- Hanks, S. (2003). Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. *Genome Biol.* 4, 111. doi: 10.1186/gb-2003-4-5-111
- Hayden, M. S., and Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF- κ B signaling. *Cell* 132, 344–362. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.020
- Heidtmann, M., Chen, E. J., Moy, M. Y., and Isberg, R. R. (2009). Large-scale identification of *Legionella pneumophila* Dot/Icm substrates that modulate host cell vesicle trafficking pathways. *Cell Microbiol.* 11, 230–248. doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01249.x
- Hervet, E., Charpentier, X., Vianney, A., Lazzaroni, J.-C., Gilbert, C., Atlan, D., et al. (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. doi: 10.1128/IAI.00805-10
- Herz, H. M., Garruss, A., and Shilatifard, A. (2013). SET for life: biochemical activities and biological functions of SET domain-containing proteins. *Trends Biochem. Sci.* 38, 621–639. doi: 10.1016/j.tibs.2013.09.004
- Hochstrasser, M. (2009). Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature* 458, 422–429. doi: 10.1038/nature07958
- Horenkamp, F. A., Mukherjee, S., Alix, E., Schauder, C. M., Hubber, A. M., Roy, C. R., et al. (2014). *Legionella pneumophila* subversion of host vesicular transport by SidC effector proteins. *Traffic* 15, 488–499. doi: 10.1111/tra.12158
- Horwitz, M. A. (1983). Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes. *J. Exp. Med.* 158, 1319–1331. doi: 10.1084/jem.158.4.1319
- Horwitz, M. A., and Maxfield, F. R. (1984). *Legionella pneumophila* inhibits acidification of its phagosome in human monocytes. *J. Cell Biol.* 99, 1936–1943. doi: 10.1083/jcb.99.6.1936
- Horwitz, M. A., and Silverstein, S. C. (1981). 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, 386–397. doi: 10.1084/jem.153.2.386
- Hsu, F., Luo, X., Qiu, J., Teng, Y. B., Jin, J., Smolka, M. B., et al. (2014). The *Legionella* effector SidC defines a unique family of ubiquitin ligases important for bacterial phagosomal remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 10538–10543. doi: 10.1073/pnas.1402605111
- Ingmundson, A., Delprato, A., Lambright, D., and Roy, C. (2007). *Legionella pneumophila* proteins that regulate Rab1 membrane cycling. *Nature* 450, 365–369. doi: 10.1038/nature06336
- 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. doi: 10.1074/jbc.M110.170746
- Kagan, J., and Roy, C. (2002). *Legionella* phagosomes intercept vesicular traffic from endoplasmic reticulum exit sites. *Nat. Cell Biol.* 4, 945–954. doi: 10.1038/ncb883
- Karin, M., and Lin, A. (2002). NF- κ B at the crossroads of life and death. *Nat. Immunol.* 3, 221–227. doi: 10.1038/ni0302-221
- Kim, D. W., Lenzen, G., Page, A. L., Legrain, P., Sansonetti, P. J., and Parsot, C. (2005). The *Shigella flexneri* effector OspG interferes with innate immune responses by targeting ubiquitin-conjugating enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 14046–14051. doi: 10.1073/pnas.0504466102
- Kinch, L. N., Yarbrough, M. L., Orth, K., and Grishin, N. V. (2009). Fido, a novel AMPylation domain common to fic, doc, and AvrB. *PLoS ONE* 4:e5818. doi: 10.1371/journal.pone.0005818
- Komano, T., Utsumi, R., and Kawamukai, M. (1991). Functional analysis of the fic gene involved in regulation of cell division. *Res. Microbiol.* 142, 269–277. doi: 10.1016/0923-2508(91)90040-H
- 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. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06124.x

- Kubori, T., Shinzawa, N., Kanuka, H., and Nagai, H. (2010). *Legionella* metaeffector exploits host proteasome to temporally regulate cognate effector. *PLoS Pathog.* 6:e1001216. doi: 10.1371/journal.ppat.1001216
- Laguna, R. K., Creasey, E. A., Li, Z., Valtz, N., and Isberg, R. R. (2006). A *Legionella pneumophila*-translocated substrate that is required for growth within macrophages and protection from host cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 18745–18750. doi: 10.1073/pnas.0609012103
- Le Negrate, G., Faustin, B., Welsh, K., Loeffler, M., Krajewska, M., Hasegawa, P., et al. (2008). *Salmonella* secreted factor L deubiquitinase of *Salmonella typhimurium* inhibits NF-kappaB, suppresses IkappaBalpha ubiquitination and modulates innate immune responses. *J. Immunol.* 180, 5045–5056. doi: 10.4049/jimmunol.180.7.5045
- Li, T., Lu, Q., Wang, G., Xu, H., Huang, H., Cai, T., et al. (2013). SET-domain bacterial effectors target heterochromatin protein 1 to activate host rDNA transcription. *EMBO Rep.* 14, 733–740. doi: 10.1038/embor.2013.86
- 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. doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01467.x
- Lorick, K. L., Jensen, J. P., Fang, S., Ong, A. M., Hatakeyama, S., and Weissman, A. M. (1999). RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 11364–11369. doi: 10.1073/pnas.96.20.11364
- Losick, V. P., Haenssler, E., Moy, M. Y., and Isberg, R. R. (2010). LnaB: a *Legionella pneumophila* activator of NF-kappaB. *Cell Microbiol.* 12, 1083–1097. doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01452.x
- Losick, V. P., and Isberg, R. R. (2006). NF-kappaB translocation prevents host cell death after low-dose challenge by *Legionella pneumophila*. *J. Exp. Med.* 203, 2177–2189. doi: 10.1084/jem.20060766
- Lovell, T. M., Woods, R. J., Butlin, D. J., Brayley, K. J., Manyonda, I. T., Jarvis, J., et al. (2007). Identification of a novel mammalian post-translational modification, phosphocholine, on placental secretory polypeptides. *J. Mol. Endocrinol.* 39, 189–198. doi: 10.1677/JME-07-0007
- 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. doi: 10.1073/pnas.0304916101
- 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. doi: 10.1073/pnas.89.20.9607
- Mihai Gazdag, E., Streller, A., Haneburger, I., Hilbi, H., Vetter, I. R., Goody, R. S., et al. (2013). Mechanism of Rab1b deactivation by the *Legionella pneumophila* GAP LepB. *EMBO Rep.* 14, 199–205. doi: 10.1038/embor.2012.211
- Mittal, R., Peak-Chew, S. Y., and McMahon, H. T. (2006). Acetylation of MEK2 and I kappa B kinase (IKK) activation loop residues by YopJ inhibits signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 18574–18579. doi: 10.1073/pnas.0608995103
- 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. doi: 10.1038/nature10335
- 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. doi: 10.1126/science.1192276
- 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. doi: 10.1126/science.1207193
- Price, C. T., Al-Khodori, S., Al-Quadan, T., Santic, M., Habyarimana, F., Kalia, A., et al. (2009). Molecular mimicry by an F-box effector of *Legionella pneumophila* hijacks a conserved polyubiquitination machinery within macrophages and protozoa. *PLoS Pathog.* 5:e1000704. doi: 10.1371/journal.ppat.1000704
- Price, C. T., Al-Quadan, T., Santic, M., Jones, S. C., and Abu Kwaik, Y. (2010a). Exploitation of conserved eukaryotic host cell farnesylation machinery by an F-box effector of *Legionella pneumophila*. *J. Exp. Med.* 207, 1713–1726. doi: 10.1084/jem.20100771
- Price, C. T., Jones, S. C., Amundson, K. E., and Kwaik, Y. A. (2010b). Host-mediated post-translational prenylation of novel dot/icm-translocated effectors of *legionella pneumophila*. *Front. Microbiol.* 1:131. doi: 10.3389/fmicb.2010.00131
- 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. doi: 10.1126/science.1212868
- Price, C. T., and Kwaik, Y. A. (2010). Exploitation of host polyubiquitination machinery through molecular mimicry by eukaryotic-like bacterial F-box effectors. *Front. Microbiol.* 1:122. doi: 10.3389/fmicb.2010.00122
- Ragaz, C., Pietsch, H., Urwyler, S., Tiaden, A., Weber, 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. doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01219.x
- Ribet, D., and Cossart, P. (2010a). Pathogen-mediated posttranslational modifications: a re-emerging field. *Cell* 143, 694–702. doi: 10.1016/j.cell.2010.11.019
- Ribet, D., and Cossart, P. (2010b). Post-translational modifications in host cells during bacterial infection. *FEBS Lett.* 584, 2748–2758. doi: 10.1016/j.febslet.2010.05.012
- Rigden, D. J. (2011). Identification and modelling of a PPM protein phosphatase fold in the *Legionella pneumophila* deAMPylase SidD. *FEBS Lett.* 585, 2749–2754. doi: 10.1016/j.febslet.2011.08.006
- Rolando, M., and Buchrieser, C. (2014). *Legionella pneumophila* type IV effectors hijack the transcription and translation machinery of the host cell. *Trends Cell Biol.* 24, 771–778. doi: 10.1016/j.tcb.2014.06.002
- Rolando, M., Rusniok, C., Margueron, R., and Buchrieser, C. (2013a). [Host epigenetic targeting by *Legionella pneumophila*]. *Med. Sci. (Paris)* 29, 843–845. doi: 10.1051/medsci/20132910010
- Rolando, M., Sanulli, S., Rusniok, C., Gomez-Valero, L., Bertholet, C., Sahr, T., et al. (2013b). *Legionella pneumophila* effector RomA uniquely modifies host chromatin to repress gene expression and promote intracellular bacterial replication. *Cell Host Microbe* 13, 395–405. doi: 10.1016/j.chom.2013.03.004
- Roy, C. R., and Mukherjee, S. (2009). Bacterial FIC Proteins AMP Up Infection. *Sci. Signal.* 2, pe14. doi: 10.1126/scisignal.262pe14
- Roy, C. R., and Tilney, L. G. (2002). The road less traveled: transport of *Legionella* to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 158, 415–419. doi: 10.1083/jcb.2002.05011
- Schmeck, B., N'Guessan, P. D., Ollomang, M., Lorenz, J., Zahlten, J., Opitz, B., et al. (2007). *Legionella pneumophila*-induced NF-kappaB- and MAPK-dependent cytokine release by lung epithelial cells. *Eur. Respir. J.* 29, 25–33. doi: 10.1183/09031936.00141005
- 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. doi: 10.1128/JB.00778-10
- Shen, X., Banga, S., Liu, Y., Xu, L., Gao, P., Shamovsky, I., et al. (2009). Targeting eEF1A by a *Legionella pneumophila* effector leads to inhibition of protein synthesis and induction of host stress response. *Cell Microbiol.* 11, 911–926. doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01301.x
- Shin, S., Case, C. L., Archer, K. A., Nogueira, C. V., Kobayashi, K. S., Flavell, R. A., et al. (2008). Type IV secretion-dependent activation of host MAP kinases induces an increased proinflammatory cytokine response to *Legionella pneumophila*. *PLoS Pathog.* 4:e1000220. doi: 10.1371/journal.ppat.1000220
- Tan, Y., Arnold, R. J., and Luo, Z. Q. (2011). *Legionella pneumophila* regulates the small GTPase Rab1 activity by reversible phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 21212–21217. doi: 10.1073/pnas.1114023109
- Tan, Y., and Luo, Z. Q. (2011). *Legionella pneumophila* SidD is a deAMPylase that modifies Rab1. *Nature* 475, 506–509. doi: 10.1038/nature10307
- Walsh, C. T., Garneau-Tsodikova, S., and Gatto, G. J. (2005). Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 44, 7342–7372. doi: 10.1002/anie.200501023
- Worby, C. A., Mattoo, S., Kruger, R. P., Corbeil, L. B., Koller, A., Mendez, J. C., et al. (2009). The fic domain: regulation of cell signaling by adenylation. *Mol. Cell.* 34, 93–103. doi: 10.1016/j.molcel.2009.03.008
- Yarbrough, M. L., Li, Y., Kinch, L. N., Grishin, N. V., Ball, H. L., and Orth, K. (2009). AMPylation of Rho GTPases by *Vibrio* VopS disrupts effector

binding and downstream signaling. *Science* 323, 269–272. doi: 10.1126/science.1166382

Yarbrough, M. L., and Orth, K. (2009). AMPylation is a new post-translational modification. *Nat. Chem. Biol.* 5, 378–379. doi: 10.1038/nchembio0609-378

Zhu, W., Banga, S., Tan, Y., Zheng, C., Stephenson, R., Gately, J., et al. (2011). Comprehensive identification of protein substrates of the Dot/Icm type IV transporter of *Legionella pneumophila*. *PLoS ONE* 6:e17638. doi: 10.1371/journal.pone.0017638

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 27 November 2014; accepted: 23 January 2015; published online: 10 February 2015.

Citation: Michard C and Doublet P (2015) Post-translational modifications are key players of the *Legionella pneumophila* infection strategy. *Front. Microbiol.* 6:87. doi: 10.3389/fmicb.2015.00087

This article was submitted to *Microbial Physiology and Metabolism*, a section of the journal *Frontiers in Microbiology*.

Copyright © 2015 Michard and Doublet. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Résumé/Abstract

La protéine kinase LegK2 de *Legionella pneumophila* et le complexe ARP2/3 de la cellule hôte : un nouveau paradigme dans le détournement du cytosquelette d'actine par un pathogène

Legionella pneumophila est une bactérie opportuniste qui émerge de l'environnement après multiplication dans des amibes et peut infecter accidentellement les macrophages alvéolaires humains, provoquant une pneumonie sévère, la légionellose. La capacité de *L. pneumophila* à survivre dans ses cellules hôtes est strictement dépendante du système de sécrétion de type 4 Dot/Icm, qui sécrète un large répertoire d'effecteurs dans le cytosol de l'hôte. Identifier la contribution individuelle de chaque protéine bactérienne sécrétée par le système Dot/Icm, dans le cycle infectieux de *L. pneumophila* reste un enjeu majeur pour comprendre les bases moléculaires de la virulence des légionelles. Mes travaux de thèse participent à cet objectif en caractérisant la voie cellulaire ciblée par la protéine kinase LegK2. Des tests d'interaction et de phosphorylation ont identifié le complexe nucléateur d'actine ARP2/3 comme cible de LegK2. Suite à l'adressage de LegK2 à la surface de la vacuole après sa translocation dans le cytosol de l'hôte, l'interaction LegK2-ARP2/3 inhibe la polymérisation d'actine sur le phagosome. Cette inhibition permet à *Legionella* de diminuer le trafic des endosomes tardifs et/ou des lysosomes vers le phagosome et favorise ainsi l'évasion du phagosome à la voie de dégradation endocytique. L'interaction LegK2-ARP2/3 met en évidence un mécanisme original de virulence dans lequel le remodelage local du cytosquelette d'actine de la cellule hôte permet à la bactérie de manipuler le trafic vésiculaire pour échapper aux défenses de l'hôte.

The protein kinase LegK2 of *Legionella pneumophila* and the ARP2/3 complex of the host cell : a new paradigm in the actin cytoskeleton hijacking by a pathogen

Legionella pneumophila is an opportunistic bacterium that emerges from the environment after multiplication in protozoans and can accidentally infect human alveolar macrophages leading to a severe pneumonia, the legionellosis. The *L. pneumophila* ability to survive within host-cells is strictly dependent on the Dot/Icm Type 4 Secretion System that translocates a large repertoire of effectors into the host cell cytosol. Deciphering the individual contribution of each bacterial protein translocated by the Dot/Icm system in the *L. pneumophila* infectious cycle remains a major challenge to understand the molecular basis of *Legionella* virulence. My works contribute to this objective by characterizing the cellular pathway targeted by the protein kinase LegK2. Interaction and phosphorylation assays identified the actin nucleator ARP2/3 complex as the target of LegK2. Following the LegK2 addressing to the vacuole surface after its translocation into host cytosol, LegK2-ARP2/3 interplay inhibits the actin polymerization on the phagosome. This inhibition allows *Legionella* to decrease the late endosome/lysosome trafficking towards the phagosome and promotes the phagosome evasion from endocytic degradation pathway. LegK2-ARP2/3 interplay highlights an original mechanism of virulence wherein the local actin cytoskeleton remodeling of host cell allows bacteria to hijack the vesicles trafficking in order to escape host-cell defenses.

Discipline

Microbiologie, Infectiologie

Mots-clés

Interaction hôte-pathogène, *Legionella pneumophila*, Actine, Complexe ARP2/3, Protéine kinase de *Legionella*, trafic endocytique

Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), INSERM U1111, CNRS UMR5308, ENS Lyon, UCB Lyon 1 ; équipe « pathogénèse des légionelles »

Campus de la Doua, Bâtiment Lwoff (R+3), 10 rue R. Dubois, 69622 Villeurbanne, France