

# PHYSIOPATHOLOGIE DES INFECTIONS A LEGIONELLA



**2023-2024**

**Dr Lise CREMET - MCU-PH**

Service de Bactériologie - CHU de Nantes

Faculté de Pharmacie de Nantes

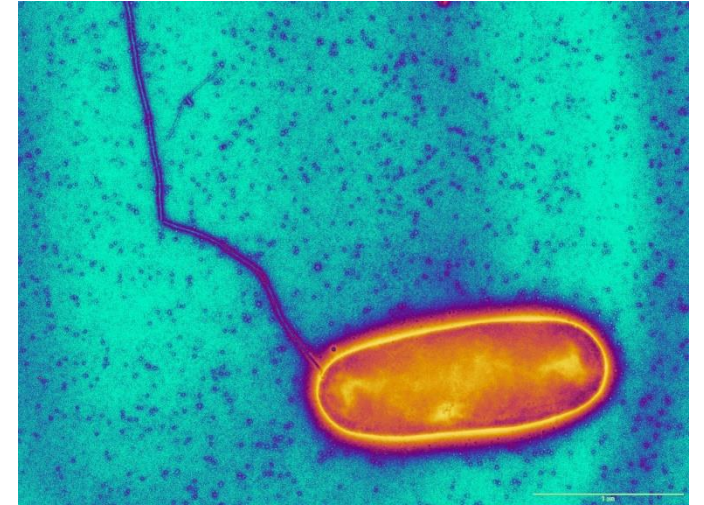
CR2TI Equipe 6, IRS2 Nantes Biotech

[lise.cremet@univ-nantes.fr](mailto:lise.cremet@univ-nantes.fr)

[lise.cremet@chu-nantes.fr](mailto:lise.cremet@chu-nantes.fr)

# *Legionella pneumophila*

- Bacille à Gram négatif
- 1<sup>ère</sup> description en 1976 :
  - 58<sup>ème</sup> congrès de l'American Legion à Philadelphie
  - 221 cas de pneumopathie sévère dont 34 décès
- Genre *Legionella* : au moins 65 espèces
- 15 sérogroupes (antigénicité LPS)
- *Legionella pneumophila* séro groupe 1 : 90% des cas humains



# Réservoir

- **Environnement aquatique naturel :**

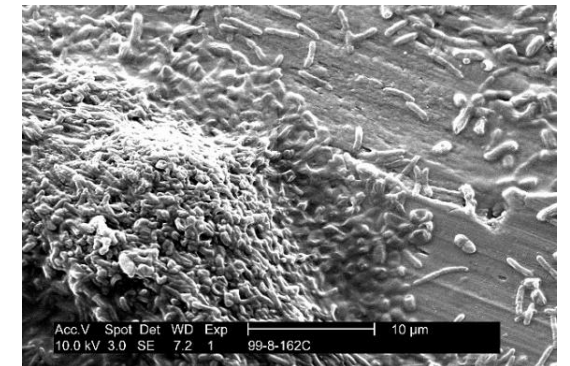
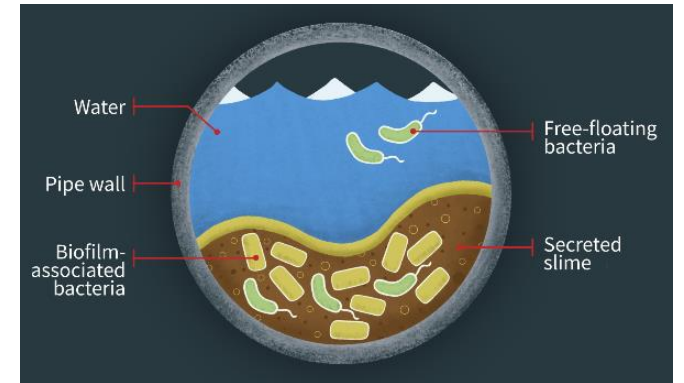
rivières, lacs, sols humides, eaux thermales

- **Milieux artificiels :**

réseaux d'eau chaude sanitaire, tours de refroidissement, bains à remous, nébuliseurs, fontaines décoratives, climatiseurs avec réservoirs d'eau

- **Conditions favorables :**

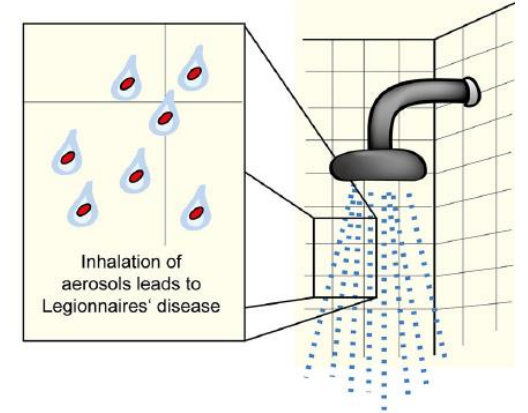
- T° entre 25 et 45° (idéal 37°),
- micro-organismes, dépôts organiques et minéraux (fer, zinc, aluminium) favorisant la formation de biofilms



# Transmission – Facteurs prédisposants

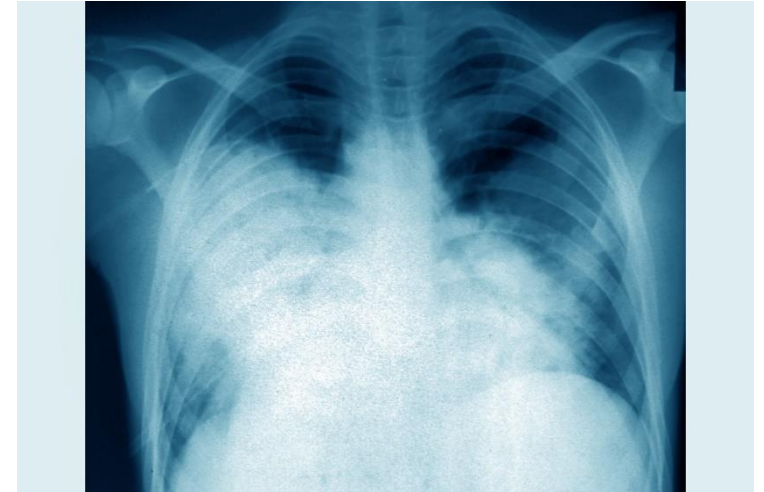


- **Inhalation** d'eau contaminée diffusée en **aérosol**
- Gouttelettes de moins de 5  $\mu\text{m}$
- Pas de transmission inter-humaine
- Pas de contamination par ingestion d'eau contaminée



- **Sujet âgé**, tabac, diabète, cancer, immunodépression, insuffisance respiratoire, insuffisance cardiaque...

## Manifestations cliniques



- **Deux manifestations cliniques :**

- infection aiguë bénigne :

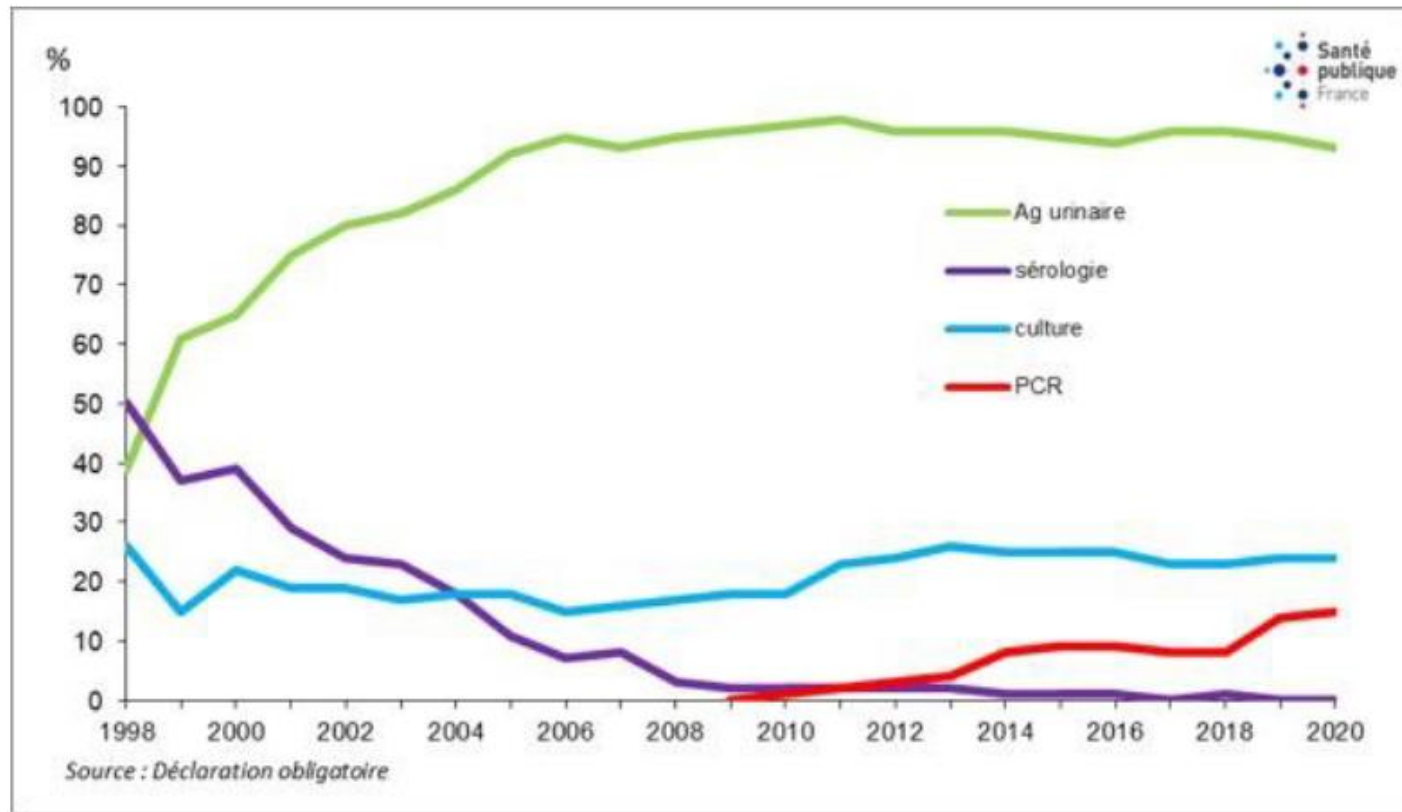
**fièvre de Pontiac** guérissant spontanément sans traitement en 2 à 5 jours

- infection aiguë pulmonaire grave :

**Légionellose** : pneumopathie avec fièvre élevée, troubles digestifs et psychiques ; parfois insuffisance respiratoire grave, insuffisance rénale (décès)

Environ 1300 cas/an en France

# Méthodes de diagnostic des cas de légionellose en France



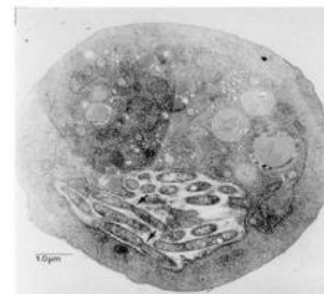
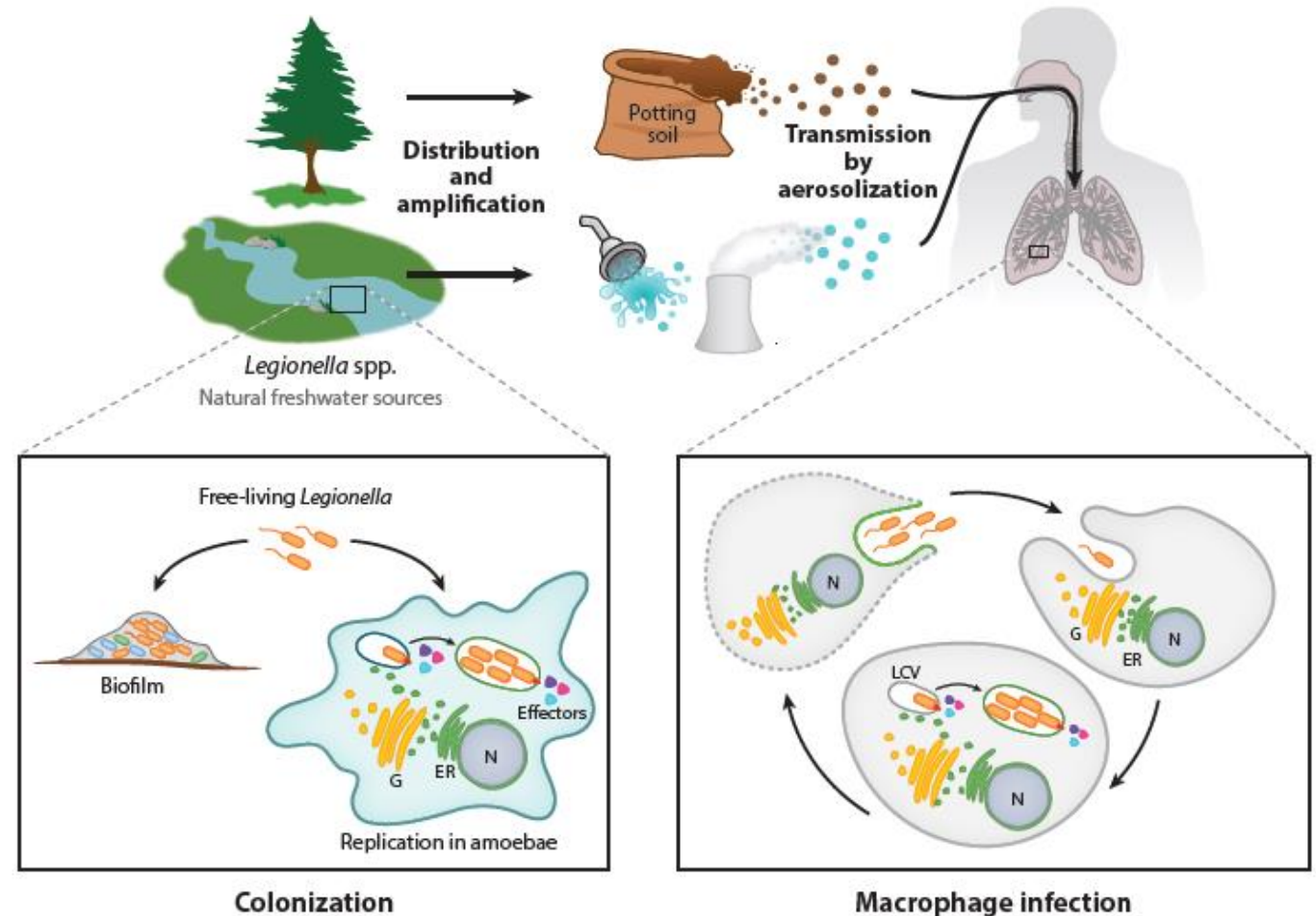
# Bactérie intra-cellulaire

- Des **amibes** dans l'environnement :

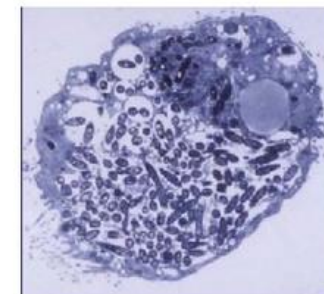
*Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga*, *Hartmannella vermiformis*, *Dictyostelium discoideum*, and *Naegleria* spp

- Des **macrophages alvéolaires** chez l'homme

Phagosome contenant la bactérie appelé : ***Legionella*-containing vacuole (LCV)**



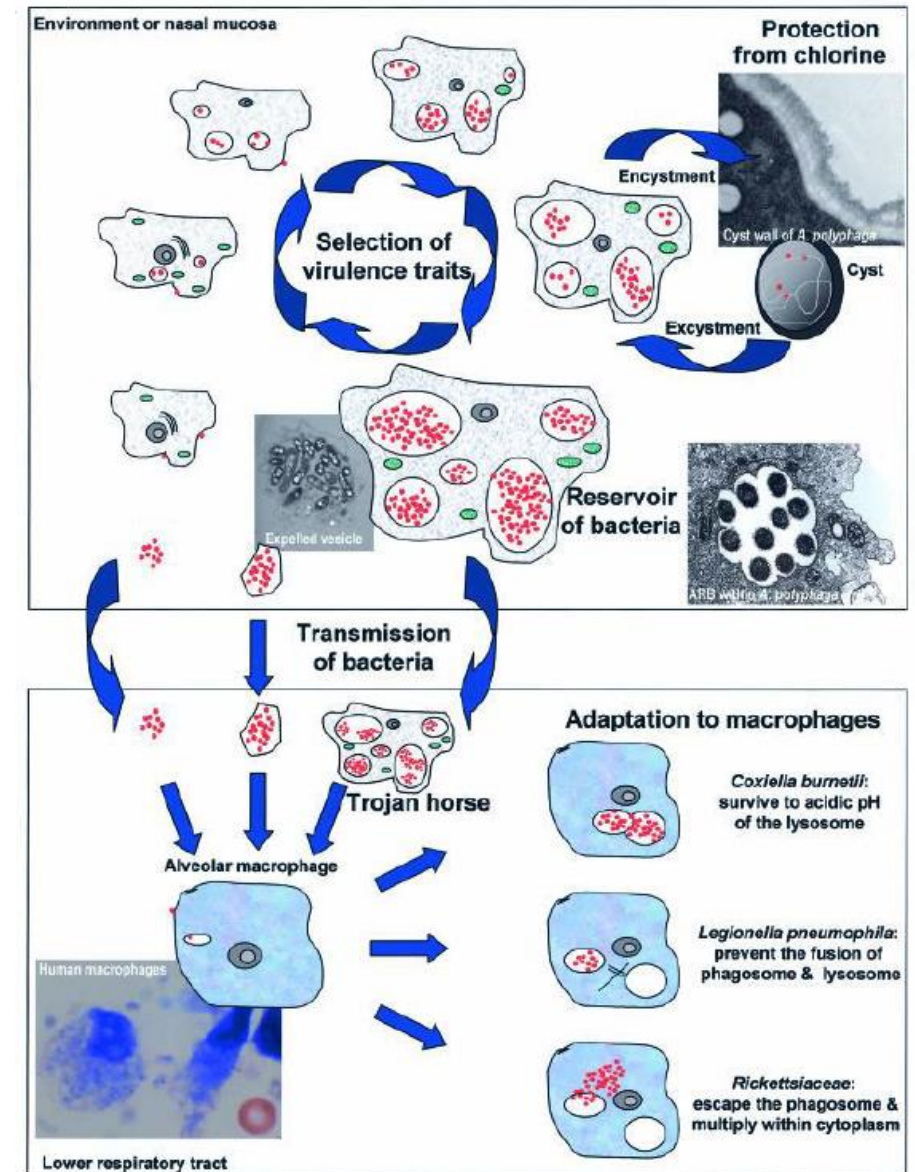
Dans une amibe



Dans un macrophage pulmonaire

# Contribution des amibes à la maladie

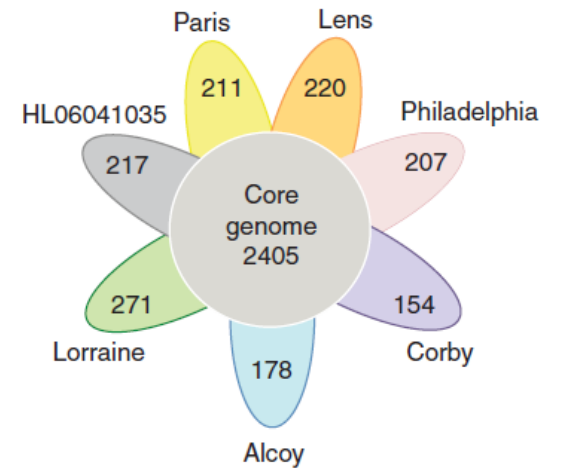
- Réservoir naturel de *L. pneumophila* qui ne se multiplie pas dans l'eau sous forme libre
- Réservoir de divers pathogènes opportunistes
- Environnement intracellulaire favorisant les échanges génétiques entre divers organismes
- Similarité entre les amibes et les macrophages humains, rendant possible l'infection humaine
- Pression de sélection propice à l'adaptation de *L. pneumophila* et à l'évolution de son génome





# Plasticité du génome de *L. pneumophila*

- 1 chromosome circulaire (~ 3,5 Mb)
- ~ 2 500 à 3 000 gènes
- Forte variabilité génétique entre les souches de *L. pneumophila*
- Environ 10% de protéines spécifiques par souche
- Particularité : richesse en gènes eucaryote-like
- Retrouvés chez d'autres bactéries intracellulaires : *Coxiella*, Mycobactéries, Rickettsies....



Espèce bactérienne Taxon	<i>Legionella pneumophila</i> Paris	<i>Legionella pneumophila</i> Lens	<i>Legionella pneumophila</i> Philadelphia-1	<i>Rickettsia bellii</i>	<i>Wolbachia pipientis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Francisella tularensis</i>	<i>Shigella flexneri</i>	<i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>Coxiella burnetii</i>
Bactérie	2380 (79%)	2287 (79,5%)	2345 (79,7%)	1047 (73,3%)	866 (72,5%)	2586 (90%)	1348 (84%)	4025 (96,2%)	4213 (95,2%)	1384 (68,6%)
Eucaryote	105 (3,5%)	99 (3,4%)	101 (3,4%)	98 (6,8%)	43 (3,5%)	10 (0,4%)	26 (1,6%)	0 (0%)	3 (0,06%)	55 (2,7%)
Archée	15 (0,5%)	14 (0,5%)	11 (0,4%)	7 (0,5%)	4 (0,3%)	5 (0,2%)	10 (0,6%)	0 (0%)	2 (0,04%)	18 (0,9%)
Virus	3 (0,1%)	3 (0,1%)	4 (0,1%)	30 (2%)	30 (2,5%)	51 (1,8%)	6 (0,4%)	31 (0,7)	38 (0,86%)	1 (0,05%)

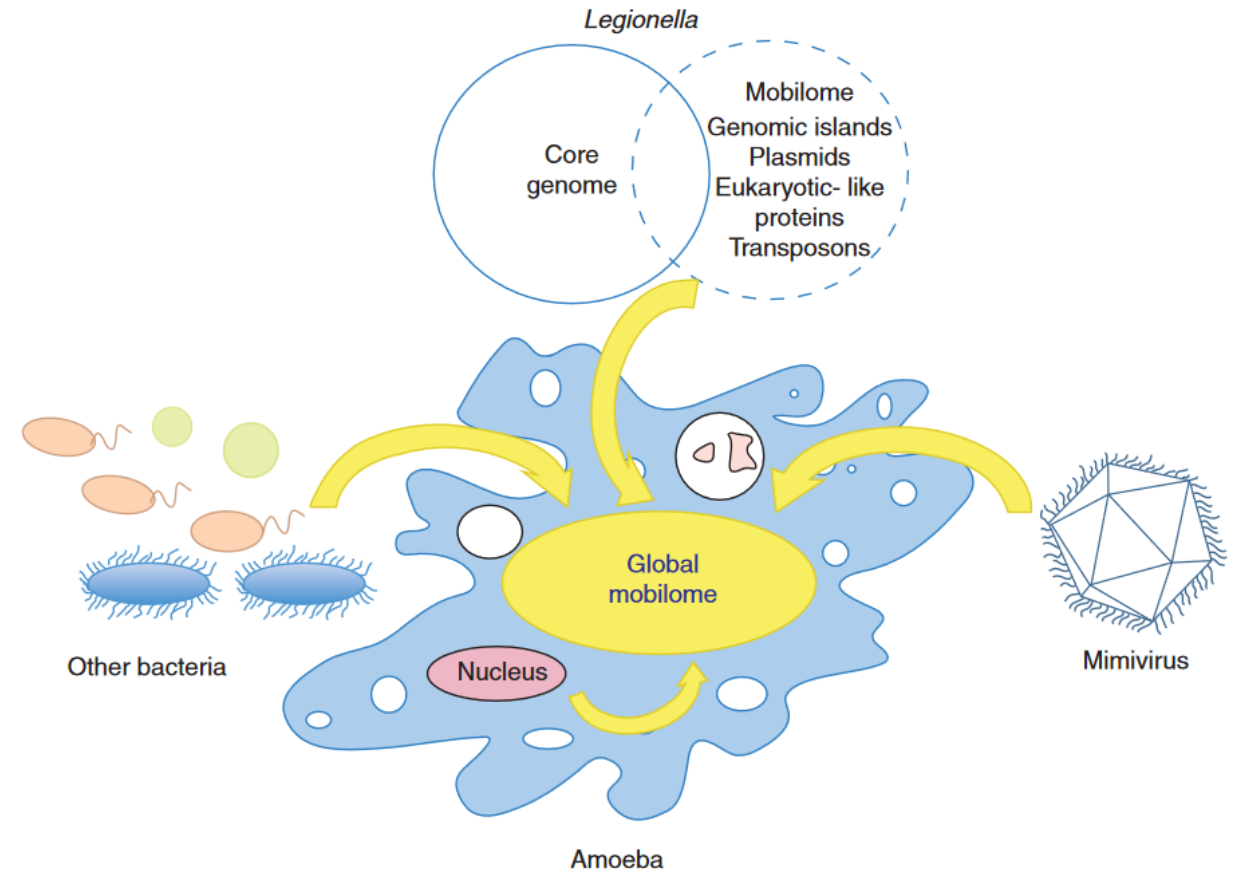
# Adaptation au parasitisme intra-cellulaire

- Mobilome de Legionella :

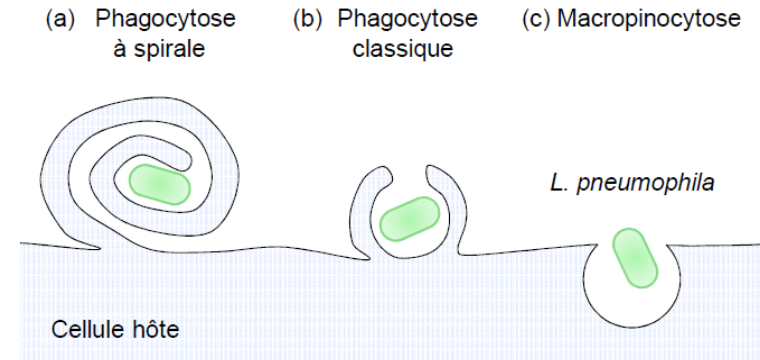
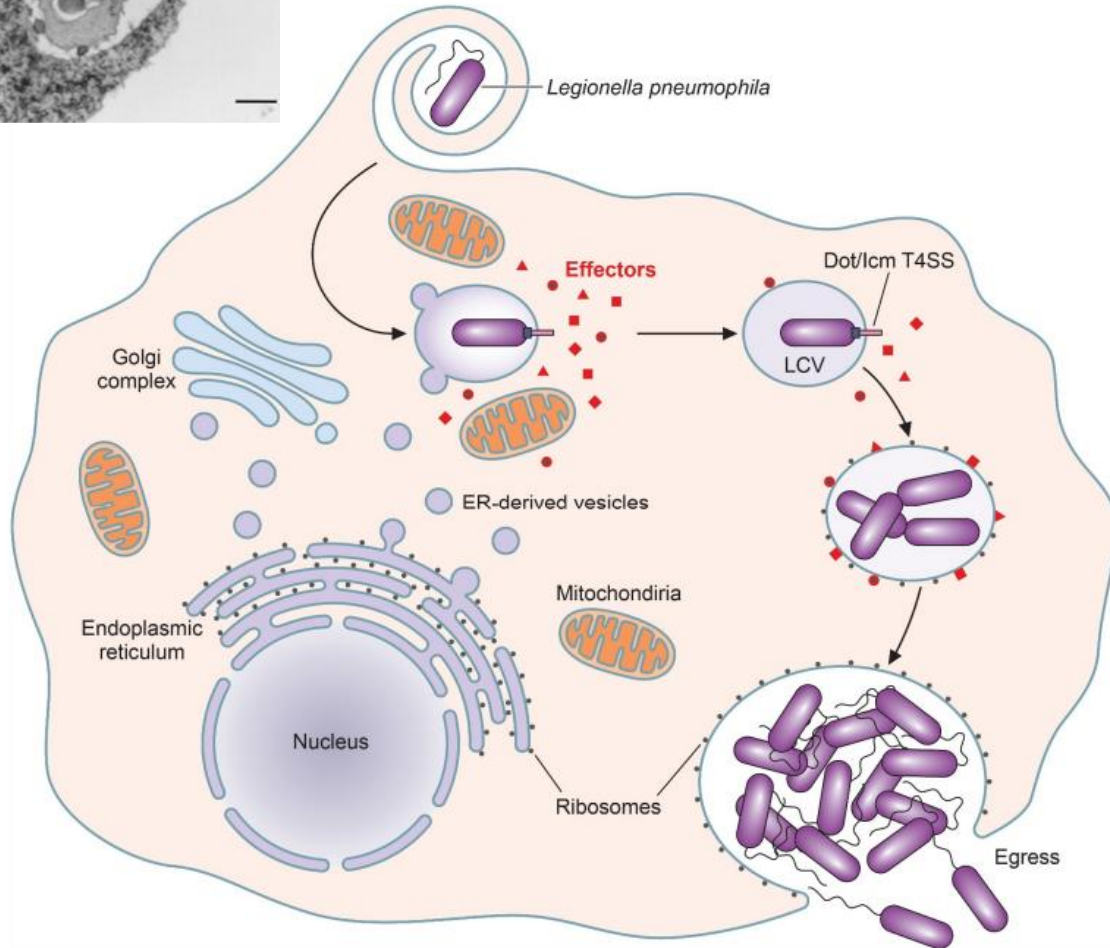
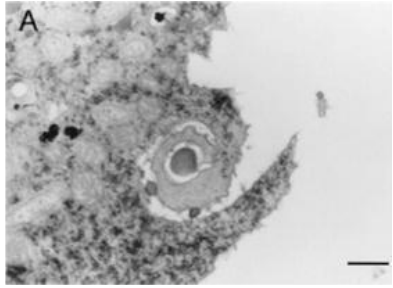
plasmides, IS, transposons, îlots de pathogénicité

- Origine de ces gènes ?

- ✓ Transfert horizontal de gènes à partir d'autres espèces et d'autres parasites intracellulaires
- ✓ Compétence naturelle de *L. pneumophila* qui pourrait être à l'origine de l'incorporation d'ARN eucaryotes dépourvus d'introns (reverse transcriptase chez *L. pneumophila*)



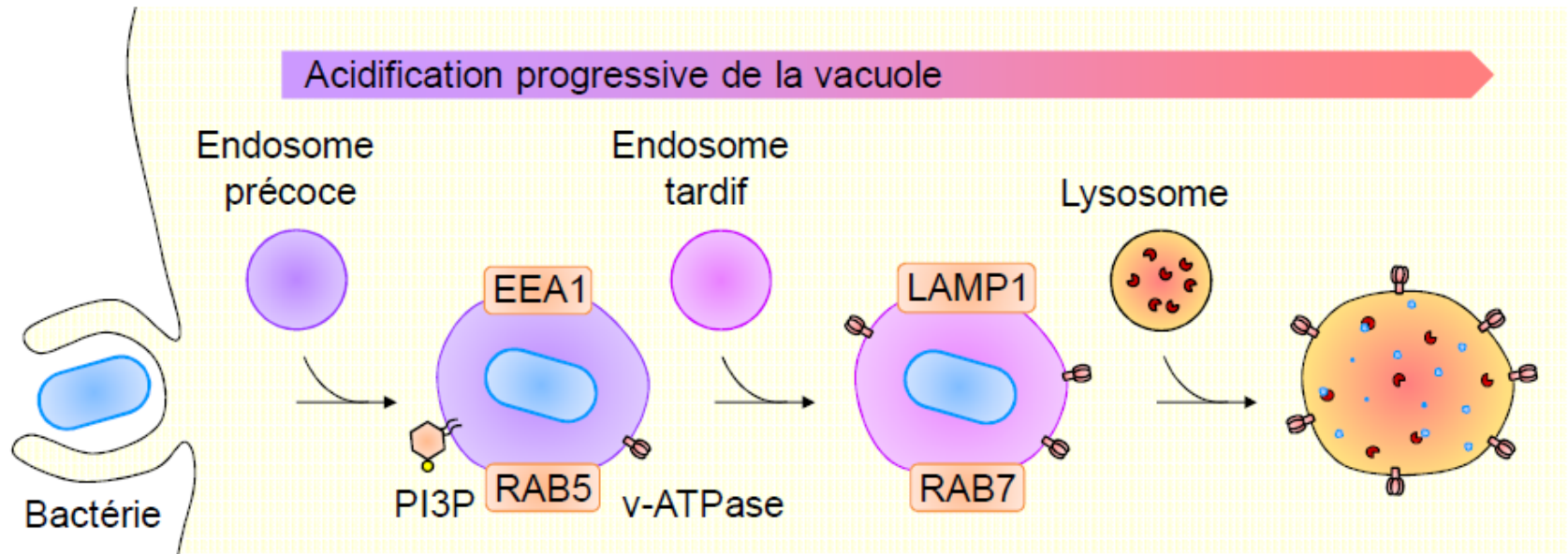
# Internalisation par phagocytose ou macropinocytose



Attachement initial de la bactérie facilité par des facteurs bactériens (T1SS, adhésines, pili type IV) et certains récepteurs cellulaires (CR1, CR3, récepteurs Fc)

Formation d'un **phagophore** par remodelage et expansion membranaire, puis d'un **autophagosome** entièrement clos

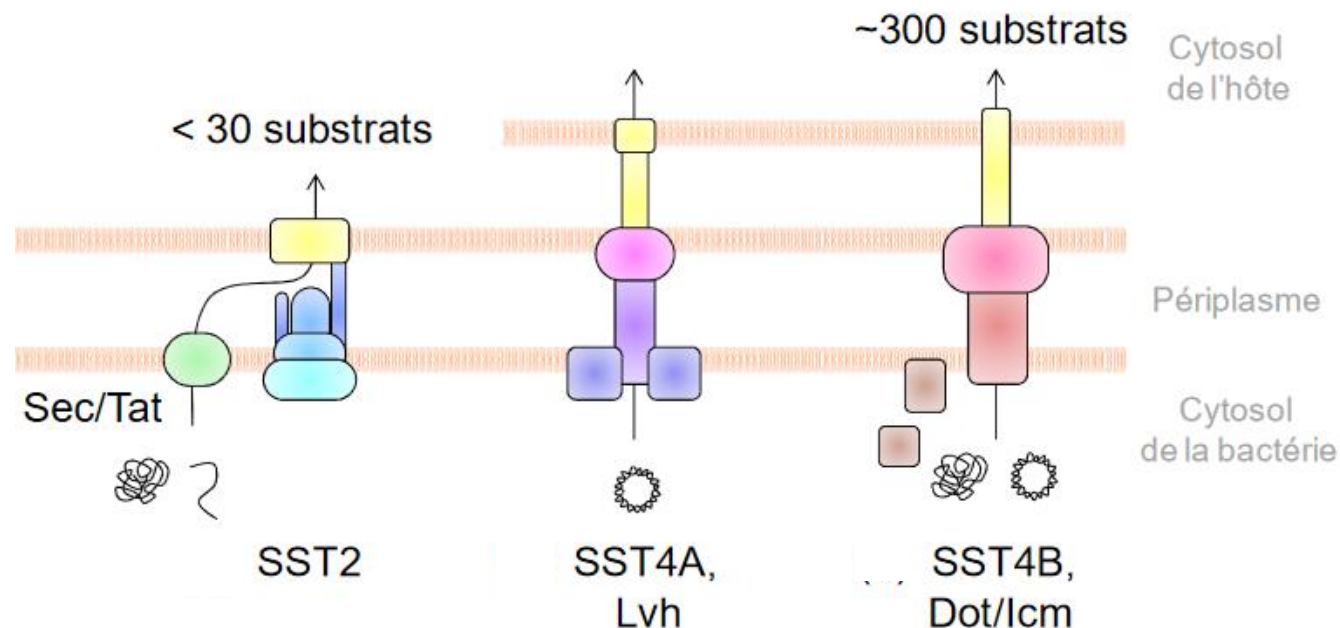
# Echappement à la voie d'endocytose classique



- Fusion phagosomes et endosomes/lysosomes
- Lyse bactérienne dans l'**autolysosome** par acidification médiée par des V-ATPases et accumulation d'hydrolases et autres enzymes de dégradation

# Un large arsenal de facteurs de virulence

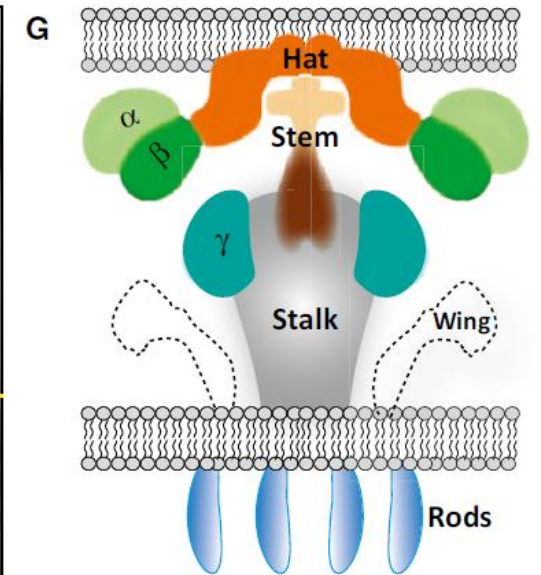
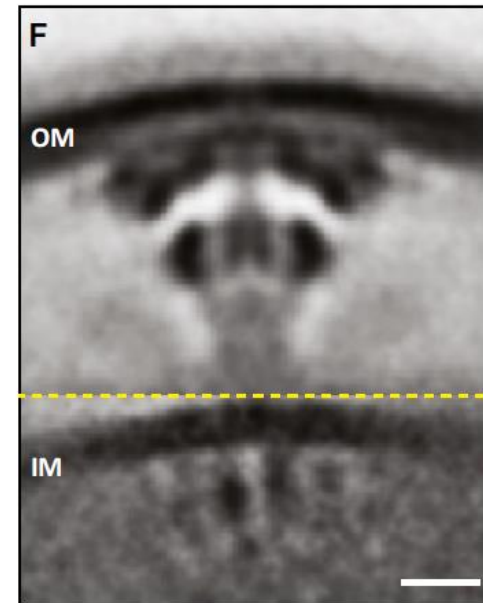
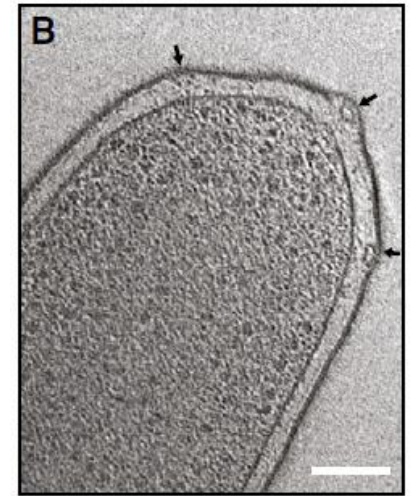
- **2 systèmes de sécrétion majeurs : T2SS et T4SS**
  - ✓ Translocation de protéines à l'extérieur de la bactérie
  - ✓ Protéines nécessaires à la réplication bactérienne et/ou à la pathogénèse

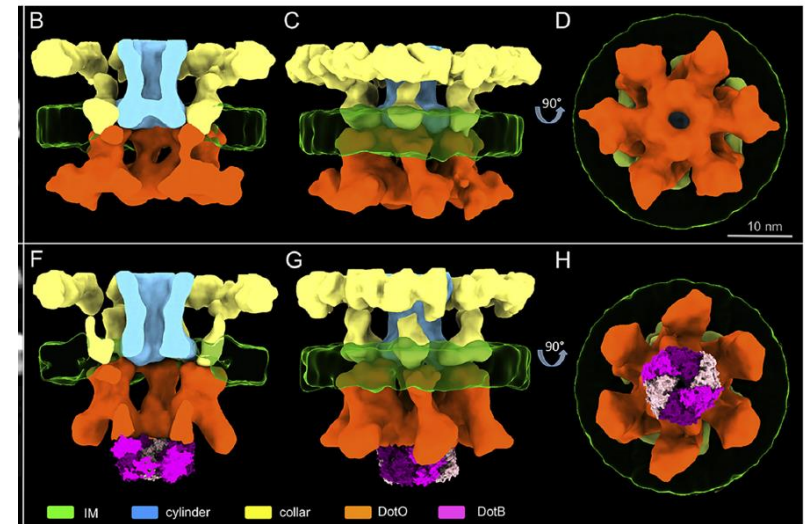
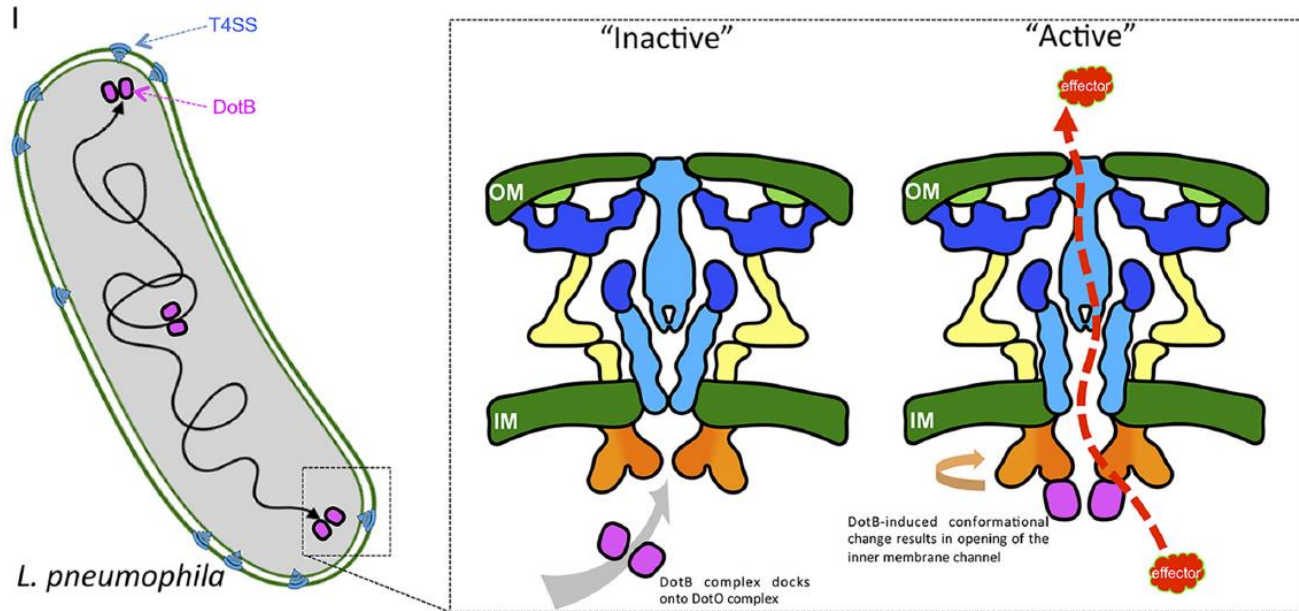
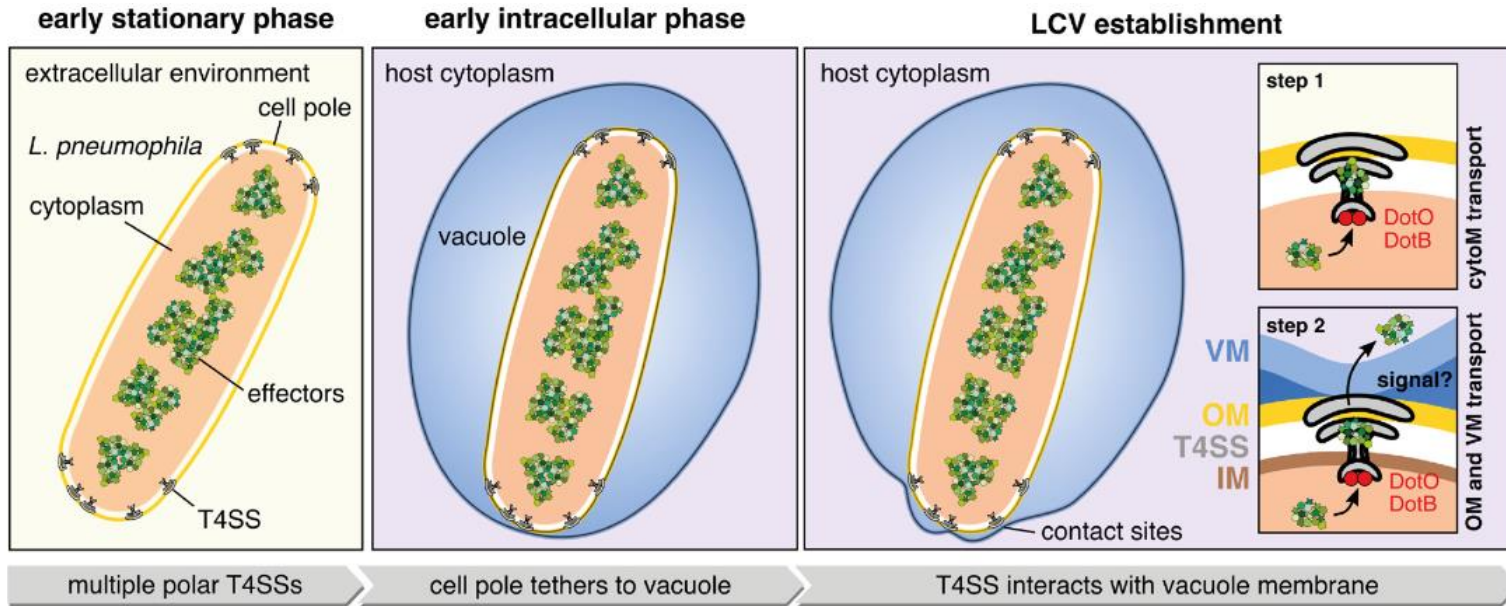


# Un facteur de virulence essentiel : le système de sécrétion de type IV, Dot/icm

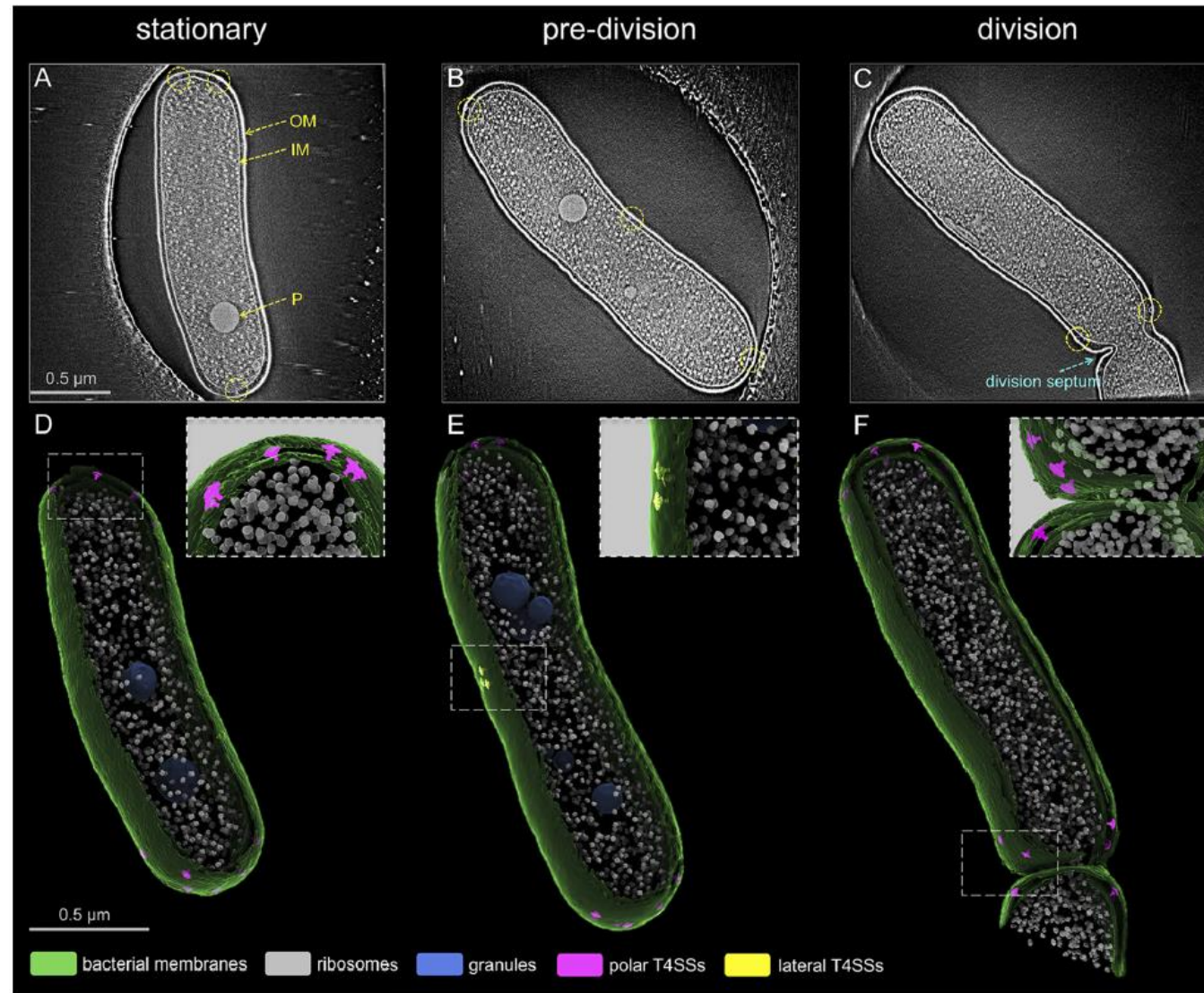
- **Commun** à toutes les espèces de Legionelles  
(defective for organelle trafficking / intracellular multiplication)
- 27 gènes *dot* et *icm* situés dans 2 régions distinctes du chromosome

- Assure la biogénèse des LCV
- Essentiel pour la réplication intra-cellulaire
- Translocation de > 300 protéines effectrices directement dans le cytoplasme des cellules hôtes





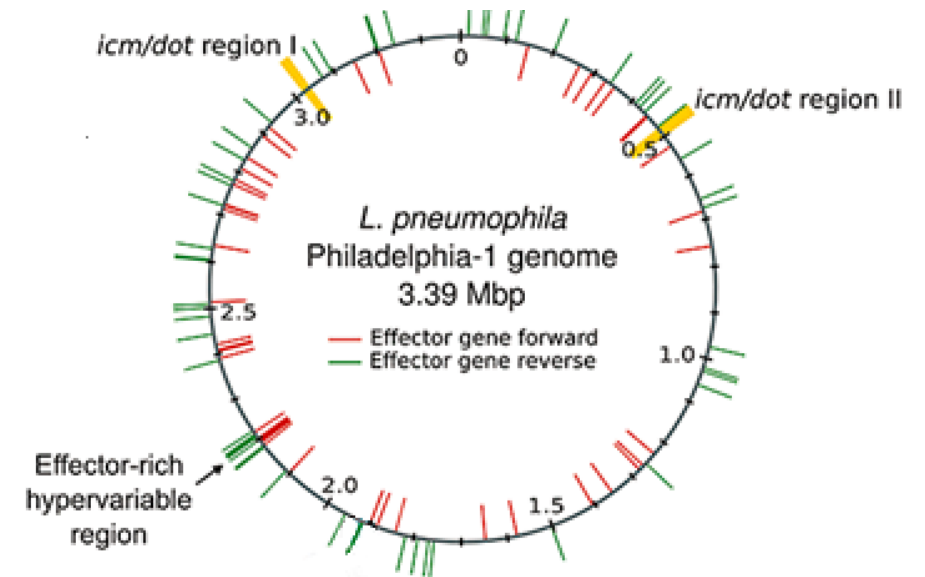
# Visualisation par cryotomographie électronique de *L. pneumophila* en phase de division cellulaire





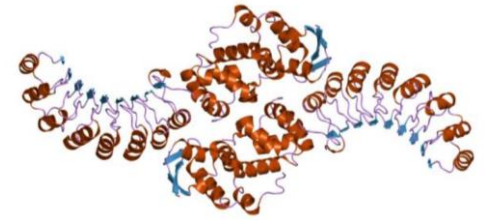
# Un vaste répertoire de protéines effectrices qui imitent les fonctions de la cellule hôte

- Environ 300 effecteurs / souche
- 10 % des gènes de Legionella
- Répertoire d'effecteurs large et divers
- Environ 18000 effecteurs uniques recensés chez Legionella spp
- Redondance fonctionnelle majeure
- Paralogues spécifiques d'un hôte particulier ?
- Fonction encore inconnue pour la majorité d'entre eux

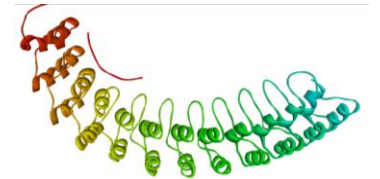


# Caractéristiques spécifiques des effecteurs du système Dot/icm

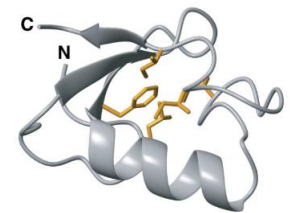
- **Protéines eucaryote-like** (GTPAses) ou à **domaine eucaryote-like** (U-box, F-box, répétitions d'ankyrine...)
- Mimétisme des fonctions cellulaires eucaryotes
- Manipulation de multiples voies de signalisation de l'hôte à l'avantage de Legionella :
  - Détournement du trafic vésiculaire intracellulaire
  - Echappement à la fusion lysosomale
  - Acquisition de nutriments issus de la cellule hôte
  - Inhibition de la synthèse protéique eucaryote
  - Fonctions anti-apoptotiques
  - ...



**Motif F-box** impliqué dans les interactions protéine-protéine

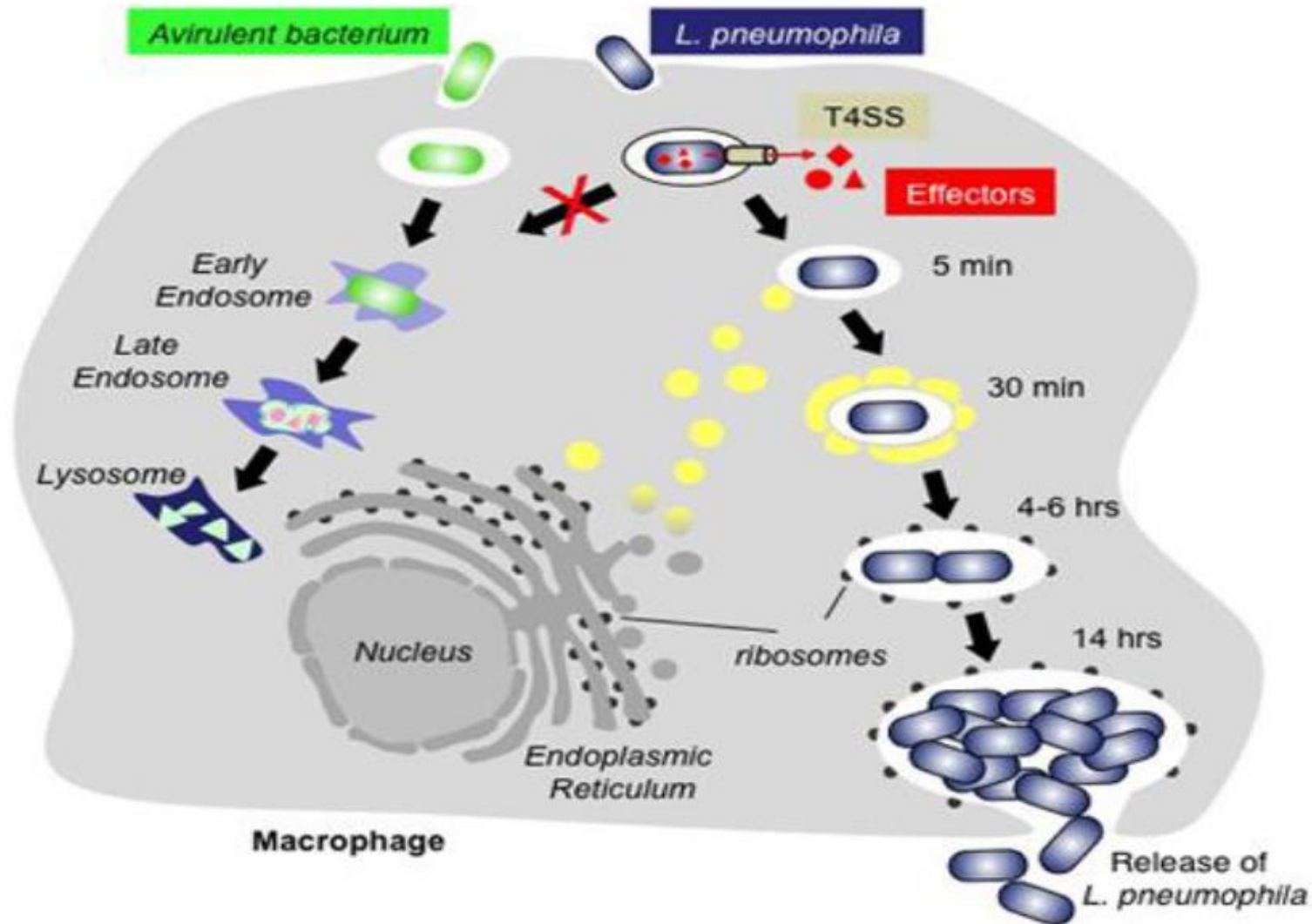


**Domaine de répétitions ankyrine** impliqué dans les interactions protéine-protéine



**Motif U-box** impliqué dans les réactions de multi-ubiquitination

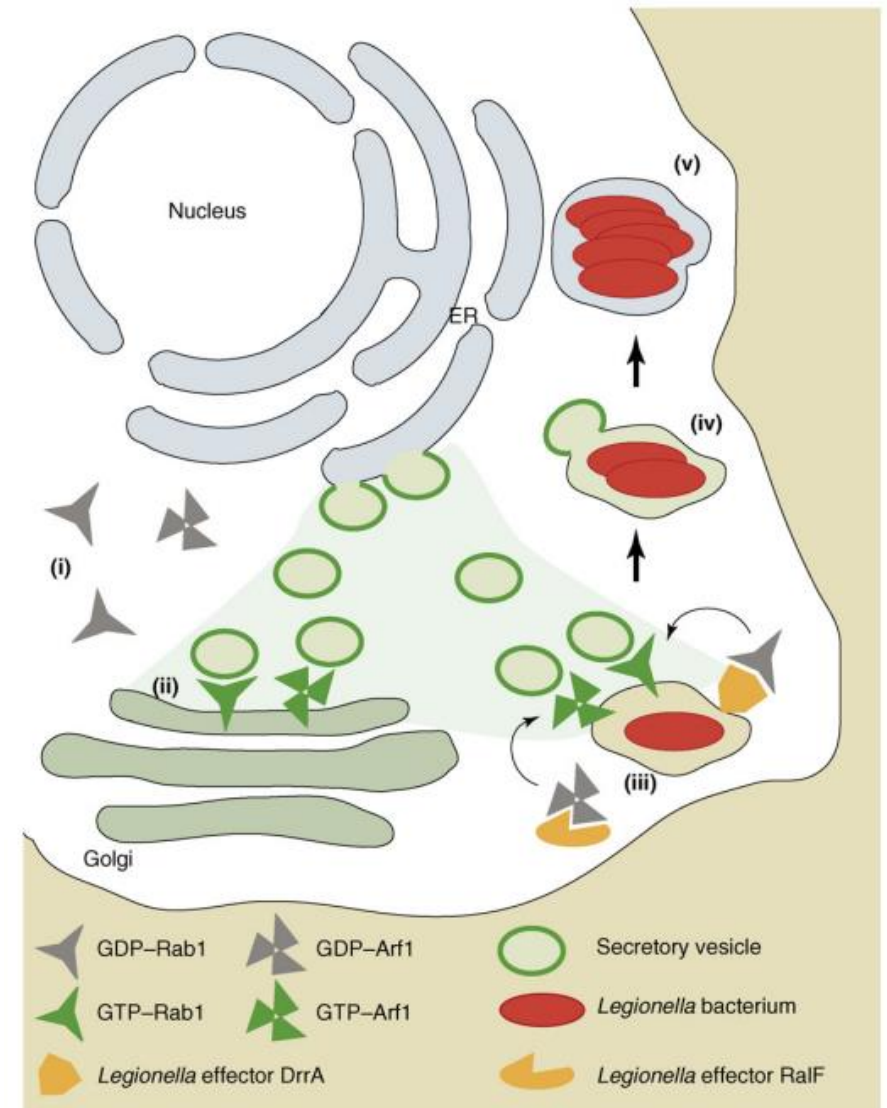
# Modification de la maturation normale du phagosome



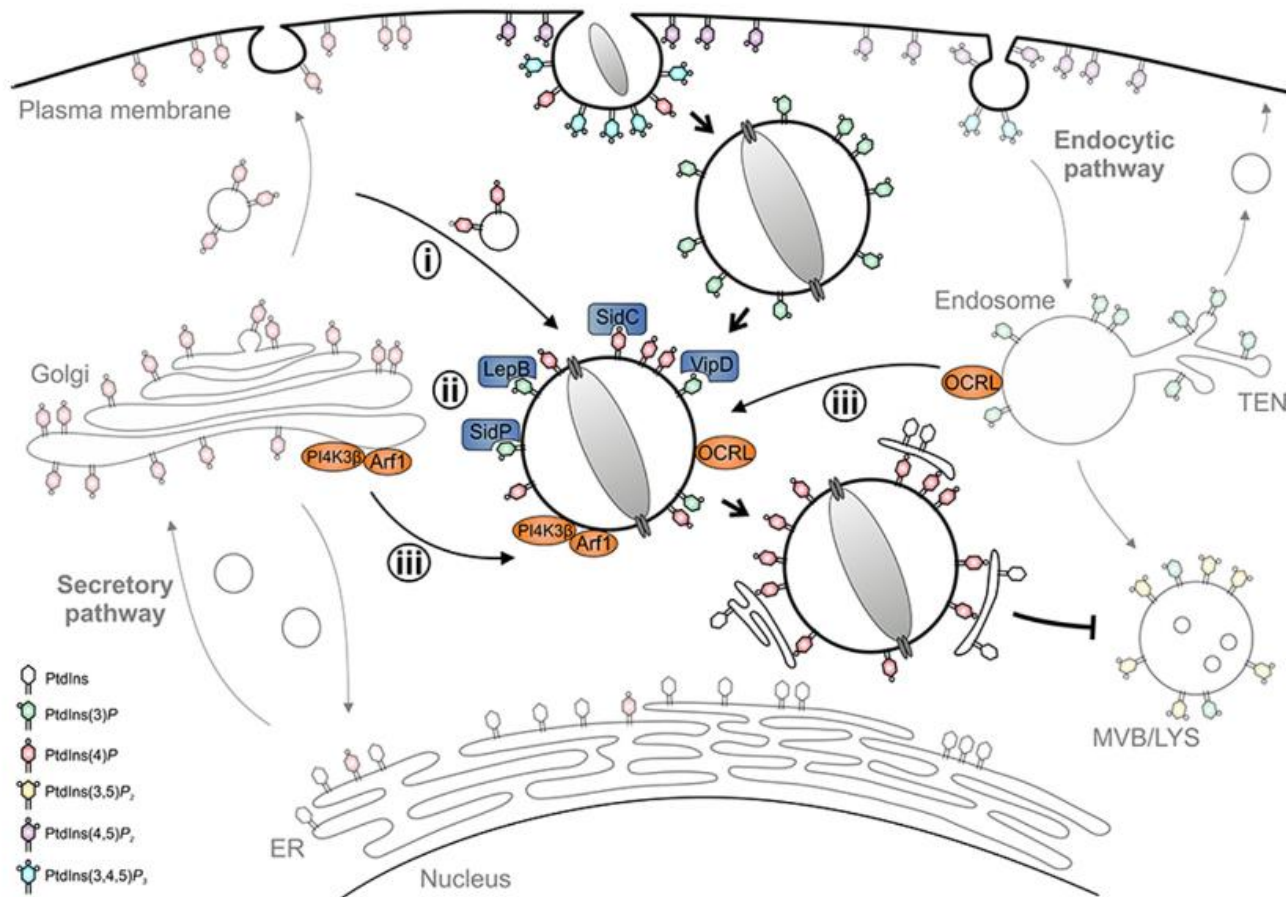
- Echappement à la fusion phagosome-lysosome
- Survie et réplication dans une vacuole dérivée du réticulum endoplasmique (LCV)
- Recrutement du RE à la surface de la vacuole, puis des ribosomes
- Réplication possible dans le compartiment RE rugueux-like

# Interaction avec le réticulum endoplasmique

- Intervention de protéines eucaryote-like pour le remodelage de la LCV :
  - RaIF
  - SidM (DrrA)
  - LidA
  - ...
- Recrutement à la surface de la LCV et contrôle de l'activation de petites GTPases de l'hôte (Rab1, Arf1) qui régulent le transport et la sécrétion de vésicules entre RE et appareil de Golgi



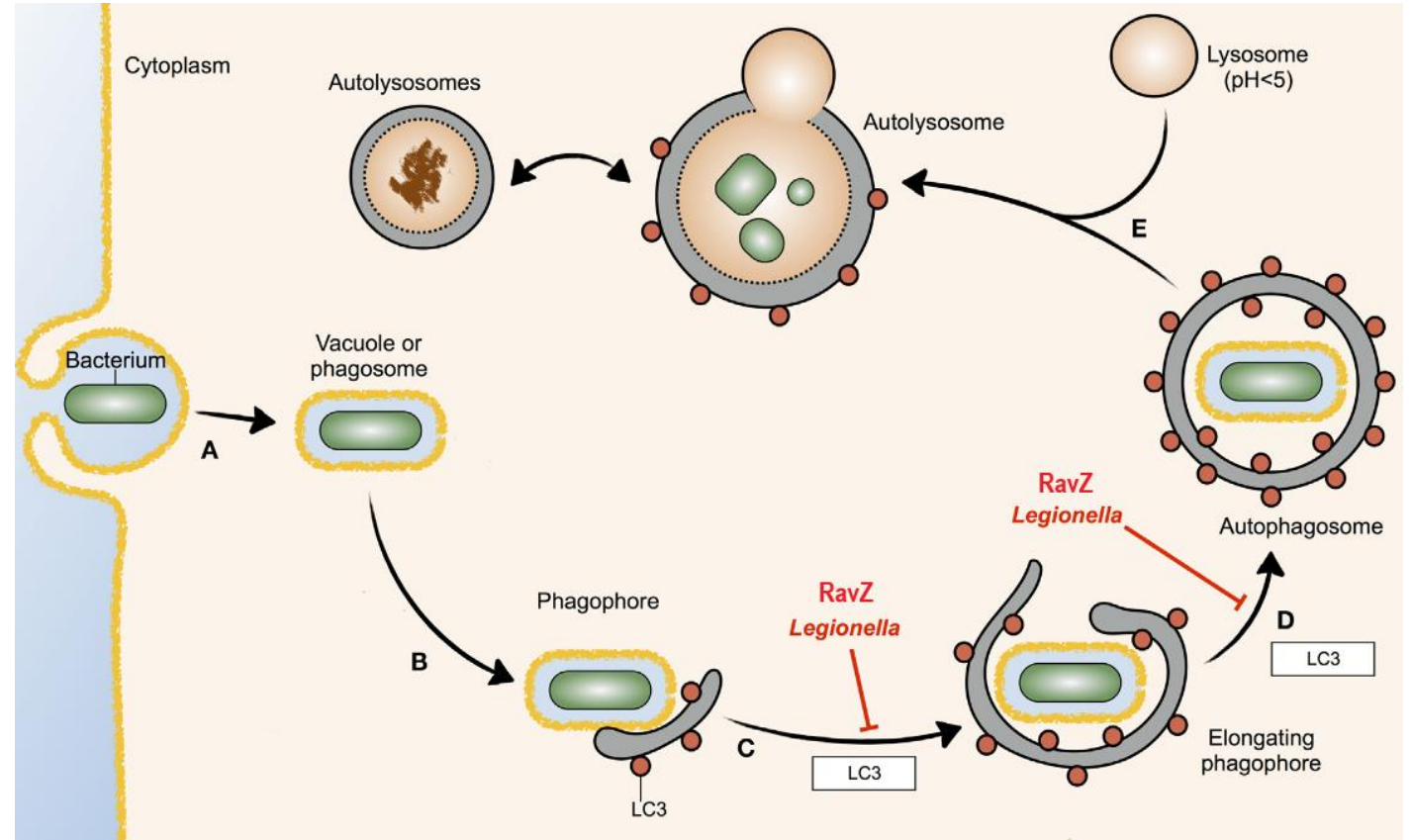
# Modulation de la composition lipidique de la LCV



- Composition en phosphoinositides (PI) différente selon les compartiments cellulaires
- PI3P : marqueur lipidique des phagosomes et macropinosomes impliqué dans le commencement de la dégradation endocytaire
- Des effecteurs limitent l'accumulation de PI3P à la surface de la LCV au profit de l'acquisition de PI4P (lipide principalement retrouvé sur le Golgi et RE), par :
  - métabolisation directe des PI
  - recrutement d'enzymes cellulaires

# Echappement au mécanisme d'autophagie

- Plusieurs effecteurs impliqués (RavZ, LpSPL, Lpg1137)
- Clivage par RavZ de la protéine LC3 associée aux membranes autophagosomales et nécessaire à la structuration et fermeture des autophagophores



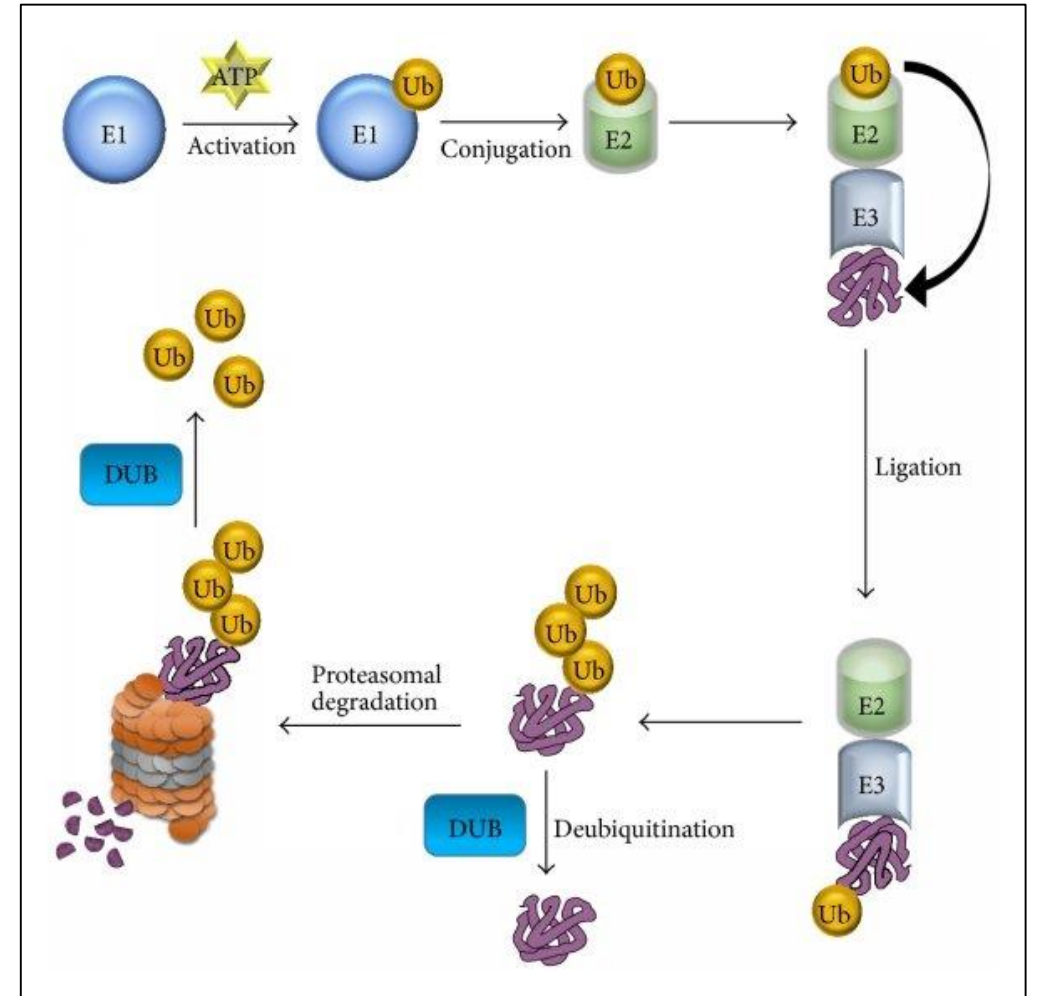
# Echappement à la voie d'endocytose classique

- Neutralisation du pH de la LCV par 2 effecteurs (SidK et WipB) au stades précoces de l'infection
- Blocage de v-ATPases (pompes à proton) de l'hôte (LAMP-1, Rab7)
- Acidification de la vacuole à un stade tardif de l'infection par acquisition de marqueurs endosomaux et lysosomaux

CONDITION	AGE DU PHAGOSOME	pH
<i>E. coli</i> vivant	45-75 min	5,6
<i>L. pneumophila</i> vivante	3-6 heures	7,4
<i>L. pneumophila</i> tuées	3-6 heures	5,5
<i>L. pneumophila</i> vivante	16-22 heures	5,6

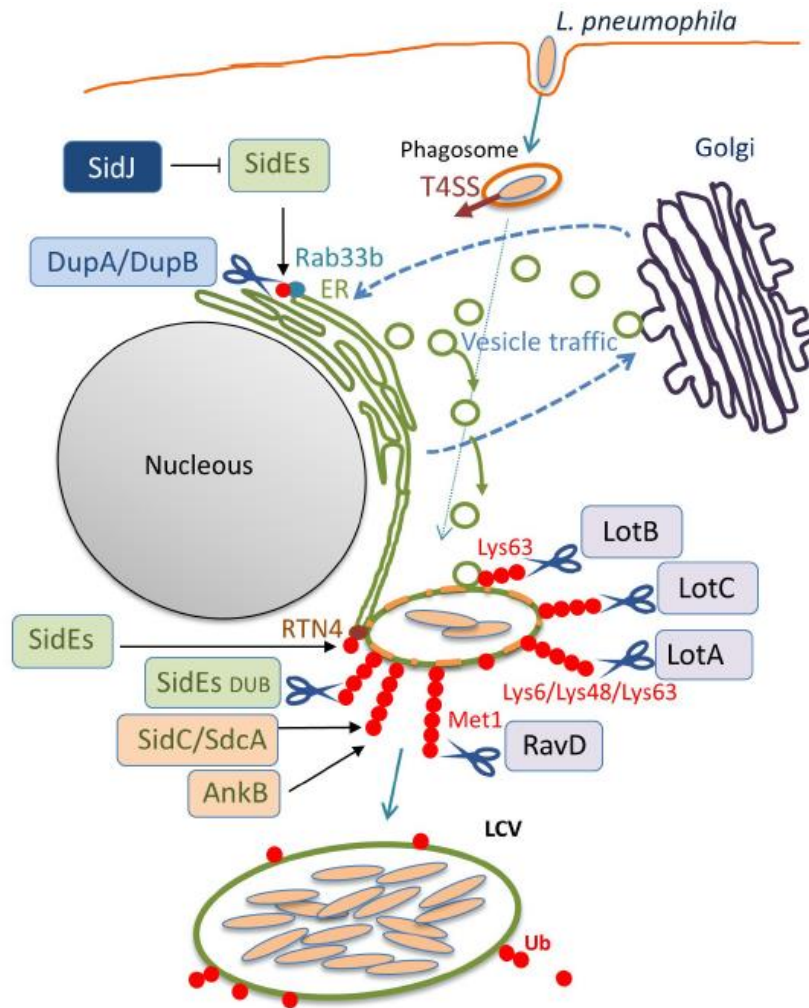
# Interaction avec la machinerie d'ubiquitylation de la cellule hôte

- Processus de dégradation des protéines hautement spécifique et contrôlé
- Basé sur le marquage des protéines à dégrader par une ou plusieurs molécules d'ubiquitine *via* une cascade enzymatique (E1, E2, E3)
- Le substrat ubiquitylé est adressé au protéasome où il est dégradé
- Activité E3 ubiquitine ligase de certains « méta-effecteurs » (LubX, SidJ) permettant la régulation temporelle d'autres effecteurs





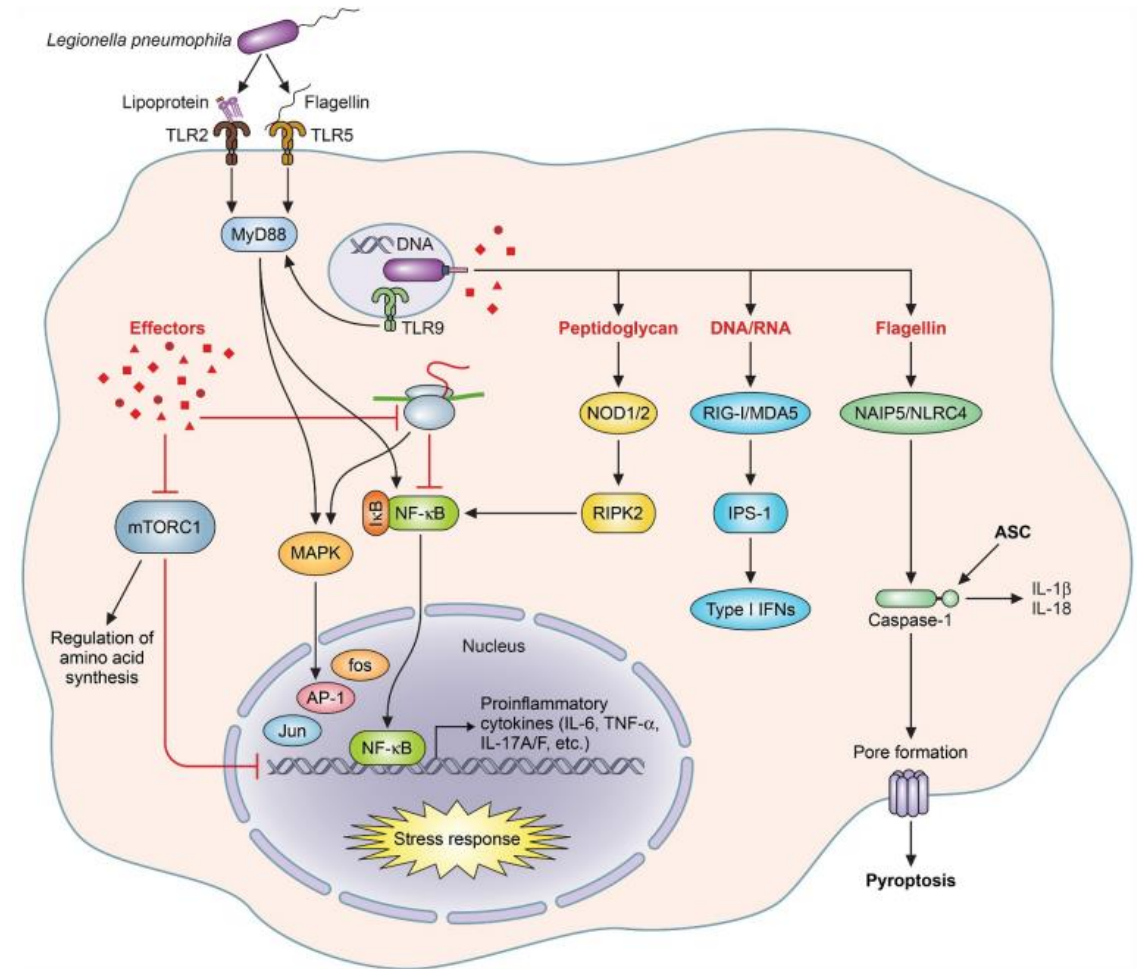
# Interaction avec la machinerie d'ubiquitylation de la cellule hôte



- Récupération de nutriments (acides aminés) par ubiquitination de protéines présentes à la surface de la LCV et détournement du protéasome de l'hôte :
  - AnkB
  - Effecteurs de la famille SidE (SdeA, SdeB, SdeC, SidE)
  - ...
- Activité dé-ubiquitinase de certains effecteurs (DupA/B, LotA/B/C, RavD)

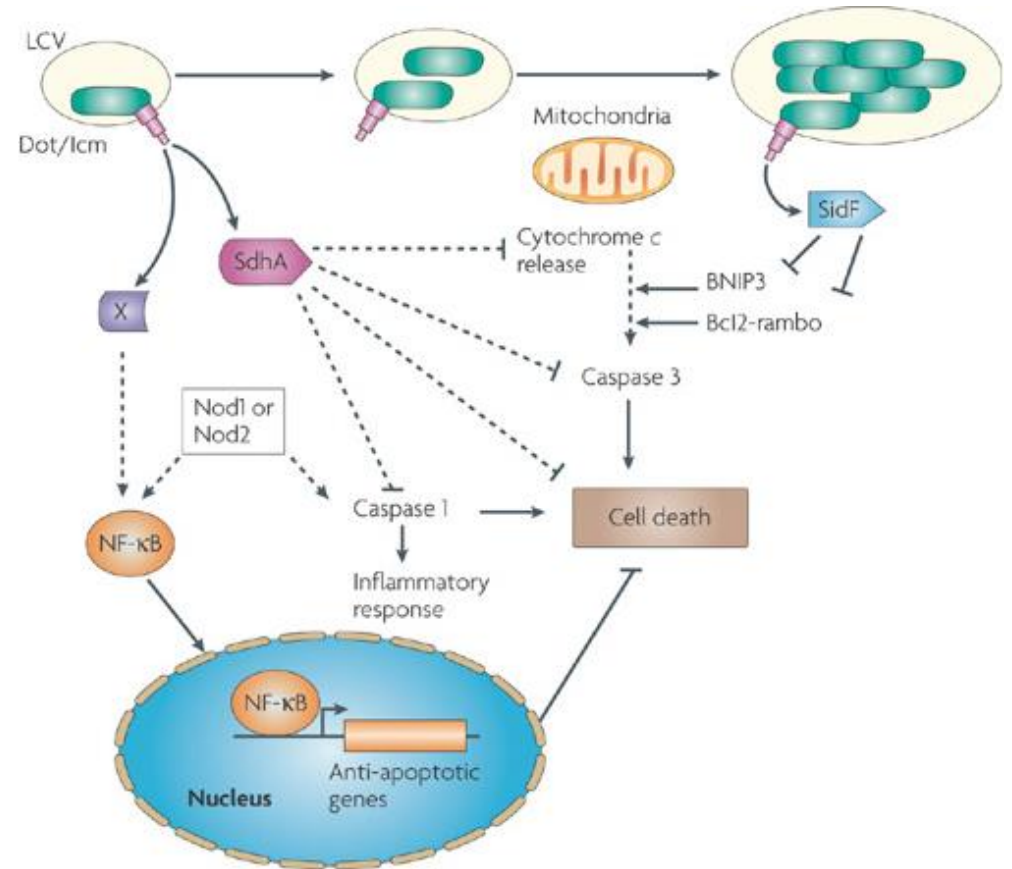
# Modulation de la réponse immunitaire innée à l'infection

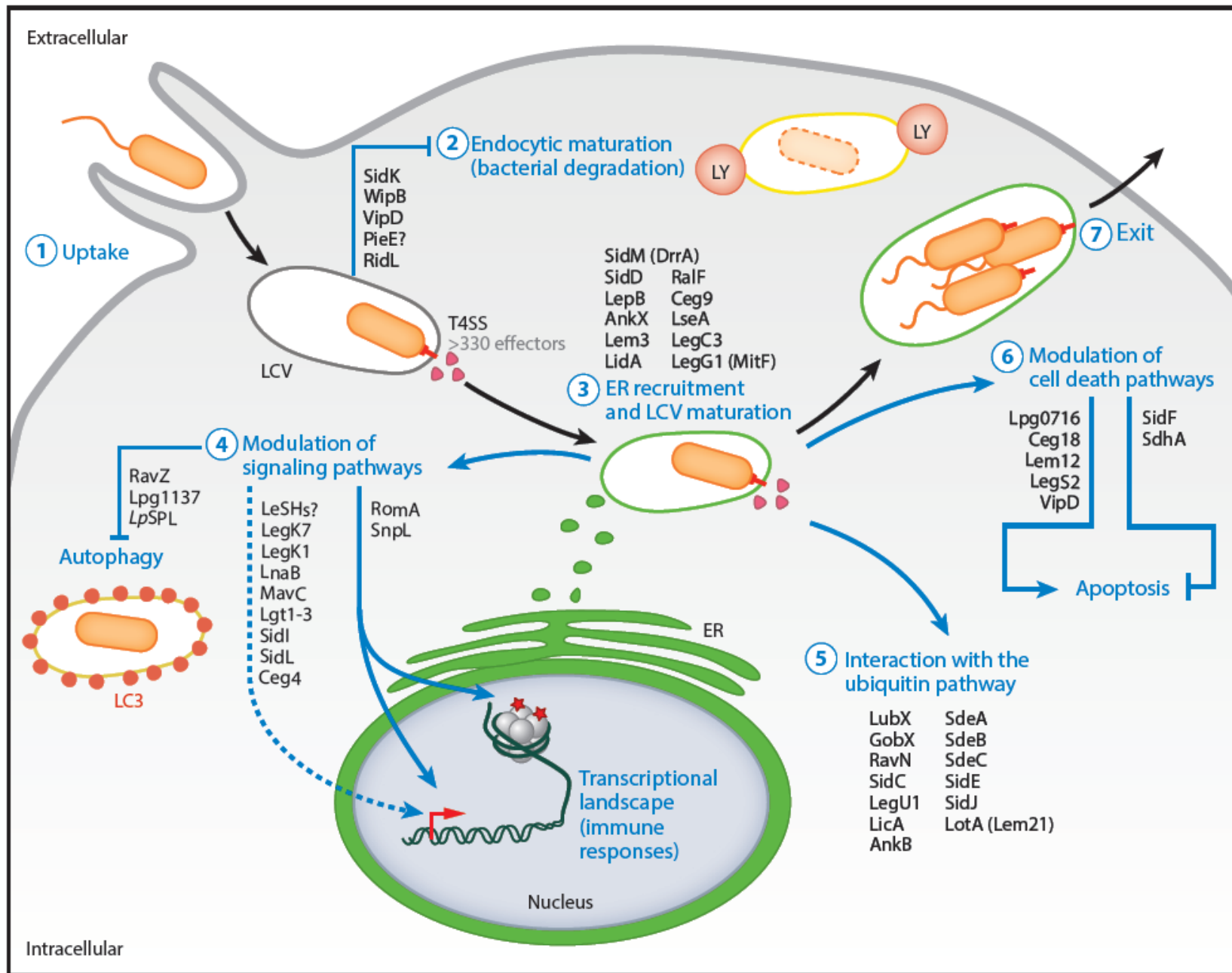
- Réponse des macrophages à l'infection :
  - Stimulation TLR/NLR
  - Production d'IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-6
  - Recrutement de polynucléaires neutrophiles
  - Production d'IFN- $\gamma$  par cellules NK
  - Activation des macrophages
- Différentes protéines effectrices (LegK1, LnaB, MavC, Lgt, SidI, SidL...) impliquées dans la **régulation de la voie NF- $\kappa$ B**



# Fonctions anti-apoptotiques

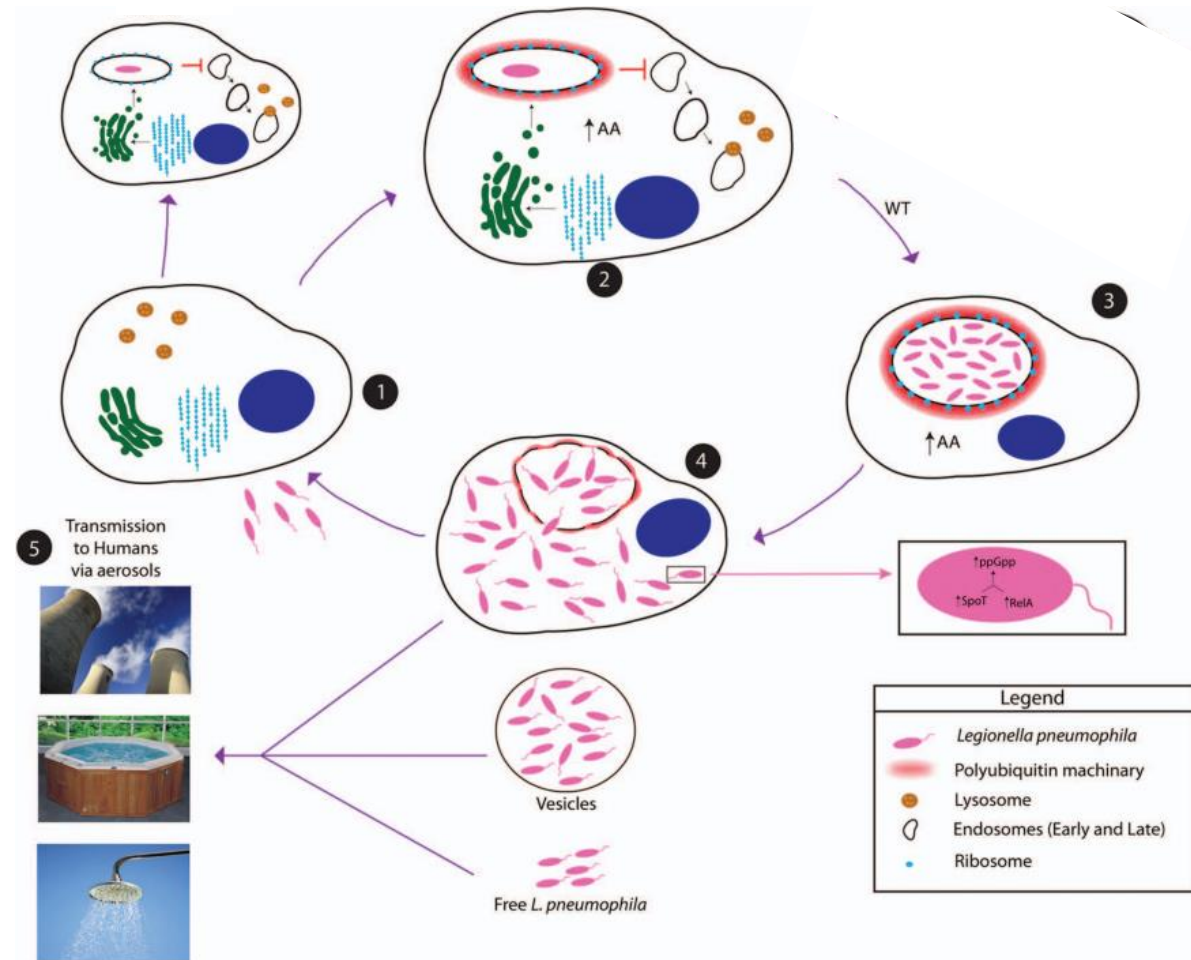
- Pas d'apoptose avant un stade avancé de réplication
- Différents effecteurs (SdhA, SidF, LegS2, VipD... ) et mécanismes impliqués :
  - activation de la voie NF- $\kappa$ B
  - inhibition de protéines pro-apoptotiques
  - ...





# Stades ultimes de l'infection

- Evolution de la vacuole
  - Densité bactérienne élevée
  - Déplétion en AA
- Passage à une forme virulente et cytotoxique (infectieuse)
- Sortie des Légionelles de la vacuole
- Sortie de la cellule
  - Par formation de pores et lyse de la cellule hôte
  - Par un mécanisme non lytique d'exocytose (effecteurs LepA/LepB)



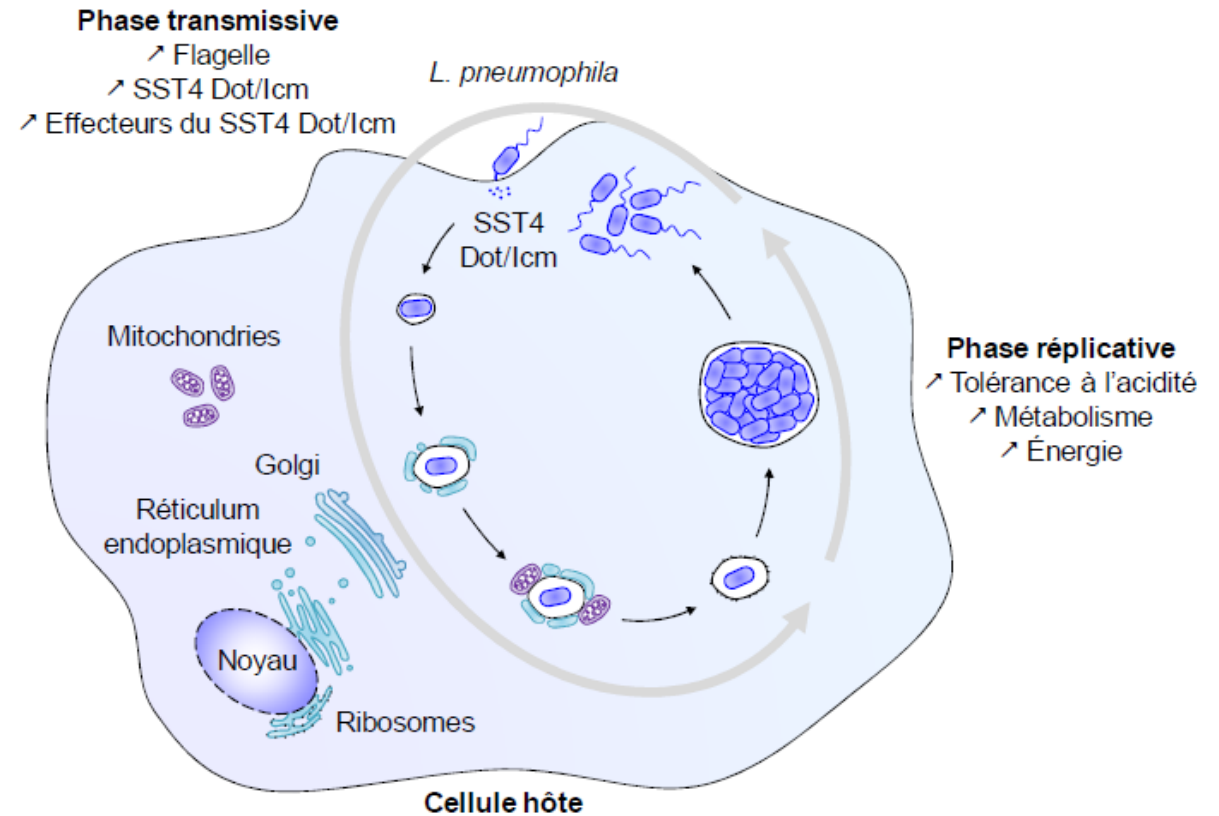
# Cycle de vie biphasique

- **Forme transmissive (virulente) :**

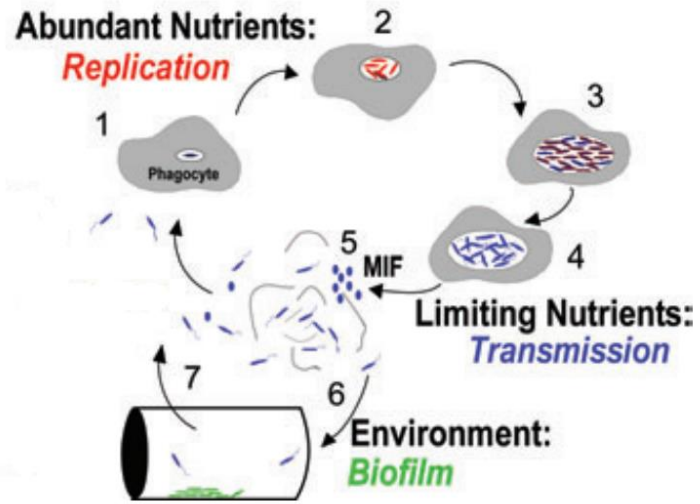
stimulation des gènes codant les protéines impliquées dans l'adhésion et l'entrée de la bactérie ainsi que les effecteurs sécrétés par le SST4 Dot/Icm et le flagelle

- **Forme répliquative (avirulente) :**

stimulation de l'expression des gènes impliqués dans les voies métaboliques, énergétiques ainsi que ceux impliqués dans la division bactérienne



# Cycle de vie biphasique



- Influencé par :
  - La richesse en nutriments dans le milieu
  - La densité bactérienne (*quorum sensing*)
- Régulateurs clé :
  - **Alarmonne ppGpp** (réponse stringente)
  - Facteur de transcription alternatif **RpoS**
  - Répresseur global **CsrA**
  - Système de *quorum sensing* **Lqs**

