Nantes Université

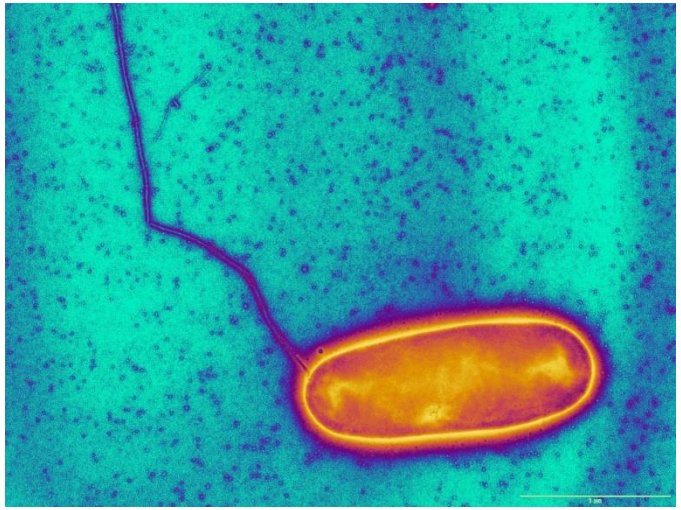
Pôle Santé
UFR des Sciences pharmaceutiques et biologiques

PHYSIOPATHOLOGIE DES INFECTIONS A LEGIONELLA

2024-2025

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
lise.cremet@chu-nantes.fr

Legionella pneumophila



- Bacille à Gram négatif

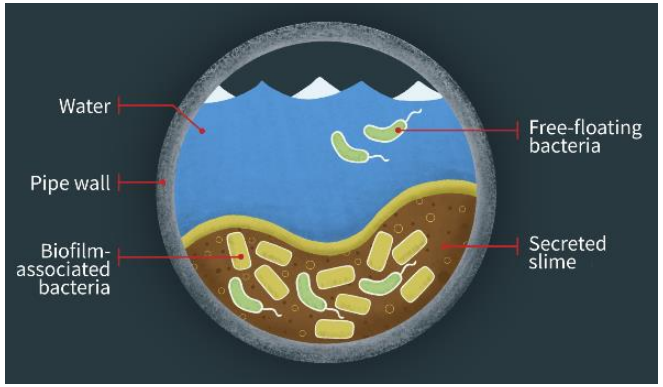
- 1ère description en 1976 :

  58ème 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* sérogroupe 1 : 90% des cas humains

Réservoir

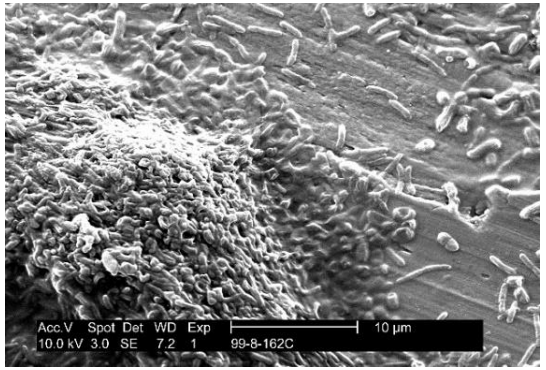


- **Environnement aquatique naturel :**

  rivières, lacs, sols humides, eaux thermales

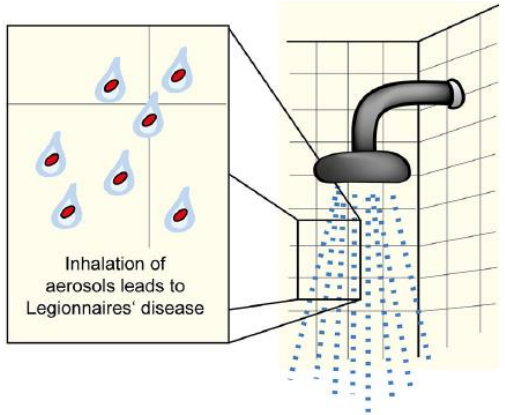
- **Milieux artificiels :**

  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 µm
- 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 :

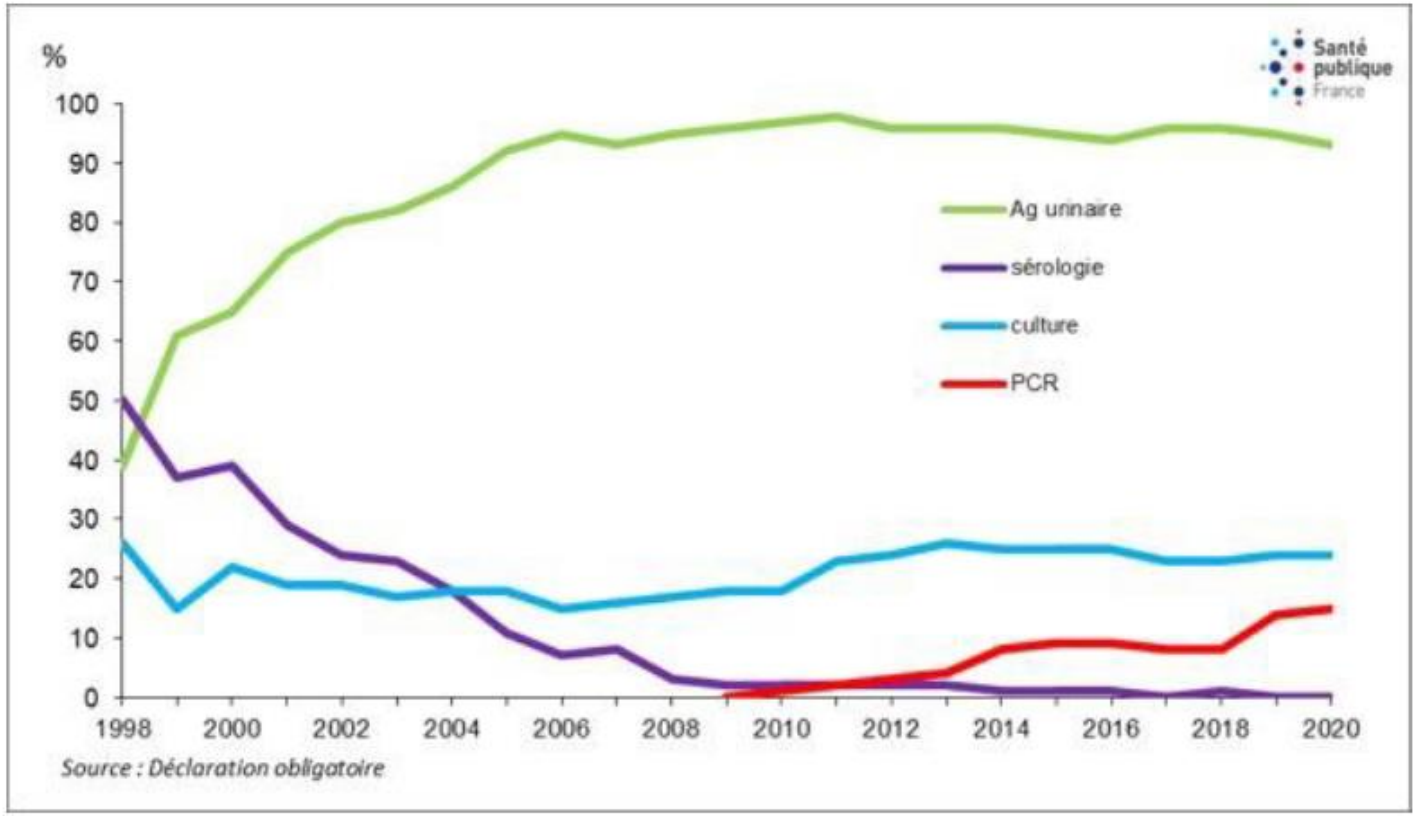
    fièvre de Pontiac guérissant spontanément sans traitement en 2 à 5 jours

  - 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



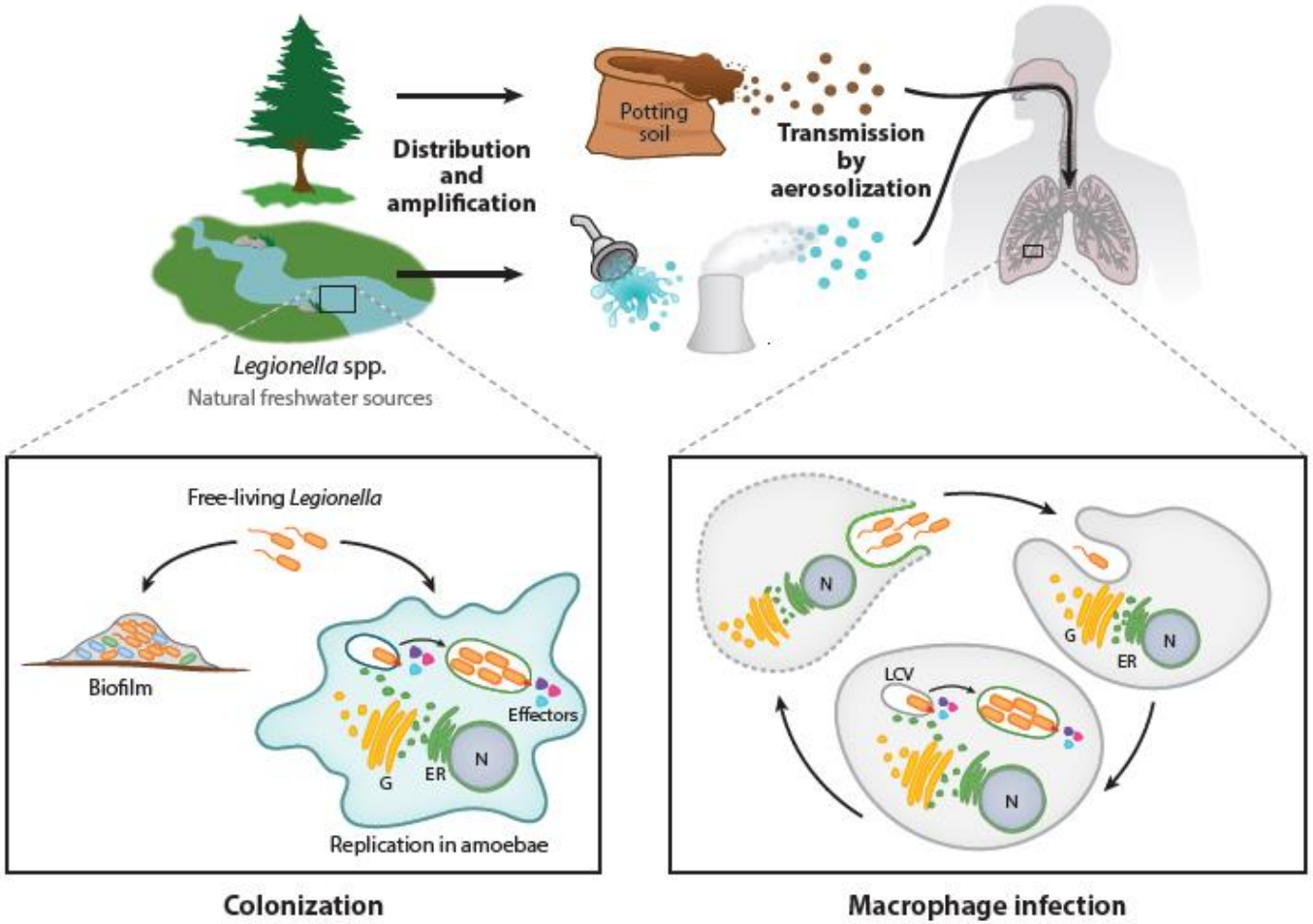
Bactérie intra-cellulaire

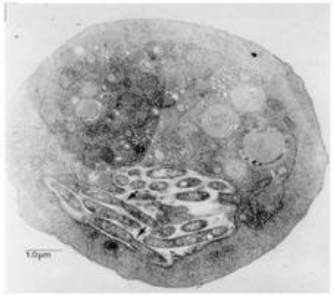
- Des **amibes** dans l'environnement :

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

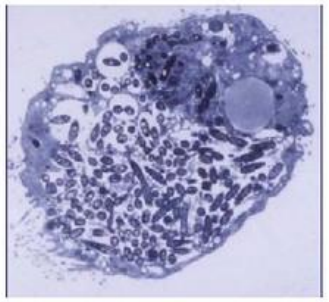
- Des **macrophages alvéolaires** chez l'homme

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





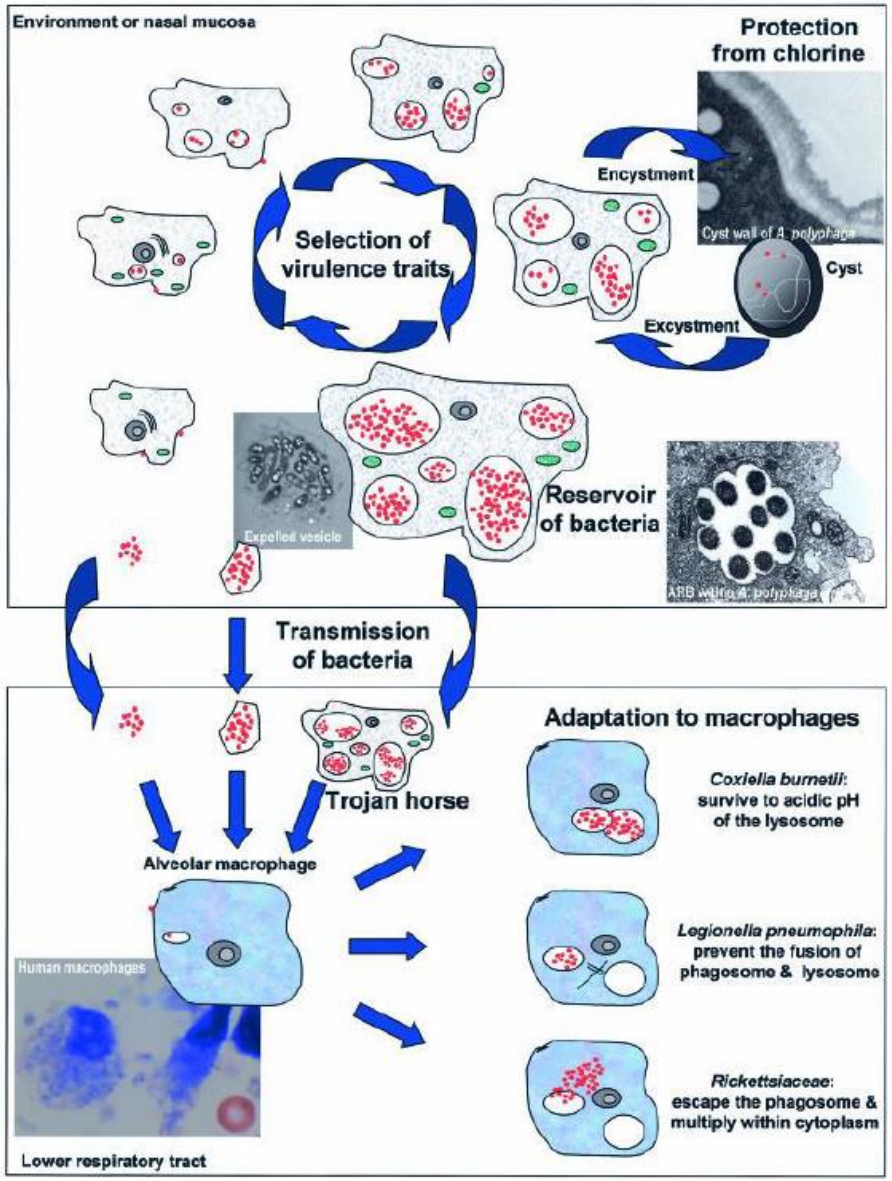
Dans une amibe



Dans un macrophage pulmonaire

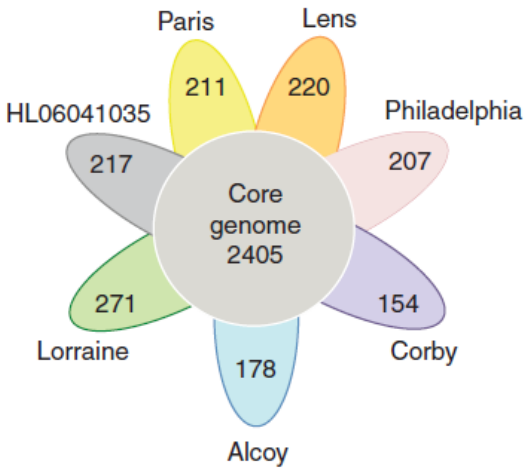
Contribution des amibes à la maladie

- 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	***Legionella pneumophila*** **Paris**	***Legionella pneumophila*** **Lens**	***Legionella pneumophila*** **Philadelphia-1**	***Rickettsia bellii***	***Wolbachia pipientis***	***Listeria monocytogenes***	***Francisella tularensis***	***Shigella flexneri***	***Salmonella*** Typhimurium	***Coxiella burnetii***
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

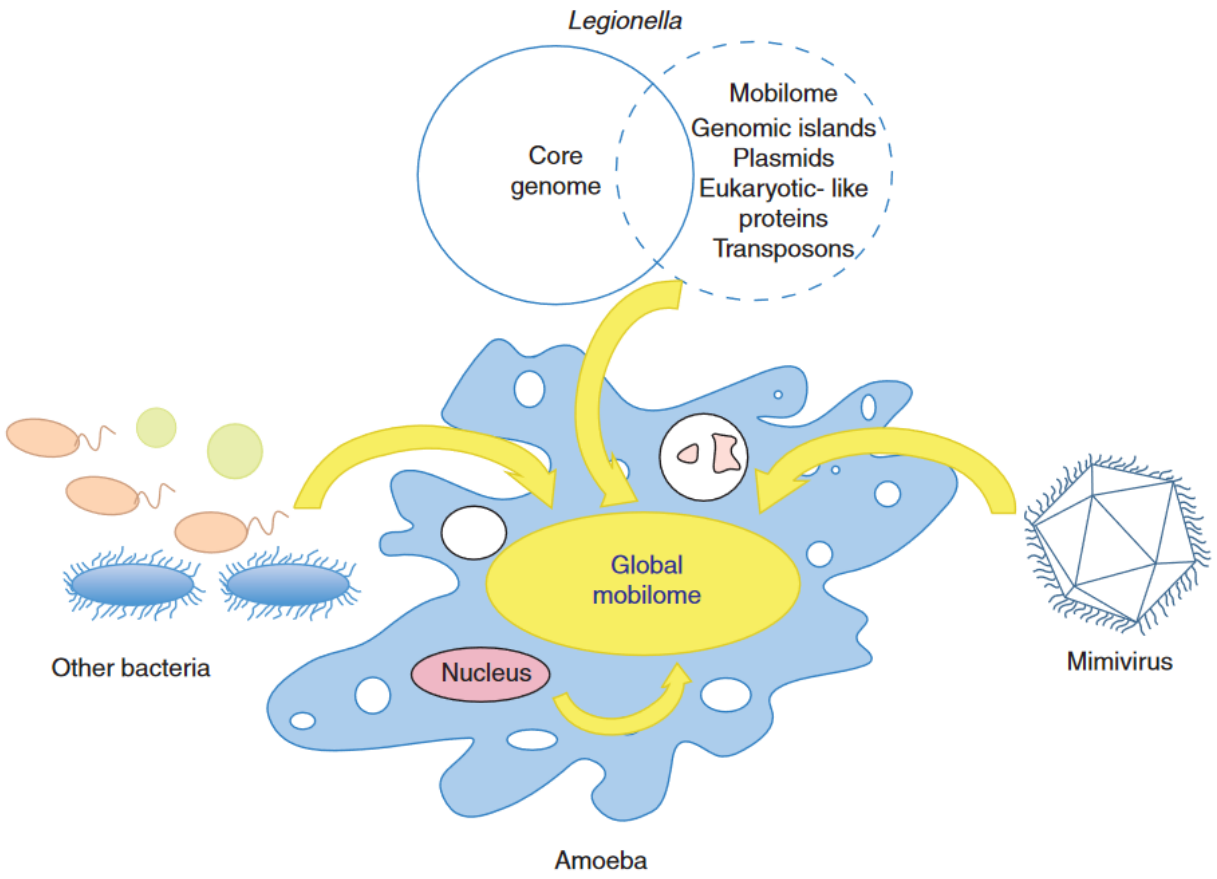
- <u>Mobilome de Legionella :</u>

  plasmides, IS, transposons, îlots de pathogénicité

- <u>Origine de ces gènes ?</u>

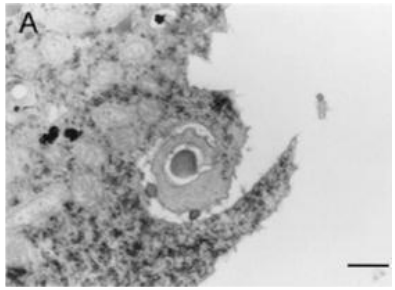
  ✓ Transfert horizontal de gènes à partir d'autres espèces et d'autres parasites intracellulaires

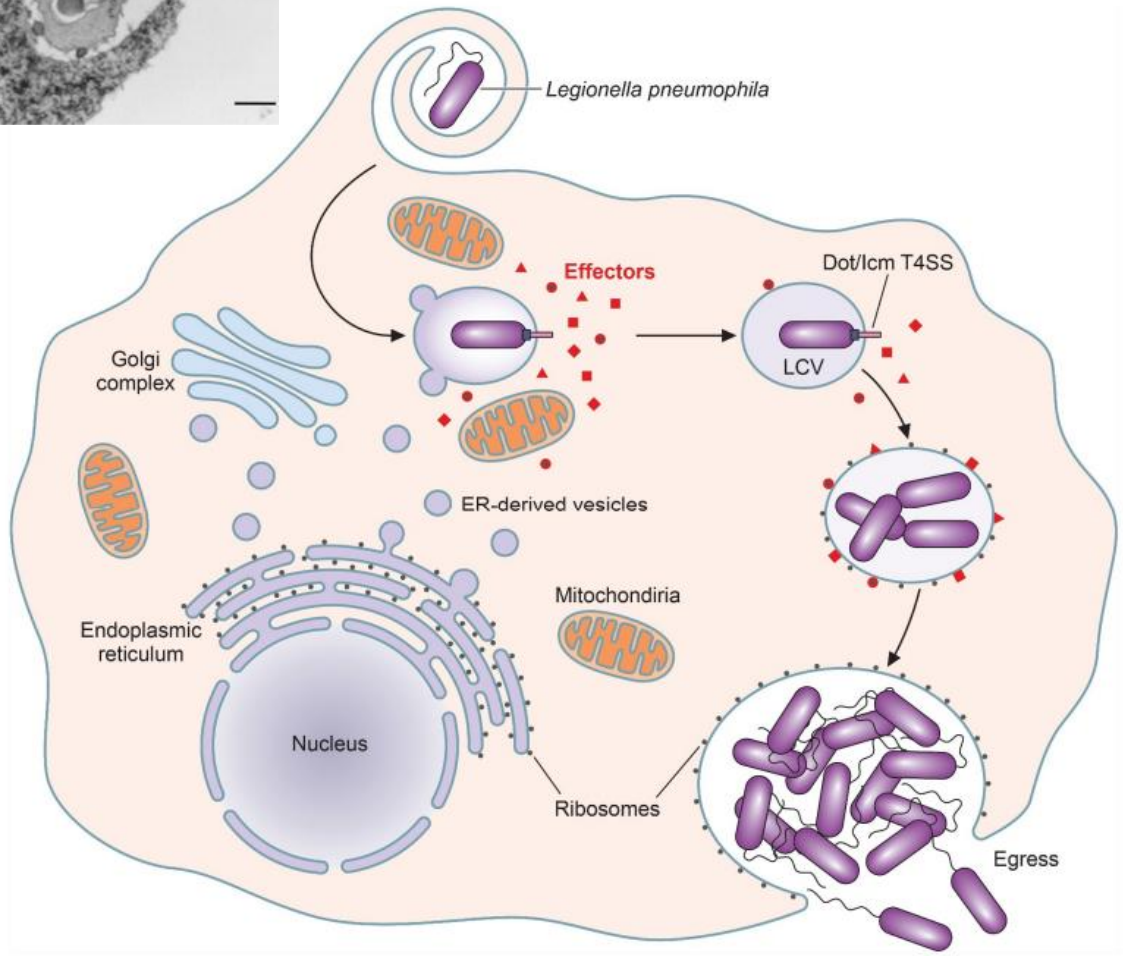
  ✓ Compétence naturelle de *L. pneumophila* qui pourrait être à l'origine de l'incorporation d'ARN eucaryotes dépourvus d'introns (reverse transcriptase chez *L. pneumophila*)



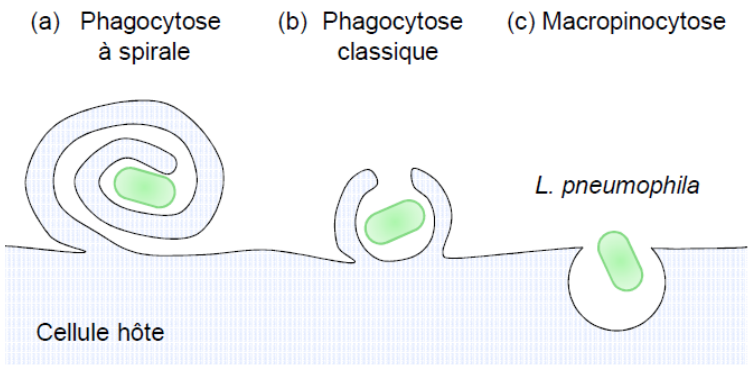
Gomez-Valero and Buchrieser, Cold Spring Harb Perspect Med, 2013

Internalisation par phagocytose ou macropinocytose





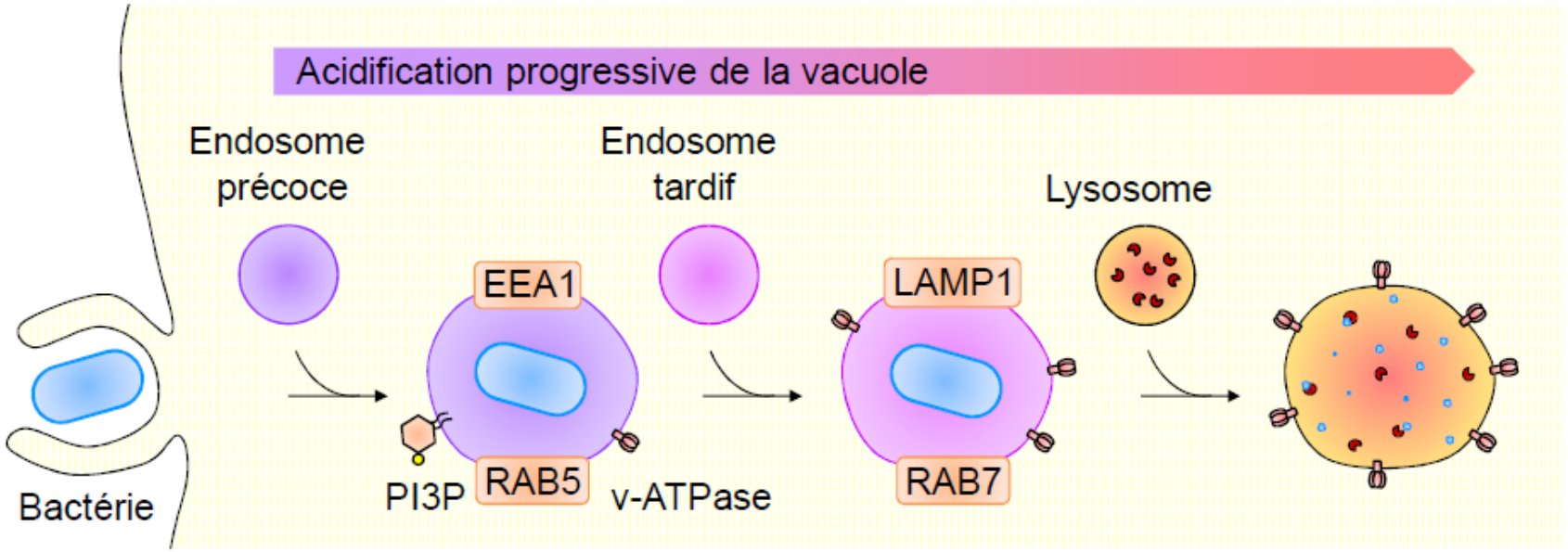
Chauhan and Shames. Virulence 2021



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



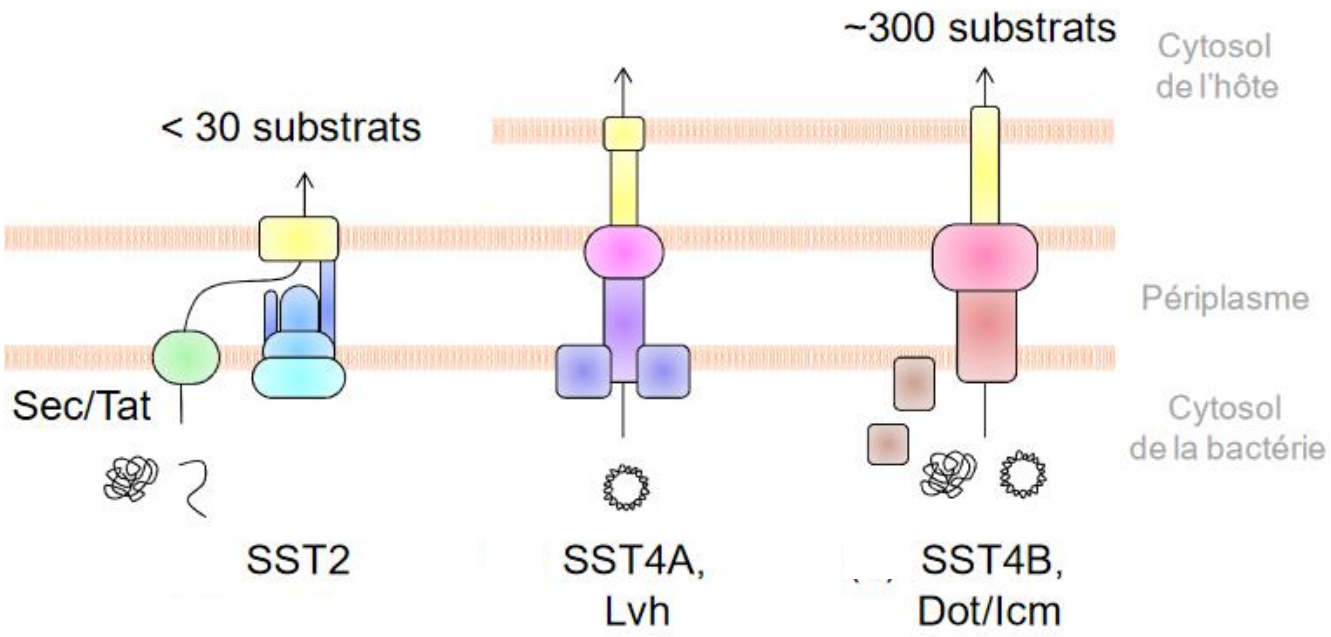
- Fusion phagosomes et endosomes/lysosomes
- Lyse bactérienne dans l'**autolysosome** par acidification médiée par des V-ATPases et accumulation d'hydrolases et autres enzymes de dégradation

Un large arsenal de facteurs de virulence

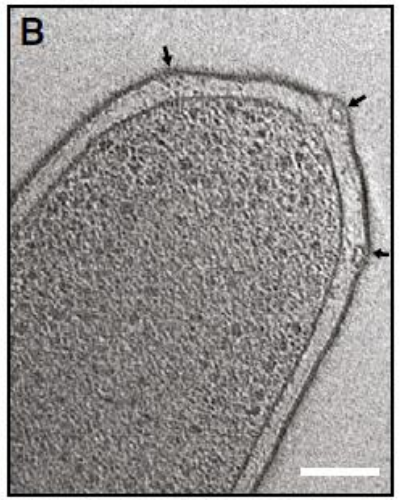
- **2 systèmes de sécrétion majeurs : T2SS et T4SS**

  ✓Translocation de protéines à l'extérieur de la bactérie

  ✓Protéines nécessaires à la réplication bactérienne et/ou à la pathogenèse

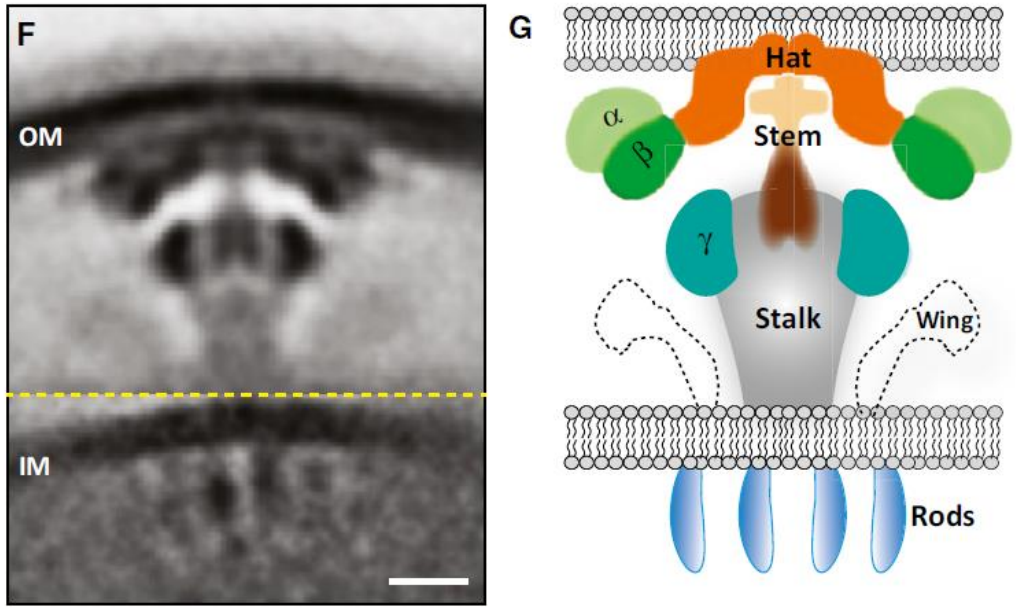


Un facteur de virulence essentiel : le système de sécrétion de type IV, Dot/icm

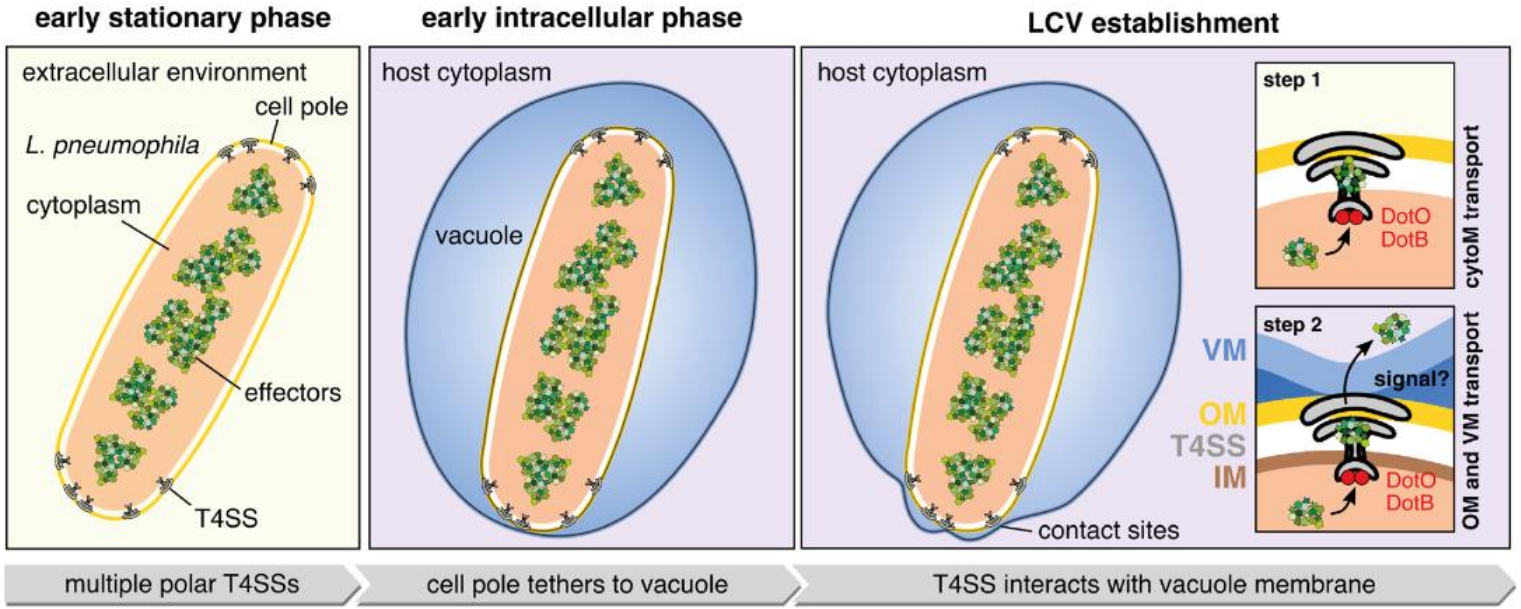


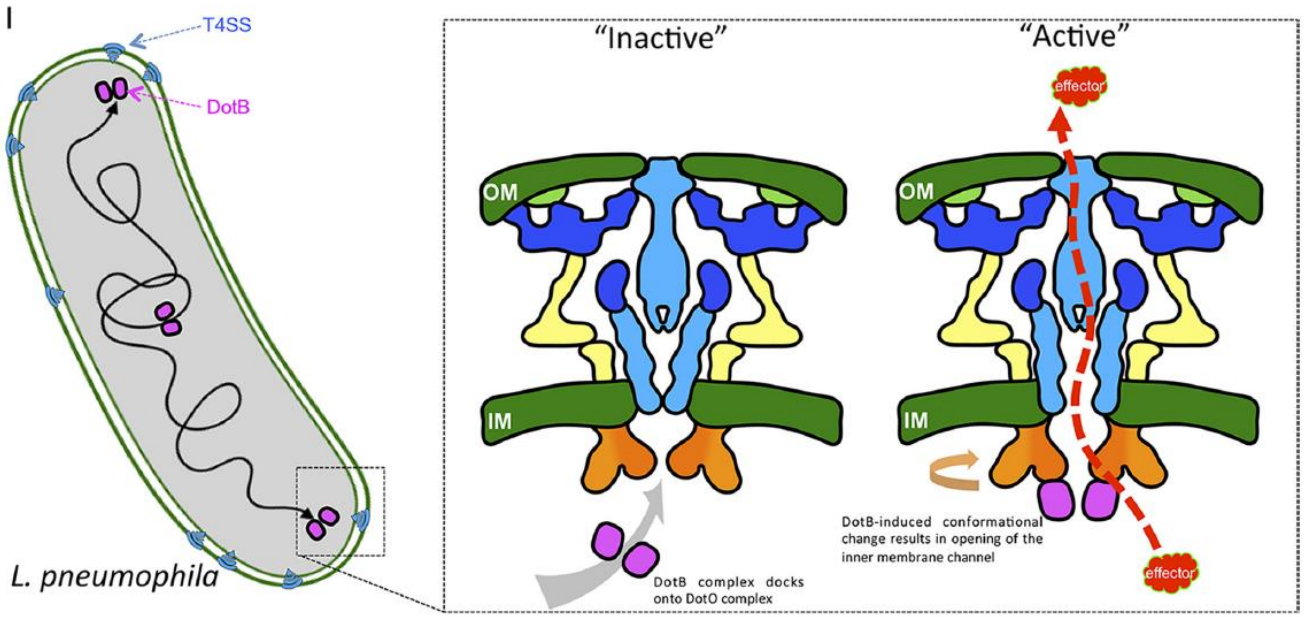
- **Commun** à toutes les espèces de Legionelles
  (defective for organelle trafficking / intracellular multiplication)
- 27 gènes *dot* et *icm* situés dans 2 régions distinctes du chromosome

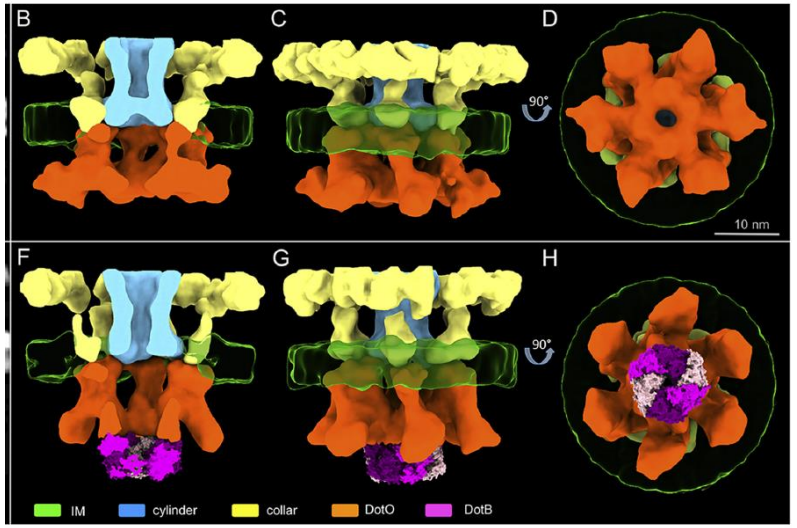
- Assure la biogénèse des LCV
- Essentiel pour la réplication intra-cellulaire
- Translocation de > 300 protéines effectrices directement dans le cytoplasme des cellules hôtes



Ghosal et al, EMBO reports, 2017

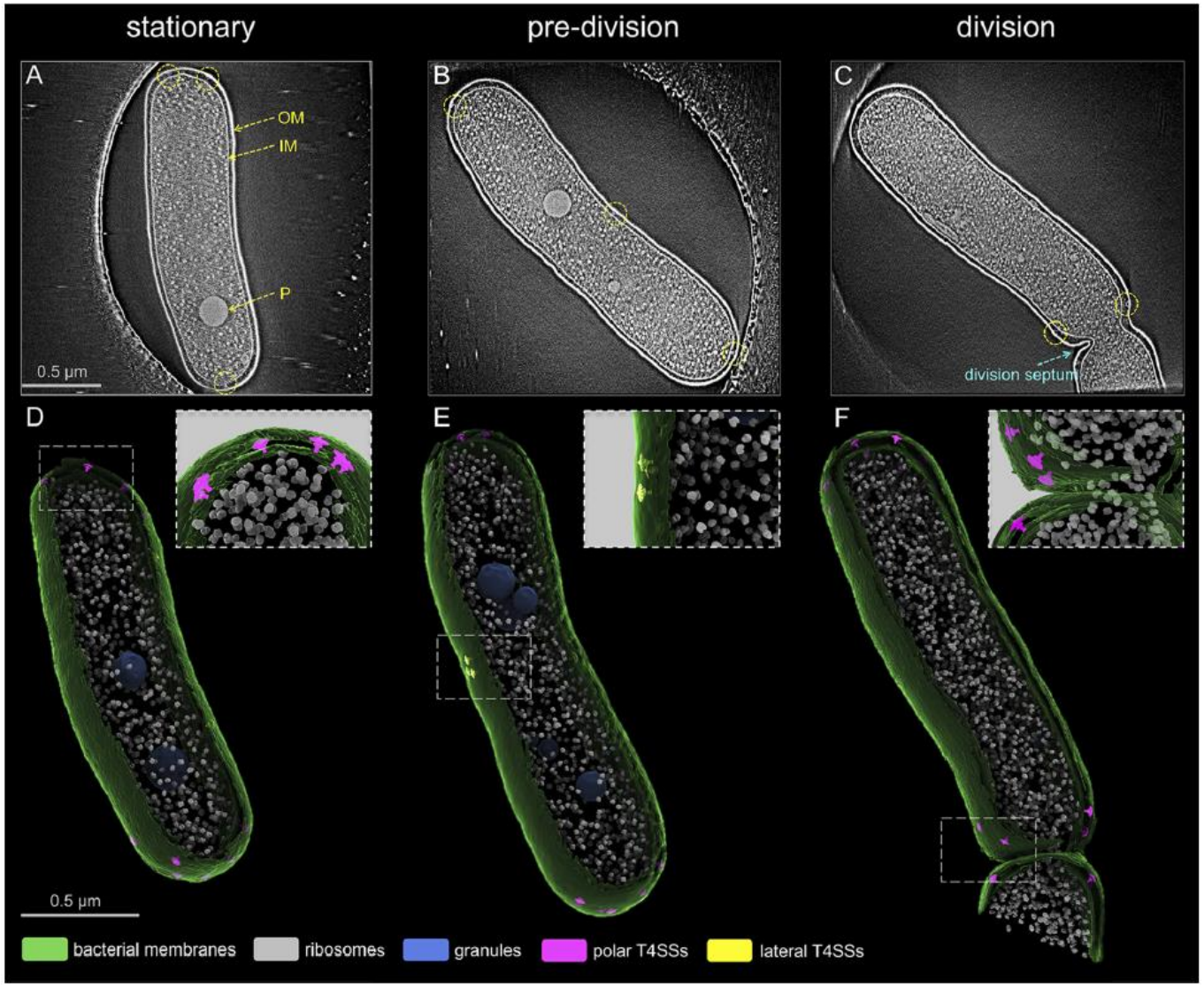






Bock et al, mBio 2021 ; Park et al, mBio 2020

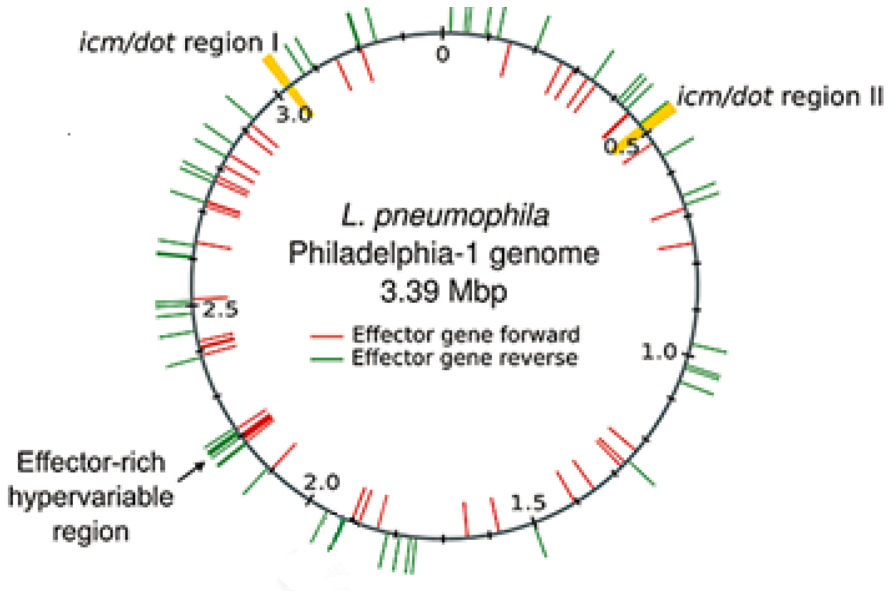
Visualisation par cryotomographie électronique de *L. pneumophila* en phase de division cellulaire



Park et al, mBio, 2020

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

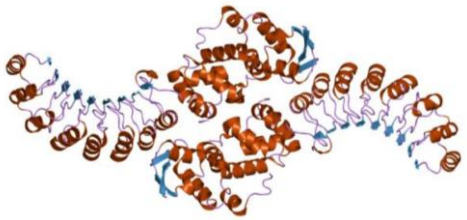
- Environ 300 effecteurs / souche
- 10 % des gènes de Legionella
- Répertoire d'effecteurs large et divers
- Environ 18000 effecteurs uniques recensés chez Legionella spp
- Redondance fonctionnelle majeure
- Paralogues spécifiques d'un hôte particulier ?
- Fonction encore inconnue pour la majorité d'entre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



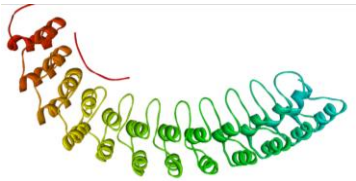
Franco et al, Cellular Microbiol, 2009

Caractéristiques spécifiques des effecteurs du système Dot/icm

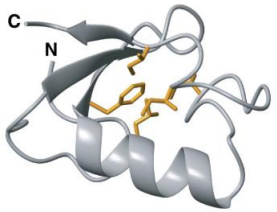
- **Protéines eucaryote-like** (GTPAses) ou à **domaine eucaryote-like** (U-box, F-box, répétitions d'ankyrine…)
- Mimétisme des fonctions cellulaires eucaryotes
- Manipulation de multiples voies de signalisation de l'hôte à l'avantage de Legionella :
  - Détournement du trafic vésiculaire intracellulaire
  - 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

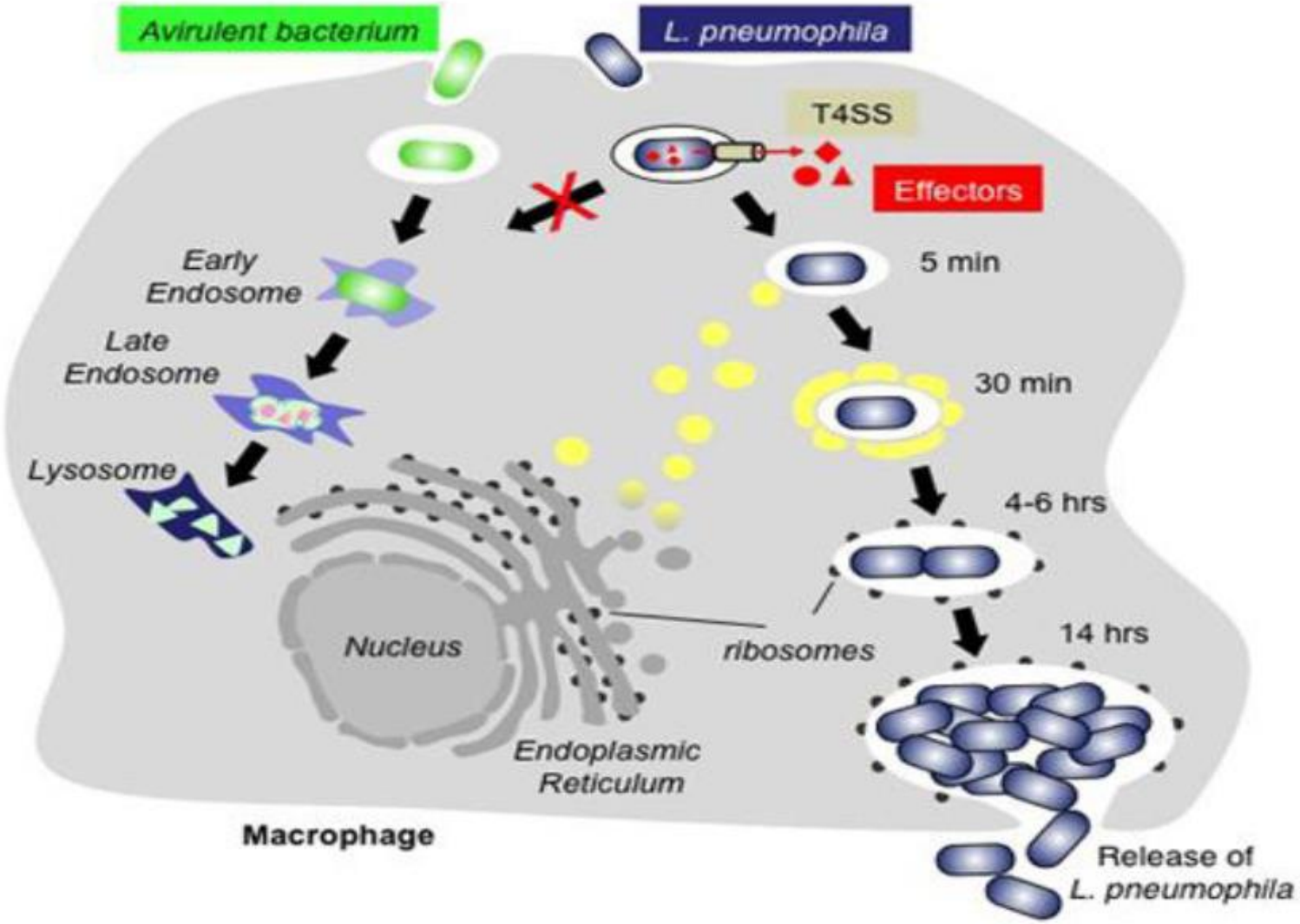


Domaine de répétitions ankyrine impliqué dans les interactions protéine-protéine



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

Modification de la maturation normale du phagosome



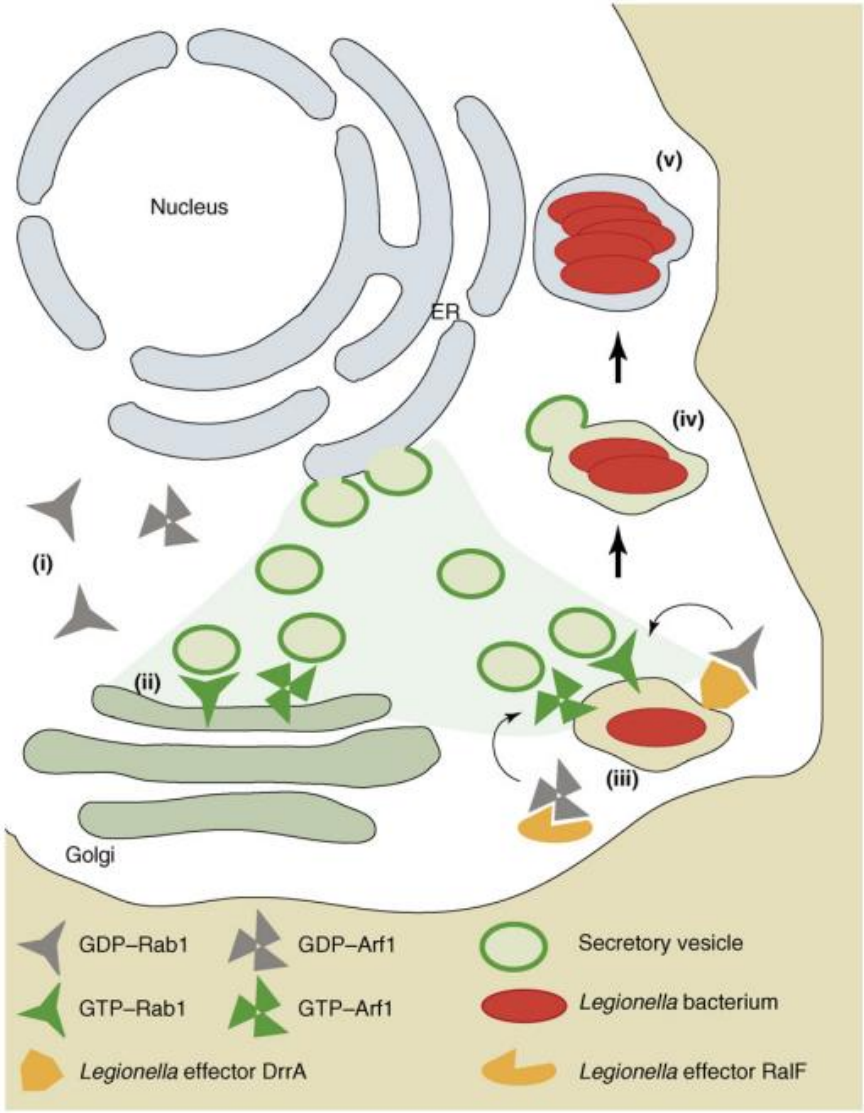
- Echappement à la fusion phagosome-lysosome
- Survie et réplication dans une vacuole dérivée du réticulum endoplasmique (LCV)

- 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

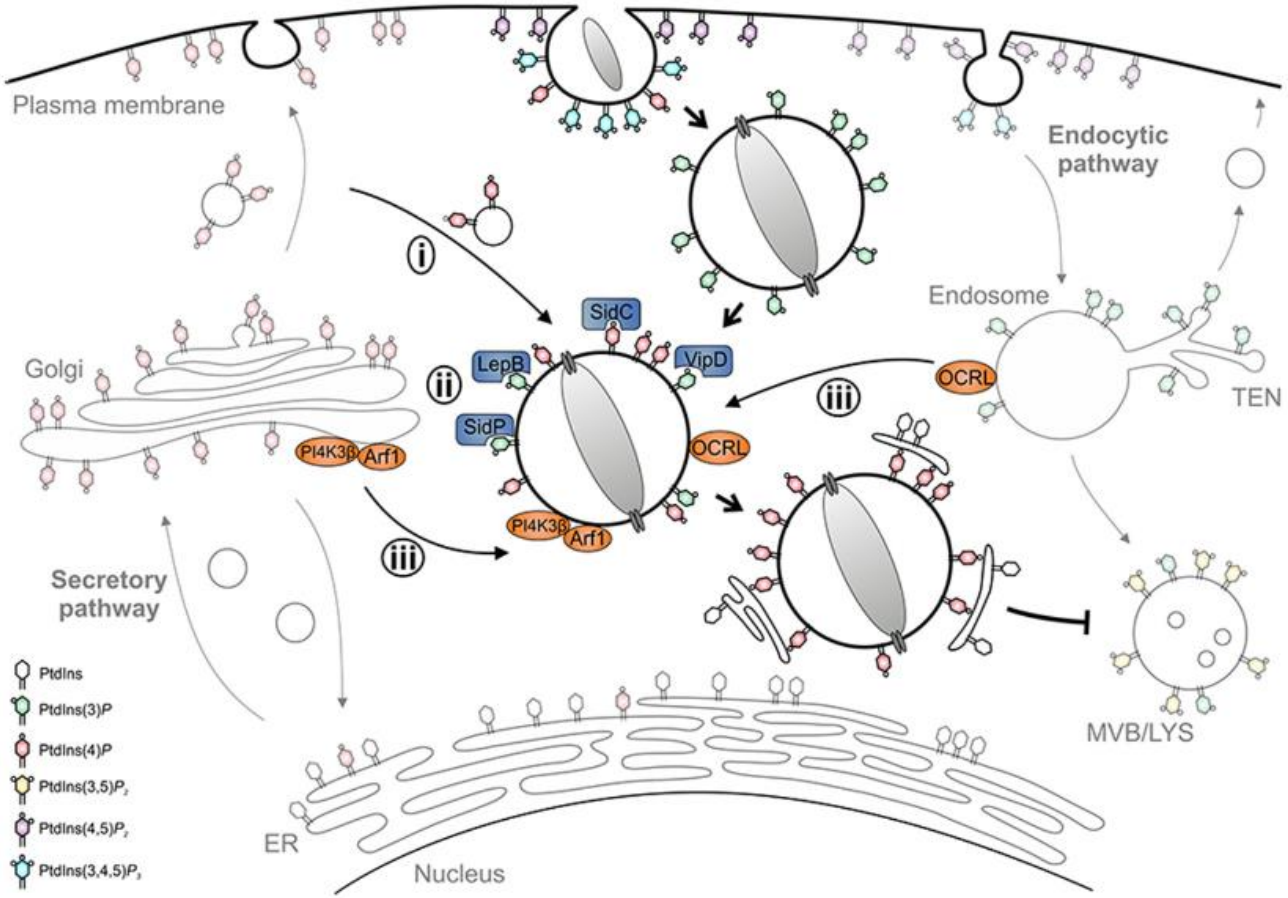
- Intervention de protéines eucaryote-like pour le remodelage de la LCV :
  - RalF
  - SidM (DrrA)
  - LidA
  - …

- 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



Ninio and Roy, Trends in Microbiology, 2007

Modulation de la composition lipidique de la LCV



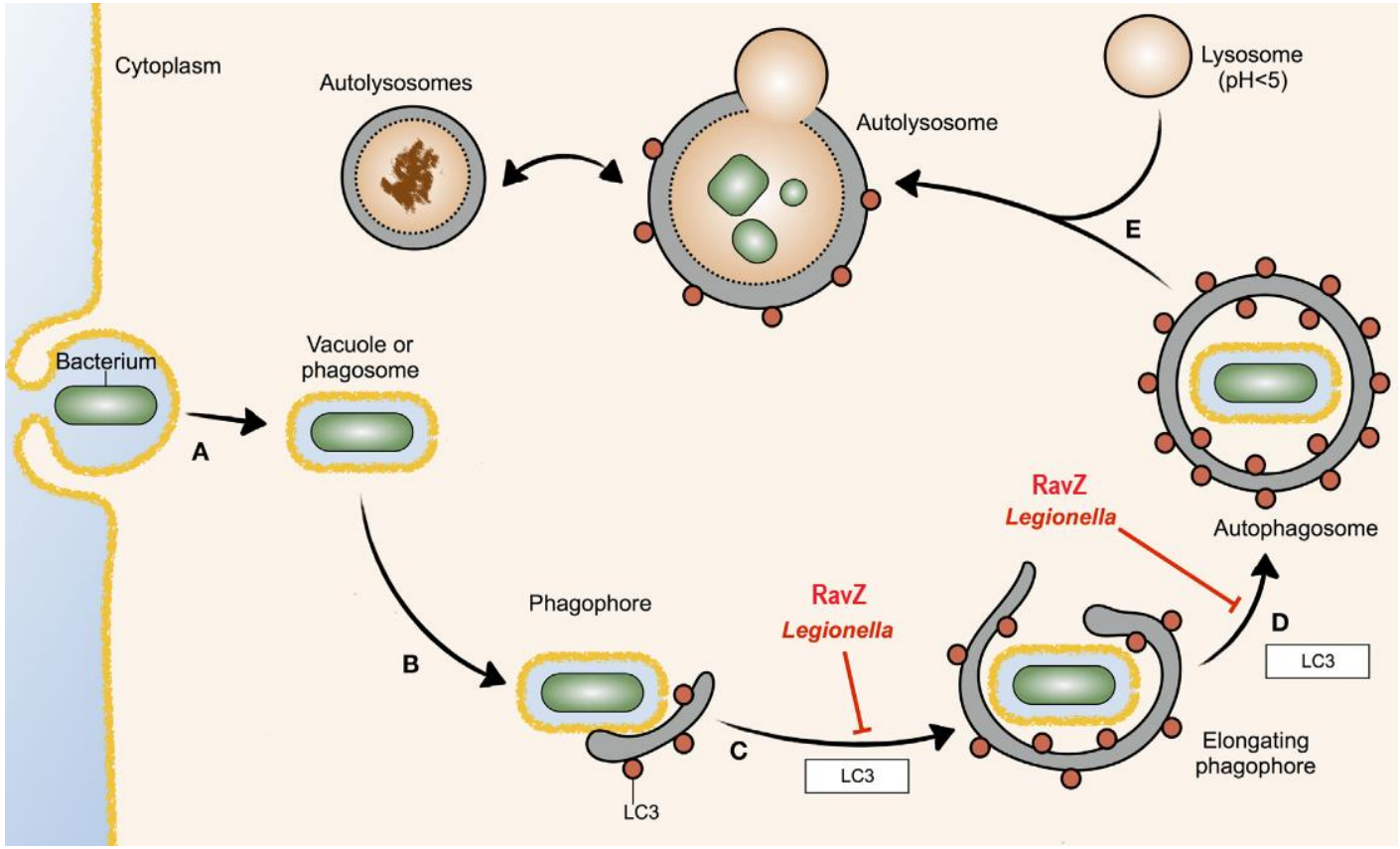
Swart and Hilbi, Front immunol, 2020

- Composition en phosphoinositides (PI) différente selon les compartiments cellulaires
- PI3P : marqueur lipidique des phagosomes et macropinosomes impliqué dans le commencement de la dégradation endocytique
- 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, *Lp*SPL, Lpg1137)

- Clivage par RavZ de la protéine LC3 associée aux membranes autophagosomales et nécessaire à la structuration et fermeture des autophagophores



Adapté de Escoll et al, Front immunol, 2016

Echappement à la voie d'endocytose classique

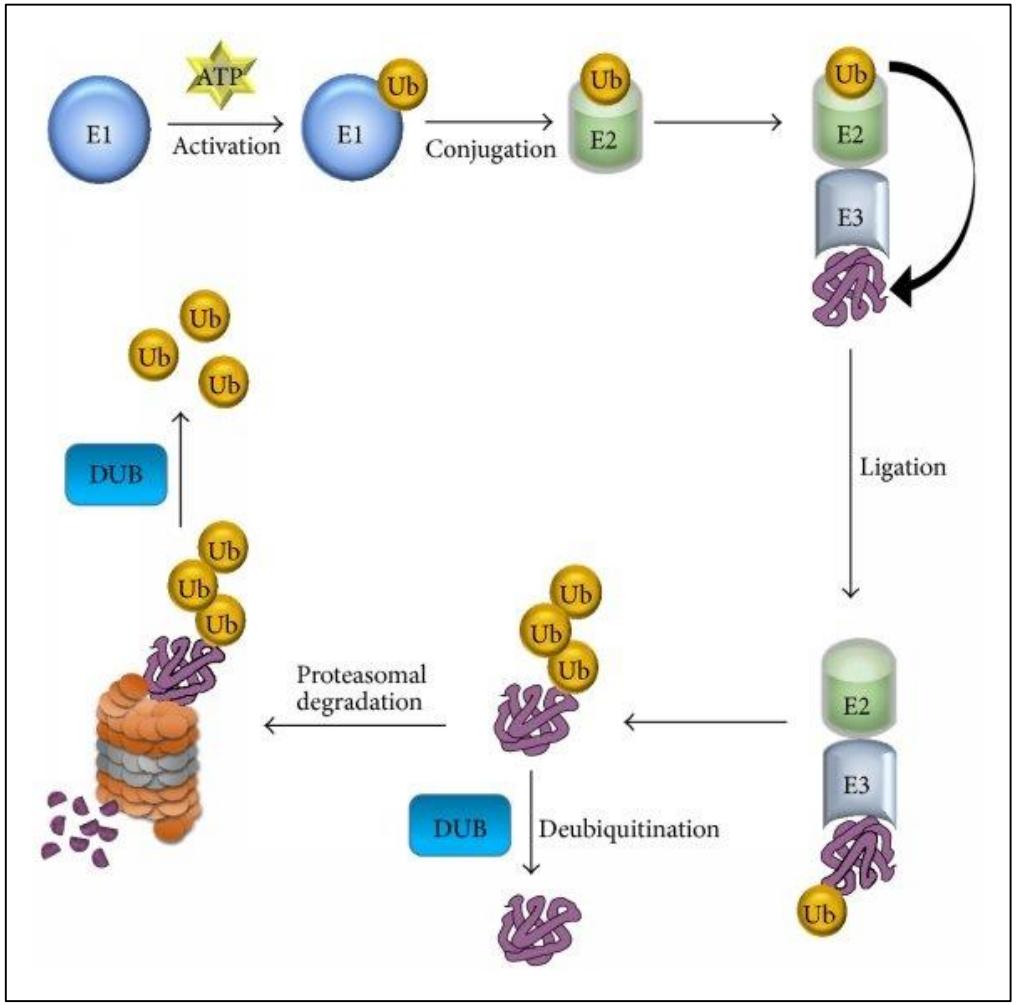
- Neutralisation du pH de la LCV par 2 effecteurs (SidK et WipB) au stades précoces de l'infection
- Blocage de v-ATPases (pompes à proton) de l'hôte (LAMP-1, Rab7)
- Acidification de la vacuole à un stade tardif de l'infection par acquisition de marqueurs endosomaux et lysosomaux

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

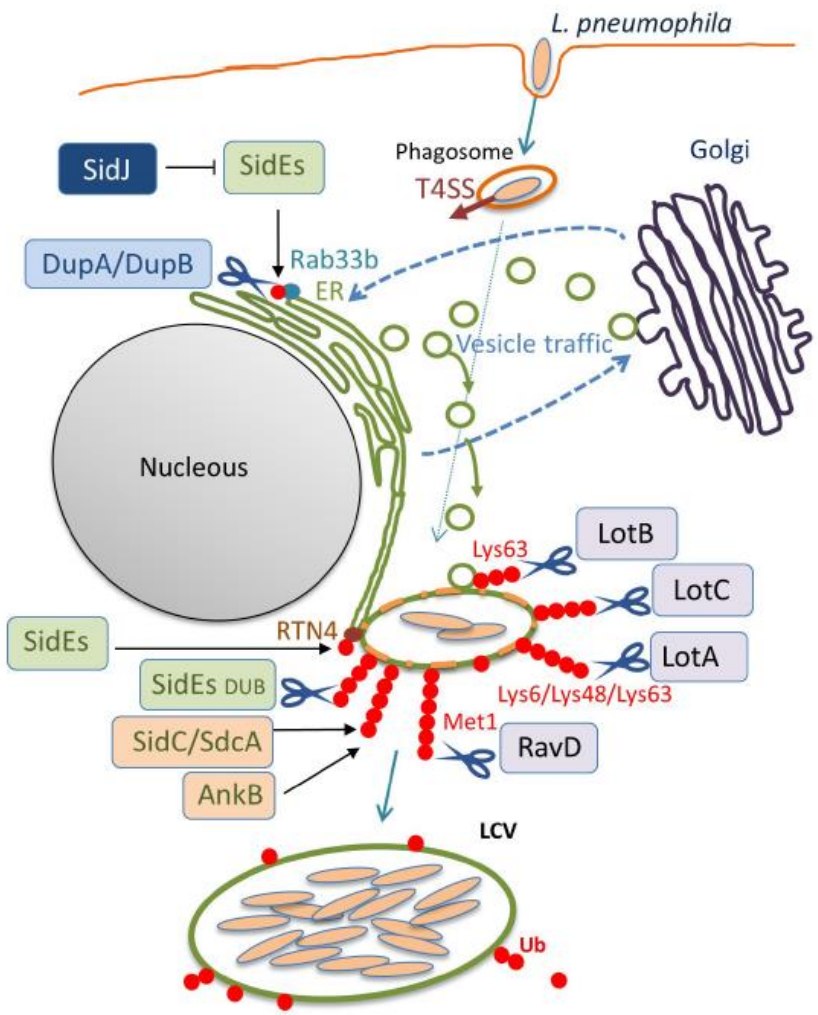
Interaction avec la machinerie d'ubiquitinylation de la cellule hôte

- 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 ubiquitinylé 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'ubiquitinylation de la cellule hôte



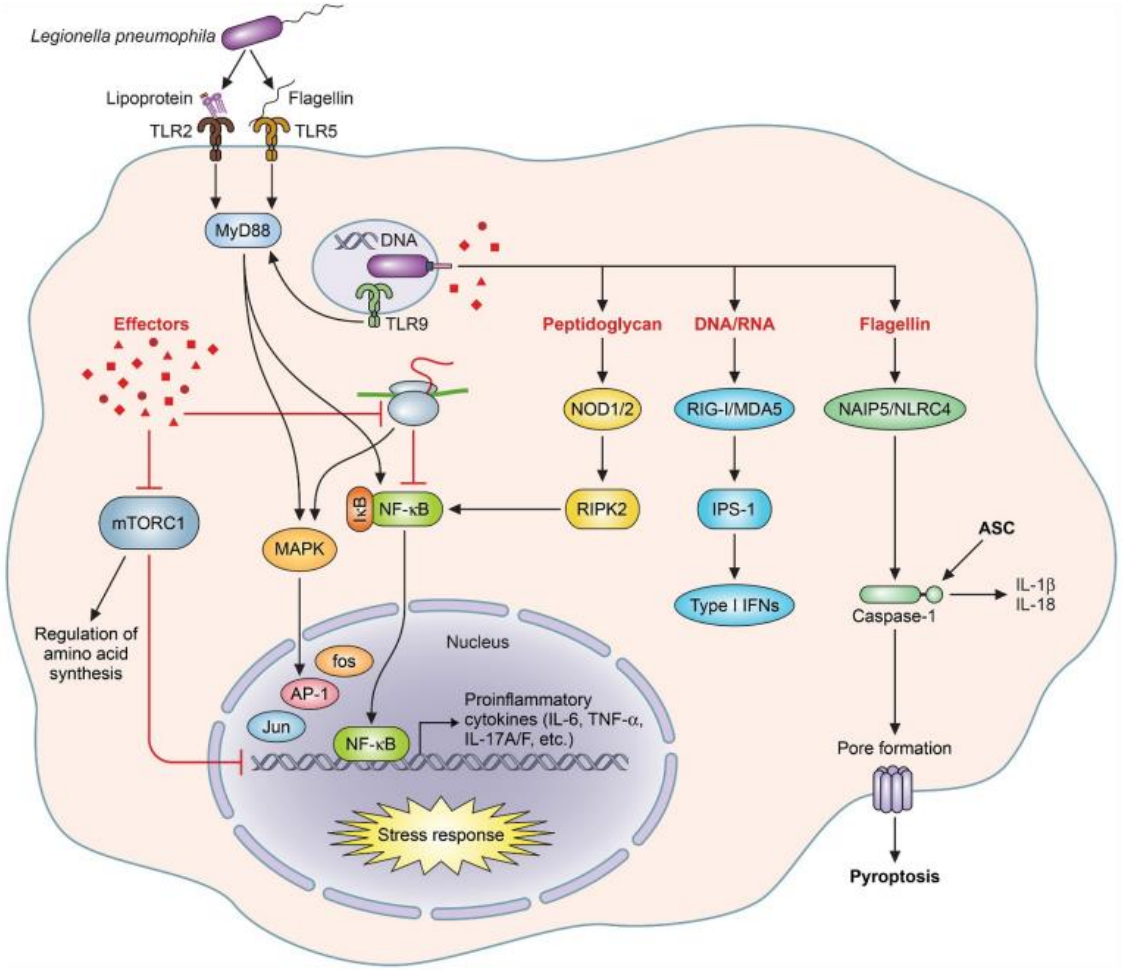
Kitao et al. Front Cell Infect Mi. 2020

- 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-1β, IL-12, IL-6
  - Recrutement de polynucléaires neutrophiles
  - Production d'IFN-γ par cellules NK
  - Activation des macrophages

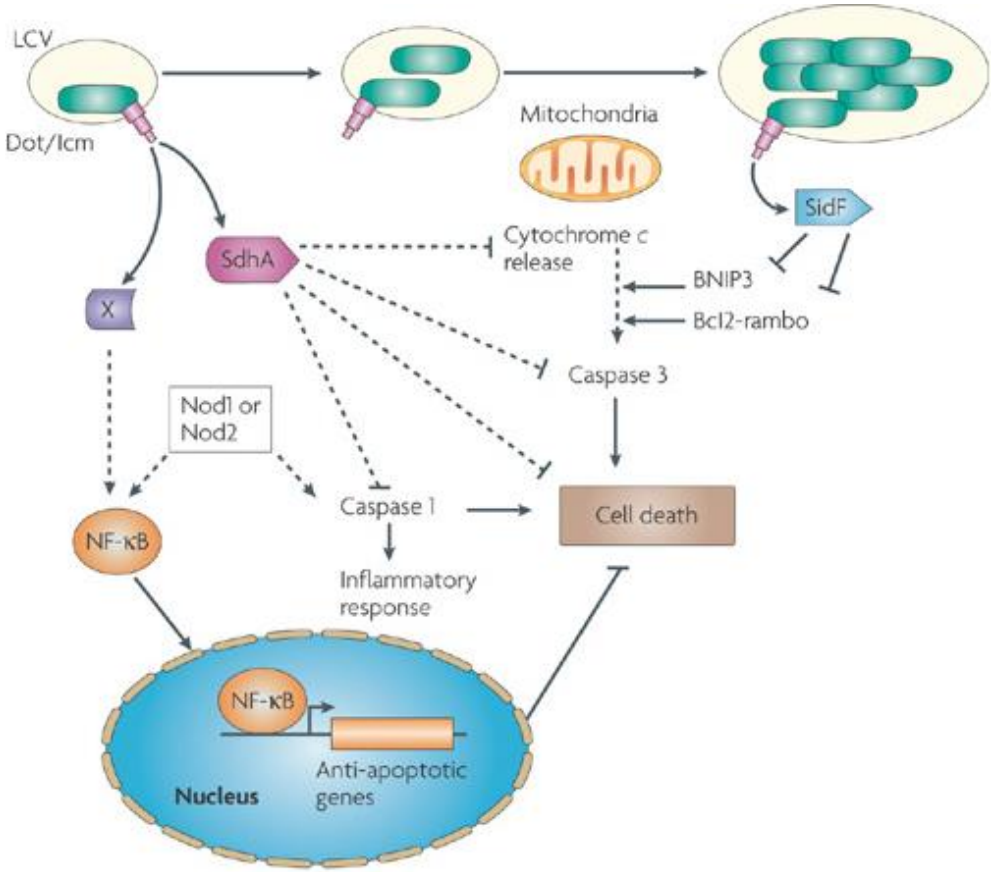
- Différentes protéines effectrices (LegK1, LnaB, MavC, Lgt, SidI, SidL…) impliquées dans la **régulation de la voie NF-κB**



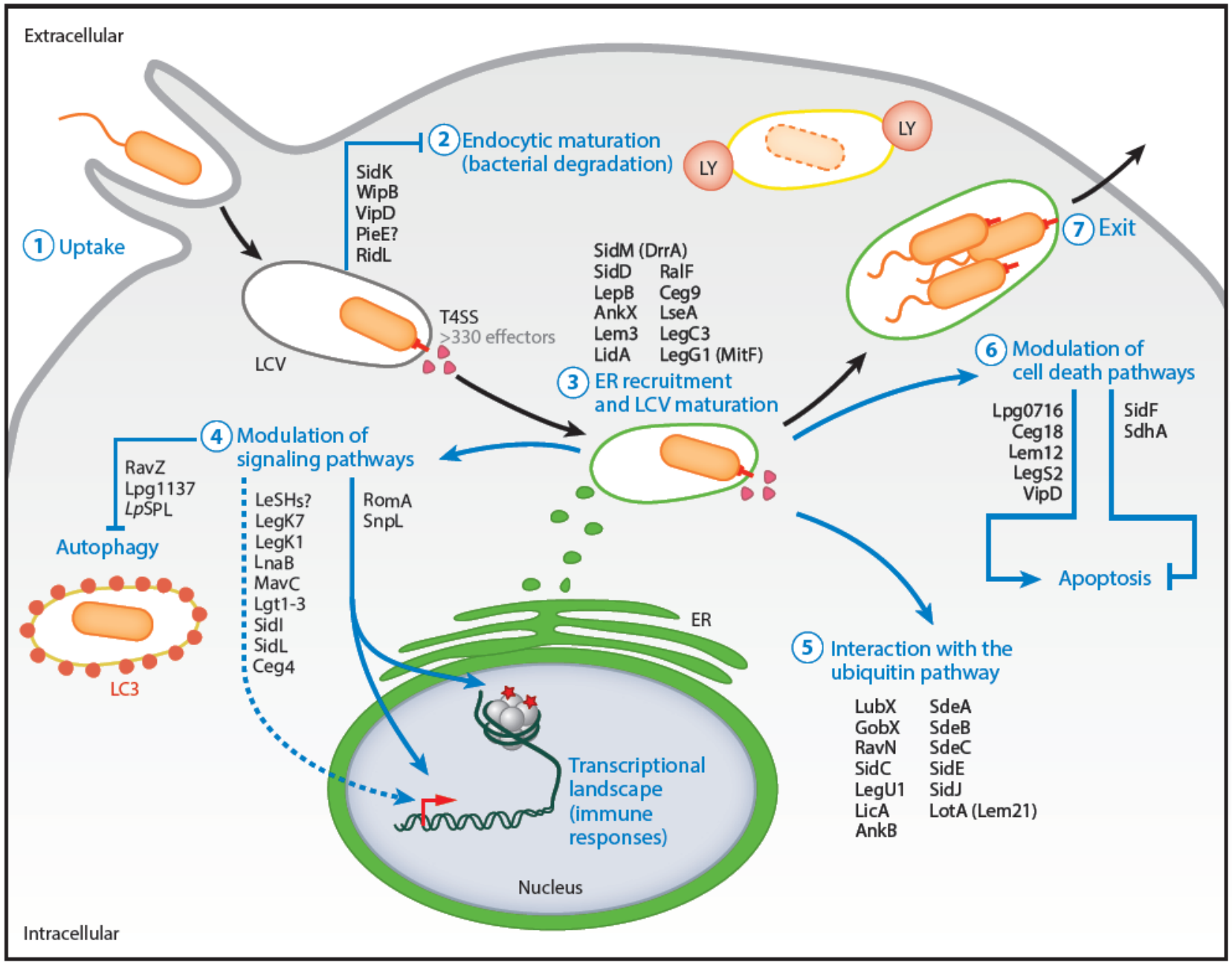
Chauhan and Shames. Virulence 2021

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-κB
  - inhibition de protéines pro-apoptotiques
  - …



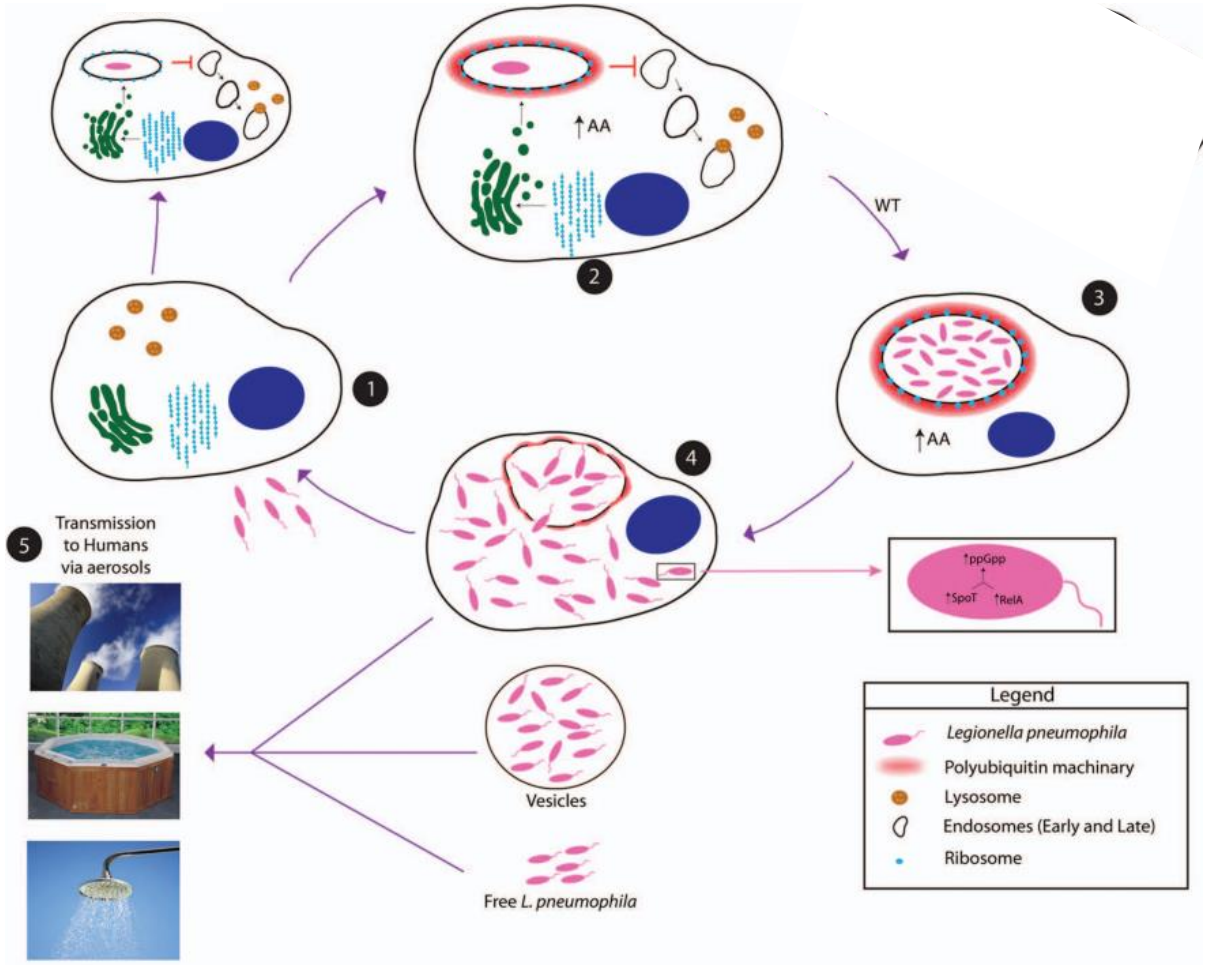
Isberg et al. Nat Rev Microbiol 2009



Mondino et al, Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis., 2020

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)

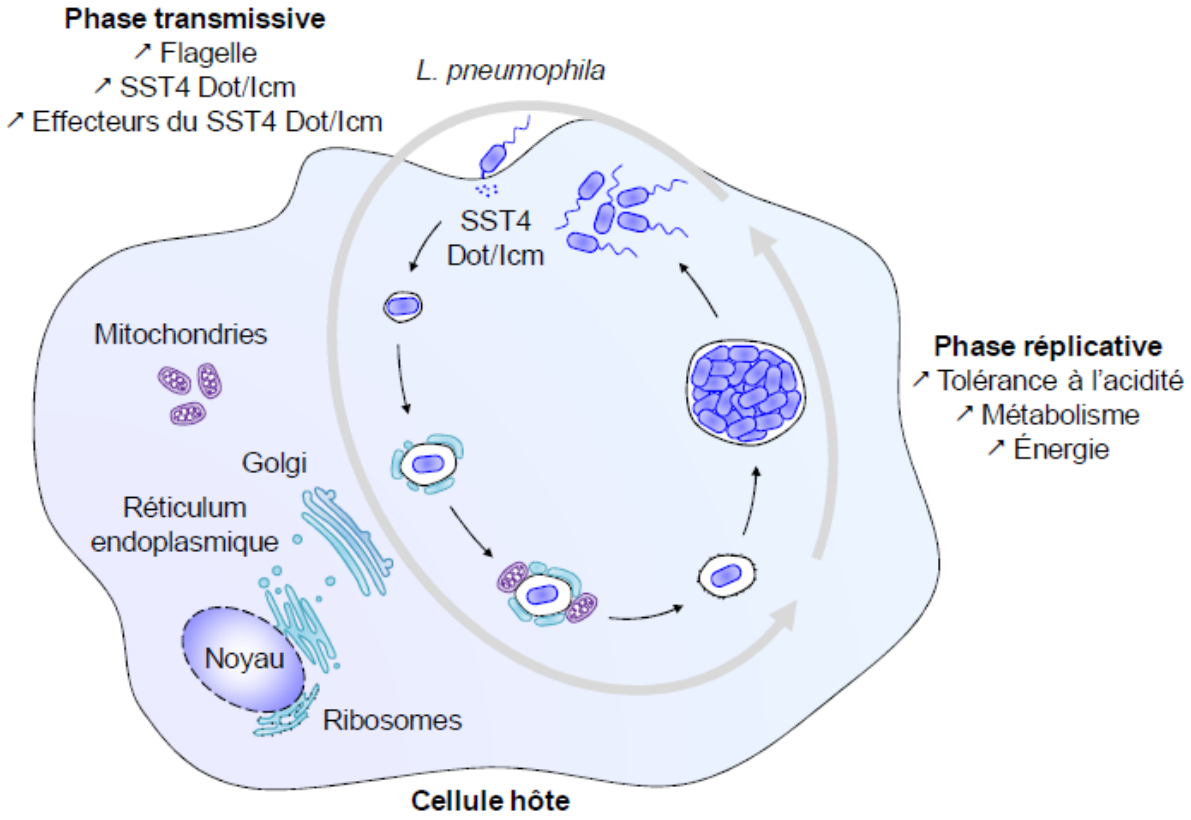


Richards et al, virulence, 2013

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 réplicative (avirulente) :**

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