THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 341
Evolution, Ecosystèmes, Microbiologie, Modélisation

Spécialité : Micro-organismes, interactions, infections

Soutenue publiquement le 16 Décembre 2016, par :
Marine VANDEWALLE-CAPO

Etude de la sensibilité aux antibiotiques et aux peptides antimicrobiens humains de *Legionella pneumophila*

Devant le jury composé de :

BERJEAUD Jean-Marc	Professeur à l'Université de Poitiers, rapporteur
GAIA Valeria	Docteur, Centre National de Référence des légionelles, Suisse, rapporteur
RIFFARD Serge	Professeur à l'Université de Saint-Etienne, rapporteur
MOLMERET Maëlle	Professeur à l'Université de Toulon, examinatrice
JARRAUD Sophie	Maitre de Conférences à l'Université de Lyon, directrice de thèse
GINEVRA Christophe	Docteur à l'Université de Lyon, co-encadrant de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Président de l'Université	**M. le Professeur Frédéric FLEURY**
Président du Conseil Académique	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Didier REVEL
Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe CHEVALIER
Vice-président de la Commission Recherche	M. Fabrice VALLÉE
Directrice Générale des Services	Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur G.RODE
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. X. PERROT
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. THEVENARD
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme C. FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. le Professeur J-C 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. le Professeur E.PERRIN
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

Résumé

Legionella pneumophila (*Lp*) est un pathogène accidentel de l'homme capable d'infecter les macrophages alvéolaires et les pneumocytes. Au cours de l'infection, *Legionella* se confronte à différents types d'agents antibactériens, dont les peptides antimicrobiens (PAMs) produit par l'hôte et les antibiotiques à activité intracellulaire administrés aux patients. Le mécanisme d'action des PAMs humains à l'encontre de *Legionella*, ainsi que le niveau de résistance aux antibiotiques de la bactérie sont à ce jour encore peu documentés. Mes travaux ont pour but de contribuer à une meilleure connaissance de l'activité anti-*Legionella* de ces molécules.

La première partie de cette étude a consisté à évaluer la sensibilité d'isolats cliniques de *Lp* sg 1 à 8 antibiotiques, afin de déterminer le seuil épidémiologique de sensibilité de la bactérie à ces différentes molécules. Nous avons démontré que l'ensemble des isolats cliniques sont sensibles aux antibiotiques testés. Les résultats ont révélé l'existence d'une sous-population présentant une sensibilité réduite aux macrolides. L'analyse des génomes a permis de corréler cette sensibilité diminuée à la présence de la pompe à efflux LpeAB spécifique des macrolides. Cette pompe est présente uniquement dans trois complexes clonaux centrés sur le ST1, le ST701 et le ST1335.

La seconde partie de cette étude a été consacrée à la caractérisation de l'activité antibactérienne des PAMs humains LL-37 et HBD-3, ainsi qu'à l'identification de leur(s) mécanisme(s) d'action contre *Legionella*. L'ensemble des tests réalisés montre que LL-37 et HBD-3 induisent une perte de cultivabilité des légionelles par des modes d'action différents. Les résultats suggèrent que LL-37 et HBD-3 agissent par perméabilisation des membranes de *L. pneumophila*. Nos résultats ont également montré que les deux peptides exercent une activité inhibitrice sur la réplication intracellulaire des légionelles, au moins en partie grâce à une collaboration avec la cellule hôte.

Mots clés : *Legionella pneumophila*, antibiotiques, sensibilité, ST1, LpeAB, peptides antimicrobiens humains, LL-37, HBD-3, mécanisme d'action.

Laboratoire : Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI)
Inserm U1111 – CNRS UMR5308 – ENS Lyon – UCB Lyon 1
Equipe « Pathogénèse des légionelles », Faculté de Médecine Lyon-Est
7 rue Guillaume Paradin, 69372 LYON, France

Abstract

Legionella pneumophila (*Lp*) is an accidental human pathogen which can infect alveolar macrophages and pneumocytes. During infection, *Legionella* have to deal with to various types of antibacterial agents, such as antimicrobial peptides (AMPs) produced by the host, and antibiotics with intracellular activity administered to patients. The mechanism of action of human AMPs against *Legionella*, and the resistance level to antibiotics of the bacterium are still poorly described. Our work aimed to contribute to a better understanding of the anti-*Legionella* activity of these molecules.

The first part of this study consisted in the evaluation of the susceptibility of clinical *Lp* sg1 isolates to 8 antibiotics, to determine the epidemiological cut-off values of these different molecules. We demonstrated that all clinical isolates are susceptible to the tested antibiotics. The results revealed the presence of a subpopulation displaying a reduced susceptibility to macrolides. The analysis of the genomes allowed us to correlate this reduced susceptibility to le presence of the LpeAB macrolides efflux pump, found specifically in the sequence types ST1, ST701 and ST1335.

The second part of this study was dedicated to the characterization of the antibacterial activity of the human AMPs LL-37 and HBD-3, and to the identification of their mechanism(s) of action against *Legionella*. All of the experiments show that LL-37 and HBD-3 induce a loss of cultivability by different mode of action. The results suggest that LL-37 and HBD-3 are able to permeabilize the membrane of the *L. pneumophila* cells. Our findings also show that both peptides inhibit the intracellular replication of *L. pneumophila*, in part through collaboration with the host cell.

Keywords: *Legionella pneumophila*, antibiotics, susceptibility, ST1, LpeAB, human antimicrobial peptides, LL-37, HBD-3, mechanism of action.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur Jean-Marc Berjeaud, Madame Valeria Gaia et Monsieur Serge Riffard de m'avoir fait l'honneur de d'évaluer ce travail et d'en être les rapporteurs. Mes remerciements vont également à Madame Maëlle Molmeret pour avoir accepté de faire partie de ce jury, et pour les conseils qu'elle m'a prodigué lors des réunions annuelles du Comité de Suivie de Thèse.

Je voudrais sincèrement remercier ma directrice de thèse, Sophie Jarraud, pour la confiance qu'elle m'a accordée depuis mon Master 2 et pour le temps qu'elle a consacré à ce travail malgré un emploi du temps surchargé. Un grand merci pour sa bienveillance, son enthousiasme et son soutien dans les bons comme dans les mauvais moments.

Mes plus sincères remerciements vont également à mon encadrant, Christophe Ginevra, pour son soutien et son aide pendant la réalisation de ce travail. Merci à lui pour ses précieux conseils techniques et scientifiques, ainsi que pour sa disponibilité, quoi qu'il en dise. Enfin, je tiens à le remercier d'avoir cru en mes capacités et d'avoir su dissiper mon pessimisme face à la mauvaise volonté des macrophages, qui au passage a bien failli me rendre folle…

Je souhaite remercier toute l'équipe « Pathogenèse des légionelles » : Patricia, Anne, Christophe, Annelise, Elisabeth, Nathalie, Claire, Ghislaine, Clémence, Pierre, Julie et Anne-Gaëlle… pour leur accueil et leur aide lors de mes rares passages au site de la Doua ou au Centre de Biologie et de Pathologie Est. J'adresse un merci tout particulier à Céline et à Virginie pour leurs conseils pratiques à la paillasse et pour leur gentillesse à mon égard. Merci aux membres de l'équipe des « compétents » pour leurs conseils lors des réunions d'équipe.

Je suis également très reconnaissante à l'équipe « Pathogénie des staphylocoques » de Laënnec (comme quoi les staph et les légio peuvent cohabiter !). Je remercie François Vandenesch pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Merci aussi à Gérard Lina, pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail lors des réunions du Comité de Suivie de ma thèse. Un immense merci à Jessica, Cédric, Florence, Sabine, Karen, Pauline, Guillaume… pour leur gentillesse et les nombreux fous rires. Ca donnerait presque envie de passer du côté obscur et d'intégrer l'équipe des « Staph » ;) Je n'oublie évidemment pas Katia. Je la remercie chaleureusement pour sa bonne humeur à toute épreuve, son imagination débordante (« miaou ») et pour son rire qui emplit le labo quotidiennement.

Je voudrais aussi remercier le personnel du CIQLE, notamment Annabelle Bouchardon, Elizabeth Errazuriz et Denis Ressnikoff, pour leur assistance et leur patience lors de ces nombreuses heures passées en microscopie.

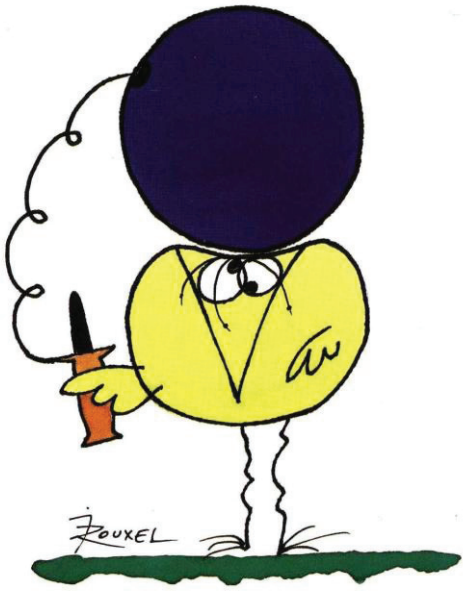
Mille mercis à toute ma famille, avec cette question récurrente « alors, comment ça avance cette thèse ? ». Je tiens à exprimer ma plus profonde gratitude à mes parents sans qui je ne serai pas qui je suis aujourd'hui, et à qui je dois tellement de choses. Je les remercie pour leur amour et leur soutien sans faille. Un grand merci également à mes grands-parents, et notamment à mon Grand-père qui s'inquiétaient régulièrement de savoir si mes « petites bêtes » travaillaient bien. Merci à mes frères, Thomas pour son soutien moral et pour avoir écouté sa grande sœur se plaindre au téléphone, et Ethan pour m'avoir assisté pendant la rédaction de ma thèse en m'éventant durant la canicule (tu vois j'ai tenu ma promesse). Merci également à ma sœur Ilona, stagiaire assidue, qui a bien failli écrire la discussion de ma thèse à ma place !

Je remercie également tous les amis qui m'ont soutenue durant ces trois années de thèse, notamment Antoine, Thomas, Laura, Jennifer, Pierre… qui m'ont permis de me changer les idées. Un grand merci à Juliette, mon amie de toujours, pour la petite virée barcelonaise qu'elle a organisée pour moi à l'occasion de mon EVJF.

Enfin, je terminerai ces remerciements par celui qui m'a épaulée, soutenue et encouragée de façon inconditionnelle ces huit (et surtout ces trois) dernières années : mon mari Eric. Il est ma source de bonheur et de motivation, et ma force dans les moments de doutes et d'inquiétude. Je ne saurais dire à quel point je l'aime…

Encore merci à toutes et à tous.

Les devises Shadok



EN ESSAYANT CONTINUELLEMENT
ON FINIT PAR RÉUSSIR. DONC:
PLUS ÇA RATE, PLUS ON A
DE CHANCES QUE ÇA MARCHE.

Sommaire

Liste des figures **17**
Liste des tableaux **21**
Liste des abréviations **23**
Introduction générale **29**
Etude bibliographique **30**
I. Legionella pneumophila 30
I.1 L'agent pathogène de la légionellose 30
I.1.1 Taxonomie 30
I.1.2 Morphologie 30
I.1.3 Habitat 31
I.1.4 Caractéristiques génomiques 32
I.1.5 Caractéristiques de l'enveloppe de *L. pneumophila* 33
I.2 La légionellose 36
I.2.1 Mode de transmission 36
I.2.2 Pathologies associées à *Legionella* 37
I.2.3 Diagnostic 38
I.2.4 Epidémiologie 40
I.2.5 Traitement et résistance aux antibiotiques 42
I.3 Cycle de vie intracellulaire 46
I.3.1 Le système de sécrétion Dot/Icm et les effecteurs bactériens 47
I.3.2 Entrée dans la cellules-hôte 54
I.3.3 Biogénèse d'une vacuole de réplication 57
I.3.4 Sortie de la cellule-hôte 65
I.4 Transition entre la phase réplicative et la phase transmissive 66
II. *Les peptides antimicrobiens* 67
II.1 Peptides antimicrobiens produits par les organismes supérieurs 67
II.1.1 Peptides linéaires en hélice alpha 67
II.1.2 Peptides linéaires riches en un acide aminé particulier 68
II.1.3 Peptides riches en cystéines à un ou plusieurs ponts disulfures 68
II.1.4 Peptides dérivés de protéines 69
II.1.5 Peptides anioniques 69
II.2 Peptides antimicrobiens produits par les bactéries 69
II.3 Facteurs déterminants de l'activité des PAMs 72
II.3.1 Facteurs bactériens 72
II.3.2 Facteurs peptidiques 75
II.4 Mécanismes d'action des PAMs cationiques 77
II.4.1 PAMs à activité antibactérienne 77
II.4.2 PAMs à activité antivirale 86
II.4.3 PAMs à activité antifongique 88
II.4.4 PAMs à activité antiparasitaire 88
II.5 Mécanismes de résistance aux PAMs 88
II.5.1 Modification de la surface bactérienne 89
II.5.2 Transporteurs membranaires 96
II.5.3 Inactivation des PAMs 98

II.5.4 Inhibition de l'expression des gènes de PAMs 99
II.6 Les peptides antimicrobiens humains 99
II.6.1 Les cathélicidines 99
II.6.2 Les défensines 103
II.6.3 Activités biologiques des PAMs humains 104
II.6.4 Effet de l'association des PAMs humains entre eux ou avec des antibiotiques 115
II.7 Peptides antimicrobiens et *Legionella* 118
II.7.1 PAMs à activité anti-*Legionella* 118
II.7.2 Mécanisme de résistance aux PAMs de *Legionella* 122
Objectifs 123
Matériel et Méthodes 125
I. *Cellules et conditions de culture* 125
I.1 Cellules procaryotes 125
I.1.1 *Legionella* spp 125
I.1.2 *E. coli* 126
I.1.3 Conservation des souches bactériennes 127
I.2 Cellules eucaryotes 127
I.2.1 Monocytes U937 127
I.2.2 Pneumocytes A549 127
II. *Construction des souches* L. pneumophila *Paris* Δrcp *et Lens* Δrcp 128
II.1 Extraction d'ADN génomique 128
II.2 Extraction d'ADN plasmidique 128
II.3 Digestion enzymatique de fragment d'ADN 128
II.4 Ligature de fragment d'ADN 128
II.5 Transformation d'*E. coli* 129
II.5.1 Préparation de bactéries chimiocompétentes 129
II.5.2 Transformation 129
II.6 Transformation de *L. pneumophila* 129
II.6.1 Préparation de bactéries électrocompétentes 129
II.6.2 Transformation 130
II.7 Inactivation du gène *rcp* chez *L. pneumophila* 130
III. *Evaluation de l'activité des PAMs humains contre* L. pneumophila *en milieu extracellulaire* 134
III.1 Peptides antimicrobiens 134
III.2 Test de croissance extracellulaire de *L. pneumophila* 134
III.3 Test de perte de cultivabilité de *L. pneumophila* 134
III.4 Test de perméabilisation de *L. pneumophila* 135
III.5 Suivi de la localisation des peptides sur *L. pneumophila* 135
III.6 Evaluation de l'interaction ADN/peptide 136
III.7 Evaluation de la morphologie de *L. pneumophila* 136
IV. *Evaluation de l'activité des PAMs humains contre* L. pneumophila *en milieu intracellulaire* 137
IV.1 Infection cellulaire 137
IV.2 Suivi de la croissance intracellulaire de *L. pneumophila* 138
IV.3 Suivi de la localisation des peptides dans la cellule hôte 139
IV.4 Test d'adhésion 139
IV.5 Test d'internalisation/survie 140
IV.6 Suivi de l'échappement à la voie endosomale 140
IV.7 Suivi du recrutement du réticulum endoplasmique 141

V. *Statistiques* 141
Résultats 142
I. *Etude de la sensibilité aux antibiotiques de souches cliniques de* L. pneumophila 142
II. *Etude de l'effet des PAMs humains sur* L. pneumophila 161
II.1 Effet des PAMs humains sur *L. pneumophila* en milieu extracellulaire 163
II.1.1 Effet de LL-37 et HBD-3 sur la cultivabilité de *L. pneumophila* 163
II.1.2 Perméabilisation des membranes de *L. pneumophila* par LL-37 et HBD-3 164
II.1.3 Localisation de LL-37 sur *L. pneumophila* 165
II.1.4 Effet de LL-37 et HBD-3 sur la morphologie de *L. pneumophila* 168
II.1.5 Effet des PAMs en association entre eux sur *L. pneumophila* 170
II.1.6 Etude de la résistance de *L. pneumophila* aux PAMs humains 170
II.2 Effet des PAMs humains sur le cycle infectieux de *L. pneumophila* 174
II.2.1 Effet de LL-37 et HBD-3 sur la réplication intracellulaire de *L. pneumophila* 174
II.2.2 Localisation des peptides au cours de l'infection 177
II.2.3 Effet de LL-37 et HBD-3 sur les étapes clé du cycle infectieux de *L. pneumophila* 181
Discussion 192
Conclusion et perspectives 208
Annexe 212
Références 215

Liste des figures

Figure 1. Morphologie de *Legionella pneumophila* (Cazalet & Buchrieser 2005 ; McDade *et al.* 1977).

Figure 2. Capsule de *Legionella longbeachae* (Cazalet *et al*. 2010).

Figure 3. Schéma de la composition du génome de 7 souches de *L. pneumophila* (Gomez-Valero & Buchrieser 2013).

Figure 4. Structure des acides gras des phospholipides membranaires (Zhang & Rock 2008).

Figure 5. Structure du LPS de *L. pneumophila* (Shevchuk *et al.* 2011).

Figure 6. Fiche de notification des cas diagnostiqués de légionellose (Source InVS).

Figure 7. Evolution du nombre et du taux d'incidence annuels des cas notifiés de légionellose en France entre 1988 et 2015 (Source InVS).

Figure 8. Schéma du mécanisme d'action des topoisomérases de type II (Cozzarelli *et al.* 2006).

Figure 9. Cycle infectieux de *Legionella pneumophila*.

Figure 10. Recrutement des vésicules de réticulum endoplasmique (RE) et de mitochondries sur la LCV (Tilney *et al*. 2001 ; Horwitz 1983).

Figure 11. Schéma du système de sécrétion de type IV Dot/Icm de *Legionella pneumophila* (Schaik *et al*. 2013).

Figure 12. Structure du core du système de sécrétion de type IV Dot/Icm de *L. pneumophila* (Kubori *et al*. 2014).

Figure 13. Modèle de sécrétion des effecteurs dépendants du complexe IcmS/IcmW via le système de sécrétion de type IV Dot/Icm de *L. pneumophila* (Sutheland *et al*. 2012).

Figure 14. Modèle de régulation de la protéine DotL du système de sécrétion de type IV Dot/Icm de *L. pneumophila* (d'après Yeo *et al.* 2000 et Buscher *et al.* 2005).

Figure 15. Schéma des différents modes d'internalisation des bactéries (d'après Horwitz 1984 et Schneider *et al.* 2007).

Figure 16. Distribution cellulaire des phosphoinositides (Di Paolo & De Camilli 2006).

Figure 17. Modification des phosphoinositides de la LCV de *L. pneumophila*.

Figure 18. Schéma de régulation des petites GTPases.

Figure 19. Schéma de fusion membranaire médiée par les protéines SNAREs.

Figure 20. Structures tertiaires des peptides antimicrobiens produits par les organismes supérieurs (Jenssen *et al.* 2006 ; Ganz 2003).

Figure 21. Schéma de structure de différents lantibiotiques (Field *et al.* 2015).

Figure 22. Schéma de la biosynthèse du peptidoglycane (Typas *et al.* 2011).

Figure 23. Schéma de l'enveloppe des bactéries à Gram positif et à Gram négatif (d'après Silhavy *et al*. 2010).

Figure 24. Modèle de translocation des peptides antimicrobiens à travers la membrane externes des bactéries à Gram négatif (Hancock 1997).

Figure 25. Schéma des différents mécanismes d'action des peptides antimicrobiens.

Figure 26. Schéma des différents modes de perméabilisation membranaire des PAMs (Brogden *et al.* 2005).

Figure 27. Structure en fleur des pores d'alaméthicine observée sur une matrice de phospholipides par microscopie à effet tunnel (Pieta *et al.* 2012).

Figure 28. Représentation schématique des différents types de pores toriques (Gilbert *et al.* 2014).

Figure 29. Modèle illustrant le processus de formation d'un pore transmembranaire induit par la mélittine (Sun *et al.* 2015).

Figure 30. Le traitement avec HBD-3 induit la formation de protrusions membranaires chez *S. aureus* (Sass *et al.* 2010).

Figure 31. Le traitement avec le la mélittine ou le PMAP-23/P6 induit des changements morphologiques chez *C. albicans* (d'après Lee *et al.* 2002).

Figure 32. Schéma des différents mécanismes de résistance aux PAMs.

Figure 33. Représentation d'un acide lipoteichoïque supplémenté en D-alanine (Anaya-Lopez *et al*. 2013).

Figure 34. Schéma du mécanisme d'incorporation de D-alanine au niveau des acides teichoïques (d'après thèse Rita Kamar).

Figure 35. Représentation d'un phosphatidylglycérole supplémenté en L-lysine ou en L-alanine (Anaya-Lopez *et al*. 2013).

Figure 36. Schéma du mécanisme d'action du facteur MprF (Anaya-Lopez *et al.* 2013).

Figure 37. Représentation du lipide A modifié par la phosphoéthanolamine ou l'aminoarabinose (Anaya-Lopez *et al.* 2013).

Figure 38. Représentation du lipide A modifié par acylation (Anaya-Lopez *et al.* 2013).

Figure 39. Représentation des différentes familles de transporteurs bactériens (Tegos *et al.* 2011).

Figure 40. L'import des PAMs vers le cytoplasme requiert le transporteur Sap (Shelton *et al.* 2011).

Figure 41. Représentation schématique de la cathélicidine humaine hCAP-18.

Figure 42. Structure tridimensionnelle de LL-37 (Vandamme *et al.* 2012).

Figure 43. Schéma de la voie d'induction de l'expression de LL-37 par la vitamine D.

Figure 44. Structure cristallographique des α- et β-défensines (Mattar *et al.* 2016).

Figure 45. Effet des peptides LL-37 et *mmu*RL-37 sur des liposomes composés de phospholipides anioniques (Morgera *et al.* 2009).

Figure 46. L'ultrastructure du virus BKV révèle l'agrégation des particules virales induite par HD5 (Dugan *et al.* 2008).

Figure 47. Région de fixation de HD-5 sur le virus HAdV (d'après Smith *et al*. 2010).

Figure 48. Colocalisation de LL-37 avec *Mycobacterium* smegmatis dans la cellule-hôte (Sonawane *et al.* 2011).

Figure 49. Schéma des étapes de l'autophagie.

Figure 50. Schéma de la voie d'activation de l'autophagie dépendante de LL-37.

Figure 51. Effet du peptide LL-37 sur la formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* (Overhage *et al.* 2008).

Figure 52. Effet de la surexpression de LL-37 sur la cicatrisation (Steinstraesser *et al.* 2014).

Figure 53. Effet synergique de l'association HNP-1/LL-37 (Nagaoka *et al.* 2000).

Figure 54. Effet de l'association de PAM humains et de lysozyme sur la viabilité de *S. aureus* (Chen *et al.* 2005).

Figure 55. Effet synergique de l'association azithromycin/LL-37 (Lin *et al.* 2015).

Figure 56. Alignement des séquences peptidiques de la warnericine RK et des δ-lysines I et II sécrétées par *Staphylococcus warneri* (Verdon *et al.* 2008).

Figure 57. Effet de l'apolipiphorin III et de la défensine extraites de l'hémolymphe de *Galleria mellonella* sur l'ultrastructure de *Legionella dumoffii* (Palusińska-Szysz *et al.* 2012).

Figure 58. Modèle des voies d'induction de l'expression des défensines HBD-2 et HBD-3 activées par *L. pneumophila* (Scharf *et al.* 2010a, b).

Figure 59. Schéma des étapes de construction du fragment d'inactivation du gène *rcp*

Figure 60. Carte du plasmide pLAW344.

Figure 61. Schéma des différentes modalités d'infection cellulaire.

Figure 62. Perte de cultivabilité de L. pneumophila Paris (travaux préliminaires réalisés par PA Juan).

Figure 63. Cultivabilité de *L. pneumophila*.

Figure 64. Perméabilisation des membranes de *L. pneumophila* par LL-37 et HBD-3.

Figure 65. Fixation de LL-37 à la surface de *L. pneumophila*.

Figure 66. LL-37 interagit avec la membrane et le contenu cytoplasmique de *L. pneumophila*.

Figure 67. Gel de retard de migration électrophorétique de l'ADN de *L. pneumophila*.

Figure 68. Effet de LL-37 et HBD-3 sur l'ultrastructure de *L. pneumophila.*

Figure 69. Effet de l'association de LL-37 et HBD-3 sur la de cultivabilité de *L. pneumophila*.

Figure 70. Gel d'électrophorèse de la PCR de vérification de la présence de la cassette Kcr.

Figure 71. Croissance extracellulaire de *L. pneumophila*.

Figure 72. Test de cultivabilité de *L. pneumophila*.

Figure 73. Test de cultivabilité de *L. pneumophila*.

Figure 74. Croissance intracellulaire de *L. pneumophila* dans les pneumocytes A549 en coincubation avec les peptides.

Figure 75. Croissance intracellulaire de *L. pneumophila* dans les macrophages U937 en coincubation avec les peptides.

Figure 76. Croissance intracellulaire de *L. pneumophila* dans les pneumocytes A549 en pré-incubés avec les peptides.

Figure 77. Croissance intracellulaire de *L. pneumophila* dans les macrophages U937 en pré-incubés avec les peptides.

Figure 78. Immunomarquage de LL-37 dans les macrophages U937 et le pneumocytes A549.

Figure 79. Localisation de LL-37 marqué au TAMRA dans les macrophages U937.

Figure 80. Colocalisation de LL-37 avec *L. pneumophila* dans les macrophages U937.
Figure 81. Immunomarquage de HBD-3 dans les macrophages U937 et le pneumocytes A549.
Figure 82. Test d'adhésion de *L. pneumophila* en coincubation avec LL-37 ou HBD-3.
Figure 83. Test d'adhésion de *L. pneumophila* aux cellules pré-incubation avec LL-37 ou HBD-3.
Figure 84. Test d'adhésion de *L. pneumophila* pré-incubée avec LL-37 ou HBD-3.
Figure 85. Adhésion de *L. pneumophila* et *E. coli* aux pneumocytes A549.
Figure 86. Test d'internalisation de *L. pneumophila* en coincubation avec LL-37 ou HBD-3.
Figure 87. Test d'internalisation de *L. pneumophila* dans les cellules pré-incubation avec LL-37 ou HBD-3.
Figure 88. Immunomarquage de LAMP-1 et colocalisation avec *L. pneumophila* dans les macrophages U937.
Figure 89. Immunomarquage de la calnexine dans les macrophages U937.
Figure 90. Bilan des activités antimicrobiennes directes des peptides LL-37 et HBD-3 contre *L. pneumophila* en milieu extracellulaire.
Figure 91. Bilan de l'effet des peptides LL-37 et HBD-3 sur le cycle infectieux de *L. pneumophila.*
Figure 92. Sensibilité à HBD-3 d'isolats cliniques de *S. aureus* (Midorikawa *et al*. 2003).
Figure 93. Cinétique de fixation de LL-37 marqué à la rhodamine sur *E. coli* (Sochacki *et al*. 2011).
Figure 94. Effet de LL-37 sur la morphologie de *P. aeruginosa* et *S. aureus* (Papareddy *et al*. 2012).
Figure 95. Effet de HBD-3 sur la morphologie de *S. aureus* (Sass *et al*. 2010).
Figure 96. Profil protéique des souches de *L. pneumophila* Paris et Lens en phase stationnaire de croissance.

Liste des tableaux

Tableau 1. Fréquence des facteurs favorisants des cas de légionellose en France en 2015 (Source InVS).

Tableau 2. Classification des bactériocines produites par les bactéries à Gram positif (Bastos *et al.* 2009).

Tableau 3. Spectre d'activité antibactérien des PAMs.

Tableau 4. Spectre d'activité antivirale des PAMs (Jenssen *et al*. 2006).

Tableau 5. Séquence peptidique de FK-13 et KR-12 (Vandamme et al. 2012).

Tableau 6. Souches bactériennes, plasmides et cellules utilisés dans cette étude.

Tableau 7. Amorces utilisées dans cette étude.

Tableau 8. Programme de la PCR 1.

Tableau 9. Programme de la PCR 2.

Tableau 10. Programme de la PCR 3.

Tableau 11. Peptides antimicrobiens utilisés dans cette étude.

Liste des abréviations

°C	Degré Celsius
aa	Acide aminé
ABC	*ATP-binding cassette*
ACES	Acide N-(acétamido-2)-amino-2-éthane sulfonique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
ADPRT	ADP ribosyltransferase
Afssaps	Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé
AG	Acide Gras
ALT	Acide Lipoteichoïque
ARN	Acide ribonucléique
ARS	Agence Régionale de Santé
ARP3	*Actin Related Protein 3*
ARPC1B	*Actin Related Protein 2/3 Complex subunit 1B*
AT	Acide Teichoïque
ATCC	*American Type Culture Collection*
ATP	adénosine triphosphate
BKV	*BK virus*
BCYE	*Buffered Charcoal Yeast Extract*
BSA	*Bovine Serum Albumin*
BYE	*Buffered Yeast Extract*
CAMP	*Cathelicidin Antimicrobial Peptide*
CCL	*Chemokine* (C-C motif) ligand
CL	Cardiolipine
CNR-L	Centre National de Référence des légionelles
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CO_2I	CO_2 Indépendant
CRL	*Cell Repository Lines*
CSE	*Cigarette Smoke Extract*
DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole
DPBS	*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*
Dot/Icm	*Defective for organelle trafficking/intracellular multiplication*
EEA1	*Early Endosomal Antigen 1*
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EGFR	*Epidermal Growth Factor Receptor*
ELISA	*Enzyme Liked Immuno Sorbent Assay*

ETEC	*Enterotoxigenic* Escherichia coli
EWGLI	*European Working Group for* Legionella *Infections*
g	Force de centrifugation (g = 9.81 m/s^2)
GC	Guanine-Cytosine
GAD	*GTPase Activating Protein*
GAG	Glucosaminoglycane
GDF	*GDI Displacement Factor*
GDI	*Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor*
GEF	*Guanine nucleotide Exchange Factor*
GFP	*Green Fluorescent Protein*
GlcNAc	acétylglucosamine
h	heure
HAdV	*Human Adenovirus*
hCAP-18	*human Cationic Antimicrobial Peptide -18*
HBD	*Human Beta Defensin*
HCMV	*Human cytomegalovirus*
HD	*Human Defensin*
HIV	*Human Immunodeficiency Virus*
HNP	*Human Neutrophil Peptide*
HSV	*Herpes Simplex Virus*
IAV	*Influenza A Virus*
IFN-γ	Interferon gamma
IL	Interleukine
InVS	Institut de Veille Sanitaire
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
Kdo	acide 3-deoxy-d-manno-oct-2-ulosonique
Kb	Kilobase
KOH	Hydroxyde de potassium
L-Ara4N	4-amino-4-déoxy-L-arabinose
LB	Luria-Bertani
LBA	Lavage Bronchoalvéolaire
Lcl	*Legionella collagen-like protein*
LCV	*Legionella-containing vacuole*
LLO	Listeriolysine O
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphocyte T
LT h-1	Lymphocyte T *helper*-1
M	Molaire

mAb	Monoclonal antibody
Man	Mannose
Mb	Mégabase
MCP-1	*Monocyte Chemoattractant Protein 1*
MOI	*Multiplicity of Infection*
MOMP	*Major Outer Membrane Protein*
MprF	*Multiple peptide resistance Factor*
Mtb	*Mycobacterium tuberculosis*
N	Concentration molaire
NAM	Acide N-acétyl-muramique
NAG	N-acétylglucosamine
NGS	*New Generation Sequencing*
NK	*Natural Killer*
PAM	Peptide antimicrobien
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PC	Phosphatidylcholine
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDG	Peptidoglycane
PE	Phosphatidyléthanolamine
pEtN	Phosphoéthanolamine
PFA	Paraformaldéhyde
PFGE :	*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*
PG	Phosphatidylglycérol
PGA	*Poly-γ-DL-glutamic acid*
PI	Phosphoinositide
PIA	*Polysaccharide intercellular adhesion*
PKC	Protéine kinase C
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acétate
PMAP	*Pig Myeloid Antimicrobial Peptide*
PMN	*Polymorpho-nuclear leukocytes*
PS	Phosphatidylsérine
PYG	*Peptone-yeast extract-glucose medium*
QuiNAc	acétylquinovosamine
RE	Réticulum Endoplasmique
Rha	Rhamnose
RND	*Resistance-nodulation-cell division*
rpm	Rotation par minute
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute medium*

RSV	*Respiratory Syncytial Virus*
RTX	*Repeats in structural toxins*
Sap	*Sensitive to antimicrobial peptides*
SBT	*Sequence Based Typing*
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Sg	Sérogroupe
SM	Sphingomyéline
SNARE	*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Activating protein Receptors*
SOC	*Super Optimal broth with Catabolite repression*
SST4	Système de sécrétion de type IV
ST	*Sequence Type*
SVF	Sérum de Vœu Fœtal
T4CPs	*Type IV secretion system Coupling Proteins*
TAMRA	5-carboxytetramethylrhodamine
TAR	Tours aéroréfrigérantes
TK	Tyrosine kinase
TLR	*Toll Like Receptor*
UFC	Unité Formant Colonie
V-ATPase	*Vacuolar-ATPase*
VDR	*Vitamin D Receptor*
VDRE	*Vitamin D Response Element*
VSV	*Vesicular stomatitis Indiana virus*
WGS	*Whole Genome Sequencing*
(p/v)	Concentration poids/volume
(v/v)	Concentration volume/volume

Introduction générale

Legionella est une bactérie ubiquiste de l'environnement hydrotellurique, également considérée comme un pathogène accidentel de l'homme. Lors de l'inhalation de goutellettes d'eau contaminées, cette bactérie est capable d'infecter les macrophages alvéolaires et les cellules épithéliales pulmonaires afin de s'y répliquer, entrainant alors une pneumonie aigüe appelée légionellose. Les bactéries du genre *Legionella* font partie des principaux agents étiologiques responsables des pneumonies communautaires sévères, occupant le deuxième ou troisième rang derrière *Streptococcus pneumoniae*. Malgré une prise en charge précoce et l'administration d'une antibiothérapie adaptée, la légionellose est associée à un taux de mortalité d'environ 10%. Le risque de contracter cette infection est notamment lié à la susceptibilité de l'hôte, et plus particulièrement à son statut immunitaire. Les personnes possédant une immunité diminuée représentent ainsi une population à risque. Un déficit du système immunitaire touchant l'expression, la production ou l'activité des peptides antimicrobiens (PAMs) pourrait alors constituer un facteur de risque important. Ces molécules sont produites par l'hôte et participent aux premières lignes de défense de l'immunité innée et permettent de lutter contre un large spectre de microorganismes. *Legionella* induit une pneumonie de sévérité variable, très sévère pour plus de 40% des patients en France, hospitalisés en unité de soins intensifs. Pour expliquer ces différences d'acquisition de la légionellose ou de sévérité, des facteurs bactériens spécifiques de souches ainsi que des facteurs d'hôtes ont été envisagés. Parmi ces hypothèses, il est possible que certaines souches de légionelles aient développé une résistance vis-à-vis des défenses de l'hôte et notamment des peptides antimicrobiens, et/ou des antibiotiques recommandés dans le cadre du traitement de l'infection. Dans ce cadre, une meilleure connaissance des mécanismes d'action des PAMs vis-à-vis de *Legionella*, encore peu documentés, apparait importante. Au regard de la détection récente d'antibiorésistance chez *Legionella*, l'étude de la résistance de ces bactéries aux agents antibactériens semble essentielle.

Dans l'étude bibliographique de ce manuscrit, une première partie est consacrée à notre modèle d'étude : *Legionella pneumophila*. Elle expose notamment les caractéristiques génomiques et phénotypiques de la bactérie, ainsi que les données relatives aux infections à *Legionella* (pathologies associées, diagnostic, épidémiologie, traitement, résistance aux antibiotiques). Par la suite, cette partie détaille le cycle de vie intracellulaire des légionelles, en décrivant les étapes de leur cycle infectieux et le rôle de protéines bactériennes dans chacune d'elles. La seconde partie établie quant à elle une synthèse des connaissances actuelles sur les peptides antimicrobiens. Elle présente la structure de ces molécules, leurs modes d'action et les mécanismes de résistance développés par les microorganismes. Elle met également l'accent sur les propriétés des peptides antimicrobiens d'origine humaine, ainsi que sur l'interaction entre *Legionella* et les PAMs.

Etude bibliographique

I. Legionella pneumophila

La découverte de *Legionella pneumophila* remonte au mois de juillet 1976, alors qu'une épidémie de pneumonie aigüe frappe un groupe de vétérans réunis à l'occasion du 58ème congrès des anciens combattants Américains à Philadelphie. Sur les 4400 participants, 182 contractèrent une pneumopathie sévère, malheureusement fatale pour 29 d'entre eux. L'agent causal ne fut isolé que quelques mois plus tard, en janvier 1977 (McDade *et al.* 1977). Le genre *Legionella* fut créé en 1979, et la bactérie responsable de l'épidémie reçut le nom de *Legionella pneumophila* (Brenner *et al.* 1979).

I.1 L'agent pathogène de la légionellose

I.1.1 Taxonomie

Les légionelles sont des gammaprotéobactéries appartenant à l'ordre des *Legionellales*, composé des familles des *Legionellaceae* (comprenant l'unique genre *Legionella*) et des *Coxiellaceae* (comprenant les genres *Coxiella* et *Rickettsiella*). Le genre *Legionella* compte actuellement 59 espèces (http://www.bacterio.net/legionella.html) divisées en 70 sérogroupes (Sg), définis en fonction des antigènes O présents dans le lipopolysaccharide (LPS) de la paroi bactérienne (Fields *et al.* 2002; Diederen 2008). L'espèce *L. pneumophila*, qui compte 16 sérogroupes, est à elle seule responsable d'environ 90% des cas de légionellose communautaire en Europe et en Amérique du Nord, 85% d'entre eux étant associés au Sg1 (Fields *et al.* 2002; Beauté *et al.* 2013).

I.1.2 Morphologie

Les bactéries du genre *Legionella* sont des bacilles aérobies strictes à Gram négatif non sporulant et mesurant entre 0.3 et 0.4 µm de largeur et entre 2 et 20 µm de longueur, voire même jusqu'à 50 µm pour les formes filamenteuses (**Figure 1**) (McDade *et al.* 1977; Cazalet & Buchrieser 2005).

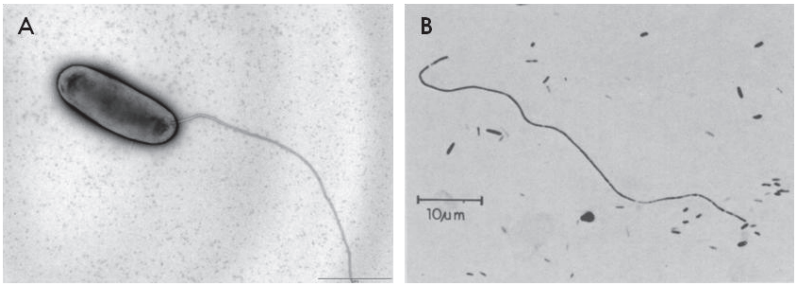


Figure 1. Morphologie de *Legionella pneumophila* (Cazalet & Buchrieser 2005 ; McDade *et al.* 1977).
Forme bacillaire (A) et filamenteuse (B) observées par microscopie électronique.

La plupart des légionelles sont mobiles grâce à un ou plusieurs flagelles situés en position polaire ou subpolaire (Rogers *et al.* 1980; Hebert *et al.* 1984), à l'exception des espèces *L. oakridgensis* et *L. longbeachae*, cette dernière ayant la particularité de produire une capsule (**Figure 2**) (Bornstein *et al.* 1991; Cazalet *et al.* 2010). Ces bactéries sont chimio-organotrophes, utilisant les acides aminés comme source de carbone et d'énergie, mais sont décrites comme auxotrophes pour la L-cystéine (George *et al.* 1980).



Figure 2. Capsule de *Legionella longbeachae* (Cazalet *et al*. 2010). Cliché de microscopie électronique à transmission de *Legionella longbeachae* produisant une capsule (flèche).

I.1.3 Habitat

Les *Legionella* sont des bactéries ubiquitaires d'origine hydrotellurique, essentiellement présentes dans les eaux douces (lacs, rivières, flaques d'eau) et les sols humides (terreaux, boue). La concentration des légionelles dans ces milieux est généralement faible, néanmoins leur présence a été détectée dans 40% des sites d'eaux douces par culture, et dans plus de 80% par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Fields *et al.* 2002; Borella *et al.* 2005). La croissance de ces bactéries est directement influencée par différents facteurs physico-chimiques de leur habitat, tels que la température, le pH, la salinité, la disponibilité des nutriments, l'exposition aux UV et la quantité d'oxygène dissout (Wadowsky *et al.* 1985; Heller *et al.* 1998; Ohno & Kato 2003). Elles se multiplient à des températures comprises entre 25°C et 42°C, cependant une eau douce à 35°C et à pH 6.9 réunit les conditions optimales de croissance (Ohno & Kato 2003). Elles ont néanmoins montré une aptitude à survivre sous des températures variant de 4°C et 60°C (Borella *et al.* 2005) ou dans des environnement inhospitaliers commes les estuaires ou le Grand Lac Salé (Utah) (Gast *et al.* 2012). L'ubiquité et la capacité d'adaptation des légionelles expliquent alors leur propagation dans les réseaux d'eau artificiels. Les légionelles sont en effet régulièrement détectées dans les tours aéroréfrigérantes (TAR), les eaux chaudes sanitaires (notamment aux niveaux des douches et des robinets), les brumisateurs, les piscines, les spas ou encore les fontaines décoratives (Atlas 1999), la présence de bras morts et la stagnation de l'eau constituant des conditions particulièrement propices à la multiplication de *Legionella*.

Dans ces environnements, les légionelles assurent leur prolifération par parasitisme intracellulaire des protozoaires. Actuellement, une vingtaine d'espèces d'amibes et deux espèces de ciliés ont été identifiées comme hôtes de *Legionella* (Lau & Ashbolt 2009). Au-delà de leur rôle dans la multiplication bactérienne, les protozoaires (libres ou en biofilm) offrent une protection contre les conditions environnementales défavorables (température, biocides) (Loret & Greub 2010). La co-évolution étroite avec les protozoaires aurait alors conduit la sélection de mécanismes permettant à *Legionella* d'infecter une grande variété d'hôtes, certains étant accidentels comme les macrophages alvéolaires et les pneumocytes humains.

I.1.4 Caractéristiques génomiques

Actuellement, les bases de données recensent les génomes complets de 11 souches de *L. pneumophila* : Philadelphia (Sg1), Paris (Sg1), Lens (Sg1), Corby (Sg1), Alcoy (Sg1), 130b (Sg1), Lorraine (Sg1), HL06041035 (Sg1), ATCC43290 (Sg12), LPE509 et Thunder Bay (Sg6) (Cazalet *et al.* 2004; Chien *et al.* 2004; Glöckner *et al.* 2008; D'Auria *et al.* 2010; Schroeder *et al.* 2010; Gomez-Valero *et al.* 2011; Amaro *et al.* 2012; Ma *et al.* 2013; Khan *et al.* 2013). Le génome de *L. pneumophila* s'organise autour d'un unique chromosome circulaire mesurant de 3.3 à 3.6 Mb, contenant environ 38% de GC (Guanine-Cytosine), et dont certaines régions peuvent être excisées et maintenues sous forme plasmidique. Les souches Paris, Lens et Lorraine possèdent un plasmide additionnel de 132 Kb, 60 Kb et 150 Kb, respectivement (Cazalet *et al.* 2004; Chien *et al.* 2004). La proportion de séquences codantes est estimée à 88% en moyenne, soit environ 3 000 gènes, dont 40% semblent spécifiques au genre *Legionella* (Steinert *et al.* 2007). Des analyses comparatives ont montré que le « *core genome* » de *L. pneumophila* est composé de 2405 gènes conservés, associés à près de 200 gènes (de 154 à 271 gènes) spécifiques de chaque souche, soit environ 10% du génome (**Figure 3**) (Gomez-Valero & Buchrieser 2013).

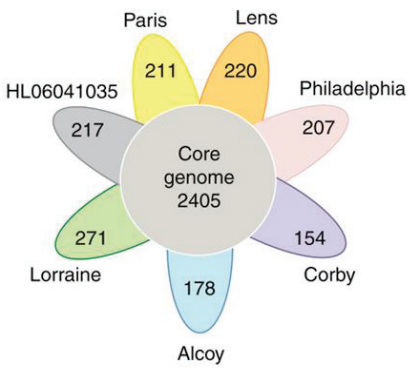


Figure 3. Schéma de la composition du génome de 7 souches de *L. pneumophila* (Gomez-Valero & Buchrieser 2013). Chaque couleur de pétale représente le génome d'une souche de *L. pneumophila*. Le nombre au centre du diagramme représente les gènes orthologues partagés par tous les génomes. Le nombre inscrit dans chacun des pétales correspond aux gènes spécifiques à chaque génome.

Cette diversité génétique est particulièrement importante et témoigne de la grande plasticité du génome de *Legionella.* A titre d'exemple, l'analyse des génomes de *Salmonella enterica* souches CT18 et Ty2 a révélé que la proportion de gènes spécifiques à chacune n'était que de 1.8 et 0.6%, respectivement (Deng *et al.* 2003). Cette diversité génomique découle de l'acquisition d'éléments génétiques mobiles (éléments intégratifs conjugatifs, séquences d'insertion, îlots de pathogénicité) et de transferts de gènes horizontaux entre souches de *L. pneumophila*, entre espèces de *Legionella*, entre différents genres bactériens, et de façon plus surprenante avec ses hôtes eucaryotes (Gomez-Valero & Buchrieser 2013). Le génome de *L. pneumophila* contient en effet de nombreux gènes codant des protéines de type eucaryote ou présentant des motifs impliqués dans des interactions protéine-protéine et des réactions enzymatiques typiques des organismes eucaryotes, représentant ainsi plus de 3% du génome (Cazalet *et al.* 2004; Lurie-Weinberger *et al.* 2010). Ces protéines sont impliquées dans la manipulation de la machinerie cellulaire de l'hôte, un processus essentiel pour la virulence et la réplication de la bactérie. La présence de gènes de type eucaryote est décrite pour d'autres bactéries intracellulaires telles que *Coxiella*, *Wolbachia* et *Mycobacterium*, néanmoins *Legionella* semble être l'un des procaryotes possédant la plus grande diversité de protéines d'origine eucaryote (Cazalet *et al.* 2004).

I.1.5 Caractéristiques de l'enveloppe de *L. pneumophila*

L'enveloppe bactérienne assure différentes fonctions essentielles telles que la protection contre les conditions environnementales, l'import sélectif des nutriments et l'export des produits de dégradation et des substrats des systèmes de sécrétion. Cette structure est le siège des contacts directs avec les autres organismes et s'avère extrêmement importante pour les bactéries pathogènes, dont les éléments de surface déterminent leur capacité à interagir avec un hôte. Ainsi, la virulence de *L. pneumophila* repose en grande partie sur les composants et les caractéristiques de son enveloppe (Shevchuk *et al.* 2011). L'enveloppe des légionelles est typique des bactéries à Gram négatif, constituée d'une membrane interne, d'un espace périplasmique contenant une couche de peptidoglycane et d'une membrane externe ; cependant elle possède quelques particularités. Une étude de microscopie très détaillée réalisée par Faulkner & Garduño suggère l'existence de différentes formes morphologiques de *L. pneumophila*, chacune correspondant à une phase de croissance ou à un stade d'infection particulier. Les auteurs ont alors observé cinq structures d'enveloppe différentes, certaines n'étant observées que chez les bactéries issues de croissance intracellulaire (Faulkner & Garduño 2002).

La membrane externe est certainement l'élément le plus discriminant de l'enveloppe des bactéries à Gram négatif. Cette bicouche lipidique est composée de phospholipides, de lipoprotéines, de protéines et du LPS. D'après l'analyse de la composition lipidique de

l'enveloppe de *L. pneumophila*, la membrane externe est principalement constituée de phosphatidylcholine (PC), de phosphatidyléthanolamine (PE), de cardiolipine (CL) et de phosphatidylglycérol (PG) (Hindahl & Iglewski 1984). La présence de PC est plutôt inhabituelle, puisque seulement 10% des bactéries connues sont capables d'intégrer ce phospholipide dans leur membrane, la plupart d'entre elles étant associées à des interactions avec des eucaryotes (Shevchuk *et al.* 2011). Son rôle exact au sein de la membrane externe reste à déterminer, cependant il semblerait que la PC soit essentielle pour la virulence de *L. pneumophila*. Les travaux de Conover *et al.* ont montré que la perte de PC dans l'enveloppe des légionelles induit notamment chez la bactérie un défaut de mobilité et d'adhésion aux macrophages (Conover *et al.* 2009).

Les propriétés de la membrane externe sont également fortement gouvernées par la structure des acides gras des phospholipides. Ces acides gras sont des acides carboxyliques à chaine aliphatique de 14 à 20 atomes de carbone pouvant être saturée (i.e. ne possédant pas de liaison carbone-carbone) ou insaturée (i.e. possédant une ou plusieurs liaisons carbone-carbone) (**Figure 4**). Les acides gras saturés forment une chaine linéaire et rigide, diminuant la fluidité de la membrane, tandis que les acides gras insaturés forment une courbure permettant d'augmenter la fluidité de la membrane. Les acides gras peuvent également présenter un groupement méthyle branché en iso ou antéiso (**Figure 4**).

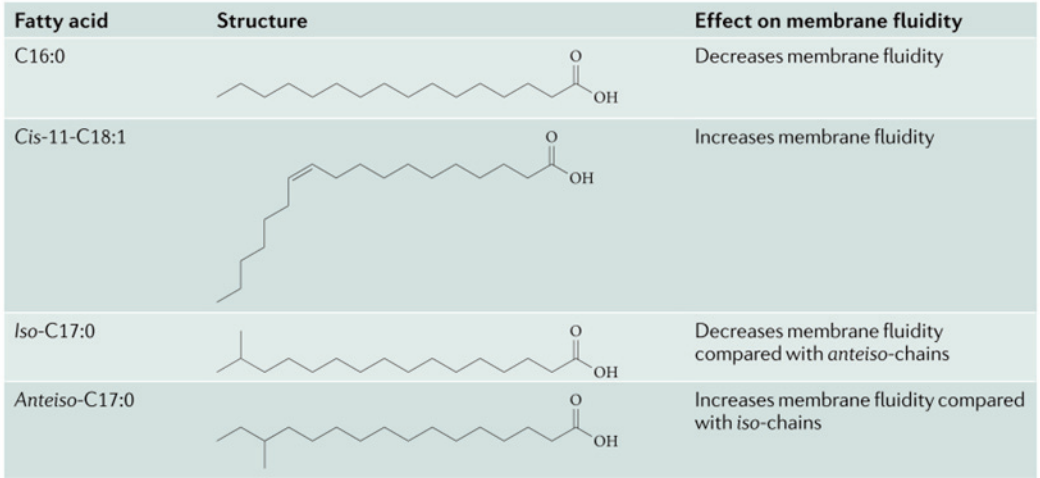


Figure 4. Structure des acides gras des phospholipides membranaires (Zhang & Rock 2008). Le nombre d'atomes de carbone (Cn), le nombre de liaison carbone-carbone (:n) et la position du groupement méthyle (iso ou anteiso) influencent directement la fluidité de la membrane.

Les acides gras antéiso produisent une membrane plus fluide que les acides gras iso car leur groupement méthyl, situé plus loin de l'extrémité de la chaine, perturbe davantage le compactage des chaines carbonées (Zhang & Rock 2008). Les bactéries ont ainsi développé des mécanismes permettant de contrôler la production et la modification les acides gras, afin de moduler la fluidité de leur membrane en fonction des conditions environnementales (Zhang & Rock 2008). Bien que typiques des bactéries à Gram positif, les acides gras

branchés sont retrouvés en grande quantité dans la membrane des légionelles (Lambert & Moss 1989). Chez *L. pneumophila*, la proportion d'acides gras branchés oscille entre 35 et 66% en fonction des conditions de culture et de la phase de croissance de la bactérie (Barker *et al.* 1993; Verdon *et al.* 2011).

Le LPS de *Legionella* joue un rôle déterminant dans la virulence de la bactérie. Il est situé au niveau du feuillet externe de la membrane externe et est porteur du pouvoir antigénique. Le LPS se compose de la chaine O (aussi appelée antigène O), du core et du lipide A, portant le pouvoir antigénique de la bactérie (**Figure 5**).

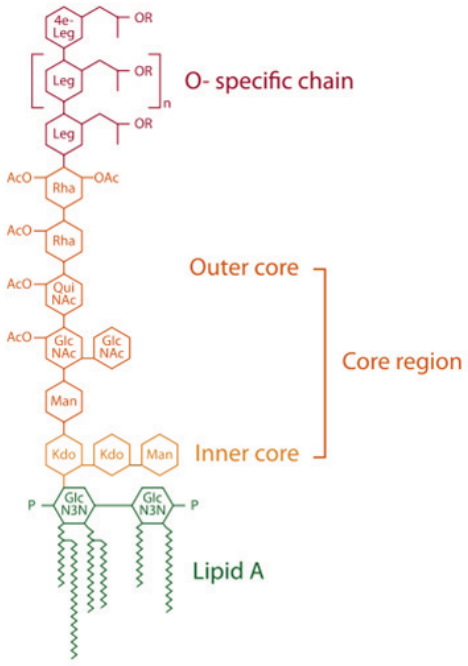


Figure 5. Structure du LPS de *L. pneumophila* (Shevchuk *et al.* 2011). Le LPS de *L. pneumophila* comprend différentes régions : la chaine O (rouge), le core comprenant le core externe (orange) et le core interne (jaune), ainsi que le lipide A (vert). Leg : dérivé de l'acide légionaminique ; 4e-Leg : dérivé de l'acide 4-épilégionaminique ; Rha : rhamnose ; Man : mannose ; QuiNac : acétylquinovosamine ; GlcNac : acétylglucosamine ; Kdo : acide 3-deoxy-d-manno-oct-2-ulosonique ; P : phosphate ; OAc : O-acétyle.

La chaine O et le core constituent la partie oligosaccharidique du LPS, tandis que le lipide A permet l'ancrage du LPS dans la membrane externe. Comparé au LPS d'autres bactéries à Gram négatif, le LPS de *L. pneumophila* possède une structure unique. Le lipide A de *L. pneumophila* contient des acides gras branchés à longue chaine peu communs, suspectés d'être responsables de la faible activité endotoxique du LPS. Il a en effet été démontré que l'activation de la production de cytokines proinflammatoires par les monocytes requiert une concentration de LPS de *L. pneumophila* 1000 fois plus élevée que celle du LPS de *Salmonella enterica* (Neumeister *et al.* 1998). De plus, le sucre constituant le lipide A est le 2,3-diamino-2,3-didéoxyglucose (GlcN3N), au lieu de la glucosamine classiquement retrouvée chez les bactéries à Gram négatif (Lück & Helbig 2013). Le core

oligosaccharidique du LPS est divisé en core interne et en core externe. Le core interne de *L. pneumophila* est composé d'un résidu d'acide 3-deoxy-d-manno-oct-2-ulosonique (Kdo) conservé chez les bactéries à Gram négatif mais ne contient pas d'heptose ni de phosphate ; tandis que le core externe est constitué de rhamnose (Rha), de mannose (Man), d'acétylquinovosamine (QuiNAc) et d'acétylglucosamine (GlcNAc) (Knirel *et al.* 1996). Cette région contient de nombreux groupements O-acétyle et N-acétyle, conférant une hydrophobicité élevée au LPS. La chaine O du LPS de *L. pneumophila* est constituée d'un homopolymère d'acide 5-acétamidino-7-acétamido-8-O-acétyl-3,5,7,9-tétradéoxy-L-glycéro-D-galacto-non-2-ulosonique, un sucre singulier également nommé acide légionaminique. L'absence de groupement hydroxyle sur cette molécule donne un caractère hydrophobe à la chaine O du LPS (Lück & Helbig 2013). Les gènes chargés de la biosynthèse du LPS de *L. pneumophila* Sg1 sont répartis dans deux régions distinctes du génome : (i) une région de 15 Kb contenant les gènes de biosynthèse du LPS retrouvée chez toutes les souches de *L. pneumophila* et (ii) une région de 18 Kb spécifique des souches appartenant au sérogroupe 1 (Petzold *et al.* 2013). La région de 15 Kb est très conservée parmi les souches de Sg1, contrairement à la région spécifique de 18 Kb, suspectée de regrouper des gènes impliqués dans la modification du LPS (Petzold *et al.* 2013). La région spécifique contient notamment le gène *lag-1* codant une O-acétyltransférase responsable de l'acétylation de l'acide légionaminique (Zou *et al.* 1999). Les souches possédant ce gène synthétisent un LPS portant un épitope reconnu par l'anticorps monoclonal mAb 3/1 du panel de Dresden. D'après plusieurs études, cet épitope est associé à une prévalence élevée chez les patients présentant une légionellose communautaire (Zou *et al.* 1999; Helbig *et al.* 2002; Harrison *et al.* 2009). De plus, des travaux ont montré que la surface des souches mAb 3/1 positives est moins chargée et plus perméable que celle des souches mAb 3/1 négatives (Gosselin *et al.* 2011). Par ailleurs, *L. pneumophila* est capable de modifier la composition de son LPS en fonction des conditions de culture et de sa phase de croissance (Barker *et al.* 1993; Fernandez-Moreira *et al.* 2006; Seeger *et al.* 2010). Cette propriété conditionne le potentiel d'infection de la bactérie, notamment sa capacité à échapper à la voie de dégradation endosomale (Fernandez-Moreira *et al.* 2006; Seeger *et al.* 2010).

I.2 La légionellose

I.2.1 Mode de transmission

Les infections à *Legionella* sont transmises par inhalation de microgouttelettes d'eau contaminées aérosolisées par un système d'eau artificiel, ou plus rarement à partir d'un réservoir naturel. La dose infectieuse n'est pas établie, cependant, le risque d'infection est considéré comme important à partir de 1 000 UFC/L (unité formant colonie/litre). Le développement d'une infection dépend de l'état immunitaire de l'hôte, de la virulence de

la bactérie mais également de la taille et de la quantité de gouttelettes d'eau inhalées (Baron & Willeke 1986). Jusqu'à très récemment, la légionellose était considérée comme une maladie non contagieuse, le premier cas suspecté de transmission interhumaine ayant été décrit en février 2016 (Borges *et al.* 2016; Correia *et al.* 2016). D'après les analyses épidémiologiques, environnementales, microbiologiques et génomiques, l'enquête a conclu qu'un homme de 48 ans (Patient 1) exposé à *L. pneumophila* sur son lieu de travail, aurait contaminé sa mère (Patient 2) alors que celle-ci prenait soin de lui. Les facteurs suggérant la transmission interhumaine comprenaient outre les données épidémiologiques et génomiques, la sévérité des symptômes respiratoires du Patient 1, le contact étroit et prolongé entre les deux patients, ainsi que l'espace réduit de la pièce non ventilée dans laquelle le contact a eu lieu (Correia *et al.* 2016).

I.2.2 Pathologies associées à *Legionella*

Les infections à *Legionella* sont regroupées sous le terme général de « légionellose ». Elles peuvent se manifester sous deux formes cliniques distinctes : la fièvre de Pontiac et la maladie du légionnaire (ou légionellose).

I.2.2.1 La fièvre de Pontiac

La fièvre de Pontiac est une forme bénigne de légionellose ne mettant pas le pronostic vital en jeu. Elle se traduit par des symptômes pseudo-grippaux comprenant fièvre, nausée, myalgie, toux, céphalées, mais pas de pneumonie. Dans certains cas, les patients présentent également des douleurs thoraciques, des difficultés respiratoires, des vomissements et des diarrhées (Tossa *et al.* 2006). La guérison est spontanée en 2 à 7 jours et ne nécessite pas de traitement. De plus, la bactérie n'est jamais isolée des poumons des patients.

I.2.2.2 La maladie du légionnaire

La maladie du légionnaire aussi appelée légionellose est une pneumonie d'évolution progressive et sévère. Une période d'incubation de 2 à 10 jours précède l'arrivée des premiers signes cliniques incluant symptômes respiratoires (toux, dyspnée) et extrarespiratoires (fièvre supérieure à 39°C, asthénie, céphalées, myalgie). L'apparition de troubles digestifs (diarrhées, nausées, vomissements) et neurologiques (confusion, délire) est également possible. Des complications telles qu'une insuffisance respiratoire, une insuffisance rénale aigüe, une rhabdomyolyse voire une atteinte multiviscérale sont parfois associées à la légionellose (Campèse *et al.* 2015).

Dans de rares cas, et en majorité chez des patients immunodéprimés, des formes extrapulmonaires sont observées, se manifestant par des atteintes cérébrales (encéphalite, abcès), cardiaques, (péricardite, myocardite, endocardite), digestives (péritonite, abcès hépatique), musculaires ou encore cutanées (cellulite) (Jarraud *et al.* 2007).

I.2.3 Diagnostic

Le diagnostic clinique de la légionellose repose sur des examens biologiques et radiologiques. La radiographie pulmonaire fait état d'une pneumonie la plupart du temps systématisée et caractérisée par une atteinte alvéolaire ou alvéolo-interstitielle (Jarraud *et al.* 2007). Cependant, aucun argument radiologique ne permet de différencier la légionellose d'une autre pneumonie bactérienne. La distinction n'est possible que grâce au diagnostic microbiologique, réalisable selon différentes méthodes :

- La recherche d'antigènes solubles dans les urines :

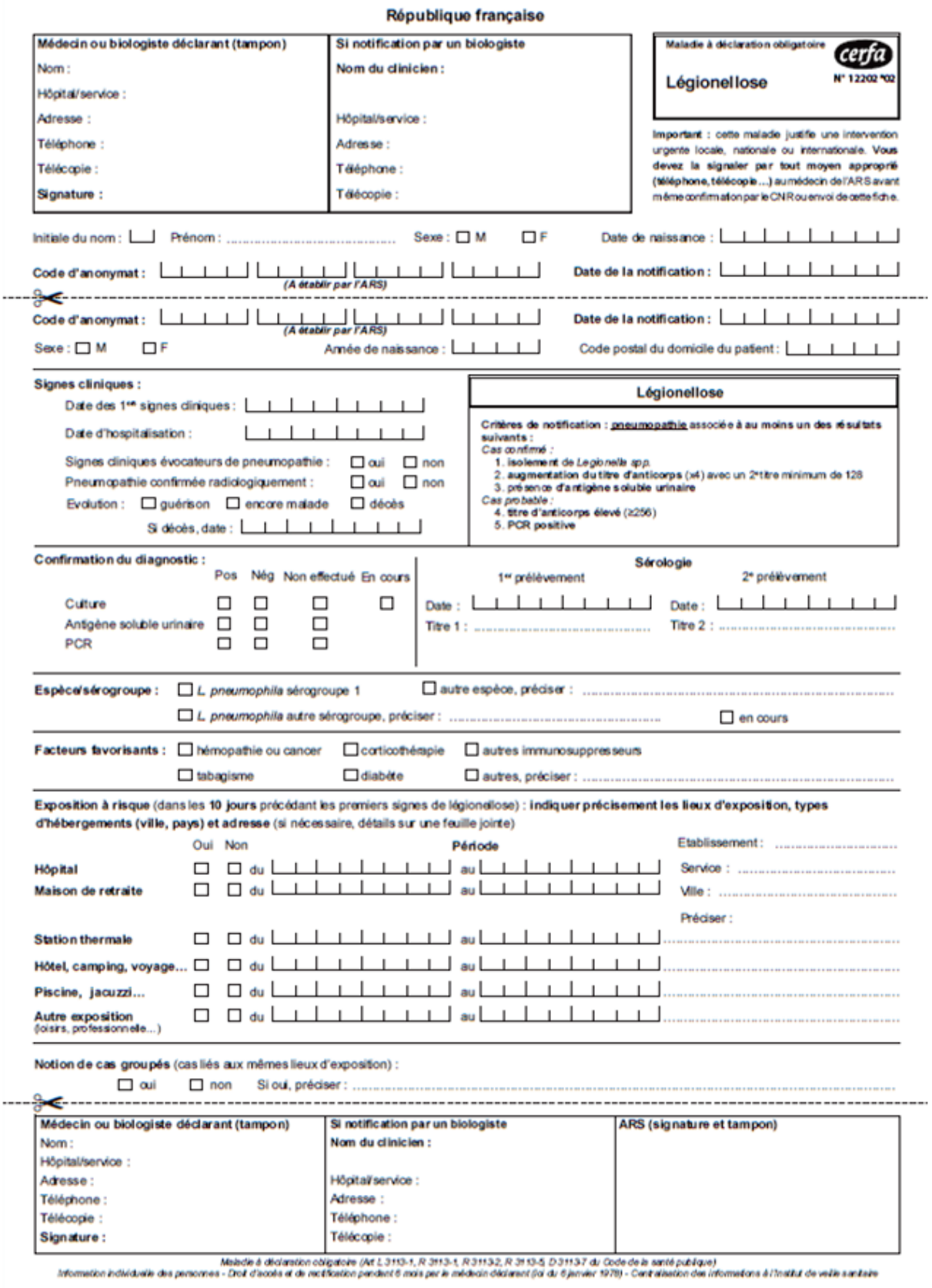
Il s'agit de la méthode la plus fréquemment utilisée en Europe (plus de 87% des cas de légionellose confirmés en 2014) (European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) 2016). Elle a l'avantage d'être rapide et de permettre un diagnostic précoce de l'infection. Les antigènes sont en effet excrétés 1 à 2 jours après l'apparition des premiers symptômes, et peuvent persister jusqu'à plusieurs semaines voire plusieurs mois malgré un traitement antibiotique (Sopena *et al.* 2002). Ces antigènes sont détectés soit par immunochromatographie sur membrane soit par immunoenzymologie (test ELISA). Ces deux méthodes sont basées sur la détection du LPS de *L. pneumophila* Sg1, avec une sensibilité variant de 70 à 90% et une spécificité de 99% (Jarraud *et al.* 2013).

- La culture des prélèvements respiratoires :

Elle reste actuellement la méthode de référence. La culture bactérienne est essentielle pour identifier la souche responsable de l'infection, mais également pour localiser la source de la contamination par comparaison moléculaire de la souche clinique avec les souches prélevées dans l'environnement (Gaia *et al.* 2005; Khodr *et al.* 2016). L'isolement des légionelles est réalisé à partir des expectorations ou d'un prélèvement broncho-pulmonaire (aspiration trachéale, lavage bronchoalvéolaire (LBA), brosse). La culture est lente (de 3 à 10 jours) et s'effectue sur un milieu spécifique (milieu BCYE) additionné d'antibiotiques (Jarraud *et al.* 2013). Par ailleurs, des méthodes de co-culture des prélèvements pulmonaires sur un tapis amibien permettent d'éliminer la flore oropharyngée contaminante afin d'augmenter la sensibilité de la culture des légionelles (Descours *et al.* 2012).

- La PCR sur prélèvements respiratoires :

Cette méthode permet un diagnostic rapide de toutes les espèces de *Legionella*. Elle est généralement réalisée à partir d'un prélèvement pulmonaire, la sensibilité variant de 80 à 100% avec une spécificité proche de 100% (Jarraud *et al.* 2013). L'amplification d'ADN est également possible à partir d'un prélèvement sanguin ou urinaire, cependant la sensibilité chute à 30% (Matsiota-Bernard *et al.* 2000).



République française

Médecin ou biologiste déclarant (tampon)	Si notification par un biologiste
Nom :	Nom du clinicien :
Hôpital/service :	
Adresse :	Hôpital/service :
Téléphone :	Adresse :
Télécopie :	Téléphone :
Signature :	Télécopie :

Maladie à déclaration obligatoire — cerfa N° 12202 *02

Légionellose

Important : cette maladie justifie une intervention urgente locale, nationale ou internationale. Vous devez la signaler par tout moyen approprié (téléphone, télécopie…) au médecin de l'ARS avant même confirmation par le CNR ou envoi de cette fiche.

Initiale du nom : ☐ Prénom : …… Sexe : ☐ M ☐ F Date de naissance : ☐☐/☐☐/☐☐☐☐

Code d'anonymat : ☐☐☐ ☐☐☐ ☐☐☐ ☐☐☐ (A établir par l'ARS) Date de la notification : ☐☐/☐☐/☐☐☐☐

Code d'anonymat : ☐☐☐ ☐☐☐ ☐☐☐ ☐☐☐ (A établir par l'ARS) Date de la notification : ☐☐/☐☐/☐☐☐☐

Sexe : ☐ M ☐ F Année de naissance : ☐☐☐☐ Code postal du domicile du patient : ☐☐☐☐☐

Signes cliniques :

Date des 1ers signes cliniques : ☐☐/☐☐/☐☐☐☐

Date d'hospitalisation : ☐☐/☐☐/☐☐☐☐

Signes cliniques évocateurs de pneumopathie : ☐ oui ☐ non

Pneumopathie confirmée radiologiquement : ☐ oui ☐ non

Evolution : ☐ guérison ☐ encore malade ☐ décès

Si décès, date : ☐☐/☐☐/☐☐☐☐

Légionellose

Critères de notification : pneumopathie associée à au moins un des résultats suivants :

Cas confirmé :
1. isolement de *Legionella spp.*
2. augmentation du titre d'anticorps (×4) avec un 2e titre minimum de 128
3. présence d'antigène soluble urinaire

Cas probable :
4. titre d'anticorps élevé (≥256)
5. PCR positive

Confirmation du diagnostic :

	Pos	Nég	Non effectué	En cours
Culture	☐	☐	☐	☐
Antigène soluble urinaire	☐	☐	☐	
PCR	☐	☐	☐	

Sérologie

1er prélèvement	2e prélèvement
Date : ☐☐/☐☐/☐☐☐☐	Date : ☐☐/☐☐/☐☐☐☐
Titre 1 : ……	Titre 2 : ……

Espèce/sérogroupe : ☐ *L. pneumophila* sérogroupe 1 ☐ autre espèce, préciser : ……

☐ *L. pneumophila* autre sérogroupe, préciser : …… ☐ en cours

Facteurs favorisants : ☐ hémopathie ou cancer ☐ corticothérapie ☐ autres immunosuppresseurs

☐ tabagisme ☐ diabète ☐ autres, préciser : ……

Exposition à risque (dans les **10 jours** précédant les premiers signes de légionellose) : **indiquer précisément les lieux d'exposition, types d'hébergements (ville, pays) et adresse** (si nécessaire, détails sur une feuille jointe)

	Oui	Non	Période	Etablissement : ……
Hôpital	☐	☐	du ☐☐/☐☐/☐☐☐☐ au ☐☐/☐☐/☐☐☐☐	Service : ……
Maison de retraite	☐	☐	du ☐☐/☐☐/☐☐☐☐ au ☐☐/☐☐/☐☐☐☐	Ville : ……
				Préciser :
Station thermale	☐	☐	du ☐☐/☐☐/☐☐☐☐ au ☐☐/☐☐/☐☐☐☐	……
Hôtel, camping, voyage…	☐	☐	du ☐☐/☐☐/☐☐☐☐ au ☐☐/☐☐/☐☐☐☐	……
Piscine, jacuzzi…	☐	☐	du ☐☐/☐☐/☐☐☐☐ au ☐☐/☐☐/☐☐☐☐	……
Autre exposition (loisirs, professionnelle…)	☐	☐	du ☐☐/☐☐/☐☐☐☐ au ☐☐/☐☐/☐☐☐☐	……

Notion de cas groupés (cas liés aux mêmes lieux d'exposition) :

☐ oui ☐ non Si oui, préciser : ……

Médecin ou biologiste déclarant (tampon)	Si notification par un biologiste	ARS (signature et tampon)
Nom :	Nom du clinicien :	
Hôpital/service :		
Adresse :	Hôpital/service :	
Téléphone :	Adresse :	
Télécopie :	Téléphone :	
Signature :	Télécopie :	

Maladie à déclaration obligatoire (Art L.3113-1, R.3113-1, R.3113-2, R.3113-5, D.3113-7 du Code de la santé publique)

Information individuelle des personnes - Droit d'accès et de rectification pendant 6 mois par le médecin déclarant (loi du 6 janvier 1978) - Centralisation des informations à l'Institut de veille sanitaire

Figure 6. Fiche de notification des cas diagnostiqués de légionellose (Source InVS).

- La sérologie :

Cette méthode ne permet qu'un diagnostic tardif voire rétrospectif. Les anticorps ne sont détectables qu'en moyenne 2 semaines après l'apparition des premiers symptômes, un pic étant atteint après 4 à 5 semaines. L'infection à *Legionella* est confirmée en cas d'une augmentation par 4 du titre d'anticorps entre deux prélèvements (réalisés à 3 à 4 semaines d'intervalle), mesurée par immunofluorescence indirecte (Jamilloux *et al.* 2012).

I.2.4 Epidémiologie

En France, la légionellose est une maladie à déclaration obligatoire. Cela implique que tous les cas de légionellose suspectés ou diagnostiqués par les médecins et les biologistes doivent être signalés à l'Agence Régionale de Santé (ARS). Une fois le diagnostic confirmé, une fiche de notification spécifique, incluant les informations cliniques, les résultats des examens bactériologiques, les facteurs de risque individuels et les sources d'exposition potentielles (**Figure 6**), est complétée et envoyée à l'ARS pour validation. Cette fiche est ensuite transmise à l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) chargé d'examiner ces données au niveau national et de détecter d'éventuels cas groupés.

En 2015, 1389 cas ont été rapportés en France grâce au dispositif de surveillance de la légionellose, soit un taux d'incidence des cas notifiés en France métropolitaine de 2,1 pour 100 000 habitants (**Figure 7**) (Source InVS).

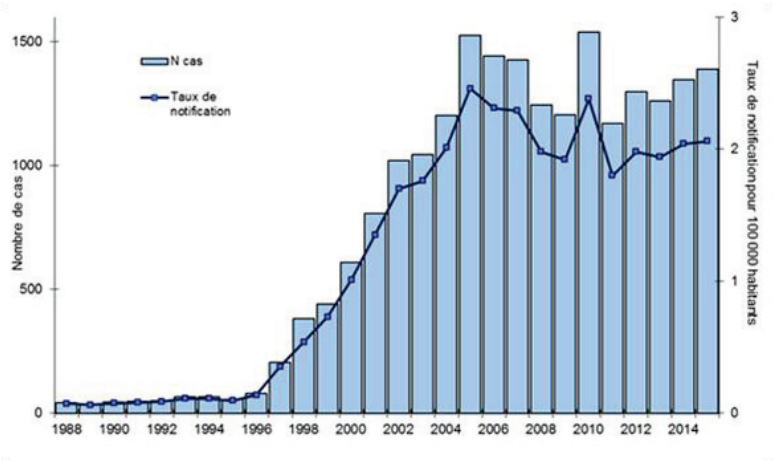


Figure 7. Evolution du nombre et du taux d'incidence annuels des cas notifiés de légionellose en France entre 1988 et 2015 (Source InVS).

Le nombre cas est en légère hausse par rapport à l'année 2014, au cours de laquelle 1348 cas avaient été rapportés. L'âge médian des patients était de 63 ans (min : 17 ans, max : 101 ans) pour un *sexe ratio* de 2.5 (992 hommes et 397 femmes). L'incidence augmente avec l'âge et le taux d'incidence le plus fort est observé pour les personnes de plus de 80 ans (6.4/100 000). Si chacun est susceptible de contracter la légionellose, certains facteurs augmentent le risque d'infection. Ces facteurs incluent l'âge avancé, le sexe masculin, le

tabagisme, le diabète, une pathologie chronique cardiaque ou pulmonaire, une insuffisance rénale, l'alcoolisme et l'immunodépression. En 2015, 76% des patients atteints de légionellose (1059/1389) présentaient au moins un facteur de risque connu (**Tableau 1**). Le taux de mortalité rapporté était de 9%, contre 9.5% en 2014 (Source InVS). Enfin, l'espèce *L. pneumophila* sérogroupe 1 a été identifiée dans plus de 96% des cas de légionelloses répertoriés.

Tableau 1. Fréquence des facteurs favorisants des cas de légionellose en France en 2015 (Source InVS).

Facteurs favorisants *	Nombre de cas	Pourcentage
Cancer/hémopathie	177	13
Corticothérapie/immunosuppresseurs	163	12
Diabète	261	19
Tabagisme	615	44
Autres	239	17
Au moins un facteur	1059	76

* non mutuellement exclusifs

Les souches cliniques de légionelles sont envoyées de manière systématique au Centre Nationale de Référence des légionelles (CNR-L) afin de procéder à un typage moléculaire. Les souches d'origine environnementale sont quant à elles envoyées à la demande de l'ARS, dans le cadre de la comparaison avec les souches isolées des patients. Trois méthodes de typage sont alors appliquées. La première méthode correspond à un typage phénotypique basé sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux permettant de subdiviser les isolats de *L. pneumophila* sg1 en 9 sous-groupes (Knoxville, Philadelphia, Benidorm, France/Allentown, Olda, Oxford, Bellingham, Heysham et Camperdown) (Helbig *et al.* 2002). La deuxième méthode permet d'identifier toutes les espèces de *Legionella* et repose sur l'analyse des profils de macrorestriction de l'ADN total par électrophorèse en champ pulsé (ou PFGE, *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*). Pour cela, l'ADN bactérien est digéré par des enzymes à sites de clivages rares et les fragments sont séparés par électrophorèse en champ pulsé. Les profils ainsi obtenus sont ensuite comparés à une base de données. La troisième méthode de typage nommée SBT (*Sequence-Based Typing*) consiste à amplifier puis à séquencer 7 portions de gènes consensus, incluant les gènes de ménage *asd* (*aspartate-β-semialdehyde dehydrogenase*) et *neuA* (*N-acetylneuraminate cytidylyl transferase*), et les gènes *flaA* (flagelline), *pilE* (piline de type IV), *mip* (*macrophage infectivity potentiator*), *mompS* (*major outer membrane protein S*) et *proA* (métalloprotéase à zinc) associés à la virulence (Gaia *et al.* 2005). Un numéro d'allèle est attribué à chaque gène afin d'obtenir un profil allélique, correspondant à la succession des numéros d'allèles des 7 gènes séparés par une virgule dans l'ordre prédéfini : *flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA* et *neuA*. Chaque profil allélique est associé à un « *Sequence Type* » (ST) (ex : le profil allélique 1,4,3,1,1,1,1 correspond au ST1). En

octobre 2016, la base de données du réseau européen de surveillance des infections à *Legionella* (EWGLI, *European Working Group for* Legionella *Infections*) recensait 2251 STs distincts (http://bioinformatics.phe.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php). Plusieurs études ont montré que la majorité des cas de légionellose sont causés par un nombre restreint de STs (ST1, ST23, ST37, ST40, ST47 et ST62) (Borchardt *et al.* 2008; Harrison *et al.* 2009; Tijet *et al.* 2010; Moran-Gilad *et al.* 2014; David *et al.* 2016; Khodr *et al.* 2016). De même, les données du CNR-L indiquent que plus de 53% des isolats cliniques collectés en 2014 appartiennent à 8 STs : les ST23 (17.4%), ST47 (6.1%), ST1 (8.5%), ST62 (4.2%), ST259 (4.8%), ST40 (4.5%), ST20 (3.3%) et ST701 (3.3%) (National 2013). Une analyse de la distribution des STs réalisée sur une période de 7 ans (entre 2008 et 2014) a permis de montrer que les ST20, 37, 40, 44, 62, 259 et 701 semblent émerger ces dernières années (National 2013). Le SBT constitue la méthode de référence européenne grâce à son fort pouvoir discriminant et à la reproductibilité des données entre les laboratoires. Cependant, malgré un indice de discrimination élevé (> 0.94) (Gaia *et al.* 2005), le SBT ne permet pas toujours de distinguer des souches isolées dans des sources environnementales différentes. Le séquençage global du génome ou WGS (*Whole Genome Sequencing*) s'impose alors peu à peu comme une approche de choix pour les investigations des cas de légionellose (Didelot *et al.* 2012; Reuter *et al.* 2013; Graham *et al.* 2014; Lévesque *et al.* 2014; Kwong *et al.* 2015; Moran-Gilad *et al.* 2015; Sánchez-Busó *et al.* 2016). Les travaux de David *et al.* ont montré que le WGS permet d'obtenir un indice de discrimination supérieur à celui du SBT, compris entre 0.99 et 0.999 selon la méthode employée (David *et al.* 2016). La résolution du WGS a ainsi permis à plusieurs équipes de faire la distinction entre des isolats responsables d'épidémie et des isolats non associés à l'épidémie en termes de temps et d'espace (Reuter *et al.* 2013; Graham *et al.* 2014; Lévesque *et al.* 2014; Moran-Gilad *et al.* 2015; Sánchez-Busó *et al.* 2016).

I.2.5 Traitement et résistance aux antibiotiques

I.2.5.1 Traitement

Le traitement de la légionellose est basé sur l'utilisation d'antibiotiques doués d'une bonne diffusion intracellulaire tels que les macrolides, les fluoroquinolones et la rifampicine. Le choix du traitement est déterminé en fonction de la sévérité de l'infection, du terrain de l'hôte et des effets indésirables potentiels. Ainsi, l'Afssaps (Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé) recommande l'utilisation d'un macrolide (azithromycine, clarithromycine, roxithromycine, josamycine, spiramycine ou érythromycine) en monothérapie pour le traitement des formes légères à modérées (formes ambulatoires ou formes hospitalisées dans un service d'urgences ou de médecine) (Afssaps 2011). Le traitement des formes graves (patient hospitalisé dans un service de soins intensifs ou de réanimation) et des patients immunodéprimés repose quant à lui sur une monothérapie par fluoroquinolones (lévofloxacine, ofloxacine ou ciprofloxacine) ou par association de 2 antibiotiques parmi les 3

familles suivantes : macrolide (spiramycine ou érythromycine), fluoroquinolone (lévofloxacine, ofloxacine ou ciprofloxacine) et rifampicine. L'utilisation des fluoroquinolones doit être raisonnée notamment en raison du risque d'émergence de souches résistantes. De même, les associations comprenant la rifampicine ne sont pas privilégiées en raison des interactions médicamenteuses potentielles. La durée de traitement des formes non graves est de 8 à 14 jours, prolongée à 21 jours pour les formes graves ou chez les patients immunodéprimés (Afssaps 2011).

I.2.5.2 Mécanismes d'action des antibiotiques et résistance

I.2.5.2.1 Mécanismes d'action des antibiotiques

La rifampicine agit en se fixant au niveau d'une poche de la sous-unité β de l'ARN polymérase bactérienne, codée par le gène *rpoB*. Cette interaction bloque la synthèse de la deuxième ou de la troisième liaison phosphodiester des transcrits, inhibant ainsi l'élongation de la molécule d'ARN (Campbell *et al.* 2001). Les fluoroquinolones inhibent quant à elles l'activité de l'ADN gyrase et de la topoisomérase IV, deux topoisomérases de type II essentielles à la synthèse de l'ADN bactérien. Ces enzymes sont impliquées dans le superenroulement négatif de l'ADN en catalysant le clivage d'un segment d'ADN double-brin, nommé segment G (pour *gate*) afin de permettre le passage d'un second segment d'ADN double-brin, nommé segment T (pour *transport*), au travers du fragment G (**Figure 8**).

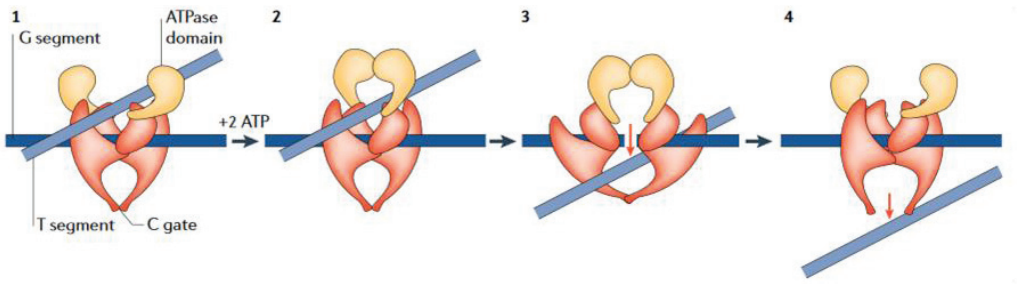


Figure 8. Schéma du mécanisme d'action des topoisomérases de type II (Cozzarelli *et al.* 2006). (1) La topoisomérase de type II (en rouge et jaune) se fixe au segment d'ADN G (bleu foncé) et eu segment T (bleu clair), (2) Deux molécules d'ATP sont hydrolysées, puis le domaine ATPase (en jaune) se ferme, (3) Le segment G est clivé and le segment T est transporté de la première cavité à la seconde cavité à travers le segment G, (4) Le fragment T est libéré au niveau du domaine C.

L'ADN gyrase et la topoisomérase IV sont des hétérotétramères de deux sous-unités différentes. L'ADN gyrase est constituée de deux sous-unités GyrA et de deux sous-unité GyrB codées par les gènes *gyrA* et *gyrB*, respectivement ; tandis que la topoisomérase IV est consituée de deux sous-unités ParC et de deux sous-unité ParE codées par les gènes *parC* et *parE*, respectivement (Hawkey 2003). Les fluoroquinolones se fixent au complexe ADN/topoisomérase de type II et induisent un changement de conformation de l'enzyme, prévenant la re-ligation du segment d'ADN clivé. Cette action inhibe la réplication de l'ADN

et confère une activité bactéricide aux fluoroquinolones (Hawkey 2003). De leur côté, les macrolides inhibent la synthèse protéique en se fixant à l'ARN ribosomal (ARNr) 23S, formant avec l'ARNr 5S et 34 protéines ribosomales (nommées L1 à L34) la sous-unité 50S du ribosome bactérien. En se fixant au niveau du tunnel de cheminement du peptide en cours de formation, les macrolides bloquent l'élongation des peptides par encombrement stérique, entrainant alors la libération du peptidyl-ARNt et l'arrêt de la traduction (Tenson *et al.* 2003).

I.2.5.2.2 Mécanismes de résistance aux antibiotiques

Malgré une prise en charge précoce et l'administration d'un traitement adapté, des échecs thérapeutiques sont régulièrement rapportés (Tan *et al.* 2001; O'Reilly *et al.* 2005; Dominguez *et al.* 2009). Selon une hypothèse actuellement envisagée, ce phénomène pourrait être lié à la présence de résistances aux antibiotiques non détectées du fait de la rareté de la réalisation d'antibiogrammes. Cette théorie est appuyée d'une part par la facilité de sélection de souches résistantes *in vitro* (Dowling *et al.* 1984; Nielsen *et al.* 2000; Almahmoud *et al.* 2009), et d'autre part par la récente description de la première souche de *Legionella* résistante aux fluoroquinolones (isolée d'un patient atteint de légionellose traité par ciprofloxacine) et de la détection *in vivo* par NGS (*New Generation Sequencing*) de la sélection de deux mutations associées à la résistance aux fluoroquinolones chez deux patients au cours du traitement par fluoroquinolones (Bruin *et al.* 2014; Shadoud *et al.* 2015). Les mécanismes de résistance aux antibiotiques de *Legionella* sont à ce jour encore peu documentés. Certains d'entre eux ont néanmoins été décrits grâce à la caractérisation de mutants résistants à la rifampicine, aux fluoroquinolones ou aux macrolides sélectionnés *in vitro* (Nielsen *et al.* 2000; Almahmoud *et al.* 2009; Descours *et al.* 2016; Massip *et al. soumis en* 2016). Chez *Legionella*, la résistance à la rifampicine peut être acquise suite à l'apparition de mutations dans le gène *rpoB* codant pour la sous-unité β de l'ARN polymérase. Nielsen *et al.* ont en effet identifié 6 types de mutations ponctuelles capables d'accroitre entre 200 et 16 000 fois la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la rifampicine (Nielsen *et al.* 2000). De manière analogue, la résistance de *L. pneumophila* à la moxifloxacine peut être multipliée par 512 suite à l'apparition de mutations par substitutions dans les gènes *gyrA*, *gyrB* et *parC* codant la topoisomérase II (Almahmoud *et al.* 2009). Les auteurs ont montré que l'augmentation progressive de la résistance est liée à un ordre précis dans l'apparition de ces mutations : la substitution T83I dans GyrA est systématiquement la première à apparaitre, suivie par les substitutions G78D ou S80R dans ParC, puis par la substitution D87N dans GyrA, ou par les substitutions S464Y ou D426N dans GyrB (Almahmoud *et al.* 2009). De même, la résistance de *L. pneumophila* à l'érythromycine et à l'azithromycine peut être multipliée par 4096 grâce à l'apparition de mutations dans les gènes codant l'ARNr 23S (*rrl*) avec ou non des mutations dans les protéines ribosomales L4 (*rplD*) et L22 (*rplV*). Isolément, les mutations affectant les protéines L4 et L22 conduisent à un bas niveau de résistance aux macrolides

(CMI des mutants 32 fois plus élevée que la CMI de la souche parentale sensible). Les mutations affectant l'ARNr 23S confèrent à *L. pneumophila* un haut niveau de résistance aux macrolides, variable selon la position de la mutation, du type de substitution et du nombre de copies mutées (CMI des mutants 2048 à 4096 fois plus élevée que la CMI de la souche parentale sensible) (Descours *et al.* 2016). La stratégie de séquençage du génome des mutants résistants aux macrolides utilisée pour identifier ces différentes mutations a par ailleurs permis de détecter chez certains clones résistants à l'azithromycine des substitutions supplémentaires dans la région promotrice des gènes *lpeA* et *lpeB* (Massip *et al.* soumis en 2016). Les travaux de Massip *et al*. ont montré que ces deux gènes codent pour des composants d'une pompe à efflux impliquée dans la résistance aux macrolides de *L. pneumophila*. L'exposition aux macrolides induit une surexpression des protéines LpeAB, associée à une sensibilité réduite aux macrolides indépendamment de l'apparition de mutations (Massip *et al.* soumis en 2016). Chez les mutants résistants à l'azithromycine, la présence des substitutions en amont des gènes *lpeAB* induit une augmentation de l'expression protéique, sans toutefois modifier le niveau de résistance aux macrolides. D'après les auteurs, la pompe à efflux comprenant LpeA et LpeB constituerait un mécanisme de résistance auxiliaire de bas niveau.

I.2.5.3 Etude de la sensibilité de Legionella *aux antibiotiques*

L'activité des antibiotiques sur *Legionella* peut être évaluée par différentes méthodes extracellulaires :

- La méthode de dilution en milieu liquide consiste à inoculer la souche à tester dans une gamme de dilution d'antibiotique réalisée en milieu de culture liquide (BYE) en tube ou en microplaque. Après 48 heures d'incubation, la CMI est identifiée comme la plus petite concentration d'antibiotique pour laquelle aucune croissance bactérienne n'est observée.

- La méthode de dilution en milieu solide consiste à incorporer une concentration donnée d'antibiotique dans un milieu (BCYE) gélosé coulé en boite de Petri. La surface de la gélose est ensuite ensemencée sous forme de spot avec les souches à tester. Après 48 à 96 heures d'incubation, la CMI de chaque souche est identifiée par l'inhibition de la croissance sur le milieu contenant la plus petite concentration d'antibiotique.

- La méthode de diffusion consiste à déposer des disques de papiers imprégnés d'antibiotiques sur milieu gélosé préalablement ensemencée avec la souche à étudier. L'antibiotique diffuse dans la gélose, créant ainsi un gradient de concentration autour du disque. Après 48 à 96 heures d'incubation, le diamètre d'inhibition est mesuré et comparé à celui d'une souche sensible. Cette technique fournit des résultats qualitatifs et est utilisée pour le dépistage des résistances de haut niveau.

- La méthode du E-test® consiste à déposer une bandelette imprégnée d'un gradient continu d'antibiotique sur un milieu gélosé préalablement ensemencé avec la souche à étudier. Après 48 à 96 heures d'incubation, la CMI se lit directement sur la bandelette graduée à l'intersection entre l'ellipse d'inhibition et la bandelette.

A ce jour, il n'existe aucune méthode standardisée pour évaluer la sensibilité de *Legionella*. Les seuils épidémiologiques de sensibilité n'ont été décrits que pour la méthode utilisant un milieu solide au charbon qui adsorbe les antibiotiques (Bruin *et al.* 2011).

I.3 Cycle de vie intracellulaire

Lors d'une infection, les bactéries sont ingérées par les cellules phagocytaires et se retrouvent piégées dans une vacuole prise en charge par le système endolysosomale. Les bactéries sont alors digérées dans un phagolysosome, un compartiment acide contenant diverses enzymes hydrolytiques (Scott *et al.* 2003). Les bactéries à mode de vie intracellulaire se sont adaptées afin d'éviter cette dégradation. L'infection par *L. pneumophila* débute par l'adhésion et l'internalisation de la bactérie par la cellule hôte (**Figure 9**).

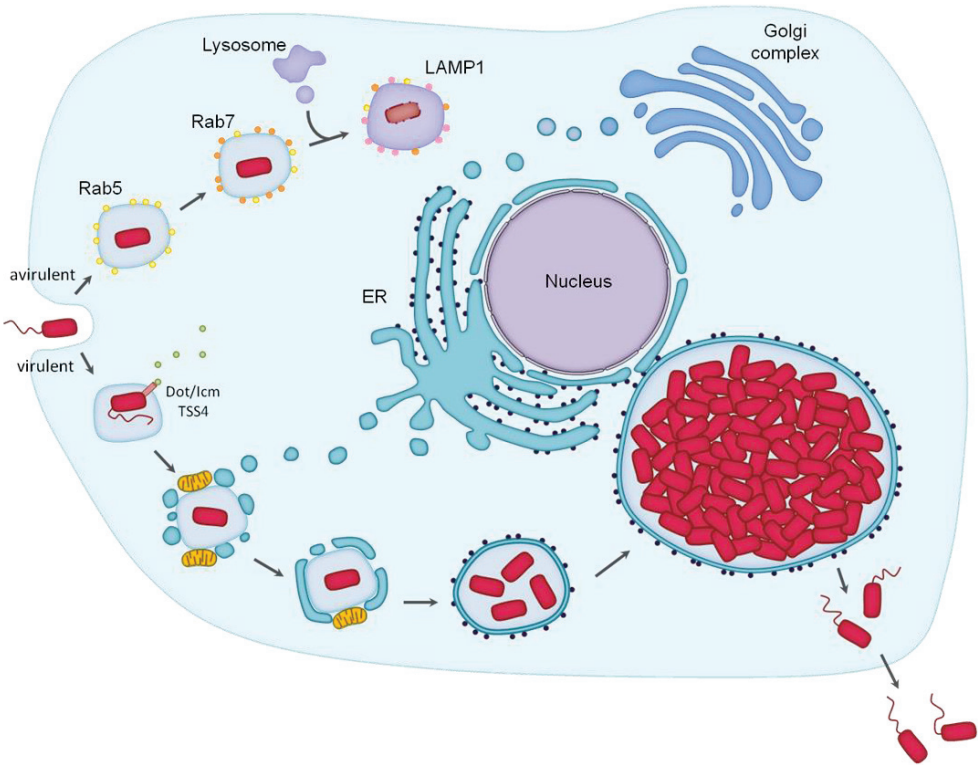


Figure 9. Cycle infectieux de *Legionella pneumophila*. *L. pneumophila* est internalisée par la cellules-hôte eucaryote dans un phagosome. Les bactéries virulentes bloquent la voie de maturation du phagosome et injectent des effecteurs via leur système de sécrétion de type 4 (TSS4) pour créer une vacuole de réplication (LCV). *L. pneumophila* recrute rapidement des mitochondries et des vésicules de réticulum endoplasmique (ER) à la surface de sa LCV, puis des ribosomes avant d'entamer sa réplication. Une fois les ressources de la cellule hôte épuisées, les bactéries lyse leur LCV et la cellule pour être libérées dans le milieu extracellulaire afin d'infecter les cellules avoisinantes.

Dès les premières minutes de contact, la bactérie injecte toute une gamme de protéines bactériennes dans le cytoplasme de son hôte via son système de sécrétion de type IV (SST4) Dot/Icm (*Defect in organelle trafficking/Intracellular multiplcation*). Grâce à cette action, *Legionella* échappe à la voie endosomale et entame la confection d'une niche de réplication dans sa vacuole, aussi appelée « Legionella-*containing vacuole* » (LCV). La LCV se recouvre alors de petites vésicules de réticulum endoplasmique (RE), de mitochondries et de ribosomes (**Figure 10**) (Horwitz 1983; Tilney *et al.* 2001). Lorsque les ressources de l'hôte sont épuisées, les bactéries lysent la LCV puis la cellule pour être libérées dans le milieu extracellulaire, où elles sont libres d'infecter les cellules avoisinantes (Hubber & Roy 2010). Pour s'adapter à ce changement d'environnement, *Legionella* adopte un mode de vie biphasique alternant entre une phase réplicative intracellulaire et une phase transmissive virulente.

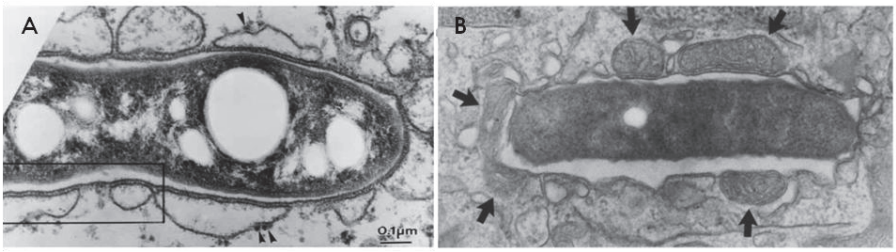


Figure 10. Recrutement des vésicules de réticulum endoplasmique (RE) et de mitochondries sur la LCV (Tilney *et al.* 2001 ; Horwitz 1983). (A) La photo de microscopie électronique a été réalisée après 15 min d'infection de macrophages par *L. pneumophila*. Le cliché montre une légionelle dans un phagosome, entouré de vésicules de RE. Les flèches indiquent la présence de ribosomes attachés aux vésicules de RE. (B) La photo de microscopie électronique a été réalisée après 1hd'infection de monocytes par *L. pneumophila*. Le cliché montre une légionelle dans un phagosome entouré de vésicules et de 5 mitochondries (flèches).

La partie suivante expose les connaissances actuelles relatives au SST4 Dot/Icm de *L. pneumophila*, de ses effecteurs et de leurs rôles dans chaque étape du cycle infectieux de la bactérie.

I.3.1 Le système de sécrétion Dot/Icm et les effecteurs bactériens

Le système de sécrétion de type IV Dot/Icm tient un rôle central dans la virulence de *L. pneumophila*. Tout au long de l'infection, il permet la translocation d'environ 300 protéines bactériennes différentes, aussi connues sous le nom d'effecteurs ou de substrats du SST4. L'échappement à la voie endosomale et la réplication intracellulaire des légionelles dépendent entièrement du SST4, codé par 27 gènes *dot/icm* exprimés constitutivement (Marra *et al.* 1992; Berger *et al.* 1994; Segal & Shuman 1997; Vogel *et al.* 1998). La mutation de la plupart de ces gènes entraine une incapacité à recruter les vésicules de RE autour de la LCV et aboutit à l'acquisition de marqueurs de la voie endosomale (Sadowsky *et al.* 1993; VanRheenen *et al.* 2004).

I.3.1.1 Structure du système de sécrétion Dot/Icm

A ce jour, l'organisation du SST4 n'est que partiellement élucidée (**Figure 11**) et la fonction de certaines protéines qui le composent reste à déterminer. Les protéines Dot/Icm peuvent néanmoins être divisées en différentes classes (Isberg *et al.* 2009) :

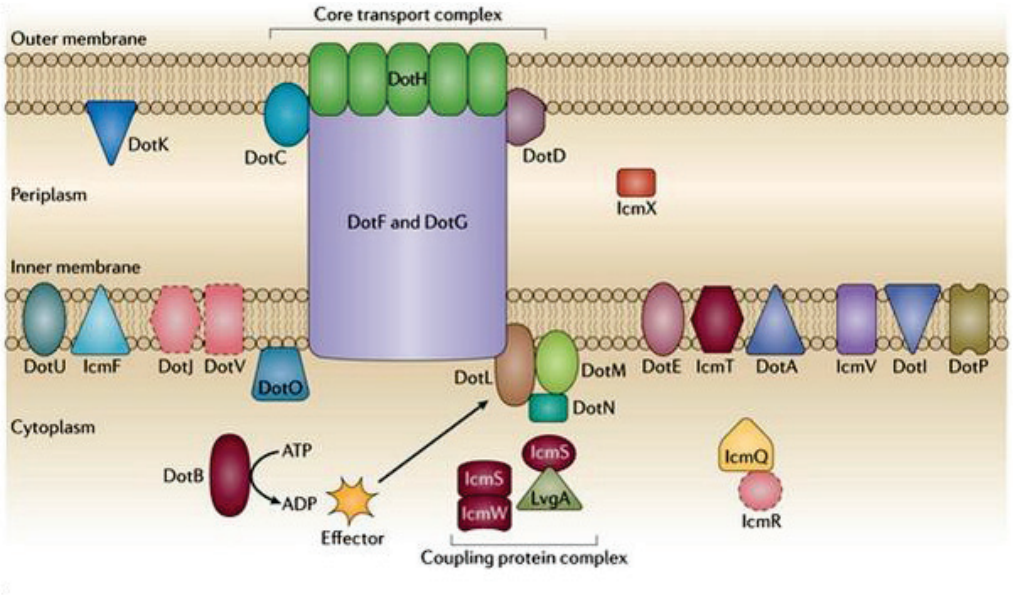


Figure 11. Schéma du système de sécrétion de type IV Dot/Icm de *Legionella pneumophila* (Schaik *et al.* 2013).

- Les protéines du core transmembranaire : DotC, DotD, DotF, DotG et DotH

Le core du système de sécrétion de type IV Dot/Icm est formé par les protéines DotC, DotD et DotH situées dans la membrane externe, et par les protéines DotF et DotG localisées dans la membrane interne (Vincent *et al.* 2006; Schaik *et al.* 2013). Ces composants forment une structure transmembranaire circulaire, observée par microscopie électronique par Kubori *et al.* (**Figure 12A**) (Kubori *et al.* 2014). L'observation microscopique de cette structure chez une souche sauvage et chez des souches mutantes Δ*dotG* et Δ*dotF* a permis d'identifier l'organisation spatiale de chaque protéine du core du SST4 Dot/Icm. D'après les auteurs, la protéine DotG formerait le pore central du SST4, traversant à la fois la membrane interne et la membrane externe. Le core apparait alors sous forme d'une structure circulaire d'environ 40 nm de diamètre contenant un pore d'environ 8 nm (**Figure 12B**, *wild-type*), les protéines DotC, DotD et DotH étant indispensables à la formation du core. Le core formé chez un mutant Δ*dotG* présente un pore plus large (**Figure 12B**, Δ*dotG*) et ne permet pas la translocation des effecteurs bactériens. Le mutant Δ*dotF* produit quant à lui 2 types de cores contenant ou non la protéine DotG (**Figure 12B**, Δ*dotF*), et présente un défaut partiel de translocation des effecteurs. Les travaux de Kubori *et al.* suggèrent donc que DotG forme le

pore central du SST4 et que DotF, bien que non essentiel, guide l'implantation de la protéine DotG et permet de stabiliser l'ensemble de la structure (Kubori *et al.* 2014).

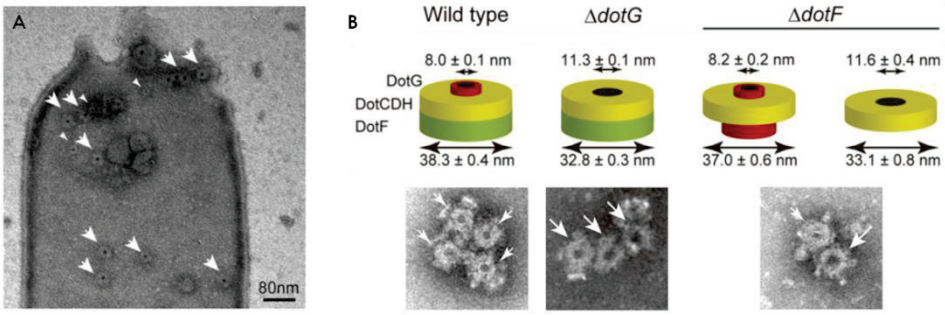


Figure 12. Structure du core du système de sécrétion de type IV Dot/Icm de *L. pneumophila* (Kubori *et al.* 2014). (A) Photo de microscopie électronique à transmission de la surface de *L. pneumophila*. Les grandes et les petites flèches indiquent les cores de grande et de petite taille, respectivement. (B) Schémas du core du système de sécrétion de type IV Dot/Icm observé chez une souche de *L. pneumophila* sauvage, Δ*dotG* ou Δ*dotF*. La moyenne des diamètres interne et externe du core, ainsi qu'une photo de microscopie électronique à transmission de la surface bactérienne sont associées à chaque type de structure. Les petites et les grandes flèches indiquent les pores de petit et de grand diamètre, respectivement.

- Les protéines chaperonnes : IcmS, IcmW et LvgA

Les protéines IcmS, IcmW et LvgA sont localisées dans le cytosol bactérien où elles forment des hétérodimères IcmS/IcmW et IcmS/LvgA (Coers *et al.* 2000; Ninio *et al.* 2005; Vincent & Vogel 2006). Ces complexes ont montré une capacité à fixer certains effecteurs bactériens, notamment SdeA, SidA, SidB, SidC, SidD, SidE, SidG, SidH, PieA, PieA, PieB, PieD, PieE, PieF, PieG, PpeA, PpeB et PpgA (Bardill *et al.* 2005; Cambronne & Roy 2007; Ninio *et al.* 2009). Les complexes IcmS/IcmW et IcmS/LvgA seraient chargés de présenter les effecteurs au système de sécrétion Dot/Icm, *via* une interaction avec la protéine membranaire DotL (Sutherland *et al.* 2012). Cette propriété évoque celle des protéines chaperonnes impliquées dans la présentation de substrat au système de sécrétion de type III. D'après le modèle proposé par Sutherland *et al*. (**Figure 13**), l'interaction avec le complexe IcmS/IcmW permet aux effecteurs d'adopter une conformation facilitant sa reconnaissance par la protéine DotL. Une fois l'effecteur engagé dans le SST4, le complexe IcmS/IcmW doit être transféré sur la protéine DotL, puis recyclé pour la translocation de nouveaux effecteurs.

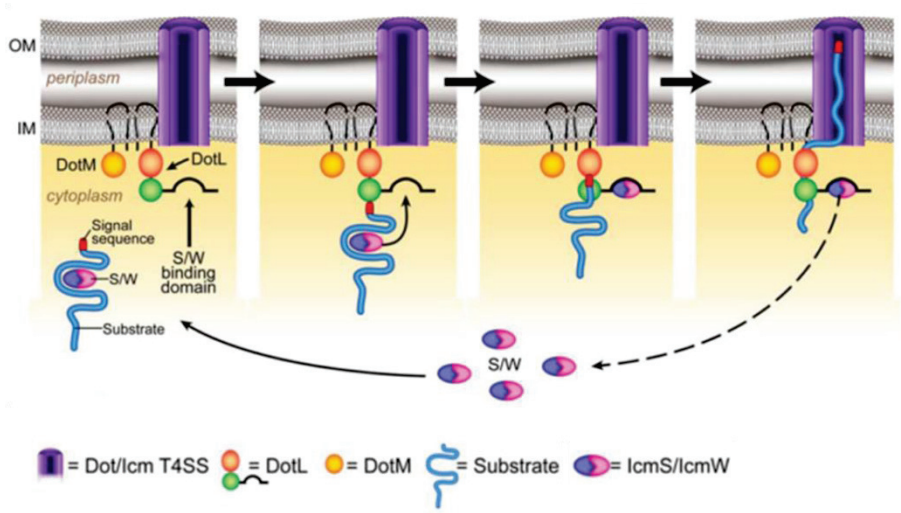


Figure 13. Modèle de sécrétion des effecteurs dépendants du complexe IcmS/IcmW via le système de sécrétion de type IV Dot/Icm de *L. pneumophila* (Sutheland *et al.* 2012). L'effecteur interagit avec le complexe IcmS/IcmW afin d'acquérir la conformation requise pour la translocation. L'effecteur est dirigé vers la membrane interne par sa séquence signal et interagit avec la protéine DotL. Une fois l'effecteur engagé dans le SST4 Dot/Icm, le complexe IcmS/IcmW doit se détacher et être transféré vers la protéine DotL. Le complexe IcmS/IcmW doit alors se dissocier de la protéine DotL et retourner à l'état cytoplasmique afin d'interagir avec de nouveaux effecteurs. OM : membrane externe, IM : membrane interne, substrate : effecteur.

- Les protéines à activité ATPase : DotL, DotM et DotN

La protéine DotL, située dans la membrane interne de *L. pneumophila*, présente une similarité de séquence avec une famille de protéines à activité ATPase connue sous le nom de T4CPs (*Type IV secretion system Coupling Proteins*) (Buscher *et al.* 2005). Dans d'autres modèles bactériens, les T4CPs sont impliquées dans le transfert de substrats vers le système de sécrétion. Des travaux de cristallographie ont montré que ces protéines s'associent en hexamère formant un canal à travers lequel les substrats doivent passer pour accéder au SST4, et dont la fermeture et l'ouverture sont régulées par la fixation d'ATP et la libération d'ADP, respectivement (**Figure 14**) (Yeo *et al.* 2000). La protéine DotL est indispensable pour la croissance intracellulaire de *L. pneumophila*, et requiert une interaction directe avec les protéines membranaires DotM et DotN, mais également avec les complexes IcmS/IcmW et IcmS/LvgA pour réguler la sécrétion des effecteurs (Buscher *et al.* 2005; Sutherland *et al.* 2012; Vincent *et al.* 2012).

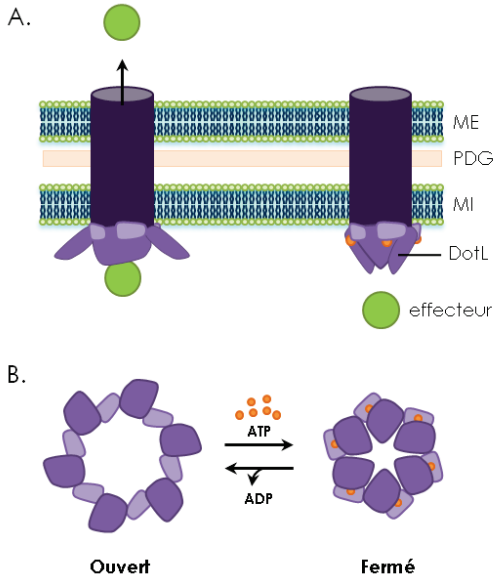


Figure 14. Modèle de régulation de la protéine DotL du système de sécrétion de type IV Dot/Icm de *L. pneumophila* (d'après Yeo *et al.* 2000 et Buscher *et al.* 2005). (A) Vue latérale et (B) vue depuis le compartiment cytoplasmique de l'hexamère de protéines DotL. Les domaines N-terminal et C-terminal de la protéine DotL sont représentés en violet clairet violet foncé, respectivement. Les sphères orange représentent les molécules d'ATP.

- Les protéines cytoplasmiques essentielles : IcmQ et IcmR

Les protéines IcmQ et IcmR sont des composants du SST4 Dot/Icm essentiels à la croissance intracellulaire de *L. pneumophila* (Coers *et al.* 2000). Elles se situent dans le cytoplasme bactérien, chacune formant une épingle à cheveux en hélice alpha (Raychaudhury *et al.* 2010). Les protéines IcmQ et IcmR forment un hétérodimère, dans lequel IcmR agirait comme une chaperonne pour prévenir l'oligomérisation ou l'interaction de IcmQ avec d'autres protéines (Hueck 1998). Plusieurs études ont en effet montré qu'en absence de ImcR, les protéines IcmQ s'assemblent en homopolymère capable d'induire la formation de pores transmembranaires (Duménil *et al.* 2004; Raychaudhury *et al.* 2010; Farelli *et al.* 2013). Il est cependant possible que cette propriété ne soit en réalité qu'un artefact dû aux conditions expérimentales (Duménil & Isberg 2001; Farelli *et al.* 2013). Plus récemment, des travaux de cristallographie ont montré que la partie C-terminale de la protéine IcmQ présente une homologie avec le site de fixation du NAD+ de certaines ADP ribosyltransferases (ADPRTs) (Farelli *et al.* 2013). Les ADPRTs sont des enzymes capables de catalyser le transfert d'une unité d'ADP-ribosyl depuis le NAD+ vers des cibles spécifiques. Cette modification induit généralement une perte de fonction de la protéine cible (Koch-Nolte *et al.* 2001). Le rôle de la fixation de NAD+ à la protéine IcmQ n'est pas clairement défini, néanmoins deux hypothèses ont été proposées : (i) IcmQ serait une ADPRT spécialisée dans la modification d'un ou plusieurs composants du SST4 ou (ii) la fixation du NAD+ stabilise le domaine C-terminal de la protéine IcmQ, permettant à la protéine d'interagir avec un autre composant du SST4 (Farelli *et al.* 2013).

- Les protéines accessoires de la membrane interne : IcmF, DotU et IcmH

Les protéines IcmF, DotU et IcmH sont des composants de la membrane interne nécessaires mais non essentiels à la croissance intracellulaire de *L. pneumophila* (Sexton *et al.* 2004a; VanRheenen *et al.* 2004; Zusman *et al.* 2004). La délétion de ces gènes induit un défaut partiel de translocation des effecteurs bactériens, de biogénèse de la LCV et d'échappement à la voie endosomale. L'interaction des protéines IcmF et DotU permet notamment de stabiliser le SST4 Dot/Icm, en particulier lors de la transition entre la phase exponentielle de croissance et la phase stationnaire (Sexton *et al.* 2004a). En effet, l'absence de IcmF ou DotU entraine la déstabilisation des protéines DotH, DotG et DotF, trois des composants du core du SST4. Si la fonction de ces protéines n'est pas encore clairement établie, plusieurs hypothèses ont été proposées par Sexton *et al.* : (i) le complexe IcmF/DotU participe à l'assemblage du SST4 ; (ii) le complexe IcmF/DotU stabilise le core du SST4 sous une forme active et prévient sa déstabilisation lors de la transition de phase ; (iii) le complexe IcmF/DotU régule le fonctionnement du SST4, en alternant entre activité et inactivité du SST4 selon la phase de croissance bactérienne ; (iv) les protéines IcmF et DotU participent au recyclage des composants du SST4 (Sexton *et al.* 2004a).

- Les autres protéines du SST4 Dot/Icm

Les autres protéines du système de sécrétion de type IV Dot/Icm sont pour la plupart essentielles pour la formation de la LCV et pour la réplication intracellulaire de *L. pneumophila*, cependant leur rôle et leur relation avec les autres composant du SST4 restent à ce jour encore peu documentés (Isberg *et al.* 2009).

Les protéines DotO, DotV, IcmV d'une part, et la protéine IcmX d'autre part ont été décrites comme des composants de la membrane interne et du périplasme, respectivement, toutefois leur fonction demeure inconnue.

La protéine DotK est une lipoprotéine présente dans la membrane externe, dont la mutation entraine un défaut partiel de croissance dans l'amibe *Acanthamoeba castellanii*. Sa localisation ainsi que son homologie avec la protéine OmpA, une protéine interagissant avec le peptidoglycane (PDG), suggèrent que DotK soit impliquée dans l'ancrage du TSS4 Dot/Icm dans la couche de PDG de *L. pneumophila* (Nagai & Kubori 2011).

La protéine DotB est une ATPase hexamèrique localisée dans le cytoplasme bactérien et dans une moindre proportion dans la membrane interne. Des analyses phylogénétiques ont permis d'identifier une homologie avec la protéine PilT, une ATPase impliquée dans la rétractation des pili de type IV (Sexton *et al.* 2004b).

La protéine DotA est essentielle à toutes les activités dépendantes du SST4 Dot/Icm. Elle se situe dans la membrane interne de *L. pneumophila*, et est composée de 8 hélices transmembranaires, d'une large partie périplasmique et d'une partie C-terminale cytoplasmique (Roy & Isberg 1997). Sa mutation entraine un défaut total de réplication intracellulaire, cependant sa fonction est aujourd'hui encore inconnue (Berger *et al.* 1994).

La protéine IcmT, localisée dans la membrane interne de la bactérie, semble posséder une double fonction. En effet, la partie N-terminale de IcmT est essentielle pour la réplication intracellulaire, tandis que la partie C-terminale de la protéine est impliquée dans la lyse de la cellule hôte, *via* la formation de pores transmembranaires indispensable à la libération des bactéries dans le milieu extracellulaire (Molmeret *et al.* 2002b; a).

I.3.1.2 Les effecteurs sécrétés via le système de sécrétion Dot/Icm

L'identification des substrats du SST4 Dot/Icm a fait l'objet de nombreux travaux. A ce jour, environ 275 effecteurs ont été identifiés grâce à différentes approches, basées sur la recherche bioinformatique de séquences homologues à des domaines eucaryotes (Cazalet *et al.* 2004; Chien *et al.* 2004; De Felipe *et al.* 2005; Brüggemann *et al.* 2006a; Kubori *et al.* 2008), la recherche d'un motif de translocation, bien qu'aucune séquence consensus n'ai été identifiée (Nagai *et al.* 2005; Huang *et al.* 2011), la recherche de gènes présentant en amont un site de fixation des éléments régulateurs PmrA ou CpxR (Zusman *et al.* 2007; Altman & Segal 2008), la recherche de protéines interagissant avec des composants du TSS4 (IcmS-IcmW) (Bardill *et al.* 2005; Ninio *et al.* 2005), l'identification de protéines perturbant les processus cellulaires de la levure (Campodonico *et al.* 2005; De Felipe *et al.* 2008; Heidtman *et al.* 2009), ou encore l'utilisation de systèmes rapporteurs de la translocation des effecteurs dans le cytoplasme de la cellule hôte, basée sur une mesure de fluorescence (Luo & Isberg 2004; Zhu *et al.* 2011).

La réplication intracellulaire efficace de *L. pneumophila* implique une régulation fine de l'expression et de la translocation de ses effecteurs. Actuellement, trois systèmes ont montré un rôle dans la régulation directe de l'expression des gènes codants les effecteurs : (i) le système à deux composants PmrAB, impliqué dans l'activation de l'expression d'une quarantaine d'effecteurs ; (ii) le système à deux composants CpxRA, permettant d'activer ou de réprimer l'expression de gènes codant certains effecteurs et de gènes *dot/icm* ; et (iii) la cascade de régulation LetAS-RsmYZ-CsrA, incluant le système à deux composants LetAS, les petits ARN RsmY et RsmZ, et le répresseur traductionnel CsrA (Nevo *et al.* 2014). La régulation de la sécrétion des effecteurs est beaucoup moins documentée. Les travaux de Charpentier *et al.* suggèrent cependant que les effecteurs de *L. pneumophila* sont synthétisés avant même l'entrée de la bactérie dans la cellule hôte (Charpentier *et al.* 2009). Tous les effecteurs n'étant pas utiles tout au long du processus d'infection, il semblerait également que chacun d'entre eux possède sa propre cinétique de translocation (Charpentier *et al.* 2009; Allombert, données non publiées). Bien qu'aucune séquence consensus n'ai été établie, la sécrétion des effecteurs serait contrôlée par un motif signal au niveau C-terminal (Nagai *et al.* 2005; Huang *et al.* 2011; Lifshitz *et al.* 2013). Récemment, une séquence signal interne a été identifiée chez certains effecteurs (Jeong *et al.* 2015). Cette seconde séquence constituerait un mécanisme de contrôle permettant à *Legionella* de créer une hiérarchie

parmi ses nombreux effecteurs, et permettrait d'exercer une régulation temporelle de la sécrétion des effecteurs tout au long du cycle d'infection.

Parmi les 275 effecteurs identifiés, la fonction de la majorité d'entre eux reste énigmatique (Isberg *et al.* 2009). La délétion d'un gène codant un effecteur n'induit que rarement un défaut de croissance intracellulaire, suggérant une redondance fonctionnelle entre différents substrats. Il est possible que cette redondance soit due à la présence de familles d'effecteurs paralogues au sein du génome de *L. pneumophila* et/ou à des effecteurs structurellement différents modifiant une même cible chez l'hôte de manière analogue (Finsel & Hilbi 2015). Chaque paralogue serait alors adapté à la croissance intracellulaire dans un hôte particulier. *Legionella* étant un pathogène capable d'interagir avec une grande variété d'hôtes, l'élaboration d'une niche de réplication ne nécessiterait qu'une fraction des effecteurs, chaque fraction étant adaptée à un type cellulaire spécifique (Luo & Isberg 2004).

I.3.2 Entrée dans la cellules-hôte

I.3.2.1 Adhésion à la cellule hôte

L'adhésion constitue une étape essentielle au cycle infectieux de toutes les bactéries pathogènes intracellulaires. Cette interaction initiale fait intervenir des constituants de la surface bactérienne aussi connus sous le nom d'adhésines, et des récepteurs membranaires de la cellule hôte. Les mécanismes mis en jeu dans l'adhésion de *L. pneumophila* aux cellules hôtes sont encore peu connus. Quelques protéines bactériennes ont cependant montré un rôle dans ce processus. L'interaction de la bactérie avec une cellule dépendrait en partie du complément. En effet, les récepteurs CR1 et CR3 présents à la surface des phagocytes professionnels et reconnaissant les fragments C3b et C3bi du complément, respectivement, sont impliqués dans la phagocytose de *Legionella*. Le contact serait engagé par la porine bactérienne MOMP (*Major Outer Membrane Protein*) capable de fixer le fragment C3, facilitant ainsi l'entrée de la bactérie (Payne & Horwitz 1987; Bellinger-Kawahara & Horwitz 1990; Krinos *et al.* 1999). De même, le récepteur du complément C1qR (*C1q receptor*) semble être utilisé par la protéine bactérienne Lcl (Legionella *collagen-like protein*) pour initier l'infection. Cette protéine est sécrétée par le système de sécrétion de type 2 (SST2) puis est relocalisée à la surface de la bactérie (Vandersmissen *et al.* 2010; Mallegol *et al.* 2012). La protéine Lcl permet l'adhésion de *Legionella* aux macrophages U937 et aux cellules épithéliales A549 et NCI-H292, via l'interaction avec les glycosaminoglycanes de la matrice extracellulaire (Vandersmissen *et al.* 2010; Duncan *et al.* 2011; Mallegol *et al.* 2012).

La protéine RtxA, sécrétée par le système de sécrétion de type 1 (SST1) de *L. pneumophila*, est quant à elle impliquée dans l'adhésion aux cellules épithéliales HEp-2 et aux monocytes THP-1 (Cirillo *et al.* 2001; Fuche *et al.* 2015). Chez d'autres pathogènes tels que *Pasteurella haemolytica* et *Escherichia coli*, les protéines de la famille RTX (*Repeats in structural toxins*) ont la faculté de se fixer aux intégrines β2 présentes à la surface cellulaire

(Lally *et al.* 1997; Ambagala *et al.* 1999). D'autres composants de la surface de *L. pneumophila* comme l'intégrine LaiA (L. pneumophila *adhesion molecule homologous with integrin analogue of* S. cerevisiae), l'adénylate cyclase putative LadC, la protéine chaperonne Hsp60 et les pili long de type IV semblent également participer au processus d'adhésion aux cellules humaines (Garduño *et al.* 1998; Stone & Abu Kwaik 1998; Chang *et al.* 2005; Newton *et al.* 2008). Les récepteurs cellulaires impliqués dans ces interactions ne sont cependant pas décrits.

I.3.2.2 Internalisation

Une fois le contact établi avec la surface de la cellule hôte, les légionelles sont phagocytées selon différents processus d'entrée. La phagocytose par enroulement (ou « coiling phagocytosis ») fut le premier mécanisme décrit pour l'entrée de *L. pneumophila* dans les monocytes et les macrophages (Horwitz 1984). Ce mode de phagocytose particulier se caractérise par la formation d'un long pseudopode s'enroulant en spirale autour de la bactérie (**Figure 15A**).

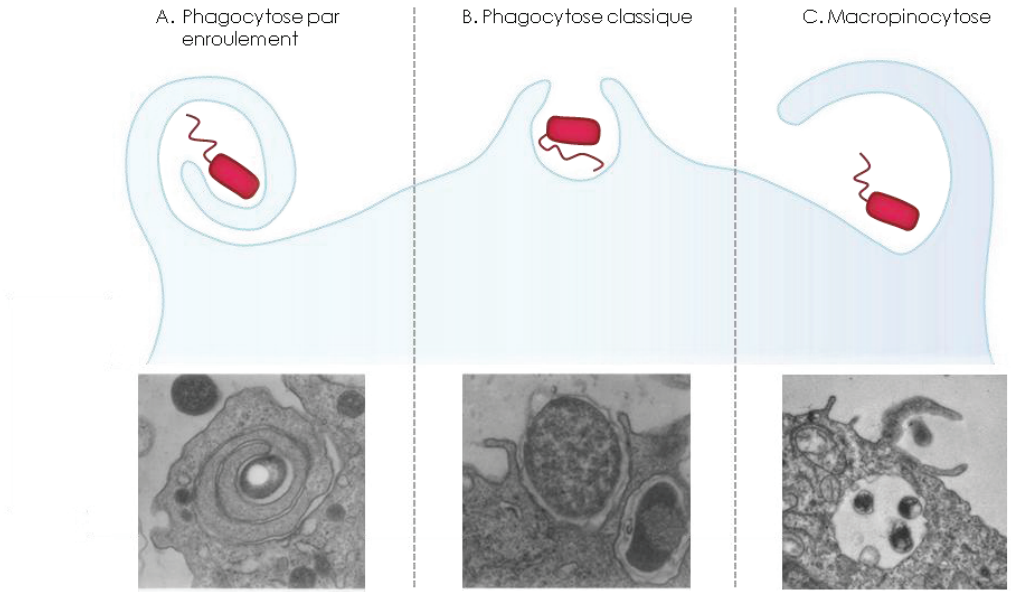


Figure 15. Schéma des différents modes d'internalisation des bactéries (d'après Horwitz 1984 et Schneider *et al.* 2007). (A) Phagocytose par enroulement. Photo : *L. pneumophila* phagocytée par un monocyte. (B) Phagocytose classique. Photo : *L. pneumophila* phagocytée par un monocyte. (C) Macropinocytose. Photo : *Afipia felis* phagocytée par un monocyte.

La phagocytose par enroulement serait conditionnée par la présence d'un composant de la surface de *L. pneumophila*. En effet, l'opsonisation préalable des légionelles conduit à une phagocytose dite « classique » à deux pseudopodes (ou « *zipper phagocytosis* »), utilisée pour l'entrée de la plupart des bactéries comme *E. coli* ou *Pseudomonas aeruginosa* (**Figure 15B**) (Horwitz 1984). De plus, la méthode de culture des légionelles semble influencer le mode de phagocytose utilisé par les macrophages. Des travaux de microscopie ont montré

qu'environ 45% des bactéries cultivées sur milieu gélosé BCYE sont phagocytées par enroulement (le reste étant internalisé par phagocytose classique), contre plus de 95% pour des bactéries issues d'une co-culture avec les amibes *A. castellanii* (Cirillo *et al.* 1999). Le mode d'entrée est également dicté en fonction de l'espèce voire de la souche de légionelles. Ainsi, dans l'étude de Rechnitzer & Blom, la souche Philadelphia est phagocytée par enroulement, alors que la souche Lp1 Knoxville et l'espèce *L. micdadei* sont internalisées par phagocytose classique (Rechnitzer & Blom 1989). L'entrée de *L. pneumophila* dans l'amibe *A. castellanii* est quant à elle orchestrée via la phagocytose par enroulement (Bozue & Johnson 1996). L'internalisation de la bactérie dans les macrophages de souris A/J et l'amibe *Dictyostelium discoideum* s'effectue selon un troisième mode d'entrée : la macropinocytose (Watarai *et al.* 2001; Peracino *et al.* 2010). En microscopie électronique, la macropinocytose se reconnait grâce au froissement de la surface cellulaire accompagné par l'émission d'un pseudopode se refermant sur la membrane plasmique pour former une large vésicule d'endocytose (**Figure 15C**) (Schneider *et al.* 2007). Bien que l'entrée de *L. pneumophila* soit opérée en majeure partie par des processus cellulaires, la présence d'un SST4 Dot/Icm fonctionnel permettrait d'augmenter l'efficacité de phagocytose des macrophages humains et de l'amibe *A. castellanii* (Hilbi *et al.* 2001). Les travaux de Hilbi *et al*. ont en effet montré que la souche sauvage de *L. pneumophila* est plus abondamment phagocytée que la plupart des mutants *dot/icm*, bien que l'efficacité d'adhésion soit équivalente pour toutes les souches. D'après les auteurs, *L. pneumophila* stimulerait son internalisation *via* la sécrétion d'effecteurs dans la cellule hôte.

Sur le plan moléculaire, l'internalisation de *L. pneumophila* par les cellules humaines et les amibes dépend de la dynamique du cytosquelette, constitué de microfilaments d'actine et de microtubules (Coxon *et al.* 1998; Cirillo *et al.* 1999; Hilbi *et al.* 2001; Hayashi *et al.* 2008; Peracino *et al.* 2010). Plusieurs études ont en effet montré un défaut de phagocytose dans des cellules traitées avec des inhibiteurs de la polymérisation de l'actine (cytochalasine A, B ou D et latrunculine) ou de la polymérisation de la tubuline (colchicine et nocodazole) (Cirillo *et al.* 1999; Hilbi *et al.* 2001; Hayashi *et al.* 2008). Le remaniement du cytosquelette semble différent en fonction du mode d'entrée de *L. pneumophila*. Ainsi, la phagocytose classique requière la polymérisation *de novo* de microfilaments d'actine et de microtubules, tandis que la phagocytose par enroulement s'effectue grâce aux microfilaments et microtubules préformés (Cirillo *et al.* 1999). De plus, les travaux de Coxon *et al.* ont permis de mettre en évidence le rôle de la tyrosine kinase (TK) et de la protéine kinase C (PKC) dans l'activation de la polymérisation de l'actine au cours de l'internalisation de *L. pneumophila* par les monocytes humains (Coxon *et al.* 1998).

I.3.3 Biogénèse d'une vacuole de réplication

Lors de la phagocytose par les cellules hôtes, les légionelles sont internalisées dans une vacuole appelée LCV. Pour échapper à la voie endocytique, les bactéries apportent plusieurs modifications à leur LCV, dont un remodelage de la composition lipidique de la vacuole et le recrutement de vésicules endoplasmiques à sa surface. Ces processus permettent non seulement le camouflage de la LCV à l'intérieur de l'hôte, mais également le façonnage d'un environnement favorable à la réplication des bactéries.

I.3.3.1 Réajustement de la composition lipidique de la LCV

Les phosphoinositides (PI) jouent un rôle majeur dans l'identité membranaire des différents compartiments cellulaires. La modification de ces lipides par des kinases et des phosphatases permet de produire une grande variété de PI, définis par le niveau et la position des phosphorylations. Ainsi, la membrane plasmique est principalement constituée de phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ($PI4,5P_2$), tandis que l'appareil de Golgi est riche en phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P) et que les endosomes se composent majoritairement de phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) (**Figure 16**) (Di Paolo & De Camilli 2006).

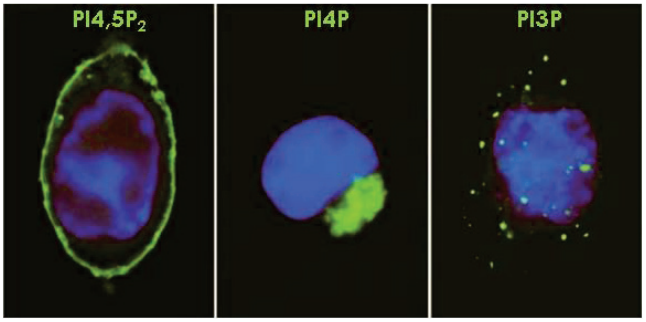


Figure 16. Distribution cellulaire des phosphoinositides (Di Paolo & De Camilli 2006). Marquage GFP (vert) illustrant la localisation prédominante du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ($PI4,5P_2$) (membrane plasmique), du phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P) (Golgi) et du phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) dans des cellules CHO (*Chinese Hamster Ovary*) . Le noyau des cellules ont été marqués au DAPI (bleu).

Au cours de l'infection par *L. pneumophila*, la composition de la vacuole d'endocytose est rapidement modifiée. Lors de l'internalisation, la LCV s'enrichie transitoirement en $PI4,5P_2$ puis en PI3P. Dans les heures qui suivent, le PI3P est progressivement éliminé en faveur de PI4P, qui devient le composant majoritaire de la LCV (Weber *et al.* 2014). La modification de la composition en PI de la LCV est un processus dépendant du SST4 Dot/Icm et permet aux légionelles de recruter différentes protéines bactériennes et cellulaires. L'effecteur SidF est une PI-3-phosphatase capable d'hydrolyser le $PI3,4,5P_3$ et le $PI3,4P_2$ en $PI4,5P_2$ et en PI4P, respectivement (Hsu *et al.* 2012) (**Figure 17**).

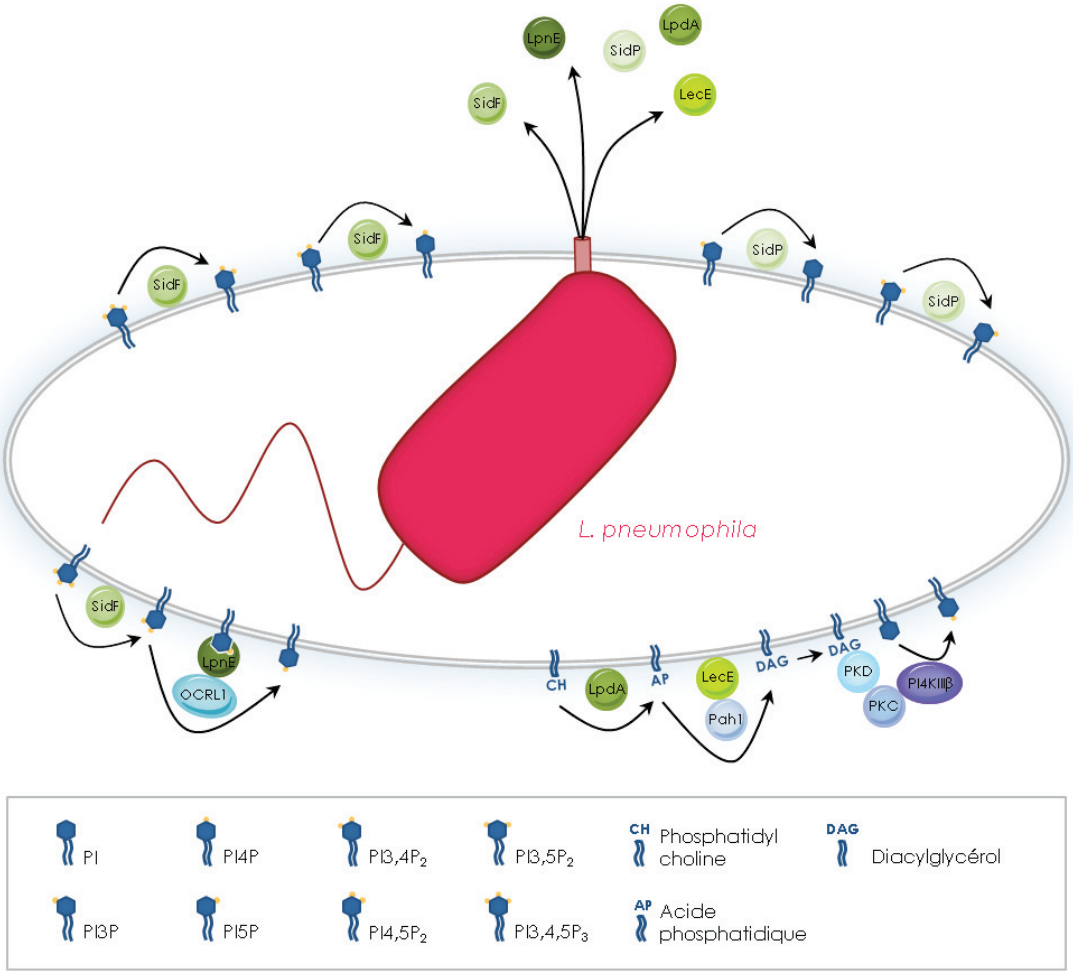


Figure 17. Modification des phosphoinositides de la LCV de *L. pneumophila*. Depuis sa vacuole, *L. pneumophila* sécrète des effecteurs (vert), qui en combinaison avec certaines protéines de l'hôte (bleu) sont impliqués dans le remodelage de lipides de la LCV : SidF, SidP, LpnE, LpdA et LecE. L'effecteur SidF hydrolyse le phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate(PI3,4,5P_3) et le phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate (PI3,4P_2) en phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PI4,5P_2) et en phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P), respectivement. L'effecteur SidP hydrolyse quant à lui le phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) et le phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate (PI3,5P_2) en PI et en phosphatidylinositol-5-phosphate (PI5P), respectivement. La protéine OCRL1 recrutée par l'effecteur LpnE hydrolyse le PI4,5P_2 produit par SidF en PI4P. L'effecteur LpdA, ancré dans la LCV, hydrolyse la phosphatidylcholine (PC) en acide phosphatidique (AP), lui-même converti en diacylglycérol (DAG) par l'action combinée de l'effecteur LecE et de la phosphatase eucaryote Pah1. Le DAG recrute ensuite la protéine kinase D (PKD) et son activateur, la protéine kinase C (PKC). La PKC activée recrute à son tour la phosphatidylinositol 4-kinase (PI4K) IIIβ (PI4KIIIβ), qui phosphoryle le PI afin de produire du PI4P à la surface de la LCV.

Durant l'infection, SidF est associé à la membrane de la LCV grâce à deux domaines transmembranaires situés dans la partie C-terminale. L'effecteur SidP, une seconde PI-3-phosphatase, hydrolyse quant à lui le PI3P et le phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate (PI3,5P_2) (**Figure 17**) (Toulabi *et al.* 2013). Outre les effecteurs bactériens, les protéines de l'hôte sont également impliquées dans la modification des PI de la LCV. La protéine OCRL1 (*Oculo-Cerebro-Renal syndrome of Lowe 1*) est une PI-5-phosphatase hydrolysant le PI4,5P_2 produit

par SidF en PI4P (**Figure 17**) (Weber *et al.* 2014), qui serait recrutée sur la LCV par l'effecteur LpnE. De même, la phosphatidylinositol 4-kinase (PI4K) IIIβ est une enzyme cellulaire recrutée sur la LCV par les effecteurs LpdA et LecE pour produire du PI4P (**Figure 17**). L'effecteur LpdA, ancré dans la LCV, hydrolyse la phosphatidylcholine (PC) en acide phosphatidique (AP), alors transformé en diacylglycérol (DAG) par la phosphatase eucaryote Pah1, préalablement activée par l'effecteur LecE. Par la suite, le DAG recrute la protéine kinase D (PKD) et son activateur, la protéine kinase C (PKC). Enfin, grâce à l'interaction avec la PKD activée, la PI4KIIIβ phosphoryle le PI afin de produire du PI4P à la surface de la LCV (Brombacher *et al.* 2009; Viner *et al.* 2012).

Au-delà de mimer la surface de l'appareil de Golgi, l'enrichissement de la LCV en PI4P contribue à l'ancrage de différents effecteurs bactériens. Les effecteurs SidC et son paralogue SdcA ainsi que SidM (ou DrrA) sont en effet capables de se fixer au PI4P (Hilbi *et al.* 2011). Bien que non essentiel, l'effecteur SidC participe au recrutement des vésicules de RE à la surface de la LCV (Ragaz *et al.* 2008). Sa structure indique la présence d'un domaine à activité ubiquitine ligase, permettant notamment l'ubiquitination de la petite GTPase cellulaire Rab1 (Finsel & Hilbi 2015). L'effecteur SidM possède quant à lui trois domaines de fixation, associés à des activités GEF (*Guanine nucleotide Exchange Factor*), GDF (*Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor* (GDI) *Displacement Factor*) et d'adénylation permettant de recruter et de réguler la petite GTPase Rab1, impliquée dans le recrutement des vésicules de RE (Allombert *et al.* 2013). Par ailleurs, les effecteurs LtpD, RidL, LidA et LnpE sont ancrés à la LCV par interaction avec le PI3P résiduel (So *et al.* 2015).

I.3.3.2 Inhibition de la maturation du phagosome

Lors d'une infection, les cellules éliminent les microorganismes en les piégeant dans un phagosome, destiné à fusionner successivement avec une série de compartiments de la voie endocytique, tels que les endosomes précoces, les endosomes tardifs et le lysosome (Scott *et al.* 2003). La fusion de la vacuole de phagocytose avec le lysosome conduit à la formation d'un phagolysosome, doté de propriétés digestives grâce à un pH bas (ente 4.5 et 5.5) et à la présence d'enzymes hydrolytiques. L'acidification du lysosome est régulée par la v-ATPase (*vacuolar-ATPase*), une pompe à proton membranaire utilisant l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie (Forgac 2007).

Simultanément au remodelage des lipides de la LCV, *L. pneumophila* interfère avec la voie endosomale afin d'échapper à la dégradation par le lysosome. En effet, la plupart des LCV contenant des légionelles virulentes ne présentent ni le marqueur Rab5 spécifique des endosomes précoces, ni le marqueur LAMP-1 spécifique du lysosome. A l'inverse, les bactéries possédant un SST4 Dot/Icm défectueux sont rapidement dirigées vers le lysosome, indiquant que l'interaction avec la voie endocytique est inhibée par des effecteurs sécrétés par *Legionella* (Berger & Isberg 1993). Ainsi, les effecteurs VipD, VipA et VipF ont été identifiés

grâce à leur capacité à interférer avec le trafic vésiculaire de la voie endosomale chez la levure (Shohdy *et al.* 2005). L'effecteur VipD sécrété par *L. pneumophila* permet de modifier la composition des endosomes précoces afin d'en perturber le fonctionnement. La partie N-terminale de cette protéine contient un domaine phopholipase, tandis que la partie C-terminale possède un domaine de fixation aux petites GTPases Rab5 et Rab22 (Vanrheenen *et al.* 2006; Ku *et al.* 2012). Il a été récemment montré que VipD est recruté au niveau de la membrane des endosomes précoces en se fixant aux GTPases Rab5 et Rab22, empêchant alors ces dernières d'interagir avec la protéine cellulaire EEA1 (*Early Endosomal Antigen 1*) impliquée dans la fusion des endosomes. De plus, l'activité phospholipase A1 de VipD permet d'éliminer le PI3P membranaire utilisé comme point d'ancrage par la protéine EEA1, bloquant ainsi la fusion entre les endosomes et la LCV (Gaspar & Machner 2014). Au cours de l'infection des macrophages, l'effecteur VipA est uniquement associé à la surface des endosomes précoces. En conditions *in vitro*, VipA se fixe à l'actine et induit la polymérisation de microfilaments (Franco *et al.* 2012). L'expression ectopique de cette protéine entraine chez la levure un défaut du trafic vésiculaire, suggérant que VipA interfère dans le trafic des endosomes le long des microfilaments d'actine lors de l'infection par *L. pneumophila*. Une fonction similaire est assurée par l'effecteur LegK2. Cette kinase est recrutée à la surface de la LCV, où elle phosphoryle les sous-unités ARPC1B (*Actin Related Protein 2/3 Complex subunit 1B*) et ARP3 (*Actin Related Protein 3)* du nucléateur de l'actine ARP2/3, prévenant ainsi la formation de microfilaments à la périphérie du phagosome. L'inhibition de la polymérisation de l'actine par legK2 empêche alors le détournement de la LCV et sa fusion avec les endosomes tardifs et le lysosome (Michard *et al.* 2015). Par ailleurs, l'effecteur AnkX intervient dans la modulation du transport des endosomes. Sa structure et la présence d'un domaine Fic (*Filamentation induced by c-AMP* (*adenosine monophosphate*)) évoque une capacité d'interaction avec des composants de l'hôte. Dans d'autres modèles bactériens, les effecteurs possédant un domaine Fic sont responsables d'adénylation (ou AMPylation), une activité enzymatique utilisant l'ATP comme substrat pour ajouter un AMP sur les résidus tyrosine et thréonine des protéines eucaryotes (Worby *et al.* 2009; Yarbrough *et al.* 2009). Bien que les cibles de l'effecteur n'aient pas été identifiées, ces données suggèrent que AnkX est impliqué dans l'AMPylation de protéines de l'hôte assurant le transport vésiculaire (Hubber & Roy 2010). D'autres effecteurs comme LegC3 et SetA sont également suspectés de perturber le trafic de la voie endocytique, cependant leurs mécanismes d'action restent indéterminés (De Felipe *et al.* 2008; Heidtman *et al.* 2009).

Une autre stratégie de *L. pneumophila* pour inhiber la maturation du phagosome consiste à maintenir un pH neutre au sein du phagosome. Une étude protéomique a révélé la présence de la v-ATPase dans la membrane de la LCV dès les premiers stades d'infection (Urwyler *et al.* 2009). Les travaux de Xu *et al.* ont par la suite permis de montrer que l'effecteur SidK, sécrété *via* le SST4 Dot/Icm, est capable de se fixer à la sous-unité catalytique VatA de la v-

ATPase. Cette interaction inhibe l'hydrolyse de l'ATP, la translocation des protons H^+ et l'acidification du phagosome (Xu *et al.* 2010). La délétion de *sidK* n'affecte cependant pas le pH de la LCV ni la croissance de *L. pneumophila*, suggérant l'existence d'un effecteur redondant (Xu *et al.* 2010).

La réussite de l'inhibition de la maturation du phagosome repose également sur la perturbation du transport rétrograde, permettant à la cellule de relier la voie endosomale et le Golgi via le trafic de vésicules (ou cargo). Le transport rétrograde assure notamment le recyclage des récepteurs membranaires impliqués dans le transport des hydrolases vacuolaires ou lysosomales, comme par exemple le récepteur CIMPR (*Cation-Independent Mannose 6-Phosphate Receptor*) (Bonifacino & Hurley 2008; Seaman 2012). L'inhibition du transport rétrograde promeut la réplication intracellulaire des légionelles (Finsel *et al.* 2013). Au cours de l'infection, *L. pneumophila* paralyse le transport rétrograde grâce à l'effecteur RidL, sécrété par le SST4 Dot/Icm (Finsel *et al.* 2013). Pour cela, RidL se fixe sur la protéine Vsp29 de l'hôte, habituellement associée aux protéines Vsp26 et Vsp35 pour former le rétromère essentiel à la reconnaissance et au transport des cargos. Bien que l'effecteur n'affecte pas l'acquisition des protéines Vsp sur la LCV, l'accumulation des autres éléments requis pour la formation du cargo est atténuée en présence de RidL (Finsel *et al.* 2013). D'après Finsel et Hilbi, *Legionella* bloquerait le transport rétrograde afin de prévenir le recyclage des cargos, créant ainsi une pénurie d'enzymes hydrolytiques dans le lysosome ((Finsel & Hilbi 2015).

I.3.3.3 Recrutement de vésicules de réticulum endoplasmique

Après avoir échappé à la voie endocytique, *Legionella* poursuit la transformation de sa vacuole en détournant le trafic vésiculaire entre le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de golgi afin d'intercepter des vésicules dérivées du RE (Xu & Luo 2013). L'acquisition de ce nouveau matériel permet (i) d'acquérir les caractéristiques de la membrane du RE et (ii) d'assurer l'expansion de la LCV nécessaire à la réplication intracellulaire des légionelles. Le détournement des vésicules de RE repose sur le recrutement d'effecteurs bactériens et de protéines régulatrices de l'hôte, en particulier les petites GTPases impliquées dans le bourgeonnement, l'amarrage et la fusion des vésicules.

Les petites GTPases fonctionnent comme des interrupteurs moléculaires (Wennerberg *et al.* 2005). Elles existent sous deux formes : une forme active membranaire liée au GTP capable d'interagir avec une cible, et une forme inactive cytoplasmique liée au GDP. La permutation d'une conformation à l'autre est finement contrôlée par deux principales classes de protéines. D'une part, les protéines activatrices GEF (*Guanine nucleotide Exchange Factor*) déplacent le GDP pour permettre la fixation d'une nouvelle molécule de GTP, et d'autre part les protéines GAP (*GTPase Activating Protein*) hydrolysent le GTP (**Figure 18**). En l'absence de signal activateur, certaines petites GTPases cytoplasmiques sont associées à des protéines

GDI (*Guanine Dissociation Inhibitor*) afin de garder la GTPase sous forme inactive (Cherfils & Zeghouf 2013). Les petites GTPases Sar1, Arf1 et Rab1 ont chacune un rôle crucial dans l'infection par *L. pneumophila*.

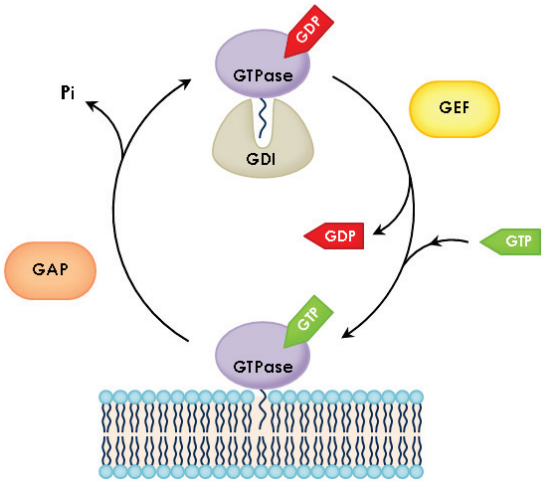


Figure 18. Schéma de régulation des petites GTPases. Les petites GTPases alternent entre une forme membranaire active liée au GTP et une forme cytoplasmique inactive liée au GDP. Certaines formes de GTPases sont liées à des protéines GDI (*Guanine Dissociation Inhibitor*) qui les maintiennent sous forme inactives. Les GTPases sont activées par des protéines GEF (*Guanine nucleotide Exchange Factor*) par échange du GDP par une molécule de GTP. Les protéines GAP (*GTPase Activating* Protein) inactivent les GTPases par hydrolyse du GTP.

La GTPase Sar1 est notamment impliquée dans la formation des vésicules de RE tapissées de protéine COPII (*Coat Protein II*). Des analyses par microscopie ont notamment montré l'importance de Sar1 dans l'attachement des vésicules de RE à la LCV (Robinson & Roy 2006). D'après ces travaux, les cellules produisant une GTPase Rab1 non fonctionnelle ne sont pas capables d'éliminer la protéine COPII de la surface des vésicules de RE, ce qui entraine un défaut de transport et de fusion avec la LCV (Robinson & Roy 2006).

Au cours de l'infection, la petite GTPase Arf1 est relocalisée sur la LCV par un processus dépendant du SST4 Dot/Icm, plus précisément par l'effecteur RalF (*Recruitment of Arf1 to Legionella vacuole Factor*) (Nagai *et al.* 2002). Cet effecteur possède une activité GEF permettant d'activer la petite GTPase Arf1, impliquée dans la fusion des vésicules de RE et de la LCV (Robinson & Roy 2006). Actuellement, RalF est le seul effecteur capable de réguler Arf1 et semble essentiel pour le recrutement de la GTPase sur la LCV (Nagai *et al.* 2002). Cependant, la délétion de *ralF* n'induit pas de défaut de réplication intracellulaire majeur, suggérant l'existence d'autres effecteurs capables de moduler l'activité de Arf1 (Nagai *et al.* 2002). De façon intéressante, l'absence des effecteurs SidC et SdcA entraine chez *L. pneumophila* une incapacité à recruter Arf1 sur la LCV malgré la présence de RalF, semblant indiquer que ces deux effecteurs participent au recrutement de la GTPase (Horenkamp *et al.* 2015). De plus, RalF ne se fixe pas sur un lipide spécifique mais semble

plutôt s'insérer dans une région de la membrane de la LVC riche en résidus aromatiques cationiques (Brombacher *et al.* 2009; Folly-Klan *et al.* 2013).

Tout comme Arf1, la petite GTPase Rab1 est relocalisée sur la membrane de la LCV par un processus dépendant du TSS4 Dot/Icm (Kagan *et al.* 2004). Les membres de la famille des GTPases Rab sont essentiels à l'attachement et à la fusion des vésicules. Au cours de l'infection par *L. pneumophila*, Rab1 est recrutée sur la membrane de la LCV et interagit avec au moins sept effecteurs bactériens : SidM, LepB, SidD, LidA, PieE, AnkX et Lem3.

Une fois sécrété, l'effecteur SidM (ou DrrA) se fixe au PI4P de la LCV (Brombacher *et al.* 2009). Grâce à son activité GEF, SidM active la petite GTPase Rab1en induisant l'échange de GDP pour une molécule de GTP. Le GDI associé à Rab1 est alors éliminé et la GTPase est recrutée dans la membrane de la LCV (Machner & Isberg 2006, 2007; Murata *et al.* 2006). A l'inverse de SidM, l'effecteur LepB hydrolyse de façon spécifique le GTP de Rab1, faisant de cette protéine bactérienne une GAP (Ingmundson *et al.* 2007). SidM est cependant capable de contrer l'activité des protéines GAP grâce à l'AMPylation de Rab1. Cette modification bloque la GTPase sous sa forme active et prévient son interaction avec les protéines GAP (Müller *et al.* 2010). L'AMPylation de Rab1 est essentielle pour son recrutement et sa rétention sur la LCV (Hardiman & Roy 2014). La disparition progressive de SidM et de Rab1 après 2h d'infection chez le macrophage suggère néanmoins que l'AMPylation n'est pas irréversible (Ingmundson *et al.* 2007). Deux groupes indépendants ont ainsi identifié l'effecteur SidD, une déAMPylase de la GTPase Rab1 (Neunuebel *et al.* 2011; Tan & Luo 2011).

L'effecteur LidA, ancré sur la LCV, a la possibilité de se lier aux petites GTPases Rab1, Rab6 et Rab8 quelle que soit leur conformation (Machner & Isberg 2006). Lors de l'infection, LidA vient en renfort de l'activité GEF de SidM. En se liant aux GTPases, LidA stabilise la forme liée au GTP et prévient l'inactivation par les protéines GAP. LidA est impliqué dans le processus d'attachement des vésicules de RE sur la LCV, néanmoins certaines zones d'ombres persistent sur les fonctions de cet effecteur. Dès les stades précoces d'infection, LidA se localise sur la LCV, puis se propage peu à peu à d'autres structures membranaires (Derre & Isberg 2005). Par ailleurs, l'effecteur PieE, localisé dans la membrane de la LCV, collabore avec LidA pour faciliter l'attachement des vésicules de RE. PieE est capable de se fixer à différentes petites GTPases, cependant sa fonction exacte au cour de l'infection reste à déterminer (Mousnier *et al.* 2014).

Outre l'AMPylation, la petite GTPase Rab1 est sujette à un autre type de modification. En effet, l'effecteur AnkX peut greffer une molécule de phosphocholine sur les GTPases Rab1 et Rab35, occasionnant une perturbation du trafic vésiculaire de la cellule, dont celui des endosomes (Pan *et al.* 2008; Mukherjee *et al.* 2011). La phosphocholination est cependant réversible, grâce à l'effecteur Lem3 (Tan *et al.* 2011). L'importance de la phosphocholination dans l'infection par *L. pneumophila* n'est pas clairement définie. D'après Tan *et al.*, la phosphocholination de Rab1 par AnkX permettrait d'inhiber la fusion des vésicules de RE

avec l'appareil de Golgi, facilitant ainsi le détournement des vésicules vers la LCV. Le rôle de Lem3 consisterait alors à s'assurer que les effecteurs AnkX accidentellement localisés sur la LCV n'inhibent pas la fusion des vésicules de RE avec la LCV (Tan *et al.* 2011).

Les vésicules de RE ainsi recrutées et attachées doivent maintenant fusionner avec le phagosome afin d'assurer l'expansion de la LCV. Chez les eucaryotes, la fusion des vésicules est réalisée par les protéines SNAREs (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Activating protein Receptors*) localisées sur la membrane de la vésicule (v-SNAREs) et sur la membrane cible (t-SNAREs) (Jahn & Scheller 2006). A l'approche d'une vésicule, les v- et t-SNAREs forment un complexe, qui avec l'aide de protéines auxiliaires, génèrent la force nécessaire à la mise contact et à la fusion des membranes (**Figure 19**).



Figure 19. Schéma de fusion membranaire médiée par les protéines SNAREs. A l'approche d'une vésicule, les v- et t-SNAREs forment un complexe, qui avec l'aide de protéines auxiliaires, génèrent la force nécessaire à la mise contact et à la fusion des membranes.

Ce processus est régit par une certaine spécificité entre v- et t-SNAREs. En effet, une v-SNARE donnée n'interagit qu'avec un groupe de t-SNAREs compatibles. Cette spécificité est problématique pour *L. pneumophila*, car suite à son internalisation, la LCV présente à sa surface les SNAREs caractéristiques de la membrane plasmique, les syntaxines, non compatibles avec les SNAREs telles que Sec22b présentes sur les vésicules de RE. *Legionella* est cependant capable d'outrepasser ce système de contrôle grâce à l'effecteur SidM. En plus de participer au recrutement de vésicules de RE décorées de SNAREs Sec22b via l'activation de Rab1, SidM se fixe directement aux syntaxines. Cette interaction permet le rapprochement et l'appariement des deux types de SNAREs habituellement non compatibles, et induit la fusion de la LCV et des vésicules de RE (Arasaki *et al.* 2012). Parallèlement au détournement des protéines SNAREs de l'hôte, certaines souches de *L. pneumophila* injectent leurs propres SNAREs lors de l'infection. Ainsi, les effecteurs LseA, Lec2, Lec3 et Lec7 interagissent avec différentes SNAREs eucaryotes afin de promouvoir la fusion entre les vésicules de RE et la LCV (King *et al.* 2015; Shi *et al.* 2016).

I.3.4 Sortie de la cellule-hôte

Tout comme l'étape d'entrée, la sortie de la cellule hôte est une étape cruciale du cycle infectieux de *L. pneumophila*. Elle permet aux bactéries de rejoindre le milieu extérieur afin de trouver un nouvel hôte pour entamer un nouveau cycle infectieux. Bien que cette étape soit essentielle à la dissémination des bactéries, les signaux et les mécanismes d'action qui gouvernent la sortie des légionelles de leur cellule hôte restent encore peu connus. Les quelques données disponibles à ce sujet ont cependant permis de montrer que la sortie de *L. pneumophila* se déroule en deux temps : (i) les bactéries se libèrent de leur LCV pour accéder au cytoplasme de la cellule, où elles effectuent quelques cycles de réplication supplémentaires, puis (ii) lysent la membrane plasmique de leur hôte pour être libérées dans l'environnement extérieur (Alli *et al.* 2000; Molmeret *et al.* 2002b; a, 2004, 2011).

Initialement, la cytolyse induite par *Legionella* était attribuée aux contraintes mécaniques infligées par les centaines de bactéries mobiles que pouvaient contenir la cellule à l'issue du cycle infectieux. Cette hypothèse a cependant été remise en question grâce à plusieurs travaux suggérant que la sortie des légionelles repose plutôt sur un processus actif initié par les bactéries elles-mêmes. Alli *et al.* ont alors proposé un modèle selon lequel les bactéries lysent la cellule via la formation de pores transmembranaires. Cette hypothèse est soutenue par l'isolation de cinq mutants *rib* (*release of intracellular bacteria*) incapables de sortir de leur hôte (macrophages U937) malgré une efficacité de réplication identique à la souche parentale sauvage (Alli *et al.* 2000). Selon ce même modèle, la formation de pores (ou activité « *pore-forming* ») serait également utilisée par les légionelles pour lyser leur LCV avant d'être employée pour la lyse de la cellule. La poursuite de ces travaux a permis d'identifier le gène *icmT* comme le responsable de l'activité « *pore-forming* » observée en fin de cycle infectieux dans les macrophages, mais également dans l'amibe *Acanthamoeba polyphaga* (Molmeret *et al.* 2002b). Le gène *icmT* code une protéine localisée dans la membrane plasmique de la bactérie, et dont la partie C-terminale est essentielle pour la formation des pores (Molmeret *et al.* 2002a). Une étude plus récente a révélé que cette activité *pore-forming* médiée par IcmT ne serait finalement pas impliquée dans la lyse de la LCV, les expérimentations ayant montré la capacité des mutants *rib* à accéder au cytoplasme des macrophages (Molmeret *et al.* 2011). Le mécanisme de lyse de la LCV reste donc à ce jour encore inconnu. Le rôle des enzymes hydrolytiques et des phospholipases sécrétées par le SST2 de *L. pneumophila* a été écarté par des travaux antérieurs (Molmeret *et al.* 2004).

Par ailleurs, la sortie des légionelles de leur hôte amibien *A. castellanii* ne semble pas faire appel à la formation de pores, mais plutôt à un processus non lytique basé sur la fusion de la LCV et de la membrane plasmique de l'amibe (Chen *et al.* 2004). Ce mécanisme impliquerait les effecteurs LepA et LepB sécrétés par le SST4 Dot/Icm, présentant une homologie de séquence avec les protéines SNAREs de l'hôte. Néanmoins, leur mode d'action lors de la sortie des bactéries reste inconnu (Chen *et al.* 2004).

I.4 Transition entre la phase réplicative et la phase transmissive

Le cycle infectieux de *Legionella* est divisé en deux phases : une phase réplicative intracellulaire et une phase transmissive. La phase réplicative correspond à la période durant laquelle les légionelles se multiplient activement dans la LCV. Une fois les nutriments de la cellule hôte épuisés, les bactéries entrent en phase transmissive, durant laquelle elles cessent leur réplication et expriment des traits leur permettant de sortir de leur cellule hôte, de persister dans le milieu extracellulaire, d'infecter une nouvelle cellule et d'y établir une nouvelle niche de réplication (Molofsky & Swanson 2004). Ces deux phases se caractérisent par d'importantes différences phénotypiques, les bactéries en phase transmissive se distinguant notamment par leur sensibilité accrue au sodium, leur mobilité et leur propriété cytotoxique. Le cycle biphasique de *Legionella* peut être modélisé *in vitro* par culture de la bactérie en milieu liquide. Les phases réplicative et transmissive sont alors associées aux phases exponentielle et stationnaire de croissance, respectivement (Molofsky & Swanson 2004). De nombreuses analyses du transcriptome de *L. pneumophila* réalisées *in vivo* (i.e. dans les amibes ou les macrophages) et *in vitro* ont ainsi mis en évidence une importante modification du profil d'expression des gènes entre la phase réplicative/exponentielle de croissance et la phase transmissive/stationnaire de croissance de la bactérie (Byrne & Swanson 1998; Bachman & Swanson 2001; Molofsky & Swanson 2003; Brüggemann *et al.* 2006b; Faucher *et al.* 2011). Lors de la phase réplicative, la multiplication des bactéries est favorisée par l'induction de gènes impliqués notamment dans le métabolisme des acides aminés, des lipides, des nucléotides et des hydrates de carbones, ainsi que dans le transport du fer et dans la division bactérienne (Brüggemann *et al.* 2006b; Faucher *et al.* 2011; Manske & Hilbi 2014). La phase transmissive se caractérise quant à elle par une stimulation de l'expression de gènes associés à la virulence de *Legionella*. Certains de ces gènes codent notamment pour des effecteurs du SST4 Dot/Icm (RalF, SidC, SidG,SdeB, VipD,…) et pour des facteurs de régulation tels que des systèmes à deux composants, des facteurs de transcription ou des protéines chaperonnes ; tandis que d'autres sont impliqués dans la biosynthèse du flagelle ou dans l'entrée de la bactérie dans la cellule hôte (Bachman & Swanson 2001; Molofsky & Swanson 2003; Brüggemann *et al.* 2006b). Ces différences d'expression des déterminants caractéristiques des phases réplicative et transmissive ont également été observées au niveau protéomique (Aurass *et al.* 2016). L'entrée de *Legionella* dans la phase transmissive serait initiée lors de la détection de la carence en nutriments, un signal détecté après que les bactéries aient lysé leur LCV pour se retrouver dans le cytosol de la cellule hôte (Byrne & Swanson 1998; Dalebroux *et al.* 2009; Molmeret *et al.* 2011). Il semblerait également que le système de *quorum sensing* de *Legionella* soit impliqué dans le processus de transition de phase de la bactérie (Tiaden *et al.* 2008).

II. *Les peptides antimicrobiens*

II.1 Peptides antimicrobiens produits par les organismes supérieurs

Les peptides antimicrobiens forment un groupe de molécules très diversifiées, impliquées dans les mécanismes de défenses innées de nombreux organismes. Ces peptides sont en effet retrouvés chez les plantes, les insectes, les reptiles, les oiseaux, les poissons et les mammifères, chez qui ils sont produits par différents tissus et/ou types cellulaires. Ils participent ainsi aux défenses de l'hôte à la fois par une action directe sur les micro-organismes, mais également grâce à leurs propriétés immunomodulatrices (Ganz 2003) et chimioattractives vis-à-vis des cellules immunitaires telles que les neutrophiles, les monocytes ou les cellules T (De Yang *et al.* 2000). La classification consensuelle des peptides antimicrobiens est aujourd'hui fondée sur leur charge globale et sur leur structure, permettant ainsi de distinguer 5 grands groupes : les peptides linéaires en hélice alpha, les peptides riches en un acide aminé particulier, les peptides riches en cystéine à un ou plusieurs ponts disulfures, les peptides dérivés de protéines et les peptides anioniques (Boman 1995; Hancock 1997; Brogden 2005).

II.1.1 Peptides linéaires en hélice alpha

La famille des peptides en hélice alpha compte plusieurs centaines de membres, issus d'organismes variés tels que les insectes (cécropine), les poissons (pleurocidine), les amphibiens (magainine), et les mammifères (cathélicidines) (Zasloff 1987; Tossi *et al.* 2000; Vandamme *et al.* 2012).

Les peptides en hélice alpha se caractérisent par leur petite taille (moins de 40 acides aminés (aa)), l'absence de cystéine, et parfois par la présence d'un coude. En suspension dans l'eau, ces peptides présentent une structure aléatoire, mais adoptent une structure comprenant une ou plusieurs hélices alpha en présence de membranes (Brogden 2005) (**Figure 20A**). L'activité de ce type de peptide repose sur deux prérequis : (i) une charge nette positive, afin de favoriser son attraction vers les membranes phospholipidiques chargées négativement, et (ii) un caractère amphiphile pour permettre son insertion dans les membranes (Yeaman & Yount 2003).

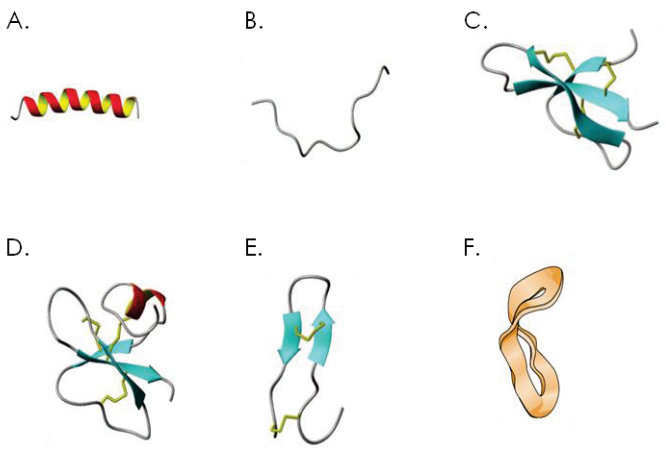


Figure 20. Structures tertiaires des peptides antimicrobiens produits par les organismes supérieurs (Jenssen *et al.* 2006 ; Ganz 2003). (A) Structure en hélice alpha (magainine 2) ; (B) structure linéaire (indolicidine bovine) ; (C) structure en feuillet beta (défensine de lapin) ; (D) structure mixte feuillet beta/hélice alpha (β-défensine 2 humaine); (E) structure en épingle à cheveux (polyphémusine) ; (F) structure circulaire (θ-défensine 1 de primate).

II.1.2 Peptides linéaires riches en un acide aminé particulier

Cette famille compte une quarantaine de peptides et se caractérise par une séquence riche en un ou deux acides aminés particuliers. Ces peptides ne possèdent pas de cystéine et adoptent une structure linéaire (**Figure 20B**). Ce groupe comprend les apidaecines issues de l'hémolymphe de l'abeille *Apis mellifera*, riches en proline (33%) (Casteels *et al.* 1989) ; l'indolicidine isolée des granules de neutrophiles bovins, riches en tryptophane (Selsted *et al.* 1992) ; le peptide PR-39 provenant des leucocytes de porc, riche en proline (49%) et en arginine (33%) (Zhao *et al.* 1995) ; ou encore l'histatine, isolée à partir de la salive des grands primates dont l'Homme, riche en histidine (Kavanagh & Dowd 2004; De Smet & Contreras 2005).

II.1.3 Peptides riches en cystéines à un ou plusieurs ponts disulfures

Cette famille d'environ 380 membres comprend à la fois des peptides cationiques et des peptides anioniques, possédant dans leur séquence des cystéines reliées entre elles par des ponts disulfures. Le nombre de résidus cystéines (2 à 10) et leur appariement entre eux sont à l'origine d'une grande diversité en termes de structure au sein de cette famille. Les ponts disulfures peuvent en effet produire des structures dites « *open-ended* » (Bulet 2004) (i) en feuillets β comme pour les défensines de lapin (**Figure 20C**) ; (ii) en feuillets β/hélices α comme pour les β-défensines humaines (**Figure 20D**), ou (iii) en épingle à cheveux comme la polyphémusine (**Figure 20E**) (Jenssen et al 2006). Il existe également des peptides cycliques comme la θ-défensine du macaque rhesus ou la théromacine de la sangsue (Ganz 2003; Tasiemski *et al.* 2004) (**Figure 20F**).

II.1.4 Peptides dérivés de protéines

Ces peptides sont obtenus par fragmentation de plus grandes protéines et possèdent une activité antibactérienne. C'est par exemple le cas de la lactoferricine, un peptide de 15 aa généré par le clivage de la partie N-terminale de la lactoferrine par une pepsine en milieu acide. Chez les mammifères, la lactoferricine est présente dans les sécrétions comme le lait, les larmes, la salive, mais également dans les granules des polynucléaires neutrophiles (PMN), où elle exerce une activité antibactérienne, antivirale, antifongique et antiparasitaire (Gifford *et al.* 2005).

II.1.5 Peptides anioniques

La dernière famille, beaucoup moins décrite dans la littérature, regroupe les peptides anioniques. Ces peptides sont présents chez les vertébrés, les invertébrés et les plantes, et participent à la réponse immunitaire innée grâce à leurs propriétés antibactérienne, antivirale et antifongique (Harris *et al.* 2009). La dermcidine, isolée à partir de la sueur (Schittek *et al.* 2001), est l'un des peptides anioniques humains les plus étudiés.

II.2 Peptides antimicrobiens produits par les bactéries

Chez les organismes supérieurs, les PAMs participent à l'immunité innée et font partie de la première ligne de défense contre les microorganismes pathogènes. Chez les bactéries, la production de peptides antimicrobiens constitue un avantage compétitif dans certaines niches écologiques, notamment pour l'accès aux ressources. Les PAMs d'origine bactérienne, également connus sous le terme de bactériocines, sont synthétisés par voie ribosomique et sécrétés à l'extérieur des cellules productrices. Tout comme les PAMs eucaryotes, les bactériocines sont de petites molécules cationiques et amphiphiles, permettant l'interaction avec les membranes bactériennes. Les bactériocines sont cependant plus puissantes et agissent à des concentrations de l'ordre du pico au nanomolaire, tandis que des concentrations micro molaires sont nécessaires à l'activité des PAMs eucaryotes. De plus, la plupart des bactériocines possèdent un spectre d'activité réduit, et restreint à quelques espèces/genres phylogénétiquement proches de la souche productrice, alors que les PAMs eucaryotes ciblent une large diversité de bactéries (Nissen-Meyer & Nes 1997). Les PAMs eucaryotes et procaryotes partagent cependant des mécanismes d'action similaires, tels que la perméabilisation membranaire, l'inhibition de la synthèse de la paroi, des acides nucléiques ou des réactions enzymatiques.

II.2.1.1 Peptides antimicrobiens produits par les bactéries à Gram négatif

Les bactériocines produites par les bactéries à Gram négatif sont regroupées sous le terme de microcines, dont la plupart ont été caractérisées chez *E. coli* et d'autres entérobactéries (Hassan *et al.* 2012). Les microcines comptent deux classes : les microcines de classe I et les microcines de classe II. Les microcines de classe I ont un faible poids moléculaire (<5kDa) et font l'objet de nombreuses modifications post-traductionnelles. Ces molécules sont codées par un groupe de gènes plasmidiques, impliqués dans la synthèse du peptide, dans ses modifications post-traductionnelles, dans son export, ainsi que dans l'immunité de la souche productrice vis-à-vis de sa propre microcine (Duquesne *et al.* 2007). Les microcines de classe II, de poids moléculaire plus important (5-20 kDa), ne portent que peu voire pas de modifications post-traductionnelles. La classe II est elle-même subdivisée en deux sous-classes, la classe IIa et la classe IIb, qui diffèrent de par la localisation des gènes codant. En effet, les gènes de microcines de classe IIa sont portés par un plasmide, tandis que ceux de la classe IIb sont chromosomiques (Duquesne *et al.* 2007).

II.2.1.2 Peptides antimicrobiens produits par les bactéries à Gram positif

Les bactériocines des bactéries à Gram positif présentent une plus grande diversité que celles des bactéries à Gram négatif. Depuis quelques dizaines d'années, un intérêt pour ces peptides s'est développé, en particulier pour les bactériocines produites par les bactéries lactiques, notamment pour leur application potentielle dans le secteur de l'industrie alimentaire. Les bactériocines produites par les bactéries à Gram positif forment un groupe hétérogène de peptides et de protéines. Une première classification, basée sur quatre classes de peptides, a été proposée par Klaenhammer en 1993 (Klaenhammer 1993). Cette classification a ensuite été par plusieurs fois reprises et modifiées, et plus récemment par Bastos *et al.* (**Tableau 2**) (Bastos *et al.* 2009).

Tableau 2. Classification des bactériocines produites par les bactéries à Gram positif (Bastos *et al.* 2009).

Classification	Caractéristiques	Groupe/sous-classe	Exemples
Classe I (lantibiotiques)	Petits peptides (<5 kDa), contenant des acides aminés modifiés	Type A (linéaire)	Pep5, Epidermine, Nukacines ISK-1
		Type B (globulaire)	Mersacine
		Type C (multi-composant)	Staphylococcine C55
Classe II	Petits peptides (<10 kDa), contenant des acides aminés non modifiés	IIa (pediocin-like)	Pediocine PA-1
		IIb (multi-composant)	Aureocine A70, Lactacine F
		IIc (divers)	Aureocine A53, Lactococcine A, Divergicine A
Classe III	Protéines thermo-sensibles	Type IIIa (bactériolysines)	Lysostaphine
		Type IIIb (non lytique)	Helveticines J
Classe IV	Peptides cycliques	-	Enterocine AS-48

Les bactériocines de type I, également connues sous le terme de lantibiotiques, sont des petits peptides (19 à 38 aa) contenant des résidus atypiques comme la lanthionine et la β-methyllanthionine (Hassan *et al.* 2012). Les lantibiotiques ont tout d'abord été classés en fonction de leur structure en deux sous-classes : le type A (linéaire) comme la nisine et le type B (globulaire) comme la mersacine (**Figure 21**). Plus récemment, une troisième sous-classe a été créée, le type C, correspondant aux lantibiotiques à deux composants comme par exemple la lacticine (Ltn) (Wescombe *et al.* 2007).

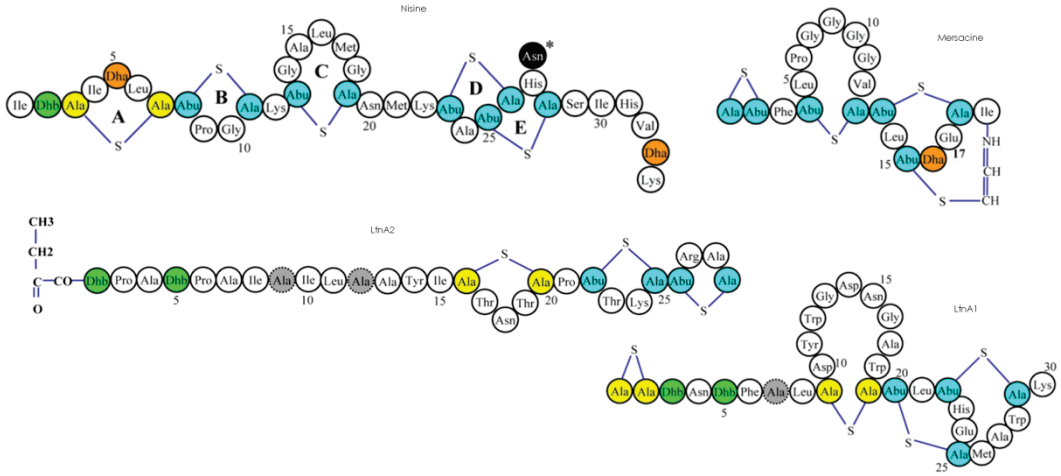


Figure 21. Schéma de structure de différents lantibiotiques (Field *et al.* 2015). Les modifications post-traductionnelles sont indiquées : Abu = acide 2-aminobutyrique, Ala-S-Ala = lanthionine, Abu-S-Ala = 3-methyllanthionine, Dha = dehydroalanine, Dhb = dehydrobutyrine.

Les bactériocines de type II sont des petits peptides (<10 kDa) cationiques, thermostables et ne portant pas de modifications post-traductionnelles. Ces bactériocines sont subdivisées en trois sous-classes. Les bactériocines de classe IIa contiennent une séquence consensus (YGNGV-C----C-V-W—A), et sont également appelées « *pediocin-like* », en référence au premier peptide caractérisé de cette classe, la pédiocine PA-1. La majorité des bactériocines de classe IIa sont produites par des bactéries lactiques, et possèdent une forte activité antibactérienne contre *Listeria monocytogenes* (Hassan *et al.* 2012). La classe IIb correspond aux bactériocines à deux peptides, dont l'activité dépend de l'action complémentaire de chacun des deux peptides, comme par exemple la plantaricine EF (Hassan *et al.* 2012). Enfin, la classe IIc regroupe tout peptide non modifié ne correspondant pas aux critères des classes IIa et IIb (Wescombe *et al.* 2007).

Les bactériocine de type III sont des protéines thermosensibles subdivisées en deux sous-classes. La classe IIIa regroupe les bactériocines lytiques (ou bactériolysines), dont l'activité repose sur l'hydrolyse des ponts peptidiques du peptidoglycane des bactéries sensibles. La

lysostaphine, produite par *Staphylococcus simulans*, fait partie des bactériolysines les plus étudiées à ce jour. Les bactériolysines de type IIIb correspondent quant à elle à des protéines non lytiques. La première bactériocine de cette classe à avoir été caractérisée est l'helvéticine produite par *Lactobacillus helveticus*. Cette protéine cible principalement d'autres espèces de *Lactobacillus*, cependant son mode d'action reste inconnu (Wescombe *et al.* 2007).

Les bactériocines de type IV regroupe les bactériocines cycliques. Ces peptides sont issus de la synthèse ribosomique et subissent des modifications post-traductionnelles permettant de lier de façon covalente le premier et le dernier acide aminé. Cette classe ne compte que très peu de membres, le plus étudié étant l'entérocine AS-48, produite par *Enterococcus faecalis*.

II.3 Facteurs déterminants de l'activité des PAMs

II.3.1 Facteurs bactériens

Quel que soit le mode d'action des PAMs, l'interaction avec les membranes est une étape essentielle pour leur activité. Les peptides sont alors capables de distinguer les microorganismes des cellules de l'hôte, grâce à des différences dans la composition des membranes cellulaires. Il apparait donc important de considérer la structure et la composition des membranes pour comprendre le mécanisme d'action et la spécificité des peptides antimicrobiens.

II.3.1.1 Peptidoglycane

Toutes les bactéries ont un élément de leur enveloppe en commun : le peptidoglycane (PDG). Le PDG permet de maintenir la forme des bactéries et assure une protection mécanique pour résister aux variations de pression osmotiques. Il forme un treillis multicouche autour de la membrane plasmique des bactéries, et représente 90% des constituants de la paroi des Gram positif, contre seulement 5 à 20% chez les Gram négatif. Le PDG forme un hétéropolymère constitué de disaccharides N-acétylglucosamine (NAG)/acide N-acétyl-muramique (NAM), reliés par des chaines latérales peptidiques. Ces chaines peptidiques sont fixées au NAM et reliées entre elles par un pont interpeptidique. La biosynthèse du PDG s'effectue successivement dans trois compartiments : le cytoplasme, la membrane plasmique et le périplasme (**Figure 22**) (Typas *et al.* 2011).

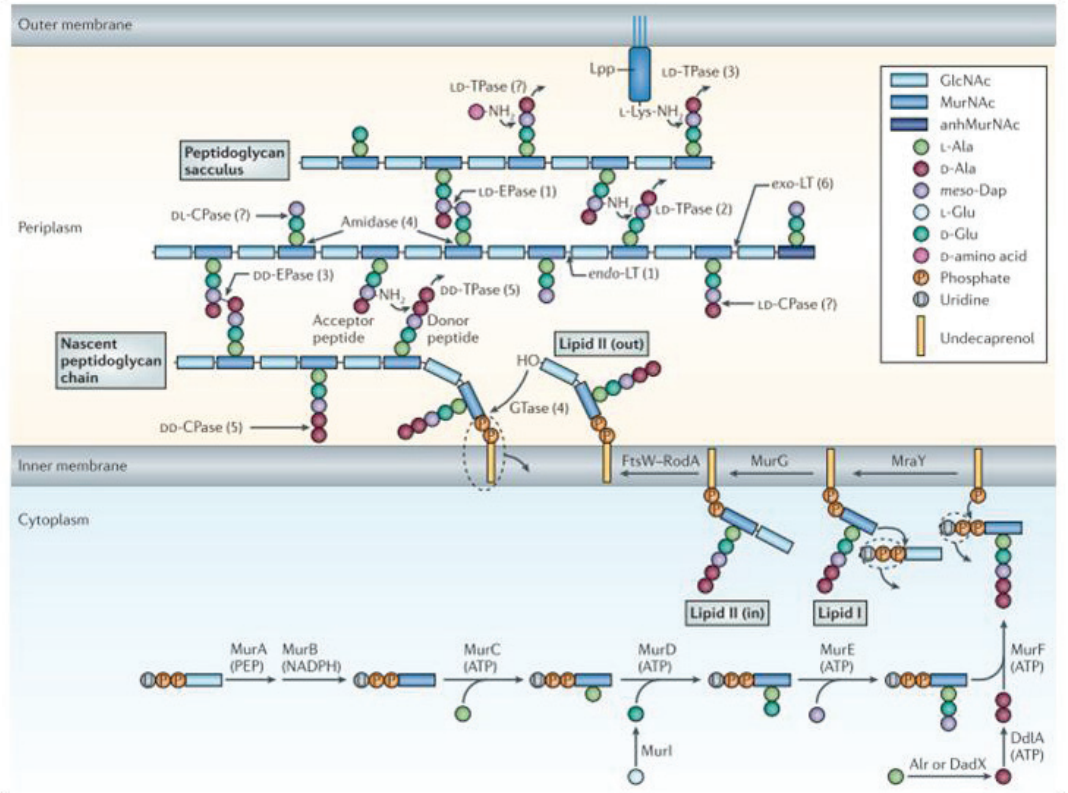


Figure 22. Schéma de la biosynthèse du peptidoglycane (Typas *et al.* 2011). Les précurseurs sont synthétisés dans le cytoplasme, lié au lipide de transport (undécaprenyl phosphate) et transféré à travers la membrane plasmique. Une glycosyltransférase (Gtase) catalyse la polymérisation d'une chaine de peptidoglycane naissante à partir d'un précurseur de lipide II ancré dans la membrane, puis la nouvelle chaine est greffée au peptidoglycane déjà formé grâce à une DD-transpeptidase (DD-Tpase).

II.3.1.2 Paroi des bactéries à Gram positif

La paroi des bactéries à Gram positif contient un PDG très épais (de 30 à 100 nm), dans lequel sont fichés de longs polymères anioniques appelés acides teichoïques (**Figure 23**), composés d'un enchainement de glycérol phosphate, de glucosyl phosphate ou de ribitol phosphate. Ces polymères, dont une partie se trouve à la surface bactérienne, confèrent une charge négative à la paroi des bactéries à Gram positif, grâce aux groupements phosphate. Les acides teichoïques sont fixés de façon covalente soit au peptidoglycane, soit aux lipides de la membrane plasmique ; ces derniers sont alors appelés acides lipoteichoïques. De plus, la surface des Gram positifs peut être décorée de protéines, attachées aux lipides membranaires, au peptidoglycane ou aux acides teichoïques (Silhavy *et al.* 2010).

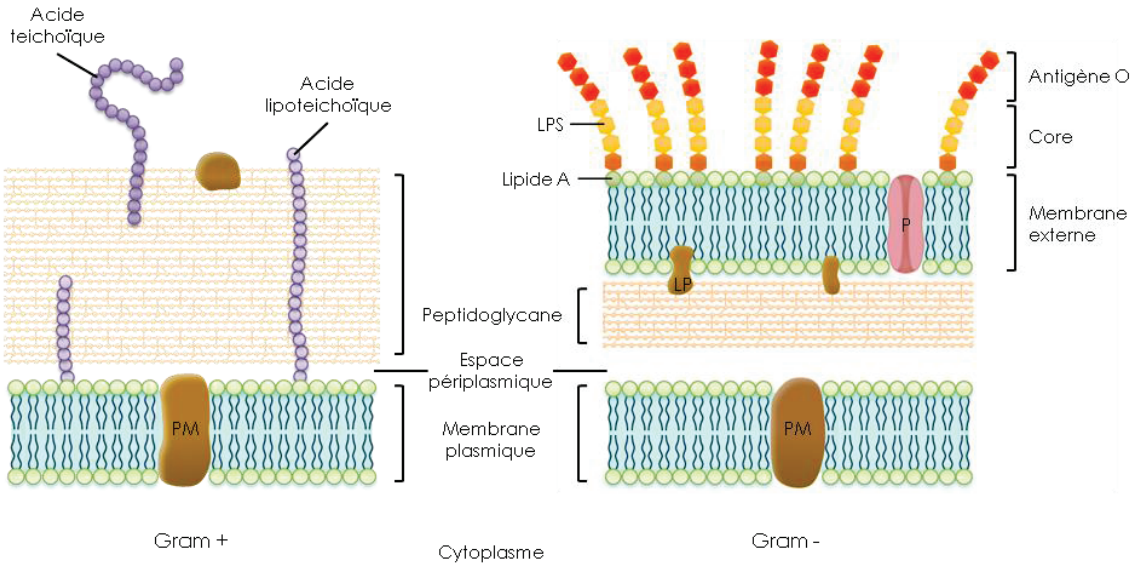


Figure 23. Schéma de l'enveloppe des bactéries à Gram positif et à Gram négatif (d'après Silhavy *et al.* 2010). LP : lipoprotéine, LPS : lipopolysaccharide, P : porine, PM : protéine membranaire.

II.3.1.3 Paroi des bactéries à Gram négatif

La paroi des bactéries à Gram négatif se compose de deux couches principales : la membrane externe et le peptidoglycane (**Figure 23**). La membrane externe est caractéristique des organismes à Gram négatif, et est absente chez les Gram positif. Il s'agit d'une double couche lipidique contenant des phospholipides uniquement du côté du feuillet interne. Le feuillet externe est quant à lui composé de glycolipides, en particulier de lipopolysaccharides (LPS) chargés négativement. Le LPS est un assemblage de trois éléments : i) le lipide A, de nature hydrophobe, et d'une partie polysaccharidique composée ii) du core et de iii) l'antigène O. La membrane externe contient également des protéines, classées en deux groupes : les lipoprotéines, assurant la cohésion entre la membrane externe et le peptidoglycane ; et les porines permettent la diffusion passive de petites molécules à travers la membrane externe (Silhavy *et al.* 2010).

II.3.1.4 Membrane plasmique

La membrane plasmique est la base de l'enveloppe bactérienne. Elle se compose d'une double couche de phospholipides, lui conférant un caractère amphiphile. La membrane plasmique des procaryotes diffère de celle des eucaryotes de par sa composition lipidique. Les phospholipides comme les phosphatidylcholine (PC), les phosphatidyléthanolamines (PE) et les sphingomyèlines (SM) portent une charge neutre, tandis que les phosphatidylglycérol (PG), les cardiolipines (CL) et les phosphatidylsérines (PS) ont une charge nette négative (Yeaman & Yount 2003). Il semble donc évident que la charge nette de la membrane plasmique dépend de sa composition en phospholipide et de leur répartition. Les membranes majoritairement composées de PG, CL ou PS, comme la membrane de

nombreuses bactéries (Sohlenkamp & Geiger 2015), portent une charge globale très négative. A l'inverse, les membranes riches en PE, PC ou SM, comme la membrane des cellules de mammifères, tendent à une charge nette neutre. La composition des membranes apparait donc comme un facteur important permettant aux peptides antimicrobiens des organismes supérieurs de cibler les cellules microbiennes plutôt que les cellules de l'hôte.

II.3.2 Facteurs peptidiques

Comme mentionné précédemment, l'action des PAMs est préférentiellement dirigée vers les membranes chargées négativement. L'activité des PAMs ne repose cependant pas uniquement sur ce critère. En effet, la charge du peptide lui-même, ainsi que la conformation, l'amphiphilie, l'hydrophobicité et l'angle polaire sont des facteurs permettant de moduler l'activité des peptides antimicrobiens.

II.3.2.1 La charge (Q)

La majorité des peptides antimicrobiens décrits à ce jour présentent une charge positive, comprise en moyenne entre +2 et +9. Cette propriété est un atout majeur car elle permet de cibler la membrane des bactéries et d'autres microorganismes chargée négativement. L'abondance de phospholipides (phosphatidyglycérol (PG), phosphatidylsérine (PS) et cardiolipines (CL)) confère en effet la charge nette négative aux membranes bactériennes, d'autant plus élevée par le LPS chez les Gram négatif, et par les acides teichoïques chez les Gram positifs (Yeaman & Yount 2003). L'activité antimicrobienne des PAMs est donc fortement corrélée avec leur charge nette. Par exemple, une étude portant sur le peptide V681 a montré que la diminution de la charge de +6 à +1 ou -5 entraine une diminution de l'activité hémolytique et de l'activité antibactérienne à l'encontre de *Pseudomonas aeruginosa*, et que cette tendance était inversée lorsque la charge nette était augmentée à +9 (Jiang *et al.* 2008). L'augmentation de la cationicité joue donc en faveur des peptides antimicrobiens, jusqu'à un certain point. En effet, Dathe *et al.* ont montré que lorsque la charge nette de la magainine dépasse +6, son activité hémolytique est fortement augmentée et son activité antibactérienne diminuée (Dathe *et al.* 2001).

II.3.2.2 La conformation (χ)

Les peptides antimicrobiens peuvent adopter différentes structures secondaires dont les hélices alpha, les feuillets beta, et les structures mixtes. De nombreux travaux ont montré l'importance de la conformation pour l'activité des peptides antimicrobiens. Par exemple, Matsuzaki *et al.* ont étudié l'effet de l'absence de ponts disulfures chez la tachyplesine, un peptide issu de la limule *Tachypleus tridentatus*. L'activité de la tachyplesine (T-SS) a été comparée à celle d'un analogue linéaire (T-Acm) dont les 4 groupements SH ont été protégés par des groupements acetamidomethyl. Les résultats ont montré que la

tachyplesine est capable de créer des pores et de se transloquer à travers une bicouche lipidique, alors que son analogue T-Acm en est incapable (Matsuzaki *et al.* 1997a).

II.3.2.3 L'amphiphilie (A)

Tous les peptides antimicrobiens possèdent des régions hydrophobes et des régions hydrophiles, permettant ainsi d'obtenir une structure amphiphile. Le modèle d'étude le plus répandu est l'hélice alpha. Une manière de mesurer de façon quantitative l'amphiphilie a été proposée par Eisenberg, et appelée « moment hydrophobe » (noté μ_H) (Eisenberg 1984). Celui-ci est calculé en faisant la somme vectorielle de l'hydrophobicité de chaque acide aminé contenu dans une hélice alpha idéale. Ce concept n'est cependant pas restreint aux hélices alpha, et peut être également appliqué à d'autres types de structures (Eisenberg *et al.* 1984). Des études ont montré la corrélation entre le moment hydrophobe et l'activité des peptides. Il a notamment été démontré que l'augmentation du moment hydrophobe entraine une augmentation de l'activité antibactérienne, mais également l'activité hémolytique (Dathe & Wieprecht 1999).

II.3.2.4 L'hydrophobicité (H)

L'hydrophobicité est définie comme le pourcentage de résidus hydrophobes d'un peptide, et est en moyenne de 50% pour la plupart d'entre eux. Cette propriété joue un rôle très important dans l'interaction avec les membranes, puisqu'elle détermine la mesure dans laquelle le peptide peut s'insérer dans la bicouche lipidique. Cependant, si l'hydrophobicité est nécessaire à la perméabilisation des microorganismes, son augmentation induit une perte de spécificité. La relation entre l'hydrophobicité et la perméabilisation a notamment été étudiée par l'équipe de Wieprecht. Pour cela, des analogues de la magainine 2 ont été créés en modifiant sa séquence sans altérer la charge, la répartition des charges, le moment hydrophobes et l'angle du peptide. Les auteurs ont ensuite évalué la capacité de la magainine et de ses analogues à perméabiliser des vésicules lipidique de différentes charges de surface. Les résultats ont montré que la magainine et ses analogues ont la même capacité de perméabilisation vis-à-vis des vésicules chargées négativement, tandis que la perméabilisation des membranes à faible charge négative voire neutre augmente avec le niveau d'hydrophobicité des peptides. Cette étude montre donc que la sélectivité des peptides diminue avec l'augmentation de l'hydrophobicité. Cette perte de sélectivité a également été mise en évidence par l'évaluation de l'activité antibactérienne et hémolytique (Wieprecht *et al.* 1997).

II.3.2.5 L'angle polaire (θ)

L'angle polaire mesure la distribution relative des faces polaires et apolaires d'un peptide en hélice alpha amphiphile. Ainsi, plus la ségrégation entre les résidus hydrophiles et hydrophobes est faible, plus l'angle polaire est petit (Yeaman & Yount 2003). Ce paramètre a une influence directe sur l'activité des peptides antimicrobiens, et particulièrement sur leur faculté à se fixer aux membranes bactériennes et à former des pores transmembranaires. Dans une étude réalisée par Uematsu et Matsuzaki, l'activité de 2 peptides d'angle polaire différent (100° et 180°) a été comparée. Les résultats ont montré que le peptide au plus faible angle polaire possède une meilleure capacité de perméabilisation et de translocation, ainsi qu'une fréquence de formation de pores plus élevée. Cependant, bien que la fréquence de formation des pores soit plus importante pour ce peptide, le taux de déstructuration des pores transmembranaires est plus élevé, suggérant la formation de pores moins stables (Uematsu & Matsuzaki 2000). Ces travaux montrent donc que la modification de l'angle polaire affecte directement l'activité des peptides antimicrobiens.

II.4 Mécanismes d'action des PAMs cationiques

II.4.1 PAMs à activité antibactérienne

La plupart des peptides antimicrobiens cationiques exercent une activité directe, par perturbation de la membrane cytoplasmique ou par perturbation de fonctions intrabactériennes, telles que la synthèse des acides nucléiques, la synthèse protéique et les réactions enzymatiques.

II.4.1.1 Attraction et attachement

Pour les peptides antimicrobiens ayant un mode d'action direct, la première étape d'attraction est essentielle. Cette interaction se fait grâce à des liaisons électrostatiques entre les peptides cationiques et les éléments chargés négativement des surfaces microbiennes. De nombreuses études ont en effet montré une corrélation entre la charge portée par le peptide et sa capacité d'attachement aux membranes (Bessalle *et al.* 1992; Dathe *et al.* 1996; Jiang *et al.* 2008).

Dans le cas des bactéries à Gram négatif, Hancock a proposé un mécanisme d'interaction peptide/membrane appelé « *self-promoted uptake* » (**Figure 24**). D'après sa théorie, les peptides entreraient en compétition avec des cations divalents Ca^{2+} et Mg^{2+}, alors chassés de leur site de fixation. La déstabilisation de la membrane externe engendrée par ce déplacement permettrait ensuite la translocation des peptides antimicrobiens (Hancock 1997).

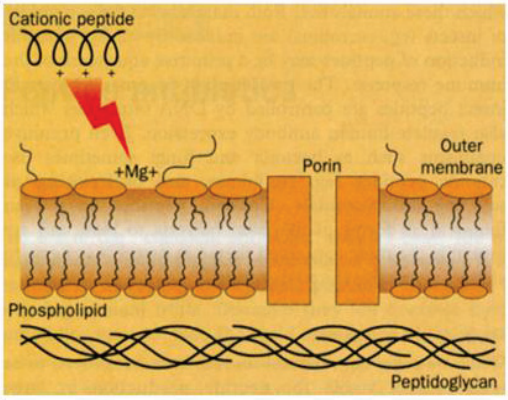


Figure 24. Modèle de translocation des peptides antimicrobiens à travers la membrane externes des bactéries à Gram négatif (Hancock 1997).

Dans le cas des bactéries à Gram positif, les peptides antimicrobiens se fixent aux acides teichoïques chargés négativement présents au niveau du peptidoglycane. Peschel *et al.* ont notamment pu mettre en évidence l'importance des acides teichoïques pour l'activité de différents peptides antimicrobiens sur *Staphylococcus aureus*. En effet, des mutants dont la structure des acides teichoïques a été altérée ont montré une sensibilité accrue à plusieurs peptides d'origine humaine, animale et bactérienne. Ces mutants produisaient des acides teichoïques dépourvus de D-alanine, et portaient par conséquent une charge négative plus importante (Peschel *et al.* 1999).

Une fois la membrane externe et/ou le peptidoglycane franchis, les peptides antimicrobiens atteignent la membrane plasmique, et selon leur nature, engendre la mort bactérienne par différents mécanismes.

II.4.1.2 Mécanismes de mort cellulaire

Les peptides antimicrobiens peuvent exercer leur pouvoir antimicrobien par deux moyens. Le premier repose sur la déstabilisation de la membrane plasmique. Ce mécanisme, utilisé par de nombreux peptides cationiques, est à ce jour bien décrit dans la littérature, surtout pour les peptides en hélice alpha. Cependant, la membrane n'est pas le seul site d'action des peptides antimicrobiens, certains étant également capables de perturber des fonctions bactériennes essentielles (**Figure 25**).

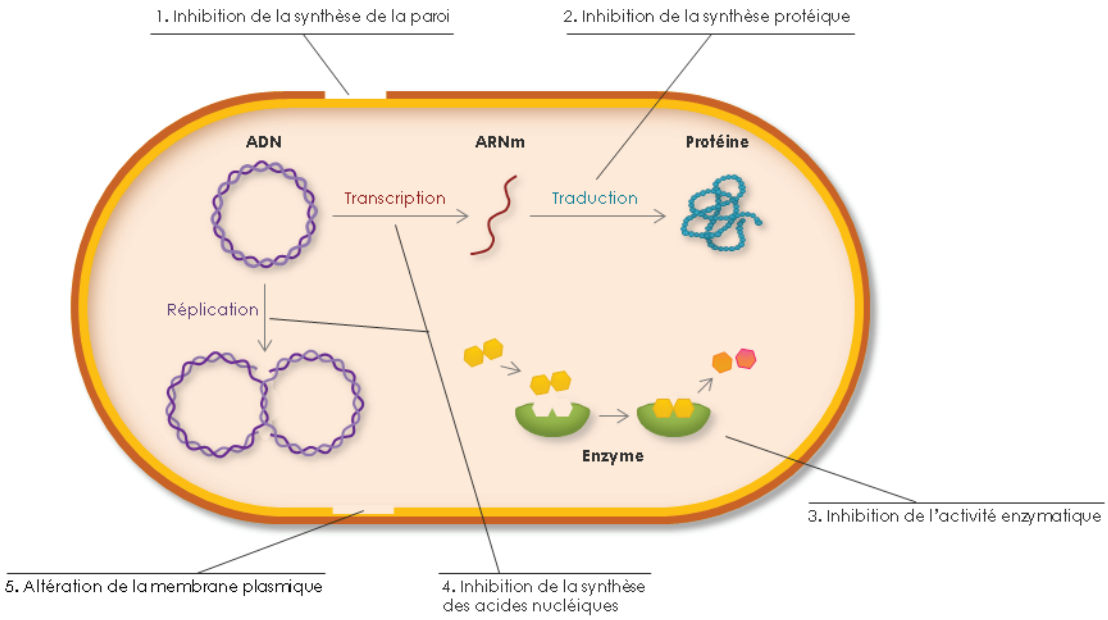


Figure 25. Schéma des différents mécanismes d'action des peptides antimicrobiens.

II.4.1.2.1 Perméabilisation membranaire

Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer comment les PAMs forment des pores pour perméabiliser les membranes. Leur nature amphiphile révèle alors toute son importance, la partie hydrophobe du peptide interagissant avec les lipides membranaires, tandis que la partie hydrophile fait face à la lumière du pore (Jenssen *et al.* 2006). Dans chacun des modèles proposés, à faible ration peptide/lipide, les PAMs se fixent à la surface bactérienne en adoptant une orientation parallèle à la membrane. Lorsque le ratio peptide/lipide augmente, les PAMs commencent à s'orienter perpendiculairement à la membrane, et s'insèrent dans la bicouche lipidique de façon à former un pore transmembranaire. Les peptides forment alors une structure dynamique, dont le diamètre et la stabilité semble fluctuer au cours du temps. Une étude s'intéressant à l'évolution du diamètre des pores a notamment montré l'existence de deux « catégories » de peptides. En effet, certains peptides comme la magainine-2 et LL-37 semblent former des pores larges dont le diamètre varie jusqu'à atteindre une certaine stabilité, alors que d'autres comme le mastoparan et le transportan forment des pores de faible diamètre et instables (Sun *et al.* 2015a).

Bien que certains mécanismes restent à élucider, trois modèles de formation de pores ont été proposés à ce jour.

II.4.1.2.1.1.1 Modèle « barrel-stave »

Le modèle « *barrel-stave* » ou modèle du tonneau fait référence à la structure du pore (**Figure 26A**). Selon ce modèle, un nombre variable de peptides s'insère dans la membrane et s'assemblent en cercle pour former une structure comparable à celle d'un tonneau, les peptides en hélice alpha faisant office de douelles. Lors de l'insertion dans la membrane bactérienne, la région hydrophobe de chaque peptide interagit avec les phospholipides, tandis que la région hydrophile fait face à la lumière du pore. Le recrutement de monomères de peptides supplémentaires permet d'agrandir le diamètre du pore, entrainant la fuite du contenu cytoplasmique et la mort cellulaire (Yeaman & Yount 2003).

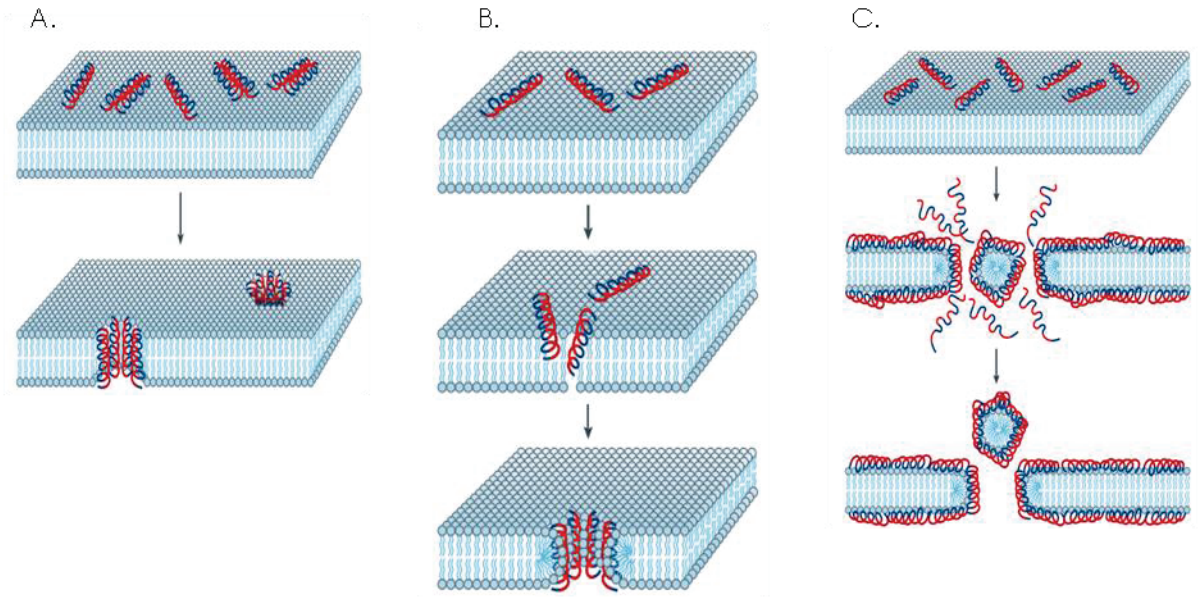


Figure 26. Schéma des différents modes de perméabilisation membranaire des PAMs (Brogden *et al.* 2005). (A) modèle « barrel-stave » ; (B) modèle « toroidal pore » ; (C) modèle « carpet ». Les résidus hydrophobes des peptides sont représentés en rouge et les résidus hydrophiles sont représentés en bleu.

L'alaméthicine, un peptide en hélice alpha de 20 aa issu du champignon *Trichoderma viride*, a été très étudié comme modèle de formation de pores transmembranaires, notamment pour son activité contre les bactéries à Gram positif. Après leur insertion dans la membrane, les peptides s'assemblent pour former un pore de type *barrel-stave*, dont le diamètre varie en fonction de la composition lipidique de la membrane-cible (He *et al.* 1996). Récemment, une équipe canadienne a pour la première fois pu visualiser la structure des pores formés par l'alaméthicine (Pieta *et al.* 2012). Les images obtenues par microscopie à haute résolution ont permis de mettre en évidence des pores en forme de fleur, dont 6 monomères d'alaméthicine constituent les pétales (**Figure 27**). Les images suggèrent également que ces

pores ne sont pas distribués de manière aléatoire dans la membrane. En effet, les pores semblent s'organiser entre eux de façon à former un treillis, cette particularité étant due au fait que chaque molécule d'alaméthicine est partagée par deux pores adjacents.

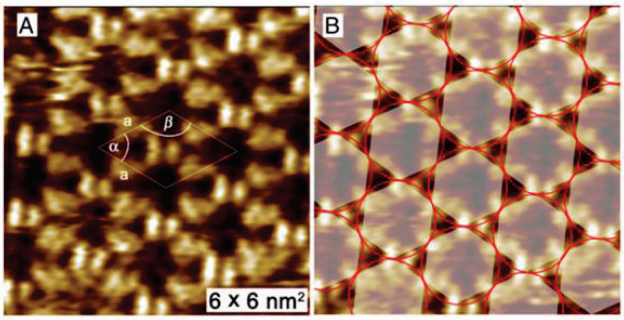


Figure 27. Structure en fleur des pores d'alaméthicine observée sur une matrice de phospholipides par microscopie à effet tunnel (Pieta *et al.* 2012).

II.4.1.2.1.1.2 Modèle « toroidal pore »

Le modèle « *toroidal pore* » ou modèle du pore torique diffère du modèle « *barrel-stave* » de par sa structure. Selon ce deuxième mécanisme, les résidus hydrophobes des peptides s'associent aux têtes polaires des phopholipides, et induisent le réagencement de ces derniers jusqu'à la fusion des deux feuillets membranaires (**Figure 26B**). La lumière du pore est alors tapissée de peptides et de têtes phospholipidiques (Yeaman & Yount 2003). Deux architectures de pores protéolipidiques ont été identifiées : le type « matrice » et le type « arc » (Gilbert *et al.* 2014).

Selon le type « matrice », la lumière du pore est composée de peptides antimicrobiens et de lipides membranaires intercalés (**Figure 28A** et **28B**).

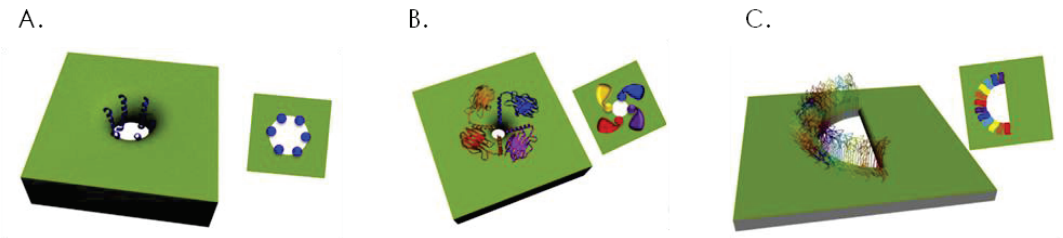


Figure 28. Représentation schématique des différents types de pores toriques (Gilbert *et al.* 2014). (A) et (B) Pores toriques de type « matrice » ; (C) Pore torique de type « arc ».

Ce type de pore a notamment été décrit pour la mélittine, un petit peptide en hélice alpha de 26 aa issu du venin d'abeille (Yang *et al.* 2001b). L'adsorption du peptide conduit à l'amincissement de la bicouche lipidique, et en s'accumulant, induit une distorsion de la membrane laissant apparaitre la région hydrophobe des phospholipides. L'insertion des peptides et le réarrangement des lipides conduit rapidement à la formation d'un pore

torique de faible diamètre (environ 1,5 nm) mais néanmoins capable de s'élargir par l'ajout de peptides supplémentaires (**Figure 29**) (Sun *et al.* 2015b). De plus, lors de la désintégration du pore, il semblerait qu'une partie des peptides soit transloquée à travers la membrane vers le cytoplasme bactérien. Ceci pourrait alors constituer un moyen pour la mélittine d'atteindre une cible intracellulaire (Matsuzaki *et al.* 1997b).

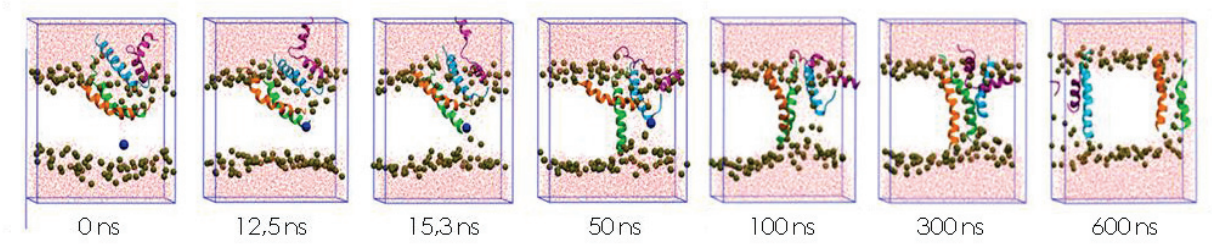


Figure 29. Modèle illustrant le processus de formation d'un pore transmembranaire induit par la mélittine (Sun *et al.* 2015). La région polaire des phospholipides est représentée en marron et les molécules d'H_2O sont représentées en rouge. Pour plus de clarté, les molécules de mélittine sont représentées de différentes couleurs, et la région hydrophobe des phospholipides n'est pas représentée.

Selon le type « arc », seul un arc de peptides intercalés de lipides borde la lumière du pore, tandis que le reste du pore est constituée uniquement de têtes phospholipidiques (**Figure 28C**). Le mécanisme de formation de ce type de pore à été sujet à controverse. Cependant un modèle consensus a été proposé, et suppose que les peptides s'associent en cercle avant leur insertion dans la membrane ; certains cercles, bien qu'incomplets, suivraient également ce schéma et formeraient des pores fonctionnels. Une récente étude a en effet pu montrer la stabilité des pores de type « arc », grâce à des simulations de dynamique moléculaire sur la protégrine, un peptide en feuillet beta de 18 aa issu des leucocytes porcins (Prieto *et al.* 2014).

II.4.1.2.1.1.3 Modèle « carpet-like »

Contrairement aux deux mécanismes précédents, le modèle « *carpet-like* » ne nécessite pas la formation de structures quaternaires. D'après ce modèle, les monomères de peptides, structurés ou non, se fixent parallèlement à la surface des membranes chargées négativement, et s'accumulent jusqu'à former un tapis. Lorsque la concentration seuil est atteinte, les peptides entrainent une perturbation de la membrane et détruisent la bicouche lipidique à la manière d'un détergent, *via* la formation de trous et de micelles (**Figure 26C**). Durant tout le processus, les peptides ne sont en contact qu'avec les têtes polaires des phospholipides (Yeaman & Yount 2003). Ce modèle a notamment été décrit pour des peptides comme la caerin 1.1 et la cécropine P1 (Gazit *et al.* 1996; Wong *et al.* 1997).

II.4.1.2.2 Perturbation des fonctions bactériennes

Bien que très documentée, la perméabilisation membranaire n'est pas le seul mécanisme d'action des peptides antimicrobiens. Il semblerait en effet que dans certains cas, ce mode d'action ne soit pas suffisant pour tuer la bactérie. Plus récemment, de nombreuses études ont permis de montrer que les peptides antimicrobiens sont capables d'interagir avec des cibles intrabactériennes, afin d'altérer certaines fonctions essentielles tels que la synthèse de la paroi bactérienne, la synthèse des acides nucléiques et des protéines, ou encore les réactions enzymatiques.

II.4.1.2.2.1.1 Inhibition de la synthèse de la paroi

L'enveloppe bactérienne est le siège de fonctions essentielles telles que le maintien de la pression osmotique, le contrôle de la diffusion des molécules, la protection contre les agressions physico-chimiques et le maintien de la forme de la cellule. L'altération directe ou indirecte d'une ou plusieurs de ses fonctions par les peptides antimicrobiens entraine alors la mort de la bactérie. Bien que très différentes entre elles, les parois des bactéries à Gram positif et des bactéries à Gram négatif partagent un élément commun : le peptidoglycane (PDG). La synthèse du PDG comprend une étape cytoplasmique au cours de laquelle les précurseurs sont synthétisés, puis transloqués à travers la membrane plasmique vers l'extérieur de la cellule, afin d'être incorporés au PDG naissant (**Figure 22**). A ce jour, la littérature recense quelques études montrant le rôle de certains peptides antimicrobiens dans l'inhibition de la biosynthèse du peptidoglycane. C'est notamment le cas de la défensine humaine HBD-3. D'après Sass *et al.*, HBD-3 n'agirait pas par déstabilisation de la membrane chez *S. aureus*, mais plutôt par interférence avec la machinerie de synthèse de la paroi. En effet, ce peptide interagit directement avec le précurseur du PDG (ou lipide II), inhibant ainsi les dernières réactions enzymatiques précédant sa translocation à travers la membrane. Ces perturbations dans la synthèse du PDG entrainent des lésions au niveau de la paroi bactérienne et la fuite du contenu cytoplasmique, visibles par microscopie électronique (**Figure 30**) (Sass *et al.* 2010).

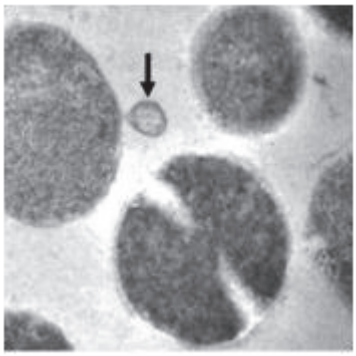


Figure 30. Le traitement avec HBD-3 induit la formation de protrusions membranaires chez *S. aureus* (Sass *et al.* 2010).Les photos de microscopie électronique à transmission ont été réalisées après traitement des bactéries avec HBD-3 (15µm) pendant 30 min. Environ 5 à 10% des bactéries présentent des protrusions membranaires remplies de cytoplasme (flèche).

Certains PAMs d'origine bactérienne peuvent également inhiber la biosynthèse du PDG. C'est notamment le cas de la mersacidine, un peptide de 20 aa produit par *Bacillus sp*, appartenant à la famille des lantibiotiques. La mersacidine interfère avec la transglycosylation, réaction enzymatique visant à incorporer un monomère de lipide II au PDG naissant. Ce mécanisme d'inhibition opère via l'interaction du peptide au niveau d'un site spécifique, différent de celui de la vancomycine (Brötz *et al.* 1998).

II.4.1.2.2.1.2 Inhibition de la synthèse des acides nucléiques et des protéines

Outre leur action sur la membrane bactérienne, les peptides antimicrobiens peuvent également perturber des fonctions intrabactérienes essentielles telles que la synthèse des acides nucléiques et des protéines.

L'indolicidine, un petit peptide de 13 aa issu des granules des neutrophiles bovins, est capable de se lier à l'ADN, et en particulier au niveau de fragments double brin AT, CG et AG (Hsu *et al.* 2005). Chez les procaryotes, la microcine B17 produite par *E. coli* bloque la réplication de l'ADN en inhibant l'action enzymatique de la gyrase, provoquant ainsi le clivage du chromosome double brin (Vizán *et al.* 1991). Autre exemple, la buforin II, un peptide dépourvu d'activité lytique, entre dans le cytoplasme d'*E. coli* pour se lier à l'ADN et à l'ARN, entrainant la mort rapide des bactéries (Park *et al.* 1998). Le peptide PR-39 exerce quant à lui son activité antimicrobienne par inhibition de la synthèse de l'ADN et des protéines (Boman *et al.* 1993). La pyrrhocoricine, l'apidaecine, l'oncocin et la bactenecine (Bac7) partagent des cibles communes. En effet, ces peptides se fixent aux protéines chaperonnes DnaK et/ou GroEL et inhibent leut activité ATPase, empêchant ainsi le repliement des protéines bactériennes (Otvos Jr. *et al.* 2000; Kragol *et al.* 2001; Chesnokova *et al.* 2004; Scocchi *et al.* 2009; Knappe *et al.* 2011). Les PAMs ayant cependant rarement une fonction unique, des expériences de microarrays ont été développées afin d'identifier toutes les cibles des peptides antimicrobiens. En utilisant une micropuce protéomique d'*E. coli*, l'équipe de Shah *et al.* a évalué à 434 le nombre de cibles de PR-39. Ces protéines

cibles sont notamment associées à des fonctions de transport et de métabolisme des nucléotides, à la traduction, au transport et au métabolisme de coenzymes, ainsi qu'à la synthèse, le transport et le catabolisme de métabolites secondaires (Shah *et al.* 2015). Cette étude a également pu montrer que la lactoferricine, PR-39 et Bac7 partagent 30 cibles communes, et notamment l'arginine décarboxylase, une enzyme essentielle à la survie d'*E. coli* en milieu acide (Shah *et al.* 2015).

II.4.1.3 Spectre d'activité

La plupart des peptides antimicrobiens possèdent un large spectre d'activité antibactérien, et ceci s'avère être un atout majeur notamment pour les organismes supérieurs. Cette propriété permet de neutraliser de nombreuses bactéries pathogènes, aussi bien Gram positives que Gram négatives. Le **tableau 3** propose une liste non exhaustive de spectres antibactériens de PAMs d'origine humaine et animale.

Tableau 3. Spectre d'activité antibactérien des PAMs.

Peptide	Structure	Source	Bactérie cible	Référence
Cathélicidine	Hélice α	Homme, Souris	*Acinetobacter baumanii* *Haemophilus influenzae* *Salmonella sp.* *Mycobacterium tuberculosis* *Bacillus anthracis* *Micrococcus luteus*	Vandamme *et al.*, 2012
HNP-1	Feuillets β	Homme	*Listeria monocytogenes* *Staphylococcus aureus* *Streptococcus pyogenes* *Proteus mirabilis* *Neisseria gonorrheae* *Salmonella* Typhimurium	Jonard *et al.*, 2006
β-Défensine	α-β	Homme, Souris	*Staphylococcus aureus* *Klebsiella pneumoniae* *Helicobacter pylori* *Escherichia coli* *Legionella pneumophila* *Salmonella* Typhimurium	Jonard *et al.*, 2006 ; Semple & Dorin, 2012 ; Scharf *et al.*, 2010 ; Ganz, 2003
Protégrine	Feuillets β	Porc	*Escherichia coli* *Pseudomonas aeruginosa* *Staphylococcus aureus* *Staphylococcus epidermidis* *Streptococcus agalactiae* *Klebsiella pneumoniae*	Gerrano & Zanetti, 2000
Cécropin	Hélice α	Porc, Papillon	*Salmonella* Typhimurium *Bacillus megaterium* *Pseudomonas aeruginosa* *Acinetobacter calcoaceticus* *Escherichia coli*	Boman, 1995

Il existe cependant quelques peptides au spectre antibactérien réduit. Citons comme exemple la bombinine, un peptide extrait de la peau d'une grenouille. Ce peptide semble posséder un spectre d'activité étroit et dont la quasi-totalité est composée de souches de staphylocoques et d'*Escherichia coli* (Simmaco *et al.* 1991).

II.4.2 PAMs à activité antivirale

II.4.2.1 Mécanismes d'action

II.4.2.1.1 Interaction directe avec la particule virale

L'interaction directe entre PAM et particule virale, en particulier la bicouche lipidique des virus enveloppés, peut déstabiliser le virion et le rendre non infectieux. La dermaseptine issue de la peau d'une grenouille possède une activité anti-HIV (*Human Immunodeficiency Virus*). La dermaseptine agit par interaction directe entre le virion avant son entrée dans la cellule-hôte. En effet le peptide fragmente l'enveloppe virale et détruit la nucléocapside, réduisant ainsi l'attachement et l'entrée du virus dans la cellule (Lorin *et al.* 2005). La dermaseptine n'a en revanche aucun effet direct sur le virus HSV (*Herpes Simplex Virus*). L'indolicidine, isolée des neutrophiles bovins, est également active contre le HIV, et capable d'inactiver le virus en moins d'une heure. L'activité du peptide étant sensible à la baisse de température, il semblerait que son mécanisme d'action repose sur une interaction directe avec l'enveloppe virale (Robinson *et al.* 1998). La rétrocycline 2 protège quant à elle les cellules épithéliales cervicales de l'infection par le HSV. Des tests de résonnance plasmonique de surface ont montré la fixation du peptide à la glycoprotéine B (gB2) du HSV avec une forte affinité. Ces données suggèrent que ce peptide protège de l'infection à HSV par fixation à la glycoprotéine B, dont la présence est essentielle pour l'attachement et l'entrée du virus dans la cellule hôte (Yasin *et al.* 2004).

II.4.2.1.2 Inhibition de l'entrée du virus

Les protéoglycanes sont présents dans la matrice extracellulaire et à la surface de la cellule. Cette molécule est constituée d'une protéine sur laquelle sont greffées une ou plusieurs chaines de glycosaminoglycane (GAG) chargées négativement. La cationicité de certains PAMs leur permet d'interagir directement avec ces molécules de surface, dont l'héparane sulfate (HS), l'un des GAG les plus importants pour l'attachement des virus (Spillmann 2001; Seo *et al.* 2010). Des peptides comme la lactoferrine et la lactofericine peuvent inhiber l'infection des cellules Vero et des MRC-5 par le HSV en se fixant aux héparanes sulfates, empêchant ainsi l'interaction virus/HS (Jenssen *et al.* 2004; Andersen *et al.* 2004).

Les PAMs peuvent également interagir directement avec certains récepteurs viraux spécifiques de la cellule hôte, et moduler l'attachement et l'entrée des virus. Un exemple bien connu est celui d'un analogue de la polyphémusine II (T22) capable de se fixer au

récepteur de chimiokines CXCR4, également utilisé par le HIV comme corécepteur pour l'entrée dans les cellules T (Murakami *et al.* 1997). Une équipe japonaise a en effet pu observer l'inhibition par le T22 de l'entrée des souches de HIV utilisant le CXCR4 comme corécepteur, contrairement aux souches utilisant le CCR5 (Xu *et al.* 1999).

II.4.2.1.3 Interaction avec une cible intracellulaire

Il a été démontré que les PAMs peuvent inhiber les étapes intracellulaires de l'infection virale. La mélittine et la cécropine sont par exemple capables d'inhiber la production de virions de HIV au sein de la cellule, en supprimant l'expression des gènes viraux (Wachinger *et al.* 1998). L'indolicidine est quant à elle capable d'inhiber l'activité de l'intégrase, une enzyme permettant l'insertion de l'ADNc du virus dans le génome de la cellule hôte (Krajewski *et al.* 2004). De son côté, la cécropine A inhibe la réplication du virus Junin en diminuant la synthèse des protéines virales, sans pour autant affectée la synthèse protéique de la cellule hôte (Albiol Matanic & Castilla 2004).

II.4.2.2 Spectre d'activité

Le spectre d'activité des PAMs comprend des virus à ADN ou ARN enveloppés ou non. La structure secondaire des peptides ne permet pas de prédire leur activité antivirale. Le **tableau 4** propose une liste non exhaustive de spectres antiviraux de PAMs d'origine humaine et animale.

Tableau 4. Spectre d'activité antivirale des PAMs (Jenssen *et al.* 2006).

Peptide	Structure	Source	Virus cible	Génome
Magainine	Hélice a	Grenouille	HSV	ADN double brin
			HIV	ARN simple brin
Cécropine	Hélice a	Insecte	Virus Junin	ARN simple brin
			HSV	ADN double brin
			HIV	ARN simple brin
Mellitine	Hélice a	Abeille	HSV	ADN double brin
			Virus Junin	ARN simple brin
LL-37	Hélice a	Homme	HSV	ADN double brin
Brevinine-1	Hélice a	Grenouille	HSV	ADN double brin
θ-Défensine	cyclique	Primate, Homme	HIV	ARN simple brin
			HSV	ADN double brin
Défensine	Feuillet β	Homme, Lapin	HSV	ADN double brin
			IAV	ARN simple brin
			HCMV	ADN double brin
			VSV	ARN simple brin
			HIV	ARN simple brin
			Adenovirus	ADN double brin
Tachyplesine	Feuillet β	Limule	HIV	ARN simple brin
			HSV	ADN double brin
			VSV	ARN simple brin
			IAV	ARN simple brin

IAV : Influenza A virus, HCMV : Human cytomegalovirus, VSV : Vesicular stomatitis Indiana virus

II.4.3 PAMs à activité antifongique

Les mécanismes d'action des PAMs à activité antifongique comprennent notamment la lyse cellulaire par fixation et déstabilisation de la membrane, l'inhibition de la synthèse de la paroi et la dépolymérisation du cytosquelette d'actine (De Lucca & Walsh 1999). L'indolicidine possède par exemple une activité fongicide à l'encontre des champignons pathogènes *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichosporon beigelli* et *Candida albicans*. D'après Lee *et al.*, le peptide déstabilise la membrane des cellules fongiques grâce à une interaction directe avec la bicouche lipidique (Lee *et al.* 2003). La morphologie de *C. albicans* traitée avec un analogue du PMAP-23 (*Pig myeloid antimicrobial peptide*) ou la mélittine témoigne également d'une potentielle activité de perméabilisation (**Figure 31**).

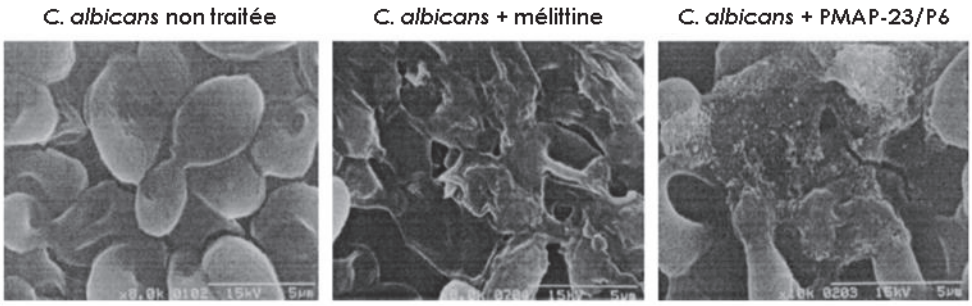


Figure 31. Le traitement avec le la mélittine ou le PMAP-23/P6 induit des changements morphologiques chez *C. albicans* (d'après Lee *et al.* 2002). Les photos de microscopie électronique à balayage ont été réalisées après traitement des levures avec 12,5 µM de mélittine ou 12,5 µM pendant 4h à 28°C.

II.4.4 PAMs à activité antiparasitaire

La magainine 2 issue de la peau de la grenouille *Xenopus laevis* possède une activité antiprotozoaire à l'encontre de *Paramecium caudatum*, *Amoeba proteus* et *Euglena gracilis*, puisque l'exposition à 10µg/ml de peptide entraine le gonflement et l'explosion de ces protistes (Zasloff 1987). Le peptide PMAP-23 exerce quant à lui une forte activité antinématode contre les œufs et les vers de *Caenorhabditis elegans*. Les travaux de Park *et al.* suggèrent que l'activité du peptide porcin repose sur la déstabilisation de la membrane cellulaire via la formation de pores ou par interaction directe avec la bicouche lipidique (Park *et al.* 2004).

II.5 Mécanismes de résistance aux PAMs

Lors d'une infection, les microorganismes pathogènes doivent faire face aux peptides antimicrobiens produits par l'hôte pour se défendre. Au cours de leur évolution, les bactéries ont développé des mécanismes de résistance aux PAMs, exprimés de façon constitutive ou inductible. Les stratégies de résistance aux PAMs mises en place par les bactéries pathogènes reposent notamment sur la modification de la surface bactérienne, l'utilisation

de transporteurs membranaires, l'inactivation directe des PAMs ou encore l'inhibition de l'expression des PAMs (**Figure 32**).

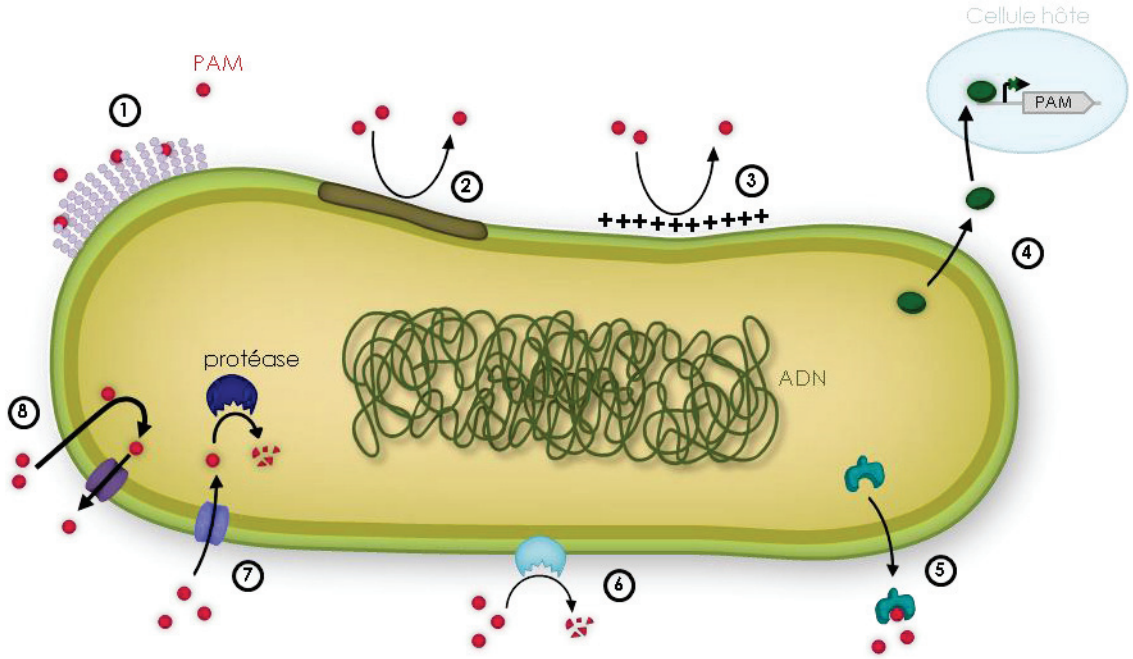


Figure 32. Schéma des différents mécanismes de résistance aux PAMs. (1) production d'un EPS ou d'une capsule, (2) modification de la fluidité membranaire, (3) modification de la charge de surface, (4) inhibition de l'expression des gènes de PAMs, (5) neutralisation des PAMs, (6), dégradation protéolytique, (7) imports des PAMs puis dégradation et (8) export des PAMs.

II.5.1 Modification de la surface bactérienne

II.5.1.1 Protection de la surface bactérienne

Pour se protéger de la réponse immunitaire de l'hôte, certaines bactéries recourent à la production d'une matrice d'exopolysaccharides ou d'une capsule, recouvrant la surface bactérienne. Ces structures agissent alors comme un bouclier, empêchant toute interaction entre les PAMs et la surface microbienne.

Le pathogène *Staphylococcus epidermidis* synthétise un exopolymère cationique nommé PIA (*polysaccharide intercellular adhesion*) codé par l'opéron *ica*, et un exopolymère anionique nommé PGA (*poly-γ-DL-glutamic acid*) codé par le gène *cap* (Koprivnjak & Peschel 2011; Anaya-López *et al.* 2013). Des études ont montré que la mutation des gènes *ica* ou *cap* augmente la sensibilité des bactéries aux peptides cationiques humains LL-37 et HBD-3, mais également la sensibilité à la dermcidine, un peptide anionique (Vuong *et al.* 2004a; b; Kocianova *et al.* 2005). Ces matrices polysaccharidiques protégeant la bactérie à la fois contre les peptides cationiques et les peptides anioniques, il semblerait que le mécanisme de résistance implique la répulsion électrostatique des peptides mais également leur séquestration mécanique (Koprivnjak & Peschel 2011).

La capsule constitue également une barrière protectrice contre les PAMs, et est utilisée par de nombreuses bactéries pathogènes. En effet, Campos *et al.* ont montré que les souches de *Klebsiella pneumonia* capsulées sont plus résistantes aux défensines, à la lactoferrine et à la polymyxine B que les souches mutantes non capsulées. De plus, ces travaux ont montré une augmentation de l'expression de la capsule bactérienne induite par la présence des PAMs (Campos *et al.* 2004). Des résultats similaires ont également été obtenus avec *Neisseria meningitidis*, dont la capsule contribue à la résistance au peptide humain LL-37 (Jones *et al.* 2009). Par ailleurs, l'étude de Llobet *et al.*, a révélé que la capsule purifiée de *Streptococcus pneumoniae* sérotype 3 ou de *P. aeruginosa* permet d'accroitre la résistance d'une souche de *K. pneumonia* non capsulée contre la polymyxine B et la défensine humaine HNP-1 (Llobet *et al.* 2008). D'après les auteurs, ces bactéries pourraient induire la libération de polysaccharides capsulaires dans le milieu en réponse aux PAMs afin d'inhiber leur interaction avec leur cible bactérienne (Llobet *et al.* 2008; Guilhelmelli *et al.* 2013).

II.5.1.2 Modification de la charge du surface

La toxicité sélective des PAMs contre les bactéries est essentiellement due à l'interaction électrostatique entre les peptides et les phospholipides anioniques de la membrane externe ou des composants de la paroi bactérienne (Anaya-López *et al.* 2013). Les bactéries à Gram positif et à Gram négatif ont alors développé des mécanismes de résistance aux PAMs basés sur la modification des constituants de leur paroi, afin d'en diminuer la charge nette négative. Réduire la charge négative de la surface bactérienne permet en effet de diminuer l'attraction électrostatique des PAMs, les gardant ainsi éloignés de leur cible. Chez les bactéries à Gram négative, la stratégie consiste à masquer les charges négatives du lipide A des LPS en ajoutant un groupement 4-amino-4-déoxy-L-arabinose (L-Ara4N) ou phosphoéthanolamine (pEtN), tandis que les bactéries à Gram positifs procèdent à la D-alanylation de leurs acides teichoïques. Enfin, certaines bactéries peuvent modifier leurs phospholipides à l'aide de L-lysine ou de L-alanine.

II.5.1.2.1 Modification des acides teichoïques par D-alanylation

Certaines bactéries à Gram positifs telles que *S. aureus* et *S. pneumoniae* sont capables de résister aux PAMs grâce à la D-alanylation des acides teichoïques (AT) et des acides lipoteichoïques (ALT) (Peschel *et al.* 1999; Kovács *et al.* 2006). L'incorporation de D-alanine, portant un groupement amine ($-NH_3^+$) chargé positivement, permet d'abaisser la charge négative des AT et des ALT riches en groupements phosphates (**Figure 33**).

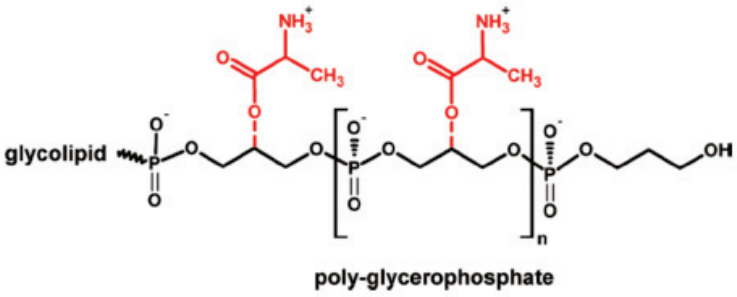


Figure 33. Représentation d'un acide lipoteichoïque supplémenté en D-alanine (Anaya-Lopez *et al.* 2013). L'acide lipoteichoïque est composé d'une chaine de poly-glycérophosphates ancrée au glycolipide membranaire. L'ajout de D-alanine (en rouge) à la chaine de poly-glycérophosphates (en noir) augmente la charge positive et permet de diminuer la charge nette négative de l'acide lipoteichoïque.

Le processus de D-alanylation requière l'action de quatre protéines codées par l'opéron *dltABCD* (Neuhaus & Baddiley 2003). La ligase cytoplasmique DltA ou Dcl (*D-alanyl carrier ligase*) active puis transfère la D-alanine à la protéine porteuse DltC ou Dcp (*D-alanyl carrier protein*) avec l'aide de la protéine chaperonne DltD. Le complexe DltC-D-alanine est ensuite transloqué à travers la membrane cytoplasmique grâce à la protéine DltB (**Figure 34**) (Neuhaus & Baddiley 2003).

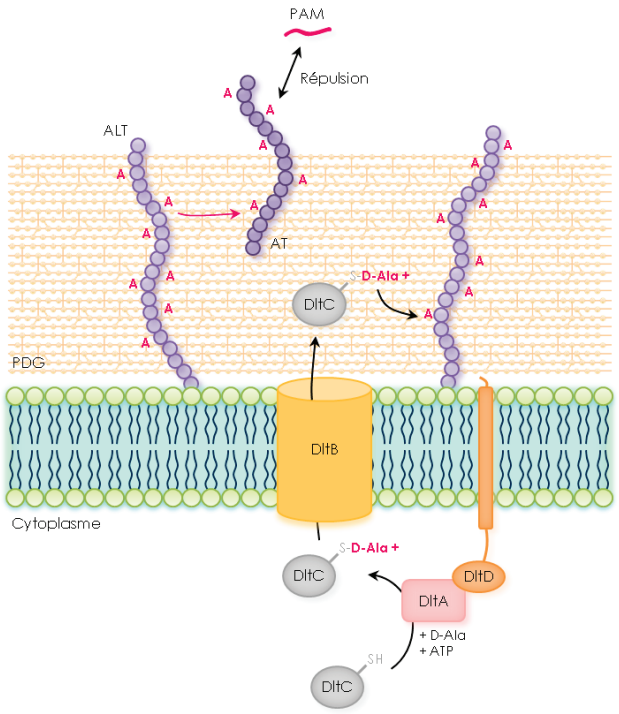


Figure 34. Schéma du mécanisme d'incorporation de D-alanine au niveau des acides teichoïques (d'après la thèse de Rita Kamar). PDG : peptidoglycane, ALT : acide lipoteichoïque, AT : acide teichoïque, PAM : peptide antimicrobien, D-Ala : D-alanine.

L'opéron *dlt* a été identifié chez plusieurs pathogènes dont les Streptocoques des groupes A et B, *Streptococcus pneumonia*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* et *Bacillus subtilis* (Perego *et al.* 1995; Abachin *et al.* 2002; Poyart *et al.* 2003; Kristian *et al.* 2005; Fabretti *et al.* 2006; Kovács *et al.* 2006; Cole & Nizet 2016). L'inactivation du gène *dltA* de ces espèces augmente leur électronégativité et par conséquent augmente également leur sensibilité à certains PAMs, dont les défensines humaines et la cathélicidine LL-37 (Cole & Nizet 2016).

II.5.1.2.2 Modification des phospholipides par ajout de L-alanine ou de L-lysine

Une autre stratégie utilisée par les bactéries pour abaisser la négativité de leur membrane consiste à ajouter des molécules de L-lysine ou de L-alanine chargées positivement au niveau des phosphatidylglycéroles (PG) (**Figure 35**) (Anaya-López *et al.* 2013).

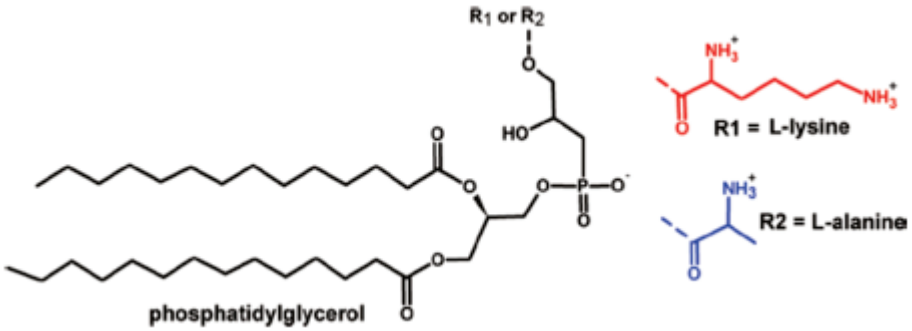


Figure 35. Représentation d'un phosphatidylglycérole supplémenté en L-lysine ou en L-alanine (Anaya-Lopez *et al.* 2013). La liaison en pointillé indique la modification apportée au phosphatidylglycérole (en noir) par ajout de L-lysine (en rouge) ou de L-alanine (en bleu).

L'ajout de L-lysine est utilisé en majorité par les bactéries à Gram positif et est réalisé par le facteur MprF (*Multiple peptide resistance Factor*) (Peschel *et al.* 2001), tandis que les bactéries à Gram négatif préfèrent l'ajout de L-alanine, réalisé par un orthologue du facteur MprF (Klein *et al.* 2009). Le facteur MprF est une protéine membranaire composée de deux domaines fonctionnels : un domaine C-terminale hydrophile cytoplasmique chargé de synthétiser le lysyl-phosphatidylglycérole (Lys-PG) et un domaine N-terminale hydrophobe permettant de transloquer le Lys-PG vers le feuillet externe de la membrane cytoplasmique (**Figure 36**) (Ernst *et al.* 2009; Anaya-López *et al.* 2013).

La synthèse de Lys-PG permet à *S. aureus* d'augmenter sa résistance aux PAMs, cependant la présence des deux domaines de MprF est nécessaire pour assurer ce phénotype (Ernst *et al.* 2009). En effet, chez *S. aureus*, l'inactivation de *mprF* accroit la sensibilité à de nombreux PAMs d'origine humaine, animale ou bactérienne, et diminue jusqu'à trente fois la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) de certains d'entre eux (Peschel *et al.* 2001). De plus, des séquences homologues du gène *mprF* ont été identifiées chez les pathogènes humains *P. aeruginosa*, *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *E. faecalis*, *B. anthracis*, and *C. diphtheriae* (Peschel *et al.* 2001).

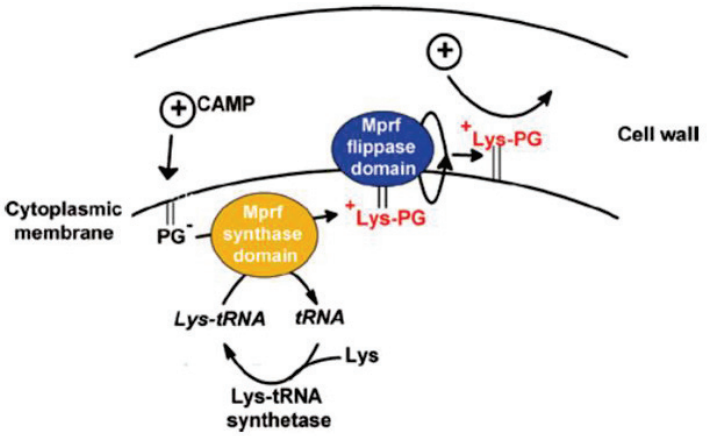


Figure 36. Schéma du mécanisme d'action du facteur MprF (Anaya-Lopez *et al.* 2013). Le domaine synthase de la protéine MprF (en orange) permet de synthétiser le Lys-PG à partir d'un Lys-tRNA et d'un phosphatidylglycérole, tandis que le domaine flippase (en bleu) permet de transloquer le Lys-PG vers le feuillet externe de la membrane cytoplasmique.

II.5.1.2.3 Modification du LPS par ajout de phosphoéthanolamine ou d'aminoarabinose

Une autre stratégie des bactéries à Gram négatif consiste à masquer la charge négative de leur membrane externe portée par le lipide A du LPS. La modification des groupements phosphates du lipide A à l'aide de composés aminés chargés positivement tels que la phosphoéthanolamine (pEtN) ou le 4-amino-4-déoxy-L-arabinose (L-Ara4N) permet de réduire la charge négative nette globale du LPS, diminuant ainsi l'interaction avec les PAMs (**Figure 37**). La greffe de pEtN au lipide A peut être réalisée au niveau du groupement phosphate de la position C-1 et/ou C-4, selon l'espèce bactérienne (Anaya-López *et al.* 2013). Chez *Helicobacter pylori*, l'ajout de la pEtN comporte deux étapes : (i) la phosphatase LpxEHP élimine le groupement phosphate en position C-1 et (ii) la transférase EptAHP ajoute le résidu pEtN sur le lipide A. L'inactivation du gène *lpxEHP* conduit au remplacement du résidu pEtN par un groupement phosphate en position C-1 du lipide A, entrainant une augmentation de la charge négative globale et une diminution de la CMI de la polymyxine B (>250µg/mL pour la souche sauvage, contre 10µg/ml pour le mutant) (Tran *et al.* 2006). Chez *N. gonorrhoeae*, le gène *lptA* régule l'ajout de pEtN au niveau de la position C-4 du

lipide A. L'inactivation de ce gène accroit d'environ 64 fois la sensibilité des gonocoques à la polymyxine B (Lewis *et al.* 2009). De la même façon, la mutation de *lptA* chez *N. meningitidis* diminue la résistance à la polymyxine B, mais également à la protégrine et à LL-37 (Tzeng *et al.* 2005). Chez *Salmonella* Typhimurium, le système à deux composants PmrAB joue un rôle important dans la détection des PAMs. En effet, PmrAB régule d'une part l'expression de *pmrC* responsable de l'ajout de pEtN sur le lipide A, et d'autre part *pmrEHFIJKLM* responsable de l'ajout de L-Ara4N chargé positivement au niveau de la position C-4 du lipide A, ces deux éléments permettant de réduire la charge négative du LPS et d'augmenter ainsi la résistance aux PAMs (Gunn *et al.* 2000; Tamayo *et al.* 2005; Cole & Nizet 2016). L'ajout de L-Ara4N sur le lipide A augmente la résistance aux PAMs d'autres pathogènes humains tels que *Proteus mirabilis*, *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa* (McCoy *et al.* 2001; Moskowitz *et al.* 2004; Cheng *et al.* 2010).

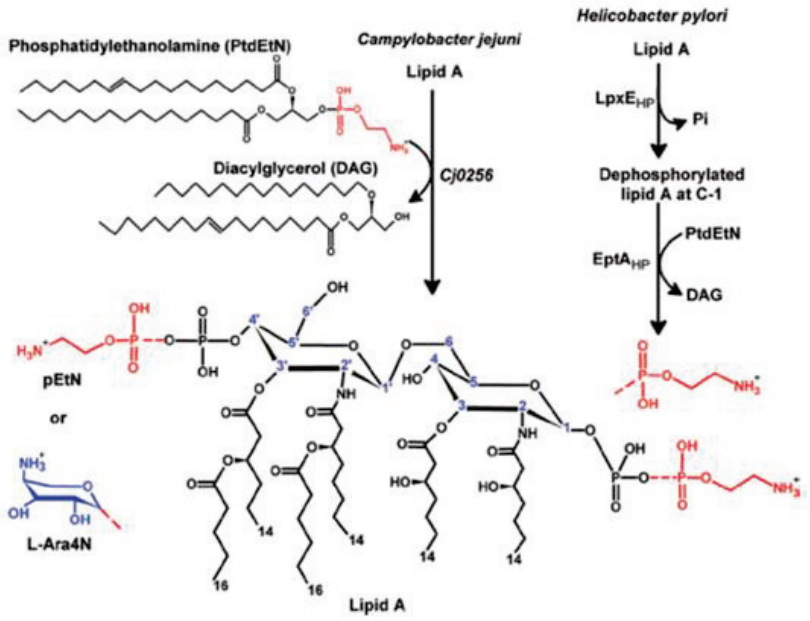


Figure 37. Représentation du lipide A modifié par la phosphoéthanolamine ou l'aminoarabinose (Anaya-Lopez *et al.* 2013). La liaison en pointillé indique la modification apportée au lipide A. Le lipide A (en noir) est modifié par ajout de phosphoéthanolamine (en rouge) au groupement phosphate C-1 et C-4 chez *Campylobacter jejuni*. Cette modification est catalysée par la phosphoéthanolamine transférase Cj0256. Chez *Helicobacter pylori*, l'ajout de pEtN comporte deux étapes enzymatiques : (i) la phosphatase LpxEHP élimine le groupement phosphate en position C-1 et (ii) la transférase EptAHP ajoute la pEtN sur le lipide A.

II.5.1.3 Modification de la fluidité membranaire

Un autre mécanisme de résistance aux PAMs utilisé par les bactéries à Gram négatif consiste à diminuer la fluidité de leur membrane externe afin d'empêcher l'insertion des peptides. Cette stratégie a été identifiée chez plusieurs pathogènes humains comme *H. influenzae*, *K. pneumoniae*, *L. pneumophila*, *Salmonella* spp ou *Vibrio cholerae*, et repose sur l'acylation du lipide A du LPS (**Figure 38**) (Anaya-López *et al.* 2013).

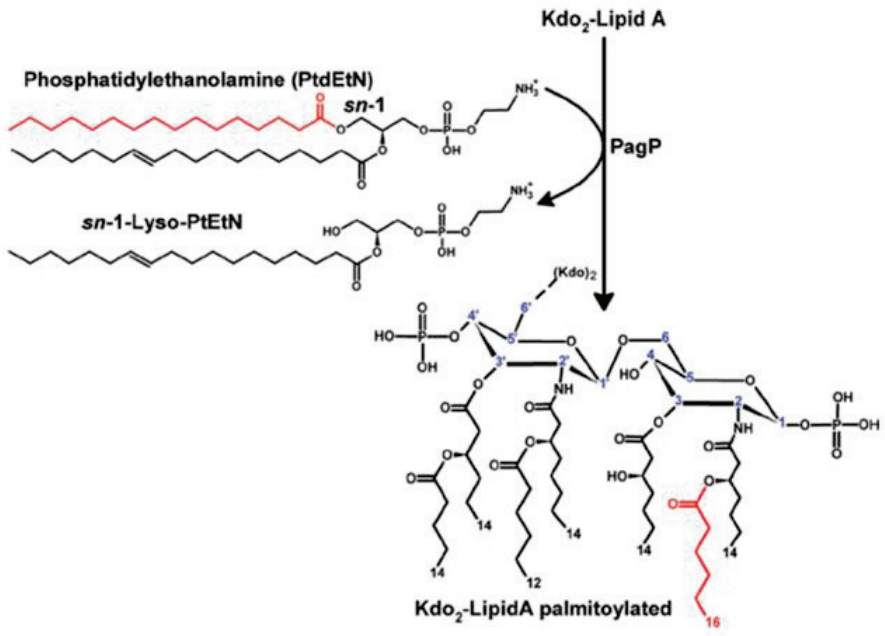


Figure 38. Représentation du lipide A modifié par acylation (Anaya-Lopez *et al.* 2013). Chez *S.* Typhimurium, PagP transfert l'acide palmitique (en rouge) de la position sn-1 d'un phospholipide (ptdEtn) vers le lipide A.

Chez *S.* Typhimurium, l'acylation de lipide A est régulée par l'acétyltransférase PagP, catalysant le transfert d'un acide palmitique issu d'un phospholipide (comme la pEtN) vers le lipide A (Bishop *et al.* 2000). Ainsi, l'inactivation du gène *pagP* (pour *PhoP-activated gene*) chez *Salmonella* entraine une augmentation de la perméabilité membranaire, se traduisant par une sensibilité accrue à la protégrine-1 et au C18G (un peptide dérivé du facteur plaquettaire IV) (Guo *et al.* 1998). Ce phénotype a également été observé chez *K. pneumoniae*, lors de la mutation du gène *lpxM* codant une enzyme responsable de l'acylation secondaire du lipide A (Clements *et al.* 2007). De même, l'absence d'acylation du lipide A chez *H. influenzae* et *V. cholerae* entraine une augmentation de la sensibilité aux PAMs, dont la magainine, HBD-3 et LL-37 (Starner *et al.* 2002; Matson *et al.* 2010). L'analyse du LPS de *V. cholerae* par spectrométrie de masse a notamment permis de montrer l'absence de lipide A hexa-acétylé chez le mutant *ΔmsbB*, contrairement à la souche sauvage (Matson *et al.* 2010). Le gène *rcp* (pour *resistance to cationic antimicrobial peptides*) de *L. pneumophila*, homologue de *pagP* de *S.* Typhimurium, semble également impliqué dans la résistance aux PAMs. La mutation de ce gène entraine une augmentation de la sensibilité à la polymyxine B et au C18G, mais semble également tenir un rôle dans la virulence de la bactérie. En effet, un mutant *Δrcp* présente un défaut de croissance intracellulaire et ainsi qu'un défaut de colonisation du poumon murin comparé à la souche sauvage (Robey *et al.* 2001).

II.5.2 Transporteurs membranaires

Une toute autre stratégie de résistance des bactéries repose sur leur capacité à transporter les PAMs à travers leur membrane, grâce à des protéines importatrices (pompes à influx) ou exportatrices (pompes à efflux). Ces types de pompes permettent de protéger la membrane plasmique bactérienne en relocalisant les PAMs vers un autre compartiment, où ils pourront éventuellement être dégradés. Les transporteurs bactériens sont divisés en cinq superfamilles (**Figure 39**) selon leur séquence, leur topologie, leur source d'énergie et la spécificité du substrat (Tegos *et al.* 2011). Certaines études ont reporté l'implication de transporteurs de type ABC (*ATP-binding cassette super family*) et RND (*resistance-nodulation-division*) dans la résistance aux PAMs.

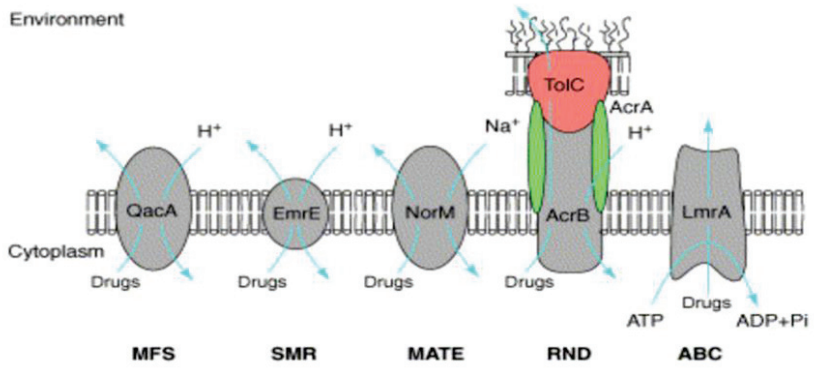


Figure 39. Représentation des différentes familles de transporteurs bactériens (Tegos *et al.* 2011). La famille de transporteurs MFS (*major facilitator super family*) est représentée par le système QacA identifié chez *S. aureus*. Les familles SMR (small multidrug resistance family) et RND (resistance-nodulation cell division super family) sont représentées par les systèmes EmrE et AcrB identifiés chez *E. coli*. La famille MATE (multi-antimicrobial extrusion protein family) est représentée par le système NorM identifié chez *Vibrio parahaemolyticus*. La famille ABC (ATP-binding cassette super family) est représentée par le système LmrA identifié chez *Lactococcus lactis*.

II.5.2.1 Pompes à influx

Les pompes à influx ABC requièrent généralement l'assistance d'une protéine périplasmique et ont pour fonction d'importer les PAMs situés dans l'espace périplasmique ou à l'interface périplasme/membrane plasmique vers le cytoplasme, où ils seraient ensuite dégradés (Gruenheid & Le Moual 2012). La recherche de mutants de *S.* Typhimurium sensibles à la protamine a conduit une équipe américaine à identifier l'opéron *sapABCDF*, codant la pompe à influx ABC Sap (Sensitive to antimicrobial peptides) (Parra-Lopez *et al.* 1993). Cette étude a également permis de montré que la protéine périplasmique SapA est essentielle pour la résistance aux PAMs, suggérant ainsi que les PAMs se lient directement à SapA pour être transportés dans le cytoplasme *via* le système (Parra-Lopez *et al.* 1993). Des homologues des gènes *sap* ont par ailleurs été identifiés chez de nombreuses autres espèces de bactéries à Gram négatif. Chez *Haemophilus influenzae*, la mutation du gène *sapA* entraine une

augmentation de la sensibilité à la β-défensine-1 de chinchilla *in vivo* (Mason *et al.* 2005; Shelton *et al.* 2011). Le transport des PAMs par le système Sap a été confirmé par Shelton *et al.* par microscopie électronique, lors de l'observation de l'accumulation de LL-37 et HBD-3 dans l'espace périplasmique d'un mutant Δ*sapBC* (**Figure 40**) (Shelton *et al.* 2011). Les travaux de Shelton *et al.* ont également apporté la preuve de la dégradation des PAMs au niveau cytoplasmique (Shelton *et al.* 2011). L'importance du transporteur Sap dans la virulence de *H. ducreyi* a quant à elle été démontrée lors de tests *in vivo* chez l'Homme, par évaluation de l'efficacité de formation de papules et des pustules après inoculation sous-cutanée de la bactérie (Mount *et al.* 2010).

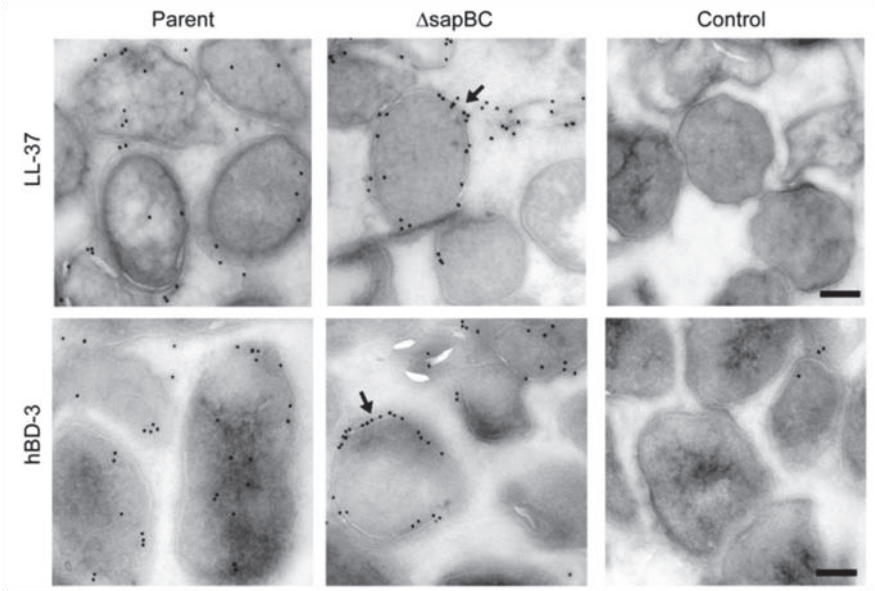


Figure 40. L'import des PAMs vers le cytoplasme requiert le transporteur Sap (Shelton *et al.* 2011). Les photos de microscopie électronique à transmission ont été réalisées après traitement des souches de *Haemophilus influenzae* sauvage et Δ*sapBC* avec 0,25µg/ml de LL-37 ou 1µg/ml de HBD-3 pendant 30min. Les peptides ont ensuite été marqués par immunogold. Un contrôle a été réalisé avec la souche sauvage non exposée aux peptides.

II.5.2.2 Pompes à efflux

Les pompes à efflux permettent d'expulser hors de la cellule les composés toxiques ayant atteint le cytoplasme bactérien. Ces transporteurs jouent un rôle important dans la résistance aux antibiotiques, dont les fluoroquinolones, les macrolides, les tétracyclines, les béta-lactames et les aminoglycosides (Poole 2007). Certaines pompes à efflux ont cependant une faible spécificité et peuvent transporter d'autres substrats, tels que les PAMs (Anaya-López *et al.* 2013). Chez *N. gonorrhoeae* et *N. meningitidis*, le transporteur MtrCDE est impliqué dans l'expulsion des PAMs hors du cytoplasme et de l'espace périplasmique, participant ainsi à la résistance à LL-37, le mCRAMP, la tachyplésine-1 et la protégrine-1 (Shafer *et al.* 1998; Tzeng *et al.* 2005; Rinker *et al.* 2011). Chez *H. ducreyi*, l'inactivation du gène *mtrC* entraine une augmentation de la sensibilité à LL-37 et à la β-défensine HBD-3, mais pas à l'α-défensine

HNP-2 (Rinker *et al.* 2011). Le système de type RND AcrAB assure quant à lui la résistance à la polymyxine B chez *K. pneumoniae* (Padilla *et al.* 2010). La surexpression de la pompe AcrAB d'E. *coli* n'améliore cependant pas la résistance à LL-37, HNP-1 et -3, HD-5, et HBD-2 et -3, indiquant que certaines pompes à efflux ont une spécificité réduite à certains PAMs (Rieg *et al.* 2009).

II.5.3 Inactivation des PAMs

II.5.3.1 Dégradation protéolytique des PAMs

Certaines bactéries pathogènes sécrètent ou expriment à leur surface des peptidases et/ou des protéases capables de reconnaitre et de cliver les PAMs avant qu'ils n'atteignent la membrane bactérienne. L'élastase produite par *P. aeruginosa* permet d'inactiver LL-37 en générant plusieurs fragments inactifs, grâce à des clivages successifs réalisés principalement dans la région portant l'activité antimicrobienne (Schmidtchen *et al.* 2002). Chez *P. mirabilis*, la métalloprotéase ZapA est un important facteur de virulence impliqué dans la dégradation de composants de la matrice extracellulaire (laminine, fibronectine, collagène), d'anticorps (IgA et IgG) et des facteurs C1q et C3 du complément, mais également de PAMs (Belas *et al.* 2004). Cette protéase permet en effet de cliver HBD-1, la protégrine PG-1 et LL-37, dont l'analyse par spectrométrie de masse a pu montrer un clivage préférentiel dans la région portant l'activité antimicrobienne, déjà observé par Schmidtchen *et al.* (Belas *et al.* 2004). Un autre exemple bien connu de protéase sécrétée est l'aureolysine produite par *S. aureus*. L'aureolysine participe notamment à le résistance à LL-37, *via* le clivage du peptide au niveau des liaisons Arg19-Ile20, Arg23-Ile24 et Leu31-Val32 (Sieprawska-Lupa *et al.* 2004).

Les protéases peuvent également être associées à l'enveloppe bactérienne, ancrées au niveau de la paroi ou de la membrane externe, comme les protéases PgtE de *S. enterica* et OmpT de *E. coli* conférant une résistance à LL-37 et au C18G (Guina *et al.* 2000; Hui *et al.* 2010).

II.5.3.2 Séquestration des PAMs

Certaines protéines associées à la surface bactérienne ou sécrétées dans le milieu extracellulaire sont capables de fixer directement aux PAMs, les empêchant ainsi d'accéder à leur cible. Au-delà de sa capacité d'activation du plasminogène, la staphylokinase (SAK) produite par *S. aureus* peut se fixer aux α-défensines HNP-1 et -2, inhibant de 80% leur activité bactéricide (Jin *et al.* 2004). De la même manière, la protéine SIC (*Streptococcal Inhibitor of Complement*) produite par *Streptococcus pyogenes* est capable de se fixer à LL-37 et aux défensines humaines afin de les inactiver (Frick *et al.* 2003; Fernie-King *et al.* 2004). La protéine M codée par le gène *emm* est un important facteur de virulence chez les Streptocoques du groupe A. L'inactivation de ce gène entraine une augmentation de la sensibilité aux cathélicidines humaines et murines en comparaison de la souche sauvage (Lauth *et al.*

2009). Les pili peuvent également séquestrer les PAMs, à l'instar de la protéine PilB des Streptocoques du groupe B capable de fixer LL-37 et mCRAMP, permettant d'augmenter la résistance à ces peptides (Maisey *et al.* 2009).

II.5.4 Inhibition de l'expression des gènes de PAMs

Une dernière stratégie de résistance utilisée par certaines bactéries pathogènes consiste à inhiber l'expression des PAMs de l'hôte. La dysenterie bacillaire est une infection sévère de l'intestin provoquée par des bactéries du genre *Shigella*. L'analyse de biopsies rectales de patients atteints de shigellose a montré une diminution voire une inhibition de l'expression des peptides HBD-1et LL-37 au cours de l'infection par *Shigella flexneri* et *S. dysenteriae* (Islam *et al.* 2001). Grâce à un modèle de xénogreffe d'intestin humain chez la souris, Sperandio *et al.* ont également pu observer une suppression de l'expression de PAMs lors de l'infection par S. *flexneri*, vraisemblablement contrôlée par des effecteurs bactériens injectés dans la cellules hôte *via* un système de sécrétion de type III, eux-mêmes régulés par le facteur de transcription MixE (Sperandio *et al.* 2008). De plus, les auteurs ont pu établir une corrélation entre la capacité des bactéries à bloquer l'expression des PAMs, et leur capacité à envahir et coloniser les cryptes intestinales (Sperandio *et al.* 2008). De même, les pathogènes intestinaux *V. cholerae* et *E. coli* entérotoxique (ETEC) sont capables de réprimer l'expression de HBD-1 et LL-37 *in vitro* et *in vivo*, notamment via l'action de la toxine cholérique et de la toxine labile respectivement (Chakraborty *et al.* 2008).

II.6 Les peptides antimicrobiens humains

II.6.1 Les cathélicidines

Les peptides antimicrobiens sont des composants de la réponse immunitaire conservés chez tous les organismes vivants. Les cathélicidines forment un groupe de peptides cationiques amphiphiles et constituent une part importante du système immunitaire des vertébrés, dont l'Homme (Kościuczuk *et al.* 2012). La seule cathélicidine humaine a été identifiée en 1995 et nommée hCAP18 (human Cationic Antimicrobial Peptide -18). La partie C-terminale de cette protéine est composée de 37 aa et porte l'activité antimicrobienne (Bandurska *et al.* 2015). LL-37 est capable de lutter contre un large spectre de microorganismes, et joue également un rôle dans l'immunomodulation et la cicatrisation.

II.6.1.1 Structure

Les cathélicidines se caractérisent par un domaine N-terminal très conservé d'environ 100 aa appelé *cathelin-like*. Ce domaine de 14kDa est encadré par un peptide signal d'environ 30 résidus côté N-terminal, et d'un peptide antimicrobien côté C-terminal (**Figure 41**). Le produit de traduction, appelé pré-pro-protéine, est dirigé vers des granules de stockage et le

peptide signal responsable du trafic intracellulaire est clivé par une peptidase. La pro-protéine ainsi obtenue est ensuite sécrétée à l'extérieur de la cellule et clivée en deux domaines par la protéinase 3 dans les neutrophiles ou par la kallikréine dans les kératinocytes : le domaine *cathelin-like* et le peptide antimicrobien actif (Dürr *et al.* 2006). Chez l'Homme, le peptide antimicrobien libéré possède une séquence de 37 aa commençant par deux leucines, à l'origine de son nom : LL-37.

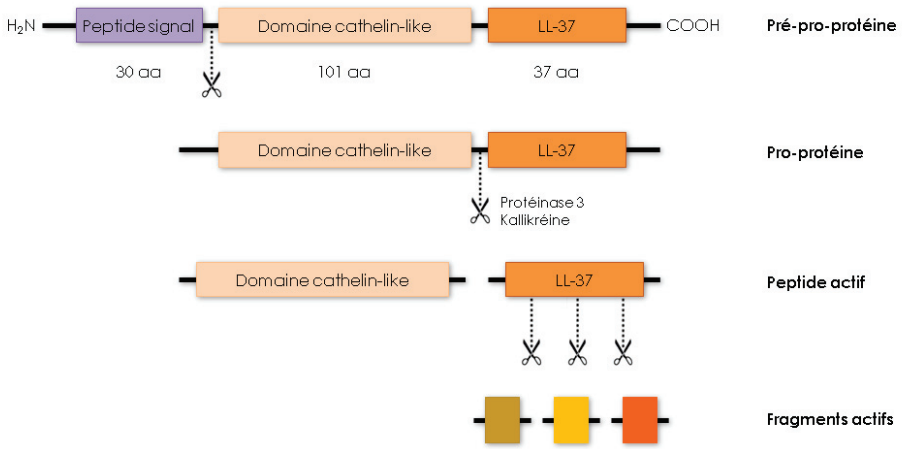


Figure 41. Représentation schématique de la cathélicidine humaine hCAP-18.

Dans l'eau pure, LL-37 adopte une forme non structurée. En revanche, en présence de membranes phospholipidiques, le peptide forme une hélice alpha amphiphile cationique composée de trois parties : (i) une hélice alpha N-terminale, suivie d'un coude (ii) d'une hélice alpha C-terminale et (iii) d'une extrémité C-terminale linéaire (**Figure 42**). La surface hydrophobique de LL-37 est principalement bordée de résidus chargés positivement, permettant une interaction avec les structures chargées négativement comme les membranes bactériennes, le LPS ou l'ADN (Vandamme *et al.* 2012).

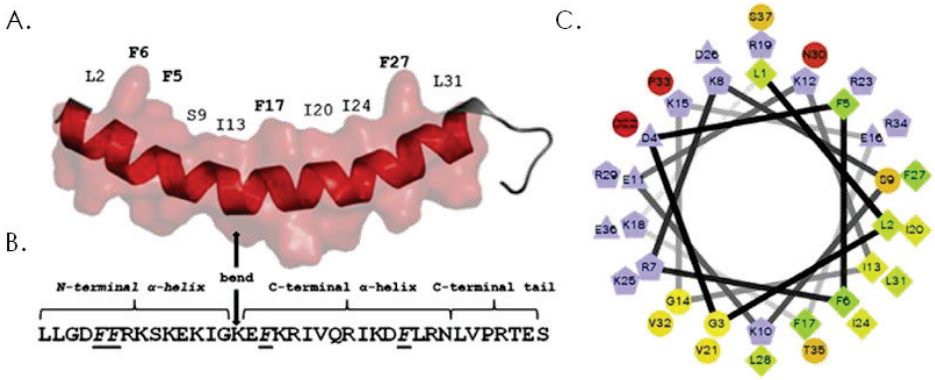


Figure 42. Structure tridimensionnelle de LL-37 (Vandamme *et al.* 2012). (A) La structure tridimensionnelle de la cathélicidine humaine LL-37 montre une hélice alpha suivi d'une queue linéaire en C-terminal. Les quatre phénylalanines bordent la surface concave du peptide.(B) Séquence peptidique de LL-37. (C) Représentation en hélice alpha de LL-37 illustrant la nature amphiphile et cationique du peptide. Les résidus hydrophiles sont représentés par des cercles, les résidus hydrophobes par des losanges, les résidus chargés négativement par des triangles, et les résidus chargés positivement par des pentagones. L'hydrophobicité est codée grâce à un gradient de vert : une hydrophobicité nulle est représentée en jaune, et la plus forte hydrophobicité en vert foncé. Les résidus hydrophiles sont codés grâce à un gradient de rouge, le rouge le plus intense correspondant au résidu le plus hydrophile (non chargé), et l'intensité de rouge diminue proportionnellement avec l'hydrophilie.

De nombreuses équipes ont cherché à identifier la région du peptide responsable de l'activité antimicrobienne, en utilisant des peptides tronqués. Leurs travaux ont notamment montré que l'hélice N-terminale est impliquée dans le chimiotactisme et l'oligomérisation du peptide, tandis que l'hélice C-terminale est importante pour l'activité antibactérienne et antivirale. De plus, des équipes indépendantes s'accordent à dire que les séquences FK-13 et KR-12 (**Tableau 5**) représentent le noyau du peptide, c'est-à-dire la plus petite région présentant une activité antimicrobienne comparable au peptide parental LL-37 (Vandamme *et al.* 2012).

Tableau 5. Séquence peptidique de FK-13 et KR-12 (Vandamme *et al.* 2012).

Nom	Séquence	Cible	CMI
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES	*E. coli* K12	40 µM
FK-13	FKRIVQRIKDFLR	*E. coli* K12	40 µM
KR-12	KRIVQRIKDFLR	*E. coli* K12	40 µM

II.6.1.2 Expression

La cathélicidine humaine LL-37 est codée par un unique gène, nommé CAMP (*Cathelicidin Antimicrobial Peptide*), situé au niveau du locus p21 du chromosome 3 (Larrick *et al.* 1995). LL-37 est exprimé dans de nombreux types cellulaires directement en contact avec l'environnement, comme les cellules épithéliales intestinales, pulmonaires, génitales et la peau (Frohm *et al.* 1997; Bals *et al.* 1998b; Nilsson *et al.* 1999; Hase *et al.* 2002). L'expression des cathélicidines est constitutive dans les cellules épithéliales, et inductibles dans les kératinocytes (Frohm *et al.* 1997). Le peptide LL-37 est également produit par les cellules du système immunitaire. En effet, les neutrophiles, les cellules NK (*Natural Killer*), les cellules

dendritiques, les macrophages, les monocytes, les lymphocytes et les mastocytes expriment de façon constitutive les cathélicidines et les stockent dans des granules (Sørensen *et al.* 1997; Agerberth *et al.* 2000; Di Nardo *et al.* 2003; Rivas-Santiago *et al.* 2008; Buchau 2010; Sonawane *et al.* 2011; Sigurdardottir *et al.* 2012; Vandamme *et al.* 2012). La libération des peptides est induite par différents signaux tels que l'activation de récepteurs TLR, la détection de certaines cytokines, de bactéries, de LPS bactérien ou le stress du réticulum endoplasmique (RE) (Vandamme *et al.* 2012). La vitamine D_3 est également un important régulateur de l'expression de LL-37. Les travaux de Wang *et al.* ont permis de déceler la présence d'un élément de réponse à la vitamine D (VDRE) dans la région promotrice du gène codant LL-37 (Wang *et al.* 2004). Cette séquence VDRE est reconnue par un facteur de transcription nommé VDR (*Vitamin D Receptor*) activé par la forme hormonale active de la vitamine D, la 1,25-dihydroxyvitamineD3 ($1,25(OH)_2D3$) (**Figure 43**). La vitamine D est alors capable d'induire l'expression de LL-37 dans différents types cellulaires dont les kératinocytes, les monocytes et les macrophages (Gombart *et al.* 2005; Yuk *et al.* 2009). A l'inverse, l'expression de LL-37 peut être inhibée par certaines exotoxines bactériennes, l'interleukine 6 (IL-6), l'infection par *Shigella* ou les interférons gamma (IFN-γ) (Agerberth *et al.* 2000; Chakraborty *et al.* 2008; Sarker *et al.* 2011).

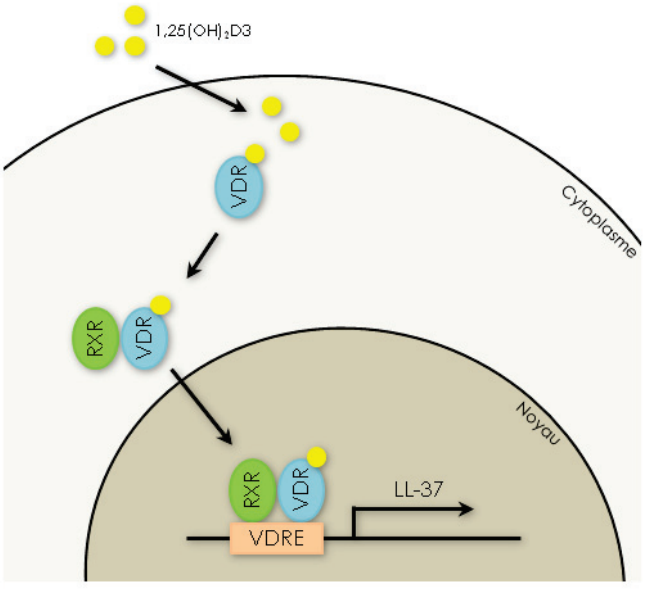


Figure 43. Schéma de la voie d'induction de l'expression de LL-37 par la vitamine D.

II.6.2 Les défensines

Tout comme les cathélicidines, les défensines sont des composants majeurs du système immunitaire humain. Les défensines sont largement distribuées au sein des tissus, en particulier dans les cellules épithéliales et phagocytaires où leur concentration peut atteindre le millimolaire. Ces peptides sont impliqués dans les réponses immunitaires innées et adaptatives, notamment grâce à leurs propriétés antibactériennes, antivirales et immunomodulatrices.

II.6.2.1 Structure

Les défensines sont de petits peptides cationiques de 28 à 50 aa, dont 6 résidus cystéines (Cys) très conservés formant 3 ponts disulfures. Ces peptides comptent 3 sous-familles, les défensines alpha (α), beta (β) et theta (θ), classées selon leur origine cellulaire ainsi que l'espacement et l'appariement entre les résidus cystéines. Les deux principales sous-familles, α- et β-défensines, possèdent une structure tertiaire comprenant trois feuillets beta antiparallèles. Ces deux sous-familles diffèrent principalement de par la disposition des ponts disulfures intramoléculaires. En effet, ces ponts se forment entre Cys1–Cys6, Cys2–Cys4 et Cys3–Cys5 chez les α-défensines et entre Cys1–Cys5, Cys2–Cys4 et Cys3–Cys6 chez les β-défensines (Dhople *et al.* 2006). La structure en 3 feuillets beta stabilisé par 3 ponts disulfures (également appelée « *defensin-like* ») représente le seul élément structural des α-défensines (**Figure 44A**), contrairement aux β-défensines dont la partie N-terminale est décorée par un segment en hélice alpha de taille variable (**Figure 44B**). Malgré une faible similarité de séquence peptidique, la conservation de la topologie « *defensin-like* » chez les vertébrés souligne l'importance de cette structure pour l'activité biologique des défensines (Dhople *et al.* 2006). La troisième sous-famille constituée des θ-défensines est inactive chez l'Homme, en raison d'une mutation engendrant la formation d'un codon stop prématuré (Ganz 2003).

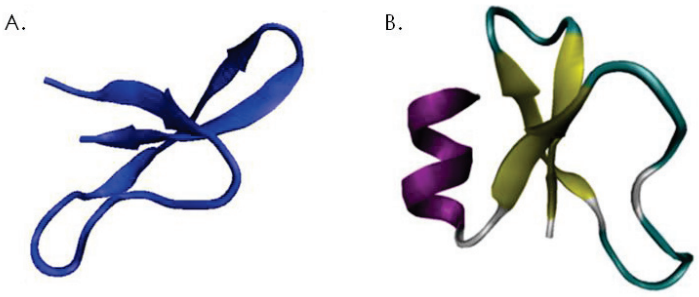


Figure 44. Structure cristallographique des α- et β-défensines (Mattar *et al.* 2016). (A) Structure de l' α-défensine 1 humaine (HNP-1), (B) Structure de la β-défensine 1 humaine (HBD-1).

II.6.2.2 Expression

Les gènes codant les défensines sont principalement situés au niveau du chromosome 8, le nombre de copie de chaque gène variant d'un individu à l'autre (Groth *et al.* 2008; Khan *et al.* 2013; Mattar *et al.* 2016). Les défensines sont abondamment produites par les cellules exposées aux microorganismes comme les leucocytes et les cellules épithéliales, spécialisées dans la synthèse d'α-défensines ou de β-défensines. Toutes les défensines humaines sont synthétisées sous forme d'un pré-pro-peptide composé d'une extension N-terminale suivi du pro-peptide, dont la séquence C-terminale correspond au peptide mature (Suarez-Carmona *et al.* 2015).

Les α-défensines 1 à 4 (HNP-1 à -4, *Human Neutrophile Peptide*) sont synthétisés de façon constitutive par les précurseurs des polynucléaires neutrophiles, également appelés promyélocytes, présents dans la moelle osseuse (Cowland & Borregaard 1999). Au cours de la différenciation cellulaire les précurseurs des HNPs sont clivés par l'élastase et la protéinase 3. Les peptides matures sont alors stockés dans des granules azurophiles, destinées à la fusion avec les vacuoles de phagocytose. Une fois la maturation cellulaire terminée, les neutrophiles cessent la production de peptides et rejoignent la circulation sanguine. Lors de la phagocytose, les granules azurophiles fusionnent avec le phagosome afin d'y déverser les HNPs (Suarez-Carmona *et al.* 2015). Les défensines HNP-1 à 3 sont par ailleurs synthétisées par les lymphocytes T et les cellules NK cultivées en présence d'IL-2 (Agerberth *et al.* 2000). Contrairement aux HNPs, les précurseurs des α-défensines HD-5 et HD-6 (*Human Defensin*) sont clivées après libération des peptides dans le compartiment extracellulaire, par une protéase inconnue (Suarez-Carmona *et al.* 2015). Les défensines HD-5 et HD-6 sont produites constitutivement par les cellules de Paneth, situées dans les cryptes de l'intestin grêle, mais également par les cellules épithéliales du tractus urogénital (De Smet & Contreras 2005; Bevins 2006).

Les β-défensines 1 à 29 (HBD-1 à -29, *Human Beta Defensin*) sont exprimées plus largement au sein de l'organisme par les cellules épithéliales. En effet, HBD-1 est synthétisée de façon constitutive au niveau du tractus urogénital, du tractus digestif ou des poumons, tandis que la synthèse des défensines HBD-2 et HBD-3 est induite par un signal endogène (interleukines, TNF-α) ou exogène (LPS) au niveau de la peau, des poumons, de la trachée, de l'intestin ou de l'utérus (Ganz 2003). Les défensines HBD-4 à -29, bien moins documentées, sont produites par les cellules épithéliales du tractus urogénital, de l'estomac, de l'intestin et des poumons (Jonard *et al.* 2006).

II.6.3 Activités biologiques des PAMs humains

Les cathélicidines et les défensines sont retrouvées chez de très nombreux organismes, allant des poissons aux mammifères, en passant par les amphibiens, les reptiles et les oiseaux. La conservation de ces peptides antimicrobiens au cours de l'évolution témoigne de leur

importance dans le système immunitaire. Les propriétés protectrices de ces molécules reposent à la fois sur leur activité antimicrobienne et sur leur activité immunomodulatrice.

II.6.3.1 Propriétés antimicrobiennes des PAMs humains

II.6.3.1.1 Activité directe des PAMs en milieu extracellulaire

Les PAMs humains sont capables d'interagir avec une grande variété de pathogènes, comprenant à la fois bactéries à Gram positif et bactéries à Gram négatif. De nombreuses équipes ont cherché à identifier le mode d'action du peptide, un intérêt particulier étant porté à l'effet direct sur les membranes bactériennes. Certaines d'entre elles ont pu montrer que LL-37 se fixe parallèlement à la surface membranaire (Wildman *et al.* 2003; Ding *et al.* 2013), pour ensuite perméabiliser les membranes. Les premières études ont d'abord suggéré que le peptide agissait selon le modèle « *carpet-like* », menant à la déstabilisation via la formation de trous et de micelles (cf **Chapitre II.4.1.2.1**) (Oren *et al.* 1999). Plus récemment, d'autres groupes ont observé une courbure de la membrane caractéristique du modèle du pore torique (Wildman *et al.* 2003; Lee *et al.* 2011), selon lequel les peptides s'associent entre eux et induisent le réarrangement des lipides membranaires, conduisant à la formation de pores transmembranaires (cf **Chapitre II.4.1.2.1**). La perméabilisation des membranes entraine alors la fuite du contenu cytoplasmique et la mort de la bactérie. Les pores formés par LL-37 et par son orthologue *mmu*RL-37 issu du macaque rhésus ont pu être observés pas microscopie à forme atomique (**Figure 45**).

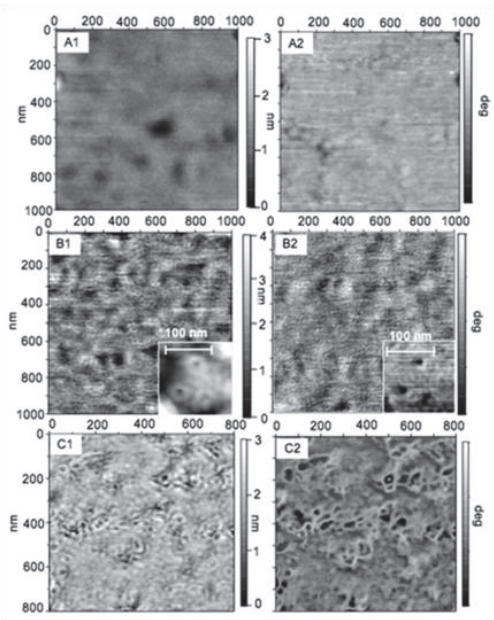


Figure 45. Effet des peptides LL-37 et *mmu*RL-37 sur des liposomes composés de phospholipides anioniques (Morgera *et al.* 2009). Les photos de microscopie à force atomique ont été réalisées après traitement des liposomes avec 20µM de peptides pendant 1h. Les images topographiques (A1, B1 et C1) et à contraste de phase (A2, B2 et C2) des liposomes ont été non traitées (A1 et A2) ou traitées avec LL-37 (B1 et B2) ou *mmu*RL-37 (C1 et C2).

D'après ces clichés, LL-37 semble générer des perturbations locales dans la membrane des liposomes, compatible avec la formation de nombreux pores d'environ 10 nm de diamètre. De plus, les images en contraste de phase indiquent que la surface des liposomes conserve son homogénéité malgré l'exposition à LL-37, tandis que *mmu*RL-37 semble causer d'importantes irrégularités. D'après les auteurs, LL-37 agirait donc bien sur les membranes selon le modèle des pores toriques, alors que *mmu*RL-37 agirait selon le modèle « *carpet-like* » (Morgera *et al.* 2009). Bien qu'ils soient moins documentés, les mécanismes d'action des défensines sont semblables à ceux décrits pour les cathélicidines.

En effet, comme pour LL-37, il a été démontré que les défensines interagissent directement avec la membrane bactérienne afin de s'y insérer. La formation de pores transmembranaires par les HNPs et les HBDs a été observée sur des membranes phospholipidiques artificielles, mais également sur bactéries viables (Lehrer *et al.* 1989; Ganz 2003; Sahl *et al.* 2005). Des observations en microscopie électronique ont mis en évidence la capacité de HBD-3 à induire des altérations morphologiques chez *S. aureus*, comme la perforation de la paroi bactérienne suivie de la fuite du contenu cytoplasmique (Shimoda *et al.* 1995; Harder *et al.* 2001). Le mécanisme d'action exact mis en jeu dans l'interaction défensines/membrane bactérienne n'a cependant pas été décrit en détail à ce jour.

La cathélicidine et les défensines humaines possèdent également une activité antivirale directe contre des adénovirus de type 3, 8 19 et 37, le virus influenza A (IAV), le virus varicelle-zona, le HSV, le HIV et le RSV (*Respiratory Syncytial Virus*) (Gordon *et al.* 2005; Ho *et al.* 2011; Crack *et al.* 2012; Tripathi *et al.* 2013; Uchio *et al.* 2013; Currie *et al.* 2013; Wilson *et al.* 2013). LL-37 et les β-défensines HBD-2 et HBD-3 sont notamment capables d'inhiber la réplication virale par interaction directe avec les virions de l'IAV et du VIH, respectivement (Tripathi *et al.* 2013; Wilson *et al.* 2013) ou par la neutralisation d'activité enzymatique du HIV (Ho *et al.* 2011). De même, la défensine HD-5 est capable d'inhiber l'infection des cellules rénales par le BKV (*BK virus*). Le prétraitement du BKV avec HD-5 diminue l'attachement du virus, suggérant une interaction directe avec le peptide. Des observations microscopiques ont en effet montré que HD-5 induit l'agrégation des particules virales (**Figure 46**). D'après les auteurs, cette agrégation inhibe l'attachement du virus à la cellule hôte en diminuant la surface virale et en masquant les épitopes viraux (Dugan *et al.* 2008). LL-37 et la cathélicidine murine mCRAMP ont quant à elles montré une activité anti-influenza A significative *in vivo*, en réduisant la sévérité de la pathologie et la réplication virale chez des souris infectées (Barlow *et al.* 2011). Les tests *in vitro* et *in vivo* réalisés dans cette étude suggèrent que le peptide agit directement sur les particules virales, plutôt que par un mécanisme impliquant un récepteur.

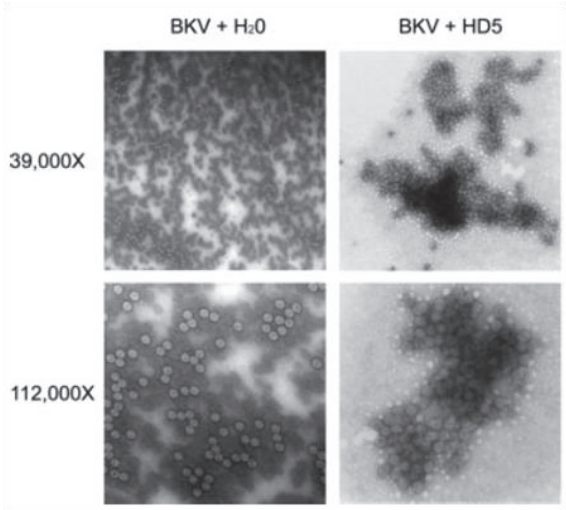


Figure 46. L'ultrastructure du virus BKV révèle l'agrégation des particules virales induite par HD5 (Dugan *et al.* 2008). Les photos de microscopie électronique ont été réalisées après traitement du virus avec 50µg/ml de HD5 pendant 1h à 4°C.

II.6.3.1.2 Activité des PAMs sur les microorganismes à multiplication intracellulaire au cours de leur cycle infectieux

Outre leur activité antimicrobienne directe en milieu extracellulaire, les PAMs humains sont capables d'inhiber la réplication intracellulaire de certains pathogènes. Les mécanismes d'action mis en jeu dans le contrôle de l'infection cellulaire sont à ce jour encore peu documentés. Quelques études ont néanmoins permis de montrer que l'activité intracellulaire des PAMs humains repose sur deux stratégies semblables à celles par les peptides d'origine animale (cf **Chapitres II.4.1.2.2.1.2 et II.4.2.1.3**) : l'inactivation directe des microorganismes et/ou l'activation des défenses de la cellule hôte.

II.6.3.1.2.1 Activité directe des PAMs sur les microorganismes dans la cellule hôte

Listeria monocytogenes est une bactérie pathogène intracellulaire facultative capable d'infecter différents types cellulaires dont les macrophages. Après avoir été phagocytée, *Listeria* sécrète une toxine à activité *pore-forming*, la listeriolysine O (LLO), capable de lyser le phagosome, permettant ainsi à la bactérie de se répliquer dans le cytoplasme de la cellule-hôte. Arnett *et al.* ont démontré que la coopération entre les macrophages et la défensine HNP-1permet de neutraliser la réplication intracellulaire de *L. monocytogenes* (Arnett *et al.* 2011). D'après cette étude, HNP-1 ne possède qu'une faible activité bactéricide directe à l'encontre de la bactérie. En analysant l'effet du peptide sur les étapes clé du cycle infectieux, les auteurs ont montré que HNP-1 contrôle la multiplication intracellulaire de *L. monocytogenes* en inhibant la libération de la toxine LLO, et par conséquent l'échappement à la voie endosomale. Parallèlement, des observations microscopiques ont

permis de mettre en évidence l'internalisation de HNP-1 par les macrophages, ainsi que le trafic vésiculaire du peptide et la colocalisation HNP-1/*L. monocytogenes* au sein du phagosome (Arnett *et al.* 2011).

Pour introduire leur génome dans la cellule hôte, certains virus non-enveloppés doivent franchir la membrane cellulaire par endocytose. Le virus doit alors lyser la membrane endosomale pour être libéré dans le cytoplasme et aller injecter son ADN dans le noyau. En se fixant à la capside, le peptide HD-5 stabilise le virus HAdV (*Human Adenovirus*) et empêche ainsi la décapsidation, la libération de la protéine virale membranolytique et la lyse de l'endosome (Nguyen et al. 2010). Ce mécanisme d'inhibition repose sur la fixation de HD-5 à l'interface penton/fibre (**Figure 47**), qui prévient la dissociation des fibres virales et bloque la décapsidation nécessaire à l'infection (Smith *et al.* 2010). Quand bien même l'ADN viral parviendrait à atteindre l'intérieur de la cellule hôte, il ne serait toujours pas à l'abri de l'action des peptides antimicrobiens. Hazrati *et al.* ont en effet démontré que le peptide HD-5 est capable de se fixer à l'ADN du virus HSV-2 au niveau intracellulaire. Selon leurs hypothèses, cette interaction peptide/ADN pourrait expliquer l'inhibition de l'expression des gènes viraux, bien que d'autres mécanismes semblent également mis en jeu (Hazrati *et al.* 2006).

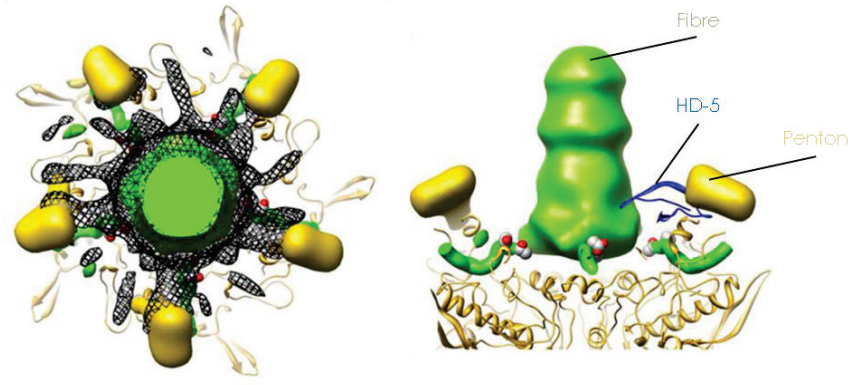


Figure 47. Région de fixation de HD-5 sur le virus HAdV (d'après Smith *et al.* 2010). Structure crystallographique des pentons et de la fibre du virus HAdV d'après observation par cryo-microscopie électronique. La fibre est représentée en vert, les pentons en jaune et le peptide HD-5 en bleu.

II.6.3.1.2.2 Activation des défenses de la cellule hôte par les PAMs

P. aeruginosa est un pathogène opportuniste notamment responsable de pneumonies acquises à l'hôpital chez les patients immunodéprimés et de pneumonie chronique chez les patients atteints de mucoviscidose. Au cours de l'infection, la bactérie peut selon un mécanisme encore mal compris, être internalisée et survivre dans les cellules épithéliales pulmonaires (Plotkowski *et al.* 1999). Une étude a de plus récemment montré que le peptide LL-37 induit une hausse du taux d'actine-F corticale des cellules épithéliales pulmonaires A549, conduisant à l'augmentation de la rigidité cellulaire, et à une diminution de

l'internalisation de *P. aeruginosa* (Byfield *et al.* 2011). La voie d'induction du remodelage de l'actine induit par LL-37 n'a cependant pas été identifiée lors de ces travaux.

L'interaction peptide/cellule-hôte tient également un rôle majeur dans le contrôle de l'infection par *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). *Mtb* possède un cycle infectieux basé sur l'échappement à la voie endosomale suivi de la réplication dans la vacuole d'endocytose. Récemment, plusieurs études ont montré l'effet protecteur du peptide LL-37 contre l'infection par *Mycobacterium*. Bien que son activité bactéricide directe soit variable selon les espèces, LL-37 est capable d'inhiber efficacement la réplication intracellulaire de *Mycobacterium* dans les monocytes et les macrophages (Yuk *et al.* 2009; Sonawane *et al.* 2011; Sato *et al.* 2013; Rekha *et al.* 2015). Des examens microscopiques ont permis d'observer l'internalisation de LL-37 dans les macrophages, mais également le trafic vésiculaire du peptide et la colocalisation LL-37/*Mycobacterium* dans le phagosome (**Figure 48**) (Sonawane *et al.* 2011).

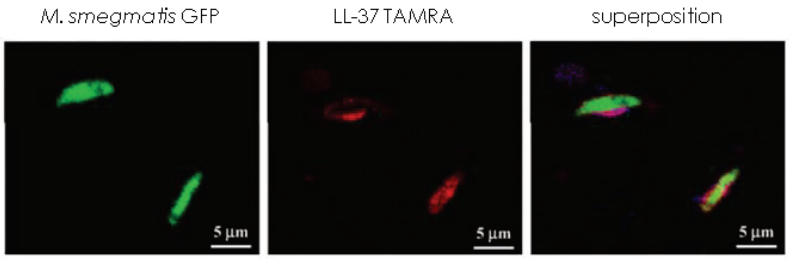


Figure 48. Colocalisation de LL-37 avec *Mycobacterium* smegmatis dans la cellule-hôte (Sonawane *et al.* 2011). Les macrophages J774A.1 ont été incubés pendant 1h avec 25 µg/mL de LL-37-TAMRA (rouge), puis infectés avec *M. smegmatis* exprimant la GFP (vert).

Parallèlement, le peptide induit l'élimination de la bactérie par autophagie, connue pour être un mécanisme de défense contre des bactéries intracellulaires (Yuk *et al.* 2009; Sato *et al.* 2013; Rekha *et al.* 2015). L'autophagie (littéralement « se manger soi-même ») est un processus de dégradation et de recyclage de protéines et d'organelles cytoplasmiques, essentiel au maintien de l'homéostasie cellulaire (**Figure 49**), permettant également en cas d'infection de capturer et de dégrader de façon sélective les pathogènes intracellulaires (Jo 2013). Lors de l'infection par *Mtb*, l'interaction d'un lipopeptide de *Mycobacterium* avec le récepteur TLR-2 des macrophages induit l'expression du facteur de transcription VDR, menant à la production de LL-37 et à l'inhibition de la réplication intracellulaire de *Mtb* (Liu 2006). Par la suite, les travaux de Yuk *et al.* ont montré que la vitamine D_3 induit l'autophagie dans les monocytes humains et inhibe la croissance intracellulaire de *M. tuberculosis* en stimulant la maturation des autophagosomes (Yuk *et al.* 2009). D'après les auteurs, LL-37 constitue un médiateur dans l'induction de l'autophagie par la vitamine D_3. En effet, le peptide active l'expression des gènes *beclin-1* et *atg-5* impliqués dans la formation des autophagosomes (Yuk *et al.* 2009). Ces résultats ont récemment été confirmés par Rekha *et al.*, dont les travaux démontrent également que l'activation de l'autophagie par LL-37

implique le récepteur purinergique P2X7 (Rekha *et al.* 2015). Pour une meilleure compréhension, la **figure 50** schématise la voie d'induction de l'autophagie dépendante de LL-37 d'après les résultats des travaux précédemment évoqués.

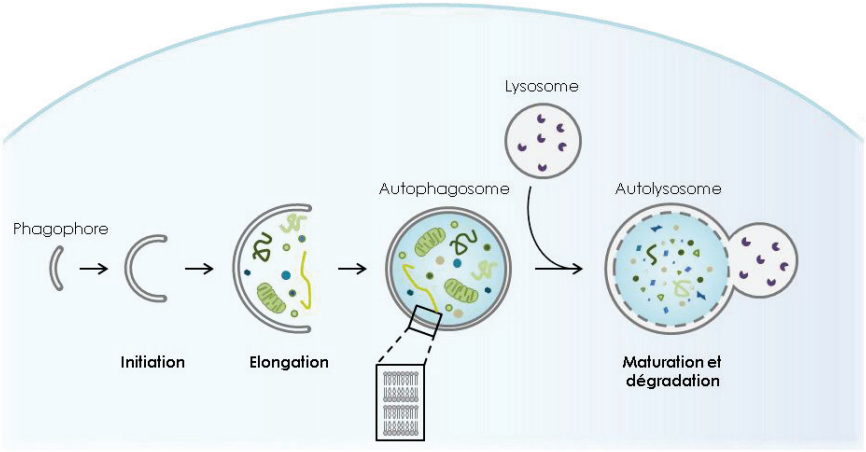


Figure 49. Schéma des étapes de l'autophagie.
(d'après http://medschool.umaryland.edu/fadenlab/autophagy.asp).Lors de l'activation de la voie de l'autophagie, l'acquisition de lipides par le phagophore permet l'élongation de la double membrane et la séquestration des éléments destinés à la dégradation. La membrane interne et la membrane externe fusionnent pour former deux membranes distinctes constituant l'autophagosome. L'autophagosome fusionne ensuite avec le lysosome, dont les enzymes hydrolytiques dégradent la membrane interne de l'autophagosome et son contenu.

Certaines défensines peuvent également agir sur les cellules-hôtes eucaryotes afin d'inhiber la réplication virale. A titre d'exemple, les défensines HBD-2 et HBD-3 inhibent l'infection cellulaire par le HIV en se liant au récepteur CXCR4 dont le virus se sert comme co-récepteur pour entrer dans les lymphocytes T. Le complexe peptide/récepteur est alors internalisé, induisant ainsi une diminution de l'expression de surface du CXCR4 (Quinones-Mateu *et al.* 2003; Feng *et al.* 2006).

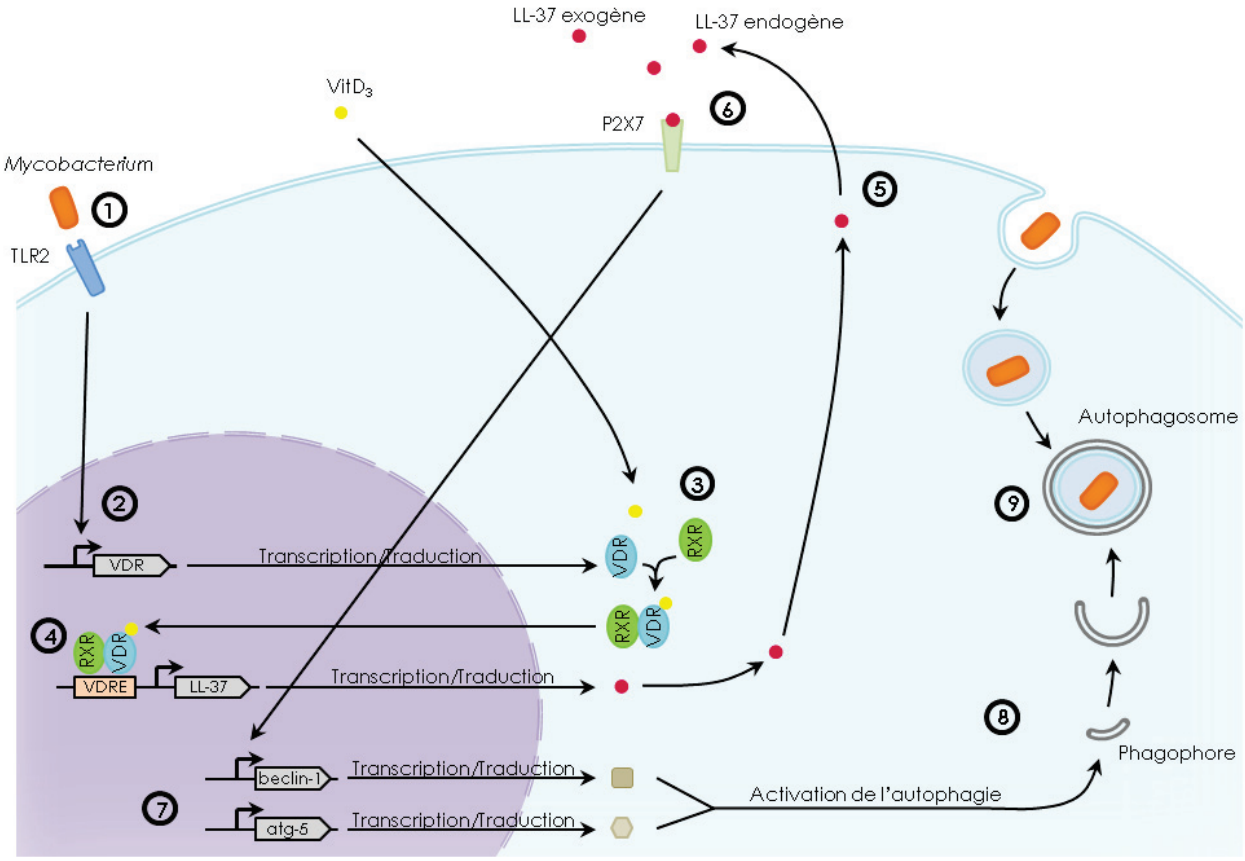


Figure 50. Schéma de la voie d'activation de l'autophagie dépendante de LL-37. (1) Détection de *Mycobacterium* par le récepteur TLR2, (2) Induction de l'expression du facteur de transcription VDR, (3) Activation du VDR par la vitamine D_3, (4) Induction de l'expression de LL-37, (5) Sécrétion de LL-37, (6) Interaction de LL-37 avec le récepteur P2X7, (7) Induction de l'expression des gènes de l'autophagie, (8) Activation de l'autophagie, (9) Elongation autour de la vacuole de phagocytose contenant *Mycobacterium*, puis élimination par fusion avec le lysosome.

II.6.3.1.3 Autres activités antimicrobiennes

II.6.3.1.3.1 Neutralisation de toxines bactériennes

Au-delà de son action bactéricide, LL-37 est capable de neutraliser certaines endotoxines bactériennes comme le LPS. Lors d'une septicémie, la lyse des bactéries par les défenses de l'hôte ou par un traitement antibiotique peut provoquer une importante libération de LPS et ainsi entrainer un choc endotoxinique, se traduisant par la libération massive de cytokines pro-inflammatoires. En se liant au LPS, LL-37 exerce une action protectrice contre le choc endotoxinique en bloquant l'interaction LPS/protéine LBP (*LPS-binding protein*) reconnue à la surface des macrophages par les récepteurs CD14 et TLR-4, bloquant ainsi l'activation des macrophages et la libération des cytokines (Bals *et al.* 1999; Cirioni *et al.* 2006; Rosenfeld *et al.* 2006). En effet, LL-37 possède une forte affinité pour le LPS, permettant une interaction directe et la neutralisation de l'activité biologique de l'endotoxine (Larrick *et al.* 1995; Turner *et al.* 1998; Scott *et al.* 2002). L'étude de Nagaoka *et al.* a permis d'observer l'effet

protecteur de LL-37 *in vivo* chez la souris, mais a également souligné le rôle de la charge, de l'hydrophobicité et de l'amphiphilie du peptide (Nagaoka *et al.* 2002). De manière analogue, les défensines sont notamment capables de neutraliser certaines exotoxines (toxine LeTx de *Bacillus anthracis*) et endotoxines bactériennes (LPS, LTA) (Dhople *et al.* 2006; Suarez-Carmona *et al.* 2015).

II.6.3.1.3.2 Propriétés anti-biofilm

La formation de biofilms inhibe la cicatrisation des plaies et favorise la colonisation bactérienne des tissus et le développement d'infections chroniques. LL-37 possède des propriétés anti-biofilm et permet notamment de détruire des biofilms préformés *in vitro* (Overhage *et al.* 2008; Dean *et al.* 2011). Le peptide est capable d'inhiber *in vitro* la formation des biofilms de *P. aeruginosa*, *Francisella novicida* ou *S. epidermidis* à des concentration bien inférieures à celles nécessaires pour tuer ou inhiber la croissance bactérienne (**Figure 51**) (Overhage *et al.* 2008; Hell *et al.* 2010; Amer *et al.* 2010; Dean *et al.* 2011). Dans le cas de *P. aeruginosa*, les travaux de Dean *et al*. ont montré que le peptide affecte la formation du biofilm en diminuant l'attachement des bactéries au support, en stimulant leur mobilité et en interférant dans deux systèmes majeurs du *quorum-sensing* (Las et Rhl), entrainant l'inhibition de l'expression de gènes essentiels au développement du biofilm (Overhage *et al.* 2008).

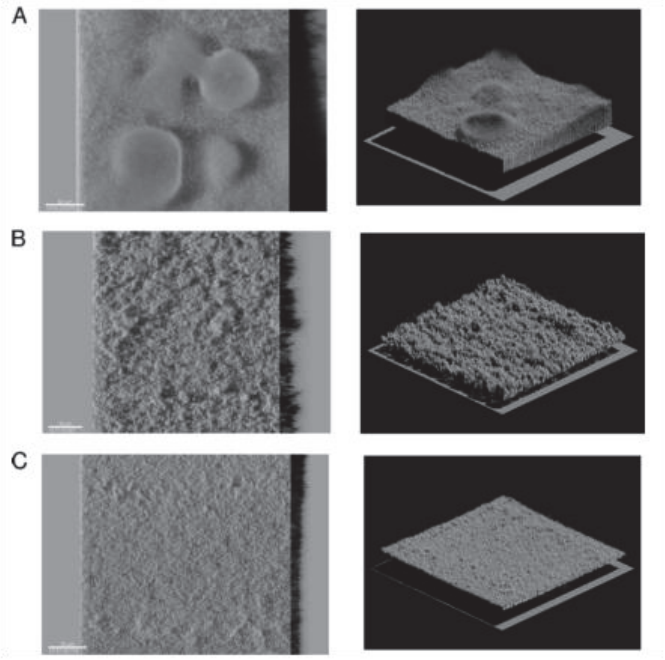


Figure 51. Effet du peptide LL-37 sur la formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* (Overhage *et al.* 2008). Les photos de microscopie confocale ont été réalisées après coloration des biofilms, et permettent d'évaluer l'effet du peptide sur la formation des biofilms (A) en absence de LL-37, (B) en présence de 4µg/ml de LL-37, et (C) avec l'addition de LL-37 sur des biofilms préformés de *P. aeruginosa*.

II.6.3.2 Rôles des PAMs humains dans le système immunitaire

Outre leur aptitude à agir directement contre les microorganismes pathogènes, les PAMs humains peuvent participer aux défenses de l'hôte en modulant la réponse immunitaire, notamment en signalant les dommages cellulaires et/ou tissulaires. Pour cela, les cathélicidines et les défensines font appel à leurs propriétés de chimiotactisme et de modulation de la libération de cytokines par les cellules de l'immunité innée et adaptative, caractéristiques des alarmines. Les alarmines se définissent par trois caractéristiques : (i) il s'agit de molécules endogènes exprimées et libérées par les leucocytes et les cellules épithéliales en cas de lésions cellulaires, (ii) capables de recruter et d'activer les cellules de l'immunité innée et adaptative, et (iii) permettant de restaurer l'homéostasie par stimulation de la cicatrisation (Vandamme *et al.* 2012).

II.6.3.2.1 Chimiotactisme

La cathélicidine LL-37 possède des propriétés chimioattractives directes pour les neutrophiles, les monocytes, les mastocytes et les lymphocytes T (Agerberth *et al.* 2000; De Yang *et al.* 2000; Babolewska & Brzezinska-Blaszczyk 2015). Cette capacité permet de mobiliser les leucocytes au niveau des sites lésés, notamment en cas d'infection microbienne. Les neutrophiles représentent la principale source de cathélicidines, stockées dans des granules prêtes à être libérées au site d'infection (Vandamme *et al.* 2012). La libération de peptides par ces cellules permet alors de mobiliser davantage de leucocytes. De plus, une étude menée par Scott *et al*. a permis de montrer que l'instillation intra-trachéale de LL-37 chez la souris stimule l'expression de 29 gènes au niveau des poumons, dont un codant la cytokine MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein 1*), connue pour son action chimioattractive sur les monocytes, les lymphocytes T et les cellules NK (Scott *et al.* 2002; Deshmane *et al.* 2009). L'augmentation de l'expression du gène codant MCP-1 a également été observée dans le sang humain exposé à LL-37 (Scott *et al.* 2002). De la même façon, LL-37 induit l'expression de l'IL-8 par les macrophages et les fibroblastes afin d'attirer les neutrophiles (Montreekachon *et al.* 2011). De leur côté, les défensines HNPs et HBDs sont également capables de recruter différents types cellulaires dont les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques ou encore les lymphocytes T, notamment *via* la stimulation de la sécrétion de l'IL-8 et de MCP-1 par les monocytes (Territo *et al.* 1989; Yang *et al.* 2000; Boniotto *et al.* 2006; Dhople *et al.* 2006; Suarez-Carmona *et al.* 2015). Ce processus est déterminé par la fixation des défensines aux récepteurs cellulaires, comme dans le cas du recrutement des lymphocytes T par HBD-2, via l'interaction avec le récepteur CCR6 (Yang *et al.* 1999).

II.6.3.2.2 Modulation de l'inflammation

Une fois les cellules immunitaires recrutées au site d'infection, les PAMs peuvent moduler leur activité, en particulier par la production et la libération de cytokines pro- et anti-inflammatoires. La cathélicidine LL-37 et les défensines HBD-1 à -3 stimulent par exemple chez les monocytes la production d'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire (Boniotto *et al.* 2006; Mookherjee *et al.* 2006), mais également d'IL-4, d'IL-5, d'IL-6 et d'IL-1β, des cytokines pro-inflammatoires (Boniotto *et al.* 2006; Yoshioka *et al.* 2008). Chez les mastocytes, l'exposition à LL-37 entraine la libération d'IL-2, d'IL-4 et d'IL-6, d'importants médiateurs de l'inflammation (Niyonsaba *et al.* 2010; Vandamme *et al.* 2012). LL-37 peut également agir en synergie avec l'IL-1β pour augmenter la production de cytokines (IL-6 et IL-10) et de chimiokines (MCP-1 et MCP-3) chez les cellules mononucléaires humaines du sang périphérique (Yu *et al.* 2007).

II.6.3.2.3 Immunité acquise

Bien qu'effecteur de la réponse immunitaire innée, LL-37 joue également un rôle dans l'immunité adaptative en modulant l'activité des cellules dendritiques, spécialisées dans la présentation d'antigènes aux lymphocytes T (LT). D'après Davidson *et al.*, l'ajout de peptide lors de la différenciation des monocytes en cellules dendritiques entraine (i) une augmentation de la capacité d'endocytose, (ii) une modification de l'expression de surface des récepteurs impliqués dans la phagocytose, (iii) une augmentation de la sécrétion de cytokines (IL-12) favorisant la différenciation des LT en LTh-1 et (iv) une augmentation de la réponse Th-1 *in vitro* (Davidson *et al.* 2004). LL-37 modifie également le comportement des cellules dendritiques immatures, notamment en augmentant l'expression de la molécule présentatrice d'antigène HLA-DR et de la molécule de costimulation CD86 (Bandholtz *et al.* 2006). Le peptide est donc capable d'intervenir dans la réponse immunitaire adaptative *via* la manipulation des cellules dendritiques.

II.6.3.2.4 Cicatrisation

Une fois l'infection contrôlée et éliminée, les tissus lésés doivent être réparés. Le processus de cicatrisation nécessite notamment la migration et la prolifération des cellules épithéliales. La cathélicidine humaine LL-37, faiblement exprimée par les kératinocytes de la peau saine, est surexprimée en cas d'infection ou de lésion (Schauber *et al.* 2007). Des tests *in vitro* ont montré que LL-37 induit la migration des kératinocytes, *via* la transactivation du facteur de croissance EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) (Tokumaru *et al.* 2005). L'équipe de Steinstraesser *et al.* a quant à elle pu démontré *in vivo* la stimulation de la cicatrisation induite par LL-37. Pour cela, les auteurs ont induit la surexpression de LL-37 à l'aide d'un plasmide codant le peptide électroporé directement au niveau de plaies cutanées chez la souris. La surexpression de LL-37 par l'épithélium et l'accélération de la cicatrisation ont pu être observées (**Figure 52**) (Steinstraesser *et al.* 2014).

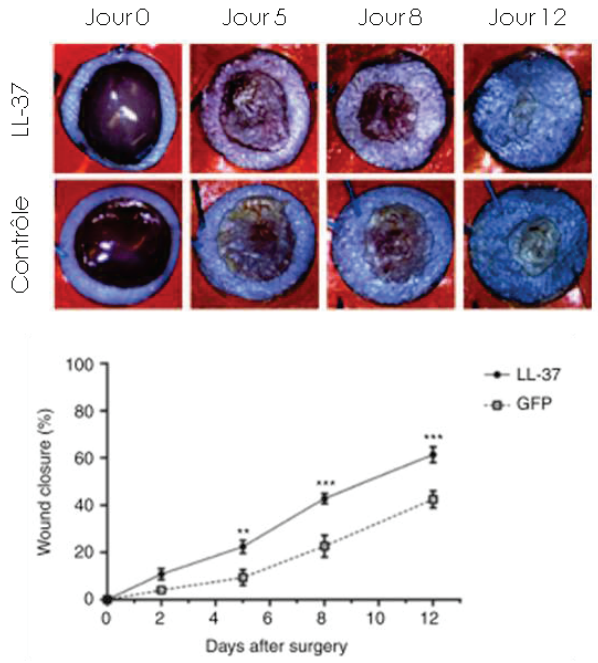


Figure 52. Effet de la surexpression de LL-37 sur la cicatrisation (Steinstraesser *et al.* 2014). Un plasmide codant LL-37 (rond noir) ou un plasmide contrôle (carré gris) ont été électroporés dans une plaie dorsale chez la souris. L'évolution de la cicatrisation a été évaluée par mesure de la surface des plaies 0, 2, 5, 8 et 12 jours après électroporation, à l'aide d'un stéréomicroscope. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cicatrisation par rapport au jour 0.

II.6.4 Effet de l'association des PAMs humains entre eux ou avec des antibiotiques

Lors d'une infection, les pathogènes peuvent induire la production ou la libération simultanée de plusieurs types de PAMs différents. Plusieurs études ont ainsi reporté des effets additifs voir synergiques de certain PAMs humains en conditions *in vitro*. Par exemple, la présence des défensines HBD-1 et HBD-2 permet d'augmenter de façon synergique l'activité bactéricide de LL-37 contre *H. pylori* et *S. aureus*, respectivement (Ong *et al.* 2002; Hase *et al.* 2003). De même, Nagaoka *et al.* ont observé une action synergique de l'association HNP-1/LL-37 sur l'activité bactéricide des peptides à l'encontre de *S. aureus* et *E. coli* (**Figure 53A**) (Nagaoka *et al.* 2000). La coprésence de ces deux peptides potentialise également leur capacité respective à perméabiliser les membranes interne et externe d'*E. coli* (**Figure 53B**) (Nagaoka *et al.* 2000).

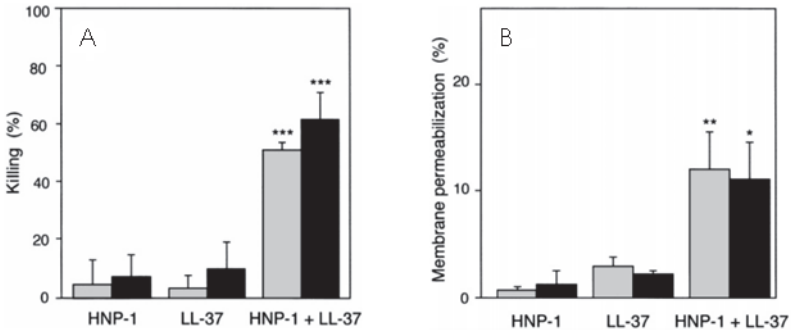


Figure 53. Effet synergique de l'association HNP-1/LL-37 (Nagaoka *et al.* 2000). (A) Effet de LL-37 et HNP-1 seuls ou en combinaison sur la viabilité de *S. aureus* (gris) et *E. coli* (noir). Les bactéries ont été incubées avec 10 µg/mL de HNP-1 et/ou 1 µg/mL de LL-37 pendant 20 min à 37°C. (B) Effet de LL-37 et HNP-1 seuls ou en combinaison sur la perméabilisation de la membrane externe (gris) et de la membrane interne (noir) de *E. coli*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Par ailleurs, l'étude de l'interaction des agents antibactériens retrouvés au niveau de la peau a conduit Chen *et al.* à tester l'effet de nombreuses combinaisons de PAMs humains (LL-37 et β-défensines) en présence ou absence de lysozyme sur la viabilité de *S. aureus* et *E. coli*. Les résultats ont montré des effets additifs et synergiques pour certaines combinaisons de molécules à l'encontre des deux bactéries (Chen *et al.* 2005). De plus, la potentialisation de l'effet bactéricide des peptides, particulièrement marquée chez *S. aureus*, semble d'autant plus importante en milieu acide (**Figure 54**) (Chen *et al.* 2005).

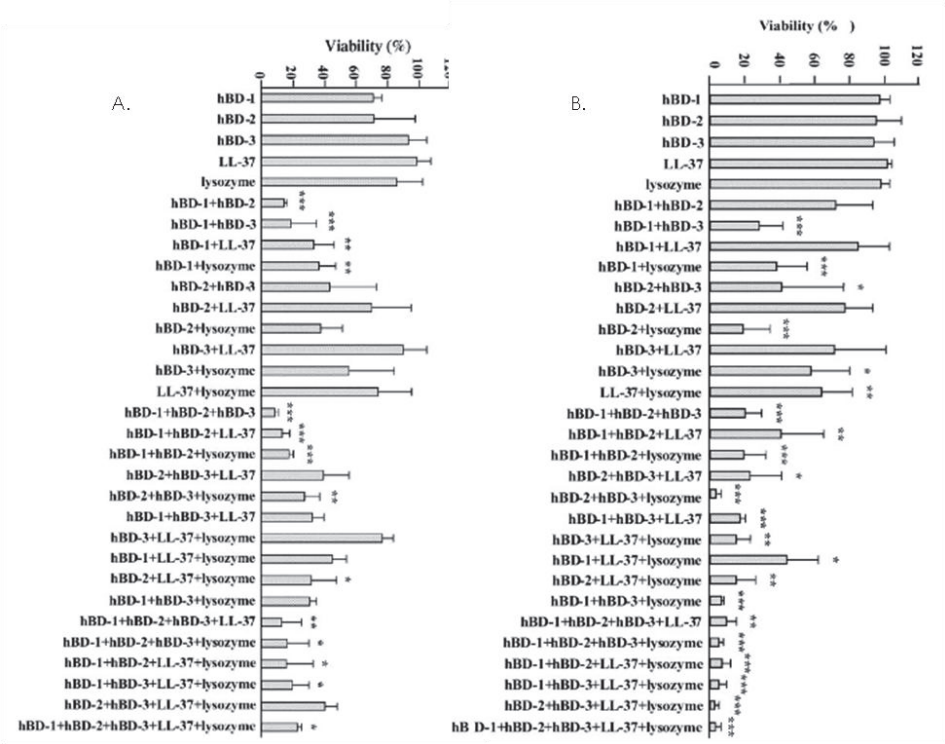


Figure 54. Effet de l'association de PAM humains et de lysozyme sur la viabilité de *S. aureus* (Chen *et al.* 2005). Effet de HBD-1, HBD-2, HBD-3, LL-37 et du lysozyme seuls ou en association sur la viabilité de *S. aureus*. Les bactéries ont été incubées avec 1 µg/mL de HBD-1, 0.3 µg/mL de HBD-2, 0.3 µg/mL de HBD-3, 0.05 de LL-37 et ou 1 µg/mL de lysozyme dans un tampon phosphate à pH 7.4 (A) ou à pH 4.6 (B) pendant 30 min à 37°C. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Dans le cadre du traitement d'une infection bactérienne, les bactéries peuvent être exposées simultanément à des PAMs et aux antibiotiques du traitement. Plusieurs études ont rapporté un effet potentialisateur des PAMs humains sur l'activité des antibiotiques. Ainsi, l'ajout des peptides HBD-1, HNH-1 ou HD-5 à des concentrations subinhibitrices ont un effet additif sur l'activité bactéricide de plusieurs antibiotiques (la tigecycline, la moxifloxacine, le piperacilline-tazobactam et le meropenem) contre *Clostridium difficile* en conditions *in vitro*, tandis que les peptides LL-37 et HBD-3 agissent en synergie avec chacun des antibiotiques testés dans cette étude (Nuding *et al.* 2014). Un groupe indien à quant à lui reporté une synergie entre le peptide HNP-1 et deux antibiotiques utilisés pour le traitement de la tuberculose, l'isoniazide et la rifampicine (Kalita *et al.* 2004). D'après les auteurs, l'addition de peptide permet d'une part d'augmenter l'efficacité *in vitro* des antibiotiques contre *M. tuberculosis*, que la bactérie soit extracellulaire ou dans des macrophages, et d'autre part d'augmenter *in vivo* la clairance des bactéries au niveau des poumons, du foie et de la rate chez la souris (Kalita *et al.* 2004). Enfin, Lin *et al.* ont mis en évidence une potentialisation de l'activité de l'azithromycine lorsqu'elle est associée à LL-37 (Lin *et al.* 2015). L'azithromycine est un antibiotique capable d'inhiber la synthèse protéique des bactéries en se fixant à la sous-unité 50S de leurs ribosomes (Kannan *et al.* 2012). D'après les auteurs, la combinaison azithromycine/LL-37 induit de façon synergique un accroissement de leur activité bactéricide à l'encontre de souches multirésistantes aux antibiotiques de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* et *A. baumannii* (**Figure 55A**) (Lin *et al.* 2015). Ces résultats ont notamment été corrélés à une augmentation de la fréquence d'apparition d'une anomalie morphologique du nucléoïde, prenant alors une forme toroïdale caractéristique de l'inhibition de la synthèse protéique (**Figure 55B**, DAPI). De plus, l'utilisation d'azithromycine marquée (vert) et d'un marqueur membranaire (rouge) ont permis de mettre en évidence une augmentation de la pénétration de l'antibiotique dans les cellules bactériennes en présence du peptide (**Figure 55B**, AZM). Selon Lin *et al.*, la perméabilisation de la membrane bactérienne induite par LL-37 faciliterait l'entrée de l'azithromycine (Lin *et al.* 2015).

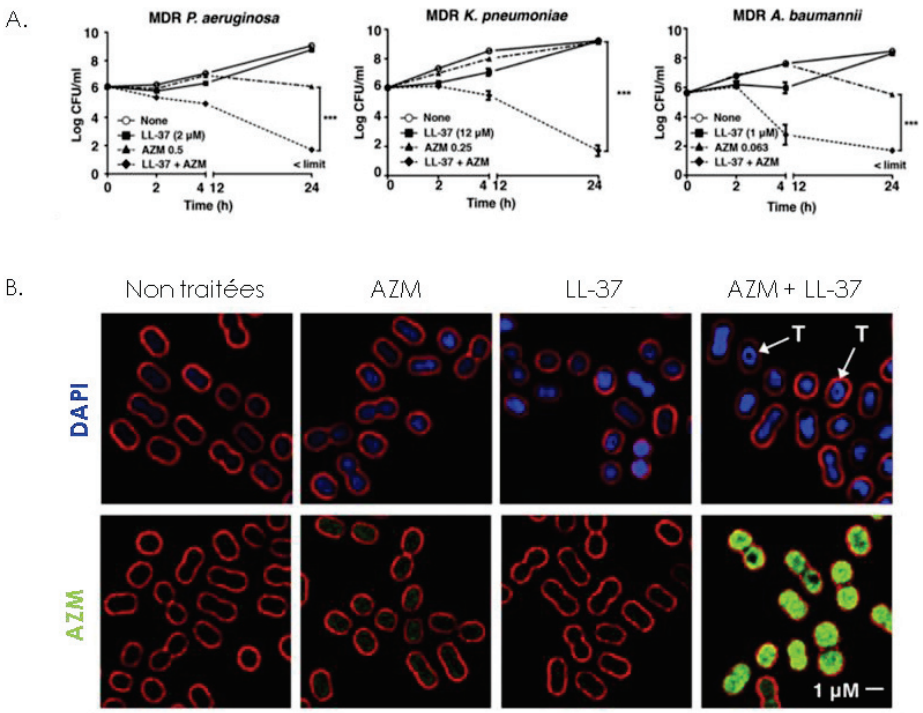


Figure 55. Effet synergique de l'association azithromycin/LL-37 (Lin *et al.* 2015). (A) Effet de l'azithromycine (AZM) et de LL-37 seuls ou en combinaison sur la viabilité de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Acinetobacter baumannii*. *** $p < 0.001$. (B) Effet de l'azithromycine (AZM) et de LL-37 seuls ou en combinaison sur la morphologie du nucléoïde bactérien et sur l'efficacité d'entrée de l'azithromycine chez *A. baumannii*. Les bactéries ont été incubées pendant 2h avec l'azithromycine (non marquée ou marquée avec un fluorochrome vert) et LL-37 seuls ou en combinaison, puis l'ADN a été marqué au DAPI (bleu) et la membrane bactérienne a été marquée avec le marqueur membranaire FM4-64 (rouge). Les flèches indiquent les nucléoïdes de forme toroïdale.

II.7 Peptides antimicrobiens et *Legionella*

Les études consacrées à l'effet des PAMs sur les bactéries pathogènes intracellulaires sont peu nombreuses, en particulier celles s'intéressant aux légionelles. Les quelques données disponibles à ce sujet concernent principalement l'activité de PAMs au niveau extracellulaire. Le mécanisme d'action des PAMs humains au cours de l'infection cellulaire par *Legionella* restent à ce jour totalement inexploré, tout comme les mécanismes développé par la bactérie pour résister à ces peptides.

II.7.1 PAMs à activité anti-*Legionella*

II.7.1.1 Les PAMs non humains

Les premiers PAMs bactériens à activité anti-*Legionella* ont été purifiés et caractérisés à partir du surnageant de culture de *Staphylococcus warneri* RK ; il s'agit de la warnericine RK et des δ-lysines I et II (Verdon *et al.* 2008). Ces petits peptides (entre 22 et 25 aa) sont cationiques et possèdent une structure α-hélicoïdal amphiphile. Malgré les différences entre leur séquence

peptidique (**Figure 56**), la warnericine RK et la δ-lysine I ont un spectre d'activité restreint presque uniquement aux bactéries du genre *Legionella*.

```
Warnericin RK       1 -----MQFITDLIKKAVDFFKGLFGNK
Hld-II S. warneri   1 MTADIISTIGDFVKWILDTVKKFTK--
Hld-I S. warneri    1 MAADIISTIGDLVKLIINTVKKFQK--
```

Figure 56. Alignement des séquences peptidiques de la warnericine RK et des δ-lysines I et II sécrétées par *Staphylococcus warneri* (Verdon *et al.* 2008).

Ces peptides sont actifs à faible concentration, leur CMI contre *L. pneumophila* ayant été établie à 3 µg/mL (soit environ 1 µM), cependant cette sensibilité diminue au cours de la croissance bactérienne (Verdon *et al.* 2008, 2011). La caractérisation de l'activité de la warnericine RK a permis de montrer que ce peptide est capable de former des pores de taille variable dans la membrane de vésicules lipidiques artificielles et des érythrocytes (Verdon *et al.* 2009). Ces observations, couplées à la confirmation de la perméabilisation de la membrane de légionelles viables, suggèrent que la warnericine RK agit sur la membrane de *Legionella* selon le modèle « *detergent-like* » (Verdon *et al.* 2009, 2011). La composition lipidique de la membrane de *Legionella* joue alors un rôle important dans la sensibilité au peptide. En effet, Verdon *et al.* ont pu montrer que l'augmentation de la quantité d'acides gras (AG) branchés (notamment des espèces iC16 :0, aC15 :0 et iC14 :0) et la diminution de la taille de ces AG au cours de la croissance bactérienne sont corrélées à une augmentation de la résistance à la warnericine chez *L. pneumophila* (Verdon *et al.* 2011). D'après les auteurs, l'augmentation de la proportion d'AG branchés entrainerait une augmentation de la fluidité membranaire, diminuant ainsi la capacité d'insertion de la warnericine dans la membrane de *Legionella*. Plus récemment, 15 peptides à activité anti-*Legionella*, dont la warnéricine RK, ont été identifiés à partir du surnageant de culture de 9 espèces de *Staphylococcus* différentes (Marchand *et al.* 2011). Ces peptides ont été classés en deux groupes selon leur activité antimicrobienne (MIC, perméabilisation membranaire et perte de cultivabilité bactérienne) et de leur activité hémolytique. Le premier groupe, incluant la warnericine RK, comprend les peptides possédant une activité bactéricide et hémolytique. Le second groupe, représenté par le PSMα (*Phenol Soluble Modulin* α), rassemble les peptides bactériostatiques et à faible activité hémolytique (Marchand *et al.* 2011; Berjeaud *et al.* 2016). Une étude de la relation structure/activité de la warnericine RK et du PSMα a notamment permis de montrer que l'activité hémolytique de ces PAMs repose en grande partie sur le 14ème résidu de leur séquence peptidique, correspondant à une phénylalanine et une glycine, respectivement. De plus, ces travaux suggèrent une corrélation entre l'activité antibactérienne de ces peptides et leur cationicité (Marchand *et al.* 2015; Berjeaud *et al.* 2016).

L'apolipophorine III (apoLp-III) et une défensine extraite de l'hémolymphe de la larve de mite *Galleria mellonella* sont deux molécules cationiques possédant une activité bactéricide directe contre *Legionella dumoffii*. L'examen microscopique de la bactérie exposée à ces composés antimicrobiens a montré d'importantes altérations de l'ultrastructure, comprenant des dommages membranaires, la présence de nombreuses vacuoles et la condensation du cytoplasme (**Figure 57**).

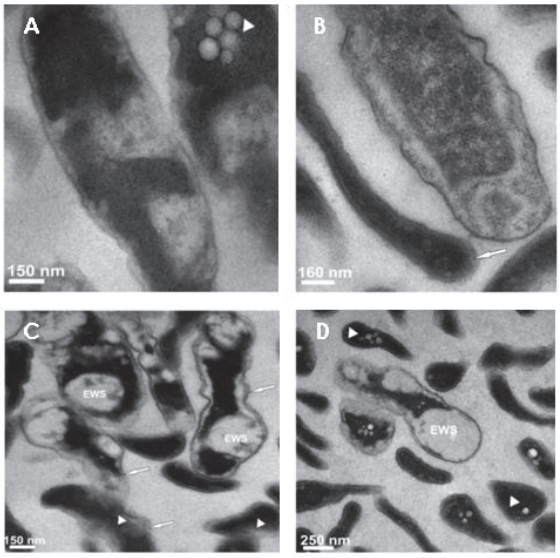


Figure 57. Effet de l'apolipophorine III et de la défensine extraites de l'hémolymphe de *Galleria mellonella* sur l'ultrastructure de *Legionella dumoffii* (Palusińska-Szysz *et al.* 2012). Les bactéries cultivées sur un milieu non supplémenté (A et C) ou supplémenté en choline (B et D) ont été exposées pendant 1h à l'apoLp-III ((A et B) ou à la défensine de *Galleria* (C et D).

Palusińska-Szysz *et al.* ont alors remarqué une amplification des dommages membranaires lorsque les légionelles avaient été préalablement cultivées en présence de choline (Palusińska-Szysz *et al.* 2012). La phosphatidylcholine (PC) est un phospholipide (PL) typique des membranes eucaryotes. *Legionella* est cependant capable de synthétiser ce PL à partir de choline exogène, afin de l'intégrer à sa membrane. Lorsque les légionelles sont cultivées en présence de choline, le contenu en cardiolipines de leur membrane n'est pas modifié, tandis que la proportion de PC augmente et que la proportion de phosphatidyléthanolamines (PE) diminue (Palusińska-Szysz *et al.* 2016). Des tests de fixation de l'apoLp-III ont ensuite été réalisés à l'aide de liposomes composés des lipides extraits d'une culture de légionelles. Les résultats ont montré que l'apoLp-III se fixe et s'insère dans la membrane des liposomes, avec une affinité plus importante pour les liposomes formés de lipides extraits de légionelles cultivées sur un milieu supplémenté en choline, comparé aux liposomes formés des lipides extraits de culture sur un milieu non complémenté (Palusińska-Szysz *et al.* 2016). D'après les auteurs, l'augmentation du taux de PC dans la membrane de *Legionella* au détriment du taux de PE augmenterait la charge négative de surface, augmentant alors l'affinité de la protéine cationique pour la membrane des légionelles (Palusińska-Szysz *et al.* 2016).

II.7.1.2 Les PAMs humains

A notre connaissance, seules trois études traitent de l'effet des PAMs humains sur *Legionella* (Edelstein *et al.* 2003; Scharf *et al.* 2010b; a). Edelstein *et al.* sont les premiers a avoir testé l'activité de ces peptides dans le cadre de la caractérisation d'un nouveau gène de virulence de *L. pneumophila*, le gène *lvgA* (*Legionella virulence gene*). Le groupe américain a montré que ce gène code pour une protéine localisée dans la membrane externe de *L. pneumophila*. D'après les auteurs, la mutation du gène *lvgA* n'a pas d'effet sur la composition du LPS des bactéries, ni sur leur internalisation et leur croissance intracellulaire dans les macrophages alvéolaires de cobaye et dans les pneumocytes humains A549. La perte du gène *lvgA* est cependant associée à une virulence atténuée *in vivo* chez le cobaye, ainsi qu'à une sensibilité accrue au peptide HBD-2 en milieu extracellulaire (Edelstein *et al.* 2003). Plus tard, Scharf *et al*. se sont intéressés au rôle des défensines HBD-2 et HBD-3 dans la réponse immunitaire contre *L. pneumophila* (Scharf *et al.* 2010b; a). D'après ces travaux, l'infection des cellules épithéliales alvéolaires SAEC (*Small Airway Epithelial Cells*) et A549 par *L. pneumophila* 130b induit l'expression et la libération de HBD-2. Ce processus dépendrait de l'activation des récepteurs cellulaires TLR2 et TLR5, capables de reconnaitre le LPS et la flagelline de la bactérie, respectivement. L'activation de ces récepteurs conduirait ensuite à l'activation des kinases MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) p38 et JNK (c-Jun N-terminal kinase), responsables de la phosphorylation des sous-unités p65 et c-Jun des facteurs de transcription NF-κB (*Nuclear Factor-kappa B*) et AP-1 (*Activator protein 1*), respectivement (**Figure 58A**). Les auteurs ont alors observé une augmentation de la fixation des facteurs p65 et c-Jun sur le promoteur du gène codant HBD-2 dans les cellules A549 infectées par *L. pneumophila*. Cette étude a également permis de montrer que la défensine HBD-2 exerce un effet inhibiteur sur la croissance extracellulaire des légionelles, ainsi que sur leur croissance intracellulaire, partiellement contrôlée par la production endogène du peptide (Scharf *et al.* 2010a). Des résultats similaires ont été obtenus pour la défensine HBD-3. En effet, Scharf *et al.* ont montré que *L. pneumophila* induit l'expression et la libération de HBD-3 par les cellules épithéliales SAEC et A549, ainsi que par des macrophages alvéolaires primaires. Ce processus requiert l'activation des récepteurs TLR2 et TLR5, mais également l'activation du TLR9, capable de détecter l'ADN bactérien (**Figure 58B**). La transduction du signal serait ensuite assurée par la kinase JNK et le facteur de transcription c-Jun. Tout comme la défensine HBD-2, HBD-3 exerce un effet inhiteur sur la croissance extracellulaire des légionelles, ainsi que sur leur croissance intracellulaire dans les pneumocytes A549. De même, la production endogène du peptide permet de freiner la réplication intracellulaire de *L. pneumophila* (Scharf *et al.* 2010b). Ces travaux ont permis de montrer que les PAMs humains possèdent une activité anti-*Legionella* et participent au contrôle de l'infection. Toutefois, aucune étude à ce jour ne décrit le mode d'action direct de ces peptides ou une

potentielle interaction peptide/cellule-hôte permettant d'inhiber la réplication intracellulaire de *Legionella*.

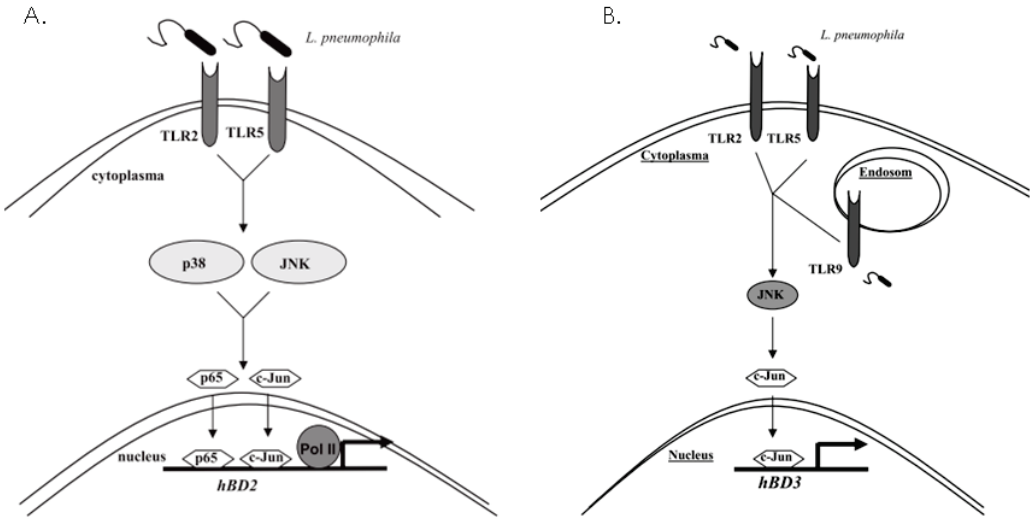


Figure 58. Modèle des voies d'induction de l'expression des défensines HBD-2 et HBD-3 activées par *L. pneumophila* (Scharf *et al.* 2010a, b). (A) *L. pneumophila* induit l'expression de la défensine HBD-2 via l'activation des récepteurs TLR2 et TLR5. La cascade de régulation implique ensuite l'activation des protéines kinases MAPK p38 et JNK ainsi que le recrutement des sous-unités p65 et c-Jun des facteurs de transcription NK-κB et AP-1, respectivement, au niveau du promoteur du gène codant HBD-2. (B) *L. pneumophila* induit l'expression de la défensine HBD-3 via l'activation des récepteurs TLR2, TLR5 et TLR9. La cascade de régulation implique ensuite l'activation de la protéine kinase JNK ainsi que le recrutement de la sous-unité c-Jun du facteur de transcription AP-1 au niveau du promoteur du gène codant HBD-3.

II.7.2 Mécanisme de résistance aux PAMs de *Legionella*

De nombreux travaux portant sur la résistance bactérienne aux PAMs humains ont pour modèle d'étude *Salmonella* Typhimurium. Plusieurs gènes de résistance y ont été identifiés dont le gène *pagP* codant la palmitoyl transférase responsable de l'ajout d'un acide palmitique au niveau du lipide A (cf **Chapitre II.5.1.3**). Cette réaction entraine une diminution de la fluidité membranaire empêchant ainsi l'insertion des peptides (Guo *et al.* 1998). Un homologue du gène *pagP* a été décrit chez *L. pneumophila,* et appelé *rcp* (*resistance to cationic peptide*)(Robey *et al.* 2001). Il a également été retrouvé chez 9 sérogroupes (2-8, 13 et 14) et 6 espèces de *Legionella* (*L. birminghamenesis*, *L. erythra*, *L. feeleii*, *L. longbeachae*, *L. micdadei* et *L. parisienesis*). D'après Robey *et al.*, la mutation du gène *rcp* induit une augmentation de la sensibilité au C18G (peptide artificiel α-hélicoïdal) en milieu extracellulaire, ainsi qu'un défaut de croissance intracellulaire dans les macrophages humains et l'amibe *Hartmannella vermiformis* (Robey *et al.* 2001). Le gène *rcp* est donc impliqué dans la résistance aux PAMs, cependant son rôle dans la résistance aux PAMs humains reste à démontrer.

Objectifs

Au cours de l'infection, les légionelles se voient confrontées à différents types d'agents antibactériens. Les premiers agents auxquels doivent faire face les bactéries sont produits par l'hôte dès les premières heures de contact. Parmi eux se trouvent les peptides antimicrobiens sécrétés notamment par les leucocytes, les macrophages et l'épithélium pulmonaire, constituant la première ligne de défense mise en place par l'immunité innée. Les mécanismes d'action de ces peptides sont très variés, l'activité prépondérante étant la déstabilisation directe de la membrane bactérienne. Si le mode d'action des peptides antimicrobiens humains à l'encontre des bactéries extracellulaires est bien décrit, leur activité sur les bactéries pathogènes intracellulaires telle que *Legionella* reste à ce jour encore peu documentée. Les antibiotiques, administrés au cours de l'infection, constituent une seconde classe d'agents antibactériens auxquels les légionelles peuvent être exposées. Les mécanismes d'action des antibiotiques sont bien décrits, cependant leur mauvaise utilisation a conduit à la sélection de résistances chez de nombreuses autres espèces bactériennes. Très récemment, deux études ont rapporté les premières preuves de l'existence d'une résistance aux fluoroquinolones chez *L. pneumophila*.

Dans ce contexte, mes travaux de thèse ont pour objectif de contribuer à une meilleure connaissance de l'activité anti-*Legionella* des antibiotiques et des peptides antimicrobiens humains. Deux axes de recherche ont alors été développés :

- Le premier axe a consisté à évaluer la sensibilité de souches cliniques de *L. pneumophila* sérogroupe 1 aux antibiotiques communément employés dans le traitement de la légionellose, et ce dans le but de déterminer le seuil épidémiologique de sensibilité de *L. pneumophila* à ces différents antibiotiques.

- Le deuxième axe a été dédié à la caractérisation de l'activité antibactérienne des peptides antimicrobiens humains et à l'identification de leur mécanisme d'action à l'encontre de *L. pneumophila*. Dans un premier temps, l'impact des PAMs a été étudié au niveau extracellulaire. Les résultats obtenus ont permis d'examiner la capacité de perméabilisation membranaire des peptides et leur effet sur la cultivabilité des légionelles. Ces données ont été complétées par l'analyse de l'impact des PAMs en association entre eux pour mettre en évidence d'éventuels effets antagonistes, additifs ou synergiques, afin d'intégrer ces données dans la compréhension globale de la physiologie de l'infection par *L. pneumophila*. L'étude du mode d'action des peptides est basée sur une approche de microscopie. Les résultats obtenus ont permis d'identifier les cibles bactériennes des PAMs humains ainsi que leur effet sur la morphologie des légionelles. Parallèlement, nous nous sommes intéressés aux mécanismes de résistance développés par *L. pneumophila* pour lutter contre les PAMs. Notre attention s'est alors plus particulièrement portée sur le rôle du gène

rcp. Dans un second temps, l'impact des PAMs humains sur *L. pneumophila* a été étudié au niveau intracellulaire. Nous avons pour cela examiné l'effet des peptides sur la capacité de réplication de *Legionella* dans les macrophages et les pneumocytes, puis plus précisément sur les étapes clé du cycle infectieux de la bactérie : l'adhésion, l'internalisation, l'échappement à la voie de dégradation endosomale et le recrutement du réticulum endoplasmique.

Matériel et Méthodes

I. *Cellules et conditions de culture*

I.1 Cellules procaryotes

I.1.1 Legionella spp

Les souches de *Legionella* utilisées dans cette étude sont décrites dans le **tableau 6**.

Tableau 6. Souches bactériennes, plasmides et cellules utilisés dans cette étude.

Souches, Plasmides, Lignées cellulaires	Caractéristiques	Référence
Souches		
Legionella pneumophila		
Leg001	Paris CIP 107629, WT	Laboratoire
Leg002	Lens CIP 108286, WT	Laboratoire
Leg093	Lens, pXDC50	Laboratoire
Leg131	Paris, pXDC31	Laboratoire
Leg132	Paris, pXDC50	Laboratoire
Leg163	Paris, Δrcp::kan	Cette étude
Leg168	Lens, Δrcp::kan	Cette étude
Escherichia coli		
coli094	DH5alpha, pLAW344	
Plasmides		
pLAW344	vecteur de clonage vide	Laboratoire
pLEG246	cassette Kcr	Cette étude
pXDC31	gène de la GFP sous contrôle d'un promoteur inductible à l'IPTG	Laboratoire
pXDC50	gène de la mCherry sous contrôle d'un promoteur inductible à l'IPTG	Laboratoire
Lignées cellulaires		
A549	Lignée de pneumocytes humains	ATCC (CCL-185)
U937	Lignée de monocytes humains	ATCC (CRL-1593.2)

Les légionelles sont cultivées sur milieu gélosé BCYE (*Buffered Charcoal Yeast Extract*) ou en milieu liquide BYE (*Buffered Yeast Extract*).

- Le milieu BCYE contient 10 g d'extrait de levure, 13 g d'agar, 2 g de charbon actif et 500 ml d'eau. Cette base est autoclavée (pendant 20 min à 120°C), puis le pH est ajusté à 6.9 à l'aide de KHO 1 N. La base est ensuite complémentée avec une solution composée de 1g d'alpha cétoglutarate, 0.4 g de L-cystéine, 0.25 g de pyrophosphate de fer et 10 g d'ACES et 500 ml d'eau, et stérilisée par filtration sur 0.22 µm. Le pH est réajusté à 6.9 l'aide de KHO 1 N si nécessaire.
- Le milieu BYE contient 10 g d'ACES, 10 g d'extrait de levure, 0.4 g de L-cystéine, 0.25 g de pyrophosphate de fer et 1 L d'eau. Le pH est ajusté à 6.9, puis la solution est stérilisée par filtration sur 0.22 µm

Après stérilisation, les milieux BCYE et BYE sont supplémentés en antibiotiques et en IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) si nécessaire, afin de maintenir une pression de sélection et/ou d'induire les l'expression de gènes d'intérêt (chloramphénicol 10 µg/mL, kanamycine 20 µg/mL, IPTG 1 mM).
Les cultures sur milieu gélosé sont incubées à 37°C pendant 48 à 72h. Les cultures en milieux liquides sont réalisées en tube 13 mL dans un volume de 5 mL ou en erlenmeyer de 250 mL dans un volume de 50 mL, puis incubées à 37°C sous agitation à 200 rpm jusqu'à ce que les bactéries aient atteint leur phase exponentielle ou stationnaire de croissance. La concentration bactérienne d'une suspension de *L. pneumophila* est évaluée par mesure de l'absorbance à 600 nm (DO_{600} = 1 équivaut à 10^9 ufc/mL).

I.1.2 E. coli

Les souches d'*E. coli* utilisées dans cette étude sont décrites dans le **tableau 6**.
Les *E. coli* sont cultivés sur milieu LB (Luria-Bertani) gélosé ou en milieu LB liquide.

- Le milieu LB gélosé est réalisé à partir de 40 g de poudre LB agar, Miller (Difco, Le Pont de Claix, France) pour 1 L d'eau distillée.
- Le milieu LB liquide est réalisé à partir de 25 g de poudre LB broth, Miller (Difco) pour 1 L d'eau distillée.

Le pH des solutions est ajusté à 7.2 à l'aide de KOH puis les milieux sont autoclavés (pendant 20 min à 120°C). Après stérilisation, les milieux LB sont supplémentés en antibiotiques et IPTG si nécessaire, afin de maintenir une pression de sélection et/ou d'induire les l'expression de gènes d'intérêt (ampicilline 100 µg/mL, chloramphénicol 10 µg/mL, kanamycine 20 µg/mL, IPTG 1 mM).

Les cultures sur milieux gélosés sont incubées à 37°C pendant 24h. Les cultures en milieux liquides sont réalisées dans des tubes en verre dans un volume de 10 mL puis incubées pendant 24h à 37°C sous agitation à 200 rpm. La concentration bactérienne d'une suspension d'*E. coli* est évaluée par mesure de l'absorbance à 600 nm (DO_{600} = 0.4 équivaut à 3.10^8 ufc/mL).

I.1.3 Conservation des souches bactériennes

Les souches de *L. pneumophila* et les souches d'*E. coli* portant une construction plasmidique sont conservées à -80°C. Pour cela les bactéries sont cultivées dans un volume de 5 mL de milieu de culture approprié (BYE ou LB) sur la nuit à 37°C sous agitation à 200 rpm. Les suspensions bactériennes sont ensuite supplémentées avec 30% de glycérol stérile, réparties dans des cryotubes et conservées à -80°C.

I.2 Cellules eucaryotes

I.2.1 Monocytes U937

Les monocytes U937 sont maintenus et cultivés en flasque dans 25 mL de milieu RPMI GlutaMAX™ (Gibco, Paisley, Royaume-Uni) supplémenté avec 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF), 10 unités de Pénicilline et 10 µg/mL de Streptomycine, et incubés à 37°C sous atmosphère enrichie à 5% en CO_2.
Pour les infections, les cellules (℄) sont différenciées en macrophages en plaque 96 puits (Greiner bio-one) ou sur lame de verre surmontée d'une chambre 16 puits (Lab-Tek® Chamber Slide™ NUNC, New York, USA) à raison de 10^5 ℄/puits dans du RPMI-SVF10%, à l'aide 50 ng/ml de phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) pendant 72h en milieu RPMI-SVF 10% avant leur utilisation. Lors des cinétiques de suivi de fluorescence au cours de l'infection, les cellules sont incubées dans du milieu CO_2 Indépendant (CO_2I, Gibco, Paisley, Royaume-Uni) supplémenté avec 10% de SVF, 2 mM de L-glutamine, 10 µg/mL de chloramphénicol et 1 mM d'IPTG.

I.2.2 Pneumocytes A549

Les cellules épithéliales alvéolaires humaines A549 sont maintenues et cultivées en flasque dans 25 mL de milieu RPMI 1640 GlutaMAX™ supplémenté avec 10% (v/v) de SVF, 10 unités de Pénicilline et 10 µg/mL de Streptomycine, et incubées à 37°C sous atmosphère enrichie à 5% en CO_2. Les cellules sont cultivées en monocouche jusqu'à confluence, puis repiquées 1 à 2 fois par semaine à l'aide de trypsine-EDTA 1X (PAA The Cell Culture Company, Velizy-Villacoublay, France). Pour les infections, les cellules sont repiquées 24h avant leur utilisation en plaque 96 puits ou Lab-Tek® 16 puits à raison de 5.10^4 ℄/puits dans du milieu RPMI supplémentée avec 2% de SVF.

Lors des cinétiques de suivi de fluorescence au cours de l'infection, les cellules sont incubées dans du milieu CO_2 Indépendant (CO_2I) supplémenté avec 2% de SVF, 2 mM de L-glutamine, 10 µg/mL de chloramphénicol et 1 mM d'IPTG.

II. *Construction des souches* L. pneumophila *Paris* Δrcp *et Lens* Δrcp

II.1 Extraction d'ADN génomique

L'extraction de l'ADN génomique est réalisée à l'aide du kit DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les recommandations du fournisseur. L'ADN génomique des souches de *L. pneumophila* est extrait à partir d'une culture sur boite de 24h, et est ensuite conservé à -20°C.

II.2 Extraction d'ADN plasmidique

L'extraction de l'ADN plasmidique est réalisée à l'aide du kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur. L'ADN plasmidique des souches de *E. coli* est extrait à partir d'une culture liquide d'environ 16h et est ensuite conservé à -20°C.

II.3 Digestion enzymatique de fragment d'ADN

La digestion enzymatique est réalisée dans un volume final de 40 µL contenant 10 µL d'ADN (produit PCR, ADN génomique ou plasmidique), 1 µL d'enzyme de restriction adéquate (New England Biolabs ou Biolabs), 5 µL de tampon fourni avec l'enzyme de restriction et 34 µL d'eau stérile. Le mélange est incubé pendant 3h à 37°C puis pendant 10 min à 70°C afin d'inactiver l'enzyme. A l'issue de la réaction enzymatique, le fragment digéré est purifié à l'aide du kit MinElute Reaction Cleanup (Qiagen).

II.4 Ligature de fragment d'ADN

La ligature de fragment d'ADN est utilisée dans le cadre de la construction de plasmides de complémentation, afin d'intégrer un gène d'intérêt dans le plasmide.
La ligature est réalisée dans un volume final de 20 µL contenant 4 µL de plasmide préalablement digéré, 12 µL d'insert préalablement digéré, 2 µL de DNA ligase (Promega) et 2 µL de tampon fourni avec la ligase. Le mélange est incubé pendant 1h à température ambiante puis stocké à 4°C.

II.5 Transformation d'*E. coli*

II.5.1 Préparation de bactéries chimiocompétentes

Une pré-culture d'*E. coli* DH5α est réalisée dans 5 mL de milieu liquide LB à partir d'une colonie isolée sur gélose LB, puis incubée pendant une nuit à 37°C sous agitation. Le lendemain, 1 ml de la pré-culture est transféré dans 50 mL de milieu LB et incubé à 37°C sous agitation jusqu'à obtention d'une DO_{600}=0.4. La culture est ensuite centrifugée à 4000 rpm pendant 20 min à 4°C, puis le culot bactérien est égoutté et remis en suspension dans 10 mL de $CaCl_2$ à 0.1 M glacé. La suspension est incubée dans de la glace pendant 1h à 1h30, puis centrifugée à 4000 rpm pendant 15 min à 4°C. Le culot bactérien est à nouveau égoutté, remis en suspension dans 2 mL de $CaCl_2$ à 0.1 M additionné de 20% de glycérol stérile, et la suspension est aliquotée par 100 µL dans des tubes pré-réfrigérés. Pour augmenter l'efficacité de transformation, les aliquots sont préalablement incubés pendant 24h à 48h à 4°C, puis stockés à -80°C.

II.5.2 Transformation

Les aliquots d'*E. coli* chimiocompétentes sont mis au contact de 5 µL d'ADN transformant pendant 30 min sur glace, puis un choc thermique à 42°C est réalisé pendant 30 secondes. Les aliquots sont replacés sur la glace, puis la suspension est diluée dans 250 µL de milieu SOC et transférée dans un tube vissé. Après une incubation d'1h à 1h30 à 37°C sous agitation, la suspension est étalée sur milieu LB contenant le(s) antibiotique(s) approprié(s) et incubée à 37°C jusqu'à obtention de clones transformants.

II.6 Transformation de *L. pneumophila*

II.6.1 Préparation de bactéries électrocompétentes

La préparation des légionelles électrocompétentes est entièrement réalisée sur glace.
Une suspension bactérienne est préparée à partir de la totalité d'une culture de 72h de *L. pneumophila* sur milieu gélosé dans 20 ml d'eau stérile froide, et la DO_{600} est mesurée. La suspension est centrifugée pendant 20 min à 4000 g, puis le culot bactérien est resuspendu dans 20 mL d'eau froide et centrifugée à nouveau. Le surnageant est éliminé et le culot bactérien resuspendu dans 20 mL d'eau froide additionné de 10% de glycérol et centrifugé à nouveau. Le surnageant est éliminé et le culot bactérien est resuspendu dans 1 mL d'eau stérile froide additionné de 30% de glycérol. La suspension est répartie en aliquots de 50 µL, stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

II.6.2 Transformation

La transformation des légionelles est réalisée sur glace. Les bactéries électrocompétentes sont mises au contact de 1 µg d'ADN transformant. Le mélange est transféré dans une cuve d'électroporation préalablement refroidie, et un courant de 2,5 kV est appliqué. Les bactéries électroporées sont ensuite resuspendues dans la cuve dans 1 mL de BYE et transférées dans un tube de 13 mL. Après 3 à 4h d'incubation à 37°C sous agitation, les bactéries sont étalées sur milieu BCYE contenant le(s) antibiotique(s) approprié(s) et incubées à 37°C jusqu'à obtention de transformants.

II.7 Inactivation du gène *rcp* chez *L. pneumophila*

L'inactivation du gène *rcp* chez *L. pneumophila* Paris et Lens est réalisée par insertion d'une cassette de résistance à la kanamycine (cassette Kcr) par recombinaison homologue. La cassette Kcr est construite en suivant la méthode de PCR « double joint » (DJ-PCR) décrite par Yu *et al.* (Yu *et al.* 2004), consistant en 3 étapes de PCR successives (**Figure 59**).

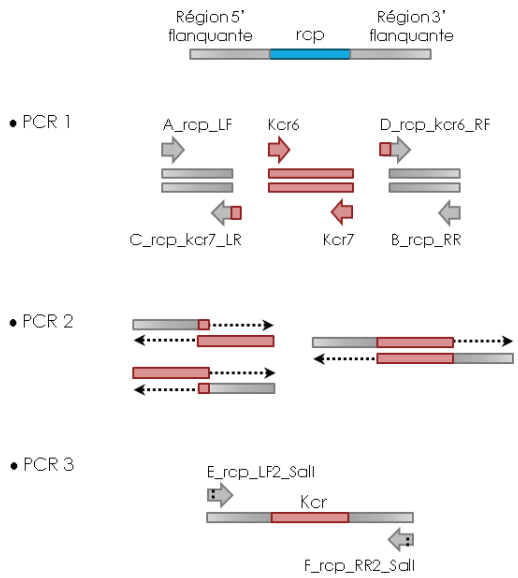


Figure 59. Schéma des étapes de construction du fragment d'inactivation du gène *rcp*.

PCR 1 : amplification des régions flanquantes 5' et 3' du gène rcp WT et de la cassette Kcr
La première étape de PCR est réalisée à partir de l'ADN génomique extrait de la souche Leg089 possédant à la fois le gène *rcp* et la cassette Kcr à différents loci. Trois fragments indépendants de 1866 pb, 1806 pb et 1177 pb sont amplifiés en utilisant les couples d'amorces spécifiques A_rcp_LF/C_rcp_kcr7_LR, D_rcp_kcr6_RF/B_rcp_RR et Kcr6/Kcr7, respectivement. La séquence des amorces est décrite dans le **Tableau 7**.

Tableau 7. Amorces utilisées dans cette étude.

Nom	Utilisation	Séquence (5'-3')	Référence
A_rcp_LF	cassette de délétion *rcp*	GCTGGTGGCTGGAGGATTGTGCATACC	cette étude
B_rcp_RR	cassette de délétion *rcp*	GTTATACCGCCAGTGCAAGCGTCCATG	cette étude
C_rcp_kcr7_LR	cassette de délétion *rcp*	TGTTCCGCTTCCTTTAGCAGACCTTTGCAGGGTTTCTCCCAG	cette étude
D_rcp_kcr6_RF	cassette de délétion *rcp*	AAAAGGAAGAGTATGAGTACTAGCTGCAAAAGGTCATGTG	cette étude
E_rcp_LF2_SalI	cassette de délétion *rcp*	AATTAGTCGACCTTAACACCCTGAAGGGTTGTGCTGCTG	cette étude
F_rcp_RR2_SalI	cassette de délétion *rcp*	CTGCCGTCGACGGTGCATTAACCACGAATGTTG	cette étude
Kcr3	cassette de délétion *rcp*	CGTTTCTGCGGACTGG	cette étude
Kcr4	cassette de délétion *rcp*	CTATCGCCTTCTTGACG	cette étude
Kcr6	cassette de délétion *rcp*	TACTCATACTCTTCC	cette étude
Kcr7	cassette de délétion *rcp*	CTGCTAAAGGAAGCGGAACA	cette étude
Ptac_SalI	complémentation *rcp*	CATTCGAGCTCCTGAATTGACTCTCTTCC	cette étude
rcpParis_ R_ SalI	complémentation *rcp* Paris	GGGTTGTCGACACATGACCTTTTGCAGCTAGC	cette étude
rcpLens_R_SalI	complémentation *rcp* Lens	GAATTGTCGACAGATTATCTTTTGCCATATGC	cette étude

Les amorces C_rcp_kcr7_LR et D_rcp_kcr6_R contiennent en 3' et en 5', respectivement, une extension chimérique homologue à la cassette Kcr. La réaction de PCR est réalisée dans un volume final de 50 µL contenant 5µL d'ADN génomique de Leg089, 0.2 mM de dNTP, 1.5 mM de $MgCl_2$, 0.4 µM de chaque amorce d'un couple et 1 unité de GoTaq polymerase® (Promega, Madison, USA). Le programme de PCR 1 est décrit dans le **Tableau 8**.

Tableau 8. Programme de la PCR 1.

<table>
<tr><th colspan="6">PCR 1</th></tr>
<tr><td colspan="3">Régions 5' et 3' flanquantes du gène rcp</td><td colspan="3">Cassette Kcr</td></tr>
<tr><td colspan="2">Dénaturation initiale</td><td>5 min à 94°C</td><td colspan="2">Dénaturation initiale</td><td>5 min à 94°C</td></tr>
<tr><td rowspan="3">32 cycles</td><td>Dénaturation</td><td>30 sec à 94°C</td><td rowspan="3">32 cycles</td><td>Dénaturation</td><td>30 sec à 94°C</td></tr>
<tr><td>Hybridation</td><td>30 sec à 58°C</td><td>Hybridation</td><td>30 sec à 50°C</td></tr>
<tr><td>Elongation</td><td>2 min à 72°C</td><td>Elongation</td><td>2 min à 72°C</td></tr>
<tr><td colspan="2">Elongation finale</td><td>10 min à 72°C</td><td colspan="2">Elongation finale</td><td>10 min à 72°C</td></tr>
</table>

PCR 2 : fusion des 3 fragments

La deuxième étape de PCR permet l'assemblage des 3 fragments précédemment amplifiés, et ne nécessite pas d'amorces spécifiques, ce rôle étant assuré par les extensions chimériques des amplicons des régions 5' et 3' du gène *rcp*. Un produit de 4771 pb est amplifié par PCR dans un volume final de 25 µL contenant 200 ng de chaque amplicons des régions flanquantes 5' et 3' du gène *rcp*, 600 ng d'amplicons de la cassette Kcr, 0.4 mM de dNTP, 1.5 mM de $MgCl_2$ et 1 unité de GoTaq polymerase® (Promega). Le programme de PCR 2 est décrit dans le **Tableau 9**.

Tableau 9. Programme de la PCR 2.

PCR 2		
Dénaturation initiale		5 min à 94°C
15 cycles	Dénaturation	30 sec à 94°C
	Hybridation	10 min à 53°C
	Elongation	8 min à 72°C
Elongation finale		10 min à 72°C

PCR 3 : amplification du fragment d'invalidation du gène rcp

Cette étape est réalisée à partir du produit de la première PCR 2. Un produit de 4707 pb est amplifié avec les amorces spécifiques E_rcp_LF2_SalI et F_rcp_RR2_SalI. La réaction de PCR est réalisée dans un volume final de 100 µL contenant 1 µL de produit de PCR 2, 0.25 mM de dNTP, 1.5 mM de $MgCl_2$, 0.5 µM de chaque amorces et 1 µL de Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, USA). Le programme de PCR 3 est décrit dans le **Tableau 10**.

Tableau 10. Programme de la PCR 3.

PCR 3		
Dénaturation initiale		30 sec à 98°C
32 cycles	Dénaturation	10 sec à 98°C
	Hybridation	30 sec à 53°C
	Elongation	5 min à 72°C
Elongation finale		10 min à 72°C

Un contrôle négatif est inclus pour chaque réaction d'amplification, afin de s'assurer de l'absence de contamination. Après chaque étape de PCR, la taille des fragments amplifiés est vérifiée sur gel d'agarose et les produits de PCR sont purifiés à l'aide du kit MinElute PCR Purification (Qiagen).

Le fragment d'invalidation du gène *rcp* obtenu par DJ-PCR est digéré par l'enzyme de restriction *SalI* puis cloné dans le plasmide pLAW344 (**Figure 60**) pour générer le plasmide pLEG246. Le plasmide pLEG246 et le fragment d'invalidation du gène *rcp* sont transformés par électroporation dans les souches *L. pneumophila* Lens et Paris, respectivement, en vue d'une recombinaison homologue. Les clones recombinants sont sélectionnés sur gélose BCYE supplémenté avec 20 µg/mL de kanamycin. La présence de la cassette Kcr est vérifiée par PCR nichée en utilisant les couples d'amorces spécifiques A_rcp_LF/Kcr3 et Kcr4/ B_rcp_RR.

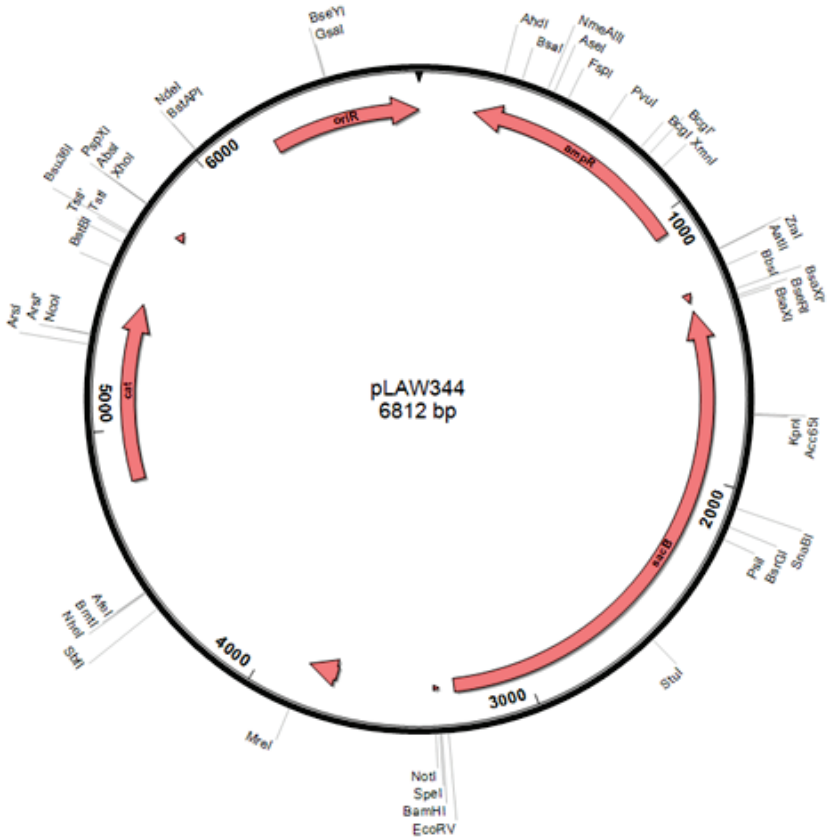


Figure 60. Carte du plasmide pLAW344. *cat* : Chloramphénicol desacétylase (résistance au chloramphenicol). *oriR* : Origine de réplication. *ampR* : gene de résistance à l'ampicilline. *sacB* : Levansucrase.

III. *Evaluation de l'activité des PAMs humains contre* L. pneumophila *en milieu extracellulaire*

III.1 Peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens humains HBD-3 (Peptanova, Sandhausen, Allemagne), LL-37 (Invivogen, Toulouse, France), et LL-37 TAMRA (Innovagen, Lund, Suède) sont décrits dans le **tableau 11**. Les peptides lyophilisés sont reconstitués dans de l'eau distillée stérile à une concentration de 100 µg/ml (HBD-3) ou 1 mg/mL (LL-37) et conservés à -80°C.

Tableau 11. Peptides antimicrobiens utilisés dans cette étude.

Peptide	Séquence protéique
Défensine HBD-3	GIINTLQKYYCRVRGGRCAVLSCLPKEEQIGKCSTRGRKCCRRKK
Cathélicidine LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES
LL-37 TAMRA	5-TAMRA-LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES

III.2 Test de croissance extracellulaire de *L. pneumophila*

Une suspension bactérienne à DO_{600}=0.2 est réalisée en BYE supplémenté ou non en antibiotiques et/ou IPTG selon la souche. La suspension est ensuite répartie en plaque 24 puits à raison de 1 mL/puits ou en plaque 96 puits à raison de 200 µL/puits, puis la plaque est incubée pendant 96h à 37°C dans l'automate TECAN Infinite® M200 PRO. Le suivi cinétique de la croissance des souches est réalisé par mesure de la DO_{600} toutes les 15 min.

III.3 Test de perte de cultivabilité de *L. pneumophila*

Une suspension de *L. pneumophila* à 10^6 UFC/mL est réalisée en milieu CO_2I à partir d'une culture liquide en phase exponentielle et stationnaire de croissance. Cette suspension est traitée avec 10 µg/mL de peptide LL-37 et/ou HBD-3 dans un volume final de 300 µL. Après une incubation de 2h ou 24h à 37°C, les suspensions non traitées et traitées avec HBD-3 sont diluées au 1/200ème et les suspensions traitées avec LL-37 ou les peptides en association sont diluées au 1/5ème. Les dilutions sont ensemencées sur gélose BCYE de façon exponentielle à l'aide de l'automate easySpiral® (Interscience, Saint-Nom-la-Bretèche, France) et incubées 48h à 72h à 37°C. Les colonies sont ensuite comptées à l'aide d'un compteur automatique Scan300® (Interscience).

III.4 Test de perméabilisation de *L. pneumophila*

Une culture de *L. pneumophila* en phase exponentielle ou en phase stationnaire de croissance est centrifugée pendant 5 min à 453 g, puis resuspendue dans du milieu CO_2I à une concentration finale de 10^6 UFC/mL. La suspension bactérienne est traitée avec 10 µg/mL de LL-37 dans un volume de 1 mL, puis incubée à 37°C pendant des temps variables. Afin de réaliser un contrôle positif de perméabilisation, 1 mL de suspension bactérienne est incubée dans de l'éthanol 70° pendant 1h, puis lavée et resuspendue dans du milieu CO_2I. Les bactéries sont ensuite marquées à l'aide du kit Live/Dead BacLight™ Bacterial Viability (Invitrogen, Oregon, USA) selon les recommandations du fournisseur, afin d'évaluer la perméabilisation membranaire. Le marquage repose sur l'utilisation de deux marqueurs d'acide nucléique : le SYTO9 (fluorescent vert, 500 nm) et l'iodure de propidium (IP) (fluorescent rouge, 635 nm). Le SYTO9 pénètre dans toutes les bactéries, tandis que l'IP ne pénètre que dans les bactéries présentant une membrane endommagée. Ces deux marqueurs sont ajoutés à la suspension bactérienne à raison de 1.5 µL chacun. La suspension est incubée pendant 15 min à température ambiante dans l'obscurité puis analysée par cytométrie en flux à l'aide d'un cytomètre BD Accuri C6 (BD Biosciences, Ann Arbor, USA). Au total, 10 000 évènements sont comptés pour chaque suspension et l'acquisition des données est réalisée à l'aide du logiciel BD Accuri C6 Software (BD Biosciences).

III.5 Suivi de la localisation des peptides sur *L. pneumophila*

Le suivi de la localisation des peptides sur *L. pneumophila* est réalisé selon deux méthodes : l'une par microscopie confocale en utilisant un peptide conjugué à un fluorochrome et l'autre par microscopie électronique à transmission après un marquage immunogold des peptides.

Méthode par utilisation d'un peptide conjugué à un fluorochrome :
Une suspension de *L. pneumophila* à 10^6 UFC/mL est réalisée en milieu CO_2I à partir d'une culture liquide en phase exponentielle de croissance. Cette suspension est traitée avec 10 µg/mL de LL-37 TAMRA et 2 µg/mL de DAPI pendant 2h à 37°C sous agitation à 200 rpm. Les bactéries sont ensuite lavées à l'aide de milieu frais puis fixées dans 1 mL de PFA 4% pendant 20 min et concentrées à 10^9 CFU/mL dans du milieu CO_2I. Un volume de 5 µL de la suspension bactérienne concentrée est déposé sur un bloc d'agarose et recouvert d'une lamelle de verre. L'observation des bactéries est réalisée à l'aide d'un microscope LEICA SP5X avec un objectif à immersion 63x et un zoom numérique de 2x et traitement des images est réalisé avec le logiciel ImageJ et Huygens pour la déconvolution.

Méthode par marquage immunogold :

Une culture de *L. pneumophila* en phase exponentielle de croissance est centrifugée pendant 5 min à 453 g, puis resuspendue dans du milieu CO_2I à une concentration finale de 10^8 UFC/mL. La suspension bactérienne est traitée avec 10 µg/mL de LL-37 dans un volume de 1 mL, puis incubée pendant 2h à 37°C sous agitation à 200 rpm. La suspension est ensuite adsorbée sur une grille de nickel recouverte d'un film formvar-C pendant 2 min à température ambiante. Le marquage immunogold est réalisé en déposant la grille sur une goutte des différents réactifs. En premier lieu, les sites non spécifiques sont saturés par incubation dans du PBS-BSA1% à température ambiante. La grille est ensuite exposée à des anticorps primaires de souris dirigés contre LL-37 (Santa Cruz Biotechnology) pendant 2h à température ambiante dans une chambre humide. Après deux lavages au PBS, la grille est incubée dans du PBS-BSA1% en chambre humide, puis mise au contact d'anticorps secondaires anti-souris conjugués à des particules d'or de 10 nm de diamètre (Aurion) pendant 45 min. Après deux lavages au PBS, la grille est observée à l'aide d'un microscope électronique à transmission JEOL JEM1400 (Tokyo, Japon) équipé d'une caméra numérique Orius 600, et l'acquisition des images est réalisée grâce au logiciel Digital Micrograph.

III.6 Evaluation de l'interaction ADN/peptide

Le test de retard de migration électrophorétique a été réalisé en mélangeant environ 250 ng d'ADN génomique extrait de la souche *L. pneumophila* Paris avec différentes concentrations de peptide LL-37, dans du tampon composé de 5% de glycérol, 10 mM de Tris-HCl (pH 8), 1 mM d'EDTA, 1 mM de DTT, 20 mM de KCl et 50 µg/mL de BSA). Le mélange a été incubé pendant 1h à 37°C, puis 5 µL ont été prélevés et déposés sur un gel d'agarose à 1%. La mobilité de l'ADN a ensuite été évaluée par migration électrophorétique.

III.7 Evaluation de la morphologie de *L. pneumophila*

Une culture de *L. pneumophila* en phase exponentielle de croissance est centrifugée pendant 5 min à 453 g, puis resuspendue dans du milieu CO_2I à une concentration finale de 10^8 UFC/mL. La suspension bactérienne est traitée avec 10 µg/mL de LL-37 dans un volume de 1 mL, puis incubée pendant 2h à 37°C sous agitation à 200 rpm. La suspension est centrifugée puis les bactéries sont fixées dans 1 mL de tampon cacodylate 0.1 M (pH 7.4) contenant 2% de glutaraldéhyde pendant 30 min à 4°C. L'échantillon est lavé 3 fois dans un tampon de Na-C-HCl-Cacodylate-HCl 0.2 M contenant 0.4 M de saccharose (pH 7.4) pendant 1h à 4°C, puis post-fixé dans un tampon de Na-C-HCl-Cacodylate-HCl 0.3 M contenant du tétroxyde d'osmium 2% pendant 1h à 4°C. L'échantillon est ensuite déshydraté dans un gradient croissant d'éthanol (pendant 5 min à 30%, 50%, 70%, 95%, 3 fois pendant 10 min à 100%, puis pendant 10 min dans de l'oxyde de propylène). L'inclusion est réalisée à

l'aide de résine EPON, dont la polymérisation s'effectue pendant 72h à 60°C. Une fois la résine polymérisée, des coupes ultra-fines d'environ 70 nm sont réalisées grâce à un ultra-microtome Reichert ultracut E (Leica). Les coupes sont montées sur une grille de cuivre traitée à la polylisine, puis stabilisées pendant 24h à température ambiante. Les coupes sont ensuite colorées à l'aide d'acétate d'uranyl et de citrate de plomb. L'observation des coupes est réalisée à l'aide d'un microscope électronique à transmission JEOL JEM1400 (Tokyo, Japon) équipé d'une caméra numérique Orius 600, et l'acquisition des images est réalisée grâce au logiciel Digital Micrograph.

IV. Evaluation de l'activité des PAMs humains contre *L. pneumophila* en milieu intracellulaire

IV.1 Infection cellulaire

Le jour de l'infection, les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS (Gibco, Paisley, Royaume Uni) afin d'éliminer toute trace de PMA résiduel (pour les U937). Les cellules sont ensuite infectées avec 100 µL d'une suspension bactérienne réalisée en RPMI-SVF2% (A549) ou RPMI-SVF10% (U937) à une MOI adaptée à chaque test, à partir d'une culture sur boite de 48h. La plaque de culture cellulaire est centrifugée pendant 5 min à 453 g afin d'initier le contact entre bactéries et cellules. Après 2 à 4h d'incubation (selon les tests) à 37°C, les cellules sont à nouveau lavées 3 fois avec du PBS, afin d'éliminer les bactéries n'ayant pas adhérées aux cellules.

Les infections peuvent être réalisées selon 3 modalités différentes (**Figure 61**) :

- pré-incubation cellules/peptides : les cellules sont incubées pendant 3h dans du milieu RPMI contenant 10 µg/mL de peptides, puis lavées avant d'être infectées.
- pré-incubation bactéries/peptides : les bactéries sont incubées pendant 1h dans du milieu RPMI contenant 10 µg/mL de peptides, puis lavées avant d'être mises au contact des cellules.
- coincubation : les peptides sont ajoutés au moment de la mise en contact des bactéries avec cellules (pour les tests d'adhésion, internalisation/survie, microscopie) ou après l'infection, dans le milieu CO_2l (pour le suivi de la croissance intracellulaire).

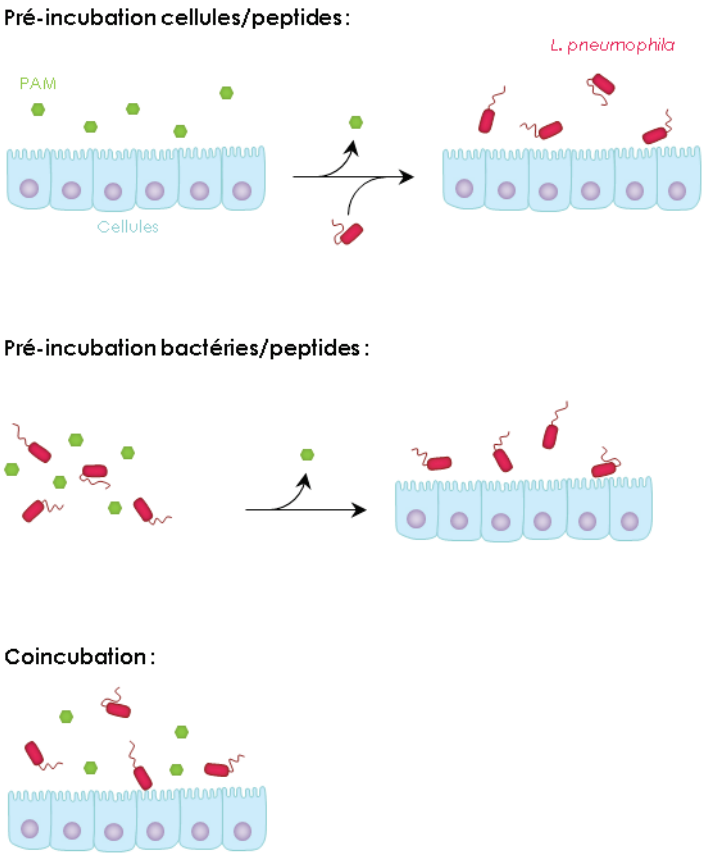


Figure 61. Schéma des différentes modalités d'infection cellulaire.

IV.2 Suivi de la croissance intracellulaire de *L. pneumophila*

Le test de croissance intracellulaire permet d'évaluer l'impact des peptides antimicrobiens sur la capacité de réplication intracellulaire de *L. pneumophila*.

Les cellules A549 et U937 cultivées en plaque 96 puits sont infectées pendant 2h à MOI 10 avec 100 µL d'une suspension de *L. pneumophila* contenant le plasmide pXDC50, portant le gène codant la protéine fluorescente mCherry. Une fois l'infection terminée, l'inoculum est remplacé par 200 µL de milieu CO_2I supplémenté avec 2 mM de L-glutamine, 2% (A549) ou 10% (U937) de SVF, 10 µg/mL de chloramphénicol afin de maintenir le plasmide pXDC50, et 1 mM d'IPTG afin d'induire l'expression de la protéine mCherry. La cinétique de croissance intracellulaire des bactéries est suivie par mesure de la fluorescence de la mCherry (excitation à 580 nm et émission à 620 nm) toutes les heures pendant environ 150h, dans un fluorimètre thermostaté à 37°C (TECAN Infinite® M200 PRO).

IV.3 Suivi de la localisation des peptides dans la cellule hôte

Le suivi de la localisation des peptides au cours de l'infection est réalisé selon deux méthodes : l'une par immunomarquage des peptides et l'autre par utilisation d'un peptide conjugué à un fluorochrome.

Méthode par immunomarquage :
L'immunomarquage et l'observation des lames sont réalisés selon le même protocole que pour le suivi de l'échappement à la voie endosomale, avec quelques modifications. Les cellules sont incubées pendant 3h, et le marquage de LL-37 est réalisé à l'aide d'un anticorps primaire monoclonal de souris dirigé contre LL-37 (Santa Cruz Biotechnology), tandis que le marquage de HBD-3 est réalisé à l'aide d'un anticorps primaire polyclonal de lapin dirigé contre HBD-3 (Santa Cruz Biotechnology), tous deux utilisés à la concentration de 4 µg/mL.

Méthode par utilisation d'un peptide conjugué à un fluorochrome :
L'infection, l'immunomarquage et l'observation des lames sont réalisés selon le même protocole que pour le suivi de l'échappement à la voie endosomale, avec quelques modifications. Les cellules sont infectées pendant 2h à MOI 100 en présence de 25 µg/mL de peptide LL-37 TAMRA, l'étape de perméabilisation n'est pas réalisée, et les bactéries extracellulaires sont marquées à l'aide d'un anticorps primaire de lapin dirigé contre *L. pneumophila* Paris et d'un anticorps secondaire chèvre anti-lapin couplés à l'AlexaFluor ® 647 (Invitrogen, Eugene, USA).

IV.4 Test d'adhésion

L'effet des peptides sur l'adhésion de *L. pneumophila* a été évalué par deux méthodes : la première repose sur la numération des UFC sur milieu gélosé et la seconde par observation microscopique.

Numération des UFC sur milieu gélosé :
Les cellules A549 et U937 cultivées en plaque 96 puits sont infectées pendant 2h à MOI 10 avec 100 µL d'une suspension de *L. pneumophila*, puis lavées avec 100 µL de PBS et lysées par choc osmotique à l'aide de 100 µL d'eau stérile froide. Les lysats cellulaires sont ensuite dilués au 1/100ème puis ensemencés sur gélose BCYE de façon exponentielle à l'aide de l'automate easySpiral®. Les boites sont incubées pendant 48h à 72h à 37°C, puis les UFC obtenues sont dénombrées à l'aide du compteur automatique Scan® 300.

Observation microscopique :
Les cellules A549 et U937 cultivées en Lab-Tek® 16 puits sont infectées pendant 2h à MOI 100 avec 100 µL d'une suspension de *L. pneumophila* contenant le plasmide pXDC31, portant le gène codant la protéine fluorescente verte GFP. Une partie des cellules est infectée avec une suspension de bactéries préalablement tuées par incubation de 30 min dans du

paraformaldéhyde (PFA) 4%, puis lavées 2 fois avec de l'eau stérile. Après l'infection, les cellules sont lavées puis fixées avec 100 µL de PFA 4% pendant 30 min à 37°C. Les cellules sont à nouveau lavées, puis marquées avec 50 µL de 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) dilué à 0.3 µg/mL dans du PBS. La chambre 16 puits est placée sous agitation douce dans l'obscurité pendant 30 min à température ambiante, puis les cellules sont lavées 2 fois avec 100 µL de PBS. La chambre 16 puits est délicatement retirée et une lamelle de verre est fixée sur la lame à l'aide du gel de fixation Fluoprep (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France). L'observation de la lame et l'acquisition des images est réalisées à l'aide d'un microscope Zeiss Axiovert 200M avec un objectif X100. Le traitement des images est réalisé à l'aide du logiciel ImageJ.

IV.5 Test d'internalisation/survie

Une parties des cellules A549 et U937 cultivées en plaque 96 puits est traitées avec 100 µL de cytochalasine D (Sigma) à 5 µg/mL pendant 1h à 37°C, afin de fournir un témoin d'internalisation négatif. Toutes les cellules sont ensuite lavées puis infectées pendant 2h à MOI 10 avec 100 µL d'une suspension de *L. pneumophila*. Après deux lavages au PBS, les cellules sont traitées avec 100 µL de gentamycine à 200 µg/mL pendant 2h à 37°C afin de tuer les bactéries extracellulaires uniquement. Les cellules sont à nouveau lavées, puis lysées par choc osmotique à l'aide de 100 µL d'eau stérile froide. Le lysat de cellules A549 est directement repris et étalé sur milieu gélosé BCYE, tandis que le lysat de cellules U937 est dilué au 1/100ème puis ensemencés sur gélose BCYE de façon exponentielle à l'aide de l'automate easySpiral®. Les boites sont ensuite incubées 48h à 72h à 37°C. Les UFC obtenues sont comptées manuellement (A549) ou à l'aide du compteur automatique Scan® 300 (U937).

IV.6 Suivi de l'échappement à la voie endosomale

Le suivi de l'échappement à la voie endosomale est réalisé par immunomarquage la protéine membranaire lysosomale LAMP-1. Les cellules A549 et U937 cultivées en Lab-Tek® 16 puits sont infectées en coincubation avec les peptides pendant 4h à MOI 100 avec 100 µL d'une suspension de *L. pneumophila* contenant le plasmide pXDC31. Une partie des cellules est infectée avec une suspension de bactéries préalablement tuées par incubation de 30 min dans du PFA 4%, puis lavées 2 fois avec de l'eau stérile. Après l'infection, les cellules sont lavées puis fixées avec 100 µL de PFA 4% pendant 30 min à 37°C. Les cellules sont lavées avec 100 µL de PBS supplémenté avec 3% d'albumine de sérum bovin (BSA), perméabilisées à l'aide de 100 µL de Triton X-100 à 0.01% pendant 15 min à 4°C, puis bloquées avec 100 µL de PBS-BSA3% pendant 1h à température ambiante. Les cellules sont incubées avec 50 µL d'anticorps primaires de souris dirigés contre LAMP-1 à 2 µg/mL (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) pendant 1h sous agitation douce, puis lavées 3 fois au PBS-BSA3%. Les cellules sont ensuite incubées avec 50 µL d'une solution d'anticorps secondaires chèvre anti-

souris couplés à l'AlexaFluor ® 546 à 1 µg/mL (Invitrogen, Eugene, USA) et de DAPI à 0.3 µg/mL pendant 30 min dans l'obscurité sous agitation douce, puis lavées. La chambre 16 puits est délicatement retirée et une lamelle de verre est fixée sur la lame à l'aide du gel de fixation Fluoprep. L'observation de la lame est réalisée à l'aide d'un microscope LEICA SP5X avec un objectif à immersion 63x et un zoom numérique de 2x. Le traitement des images est réalisé à l'aide du logiciel ImageJ.

IV.7 Suivi du recrutement du réticulum endoplasmique

Le suivi de l'échappement à la voie endosomale est réalisé par immunomarquage de la calnexine, une protéine transmembranaire du réticulum endoplasmique (RE). L'infection, l'immunomarquage et l'observation des lames sont réalisés selon le même protocole que pour le suivi de l'échappement à la voie endosomale, à la différence que l'anticorps primaire de souris est dirigé contre la calnexine (Santa Cruz Biotechnology).

V. *Statistiques*

Pour les tests de perte de cultivabilité, les différences les traitements ont été comparées par un test t de Student pour échantillons appariés. Une *p value* inférieure à 0,05 est considérée comme représentante d'une différence statistique significative. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Graphpad. Pour les tests d'adhésion et d'internalisation, les différences entre les traitements ont été comparées par un test de rangs signés de Wilcoxon pour échantillons appariés. Une *p value* inférieure à 0,05 est considérée comme représentante d'une différence statistique significative. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R.

Résultats

I. *Etude de la sensibilité aux antibiotiques de souches cliniques de L. pneumophila*

Afin d'évaluer la sensibilité aux antibiotiques de *L. pneumophila*, une stratégie basée sur la détermination de la CMI par une méthode de microdilution en milieu liquide a été mise en place au CNR des légionelles. Dans notre étude, les CMI de 8 antibiotiques (ciprofloxacine, moxifloxacine, lévofloxacine, érythromycine, azithromycine, clarithromycine, doxycycline et rifampicine) communément utilisés pour traiter la légionellose ont été déterminées pour 109 isolats cliniques de *L. pneumophila* sérogroupe 1 caractérisés lors de précédents travaux (Chidiac *et al.* 2012). La sensibilité de ces isolats a été analysée par comparaison avec la CMI de souches résistantes aux antibiotiques sélectionnées *in vitro*, incluant 12 souches résistantes aux macrolides et 7 souches résistantes aux fluoroquinolones dont les mécanismes moléculaires ont été caractérisés (Almahmoud *et al.* 2009; Descours *et al.* 2016), ainsi que 10 souches résistantes à la rifampicine sélectionnées dans cette étude. Les résultats ont montré que l'ensemble des isolats cliniques sont sensibles à tous les antibiotiques testés. Cependant, la distribution des CMI révèle l'existence d'une sous-population de souches présentant une sensibilité réduite aux macrolides, et plus particulièrement à l'azithromycine. Massip *et al.* ont récemment démontré le rôle d'une pompe à efflux (LpeAB) spécifique des macrolides chez la souche de référence Paris (Massip *et al.* soumis en 2016). L'analyse des génomes des 109 souches a permis de montrer que toutes les souches et uniquement les souches de la sous-population présentant une sensibilité réduite aux macrolides possèdent la pompe LpeAB. La distribution de la présence des gènes *lpeAB* dans 701 *L. pneumophila* (vérifiée *in silico* sur 269 génomes et par PCR sur 432 isolats) montre que la pompe est présente dans 3 complexes clonaux centrés sur le ST1, le ST701 et la ST1335.

Ces travaux ont conduit à la rédaction d'un article soumis au journal *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Cet article est présenté ci-dessous.

MIC distribution among wild-type strains of *Legionella pneumophila* identify a subpopulation with reduced susceptibility to macrolides owing to genes coding for an efflux pump

Running title: *L. pneumophila* WT MICs and macrolides efflux

Marine VANDEWALLE-CAPO[1], Clémence MASSIP[1], Ghislaine DESCOURS[1,2], Joséphine CHARAVIT[2], Joelle CHASTANG[2], Pierre Alain BILLY[2], Sandrine BOISSET[3], Gerard LINA[1,2], Max MAURIN[3], Sophie JARRAUD[1,2] and Christophe GINEVRA[1,2]

[1]International Center for Infectiology Research, Université Lyon 1, UMR CNRS 5308, U1111 Inserm, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, F-69008, France

[2]National Reference Center of *Legionella*, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

[3]Grenoble Alpes University, TIMC-IMAG, CNRS/UGA, UMR 5525, Institut Jean Roget, Campus Santé, F-38700 La Tronche, France

Abstract

Legionnaires' disease is a severe pneumonia mainly caused by *Legionella pneumophila*. Its treatment requires the use of antibiotics. The purpose of this study was to describe the susceptibility of clinical strains of *Legionella pneumophila* to seven antibiotics used for legionellosis treatment. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of 109 well-characterized clinical strains of *L. pneumophila* serogroup 1 were determined using a broth microdilution method without charcoal and compared to antibiotic-resistant strains selected *in vitro*. All strains were inhibited by low concentrations of fluoroquinolones, macrolides, and rifampicin. The epidemiological cut-off values (ECOFFs) were 0.064 mg/L for ciprofloxacin, 0.064 mg/L for moxifloxacin, 0.032 mg/L for levofloxacin, 1 mg/L for erythromycin, 2 mg/L for azithromycin, 0.064 mg/L for clarithromycin, 2 mg/L for doxycycline, and 0.001 mg/L for rifampicin. However, MIC distributions revealed a subpopulation of strains displaying a reduced susceptibility to some macrolides (especially to azithromycin) which correlated with the presence of the *lpeAB* genes encoding a macrolide efflux pump found specifically in the sequence types (ST) ST1, ST701, and closely related STs. Thus all isolates could be considered susceptible to the tested antibiotics, although the macrolides were less active against some strains harbouring a specific efflux system.

Key words

Legionella pneumophila, antibiotics, susceptibility, azithromycin, ST1, efflux pump, LpeAB

Introduction

Legionella species are ubiquitous environmental bacteria commonly found as an intracellular parasite of amoebae of freshwater and soil, and few species are pathogenic for humans. *Legionella pneumophila* is, however, responsible for 90% of Legionnaire's disease (LD) cases worldwide [1]. Although 16 serogroups of *L. pneumophila* have been identified, serogroup 1 (Lp1) causes approximately 85% of culture-confirmed cases [2]. Human contamination occurs after inhalation of contaminated aerosol droplets from natural or man-made water systems. Once the pulmonary alveoli are reached, the bacterium is able to enter and replicate within macrophages and pneumocytes, possibly leading to a severe pneumonia known as Legionnaires' disease (LD) [3,4]. Antimicrobial therapy for LD is based on the use of antibiotics able to reach high intracellular concentrations, such as macrolides, fluoroquinolones, and rifampicin. Macrolides (especially azithromycin) and the fluoroquinolones are recommended as first-line treatment of LD, because of their efficiency against intracellular *L. pneumophila in vitro*, but also *in vivo* in a guinea pig model of infection [5-8]. However, despite early administration of an appropriate antibiotic, treatment failures are still reported and mortality rates remains high (approximately 10%, and up to 30% in immunocompromised persons) [9-11]. Several studies have shown that acquired resistances to macrolides, fluoroquinolones, or rifampicin in *L. pneumophila* can be easily selected *in vitro* [12-14]. As for fluoroquinolones, one resistant strain was recently isolated in a legionellosis patient treated with ciprofloxacin, and fluoroquinolone-resistant mutants were also detected *in vivo* in two other patients [15-17]. As a result, there is an urgent need to further evaluate the prevalence of fluoroquinolone resistance among clinical strains of *L. pneumophila*, and to monitor the emergence of resistances to other clinically useful antibiotics in LD patients.

In this study, we aimed to evaluate the antibiotic susceptibility of well-characterized clinical strains of Lp1 isolated from LD cases of variable severity, taking antibiotic-resistant strains selected *in vitro* as controls.

Materials and methods

Bacterial strains and culture conditions

Lp1 Paris (CIP107629T; wild-type) was used as a reference as it is an endemic strain worldwide [18]. From this parental strain, seven fluoroquinolone-resistant strains and twelve macrolide-resistant strains selected under moxifloxacin and erythromycin or azithromycin pressure, respectively, were obtained in a biosafety level 3 laboratory to prevent the spread of antibiotic-resistant strains [13] (G. Descours *et al.* submitted for publication; Table 1). The *L. pneumophila* strain Paris deleted for *dotA* was used to select rifampicin-resistant strains.

Deletion of *dotA* gene abolished the ability of bacteria to infect cells, allowing experimentations in a biosafety level 2 laboratory.

A total of 541 wild-type isolates of *L. pneumophila* were tested in this study, including 109 well-characterized Lp1 clinical strains collected from April 2006 to June 2007, during a study characterizing factors associated with hospital mortality in community-acquired LD cases in France [19]; and 432 clinical (n=360) and environmental (n=72) *L. pneumophila* isolates from the collection of the French National Reference Centre for *Legionella* comprising 119 different STs (Supplementary table S1). Among the 523 Lp1 strains, 67 were ST1, 28 were single-locus variants (SLV), 11 double-locus variants (DLV) and 7 triple-locus variants (TLV) of ST1. Six were ST701, 1 was a SLV, 3 were DLV and 9 were TLV of ST701.

Bacterial strains were either grown in: 1/ N-(2-acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid (ACES)-buffered yeast extract (BYE) broth at 35°C, without agitation, in an aerobic atmosphere; or 2/ on buffered-charcoal-yeast extract (BCYE) agar medium (Oxoid, Dardilly, France), at 35°C, in a 2.5% CO_2-enriched atmosphere.

Antibiotics

Eight antibiotics were tested: azithromycin, erythromycin, clarithromycin, rifampicin, doxycycline (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France), moxifloxacin, ciprofloxacin (Bayer, Puteaux, France), and levofloxacin (Sanofi, Gentilly, France). Antibiotics were prepared as 64 g/L stock solutions and stored at -20°C, according to the manufacturers' recommendations.

***Selection of rifampicin-resistant strains of* L. pneumophila**

Selection of 48 independent rifampicin-resistant strains of Lp1 Paris Δ*dotA* was performed as described by Nielsen *et al.* [14] with minor modifications. Briefly, rifampicin-resistant mutants were obtained by culturing an inoculum of 10^9 CFU on BCYE plate containing 15 mg/L rifampicin. Plates were incubated at 35°C in a 2.5% CO_2-enriched atmosphere.

rpoB *gene amplification and sequencing*

As the most common rifampicin resistance mechanisms involve mutations in RNA polymerase subunit *rpoB* gene [14,20] (G. Descours *et al.* submitted for publication), this gene was analysed by PCR and sequenced in the 48 rifampicin-resistant strains selected *in vitro*.

Genomic DNA was extracted from the Lp1 Paris Δ*dotA* and the 48 rifampicin-resistant strains selected *in vitro*, using a thermolysate method. Briefly, to produce the thermolysate, a colony was picked and resuspended in 250 µL distilled water, incubated for 15 min at 100°C, centrifuged at 15,000 rpm for 3 min, and the cell pellet was then removed.

A PCR product of 2303 bp was generated using the specific primers of *rpoB* gene, Rpl_F (5'-GAAGAAGCTGGTGCTACAGTAGA-3') and Rif_D3_R (5'-ATCAGATGCAACGATTCTTTCC-3'), as

previously described [21]. PCR was performed in a total volume of 50 µL containing 10 µL of DNA thermolysate, 1mM dNTP, 10mM $MgCl_2$, 0.4 µM of each primer, and 1U of GoTaq polymerase® (Promega, Madison, USA). Amplicons were checked by agarose gel-electrophoresis. Double strand DNA sequencing was performed by Beckman Coulter Genomics (Villepin, France) using the same primers.

MIC determination

Minimal inhibitory concentrations (MICs) of the antibiotics tested were determined using microtiter plate assays as described previously (G. Descours *et al.* submitted for publication). Briefly, each strain of *L. pneumophila* was re-suspended from plates in BYE broth to a concentration of 0.5 Mac Farland and then distributed into 96-wells microtiter plates (BD Falcon™, Becton Dickinson, Le Pont-de-Claix, France) at 160 µL per well. Forty microliters of antibiotic suspensions were added with increasing two-fold concentrations, ranging from 0.015 to 16 mg/L for erythromycin and azithromycin, 0.0005 to 0.512 mg/L for moxifloxacin, ciprofloxacin, levofloxacin, and clarithromycin, 0.06 to 64 mg/L for doxycycline, and 0.00006 to 0.064 mg/L for rifampicin. The MICs corresponded to the lowest antibiotic concentrations for which no visible growth of *L. pneumophila* was detected after 48 h of incubation at 35°C. MIC_{50} and MIC_{90} levels were defined as the lowest concentration of the antibiotic at which 50 % and 90 % of the isolates were inhibited, respectively. The wells containing 200 µL of BYE broth or bacterial suspension without any antibiotic were respectively used as negative and positive growth controls. MICs of Lp1 Paris were also determined as controls. The number of isolates that had particular MICs was plotted to obtain a distribution curve. The epidemiological cut-off values for resistance (ECOFFs) breakpoints were determined according to EUCAST methodology as the upper limit of the curve for the majority of the population and expressed as WT ≤ X mg/L [22].

PCR amplification of* lpeAB *genes

PCR screening assays were used for detection of the *lpeAB* genes in the 432 clinical and environmental *L. pneumophila* strains. Genomic DNA were extracted from 72-hour cultures on BCYE using QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's recommendations. A PCR product of 359 bp overlapping *lpp2879* and *lpp2880* genes was generated using the specific primers lpp2879_detec_F2 (5'-GTGATGATTGTCTTATTGGTGCGA-3') and lpp2879_detec_R3 (5'-ATGGCGTTTAAGATGATGGTGATT-3'). PCR were performed using LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I system (Roche, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Bioinformatics

The presence of the *lpeAB* genes was investigated by tBLASTn in 160 published *L. pneumophila* genomes for which ST data were available, including 151 genomes described by David *et al.* 2016 [23].

Phylogenetic cluster analyses were performed by defining minimum spanning trees based on sequence-based typing (SBT) allele data using The Bionumerics software 7.1 (Applied Math, St Martens Latem, Belgium).

Accession number

WG sequences were deposited in the European Nucleotide Archive (ENA) under the accession number PRJEB15241.

Results

Selection of rifampicin-resistant strains

Culture of Lp1 Paris Δ*dotA* on BCYE containing 15 mg/L rifampicin resulted in growth of more than 200 spontaneous rifampicin-resistant colonies, the mutation rate being estimated at 2.10^{-8}. PCR amplification and sequencing of *rpoB*, the gene coding for the sub-unit B of RNA polymerase, were performed on 48 randomly-selected colonies. The DNA sequence of the parental strain Lp1 Paris Δ*dotA* and that of the rifampicin-resistant strains were compared to identify potential mutations. Eight point mutations producing amino acid substitutions at five independent positions were detected. All rifampicin-resistant strains presented only a single point mutation (Val159Phe, Ser537Thr, Ser537Phe, His541Tyr, His541Asp, His541Arg, or Asp531Val), with the exception of one strain that presented two mutations (Val159Phe and Val158Phe). Among these 48 strains, 10 strains (Rif1-10) representative of each mutation were selected for susceptibility assays (Table 1).

Antibiotic susceptibility

Antibiotic susceptibility testing was performed for the 109 well-characterized clinical strains of Lp1, and results were compared to those of the Lp1 Paris (which is known to be susceptible to all antibiotics) and to those of antibiotic-resistant strains selected *in vitro*. Overall, the MIC range for clinical strains was very close to the MIC values of the Paris strain for all the antibiotics tested (Table 2). Doxycycline MIC ranged from 0.12 to 2 mg/L (MIC_{50} and MIC_{90} values were 1 and 2, respectively). Rifampicin MICs ranged from 0.00012 to 0.001 mg/L, (MIC_{50} and MIC_{90} values of 0.0005 mg/L). These rifampicin MICs were at least 500 times lower MICs of rifampicin resistant strains (ranging from 0.5 to 64 mg/L; Figure 1), suggesting that all clinical strains could be considered susceptible to rifampicin. Moxifloxacin MICs ranged from 0.008-0.064 mg/L (MIC_{50} and MIC_{90} values were both 0.032 mg/L), ciprofloxacin MICs ranged from 0.008-0.064 mg/L (MIC_{50} and MIC_{90} values were 0.016 and 0.032 mg/L, respectively) and

levofloxacin MICs ranged from 0.004-0.032 mg/L (MIC_{50} and MIC_{90} values were 0.016 and 0.032 mg/L, respectively; Table 2). MICs of these 3 fluoroquinolones were 2 to 4 times lower than the low-level fluoroquinolone-resistant strain L1P4 (MICs ranged from 0.128 to 0.25 mg/L; Figure 1) and were 62.5 to 125 times lower than high-level fluoroquinolone-resistant strains (MICs ranged from 4 to 8 mg/L; Figure 1) suggesting that all clinical strains could be considered susceptible to fluoroquinolones. Azithromycin MICs ranged from 0.004-2 mg/L (MIC_{50} and MIC_{90} values were 0.06 and 0.05 mg/L), clarithromycin MICs ranged from 0.004-0.064 mg/L (MIC_{50} and MIC_{90} values were both 0.032 mg/L) and erythromycin MICs ranged from 0.03-1 mg//L (MIC_{50} and MIC_{90} values were 0.125 and 0.5 mg/L, respectively; Table 2). MICs of these 3 macrolides were 16 to 1024 lower than MICs of resistant strain (MICs ranged from 32-2048 mg/L; Figure 1), suggesting that clinical strains could be considered susceptible to macrolides.

For clinical strains of *L. pneumophila*, the range of MICs for macrolides was wider than for other antibiotics. In particular, the MIC range was broader for azithromycin and seemed to follow a bimodal distribution with peaks at 0.06 mg/L and 0.5 mg/L. This pattern suggested the existence of a subpopulation displaying reduced susceptibility to azithromycin, and to a lesser extent to erythromycin.

The ECOFFs were determined to be 0.064 mg/L for ciprofloxacin, 0.064 mg/L for moxifloxacin, 0.032 mg/L for levofloxacin, 2 mg/L for azithromycin, 1 mg/L for erythromycin, 0.064 mg/L for clarithromycin, 0.001 mg/L for rifampicin, and 2 mg/L for doxycycline.

Correlation between MIC and ST

Phylogenetic cluster analysis was performed on the 109 well-characterized clinical strains of Lp1 to identify a potential correlation between azithromycin MIC and the previously described ST of strains [19]. Clustering of clinical strains according to their ST showed that only ST701, ST259 (a TLV of ST701) and the clonal complex composed of ST1, ST6, and ST177 were associated with the highest azithromycin MICs, as determined in susceptibility assays (ranging from 0.25 to 2 mg/L; Figure 2A). These results demonstrated that the population with reduced azithromycin susceptibility was restricted to a small subset of STs.

Evaluation of lpeAB genes distribution

Recently, *lpeAB* genes were shown to encode components of a tripartite efflux pump implicated in resistance to some macrolides in *L. pneumophila* (C. Massip *et al.* submitted for publication). As we suspected this mechanism to be responsible for the reduced susceptibility to azithromycin, the distribution of these genes was investigated in the draft genomes available for the 109 well-characterized clinical strains. A phylogenetic cluster analysis was performed to identify a potential correlation between the efflux pump and the ST of the strains. Clustering of clinical strains according to their ST showed that the *lpeAB* genes were

only detected in ST701, ST259 and the clonal complex composed of ST1, ST6 and ST177 (Figure 2B), previously associated to the highest azithromycin MICs.

The distribution of *lpeAB* genes was then evaluated by PCR amplification in a larger collection of 432 clinical and environmental isolates, previously genotyped by SBT. Once again, *lpeAB* genes were only detected in ST1 and ST701 (and all close STs tested such as ST6, ST7, ST177, ST2046, ST2130, and ST2116, ST194, ST259, ST231, respectively; Figure 3 and Supplementary Table). Identification of these genes in *L. pneumophila* genome databases (for which ST data were available) confirmed the specificity of the efflux pump for ST1 and related STs (SLV & DLV). No ST701, 259 or related to these STs were present in these databases. The genomes analyses highlighted a 3rd cluster of 4 isolates positive for the efflux pump composed of 2 related STs (ST 1335 and 1395), all of which were *L. pneumophila* subsp. *pascullei*.

Discussion

In this work, we determined the MIC distribution of clinical isolates of *L. pneumophila* to macrolides, fluoroquinolones, doxycycline, and rifampicin. To this end, 109 well-characterized clinical strains of Lp1 were subjected to antibiotic susceptibility testing. While no resistance was observed towards the eight antibiotics tested, we identified a subpopulation of isolates displaying reduced azithromycin susceptibility. Phylogenetic analysis suggested that this decreased sensitivity was due to a macrolide efflux pump encoded by *lpeAB* genes, likely specific of ST1, ST701, ST1335 and closely related STs.

In clinical practice, antibiotic susceptibility testing is almost never performed on *L. pneumophila* isolates as it is assumed that it should always be sensitive to antibiotics used for treatment. However, in 2015, the *in vivo* selection of fluoroquinolone resistance mutations was demonstrated in two LD patients treated with these antibiotics using deep-sequencing approaches [17]. Moreover, a ciprofloxacin-resistant *L. pneumophila* strain was isolated from a respiratory specimen collected from a LD patient treated with this antibiotic [16]. These two descriptions promote susceptibility testing use for clinical *L. pneumophila* isolates associated with treatment failures. Several methods have been used to study *Legionella* antibiotics susceptibility but none of these methods is considered a gold standard. We propose herein, by using a broth microdilution method, an overall study of the distribution of antibiotic MICs in 109 clinical isolates of *L. pneumophila* comprising 40 different STs in parallel; 29 antibiotic-resistant *L. pneumophila* strains with resistance mechanisms characterized at molecular level were used as controls.

Since antibiotic resistance in *L. pneumophila* has been rarely reported, there are no established breakpoints for susceptibility. To this end, Fluoroquinolone-, macrolide-, and rifampicin resistant strains selected *in vitro* were used. Fluoroquinolone- and macrolide-

resistant strains have been described in previous studies [13] (G. Descours *et al.* submitted for publication). Spontaneous rifampicin-resistant strains were selected *in vitro* for this study.
The mutation rate for rifampicin resistance was approximately 2.10^{-8}, which is consistent with that reported in the literature [14]. In many bacteria, single point mutations in RNA polymerase subunit *rpoB* gene can result in rifampicin resistance. This gene is highly conserved and can be divided in four resistance clusters (N-terminal cluster, and clusters I to III) and mutations mostly occur in cluster I [25]. In the present study, sequencing of *rpoB* gene revealed eight single or double amino acid substitutions at five independent positions. To our knowledge, Val159Phe substitution is the first reported mutation in N-terminal cluster of *rpoB* gene in *Legionella*. Among the 48 sequenced strains, only one harboured a double mutation (Val158Phe/Val159Phe). However, the rifampicin MIC of this strain was the same as that of the strain harbouring the single mutation Val159Phe. It is likely that the Val158Phe substitution was not involved in rifampicin resistance, especially as this mutation has never been described in *Legionella* or in other bacterial species [14]. All other mutations detected were located in cluster I of *rpoB* gene, the most frequent being His541Tyr (23/48 strains). Predominance of His541Tyr substitution was even more pronounced in rifampicin-resistant strains selected by Nielsen *et al.* (12/14 strains) [14]. We also identified five new substitutions in cluster I: Asp531Val, Ser537Thr, His541Leu, His541Asp, and His541Arg. Overall, MIC values of spontaneous rifampicin-resistant strains from this study were lower than those obtained by Nielsen *et al.*, as rifampicin MIC for a given mutation (His541Tyr) varied from 16 mg/L in our study to >256 mg/L in the Danish study [14]. However, this discrepancy may be related to different MIC assays and Lp1 strains used in these studies.

MICs of the 109 clinical strains were also compared to those of macrolide- and fluoroquinolone-resistant strains selected *in vitro* in previous studies [13] (G. Descours *et al.* submitted for publication). MICs of the macrolide-resistant strains harboring at least mutations in the 23S rRNA *rrl* genes ranged from 32 to 2048 mg/L for azithromycin, 1024 to 2048 mg/L for erythromycin, and 64 to 512 mg/L for clarithromycin (G. Descours *et al.* submitted for publication). MICs of fluoroquinolone-resistant strains varied according to the mutation(s). Indeed, a single mutation in the *gyrA* gene induced a low-level resistance to fluoroquinolones, whereas combined mutations in *gyrA* and *parC*, or in *parC* and *gyrB* induced high-level resistances. This observation is in accordance with the results obtained by Almahmoud *et al.*, although MICs values differ because of different methodologies for MIC determination [13].

The present study found that all Lp1 clinical isolates analyzed were susceptible to the antibiotics commonly used in LD treatment. This result is in agreement with several studies that demonstrated the absence of drug resistance in *L. pneumophila* strains isolated from patients

or water systems [15,24,27,29]. As expected, for a given antibiotic, MIC values obtained in this study were close to those described in previous studies using the same methodology [15,24]. Despite different methodologies, we observed a broader MIC distribution for macrolides when compared to other antibiotic families, as previously reported by Bruin *et al.* [27]. Azithromycin MIC distribution was particularly wide, covering 3 to 4 more dilutions than fluoroquinolones, doxycycline or rifampicin MICs. Furthermore, the azithromycin MIC range (0.015-2 mg/L) was consistent with the results of a previous study using broth dilution method that investigated the *in vitro* activity of azithromycin on 196 clinical Lp1 isolates collected in Canada [29]. The authors observed a bimodal distribution of MICs, showing that ST1 isolates were associated with reduced azithromycin susceptibility. Interestingly, the azithromycin susceptibility assays herein revealed a very similar profile of MIC distribution, characterized by two MIC peaks (0.06 mg/L and 0.5 mg/L). Likewise, phylogenetic analysis showed that the highest azithromycin MICs were predominantly associated to ST1, ST701 and closely related STs. Taken together, these results strongly suggested the presence of a resistance mechanism specific to these STs.

In this study, we demonstrated that the reduced azithromycin susceptibility of ST1, ST701 and closely related STs strains was linked to the presence of the *lpeAB* genes. The role in azithromycin, spiramycin and erythromycin resistance of the efflux pump (driven by protomotrice force) encoded by these genes was recently described by Massip *et al.* (C. Massip *et al.* submitted for publication). Regarding their specific distribution, LpeAB may explain the reduced susceptibility of ST1 and ST52 (ST1 single allele variant) strains observed in the Canadian study. To identify the mechanism involved in reduced azithromycin susceptibility, Mallegol *et al.* examined targets and mechanisms known to be involved in macrolide resistance in other bacteria (mutations in 23S rRNA *rrl* genes, riboproteins L4 and L22 genes, presence of methylase genes…) but none of these were detected in the 196 isolates [29]. Implication of LpeAB had not been considered, as it was not known to be involved in macrolide resistance until its recent description by Massip *et al.* (C. Massip *et al.* submitted for publication).

The role of LpeAB in reduced susceptibility to azithromycin observed in this work and in the Canadian study is also supported by MIC assays performed by Massip *et al.* on a *lpeAB* knockout strain (C. Massip *et al.* submitted for publication). Indeed, it has been shown that the mutation of *lpeAB* genes in a wild-type Paris strain decreased azithromycin MIC from 0.5 to 0.032 mg/L. These MIC values closely match with the two MIC peaks (0.5 mg/L and 0.06 mg/L) observed in the azithromycin susceptibility assays, corresponding to ST1, ST701 and closely related STs strain population, and to the other ST strain population, respectively.

Mutations in genes encoding the ribosomal proteins L4 and L22 and the 23S rRNA are known to be responsible for variable resistance levels to macrolides in many pathogens, including

L. pneumophila (G. Descours *et al.* submitted for publication). To ensure that the decreased azithromycin susceptibility observed in MIC assays was not due to these types of mutation, we analyzed *rplD*, *rplV*, and *rrl* genes from the 109 clinical strains using whole genome sequencing data available in our laboratory (data not shown). No mutation was detected in the screened genes, which strengthens the belief that LpeAB efflux pump is responsible for the reduced azithromycin susceptibility.

Conclusion

In the present study, Lp1 clinical strains did not display any *in vitro* resistance toward the tested antibiotics, in agreement with previously published data. Interestingly, we observed a subpopulation of strains displaying a reduced susceptibility to azithromycin. Phylogenetic analysis allowed us to correlate this phenotypic trait to the presence of the *lpeAB* genes encoding a macrolide efflux pump, which seems specific of ST1, ST701 and closely related STs. Analysis of genome databases and PCR testing confirmed the clonal distribution of this efflux pump in these two clusters, and highlighted its presence in a third cluster composed of *L. pneumophila* subsp. *pascullei*.

Although drug resistance had never been detected so far in clinical or environmental samples until 2014, the recent isolation of a fluoroquinolone-resistant strain from a LD patient warrants further monitoring of the emergence and prevalence of drug resistance in *L. pneumophila*.

Acknowledgments

The genomes sequenced in this study were funded by the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) grant N° DBI20131228568.

We thank Dr Philip Robinson (DRCI, Hospices Civils de Lyon, France) for help in manuscript preparation.

Table 1. Antibiotic-resistant strains used and selected in this study

Strain	Mutated gene(s) (Nucleotide or amino acid change)	Antibiotic used for resistance selection	Source
L1P4	*gyrA* (T83I)	Moxifloxacin	[13]
L1P6	*gyrA* (T83I), *parC* (G78D)	Moxifloxacin	[13]
L2P6	*gyrA* (T83I), *parC* (S80R)	Moxifloxacin	[13]
L6P9	*gyrA* (T83I, D87N), *parC* (G78D)	Moxifloxacin	[13]
L4P12	*gyrA* (T83I), *gyrB* (S464Y), *parC* (G78D)	Moxifloxacin	[13]
L5P9	*gyrA* (T83I), gyrB (D426N), *parC* (G78D)	Moxifloxacin	[13]
L5P10	*gyrA* (T83I, D87N), gyrB (D426N), *parC* (G78D)	Moxifloxacin	[13]
Ery1	*rrl* (G2057A, A2059C), *rplD* (G66D)	Erythromycin	(G. Descours *et al.* submitted for publication)
Ery2	*rrl* (C2611G)*, *rplD* (Q62R , G64E)	Erythromycin	(G. Descours *et al.* submitted for publication)
Ery3	*rrl* (C2611T)*, *rplD(G66A)*	Erythromycin	(G. Descours *et al.* submitted for publication)
Ery4	*rrl* (A2058T)*, *rplD* (G66A), *rplV* (K90M)	Erythromycin	(G. Descours *et al.* submitted for publication)
Ery5	*rrl* (A2058C, A2059G)*, *rplD* (G66A)	Erythromycin	(G. Descours *et al.* submitted for publication)
Ery6	*rrl* (C2611T)*, *rplD* (G66D)	Erythromycin	(G. Descours *et al.* submitted for publication)
Azi1	*rrl* (C2611T)*, *rplD* (T65K, G66R), *rplV* (G91D)	Azithromycin	(G. Descours *et al.* submitted for publication)
Azi2	*rrl* (A2058G)*, *rplD* (G66D)	Azithromycin	(G. Descours *et al.* submitted for publication)
Azi3	*rrl* (C2611T)*, *rplD* (T65K, G66C)	Azithromycin	(G. Descours *et al.* submitted for publication)
Azi4	*rrl* (C2611G)*, *rplD* (del 63KG64)	Azithromycin	(G. Descours *et al.* submitted for publication)
Azi5	*rrl* (A2058G)*, *rplD* (T65K), *rplV* (P87L, G91D)	Azithromycin	(G. Descours *et al.* submitted for publication)
Azi6	*rrl* (A2058G*)	Azithromycin	(G. Descours *et al.* submitted for publication)
Rif1	*rpoB* (S537T), Δ*dotA::kan*	Rifampicin	This work
Rif2	*rpoB* (H541R), Δ*dotA::kan*	Rifampicin	This work
Rif3	*rpoB* (V159F, V158F), Δ*dotA::kan*	Rifampicin	This work
Rif4	*rpoB* (H541Y), Δ*dotA::kan*	Rifampicin	This work
Rif5	*rpoB* (V159F), Δ*dotA::kan*	Rifampicin	This work
Rif6	*rpoB* (H541R), Δ*dotA::kan*	Rifampicin	This work
Rif7	*rpoB* (H541Y), Δ*dotA::kan*	Rifampicin	This work
Rif8	*rpoB* (N531V), Δ*dotA::kan*	Rifampicin	This work
Rif9	*rpoB* (H541N), Δ*dotA::kan*	Rifampicin	This work
Rif10	*rpoB* (N531V), Δ*dotA::kan*	Rifampicin	This work

* Nucleotide change

Table 2. MIC ranges, MIC_{50}, MIC_{90} and ECOFF of eight antibiotics for 109 *L. pneumophila* clinical isolates and Paris strain determined by the microdilution method

	Clinical strains				Paris strain
	MIC range (mg/L)	MIC_{50} (mg/L)	MIC_{90} (mg/L)	ECOFF (mg/L)	MIC (mg/L)
Ciprofloxacin	0.008-0.064	0.016	0.032	0.064	0.016
Moxifloxacin	0.008-0.064	0.032	0.032	0.064	0.032
Levofloxacin	0.004-0.032	0.016	0.032	0.032	0.008
Azithromycin	0.015-2	0.06	0.5	2	0.5
Erythromycin	0.03-1	0.125	0.5	1	0.5
Clarithromycin	0.004-0.064	0.032	0.032	0.064	0.032
Rifampicin	0.00012-0.001	0.0005	0.0005	0.001	0.0005
Doxycycline	0.12-2	1	2	2	2

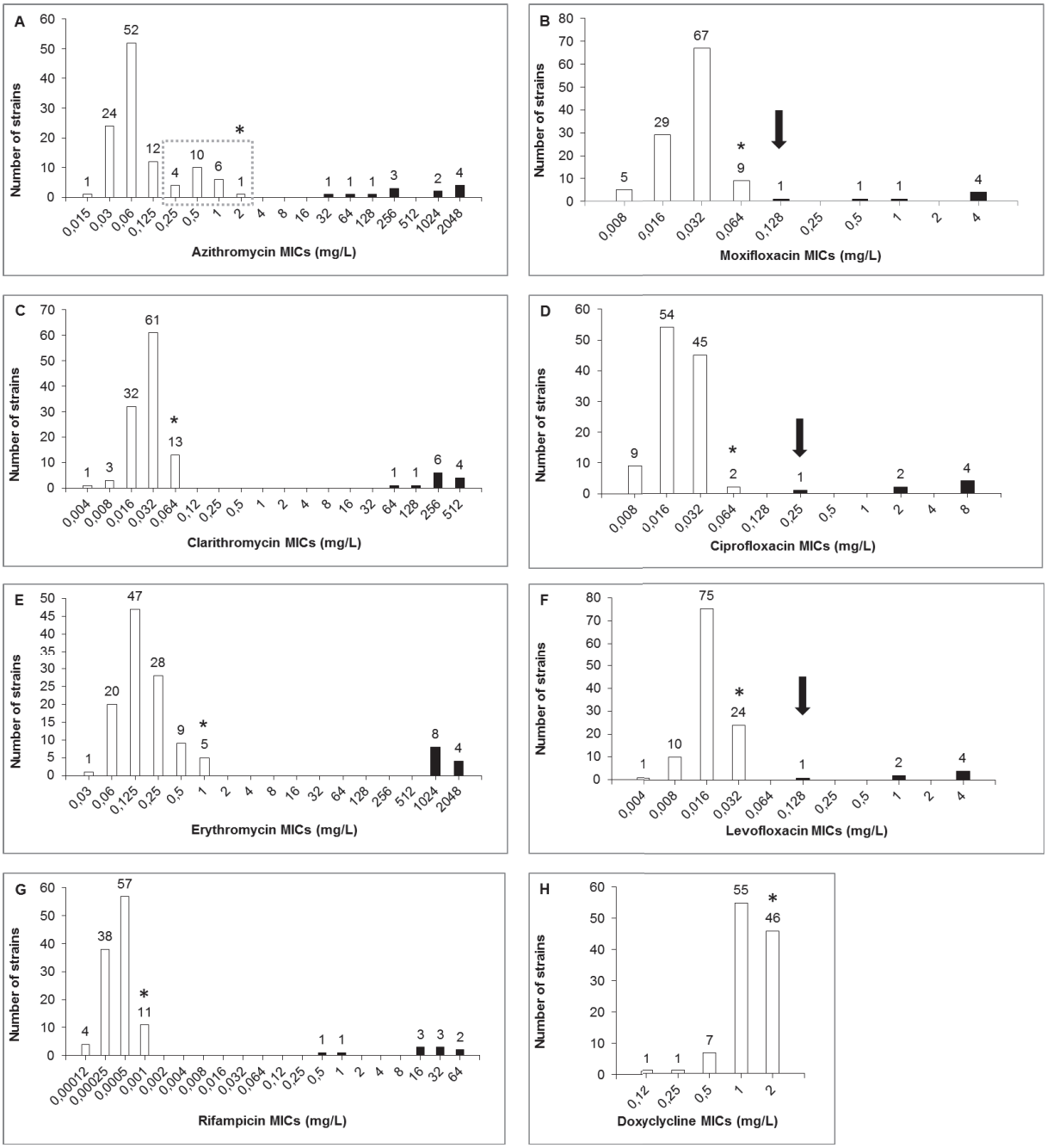


Figure 1. Distribution of antibiotic MICs for 109 *L. pneumophila* clinical strains (white bars) and antibiotic-resistant strains selected *in vitro* (black bars).

Susceptibility of rifampicin-resistant strains (n = 10) was tested for rifampicin, susceptibility of fluoroquinolone-resistant strains (n = 7) was tested for moxifloxacin, ciprofloxacin and levofloxacin, and susceptibility of macrolide-resistant strains (n = 12) was tested for azithromycin, clarithromycin and erythromycin. The dotted frame corresponds to the clinical strains presenting a reduced susceptibility (*i.e.*, possessing the *lpeAB* genes). Black bars correspond to resistant isolates. The black arrows indicate low-level resistance. Black asterisks indicate ECOFF values.

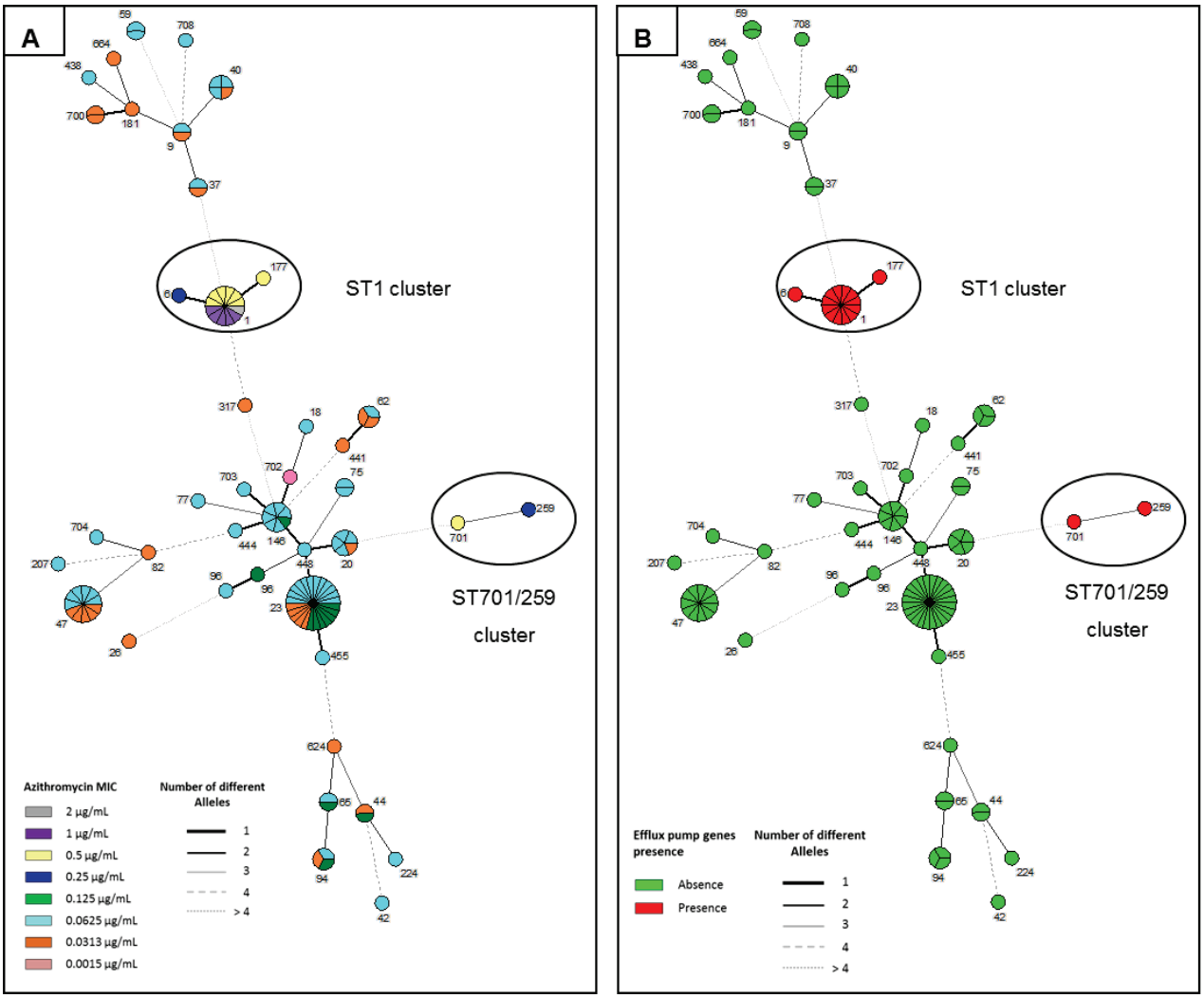


Figure 2. Minimum spanning trees of *L. pneumophila* sg1 clinical strains (n = 109). Categorical clustering based on ST was performed using Bionumerics 7.1 software. Circles represent STs, each slice of each circle represent an isolate. A/ Colors within circle correspond to MICs. B/ Colors within circles correspond to the presence (red) or the absence (green) of the *lpeAB* genes based on genomes data.

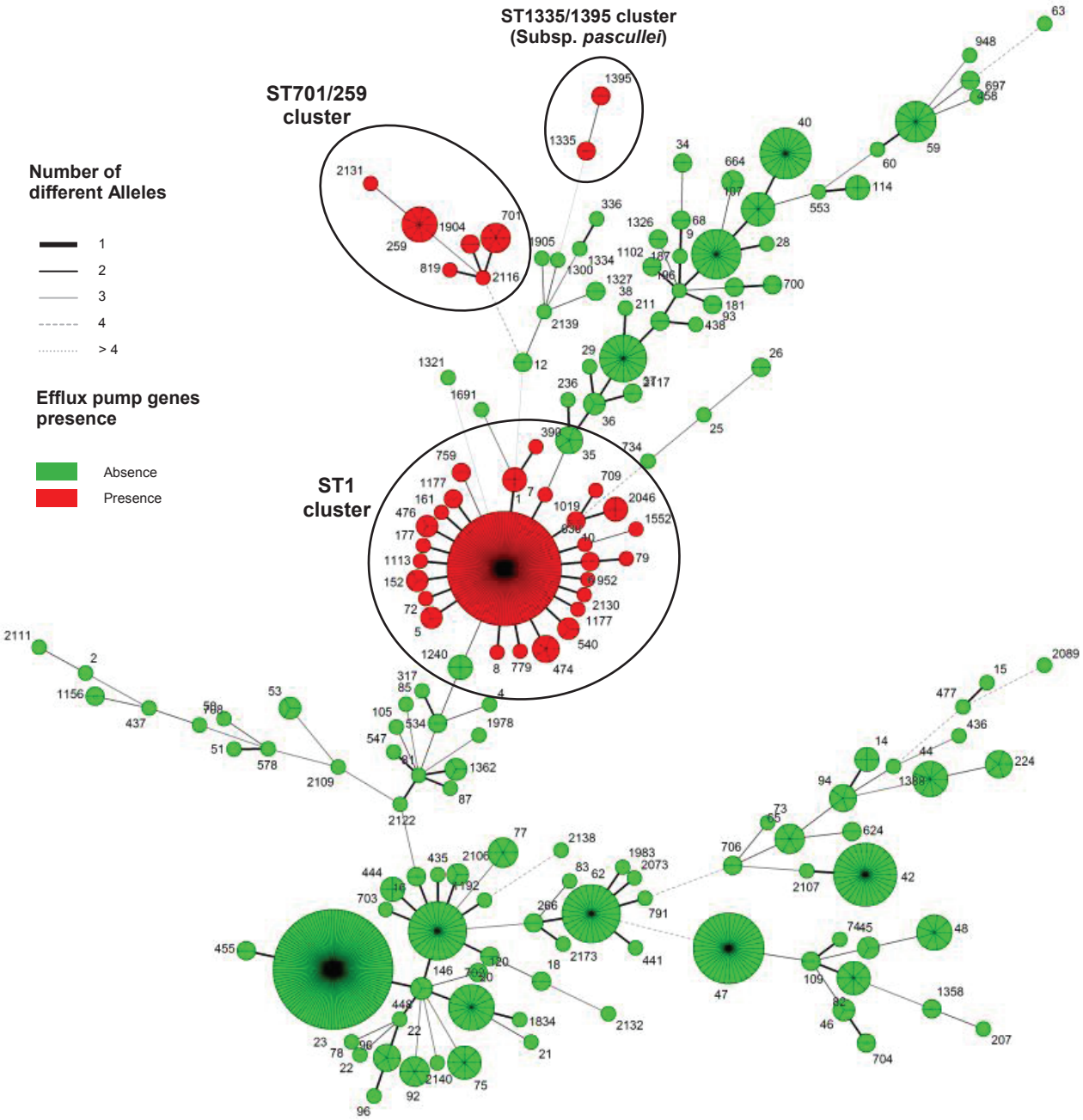


Figure 3. Minimum spanning trees of *L. pneumophila* sg1 clinical and environmental strains (n = 701). Categorical clustering based on ST was performed using Bionumerics 7.1 sofware. Circles represent STs, each slice of each circle represents an isolate. Colors within circles correspond to the presence (red) or the absence (green) of the *lpeAB* genes based on genomes and PCR data.

References

1. **Yu VL**, **Plouffe JF**, **Pastoris MC**, **Stout JE**, **Schousboe M**, **Widmer A**, **Summersgill J**, **File T**, **Heath CM**, **Paterson DL**, **Chereshsky A**. 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.

2. **Beauté J**, **Zucs P**, **de Jong B**. 2013. Legionnaires disease in Europe, 2009-2010. Euro Surveill **18**:20417.

3. **Fields B**, **Robert B**, **Richard B**. 2002. *Legionella* and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation. J Clin Microbiol **16**:697–699.

4. **Fraser DW**, **Tsai TR**, **Orenstein W**, **Parkin WE**, **Beecham HJ**, **Sharrar RG**, **Harris J**, **Mallison GF**, **Martin SM**, **McDade JE**, **Shepard CC**, **Brachman PS**. 1977. Legionnaires' Disease. N Engl J Med **297**:1189–1197.

5. **Edelstein PH**, **Edelstein MAC**. 1991. In vitro activity of azithromycin against clinical isolates of *Legionella* species. Antimicrob Agents Chemother **35**:180–181.

6. **Stout JE**, **Arnold B**, **Yu VL**. 1998. Activity of azithromycin, clarithromycin, roxithromycin, dirithromycin, quinupristin/dalfopristin and erythromycin against *Legionella* species by intracellular susceptibility testing in HL-60 cells **1**:289–291.

7. **Fitzgeorge RB**, **Featherstone AS**, **Baskerville A**. 1990. Efficacy of azithromycin in the treatment of guinea pigs infected with *Legionella* pneumophila by aerosol. J Antimicrob Chemother **25 Suppl A**:101–108.

8. **Fitzgeorge RB**, **Lever S**, **Baskerville A**. 1993. A comparison of the efficacy of azithromycin and clarithromycin in oral therapy of experimental airborne Legionnaires' disease. JAntimicrobChemother **31 Suppl E**:171–176.

9. **Tan JS**, **File TM**, **DiPersio JR**, **DiPersio LP**, **Hamor R**, **Saravolatz LD**, **Stout JE**. 2001. Persistently positive culture results in a patient with community-acquired pneumonia due to *Legionella pneumophila*. Clin Infect Dis **32**:1562–6.

10. **Glaser S**, **Weitzel T**, **Schiller R**, **Suttorp N**, **Luck P**. 2005. Persistent Culture-Positive *Legionella* Infection in an Immunocompetent Adult **41**:765–766.

11. **Dominguez A**, **Alvarez J**, **Sabria M**, **Carmona G**, **Torner N**, **Oviedo M**, **Cayla J**, **Minguell S**, **Barrabeig I**, **Sala M**, **Godoy P**, **Camps N**. 2009. Factors influencing the case-fatality rate of Legionnaires' disease. Int J Tuberc Lung Dis **13**:407–412.

12. **Dowling JN**, **McDevitt DA**, **Pasculle AW**. 1984. Disk diffusion antimicrobial susceptibility testing of members of the family Legionellaceae including erythromycin-resistant variants of *Legionella micdadei*. J Clin Microbiol **19**:723–729.

13. **Almahmoud I**, **Kay E**, **Schneider D**, **Maurin M**. 2009. Mutational paths towards increased fluoroquinolone resistance in *Legionella pneumophila*. J Antimicrob Chemother **64**:284–293.

14. **Nielsen K**, **Hindersson P**, **Hoiby N**, **Bangsborg JM**. 2000. Sequencing of the rpoB gene in *Legionella pneumophila* and characterization of mutations associated with rifampin resistance in the Legionellaceae. Antimicrob Agents Chemother **44**:2679–2683.

15. **Onody C**, **Matsiota-Bernard P**, **Nauciel C**. 1997. Lack of resistance to erythromycin, rifampicin and ciprofloxacin in 98 clinical isolates of *Legionella pneumophila*. J Antimicrob Chemother **39**:815–816.

16. **Bruin JP**, **Koshkolda T**, **IJzerman EPF**, **Luck C**, **Diederen BMW**, **Den Boer JW**, **Mouton JW**. 2014. Isolation of ciprofloxacin-resistant *Legionella pneumophila* in a patient with severe pneumonia. J Antimicrob Chemother **69**:2869–2871.

17. **Shadoud L**, **Almahmoud I**, **Jarraud S**, **Etienne J**, **Larrat S**, **Schwebel C**, **Timsit JF**, **Schneider D**, **Maurin M**. 2015. Hidden Selection of Bacterial Resistance to

Fluoroquinolones In Vivo: The Case of *Legionella pneumophila* and Humans. EBioMedicine **2**:1179–1185.

18. **Cazalet C**, **Rusniok C**, **Brüggemann H**, **Zidane N**, **Magnier A**, **Ma L**, **Tichit M**, **Jarraud S**, **Bouchier C**, **Vandenesch F**, **Kunst F**, **Etienne J**, **Glaser P**, **Buchrieser C**. 2004. Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. Nat Genet **36**:1165–1173.

19. **Chidiac C**, **Che D**, **Pires-Cronenberger S**, **Jarraud S**, **Campese C**, **Bissery A**, **Weinbreck P**, **Brun-Buisson C**, **Sollet JP**, **Ecochard R**, **Desenclos JC**, **Etienne J**, **Vanhems P**. 2012. Factors associated with hospital mortality in community-acquired legionellosis in France. Eur Respir J **39**:963–970.

20. **Jin DJ**, **Gross CA**. 1988. Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli* rpoB gene that lead to rifampicin resistance. J Mol Biol **202**:45–58.

21. **Serr A**, **Koenig BF**, **Heep M**, **Nielsen K**, **Bangsborg JM**. 2001. Update on rifampin resistance in the Legionellaceae. Antimicrob Agents Chemother **45**:2181–2182.

22. **Kahlmeter G**, **Brown DFJ**, **Goldstein FW**, **MacGowan AP**, **Mouton JW**, **Österlund A**, **Rodloff A**, **Steinbakk M**, **Urbaskova P**, **Vatopoulos A**. 2003. European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. J Antimicrob Chemother **52**:145–148.

23. **David S**, **Mentasti M**, **Tewolde R**, **Aslett M**, **Harris SR**, **Afshar B**, **Underwood A**, **Fry NK**, **Parkhill J**, **Harrison TG**. 2016. Evaluation of an optimal epidemiologic typing scheme for *Legionella pneumophila* with whole genome sequence data using validation guidelines. J Clin Microbiol JCM.00432–16.

24. **García MT**, **Pelaz C**, **Giménez MJ**, **Aguilar L**. 2000. In vitro activities of gemifloxacin versus five quinolones and two macrolides against 271 Spanish isolates of *Legionella pneumophila*: Influence of charcoal on susceptibility test results. Antimicrob Agents Chemother **44**:2176–2178.

25. **Goldstein BP**. 2014. Resistance to rifampicin: a review. J Antibiot (Tokyo) **67**:625–30.

26. **Tsakris A**, **Alexiou-Daniel S**, **Souliou E**, **Antoniadis A**. 1999. In-vitro activity of antibiotics against *Legionella pneumophila* isolates from water systems. J Antimicrob Chemother **44**:693–695.

27. **Bruin JP**, **Ijzerman EPF**, **den Boer JW**, **Mouton JW**, **Diederen BMW**. 2011. Wild-type MIC distribution and epidemiological cut-off values in clinical *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates. Diagn Microbiol Infect Dis **72**:103–108.

28. **Moffie BG**, **Mouton RP**. 1988. Sensitivity and resistance of *Legionella pneumophila* to some antibiotics and combinations of antibiotics. J Antimicrob Chemother **22**:457–462.

29. **Mallegol J**, **Fernandes P**, **Melano RG**, **Guyard C**. 2014. Antimicrobial activity of solithromycin against clinical isolates of *Legionella pneumophila* serogroup 1. Antimicrob Agents Chemother **58**:909–15.

II. *Etude de l'effet des PAMs humains sur* L. pneumophila

Avant mon arrivée en thèse, des travaux préliminaires avaient permis d'évaluer l'impact des peptides humains HNP-1, HNP-2, HNP-3, LL-37, HBD-2 et HBD-3 sur la cultivabilité de *L. pneumophila* Paris. Afin de définir les conditions expérimentales optimales, les tests ont été réalisés dans différents milieux : le tampon Sorenson (Edelstein *et al.* 2003), le milieu BYE (utilisé pour la culture des légionelles) et le milieu CO_2I (utilisé en culture cellulaire). Les résultats ont montré que le tampon Sorenson présente une forte toxicité vis-à-vis de *L. pneumophila*, en entrainant une perte de cultivabilité de 90% en 1h ; tandis que le milieu BYE inhibe l'activité antimicrobienne des peptides, certainement en raison d'une trop forte salinité (Bals *et al.* 1998a; Dhople *et al.* 2006; Jonard *et al.* 2006). Le milieu de culture cellulaire, non toxique pour les légionelles, a donc été retenu pour évaluer l'activité des PAMs. Nous avons alors observé une perte de cultivabilité de *L. pneumophila* suite à l'incubation avec LL-37 ou HBD-3, mais pas HBD-2, HNP-1, HNP-2 ou HNP-3 (**Figure 62**). La capacité de ces peptides à perméabiliser les membranes de *Legionella* a ensuite été évaluée en réalisant une cinétique d'incorporation d'iodure de propidium, dont la fluorescence témoigne d'une altération membranaire. D'après ce test, seuls les peptides LL-37 et HBD-3 sont cytotoxiques pour *L. pneumophila*, la cathélicidine semblant cependant plus efficace que la défensine. Au cours de mon Master 2 Recherche, nous avons également analysé l'impact des PAMs au cours de l'infection cellulaire par *Legionella*. Les premiers résultats semblaient alors montrer que les peptides LL-37 et HBD-3 possèdent un effet inhibiteur sur la réplication intracellulaire de *L. pneumophila* dans les macrophages U937 et les pneumocytes A549.

Ainsi, ces données ont constitué le point de départ de mes travaux de thèse dédiés à la caractérisation de l'activité antibactérienne des peptides antimicrobiens humains et à l'identification de leur mécanisme d'action à l'encontre de *L. pneumophila*. Nos efforts se sont concentrés sur l'effet de LL-37 et HBD-3, deux peptides structurellement différents qui, d'après nos travaux préliminaires, possèdent la plus forte activité anti-*Legionella* des PAMs humains. Ce choix nous semble d'autant plus intéressant que ces deux peptides semblent posséder des modes d'action différents l'un de l'autre. Cette étude a été réalisée sur la souche Paris, une souche endémique mondiale, ainsi que sur la souche Lens, isolée en 2003 et 2004 lors de la plus grande épidémie française de légionellose.

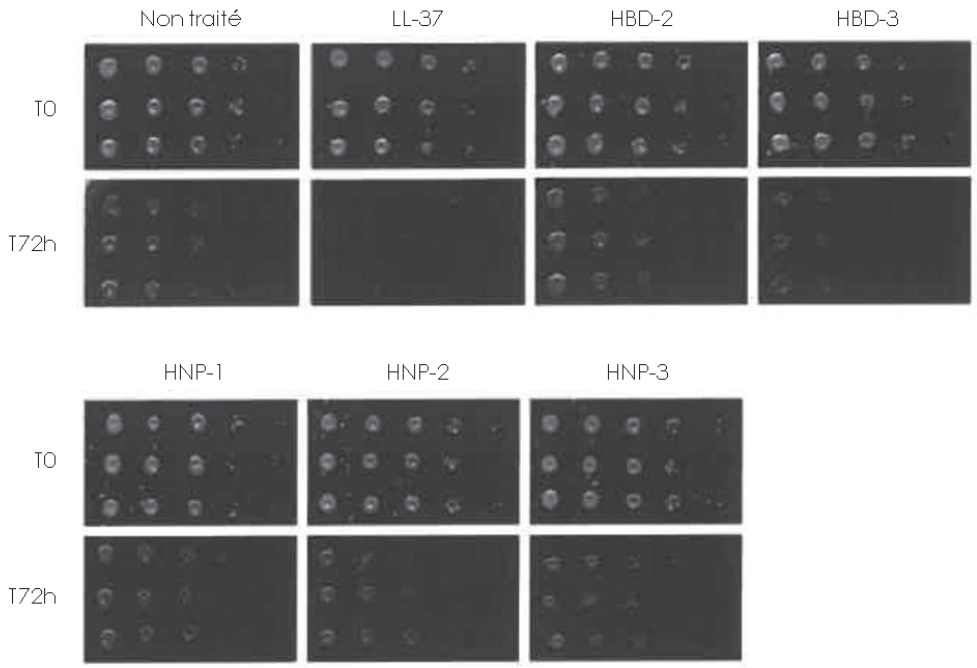


Figure 62. Perte de cultivabilité de *L. pneumophila* Paris (travaux préliminaires réalisés par PA Juan).
Une suspension de la souche Paris (5.10^6 bactéries/mL) a été incubée en milieu CO_2I en absence ou en présence de 10 µg/mL de LL-37, HBD-2, HBD-3, HNP-1, HNP-2 ou HNP-3 pendant 72h à 37°C. A T0 et T72h, chaque suspension bactérienne a été diluée en cascade de 10 en 10 jusqu'à la dilution 10^{-4}, et chaque dilution a été ensemencée sous forme de spot de 5 µL sur milieu BCYE. Les boites ont ensuite été incubées pendant 72h à 37°C.

II.1 Effet des PAMs humains sur *L. pneumophila* en milieu extracellulaire

II.1.1 Effet de LL-37 et HBD-3 sur la cultivabilité de *L. pneumophila*

Afin de caractériser l'activité antimicrobienne des PAMs humains à l'encontre de *L. pneumophila*, nous avons tout d'abord évalué l'impact des peptides LL-37 et HBD-3 sur la cultivabilité de la bactérie. Les résultats montrent que les souches Paris WT et Lens WT sont sensibles à LL-37 et HBD-3 en phase exponentielle de croissance, la cultivabilité des bactéries étant diminuée de 3 et 2 logs, respectivement, suite à l'incubation de 24h en présence des peptides (**Figure 63**). Les souches Paris WT et Lens WT semblent en revanche plus résistantes à LL-37 et HBD-3 en phase stationnaire de croissance, la perte de cultivabilité des bactéries étant cette fois inférieure à 1 log en présence des peptides. Ces résultats montrent donc que la sensibilité à LL-37 et HBD-3 de *L. pneumophila* varie en fonction de sa phase de croissance, la bactérie étant sensible aux peptides en phase exponentielle de croissance puis résistante en phase stationnaire. De plus, il semblerait que *L. pneumophila* soit plus sensible à LL-37 qu'à HBD-3, la perte de cultivabilité étant plus importante en présence de la cathélicidine.

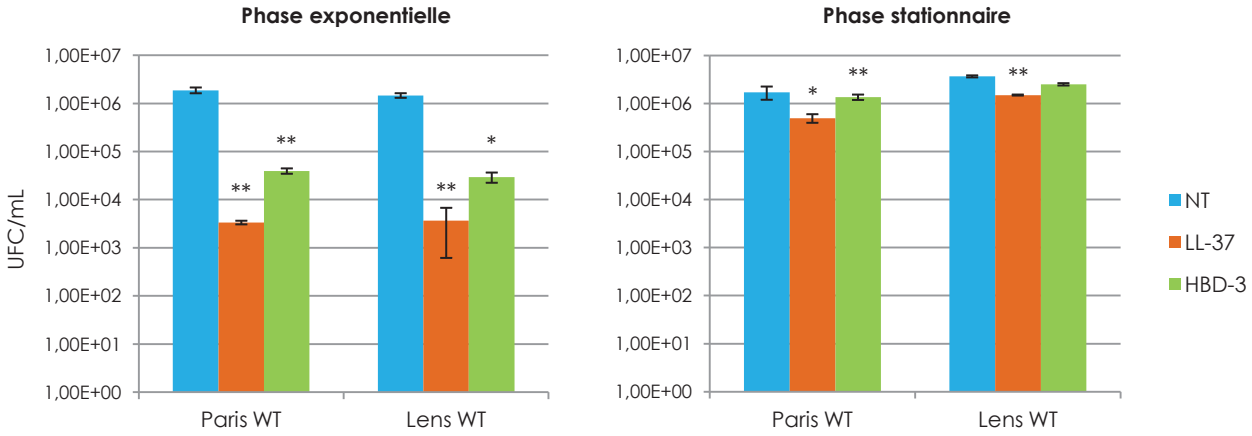
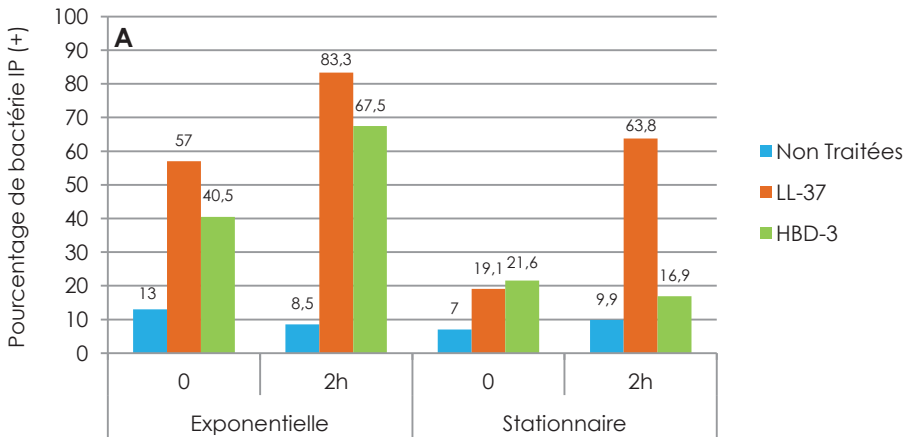


Figure 63. Cultivabilité de *L. pneumophila*. Des cultures bactériennes en phase exponentielle et stationnaire de croissance ont été resuspendues dans du milieu CO_2l à une concentration de 10^6 bactérie/mL. Ces suspensions ont été incubées à 37°C pendant 24h en absence (bleu) ou en présence de LL-37 (orange) ou HBD-3 (vert) (10 µg/mL), puis diluées avant d'être ensemencées sur milieu BCYE. Les boites ont été incubées 3 jours à 37°C et les UFC ont été comptées à l'aide d'un scan automatique. Les données représentent la moyenne du nombre de CFU/mL obtenue dans trois puits pour une expérience. La moyenne est représentée entourée de la valeur de l'écart-type. Les données représentent trois expériences indépendantes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

II.1.2 Perméabilisation des membranes de *L. pneumophila* par LL-37 et HBD-3

L'activité antibactérienne des PAMs repose principalement sur la perméabilisation des membranes. Nous avons donc tenté de déterminer si le peptide humain LL-37 était capable de perméabiliser les membranes de *L. pneumophila*. La perméabilité des légionelles a été évaluée à l'aide du kit Baclight, utilisant deux colorants d'acides nucléiques : le colorant vert fluorescent SYTO 9 et le colorant rouge fluorescent à l'iodure de propidium (IP). Le SYTO 9 pénètre dans toutes les bactéries, tandis que l'IP pénètre seulement dans les bactéries dont les membranes sont endommagées. La souche *L. pneumophila* Paris après croissance jusqu'en phase exponentielle ou stationnaire a été incubée en présence de PAMs, marquée immédiatement (T0), 2 heures (T2) ou 24h (T24) après l'ajout des peptides, puis analysée par cytométrie en flux. Pour les cultures en phase exponentielle de croissance, les résultats montrent que l'IP pénètre dans les bactéries exposées à LL-37 et HBD-3 dès le temps le plus précoce (T0 : 0 minute d'incubation à 37°C + 15 minutes de marquage à température ambiante) avec une proportion de bactéries IP positives de plus de 57% pour LL-37 et jsuqu'à 40% pour HBD-3 (**Figure 64A**). Après 2 heures d'incubation, le pourcentage de bactéries IP positives augmente jusqu'à 83% pour LL-37 et 63% pour HBD-3. Après 24 heures, la perméabilisation n'est pas plus importante qu'après 2 heures d'incubation. Pour ces 2 peptides l'effet est dose dépendant (**Figure 64B**). Pour les cultures en phase stationnaire de croissance, les profils sont différents pour les 2 peptides. Une plus faible proportion de bactéries exposées à LL-37 incorpore de l'IP à T0 par rapport aux bactéries en phase exponentielle de croissance (19%) (**Figure 64A**). En revanche, après 2 heures ou 24 heures d'incubation avec le peptide, une proportion similaire de bactérie incorpore de l'IP. L'effet de LL-37 dans sur les bactéries en phase stationnaire de croissance est également dose dépendant (**Figure 64B**). Quel que soit le temps d'incubation, les bactéries en phase stationnaire de croissance ne sont que peu ou pas perméabilisées par HBD-3.



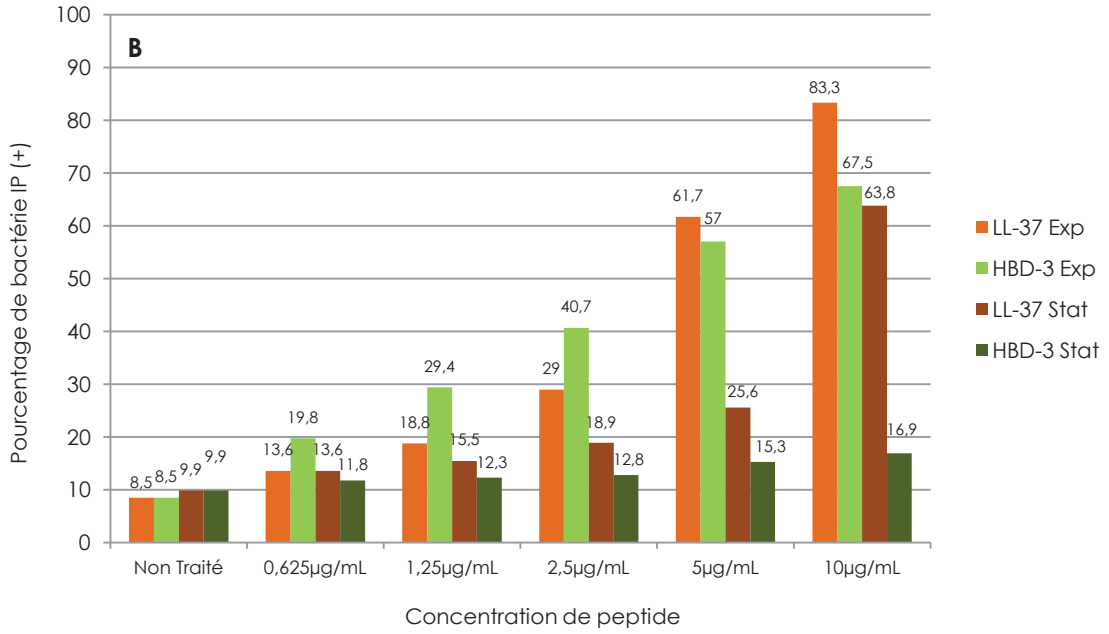


Figure 64. Perméabilisation des membranes de *L. pneumophila* par LL-37 et HBD-3. A. Une culture de la souche *L. pneumophila* Paris en phase exponentielle ou en phase stationnaire de croissance a été incubée en absence de peptide (bleu), en présence de LL-37 (10 µg/mL) (orange) ou de HBD-3 (10 µg/mL) (vert). B. Une culture de la souche *L. pneumophila* Paris en phase exponentielle (Exp) ou en phase stationnaire (Stat) de croissance a été incubée en présence de concentrations croissantes de LL-37 ou de HBD-3. Les bactéries ont été marquées à l'aide du kit Baclight immédiatement ou 2h après l'ajout du peptide, puis analysées par cytométrie en flux. Les données sont représentatives de 2 à 3 expériences.

II.1.3 Localisation de LL-37 sur *L. pneumophila*

Les tests de perte de cultivabilité et de perméabilisation membranaire ont montré que le peptide LL-37 exerce une activité bactéricide directe contre *L. pneumophila,* vraisemblablement via la perméabilisation des membranes de la bactérie. Afin de caractériser plus précisément le mode d'action de la cathélicidine LL-37 contre les légionelles, nous avons choisi d'utiliser une approche de microscopique afin de localiser la ou les cibles bactériennes du peptide.

Dans un premier temps, la souche Paris WT a été incubée pendant 2h en présence de 10 µg/mL de peptide LL-37 marqué au TAMRA. Des observations en microscopie confocale permettent de mettre en évidence une nette accumulation du peptide sur la surface des bactéries, en particulier celles en cours de division (**Figure 65**). En effet, la localisation du peptide délimite le contour de chaque légionelle, suggérant une interaction avec la membrane bactérienne.

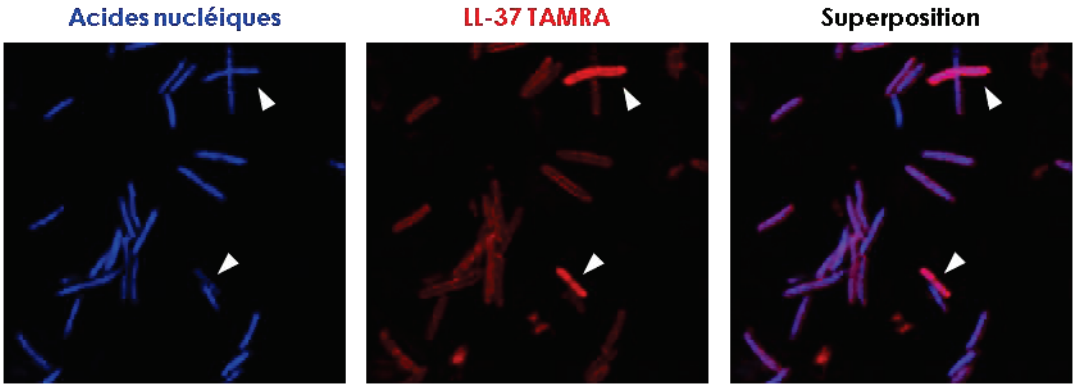


Figure 65. Fixation de LL-37 à la surface de *L. pneumophila*.La souche *L. pneumophila* Paris a été incubée avec 10 µg/mL de LL-37 TAMRA (rouge) et 2 µg/mL de DAPI (bleu) pendant 2h. Les bactéries ont ensuite été lavées puis observées par microscopie confocale. Les flèches blanches indiquent les bactéries en cours de division.

Dans un second temps, nous avons réalisé un marquage immunogold de LL-37 afin de visualiser plus en détail la localisation du peptide sur *L. pneumophila*. Pour cela, la souche Paris WT a été incubée pendant 2h en absence ou en présence de LL-37, puis marquées à l'aide d'anticorps primaires dirigés contre le peptide et d'anticorps secondaires conjugués à des particules d'or, pour enfin être observée par microscopie électronique à transmission. Les légionelles non traitées apparaissent sous forme de bacilles à la membrane intacte et au contenu cytoplasmique uniforme (**Figures 66A-C**). De plus, comme attendu, aucun marquage correspondant à LL-37 n'est visible. Les bactéries exposées au peptide présentent quant à elles différents degrés d'altération, notamment au niveau membranaire et cytoplasmique (**Figures 66D-I**). En effet, bien que quelques légionelles traitées possèdent encore une membrane intacte (**Figure 66D**), la grande majorité affiche une rupture de leur membrane plus ou moins importante d'où s'échappe le contenu cytoplasmique (**Figures 66F-I**). Le marquage spécifique de LL-37 est détecté sur la membrane de *L. pneumophila* (**Figures 66D et E**), mais aussi, et de façon prédominante, au niveau du contenu cytoplasmique émanant de la bactérie (**Figures 66F-I**). Ces observations permettent alors de confirmer la fixation de LL-37 sur la membrane de *L. pneumophila* observée par microscopie confocale, mais semblent également indiquer l'existence d'une interaction entre le peptide et un ou plusieurs composants intrabactériens.

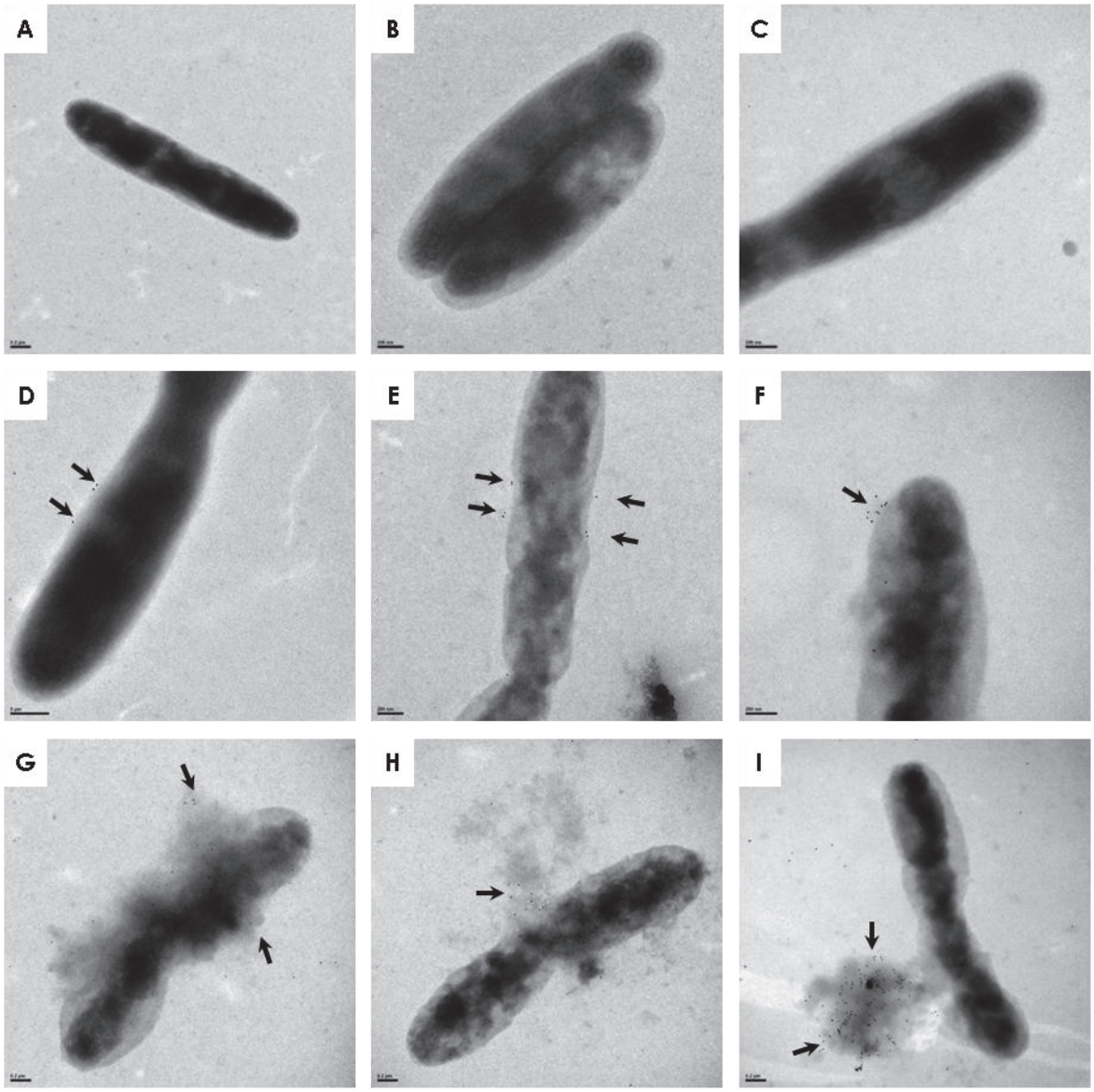


Figure 66. LL-37 interagit avec la membrane et le contenu cytoplasmique de *L. pneumophila*. La souche Paris WT cultivée en phase exponentielle a été incubée en absence (A-C) ou en présence (D-I) du peptide LL-37 (10 µg/mL) pendant 2h à 37°C sous agitation. Les bactéries ont été lavées, incubées dans une solution d'anticorps primaires dirigés contre LL-37, puis fixées, marquées par immunogold et observées par microscopie électronique à transmission. Les flèches indiquent la présence du peptide.

Afin d'identifier la ou les cibles intrabactériennes de LL-37, nous avons examiné la capacité du peptide à se fixer à l'ADN de *L. pneumophila* par un test de retard de migration électrophorétique. Pour cela, une quantité fixe d'ADN génomique (250 ng) a été incubée avec différentes concentrations de LL-37 (de 0 à 50 µg/mL) pendant 1h à 37°C, puis le mélange ont été déposés sur un gel d'agarose à 1% afin d'évaluer la migration de l'ADN par électrophorèse (**Figure 67**). L'ADN est retenu dans le puit de dépôt en présence de 50 µg/mL de LL-37, suggérant une précipitation de l'ADN induite par le peptide. Cette inhibition de migration suggère alors que LL-37 est capable d'interagir avec l'ADN de *L. pneumophila*.

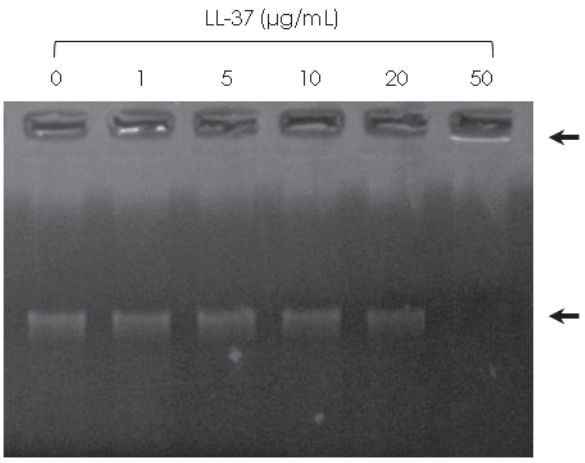


Figure 67. Gel de retard de migration électrophorétique de l'ADN de *L. pneumophila*. L'interaction ADN/LL-37 a été évaluée par l'effet inhibiteur du peptide sur la migration de l'ADN. Une quantité fixe d'ADN génomique (250 ng) de *L. pneumophila* Paris a été incubée avec différentes concentrations de LL-37 (de 0 à 50 µg/mL) pendant 1h à 37°C. Le mélange a ensuite été déposés sur un gel d'agarose à 1% afin d'évaluer la migration de l'ADN par électrophorèse. La concentration de peptide est indiquée au dessus des puits de dépôt. Les flèches indiquent la présence de bandes correspondant à l'ADN génomique.

II.1.4 Effet de LL-37 et HBD-3 sur la morphologie de *L. pneumophila*

L'effet des peptides LL-37 et HBD-3 sur l'ultrastructure de *L. pneumophila* a été évalué par microscopie électronique à transmission. Pour cela, la souche Paris WT a été incubée pendant 2h en absence ou en présence de 10 µg/mL de LL-37 ou de HBD-3. Les légionelles non traitées apparaissent alors sous forme de bacilles d'une longueur variant de 1.6 à 3.9 µm pour un diamètre compris entre 0.4 et 0.5 µm (**Figures 68A-C**). Le cytoplasme est homogène, riche en ribosomes et parsemé de quelques vacuoles. Les cellules présentent une enveloppe typique de *L. pneumophila*, caractérisée par une membrane externe ondulée séparée de la membrane interne par un mince espace périplasmique. En comparaison des bactéries non traitées, les légionelles exposées à LL-37 semblent avoir subi d'importants dommages morphologiques, notamment au niveau de l'enveloppe bactérienne (**Figures 68D-I**). D'une manière générale, une grande quantité de matériel cytoplasmique est retrouvé hors des bactéries (**Figure 68D**). Les bactéries traitées avec LL-37 montrent une augmentation de l'espace périplasmique (**Figures 68E-H**), parfois rempli de matériel cytoplasmique (**Figure 68H**). Certaines légionelles présentent à la fois une rupture de la membrane externe et de la membrane interne, associée à la fuite du contenu cytoplasmique dans le compartiment extracellulaire (**Figure 68G**). Quelques bactéries ayant perdu la totalité de leur contenu cytoplasmique prennent l'apparence de cellules dites « fantômes » (**Figure 68I**). Les légionelles exposées à HBD-3 présentent également d'importantes altérations morphologiques (**Figures 68J-L**). Le traitement avec HBD-3 semble avoir induit une fuite du contenu cytoplasmique dans le milieu extracellulaire, toutefois moins abondant qu'en présence de LL-37 (**Figure 68J**). Une augmentation de l'espace périplasmique ainsi que le

dédoublement des membranes externe et interne sont observés chez de nombreuses bactéries (**Figure 68K**). L'incubation avec HBD-3 induit également chez de nombreuses légionelles la formation de petites protrusions membranaires remplies de contenu cytoplasmique (**Figure 68L**). Cette anomalie morphologique n'est pas détectée sur les bactéries traitées avec LL-37. Ces différentes observations semblent indiquer que les peptides LL-37 et HBD-3 induisent tous deux une rupture des membranes de *L. pneumophila*.

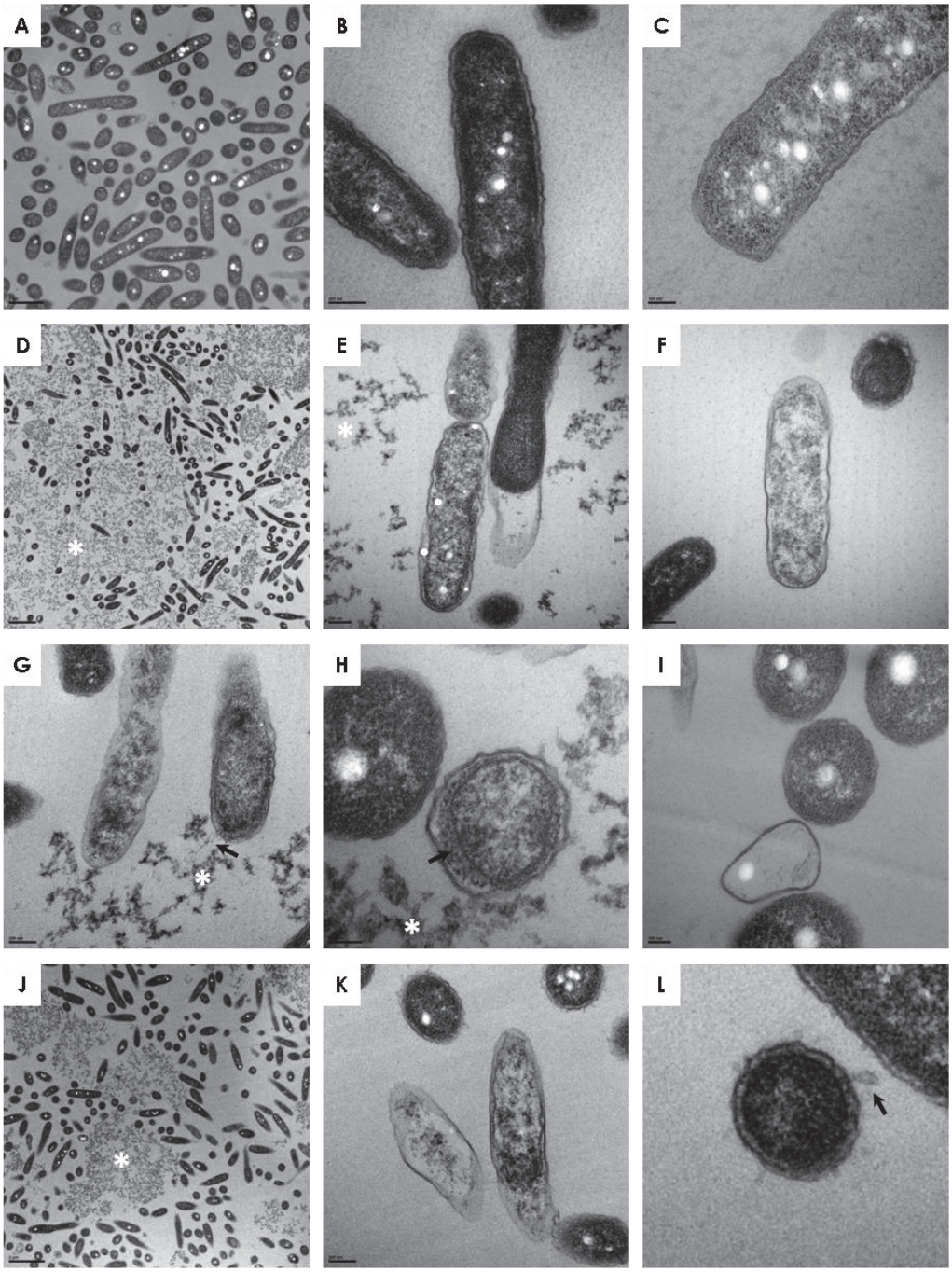


Figure 68. Effet de LL-37 et HBD-3 sur l'ultrastructure de *L. pneumophila*. La souche Paris WT cultivée en phase exponentielle a été incubée en absence (A-C) ou en présence des peptides LL-37 (10 µg/mL) (D-I) ou HBD-3 (10 µg/mL) (J-L) pendant 2h à 37°C sous agitation. Les bactéries ont été lavées, fixées puis marquées et observées par microscopie électronique à transmission. Les astérisques blancs indiquent la présence de contenu cytoplasmique hors des bactéries.

II.1.5 Effet des PAMs en association entre eux sur *L. pneumophila*

Les résultats montrent que LL-37 réduit plus efficacement la cultivabilité de la souche Paris en phase exponentielle que le peptide HBD-3, conformément aux résultats précédents (**Figure 69**). De manière surprenante, l'association des deux peptides à concentration équivalente conduit à une perte de cultivabilité intermédiaire, suggérant un effet antagoniste sur l'activité antimicrobienne contre *L. pneumophila*. Ce niveau de cultivabilité est cependant diminué par l'augmentation de la concentration de la défensine.

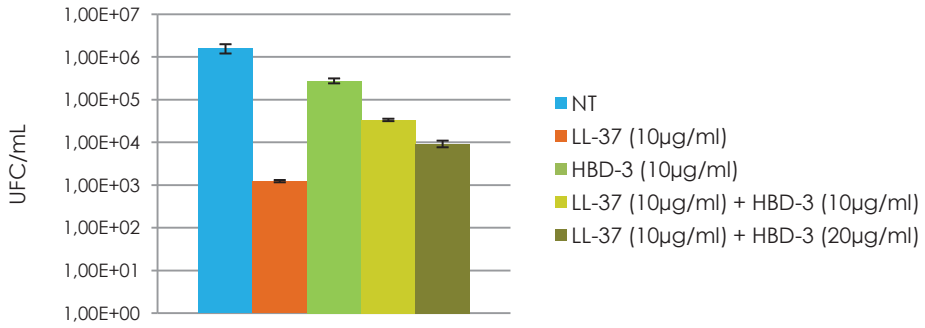


Figure 69. Effet de l'association de LL-37 et HBD-3 sur la de cultivabilité de *L. pneumophila*. Une culture de la souche L. pneumophila Paris en phase exponentielle de croissance a été resuspendue dans du milieu CO_2I à une concentration de 10^6 bactérie/mL. Cette suspension a été incubée à 37°C pendant 24h en absence ou en présence de LL-37 et/ou HBD-3, puis diluée avant d'être ensemencée sur milieu BCYE. Les boites ont été incubées 3 jours à 37°C et les UFC ont été comptées à l'aide d'un scan automatique. Les données représentent la moyenne du nombre de CFU/mL obtenue dans trois puits pour une expérience. La moyenne est représentée entourée de la valeur de l'écart-type. Les données représentent trois expériences indépendantes. NT : bactéries non traitées.

II.1.6 Etude de la résistance de *L. pneumophila* aux PAMs humains

Le gène *rcp* de *L. pneumophila* est impliqué dans la résistance à un petit peptide synthétique possédant une structure en hélice alpha similaire à LL-37 (Robey *et al.* 2001). Afin d'évaluer son rôle dans la résistance aux PAMs humains, le gène *rcp* a été muté par insertion d'une cassette de résistance à la kanamycine par recombinaison homologue chez les souches Paris et Lens. Les clones recombinants, nommés Paris Δ*rcp* et Lens Δ*rcp*, ont été vérifiés par PCR chevauchantes à l'aide des couples d'amorces spécifiques A_rcp_LF/Kcr3 et Kcr4/ B_rcp_RR (**Figure 70**).

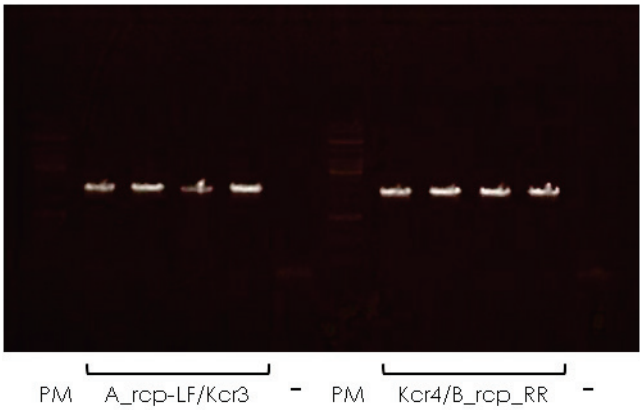


Figure 70. Gel d'électrophorèse de la PCR de vérification de la présence de la cassette Kcr. PM : échelle de poids moléculaire, - : témoin négatif (sans ADN).

II.1.6.1 Croissance extracellulaire des mutants Δrcp

Le comportement des mutants Paris Δ*rcp* et Lens Δ*rcp* en milieu BYE a été évalué afin de déterminer si la perte du gène *rcp* entraine un défaut de croissance extracellulaire. Pour cela, un suivi cinétique de la croissance des souches a été réalisé par mesure de la DO_{600} toutes les 15 minutes. La courbe de croissance des mutants Paris Δ*rcp* et Lens Δ*rcp* ne montrent aucune différence avec celle des souches Paris WT et Lens WT, respectivement (**Figure 71**). Ces résultats indiquent donc que la perte du gène *rcp* n'a pas d'effet sur la croissance extracellulaire des mutants.

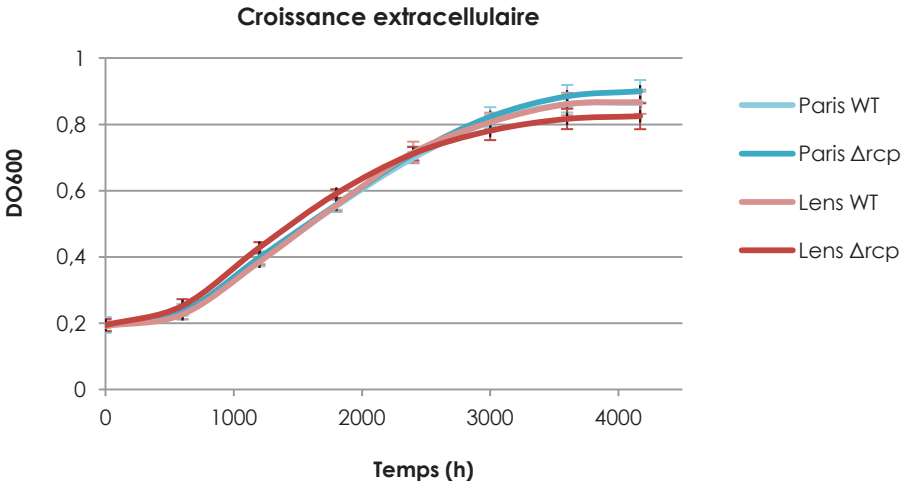


Figure 71. Croissance extracellulaire de *L. pneumophila*. Les suspensions bactériennes ont été réalisées dans du milieu BYE à DO 0.2, puis distribuées en plaque 24 puits. La DO_{600} a été mesurée toutes les 15 minutes par un lecteur automatique thermostaté à 37°C.

II.1.6.2 Effet des PAMs humains sur la cultivabilité des mutants Δrcp

Afin de déterminer le rôle du gène *rcp* dans la résistance aux PAMs humains, nous avons évalué l'impact des peptides LL-37 et HBD-3 sur la cultivabilité des mutants Paris Δ*rcp* et Lens Δ*rcp* par comparaison avec leur souche parentale respective, Paris WT et Lens WT.

II.1.6.2.1 Effet de la cathélicidine LL-37

Les mutants Paris Δ*rcp* et Lens Δ*rcp* en phase exponentielle de croissance sont toutes les deux sensibles à LL-37, la présence du peptide entrainant une perte de cultivabilité d'environ 3.5 log par rapport aux bactéries non traitées (**Figure 72**). Les souches mutantes présentent cependant deux phénotypes distincts en phase stationnaire de croissance. En effet, alors que le mutant Paris Δ*rcp* reste sensible à LL-37, avec une perte de 3 logs par rapport aux bactéries non traitées, le mutant Lens Δ*rcp* semble plus résistant au peptide, la perte de cultivabilité étant alors inférieure à 1 log. Ces résultats indiquent alors que la souche Paris Δ*rcp* est plus sensible à LL-37 que la souche Lens Δ*rcp* durant la phase stationnaire de croissance. Le mutant Lens Δ*rcp* semble néanmoins légèrement plus sensible au peptide que la souche parentale Lens WT. Ensemble, ces résultats montrent que la sensibilité de *L. pneumophila* à LL-37 varie en fonction de la phase de croissance, la bactérie étant sensible au peptide en phase exponentielle de croissance, puis résistante en phase stationnaire de croissance. De plus, le gène *rcp* semble impliqué dans la résistance de la souche Paris au peptide LL-37 durant la phase stationnaire de croissance. Bien que le mutant Lens Δ*rcp* ne montre pas une grande sensibilité à LL-37 en phase stationnaire de croissance, nous n'excluons pas la possibilité que le gène *rcp* soit impliqué dans la résistance de la souche Lens.

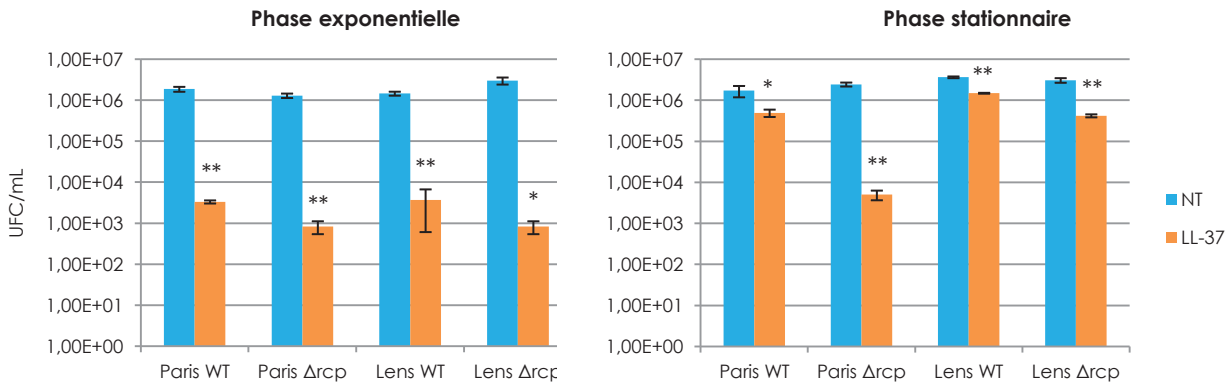


Figure 72. Test de cultivabilité de *L. pneumophila*. Des cultures bactériennes en phase exponentielle et stationnaire de croissance ont été resuspendues dans du milieu CO_2l à une concentration de 10^6 bactérie/mL. Ces suspensions ont été incubées à 37°C pendant 24h en absence (bleu) ou en présence de LL-37 (10 µg/mL) (orange), puis diluées avant d'être ensemencées sur milieu BCYE. Les boites ont été incubées 3 jours à 37°C et les UFC ont été comptées à l'aide d'un scan automatique. Les données représentent la moyenne du nombre de CFU/mL obtenue dans trois puits pour une expérience. La moyenne est représentée entourée de la valeur de l'écart-type. Les données représentent trois expériences indépendantes. NT : bactéries non traitées. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

II.1.6.2.2 Effet de la défensine HBD-3

Les mutants Paris Δ*rcp* et Lens Δ*rcp* en phase exponentielle semblent également tous les deux sensibles au peptide HBD-3, dans une moindre mesure cependant par rapport à leur souche parentale respective (**Figure 73**). En effet, la cultivabilité des souches mutantes est diminuée d'1 log ou moins suite à l'incubation avec HBD-3. Les mutants Paris Δ*rcp* et Lens Δ*rcp* en phase stationnaire de croissance semblent quant à eux résistants à HBD-3, la perte de cultivabilité en présence du peptide étant inférieure à un demi-log par rapport aux bactéries non traitées. Ces résultats montrent donc que la sensibilité à HBD-3 de *L. pneumophila* varie en fonction de sa phase de croissance, la bactérie étant sensible au peptide en phase exponentielle de croissance puis résistante en phase stationnaire. De plus, il semblerait que *L. pneumophila* soit plus sensible à LL-37 qu'à HBD-3, la perte de cultivabilité étant plus importante en présence de la cathélicidine. Enfin, le gène *rcp* ne semble pas impliqué dans la résistance de *L. pneumophila* au peptide HBD-3, la cultivabilité des mutants Paris Δ*rcp* et Lens Δ*rcp* étant au moins équivalente à leur souche parentale respective.

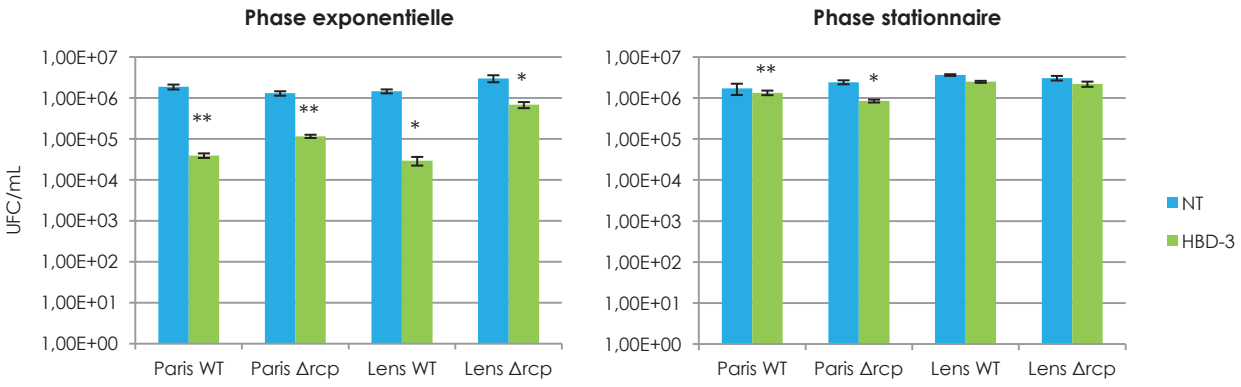


Figure 73. Test de cultivabilité de *L. pneumophila*. Des cultures bactériennes en phase exponentielle et stationnaire de croissance ont été resuspendues dans du milieu CO_2I à une concentration de 10^6 bactérie/mL. Ces suspensions ont été incubées à 37°C pendant 24h en absence (bleu) ou en présence HBD-3 (10 µg/mL) (vert), puis diluées avant d'être ensemencées sur milieu BCYE. Les boites ont été incubées 3 jours à 37°C et les UFC ont été comptées à l'aide d'un scan automatique. Les données représentent la moyenne du nombre de CFU/mL obtenue dans trois puits pour une expérience. La moyenne est représentée entourée de la valeur de l'écart-type. Les données représentent trois expériences indépendantes. NT : bactéries non traitées. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

II.2 Effet des PAMs humains sur le cycle infectieux de *L. pneumophila*

II.2.1 Effet de LL-37 et HBD-3 sur la réplication intracellulaire de *L. pneumophila*

De précédentes études ont montré la capacité des peptides LL-37 et HBD-3 à inhiber la réplication intracellulaire de *M. smegmatis* dans le macrophages THP-1 et de *L. pneumophila* 130b dans les pneumocytes A549, respectivement (Scharf *et al.* 2010b; Sonawane *et al.* 2011). Par ailleurs, des travaux préliminaires réalisés au sein de notre laboratoire ont mis en évidence un effet inhibiteur de ces deux peptides sur la croissance intracellulaire de la souche *L. pneumophila* Paris. Ces résultats nous ont donc amené à tester l'effet de LL-37 et HBD-3 sur la croissance des souches Paris et Lens dans les macrophages U937 et les pneumocytes A549. Pour cela, les souches Paris et Lens ont été mises au contact des cellules A549 ou U937 (MOI 10), coincubées en présence de 10 µg/mL de LL-37 ou HBD-3. Un suivi cinétique de la croissance intracellulaire a ensuite été réalisé par mesure de la fluorescence de la protéine mCherry exprimée par les légionelles. Les **figures 74A** et **74B** montrent que les peptides LL-37 et HBD-3 inhibent la croissance des légionelles dans les pneumocytes A549, de façon totale pour la souche Paris ou partielle pour la souche Lens.

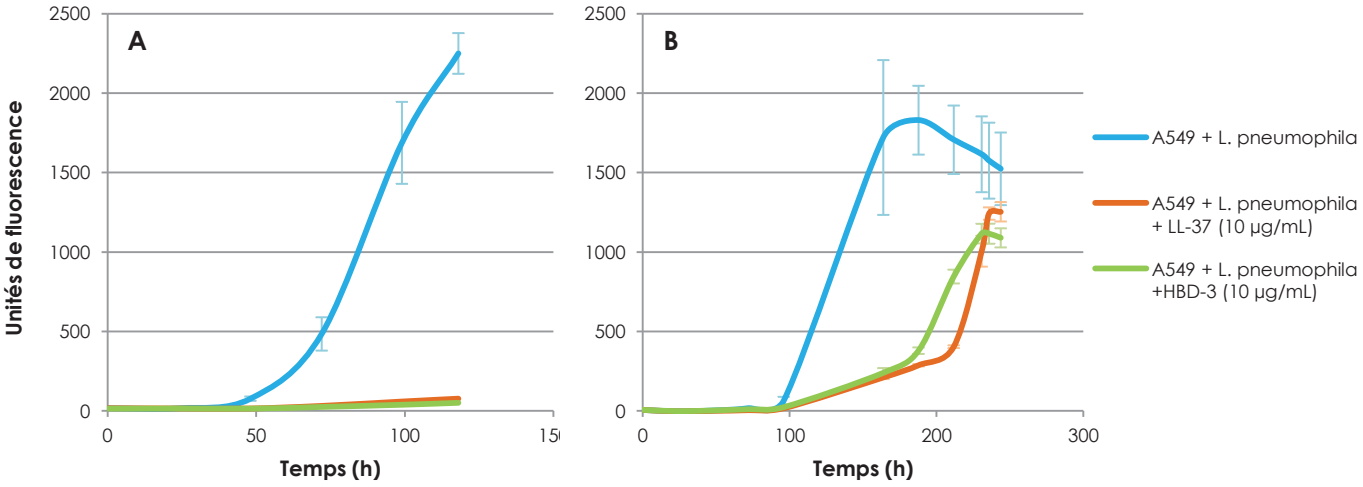


Figure 74. Croissance intracellulaire de *L. pneumophila* dans les pneumocytes A549 en coincubation avec les peptides. Les pneumocytes A549 ont été infectés pendant 2h à 37°C avec une suspension de la souche Paris (A) ou de la souche Lens (B) à une MOI=10. Les cellules ont été lavées afin d'éliminer les bactéries extracellulaires, puis on été incubée dans du milieu CO_2I contenant 10µg/mL de LL-37 ou de HBD-3. La croissance bactérienne a été évaluée par mesure de la fluorescence de la protéine mCherry à 37°C. Les courbes représentent la moyenne de fluorescence obtenue dans trois puits pour une expérience. La moyenne est représentée entourée de la valeur de l'écart-type. Les données représentent trois expériences indépendantes.

De même, les **figures 75A** et **75B** montrent que la présence des peptides LL-37 ou HBD-3 inhibe la réplication des souches Paris et Lens dans les macrophages U937.

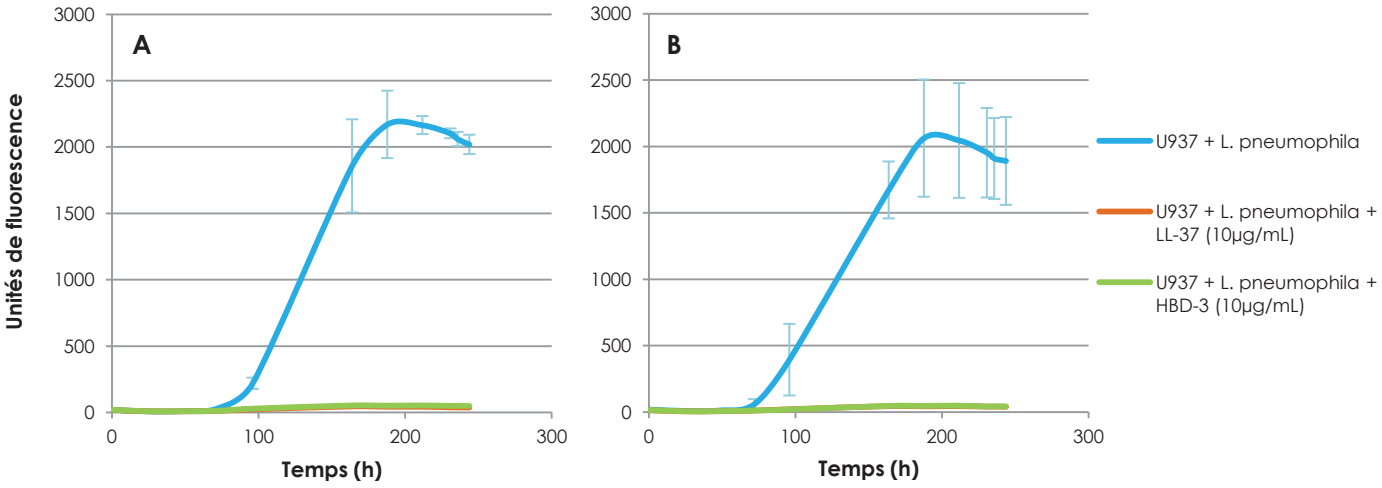


Figure 75. Croissance intracellulaire de *L. pneumophila* dans les macrophages U937 en coincubation avec les peptides. Les macrophages U937 ont été infectés pendant 2h à 37°C avec une suspension de la souche Paris (A) ou de la souche Lens (B) à une MOI=10. Les cellules ont été lavées afin d'éliminer les bactéries extracellulaires, puis on été incubée dans du milieu CO_2I contenant 10µg/mL de LL-37 ou de HBD-3. La croissance bactérienne a été évaluée par mesure de la fluorescence de la protéine mCherry à 37°C. Les courbes représentent la moyenne de fluorescence obtenue dans trois puits pour une expérience. La moyenne est représentée entourée de la valeur de l'écart-type. Les données représentent deux ou trois expériences indépendantes.

Afin d'éclaircir le mode d'action utilisé par LL-37 et HBD-3 pour inhiber la réplication intracellulaire de *L. pneumophila*, des tests de réplication intracellulaire ont été réalisés sur des cellules prétraitées avec les peptides. Cette modalité d'infection permet de s'affranchir de l'activité directe des peptides au niveau extracellulaire (**Figure 63**) afin d'évaluer l'activité antibactérienne des peptides au niveau intracellulaire. Pour cela, les pneumocytes A549 et les macrophages U937 ont été prétraités avec 10 µg/mL de LL-37 ou HBD-3 pendant 3h, puis lavés afin d'éliminer les peptides, avant de réaliser un suivi cinétique de la croissance intracellulaire des bactéries en absence de peptides. Les **figures 76A** et **76B** montrent que la croissance de la souche Paris est fortement inhibée dans les pneumocytes prétraités avec LL-37 ou HBD-3, tandis que la croissance de la souche Lens n'est que faiblement inhibée.

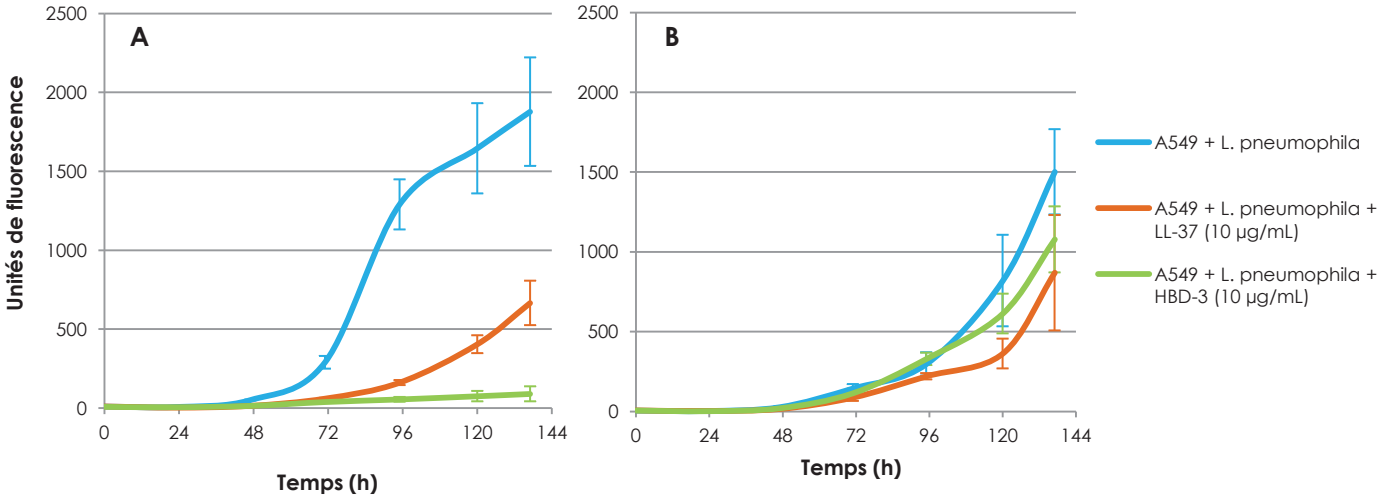


Figure 76. Croissance intracellulaire de *L. pneumophila* dans les pneumocytes A549 pré-incubés avec les peptides. Les pneumocytes A549 ont été prétraités avec 10µg/mL de LL-37 ou HBD-3 pendant 3h à 37°C, puis lavées afin d'éliminer les peptides. Les cellules ont ensuite été infectées pendant 2h à 37°C avec une suspension de la souche Paris (A) ou de la souche Lens (B) à une MOI=10. Les cellules ont été lavées afin d'éliminer les bactéries extracellulaires, puis on été incubées dans du milieu CO_2l. La croissance bactérienne a été évaluée par mesure de la fluorescence de la protéine mCherry à 37°C. Les courbes représentent la moyenne de fluorescence obtenue dans trois puits pour une expérience. La moyenne est représentée entourée de la valeur de l'écart-type. Les données représentent une ou deux expériences indépendantes.

Les **figures 77A** et **77B** montrent quant à elles que la croissance des souches Paris et Lens est nettement diminuée dans des macrophages U937 prétraités avec LL-37 ou HBD-3. Ensemble, ces résultats indiquent que ces deux peptides sont capables d'inhiber la réplication intracellulaire des légionelles malgré l'absence de leur activité bactéricide directe en milieu extracellulaire. Deux hypothèses sont alors envisageables pour expliquer l'activité intracellulaire des peptides LL-37 et HBD-3 : (i) les peptides sont internalisés par la cellule hôte puis sont redirigés vers la vacuole de phagocytose contenant *Legionella*, où ils exercent leur activité bactéricide directe ou (ii) les peptides induisent/répriment un processus cellulaire permettant de limiter la multiplication des bactéries.

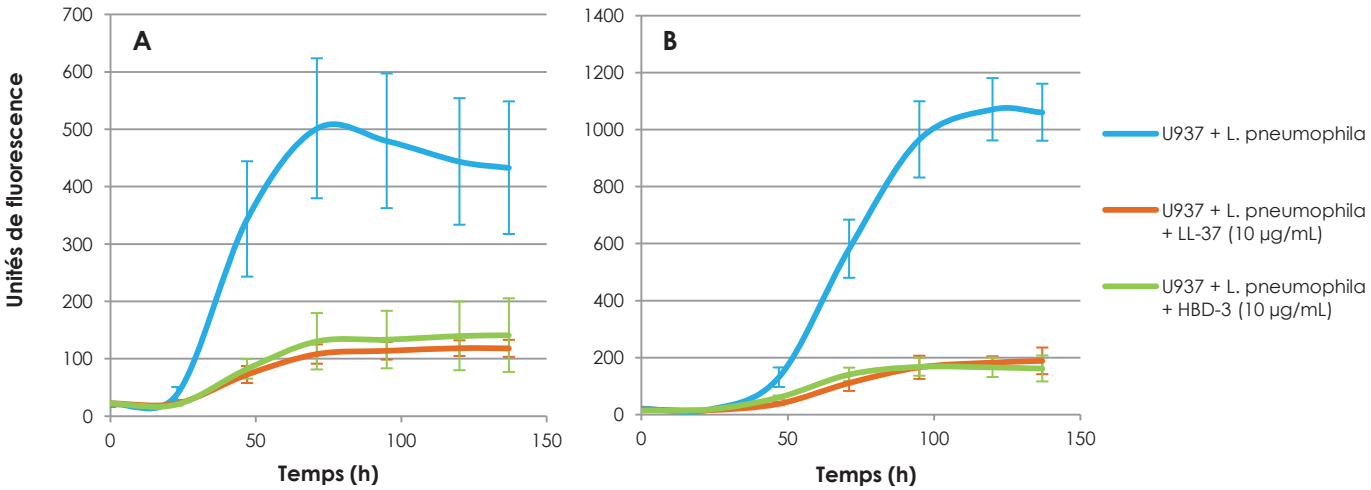


Figure 77. Croissance intracellulaire de *L. pneumophila* dans les macrophages U937 pré-incubés avec les peptides. Les macrophages U937 ont été prétraités avec 10µg/mL de LL-37 ou HBD-3 pendant 3h à 37°C, puis lavées afin d'éliminer les peptides. Les cellules ont ensuite été infectées pendant 2h à 37°C avec une suspension de la souche Paris (A) ou de la souche Lens (B) à une MOI=10. Les cellules ont été lavées afin d'éliminer les bactéries extracellulaires, puis on été incubées dans du milieu CO_2I. La croissance bactérienne a été évaluée par mesure de la fluorescence de la protéine mCherry à 37°C. Les courbes représentent la moyenne de fluorescence obtenue dans trois puits pour une expérience. La moyenne est représentée entourée de la valeur de l'écart-type. Les données représentent deux expériences indépendantes.

II.2.2 Localisation des peptides au cours de l'infection

II.2.2.1 Localisation de LL-37 dans les macrophages U937 et les pneumocytes A549

Dans un premier temps, nous avons réalisé un immunomarquage du peptide LL-37 afin d'évaluer par microscopie confocale l'internalisation du peptide amené de façon exogène dans les macrophages U937 et les pneumocytes A549. Pour cela, les cellules ont été incubées pendant 3h à 37°C en absence ou en présence de LL-37, puis lavées et marquées à l'aide d'un anticorps primaire dirigé contre le peptide. Les macrophages incubés en absence de LL-37 exogène présentent un marquage léger et diffus, témoin de l'expression endogène du peptide (**Figure 78A**). Les macrophages incubés en présence de LL-37 exogène affichent quant à eux un marquage beaucoup moins diffus et concentré dans ce qui semble être des vésicules (**Figure 78B**). De même, un marquage diffus ou vésiculaire est observé dans les pneumocytes A549 incubés en absence ou en présence de LL-37 exogène, respectivement (**Figures 78C et 78D**).

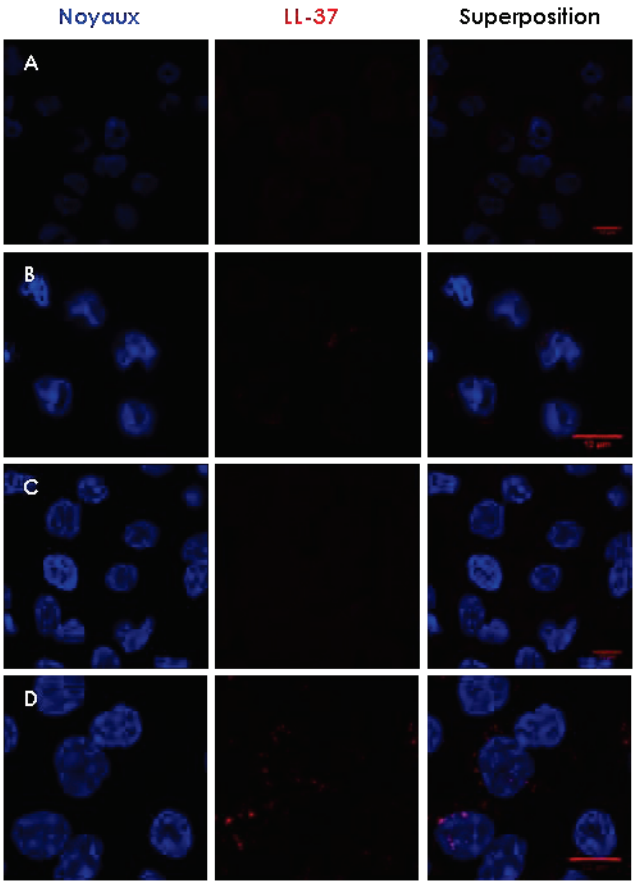


Figure 78. Immunomarquage de LL-37 dans les macrophages U937 et le pneumocytes A549. Les macrophages U937 (A et B) et les pneumocytes A549 (C et D) ont été incubés en absence (A et C) ou en présence (B et D) de LL-37 exogène (10 µg/mL) pendant 3h à 37°C. Les cellules ont ensuite été lavées puis le peptide a été marqué à l'aide d'un anticorps primaire monoclonale dirigé contre LL-37 et d'un anticorps secondaire l'AlexaFluor® 546 (rouge). Le noyau des cellules a été marqué au DAPI (bleu).

De plus l'internalisation du peptide exogène par les macrophages U937 a également été démontrée grâce à l'utilisation de LL-37 marqué au TAMRA (**Figure 79**). Ces résultats suggèrent donc que LL-37 est internalisé dans des vésicules par les macrophages U937 et les pneumocytes A549.

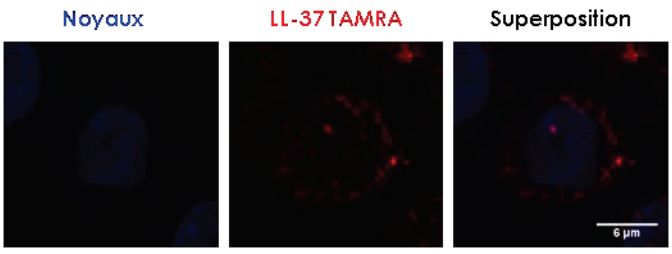


Figure 79. Localisation de LL-37 marqué au TAMRA dans les macrophages U937. Les macrophages U937 en présence de LL-37 marqué au TAMRA (10 µg/mL) pendant 2h à 37°C. Les cellules ont ensuite été lavées et le noyau des cellules a été marqué au DAPI.

Dans un second temps, les macrophages U937 ont été infectés avec la souche *L. pneumophila* Paris exprimant la GFP en présence de peptide LL-37 marqué au TAMRA. Les bactéries extracellulaires ont ensuite été marquées à l'aide d'un anticorps primaire anti-*Legionella* afin de les distinguer des bactéries intracellulaires. Les observations en microscopie confocale montrent alors qu'environ 18,5% des légionelles intracellulaires colocalisent avec LL-37 (**Figure 80A**). Des résultats similaires sont obtenus lorsque le peptide marqué est ajouté sur des macrophages préalablement infectés puis lavés. Dans ces conditions, environ 12% des bactéries intracellulaires colocalisent avec LL-37 (**Figure 80B**). Ces différentes observations suggèrent alors que le peptide LL-37est internalisé par la cellule hôte, où il est capable de colocaliser avec *L. pneumophila*.

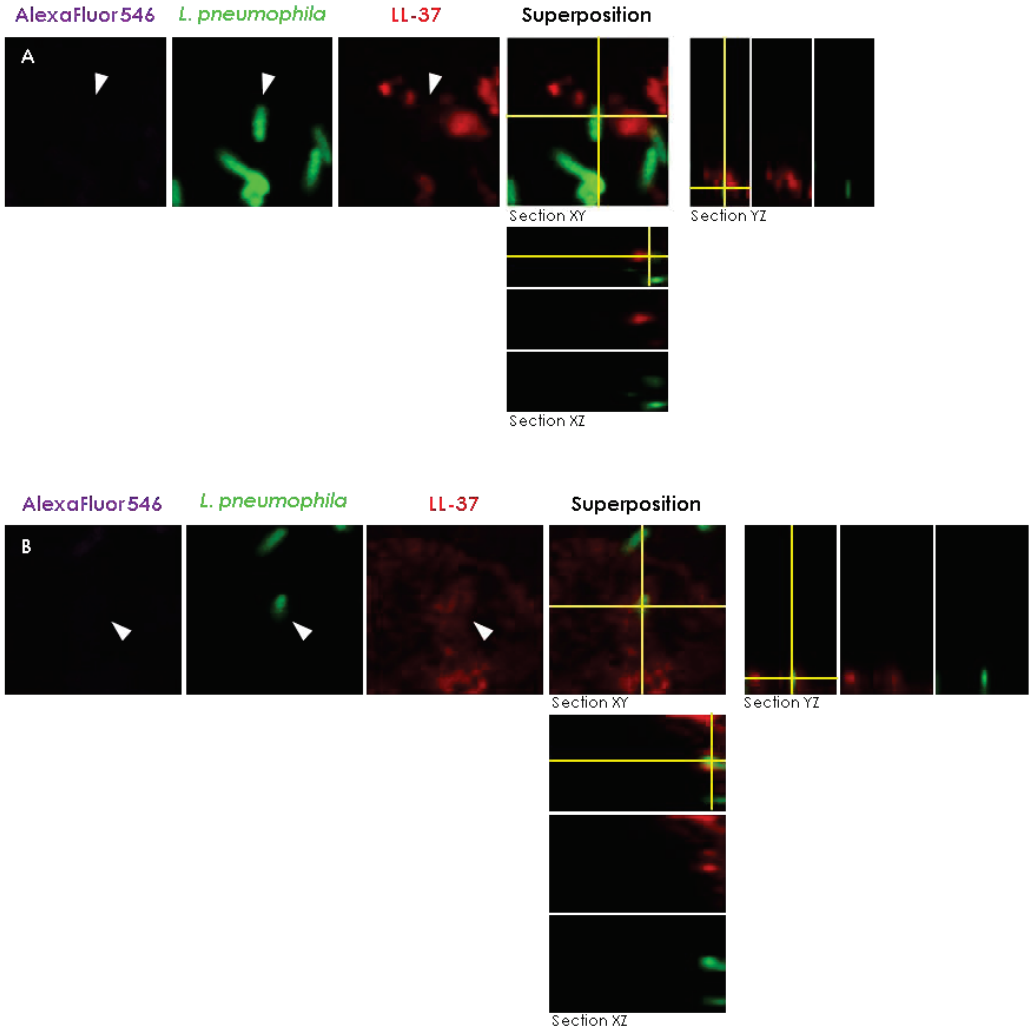


Figure 80. Colocalisation de LL-37 avec *L. pneumophila* dans les macrophages U937. (A) Les macrophages U937 ont été infectés pendant 2h avec la souche *L. pneumophila* Paris exprimant la GFP en présence de LL-37 marqué au TAMRA. (B) Les macrophages U937 ont été incubés pendant 2h avec le peptide LL-37 marqué au TAMRA, puis lavés et infectés pendant 2h avec souche *L. pneumophila* Paris exprimant la GFP. Suite à l'infection, les cellules ont été lavées puis les bactéries extracellulaires ont été marquées à l'aide d'un anticorps primaire anti-*Legionella* et d'un anticorps secondaire AlexaFluor® 647 afin de les distinguer des bactéries intracellulaires. Les flèches blanches indiquent la présence de bactéries intracellulaires colocalisant avec LL-37. Les droites jaunes représentent les sections orthogonales.

II.2.2.2 Localisation de HBD-3 dans les macrophages U937 et les pneumocytes A549

Nous avons également réalisé l'immunomarquage de HBD-3 afin d'évaluer son internalisation par les macrophages U937 et les pneumocytes A549. Le protocole de marquage du peptide est le même que celui appliqué pour le marquage de LL-37, la seule différence étant l'utilisation d'un anticorps primaire polyclonal dirigé contre HBD-3. Les macrophages non traités présentent un marquage diffus, témoin de l'expression endogène du peptide (**Figure 81A**). Curieusement, les macrophages incubés en présence de HBD-3 exogène affichent également un marquage diffus, comparable à celui des macrophages non traités (**Figure 81B**). Ce type de marquage est également retrouvé dans les pneumocytes A549 incubés ou non en présence de HBD-3 exogène (**Figures 81C et 81D**). Il nous est donc difficile de déterminer si le peptide ajouté de manière exogène est internalisé ou non par les cellules.

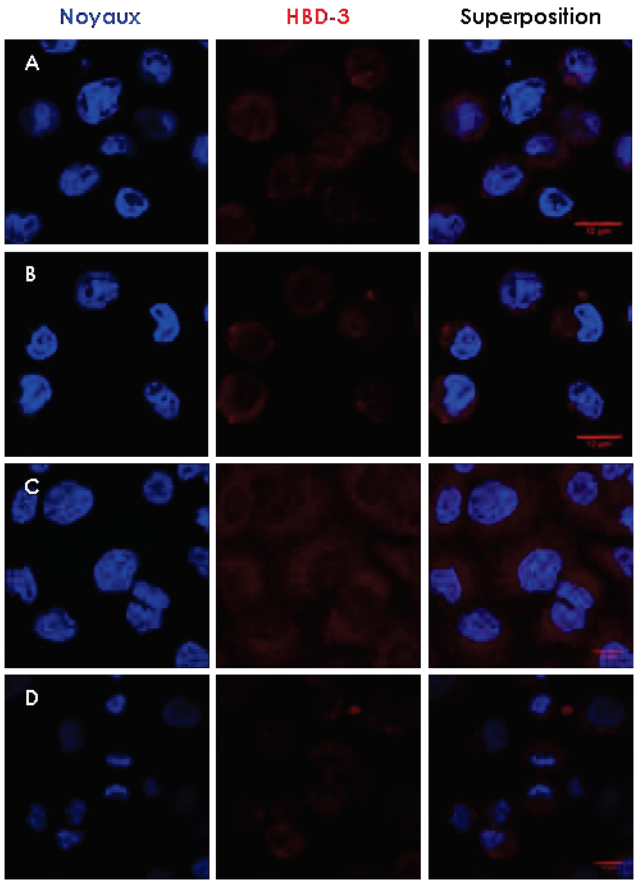


Figure 81. Immunomarquage de HBD-3 dans les macrophages U937 et le pneumocytes A549. Les macrophages U937 (A et B) et les pneumocytes A549 (C et D) ont été incubés en absence (A et C) ou en présence (B et D) de HBD-3 exogène (10 µg/mL) pendant 3h à 37°C. Les cellules ont ensuite été lavées puis le peptide a été marqué à l'aide d'un anticorps primaire polyclonal dirigé contre HBD-3 et d'un anticorps secondaire l'AlexaFluor ® 546 (rouge). Le noyau des cellules a été marqué au DAPI (bleu).

II.2.3 Effet de LL-37 et HBD-3 sur les étapes clé du cycle infectieux de *L. pneumophila*

Notre deuxième hypothèse quant au mécanisme d'action de LL-37 et HBD-3 est que ces peptides induisent ou répriment un processus cellulaire permettant d'inhiber la réplication de *L. pneumophila*. Nous avons alors tenté d'identifier à quelle(s) étape(s) du cycle infectieux de la bactérie ces peptides interviennent, en évaluant leur effet sur l'adhésion, l'internalisation, l'échappement à la voie endosomale et le recrutement du réticulum endoplasmique.

II.2.3.1 Effet des peptides sur l'adhésion de L. pneumophila

L'adhésion des souches Paris et Lens aux pneumocytes A549 et aux macrophages U937 a été évaluée en absence ou en présence des peptides LL-37 et HBD-3. Pour cela, les cellules ont été infectées par les légionelles pendant 2h an absence ou en présence de peptides, puis lavées et lysées par choc osmotique. Le lysat a ensuite été ensemencé sur milieu BCYE, et les UFC ont été comptées après 3 jours d'incubation à 37°C. L'efficacité d'adhésion des bactéries a été déterminée par calcul du ratio du nombre d'UFC exposées aux peptides sur le nombre d'UFC non traitées. L'adhésion de *L. pneumophila* aux pneumocytes et aux macrophages n'est pas affectée en présence du peptide LL-37, quel que soit la souche considérée (**Figure 82**).

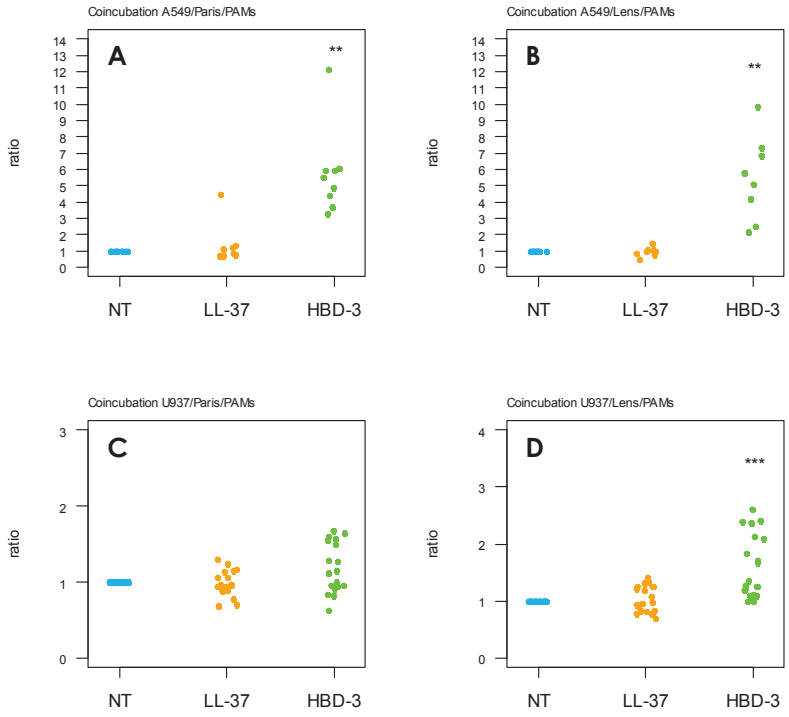


Figure 82. Test d'adhésion de *L. pneumophila* en coincubation avec LL-37 ou HBD-3. Les pneumocytes A549 (A et B) ou les macrophages U397 (C et D) ont été infectés pendant 2h avec de la souche Paris (A et C) ou la souche Lens (B et D) à une MOI=10 en absence (NT) ou en présence de 10 µg/mL de LL-37 ou HBD-3. Les cellules ont été lavées puis lysées par choc osmotique. Le lysat a été ensemencé sur milieu BCYE et incubé 72h à 37°C. Les données représentent trois ou quatre expériences indépendantes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

De manière surprenante, l'adhésion des souches Paris et Lens aux pneumocytes A549 semble stimulée par HBD-3. En effet, la présence du peptide permet d'augmenter en moyenne par 6 et par 5 l'efficacité d'adhésion des souches Paris et Lens, respectivement. Ce phénotype est également observé pour l'adhésion de la souche Lens aux macrophages U937, cependant dans des proportions bien moindres. En revanche, l'adhésion de la souche Paris aux macrophages ne semble pas modifiée de façon significative en présence de HBD-3. Des tests d'adhésion ont également été réalisés avec des pneumocytes A549 prétraités pendant 3h avec LL-37 ou HBD-3. Comme précédemment, LL-37 n'affecte pas l'adhésion des légionelles aux pneumocytes, contrairement à HBD-3 qui augmente en moyenne de 6 et 3 fois l'efficacité d'adhésion des souches Paris et Lens, respectivement (**Figure 83**).

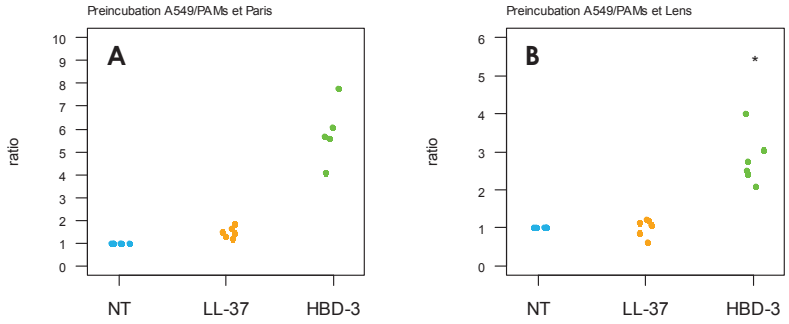


Figure 83. Test d'adhésion de *L. pneumophila* aux cellules pré-incubation avec LL-37 ou HBD-3. Les pneumocytes A549 ont été pré-incubés en absence (NT) ou en présence de 10 µg/mL de LL-37 ou HBD-3, puis lavés et infectés pendant 2h avec de la souche Paris (A) ou la souche Lens (B) à une MOI=10. Les cellules ont été lavées puis lysées par choc osmotique. Le lysat a été ensemencé sur milieu BCYE et incubé 72h à 37°C. Les données représentent trois expériences indépendantes. ND : non déterminé. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Enfin, Des tests d'adhésion aux pneumocytes A549 ont été réalisés avec des légionelles prétraitées pendant 1h avec LL-37 ou HBD-3. Une fois encore, LL-37 n'affecte pas l'adhésion des légionelles, tandis que l'efficacité d'adhésion des souches Paris et Lens est doublée grâce à HBD-3 (**Figure 84**).

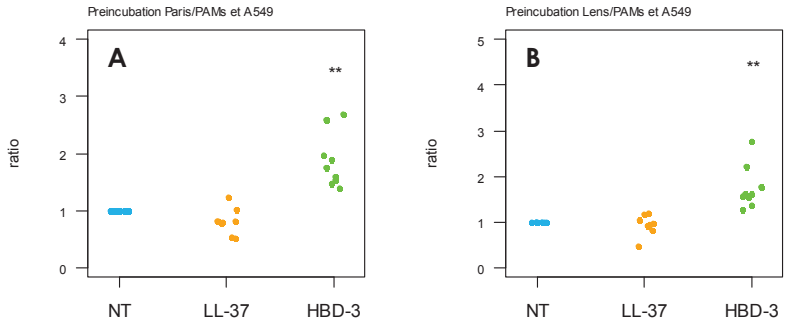


Figure 84. Test d'adhésion de *L. pneumophila* pré-incubée avec LL-37 ou HBD-3. Les pneumocytes A549 ont été infectés à une MOI=10 pendant 2h avec de la souche Paris (A) ou la souche Lens (B) pré-incubée en absence (NT) ou en présence de 10 µg/mL de LL-37 ou HBD-3. Les cellules ont été lavées puis lysées par choc osmotique. Le lysat a été ensemencé sur milieu BCYE et incubé 72h à 37°C. Les données représentent quatre expériences indépendantes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Par ailleurs, l'adhésion de la souche Paris aux pneumocytes A549 a été évaluée par microscopie confocale ou par épifluorescence. Pour cela, les cellules ont été infectées à MOI 100 pendant 2h avec des légionelles exprimant la GFP, le tout en absence ou en présence de HBD-3. Les cellules ont ensuite été lavées et leur noyau a été marqué au DAPI. En absence de traitement, chaque cellule compte en moyenne 0.62 légionelles adhérées à sa surface, contre 2.21 en présence de HBD-3, soit environ 3.5 fois plus (**Figure 85**). Les observations de microscopie confirment donc la stimulation de l'adhésion de la souche Paris aux pneumocytes en présence du peptide HBD-3. Les observations ont également été réalisées avec des légionelles préalablement tuées au PFA. EN absence du peptide, chaque cellule compte à leur surface en moyenne 0.53 légionelles, contre 4.02 en présence de HBD-3, soit environ 7.6 fois plus. Ces observations indiquent donc que le peptide HBD-3 stimule l'adhésion des légionelles, que celles-ci soient vivantes ou mortes. Afin de tester la spécificité de ce phénotype, les tests d'adhésion ont été réalisés avec une souche d'*E. coli* exprimant la GFP. En absence de peptide, chaque cellule compte en moyenne 0.24 bactéries à leur surface, contre 0.65 en présence de HBD-3, soit environ 2.7 fois plus. Le peptide augmente également l'adhésion des *E. coli* préalablement tués au PFA, les pneumocytes comptant en moyenne 8.3 fois plus de bactéries à leur surface en présence de HBD-3. Pris ensemble, ces résultats suggèrent d'une part que l'augmentation de l'adhésion induite par HBD-3 n'est pas spécifique au genre *Legionella,* et d'autre part que ce processus ne dépend pas de la viabilité des bactéries.

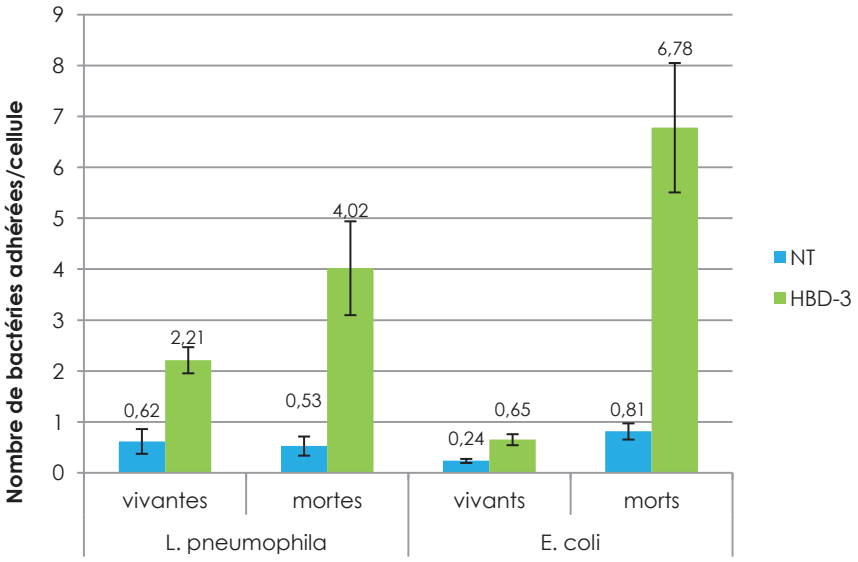


Figure 85. Adhésion de *L. pneumophila* et *E. coli* aux pneumocytes A549. Les pneumocytes A549 ont été infectés par *L. pneumophila* ou *E. coli* exprimant la GFP à MOI100 pendant 2h en absence ou en présence de HBD-3 (10 µg/mL). Les cellules ont été lavées et leur noyau marqué au DAPI. Le nombre de bactérie (vivantes ou préalablement tuées au PFA) adhérées aux cellules a été évalué par microscopie confocale ou à épifluorescence. Les données représentent la moyenne du nombre de bactéries adhérées par cellules, encadrée par la valeur de l'écart-type. Pour chaque condition, plus d'un millier de cellules ont été prises en compte. Les données représentent trois expériences indépendantes pour l'adhésion des légionelles, ou une expérience pour l'adhésion d'*E. coli*.

II.2.3.2 Effet des PAMs sur l'internalisation/survie de L. pneumophila

L'internalisation des souches Paris et Lens aux pneumocytes A549 et aux macrophages U937 a été évaluée en absence ou en présence de LL-37 et HBD-3. Pour cela, une partie des cellules ont été traitées à la cytochalasine D, un inhibiteur de la polymérisation de l'actine, afin de réaliser un contrôle négatif d'internalisation. Les cellules ont ensuite été lavées puis infectées avec les légionelles pendant 2h an absence ou en présence de peptides. Après de nouveaux lavages, les cellules ont été traitées à la gentamicine afin de tuer les bactéries extracellulaires. Les cellules ont ensuite été lavées, puis lysées par choc osmotique. Le lysat a été ensemencé sur milieu BCYE, et les UFC ont été comptées après 3 jours d'incubation à 37°C. L'efficacité d'internalisation des bactéries a été déterminée par calcul du ratio du nombre d'UFC exposées aux peptides ou à la cytochalasine sur le nombre d'UFC non traitées. Comme attendu, l'internalisation des souches Paris et Lens est diminuée dans les pneumocytes et les macrophages prétraités à la cytochalasine (**Figure 86**).

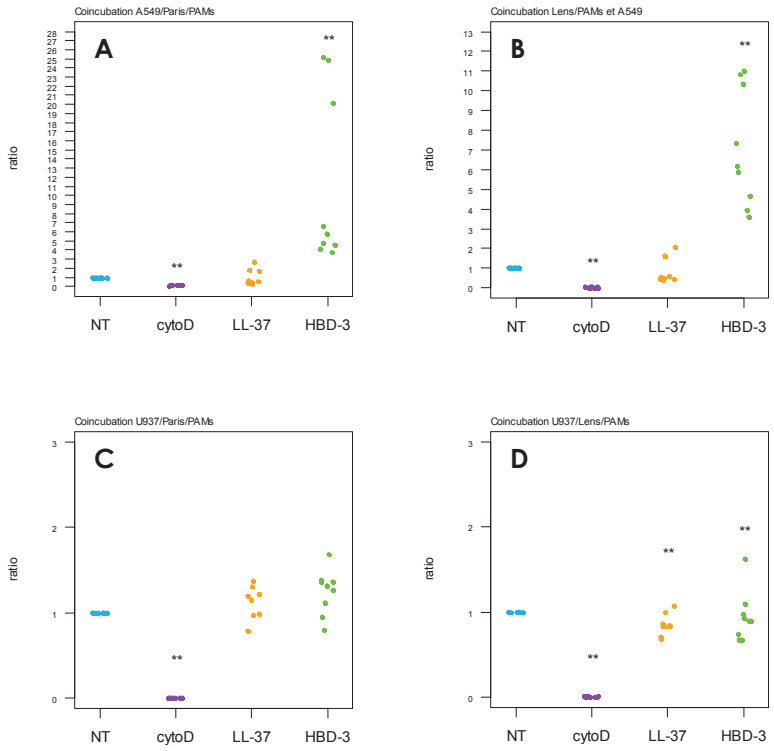


Figure 86. Test d'internalisation de *L. pneumophila* en coincubation avec LL-37 ou HBD-3. Les pneumocytes A549 (A et B) ou les macrophages U397 (C et D) ont été infectés pendant 2h avec de la souche Paris (A et C) ou la souche Lens (B et D) à une MOI=10 en absence (NT) ou en présence de 10 µg/mL de LL-37 ou HBD-3. Les cellules ont été lavées, traitées pendant 2h avec 200 µg/mL de Gentamycine puis lavées. Les cellules ont été lysées par choc osmotique et le lysat a été ensemencé sur milieu BCYE et incubé 72h à 37°C. Les données représentent trois expériences indépendantes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

L'internalisation des légionelles dans les pneumocytes A549 n'est pas affectée par le peptide LL-37. De même, LL-37 ne modifie pas l'internalisation de la souche Paris dans les macrophages U937, tandis que l'internalisation de la souche Lens semble légèrement diminuée. La présence du peptide HBD-3 semble quant à elle stimuler l'internalisation de *L. pneumophila* dans les pneumocytes A549, le nombre de légionelles intracellulaires étant en moyenne multiplié par 11 et par 7 pour les souches Paris et Lens, respectivement. L'internalisation de ces souches dans les macrophages ne semble cependant pas affectée par HBD-3. Des tests d'internalisation ont également été réalisés avec des pneumocytes préincubés avec les peptides puis lavés. L'internalisation de la souche Paris est équivalente dans les pneumocytes non traités et les pneumocytes préincubés avec LL-37, tandis que l'internalisation de la souche Lens semble légèrement diminuée (**Figure 87**). Le prétraitement des pneumocytes avec HBD-3 n'a quant à lui pas d'effet significatif sur la capacité d'internalisation des légionelles. D'une manière générale, les résultats de coincubation suggèrent que le peptide LL-37 n'a que peu voire pas d'effet sur l'internalisation de *L. pneumophila* par les pneumocytes ou les macrophages, tandis que HBD-3 augmente l'internalisation des bactéries dans les pneumocytes uniquement.

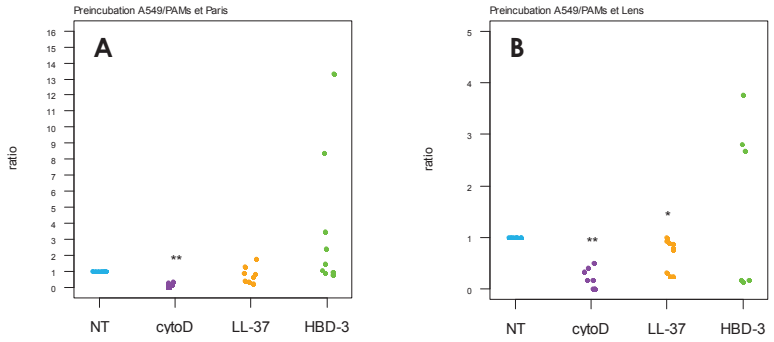


Figure 87. Test d'internalisation de *L. pneumophila* dans les cellules pré-incubation avec LL-37 ou HBD-3. Les pneumocytes A549 ont été pré-incubés en absence (NT) ou en présence de 10 µg/mL de LL-37 ou HBD-3, puis lavés et infectés pendant 2h avec de la souche Paris (A) ou la souche Lens (B) à une MOI=10. Les cellules ont été lavées, traitées pendant 2h avec 200 µg/mL de Gentamycine puis lavées. Les cellules ont été lysées par choc osmotique et le lysat a été ensemencé sur milieu BCYE et incubé 72h à 37°C. Les données représentent trois expériences indépendantes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

II.2.3.3 Effet des PAMs sur l'inhibition de la fusion phagosome/lysosome

L'échappement à la voie endosomale est une étape cruciale du cycle intracellulaire de *L. pneumophila*. Pour déterminer l'impact des peptides LL-37 et HBD-3 sur cette étape du cycle infectieux, des tests de colocalisation des légionelles avec la protéine LAMP-1 spécifique du lysosome (*lysosome-associated membrane protein-1*) ont été mis au point au cours de cette étude. Pour cela, des macrophages U937 ont été infectés MOI 100 pendant 6h avec des légionelles exprimant la GFP, le tout en absence ou en présence des peptides. Le noyau des cellules a été marqué au DAPI et la protéine LAMP-1 a été immunomarquée. Les observations en microscopie confocale montrent que le marquage de LAMP-1 dans des macrophages non traités apparait sous forme de petites vésicules (**Figure 88A**). Ce phénotype est retrouvé chez tous les macrophages, quel que soit leur traitement. L'effet des peptides a été évalué par calcul du pourcentage de légionelles colocalisant avec la protéine LAMP-1. Ainsi, en absence de peptide, la protéine LAMP-1 colocalise avec 5.9 % des bactéries non traitées, et avec 16.3 % des bactéries préalablement tuées au PFA (**Figure 88B**). En présence du peptide LL-37, la protéine lysosomale est recrutée autour de 7 % des légionelles, alors qu'en présence du peptide HBD-3, l'accumulation de LAMP-1 est détectée autour de 17.9 % des bactéries. Les expérimentations doivent être répétées avant de pouvoir réaliser les analyses statistiques, cependant il semblerait que contrairement à LL-37, HBD-3 induit le recrutement du lysosome au niveau de la LCV.

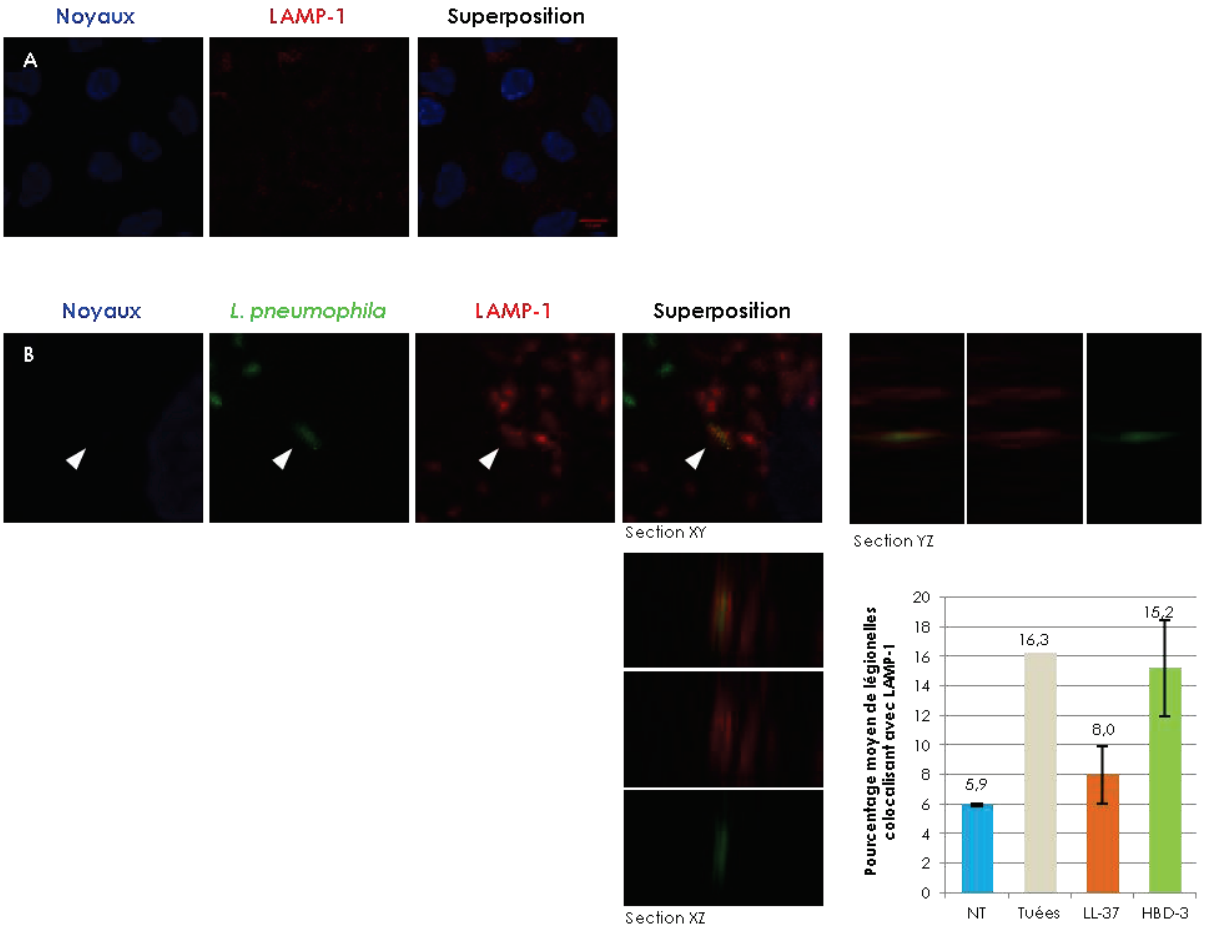


Figure 88. Immunomarquage de LAMP-1 et colocalisation avec *L. pneumophila* dans les macrophages U937. (A) La protéine lysosomale LAMP-1 a été immunomarquée (rouge) dans les macrophages U937 et le noyau des cellules a été marqué au DAPI (bleu). (B) Les macrophages U937 ont été infectés à MOI 100 pendant 6h avec la souche *L. pneumophila* Paris exprimant la GFP en présence de LL-37 ou HBD-3 (10 µg/mL). Les cellules ont été lavées, puis la protéine LAMP-1 a été immunomarquée et le noyau des cellules a été marqué au DAPI. Les flèches blanches indiquent le présence de colocalisation légionelle/LAMP-1. Un graphique indique le pourcentage moyen de bactéries colocalisant avec la protéine LAMP-1. Les données représentent une expérience.

II.2.3.4 Effet des PAMs sur le recrutement du réticulum endoplasmique

Le recrutement du RE est une étape indispensable dans le processus de biogénèse de la LCV. Pour évaluer l'effet de LL-37 et HBD-3, des tests de colocalisation des légionelles avec la calnexine, une protéine spécifique du RE, ont été mis au point au cours de cette étude. Des macrophages U937 ont été infectés MOI 100 pendant 4h avec des légionelles exprimant la GFP, le tout en absence ou en présence des peptides. Le noyau des cellules a été marqué au DAPI et la calnexine a été immunomarquée. Nous n'avons cependant pas pu réaliser de numération de la colocalisation légionelles/calnexine durant cette étude. En effet, les macrophages présentaient un défaut d'adhésion qui entrainait la perte d'un grand nombre d'entre eux au cours des différents lavages. Nous avons tout de même réalisés quelques

clichés du marquage de la calnexine par microscopie confocale. Les macrophages non traités montrent un marquage léger et diffus de la calnexine, parfois concentré sous forme de vésicules (**Figure 89A**). Ce type de distribution de la calnexine est également observé dans les macrophages infectés par *L. pneumophila*, en plus d'une accumulation de la protéine sur un coté du noyau de la cellule (**Figure 89B**).

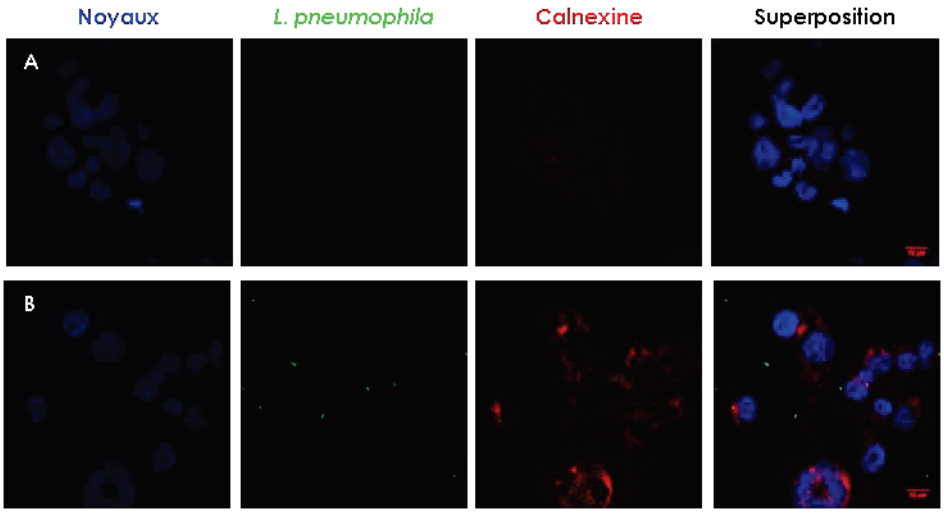


Figure 89. Immunomarquage de la calnexine dans les macrophages U937. Les macrophages U937 ont été incubés pendant 4h en absence (A) ou en présence (B) de la souche *L. pneumophila* exprimant la GFP. Les cellules ont ensuite été lavées puis la calnexine a été immunomarquée (rouge) et le noyau des cellules a été marqué au DAPI (bleu).

Bilan de l'activité anti-*Legionella* des peptides LL-37 et HBD-3

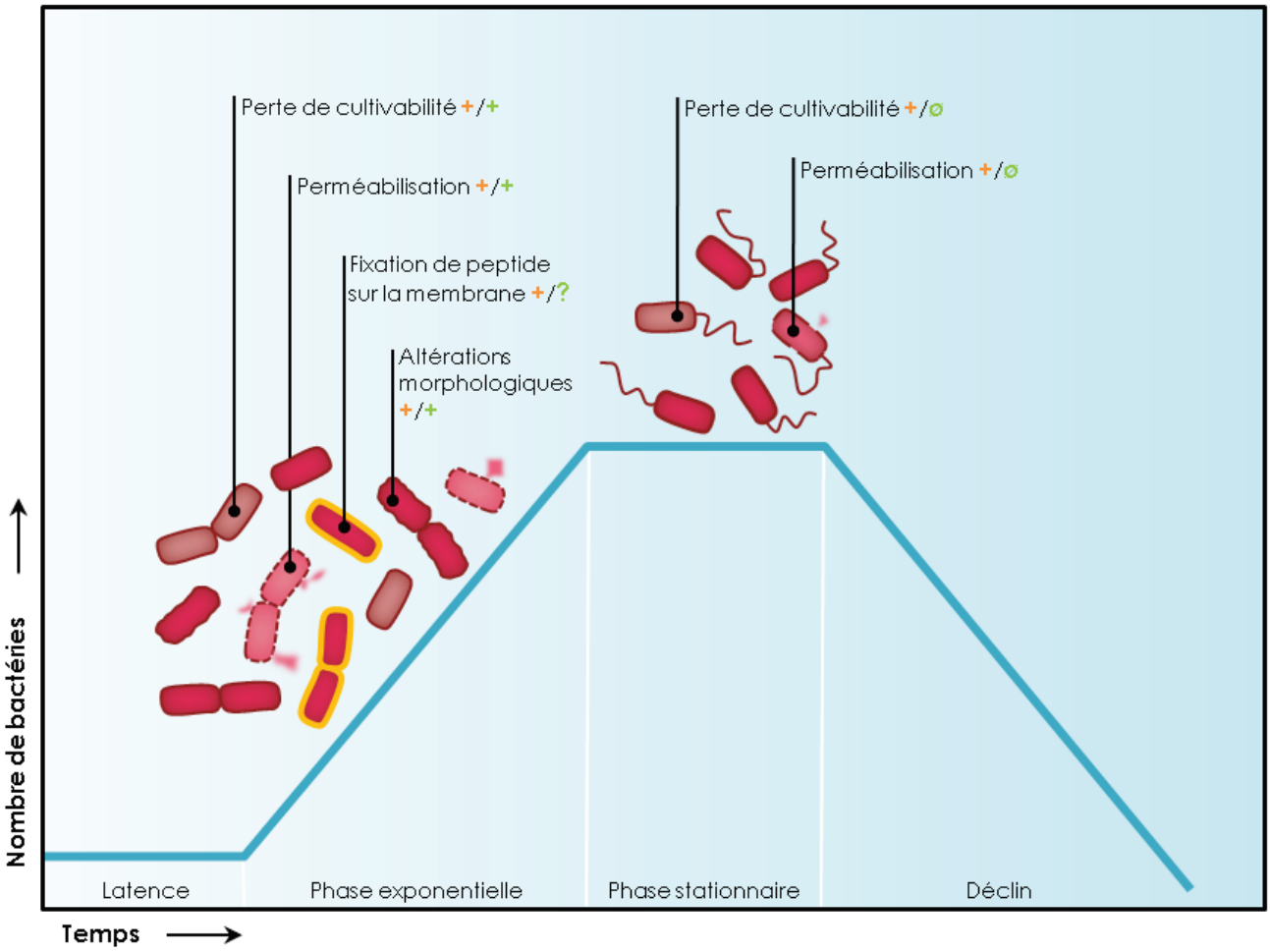


Figure 90. Bilan des activités antimicrobiennes directes des peptides LL-37 et HBD-3 contre *L. pneumophila* en milieu extracellulaire.
+ : présence de l'activité antimicrobienne
Ø : absence de l'activité antimicrobienne
? : présence/absence de l'activité antimicrobienne à déterminer
Les activités antibactériennes des peptides LL-37 et HBD-3 sont indiquées en orange et vert, respectivement.

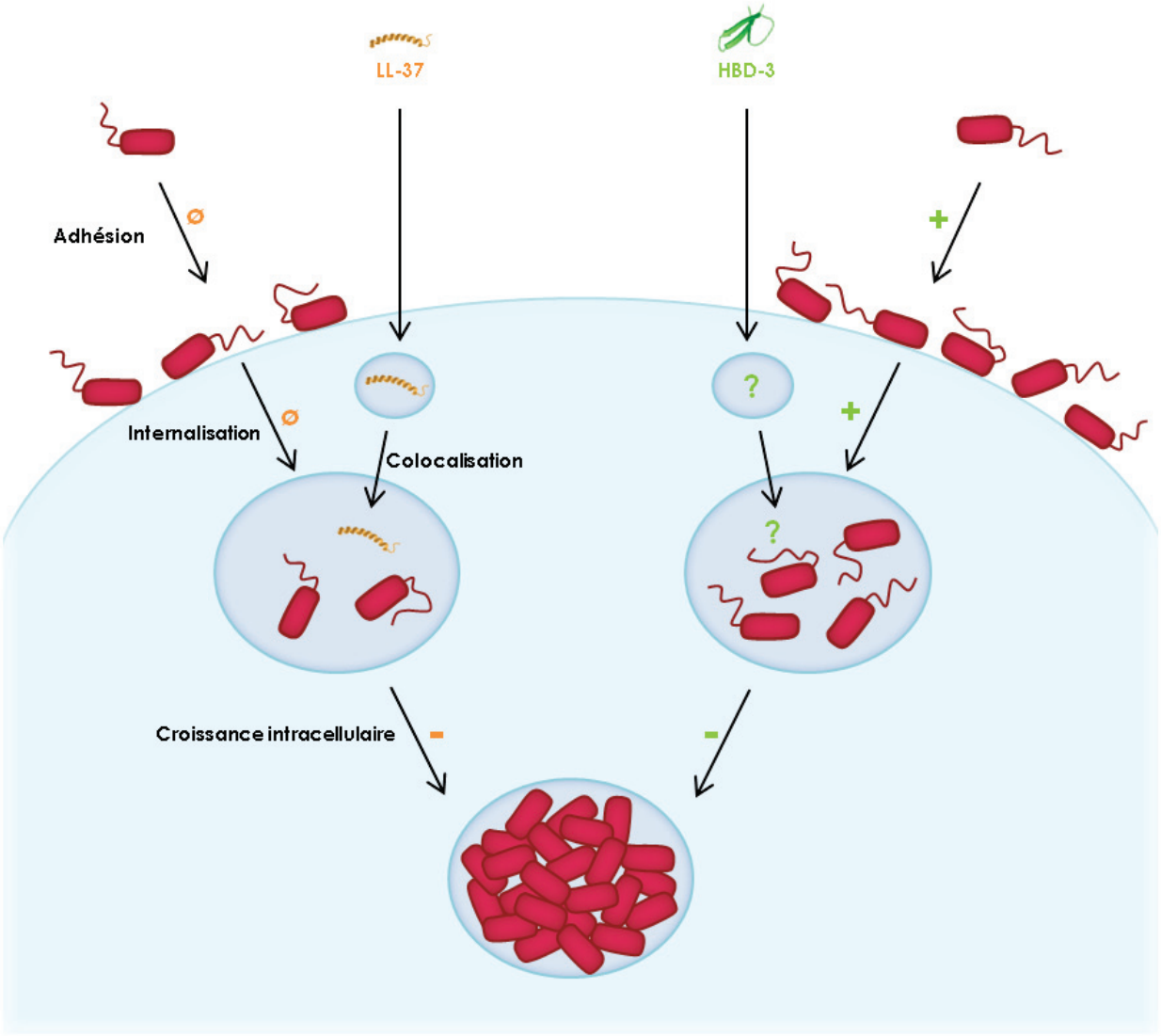


Figure 91. Bilan de l'effet des peptides LL-37 et HBD-3 sur le cycle infectieux de *L. pneumophila*.
+ : stimulation
- : inhibition
ø : absence d'effet
? : effet à déterminer.
Les effets des peptides LL-37 et HBD-3 sont indiquées en orange et vert, respectivement.

Discussion

La première partie de cette étude a été consacrée à l'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques de souches cliniques de *L. pneumophila* sérogroupe 1. Ces travaux ont permis, d'une part, de montrer que l'ensemble des isolats sont sensibles aux 8 antibiotiques testés (ciprofloxacine, moxifloxacine, lévofloxacine, érythromycine, azithromycine, clarithromycine, doxycycline et rifampicine) par comparaison avec des souches résistantes aux antibiotiques sélectionnées *in vitro*, et d'autre part, de déterminer les seuils épidémiologiques de sensibilité (ECOFFS) pour chacun de ces antibiotiques à l'aide d'une méthode de microdilution en milieu liquide sans charbon. La distribution des CMI a également permis de mettre en évidence l'existence d'une sous-population de souches présentant une sensibilité réduite aux macrolides, liée à la présence de la pompe à efflux LpeAB. Cette pompe à efflux est distribuée de façon spécifique dans 3 clades : les souches ST1, ST701, ST1335 et leurs variants proches. Ce phénomène de variabilité de sensibilité entre souches bactériennes a également été décrit pour les PAMs, notamment a l'encontre de *S. aureus*, *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* et *Peptostreptococcus micros* (**Figure 92**) (Midorikawa *et al.* 2003; Brissette *et al.* 2004; Joly *et al.* 2004; Ouhara *et al.* 2008; Bayer *et al.* 2015; Jin *et al.* 2016).

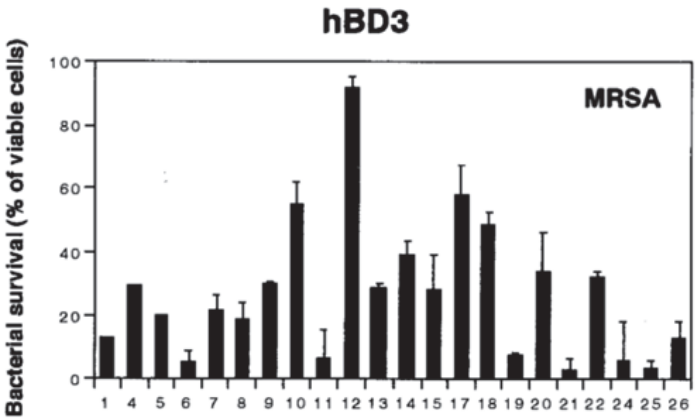


Figure 92. Sensibilité à HBD-3 d'isolats cliniques de *S. aureus* (Midorikawa *et al.* 2003). La sensibilité à la défensine humains HBD-3 a été évaluée pour 22 souches cliniques de *S. aureus* résistantes à la méticilline. Chaque souche a été resuspendue dans du tampon et incubée pendant 2h avec 1 µg/mL de peptide avant d'être ensemencée sur gélose. La proportion de bactéries viable par rapport à l'inoculum de départ est exprimée en pourcentage.

A l'image de nos résultats sur les antibiotiques, certaines études ont montré que la sensibilité réduite aux PAMs observée chez certaines souches est corrélée à la présence d'un mécanisme de résistance. Citons comme exemple les travaux d'une équipe suédoise, portant sur la sensibilité aux α-défensines de souches cliniques de *S. aureus* issues de prélèvements de portage nasal (Jin *et al.* 2004). Dans cette étude, les auteurs ont montré que les souches les moins sensibles sécrètent une protéine, la staphylokinase (SAK), capable

d'inactiver les défensines HNP-1 et HNP-2 via la formation de complexes SAK/défensine (Jin *et al.* 2004). Dans la littérature, les mécanismes moléculaires impliqués dans la diminution de la sensibilité aux PAMs de certaines souches bactériennes restent relativement peu investigués. Nous pouvons néanmoins imaginer que certains d'entre eux repose sur l'efflux des peptides. Les pompes à efflux jouent en effet un rôle essentiel dans la résistance aux PAMs de nombreux pathogènes, dont *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, K. pneumoniae, *S.* Typhimurium et *Y. enterocolitica* (Parra-Lopez *et al.* 1993; Shafer *et al.* 1998; Bengoechea & Skurnik 2000; Tzeng *et al.* 2005; Padilla *et al.* 2010; Zähner *et al.* 2010; Shelton *et al.* 2011; Blodkamp *et al.* 2016; Kandler *et al.* 2016). De plus, elles possèdent une spécificité de substrats variable, certaines étant capables d'éliminer différents types de PAMs (d'origine humaine ou animale) ainsi que des antibiotiques (Tzeng *et al.* 2005; Padilla *et al.* 2010; Zähner *et al.* 2010; Shelton *et al.* 2011), tandis que d'autres semblent posséder un spectre de substrats réduit à quelques peptides (Rinker *et al.* 2012; Blodkamp *et al.* 2016), à l'instar de la pompe LpeAB qui semble spécifique des macrolides. Il serait alors intéressant d'étudier le rôle de cette pompe à efflux dans la protection de *L. pneumophila* contre les PAMs humains.

La seconde partie de cette étude décrit l'activité antibactérienne et le mode d'action des PAMs humains LL-37 et HBD-3 contre *L. pneumophila*. L'effet de ces peptides a été évalué en milieu extracellulaire, mais également au cours du cycle infectieux de la bactérie. Nos travaux ont permis de mettre en évidence une activité bactéricide directe de LL-37 et HBD-3 à l'encontre des légionelles, vraisemblablement par interaction avec la membrane bactérienne. Les images de microscopie électronique à transmission ont en effet révélé d'importantes altérations membranaires, et bien que chaque peptide induise des dommages bien distincts, il semblerait que tout deux compromettent l'intégrité des membranes de *L. pneumophila*. Cette hypothèse est par ailleurs corroborée par les analyses de cytométrie en flux réalisées avec ces peptides, suggérant qu'ils perméabilisent les membranes des légionelles. De plus, nos travaux ont souligné l'importance du gène *rcp* dans la résistance de la souche *L. pneumophila* Paris contre le peptide LL-37, durant la phase stationnaire de croissance de la bactérie. L'étude de l'effet des PAMs humains au cours du cycle infectieux des légionelles a quant à elle permit de montrer que les peptides LL-37 et HBD-3 sont capables d'inhiber la réplication intracellulaire de *L. pneumophila*, au moins en partie grâce à un mécanisme indépendant de leur activité bactéricide directe en milieu extracellulaire. Lors de la caractérisation de ce mécanisme, nous avons notamment observé l'internalisation de LL-37 et sa colocalisation avec *L. pneumophila* au sein des macrophages, ainsi que l'induction par HBD-3 de l'adhésion et de l'internalisation des légionelles dans les pneumocytes. D'une manière générale, nos résultats suggèrent que les peptides LL-37 et HBD-3 possèdent une activité antimicrobienne contre *L. pneumophila*, médiée par des mécanismes d'action différents.

Les tests de perte de cultivabilité réalisés dans notre étude ont montré que les légionelles sont sensibles à l'action des PAMs humains au niveau extracellulaire. En effet, au cours de la phase exponentielle de croissance, la cultivabilité de *L. pneumophila* est diminuée de 2 à 3 logs suite à l'exposition aux peptides LL-37 et HBD-3. A notre connaissance, ces résultats constituent la première description de l'effet de la cathélicidine humaine LL-37 sur *Legionella*. L'impact de la défensine HBD-3 sur *L. pneumophila* a quant à lui déjà été testé par une équipe allemande. Dans leur étude, Scharf *et al*. ont notamment montré que HBD-3 inhibe la réplication extracellulaire des légionelles (Scharf *et al.* 2010b). Nos résultats sont donc concordant avec la littérature, dans la mesure où nous observons également un effet délétère de HBD-3 vis-à-vis de *L. pneumophila*. Par ailleurs, nos résultats suggèrent que *Legionella* présente une sensibilité variable aux différents PAM humains. En effet, HBD-3 semble avoir une activité inhibitrice plus modérée que celle de LL-37. Ce phénomène provient certainement des différences de propriétés physicochimiques et/ou structurales caractérisant chaque peptide. De même, des modes d'action potentiellement différents pourraient expliquer l'inégalité d'efficacité des peptides LL-37 et HBD-3.

Les tests de perte de cultivabilité ont également permis de montrer que les légionelles en phase exponentielle de croissance sont plus sensibles à l'activité antibactérienne directe des peptides LL-37 et HBD-3 que les légionelles en phase stationnaire de croissance. De nombreuses études ont montré que les bactéries en phase stationnaire de croissance sont plus résistantes aux agents antimicrobiens tels que les antibiotiques, et plus rarement les peptides antimicrobiens (Mayhall & Apollo 1980; McLeod & Spector 1996; Spoering & Lewis 2001; Paramasivan *et al.* 2005; Matsuo *et al.* 2011; Mohamed *et al.* 2016). La sensibilité des légionelles à la warnericine RK varie également en fonction de la phase de croissance de la bactérie, la phase stationnaire étant associée à une augmentation de la résistance au peptide (Verdon *et al.* 2008, 2011). Les auteurs avaient alors observé une corrélation entre la diminution de sensibilité à la warnericine RK et la modification de la composition lipidique de l'enveloppe des légionelles au cours de leur croissance, caractérisée par un enrichissement en acide gras branchés et par un raccourcissement de la chaine des acides gras, entrainant alors une augmentation de la fluidité membranaire (Verdon *et al.* 2011). De la même manière, la modification de la composition lipidique des membranes pourrait être à l'origine de l'augmentation de la résistance de *L. pneumophila* aux peptides humains LL-37 et HBD-3.

Dans cette étude, nous avons tenté de déterminer le mécanisme d'action direct des peptides LL-37 et HBD-3 sur *L. pneumophila*. Les tests d'incorporation d'IP ont alors permis de montrer que ces deux peptides exercent une action de perméabilisation des membranes de la bactérie. Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature, décrivant la perméabilisation membranaire comme le principal mode d'action de ces peptides, notamment à l'encontre d'*E. coli* (Turner *et al.* 1998; Oren *et al.* 1999; Boniotto *et al.* 2003; Lee

et al. 2011). Nos résultats montrent que LL-37 et HBD-3 ont une action rapide, puisqu'une incubation de 15 minutes (T0) est suffisante pour observer la perméabilisation des légionelles. De plus, la capacité de perméabilisation des peptides varie en fonction de l'état physiologique des bactéries. HBD-3 n'a pas d'effet sur les bactéries en phase stationnaire, et la proportion de bactéries perméabilisées par LL-37 est plus élevée pour les légionelles en phase exponentielle que pour celles en phase stationnaire de croissance. Ces résultats sont concordants avec les données de perte de cultivabilité. Néanmoins, pour un même traitement la proportion de bactéries IP positives après traitement par LL-37 pour les bactéries en phase exponentielle est plus faible que celles des bactéries perdant leur cultivabilité. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le peptide a une action si efficace qu'une partie des bactéries ne sont plus suffisamment intègres pour être détectées en cytométrie. Ceci est cohérent avec les observations de microscopie électronique à transmission sur lesquelles de nombreux débris bactériens sont distinguables (**Figure 68 D-I**).

Afin de confirmer le mode d'action du peptide LL-37 sur *L. pneumophila* en milieu extracellulaire, nous avons tenté d'identifier la ou les cibles bactériennes du peptide. L'utilisation de LL-37 marqué au TAMRA d'une part, et le marquage immunogold du peptide d'autre part, ont permis de mettre en évidence la fixation de la cathélicidine à la surface des légionelles. Ces résultats montrent donc la capacité du peptide à interagir avec la membrane de *Legionella*, et permettent de renforcer l'hypothèse selon laquelle LL-37 agit par perméabilisation membranaire. L'utilisation de LL-37 marqué au TAMRA nous a également permis d'observer une fixation potentiellement plus importante du peptide sur les bactéries en cours de division. Un phénotype similaire a été décrit par une équipe américaine au cours d'une étude portant sur le mode d'action de LL-37 à l'encontre d'*E. coli* (Sochacki *et al.* 2011). Ces travaux sont basés sur l'imagerie en temps réel de la répartition spatial de trois marqueurs fluorescents : (i) le peptide LL-37 marqué à la rhodamine (Rh-LL-37), la GFP localisée dans le périplasme et le marqueur d'ADN Sytox Green. Selon ce modèle, le signal de la GFP disparait lorsque la membrane externe est perméabilisée, tandis que le signal du Sytox Green apparait lorsque la membrane plasmique est endommagée (Sochacki *et al.* 2011). D'après les auteurs, LL-37 présente trois phases distinctes de fixation correspondant au degré de pénétration du peptide dans les cellules bactériennes (**Figure 93**).

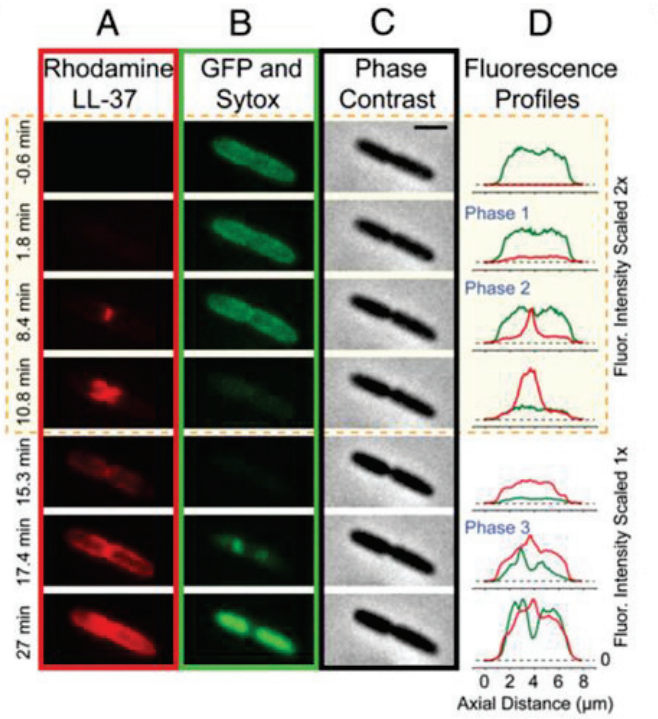


Figure 93. Cinétique de fixation de LL-37 marqué à la rhodamine sur *E. coli* (Sochacki *et al*. 2011). Les bactéries expriment une GFP périplasmique et le milieu contient le marqueur d'ADN Sytox Green. Chaque image est issue d'une même vidéo au temps indiqué à gauche. (A) LL-37 marqué à la rhodamine, (B) GFP périplasmique puis marqueur d'ADN Sytox Green, (C) contraste de phase et (D) profils d'intensité des signaux de fluorescence rouge et verts.

La phase 1 correspond à la fixation uniforme de LL-37 à la surface de la membrane externe de toutes les bactéries. Chez les bactéries en cours de division, la phase 2 est associée à une fixation massive de peptides au niveau du septum, se propageant le long de la bactérie. Le début de cette phase est marqué par l'arrêt de la croissance bactérienne, et impliquerait l'entrée et la diffusion du peptide dans le périplasme. Enfin, durant la phase 3, LL-37 perméabilise la membrane plasmique pour accéder au cytoplasme bactérien. Cette étude montre donc que le peptide LL-37 est capable de perméabiliser successivement la membrane externe et la membrane interne d'*E. coli*, les bactéries en cours de division étant particulièrement vulnérables à l'action du peptide. Selon Sochacki *et al.*, ce phénomène serait du à l'importante perméabilité de la membrane néoformée, localisée au niveau du septum bactérien (Sochacki *et al.* 2011). Les clichés que nous avons réalisés montrent une distribution de LL-37 sur toutes les légionelles comparable à celle observée sur les cellules d'*E. coli* en phase 1. De même, la fixation massive de LL-37 sur les légionelles en cours de division évoque la phase 3 de la cinétique de fixation du peptide chez *E. coli*. Au vu de ces similitudes, il est tentant d'imaginer que LL-37 utilise le même mécanisme de perméabilisation membranaire à la fois chez *E. coli* et chez *L. pneumophila*. Il est en effet possible que la durée d'incubation légionelles/LL-37 TAMRA fixée à 2h dans notre étude ne nous ait pas permis d'observer la phase de fixation massive de peptides au niveau du septum bactérien,

intervenant très précocement chez *E. coli*. Une manière simple de vérifier cette hypothèse serait alors de renouveler nos observations cette fois par vidéomicroscopie, afin de visualiser en temps réel la fixation et la distribution de LL-37 sur des légionelles viables. Par ailleurs, un mode d'action favorisant la perméabilisation des bactéries en cours de division pourrait expliquer, au moins en partie, la plus grande sensibilité à LL-37 des légionelles en phase exponentielle de croissance par rapport à celles en phase stationnaire de croissance, suggérée par les tests de perte de cultivabilité et le test de perméabilisation membranaire réalisés dans notre étude. Nos images de microscopie suggèrent donc que LL-37 est capable d'interagir avec la membrane de *L. pneumophila*. Afin de d'identifier plus précisément la cible du peptide, nous avons tenté de déterminer si LL-37 interagit plus particulièrement avec certains phospholipides membranaires tels que la phosphatidylcholine (PC). Ce mécanisme est en effet utilisé par l'ApoLp-III et les défensines de *G. mellonella* pour perméabiliser les membranes de *Legionella dumoffii* (cf **Chapitre II.7.1.1**) (Palusińska-Szysz *et al.* 2012, 2016). En nous inspirant de ces travaux, nous avons réalisé des tests de cultivabilité avec des légionelles préalablement cultivées en absence ou en présence de PC. Nos résultats préliminaires montrent que LL-37 induit une perte de cultivabilité similaire des légionelles cultivées en absence ou en présence de choline, suggérant que le peptide ne cible pas particulièrement ce phospholipide pour perméabiliser les membranes de *L. pneumophila*.

La recherche des cibles de LL-37 par marquage immunogold nous a également permis de déterminer que le peptide interagit avec un ou plusieurs composants intrabactériens. Dans la littérature, certains PAMs sont décrits comme étant capables de se fixer à l'ADN, à l'ARN ou aux protéines situés dans le cytoplasme bactérien (Brogden 2005). La réalisation d'un test de retard de migration électrophorétique a permis de mettre en évidence l'interaction de LL-37 avec l'ADN de *L. pneumophila*. Cette propriété est également utilisée par la cathélicidine pour se fixer à l'ADN d'*E. coli* (Mardirossian *et al.* 2014). Il est probable que ces interactions reposent sur l'attraction électrostatique entre les charges positives du peptide et les charges négatives portées par les groupements phosphate de l'ADN. Dans leur étude, Mardirossian *et al.* ont montré que LL-37 est capable d'inhiber la transcription en conditions *in vitro*, cependant cette activité semble insuffisante pour diminuer de façon significative la synthèse protéique chez *E. coli* (Mardirossian *et al.* 2014). D'après les auteurs, LL-37 se fixerait à l'ARN polymérase afin de réduire son activité, toutefois la quantité d'ARN produite permettrait d'assurer une synthèse protéique suffisante pour la survie de la bactérie. Ces données n'excluent pas la possibilité que l'interaction LL-37/ADN soit capable de perturber les processus de transcription et/ou de traduction chez *Legionella*. Ainsi, l'interaction de la cathélicidine avec l'ADN bactérien pourrait participer à l'activité anti-*Legionella* du peptide.

Afin d'obtenir plus de précisions sur le mécanisme d'action de LL-37 et HBD-3, leur effet sur la morphologie de *L. pneumophila* a été examiné par microscopie électronique à transmission. Nos observations ont montré que les deux peptides induisent d'importants dommages morphologiques, en particulier au niveau membranaire. Cependant, les lésions engendrées par LL-37 sont vraisemblablement différentes de celles occasionnées par HBD-3, suggérant que ces deux peptides agissent sur *L. pneumophila* selon des mécanismes d'action bien distincts l'un de l'autre. D'après nos images, la cathélicidine LL-37 induit principalement une rupture de l'intégrité des membranes et une fuite massive du contenu cytoplasmique bactérien dans le compartiment extracellulaire. Papareddy *et al.* ont reporté des changements de l'ultrastructure de *P. aeruginosa* et *S. aureus* similaires suite à l'incubation des bactéries avec LL-37 (**Figure 94**) (Papareddy *et al.* 2012).

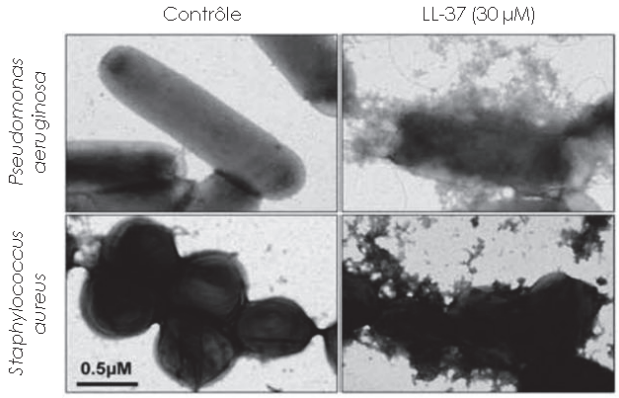


Figure 94. Effet de LL-37 sur la morphologie de *P. aeruginosa* et *S. aureus* (Papareddy *et al.* 2012).

Dans cette étude, l'altération des membranes bactériennes semble plus importante, cependant la concentration de peptide utilisée (30 µM) est beaucoup plus élevée que dans nos travaux (2.2 µM). Nos observations microscopiques semblent donc cohérentes avec nos résultats de perméabilisation membranaire, et tendent à confirmer que la rupture de l'intégrité membranaire constitue la base de l'activité anti-*Legionella* de LL-37 au niveau extracellulaire. L'ultrastructure des légionelles exposées à la défensine HBD-3 révèle également la présence de dommages membranaires. La fuite de contenu cytoplasmique semble toutefois plus modérée qu'avec LL-37, suggérant que HBD-3 possède une plus faible activité de perméabilisation membranaire. La principale altération morphologique induite par la défensine apparait sous forme de petites protrusions membranaires remplies de contenu cytoplasmique. De telles lésions ont également été observées sur des cellules de *S. aureus* incubées avec HBD-3 (**Figure 95**) (Harder *et al.* 2001; Sass *et al.* 2010).

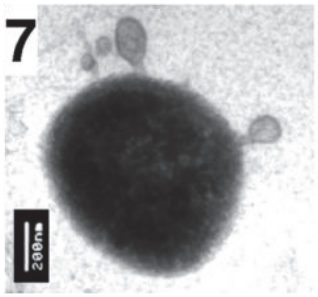


Figure 95. Effet de HBD-3 sur la morphologie de *S. aureus* (Sass *et al*. 2010).

Selon Sass *et al*., ce type de dommage serait dû à une perturbation de la biosynthèse de la paroi bactérienne, plutôt qu'à la formation de pores transmembranaires (Sass *et al.* 2008). Les auteurs en effet montré que HBD-3 est capable de se fixer à l'UDP-MurNAc-pentapeptide (ou lipide II), constituant le précurseur du PDG. Cette interaction inhiberait les dernières réactions enzymatiques précédant la translocation du lipide II à travers la membrane, entrainant alors la formation de lésions locales dans la paroi bactérienne, d'où s'échapperaient la membrane et le contenu cytoplasmique sous l'action de la pression osmotique (Sass *et al.* 2008, 2010). Dans la mesure où la paroi des bactéries à gram négatif contient également du peptidoglycane, nous pouvons imaginer que HBD-3 utilise un mode d'action comparable à l'encontre de *L. pneumophila*. Un mécanisme basé sur l'inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne est d'autant plus cohérent que les légionelles ne sont sensibles à HBD-3 qu'au cours de la phase exponentielle de croissance. En effet, les lipides II sont particulièrement abondants dans les zones d'élongation et de formation du septum, uniquement présentes chez les bactéries en phase exponentielle de croissance (Scheffers & Pinho 2005). Nos résultats de microscopie électronique à transmission renforcent donc notre hypothèse selon laquelle LL-37 agit par perméabilisation membranaire sur *L. pneumophila*, et suggèrent un mécanisme d'action différent pour HBD-3, potentiellement basé sur l'inhibition du processus de synthèse de la paroi bactérienne. Des analyses supplémentaires seront cependant nécessaires pour confirmer l'utilisation de ces mécanismes par LL-37 et HBD-3.

Lors d'une infection, les bactéries sont confrontées simultanément à différents types de PAMs, certains d'entre eux étant capables d'agir de concert pour potentialiser leur activité antimicrobienne (Nagaoka *et al.* 2000; Hase *et al.* 2002; Ong *et al.* 2002; Chen *et al.* 2005). Au cours de notre étude, nous avons donc testé l'effet de l'association de LL-37 et HBD-3 (10 µg/mL de chaque peptide) sur la cultivabilité de *L. pneumophila*. Dans nos conditions expérimentales, cette association de peptides a un effet antagoniste. A notre connaissance, l'effet de l'association LL-37/HBD-3 n'a été évalué que par deux équipes. D'après Chen *et al.*, cette association n'a pas d'effet additif, synergique ou antagoniste sur la viabilité de *S. aureus* (concentrations testées : 0.05 µg/mL de LL-37 et 0.1 µg/mL de HBD-3) (Chen *et al.* 2005), tandis que Midorikawa *et al.* ont reporté un effet additif sur la survie de

S. aureus (concentration testée : 1 µg/mL pour chaque peptide) (Midorikawa *et al.* 2003). La nature de cette interaction semble donc variable en fonction des concentrations de peptides utilisées. Cette hypothèse est soutenue par une étude de Yu *et al.*, au cours de laquelle l'effet de différentes combinaisons de PAMs d'origine humaine et animale à des concentrations variables a été évalué sur la viabilité d'*E. coli*. Les auteurs ont notamment montré que l'association indolicidine/apidaecine est antagoniste à faible concentration mais synergique à forte concentration, tandis que la tendance inverse est observée pour l'association mellitine/apidaecine (Yu *et al.* 2016). Il est alors possible que la nature de l'interaction LL-37/HBD-3 à l'encontre de *L. pneumophila* soit également variable suivant la concentration des peptides. Les mécanismes moléculaires des interactions entre PAMs, en particulier l'antagonisme, sont encore mal connus. Nous pouvons cependant imaginer que l'antagonisme de la combinaison LL-37/HBD-3 observé dans notre étude résulte d'une compétition pour un site de fixation ou de l'altération d'un site de fixation par l'un des peptides (Ulvatne *et al.* 2001). Le mécanisme de cet antagonisme pourra être identifié lorsque nous aurons déterminé avec plus de précision la cible et le mode d'action de chacun des peptides.

Au cours de cette étude, nous nous sommes également intéressés à l'effet de l'association entre les PAMs humains et les antibiotiques sur *L. pneumophila*. La technique classiquement utilisée au laboratoire pour évaluer l'activité des antibiotiques consiste à déterminer la CMI des molécules par microdilution en milieu liquide BYE. Cette méthode n'a cependant pas pu être appliquée dans nos travaux, les résultats préliminaires ayant démontré que l'activité des PAMs humains est inhibée dans le milieu de culture des légionelles. Ce phénomène est certainement lié à une trop forte concentration en sels dans le milieu BYE, ou à une interaction entre les peptides et un composant du milieu. Nous avons donc choisi d'évaluer l'effet de la combinaison PAMs/antibiotique via la réalisation d'antibiogrammes sur milieu de culture solide sans charbon. Les tests se sont révélés peu concluants, en raison des très faibles diamètres d'inhibition produits par les peptides LL-37 et HBD-3 (inférieur à 8 mm) malgré une forte concentration de peptide (1 mg/mL pour LL-37 et 100 µg/mL pour HBD-3). Une alternative reste cependant envisageable, et consisterait à déterminer la CMI des agents antibactériens par microdilution dans du milieu de culture cellulaire supplémenté avec un faible pourcentage de milieu de culture bactérien. Cette méthode a notamment été utilisée dans une récente étude de Lin *et al.*, dont les travaux ont permis de mettre en évidence un effet synergique de l'association LL-37/azithromycine contre *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* et *A. baumannii* (Lin *et al.* 2015). Les premiers essais réalisés en milieu CO_2I-BYE10% sont actuellement en cours de réalisation.

Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés au rôle du gène *rcp* dans la résistance de *L. pneumophila* aux PAMs humains. Nous avons alors montré que la perte de ce gène induit une augmentation de la sensibilité à LL-37 chez la souche Paris en phase stationnaire de croissance. D'après Robey *et al.*, le gène *rcp* présente une forte homologie avec le gène *pagP* de *S.* Typhimurium et participe à la résistance de *L. pneumophila* 130b contre le C18G, un petit peptide synthétique α-hélicoïdal (Robey *et al.* 2001). Chez *Salmonella*, la palmitoyl transférase PagP catalyse la greffe d'un acide palmitique sur le lipide A. Selon plusieurs études, l'acylation du lipide A promouvrait la résistance aux PAMs en diminuant la fluidité des membranes bactériennes, empêchant ainsi l'insertion des peptides (Guo *et al.* 1998; Bishop *et al.* 2000). Ces données suggèrent alors que le gène *rcp* est impliqué dans la modification des lipides membranaires de *L. pneumophila*, permettant à la bactérie d'accroitre sa résistance aux PAMs dont la cathélicidine humaine LL-37. Cette hypothèse est notamment soutenue par deux études ayant démontré que la composition lipidique de la membrane conditionne la sensibilité de *Legionella* aux PAMs tels que la warnericine RK et l'apoLp-III (cf **Chapitre II.7.1.1**) (Verdon *et al.* 2011; Palusińska-Szysz *et al.* 2012). Nos résultats suggèrent cependant que le gène *rcp* n'est pas essentiel à la souche Lens pour résister à LL-37 lors de la phase stationnaire de croissance. Nous suspectons alors que cette souche possède des facteurs supplémentaires impliqués dans la résistance aux PAMs, permettant de compenser la perte du gène *rcp*. La comparaison des génomes des souches Paris et Lens révèle une importante variabilité génétique. En effet, 10% des gènes de la souche Lens ne sont pas retrouvés chez la souche Paris (Cazalet *et al.* 2004). Il est possible que certains de ces gènes codent pour des mécanismes de résistance aux PAMs. L'une des stratégies de résistance aux PAMs mises en place par les bactéries est basée sur la protection de la surface bactérienne, notamment grâce à la production d'une capsule ou d'un exopolysaccharide. Dans la littérature, les exopolysaccharides sont décrits comme des structures capables de limiter l'accès des PAMs à leur cible bactérienne, et dont le mode d'action repose sur la répulsion électrostatique ou la séquestration des peptides, selon leur charge (Vuong *et al.* 2004b). La production d'un exopolysaccharide permet ainsi à certaines bactéries pathogènes pulmonaires, telles que *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* et *Burkholderia cepacia*, de neutraliser l'activité des peptides humains LL-37 et HBD-3 (Herasimenka *et al.* 2005; Benincasa *et al.* 2009; Foschiatti *et al.* 2009). Cette inhibition reposerait non seulement sur l'interaction électrostatique entre les exopolysaccharides chargés négativement et les peptides cationiques, mais également sur les caractéristiques structurales des deux interactants (Benincasa *et al.* 2009; Foschiatti *et al.* 2009). Au sein de notre laboratoire, nous savons par expérience que la souche Lens en phase stationnaire de croissance produit un exopolysaccharide de surface, non produit par la souche Paris. Cette particularité confère notamment à la souche Lens un profil protéique bien distinct de celui de la souche Paris, et apparait sous la forme d'une trainée (ou smear) sur gel de

polyacrylamide (**Figure 96**). Cet exopolysaccharide pourrait alors pallier l'absence du gène *rcp*, et expliquerait la différence de sensibilité au peptide LL-37 entre les mutants Paris Δ*rcp* et Lens Δ*rcp* en phase stationnaire de croissance. La production d'un exopolysaccharide constituerait donc un mécanisme de résistance propre à la souche Lens, permettant à la bactérie de repousser ou de piéger les PAMs à distance de leur cible.



Figure 96. Profil protéique des souches de *L. pneumophila* Paris et Lens en phase stationnaire de croissance.

Un deuxième mécanisme de résistance potentiel spécifique de la souche Lens pourrait impliquer une modification du LPS. Des travaux réalisés dans notre laboratoire dans le cadre de la recherche de gènes responsables de modifications de la surface des légionelles ont permis d'identifier un gène spécifique de la souche Lens, le gène *lpl2876*, codant une enzyme similaire à une ADP-heptose:LPS heptosyltransférase II. D'après la base de données Legiolist, *lpl2876* fait partie d'un groupe de 4 gènes uniquement présent chez la souche Lens, et situé dans une région du génome particulièrement riche en gènes impliqués dans la biosynthèse et la modification du lipide A (cf http://genolist.pasteur.fr/LegioList/). Chez *E. coli*, *S.* Typhimurium et *Campylobacter jejuni*, l'heptosyltransférase codée par le gène *waaF* catalyse le transfert du second résidu heptose au niveau du core du LPS (Sirisena *et al.* 1994; Brabetz *et al.* 1997; Oldfield *et al.* 2002). La mutation du gène *waaF* prévient l'incorporation de l'heptose et conduit à la synthèse d'un LPS altéré, caractérisé par un core oligosaccharidique tronqué (Schnaitman & Klena 1993). Les travaux d'Oldfield *et al.* ont toutefois montré que cette mutation n'affecte pas l'exopolysaccharide produit par *C. jejuni* (Oldfield *et al.* 2002). Ces données laissent penser que le gène *lpl2876* serait responsable d'une modification du LPS bactérien, une fonction constituant la base de nombreux mécanismes de résistance aux PAMs (cf **Chapitre II.5.1**). Il est cependant peu probable que ce gène code pour une heptosyltransférase, étant donné que le LPS de *L. pneumophila* ne contient pas d'heptose (Hindahl & Iglewski 1984). Bien que sa fonction reste à déterminer, le gène *lpl2876* reste une cible potentielle pour la caractérisation de la résistance à LL-37 de la

souche Lens Δ*rcp* en phase stationnaire de croissance. Selon une autre hypothèse, la différence de sensibilité à LL-37 entre les souches Paris Δ*rcp* et Lens Δ*rcp* serait due aux propriétés physicochimiques de la surface des bactéries. Une étude de Gosselin *et al.* a notamment permis de démontrer que le LPS de la souche Lens est moins chargé (autrement dit moins électronégatif) que celui de la souche Paris (Gosselin *et al.* 2011). Or, le mode d'action des PAMs repose en premier lieu sur une interaction électrostatique entre leurs charges positives et les charges négatives de la surface bactérienne (cf **Chapitre II.3**). Il est alors possible que, comparé à la souche Lens, le LPS de la souche Paris présente une plus forte affinité pour le peptide LL-37. Ainsi, la résistance de la souche Lens Δ*rcp* pourrait être due, au moins en partie, à la faible charge négative portée par son LPS.

Le rôle du gène *rcp* dans la résistance à HBD-3 de *L. pneumophila* a également été évalué au cours de cette étude. La perte de ce gène ne semble pas affecter la cultivabilité des souches Paris et Lens exposées malgré la présence de la défensine. Nos résultats suggèrent donc que la résistance à HBD-3 des légionelles en phase stationnaire de croissance est assurée par un ou plusieurs mécanismes de résistance indépendants du gène *rcp*. Chez le pathogène respiratoire *H. influenzae*, la résistance à HBD-3 repose sur l'import du peptide par le transporteur Sap, puis sur sa dégradation par des peptidases cytoplasmiques (Shelton *et al.* 2011). *L. pneumophila* pourrait alors utiliser un mécanisme analogue pour résister à la défensine HBD-3.

La résistance de *L. pneumophila* contre les PAMs humains semble donc être multifactorielle.

L. pneumophila étant un pathogène intracellulaire, nous nous sommes intéressés à l'effet de LL-37 et HBD-3 sur la réplication des souches Paris et Lens dans les macrophages U937 et les pneumocytes A549, représentant les deux types cellulaires infectés lors d'atteintes pulmonaires. Nous avons alors observé un effet inhibiteur de LL-37 et HBD-3 sur la réplication des deux souches dans les cellules U937 et A549. Nos résultats sont concordant avec les données de Scharf *et al*., décrivant un effet délétère de HBD-3 sur la croissance de la souche 130b dans les cellules A549 (Scharf *et al.* 2010b). De même, les tests de pré-incubation cellules/peptides ont montré que LL-37 et HBD-3 sont capables d'inhiber la réplication intracellulaire de *L. pneumophila*, indépendamment d'une activité bactéricide directe en milieu extracellulaire. Les mécanismes permettant aux PAMs humains d'inhiber la multiplication intracellulaire de *Legionella* ne sont pas décrits dans la littérature.

Notre première hypothèse quant au mécanisme d'action de LL-37 et HBD-3 soutenait que les peptides sont internalisés et relocalisés vers la vacuole d'endocytose des légionelles, où ils pourraient exercer une activité bactéricide directe contre la bactérie. Un tel processus a notamment été mis en évidence dans le cadre de l'infection par *M. smegmatis*. En effet, Sonawane *et al*. ont montré l'internalisation de LL-37 par les macrophages THP-1, ainsi que la

colocalisation du peptide et de la bactérie au sein du phagosome (Sonawane *et al.* 2011). Nous avons donc tenté de déterminer si les peptides LL-37 et HBD-3 sont internalisés par nos modèles cellulaires. Si nos observations en microscopie confocale ont permis de confirmer l'internalisation de LL-37 exogène dans les macrophages U937 et les pneumocytes A549, l'endocytose de HBD-3 n'a pas pu être démontrée par immunomarquage suggérant un autre mécanisme d'action. Nous envisageons néanmoins de vérifier ce phénotype en renouvelant les observations de microscopie en utilisant un peptide HBD-3 marqué au TAMRA. Par la suite, nous avons pu montrer que la cathélicidine LL-37 est capable de colocaliser avec *L. pneumophila* au sein de la vacuole de phagocytose. D'après ces résultats, il semblerait donc possible que le peptide exerce une activité bactéricide directe contre *Legionella* au niveau intracellulaire. De plus, l'activité intracellulaire de LL-37 pourrait être potentialisée par les conditions physicochimiques propres au phagosome. En effet, l'exposition de la bactérie à LL-37 dans un espace réduit tel que le phagosome permettrait d'obtenir une concentration locale de peptide plus élevée que celle du milieu extracellulaire, et pourrait constituer un mécanisme d'action plus efficace pour éliminer le pathogène. L'action de LL-37 dans le phagosome pourrait également être appuyée par d'autres PAMs, notamment les défensines dont la production par les pneumocytes est stimulée lors de l'infection par *L. pneumophila* (Scharf *et al.* 2010b; a). De même, le pH de la vacuole de phagocytose pourrait influencer l'activité des PAMs humains. A titre d'exemple, les travaux de Chen *et al.* ont montré que l'acidification du milieu permet d'augmenter l'effet bactéricide de l'association LL-37/HBD-2 contre *E. coli* (Chen *et al.* 2005). Ces différentes données suggèrent donc que les PAMs humains pourraient avoir une activité bactéricide directe contre *L. pneumophila* au sein même de la cellule hôte.

Une seconde hypothèse concernant ce qui pourrait expliquer l'inhibition de la réplication intracellulaire de *L. pneumophila* par LL-37 et HBD-3 repose sur une action indirecte des peptides, telle que la stimulation de l'autophagie. Ce processus est notamment utilisé par LL-37 pour prévenir la multiplication intracellulaire de *Mycobacterium* dans les monocytes et les macrophages (Yuk *et al.* 2009; Rekha *et al.* 2015). D'après ces études, LL-37 stimule l'expression de gènes impliqués dans la formation des autophagosomes, permettant ainsi d'éliminer efficacement *M. tuberculosis*. Il est possible que l'autophagie induite par les PAMs participe également à l'inhibition de la réplication intracellulaire de *L. pneumophila*. Ainsi, nous envisageons de vérifier cette théorie en évaluant l'effet de LL-37 et HBD-3 sur le recrutement des autophagosomes autour de la vacuole de *L. pneumophila* par une approche de microscopie confocale.

Afin de clarifier le mode d'action de LL-37 et HBD-3 au niveau intracellulaire, nous avons mis en place des tests permettant d'évaluer l'impact des peptides sur les étapes clé du cycle infectieux de *L. pneumophila*. Nous nous sommes intéressés en premier lieu aux étapes précoces d'adhésion et d'internalisation des légionelles. D'une manière générale,

nos résultats suggèrent que LL-37 n'a pas d'effet sur l'adhésion et l'internalisation de *Legionella* dans les pneumocytes A549 et les macrophages U937, de même HBD-3 ne semble pas avoir de réel effet sur l'adhésion et l'internalisation de la bactérie dans les macrophages. En revanche, la défensine HBD-3 stimule l'adhésion et l'internalisation des légionelles dans les pneumocytes. A notre connaissance, ce phénotype n'a actuellement pas été rapporté chez *Legionella*. D'une manière générale, la stimulation de l'adhésion et de l'internalisation des bactéries par les PAMs humains est un phénomène peu décrit dans la littérature. Seules deux études ont montré que l'adhésion des pathogènes *H. influenzae*, *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* et *Moraxella catarrhalis* aux cellules épithéliales pulmonaires pouvait être stimulée par les α-défensines HNP-1, -2 et -3, cependant les mécanismes mis en jeu dans ces interactions n'ont pas été identifiés (Gorter *et al.* 1998, 2000). Une première hypothèse qui pourrait expliquer une stimulation de l'adhésion repose sur l'induction de facteurs bactériens tels que des adhésines lors de l'interaction bactérie/PAMs. Cette hypothèse ne semble cependant pas cohérente avec nos résultats. Dans notre modèle d'étude, la stimulation de l'adhésion par HBD-3 ne semble pas dépendre de la viabilité des légionelles. Nos observations par microscopie confocale ont en effet montré que le peptide stimule également l'adhésion des bactéries préalablement tuées au PFA 4%. Ainsi, ces résultats indiquent que la stimulation de l'adhésion de *L. pneumophila* par HBD-3 n'implique pas un processus métabolique bactérien. Une seconde hypothèse consisterait au contraire en la stimulation de l'expression de récepteurs à la surface des cellules eucaryotes par le peptide. Plusieurs études ont mis en évidence la capacité du peptide HBD-3 à induire l'expression de récepteurs de surface tels que le CCR6, le CCR7, le CD80, le CD86 ou le CD40 sur différents types cellulaires (Yang *et al.* 2001a; Funderburg *et al.* 2007; Mburu *et al.* 2011). De plus, l'une de ces études a notamment montré que l'induction par HBD-3 de l'expression du CD80 à la surface des monocytes dépend de l'interaction du peptide avec les récepteurs cellulaires TLR1 et TLR2 (Funderburg *et al.* 2007). L'implication d'un processus cellulaire est cohérente avec nos résultats. En effet, la pré-incubation HBD-3/pneumocytes induit une stimulation de l'adhésion des légionelles comparable à celle observée lors de la coincubation, tandis que la pré-incubation HBD-3/légionelles ne stimule que très faiblement l'adhésion des bactéries. Il est donc possible que HBD-3 stimule l'expression de surface d'un récepteur permettant à *Legionella* d'accroitre son efficacité d'adhésion. Un tel mécanisme est également compatible avec le fait que la stimulation de l'adhésion de *Legionella* par HBD-3 est variable selon le modèle cellulaire. Ainsi, le peptide induirait l'expression de récepteurs produits par les pneumocytes mais pas par les macrophages. Ces différentes hypothèses pourront être vérifiées lors de prochains travaux. Par exemple, la réalisation de tests d'adhésion sur des cellules préalablement fixées au PFA nous permettrait de confirmer l'implication d'un processus cellulaire dans le processus de stimulation de l'adhésion de *L. pneumophila* par HBD-3. Si cette théorie est confirmée, nous pourrions alors rechercher des récepteurs à la fois

présent chez les pneumocytes A549 et absent chez les macrophages U937, et tester l'effet d'agonistes spécifiques de ces récepteurs sur l'adhésion de *Legionella* en présence de HBD-3. Par ailleurs, il est probable que la stimulation de l'internalisation de *L. pneumophila* dans les pneumocytes soit la conséquence de l'adhésion accrue par l'action de HBD-3. D'une manière générale, la stimulation de l'adhésion et de l'internalisation bactérienne par HBD-3, suivie de l'inhibition de la croissance intracellulaire de *Legionella* est un phénotype surprenant. A notre connaissance, aucun PAM humain n'a montré une telle activité. Ce phénotype a néanmoins été décrit pour un peptide cyclique : la bacitracine. D'après Campos *et al.,* la bacitracine stimule la fixation et l'entrée du papillomavirus humain de type 16 (HPV16) dans les kératinocytes HaCaT, pour finalement inhiber sa réplication virale (Campos *et al.* 2012). Les résultats des tests d'adhésion et d'internalisation nous laissent supposer que les peptides LL-37 et HBD-3 exercent leur effet inhibiteur contre *L. pneumophila* grâces à des mécanismes différents, à la fois entre eux et selon le type cellulaire.

Au cours de cette étude, nous avons également tenté d'évaluer l'impact des peptides LL-37 et HBD-3 sur la fusion phagosome/lysosome lors de l'infection des macrophages par *L. pneumophila* à MOI 100. Nous avons pour cela comptabilisé le nombre de bactéries colocalisant avec LAMP-1 en absence ou en présence des peptides. Les résultats montrent qu'en absence de peptide, la protéine LAMP-1 colocalise avec 5.9 % des bactéries non traitées, et avec 16.3 % des bactéries préalablement tuées au PFA. Ces pourcentages semblent faibles en comparaison des données de la littérature. D'après plusieurs études, LAMP-1 colocalise avec 10 à 25 % des légionelles non traitées, et avec plus de 80 % des légionelles avirulentes (Δ*dotA* ou tuées à la chaleur) (Alli *et al.* 2000; Miyake *et al.* 2005; Vincent & Vogel 2006). Il semblerait donc que le nombre de bactéries colocalisant avec LAMP-1 ait été sous-estimé, et ce quel que soit le traitement. Nous avons alors identifié plusieurs facteurs pouvant expliquer ces faibles valeurs de colocalisation. La méthode de calcul du pourcentage de bactéries colocalisant avec LAMP-1 constitue le premier facteur. En effet, lors de nos travaux, ce pourcentage a été calculé en divisant le nombre de bactéries colocalisant avec LAMP-1 par le nombre total de bactéries. Or, le pourcentage de bactéries colocalisant avec LAMP-1 serait probablement plus élevé si nous avions divisé le nombre de bactéries colocalisant avec LAMP-1 par le nombre de bactéries intracellulaires. Lors de futurs travaux, nous envisageons donc de reproduire ces tests de colocalisation en réalisant un immunomarquage des bactéries extracellulaires, afin d'évaluer la proportion de légionelles intracellulaires et de réaliser des calculs plus pertinents. Ce marquage semble d'autant plus important qu'il nous a par la suite permis de mettre en évidence le faible taux d'internalisation des légionelles au cours des expériences de colocalisation *Legionella*/LL-37 TAMRA. Les observations de microscopie confocale ont en effet montré que seuls 10 % des bactéries avaient été internalisées par les macrophages dans nos conditions expérimentales. Ce pourcentage semble faible compte tenu du type cellulaire et du temps d'infection de 2h.

Nous envisageons donc de modifier nos conditions expérimentales afin d'obtenir un meilleur rendement d'infection. Nos travaux préliminaires montrent que la réalisation d'une pré-incubation de 2h à 37°C des légionelles dans le milieu de culture cellulaire avant l'infection, ainsi que la diminution de la MOI à 10 permettent d'obtenir un taux de bactéries intracellulaires d'environ 30 %. Ce pourcentage semble cependant encore relativement faible pour des macrophages, dont la fonction première est la phagocytose. Il est possible que ce faible taux d'internalisation soit dû, au moins en partie, à une anomalie intrinsèque des macrophages. Cette hypothèse est suggérée par le fait que durant une grande partie de notre étude, nous avons été confrontés à un important défaut d'adhésion des macrophages. En effet, au fil des passages d'entretien, la capacité d'adhésion des monocytes U937 différenciés en macrophages diminuait rapidement. Afin d'identifier la source de ce défaut, nous avons testé l'effet du changement de différents paramètres : le temps de différenciation des monocytes, la concentration de PMA, la marque de PMA, le lot de milieu de culture, le lot de SVF, la marque des plaques 96 ou 24 puits, la réalisation d'un prétraitement des plaques à la poly-L-lysine, le lot de congélation de monocytes, l'incubateur et le manipulateur. Malgré toutes ces tentatives, nous n'avons pas été en mesure de déterminer la cause du défaut d'adhésion des macrophages U937. Les résultats présentés dans cette étude ont été obtenus à partir de macrophages possédant une capacité d'adhésion correcte, avant que celle-ci ne chute. Néanmoins nous ne pouvons exclure que l'anomalie à l'origine du défaut d'adhésion affecte également la capacité de phagocytose des cellules. Nous envisageons donc de reproduire les expériences de colocalisation *Legionella*/PAMs et *Legionella*/LAMP-1 avec une nouvelle lignée de monocytes U937, récemment commandée par le laboratoire. Par ailleurs, ces cellules seront également utilisées lors de l'évaluation de l'effet des peptides LL-37 et HBD-3 sur le recrutement du RE, réalisée par comptage des colocalisations *Legionella*/calnexine.

Conclusion et perspectives

La première partie de cette étude avait pour objectif d'évaluer la sensibilité aux antibiotiques de souches cliniques de *L. pneumophila* sérogroupe 1. Ces travaux ont permis de mettre en évidence l'absence de résistance aux 8 antibiotiques testés, néanmoins la distribution des CMI a montré l'existence d'une sous-population de souches présentant une sensibilité diminuée aux macrolides, corrélant avec la présence de la pompe à efflux LpeAB retrouvée spécifiquement chez les souches ST1, ST701, ST1335 ou ST proches. Il serait intéressant de déterminer dans les conditions de cette étude de façon systématique et prospective les CMI de souches de *L. pneumophila* issues de prélèvements cliniques, afin de (i) surveiller l'émergence de résistance aux antibiotiques communément utilisés pour le traitement de la légionellose, et (ii) d'évaluer la prévalence de la résistance aux fluoroquinolones récemment décrite (Bruin *et al.* 2014). Par ailleurs, nous pourrions évaluer de rôle de la pompe LpeAB spécifique des macrolides dans la résistance des légionelles aux PAMs humains, afin de mettre en évidence une éventuelle résistance croisée. Une approche possible consisterait à déterminer la sensibilité aux peptides de la souche Paris Δ*lpeAB*, précédemment construite par Massip *et al.* (Massip *et al.* soumis en 2016).

La seconde partie de cette étude avait pour but de caractériser l'activité antibactérienne des peptides antimicrobiens humains LL-37 et HBD-3 ainsi que leur mode d'action contre *L. pneumophila*.

Nos travaux ont permis de montrer que ces deux peptides induisent une perte de cultivabilité de *L. pneumophila* avec une efficacité variable selon l'état physiologique des bactéries. Les différents tests réalisés suggèrent que LL-37 et HBD-3 possèdent des mécanismes d'action différents à l'encontre de *Legionella*. La cathélicidine LL-37 se fixe à la surface des légionelles et perméabilise les membranes bactériennes, avec encore une fois une efficacité variable en fonction de la phase de croissance des bactéries. Afin d'obtenir plus de précisions sur le mécanisme d'action de LL-37, nous envisageons de poursuivre les tests de perméabilisation par cytométrie en flux initiés dans cette étude. Ces données pourraient par la suite être complétées par l'évaluation de l'impact de la composition lipidique des membranes sur l'activité du peptide. A l'image des travaux de Morgera *et al*., nous pourrions moduler la composition lipidique de liposomes renfermant un fluorophore et mesurer la capacité de perméabilisation de LL-37 (Morgera *et al.* 2009). Par ailleurs, ces tests de perméabilisation membranaires pourront être employés pour l'identification du mécanisme d'action de la défensine HBD-3. Nos observations en microscopie électronique à transmission montrent que HBD-3 induit une perforation des membranes de *Legionella*, ainsi que la formation de protrusions cytoplasmiques, ces deux phénotypes suggérant que le peptide agit contre *L. pneumophila* par inhibition de la synthèse du PDG (Sass *et al.* 2010).

Afin de vérifier cette hypothèse, nous pourrions par exemple mesurer l'impact de HBD-3 sur le niveau cytoplasmique de lipide II (précurseur du PDG). Nous pourrions également déterminer la localisation de HBD-3 sur *L. pneumophila* à l'aide d'un peptide marqué, afin de vérifier si la défensine se fixe préférentiellement ou non au niveau des zones de biosynthèse de la paroi bactérienne.

Au cours de notre étude, nous avons montré que l'association de LL-37 et HBD-3 a un effet antagoniste sur la cultivabilité de *L. pneumophila* dans nos conditions expérimentales. Nous envisageons de renouveler l'expérience en faisant varier la concentration de LL-37 et HBD-3 afin de déterminer si ce paramètre influence la nature de l'interaction entre les deux peptides. La recherche d'une synergie entre peptides antimicrobiens pourrait être étendue aux autres PAMs humains (HNPs et HBDs), en testant l'effet de combinaisons de 2 peptides ou plus sur la cultivabilité des légionelles. Par ailleurs, des travaux visant à évaluer l'effet de l'association entre les PAMs humains et les antibiotiques sur *L. pneumophila* ont été entrepris. Nos résultats préliminaires ont montré que la méthode de diffusion sur milieu gélosé ne semble pas adaptée à l'étude des PAMs. Par conséquent, nous envisageons d'adopter une approche basée sur la détermination de la CMI en milieu de culture cellulaire supplémenté en BYE. Les premiers essais sont actuellement en cours de réalisation.

Une partie de cette étude a été consacrée à l'étude de la résistance aux PAMs humains de *L. pneumophila*. Les résultats ont montré que le gène *rcp* est impliqué dans la résistance à LL-37 de la souche Paris en phase stationnaire de croissance. Ce gène est décrit comme un homologue de la palmitoyl transférase PagP de *S.* Typhimurium, une enzyme responsable de la modification du lipide A entrainant une diminution de la fluidité des membranes de la bactérie. Il nous semblerait alors intéressant de comparer par spectrométrie de masse la structure du lipide A des souches sauvages et Δ*rcp* pendant les différentes phases de croissance, afin de déterminer si le gène *rcp* assure une fonction similaire à celle du gène *pagP*. De même, nous pourrions évaluer la fluidité membranaire des souches sauvages et Δ*rcp* à l'aide d'une sonde fluorescente telle que le diphénylhexatriène (DPH) (Jasniewski *et al.* 2008; Louesdon *et al.* 2015). Cette approche consisterait à mesurer l'amplitude de mouvement de la sonde fluorescente hydrophobe insérée dans la bicouche lipidique, considérée comme identique à celle des chaines d'acides gras des phospholipides membranaires. Ces données devront être complétées par une analyse de l'expression du gène *rcp* au cours des différentes phases de croissance de *L. pneumophila*, réalisée par RT-PCR quantitative. Par ailleurs, nous envisageons de déterminer le rôle du gène *rcp* dans la réplication intracellulaire de *L. pneumophila* dans les macrophages et les pneumocytes.

Nos travaux ont également permis de montrer que le gène *rcp* n'est pas indispensable à la souche Lens pour résister à LL-37 durant la phase stationnaire de croissance, suggérant l'existence d'un ou plusieurs autres mécanismes de résistance au peptide chez cette souches de *L. pneumophila*. L'identification de ces mécanismes de

résistance supplémentaires pourrait s'orienter vers l'étude du rôle de l'exopolysaccharide produit par la souche Lens. De même, le rôle de l'heptosyltransférase putative codée par le gène *lpl2876* pourra être investigué en évaluant l'effet de l'inactivation de ce gène sur la résistance de la souche Lens à la cathélicidine LL-37.

L'étude de l'effet des PAMs humains sur l'infection par *L. pneumophila* a montré que les peptides LL-37 et HBD-3 inhibent la réplication intracellulaire de la bactérie. De plus, nous avons pu déterminer que cette activité inhibitrice repose au moins en partie sur une interaction entre le peptide et la cellule hôte, indépendamment d'une activité bactéricide directe du peptide en milieu extracellulaire. La possibilité d'une activité bactéricide intracellulaire a été validée pour la cathélicidine, grâce à l'observation de son internalisation par les macrophages U937 et de sa relocalisation dans la vacuole d'endocytose contenant *L. pneumophila*. Ce phénotype pourrait être vérifié pour la défensine HBD-3, notamment à l'aide d'un peptide marqué au TAMRA. Parallèlement, l'hypothèse selon laquelle LL-37 et HBD-3 stimulent les défenses de la cellule hôte a été examinée en évaluant l'effet des peptides sur les étapes clés du cycle infectieux de *Legionella*. Les résultats obtenus montrent que LL-37 n'affecte pas les étapes précoces de l'infection, tandis que HBD-3 augmente l'adhésion et l'entrée des légionelles dans les pneumocytes A549. Le mécanisme mis en jeu dans la stimulation de l'adhésion de *L. pneumophila* par HBD-3 n'a pu être identifié, néanmoins les observations de microscopie confocale suggèrent l'implication d'un processus cellulaire non spécifique aux légionelles. L'une de nos hypothèses implique que la défensine stimule l'expression de surface d'un récepteur cellulaire permettant de fixer de façon directe ou non les légionelles. Afin de vérifier cela, nous pourrions évaluer l'effet de HBD-3 sur l'adhésion de *L. pneumophila* en utilisant des pneumocytes préalablement incubés en présence d'agonistes spécifiques de différents récepteurs cellulaires. Au cours de notre étude nous avons également tenté d'analyser l'impact de LL-37 et HBD-3 sur les étapes plus tardives du cycle infectieux de *Legionella*. Des tests de colocalisation *Legionella*/LAMP-1 ont été entrepris afin de déterminer si les peptides favorisent la dégradation des bactéries par la voie endocytique. Il nous a cependant été difficile d'interpréter les résultats obtenus, en raison des pourcentages de colocalisation anormalement faibles des conditions contrôles. Nous envisageons alors de renouveler ces tests sur une nouvelle lignée de macrophages. Ces données pourront par ailleurs être complétées par l'évaluation de l'effet des peptides sur la capacité de recrutement du réticulum endoplasmique des légionelles, grâce à des tests de colocalisation *Legionella*/calnexine réalisés par microscopie confocale. Cette approche pourrait également être employée pour des tests de colocalisation *Legionella*/LC3 (protéine spécifique des autophagosomes), afin d'étudier la capacité des peptides LL-37 et HBD-3 à induire la dégradation de *L. pneumophila* par autophagie.

En conclusion, ces travaux contribuent à une meilleure compréhension du rôle des peptides LL-37 et HBD-3 dans la défense de l'hôte contre *L. pneumophila*. En évaluant l'impact de ces PAMs sur *les* légionelles à la fois au niveau extracellulaire et intracellulaire, nos résultats suggèrent des modes d'action différents pour chacun des deux peptides. La poursuite de l'étude de l'activité de LL-37 et HBD-3 permettrait d'éclaicir le mécanisme d'action de ces peptides contre *Legionella*, et serait également l'occasion d'analyser l'effet d'autres PAMs humains.

Annexe

Poster présenté à la FEMS (2015)

Title:

Effect of human antimicrobial peptides against *Legionella pneumophila*

Abstract:

Background: Antimicrobial peptides (AMPs) are natural antibiotics widespread throughout the animal kingdom, from bacteria to mammals. They are important components of both innate and adaptative immunity, providing protection against a broad-spectrum of pathogens, such as viruses, bacteria, fungi and parasites.

Objective: Investigate the effect of two human AMPs (HBD-3 and LL-37) on *Legionella pneumophila*.

Methods: In this study, we investigated the action of synthetic LL-37 and HBD-3 on both extracellular and intracellular lifestyle of *L. pneumophila*.

Results: We showed that both peptides exhibit a phase dependent bactericidal effect on extracellular *L. pneumophila*. We also observed that LL-37 and HBD3 inhibit intracellular replication of *L. pneumophila* in macrophages and pneumocytes. We showed by colony counting assays that the adherence and internalization of *L. pneumophila* was not affected in presence of LL-37, but was stimulated with HBD-3, suggesting that this two peptides restrain the bacterial replication by different mechanism of action.

Conclusion: Human AMPs LL-37 and HBD-3 seems to be involved in innate immunity against *L. pneumophila* by acting on the extracellular bacteria and on its intracellular replication.

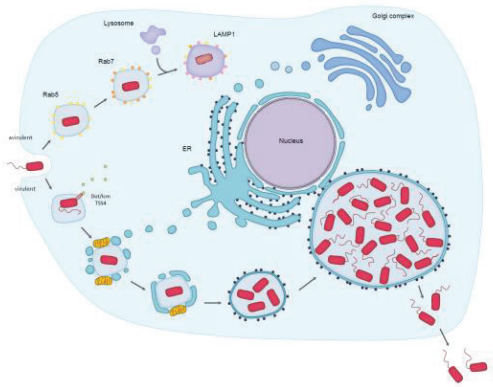
EFFECT OF HUMAN ANTIMICROBIAL PEPTIDES AGAINST *LEGIONELLA PNEUMOPHILA*

Vandewalle M[1], Juan PA[2], Talagrand E[3], Lina G[1], Doublet P[1], Jarraud S[1], Ginevra C[1]

[1] CIRI - Centre International de Recherche en Infectiologie, Ecole Normale Supérieure de Lyon ; Université Ly on 1, INSERM U1111, CNRS UMR5308, ENS de Lyon, France.
[2] Team « Signaling and genetics of competence development in bacterial pathogens », CNRS UMR5240 « Microbiology, Adaptation and Pathogenesis » , Université Ly on 1, France
[3] Team « Pathogènes Hydriques Santé Environnements », UMR 5569 HSM, Université de Montpellier, France ; Département d'Hygiène Hospitalière, CHRU de Montpellier, France

INTRODUCTION

Legionella pneumophila is a ubiquitous fresh water bacterium, described as opportunistic human pathogen responsible for a severe pneumonia known as Legionnaire's disease. When contaminated droplets reach the lung, bacteria can infect alveolar macrophages and pneumocytes, where *Legionella* evades the endocytic degradation pathway and create a replication-permissive *Legionella*-containing vacuole (LCV).
Upon bacterial pulmonary aggression and in a innate immune response context, pulmonary epithelium and neutrophils produce endogen cationic peptides called antimicrobial peptides (AMPs). The protective effects of AMPs rely on their features (cationic charge and amphipathicity) which allow a direct interaction with negatively charged bacterial surfaces, to damage and permeabilize the cell membrane. AMPs can also enter the microbial cytoplasm and inhibit essential functions such as DNA, RNA and protein synthesis, enzymatic activity and cell-wall synthesis. In addition, AMPs can indirectly act against bacteria through a cooperation with the host cell, for example enhancing phagocytosis or by immunomodulation.
These mechanisms of action of AMPs are well documented for extracellular pathogens, but still poorly described for intracellular bacteria, such as *Legionella pneumophila*.

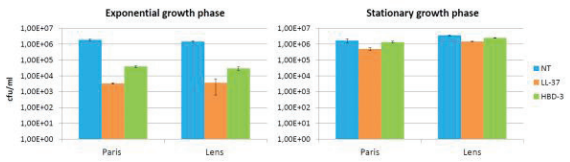


OBJECTIVE

Investigate the effect of two human AMPs (HBD-3 and LL-37) on both extracellular and intracellular lifestyle of two different *Legionella pneumophila* strains (Paris and Lens)

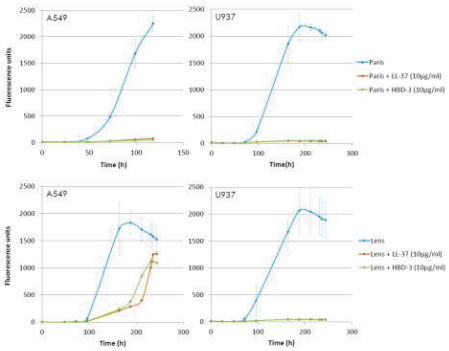
RESULTS

Growth phase modulates sensitivity to AMPs



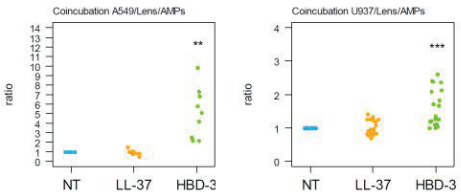
L. pneumophila cultivability evaluation. *Legionella* in exponential and stationary growth phase were non treated (blue) or incubated with 10µg/ml of LL-37 (orange) or HBD-3 (green) during 24h, and then plated on BCYE for colony counting assay.

Intracellular growth of L. pneumophila is inhibited/delayed by AMPs



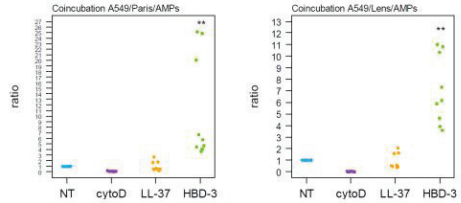
Intracellular growth of *L. pneumophila* in pneumocytes (A549) or macrophages (U937). Cells were exposed to *Legionella* (MOI of 10) for 2h, then washed and incubated with AMPs (10µg/ml). Intracellular replication was monitored by measuring the fluorescence of mCherry.

HBD-3 stimulate Legionella adhesion to A549 cells and/or U937 cells



Adhesion assay. Cells were exposed to *Legionella* (MOI of 10) during 2h with 10µg/ml of AMPs, then washed, lysed and bacteria were plated on BCYE for colony counting assay. * $P< 0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

HBD-3 stimulate Legionella internalization in A549 cells



Internalization assay. Cells were exposed to *Legionella* (MOI of 10) during 2h with 10µg/ml of AMPs, then treated with 200µg/ml of gentamicin for 2h to remove any extracellular bacteria. Cells were washed and lysed, then intracellular bacteria were plated on BCYE for colony counting assay. * $P< 0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

CONCLUSIONS

Human AMPs LL-37 and HBD-3 seems to be involved in innate immunity against *L. pneumophila* by acting on the extracellular bacteria and on its intracellular replication
- Bactericidal effect of AMPs vary according to the growth phase, with a much more pronounced effect during exponential growth phase
- LL-37 and HBD-3 inhibit/delay *Legionella* intracellular growth in macrophages and pneumocytes
- LL-37 had no effect on *Legionella* adhesion or internalization in macrophages or pneumocytes
- HBD-3 enhance *Legionella* adhesion and internalization in macrophages and/or pneumocytes

With regards to the AMPs effect ion intracellular growth each peptide seems to exert its inhibitory action against *L. pneumophila* by different mechanisms from each other.

Références

Abachin E, Poyart C, Pellegrini E *et al.* (2002) Formation of D-alanyl-lipoteichoic acid is required for adhesion and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology*, **43**, 1–14.

Afssaps (2011) *Traitement antibiotique de la légionellose chez l'adulte*.

Agerberth B, Charo J, Werr J *et al.* (2000) The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood*, **96**, 3086–3093.

Albiol Matanic VC, Castilla V (2004) Antiviral activity of antimicrobial cationic peptides against Junin virus and herpes simplex virus. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **23**, 382–9.

Alli OA, Gao LY, Pedersen LL *et al.* (2000) Temporal pore formation-mediated egress from macrophages and alveolar epithelial cells by *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity*, **68**, 6431–40.

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 and Infection*, **15**, 981–8.

Almahmoud I, Kay E, Schneider D, Maurin M (2009) Mutational paths towards increased fluoroquinolone resistance in *Legionella pneumophila*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **64**, 284–293.

Altman E, Segal G (2008) The response regulator CpxR directly regulates expression of several *Legionella pneumophila icm/dot* components as well as new translocated substrates. *Journal of Bacteriology*, **190**, 1985–1996.

Amaro F, Gilbert JA, Owens S, Trimble W, Shuman HA (2012) Whole-genome sequence of the human pathogen *Legionella pneumophila* serogroup 12 strain 570-CO-H. *Journal of Bacteriology*, **194**, 1613–1614.

Ambagala TC, Ambagala APN, Srikumaran S (1999) The leukotoxin of *Pasteurella haemolytica* binds to beta-2 integrins on bovine leukocytes. *FEMS Microbiology Letters*, **179**, 161–167.

Amer LS, Bishop BM, van Hoek ML (2010) Antimicrobial and antibiofilm activity of cathelicidins and short, synthetic peptides against *Francisella*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **396**, 246–51.

Anaya-López JL, López-Meza JE, Ochoa-Zarzosa A (2013) Bacterial resistance to cationic antimicrobial peptides. *Critical Reviews in Microbiology*, **39**, 180–95.

Andersen JH, Jenssen H, Sandvik K, Gutteberg TJ (2004) Anti-HSV activity of lactoferrin and lactoferricin is dependent on the presence of heparan sulphate at the cell surface. *Journal of medical virology*, **74**, 262–71.

Arasaki K, Toomre DK, Roy CR (2012) The *Legionella pneumophila* effector DrrA is sufficient to

stimulate SNARE-dependent membrane fusion. *Cell Host & Microbe*, **11**, 46–57.

Arnett E, Lehrer RI, Pratikhya P, Lu W, Seveau S (2011) Defensins enable macrophages to inhibit the intracellular proliferation of *Listeria monocytogenes*. *Cellular Microbiology*, **13**, 635–651.

Atlas RM (1999) *Legionella*: from environmental habitats to disease pathology, detection and control. *Environmental Microbiology*, **1**, 283–293.

Aurass P, Gerlach T, Becher D *et al.* (2016) Life stage-specific proteomes of *Legionella pneumophila* reveal a highly differential abundance of virulence-associated Dot/Icm effectors. *Molecular & Cellular Proteomics*, **15**, 177–200.

Babolewska E, Brzezinska-Blaszczyk E (2015) Human-derived cathelicidin LL-37 directly activates mast cells to proinflammatory mediator synthesis and migratory response. *Cellular Immunology*, **293**, 67–73.

Bachman MA, Swanson MS (2001) RpoS co-operates with other factors to induce *Legionella pneumophila* virulence in the stationary phase. *Molecular Microbiology*, **40**, 1201–1214.

Bals R, Wang X, Wu Z *et al.* (1998a) Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *Journal of Clinical Investigation*, **102**, 874–880.

Bals R, Wang X, Zasloff M, Wilson JM (1998b) The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 9541–6.

Bals R, Weiner DJ, Moscioni AD, Meegalla RL, Wilson JM (1999) Augmentation of innate host defense by expression of a cathelicidin antimicrobial peptide. *Infection and Immunity*, **67**, 6084–6089.

Bandholtz L, Ekman GJ, Vilhelmsson M *et al.* (2006) Antimicrobial peptide LL-37 internalized by immature human dendritic cells alters their phenotype. *Scandinavian Journal of Immunology*, **63**, 410–419.

Bandurska K, Berdowska A, Barczynska-Felusiak R, Krupa P (2015) Unique features of human cathelicidin LL-37. *BioFactors*, **41**, 289–300.

Bardill JP, Miller JL, Vogel JP (2005) IcmS-dependent translocation of SdeA into macrophages by the *Legionella pneumophila* type IV secretion system. *Molecular Microbiology*, **56**, 90–103.

Barker J, Lambert P a, Brown MR (1993) Influence of intra-amoebic and other growth conditions on the surface properties of *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity*, **61**, 3503–10.

Barlow PG, Svoboda P, Mackellar A *et al.* (2011) Antiviral activity and increased host defense against influenza infection elicited by the human cathelicidin LL-37. *PLoS One*, **6**, e25333.

Baron PA, Willeke K (1986) Respirable droplets from whirlpools: Measurements of size distribution and estimation of disease potential. *Environmental Research*, **39**, 8–18.

Bastos MCF, Ceotto H, Coelho ML V, Nascimento JS (2009) Staphylococcal antimicrobial peptides: relevant properties and potential biotechnological applications. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, **10**, 38–61.

Bayer AS, Mishra NN, Chen L *et al.* (2015) Frequency and distribution of single-nucleotide polymorphisms within *mprF* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates and their role in cross-resistance to Daptomycin and host defense antimicrobial peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **59**, 4930–4937.

Beauté J, Zucs P, de Jong B (2013) Legionnaires disease in Europe, 2009-2010. *Euro surveillance: bulletin Européen sur les maladies transmissibles*, **18**, 20417.

Belas R, Manos J, Suvanasuthi R (2004) *Proteus mirabilis* ZapA metalloprotease degrades a broad spectrum of substrates , including antimicrobial peptides. *Infection and Immunity*, **72**, 5159–5167.

Bellinger-Kawahara C, Horwitz MA (1990) Complement component C3 fixes selectively to the major outer membrane protein (MOMP) of *Legionella pneumophila* and mediates phagocytosis of liposome-MOMP complexes by human monocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, **172**, 1201–1210.

Bengoechea ÂA, Skurnik M (2000) Temperature-regulated efflux pump / potassium antiporter system mediates resistance to cationic antimicrobial peptides in *Yersinia*. *Molecular Microbiology*, **37**, 67–80.

Benincasa M, Mattiuzzo M, Herasimenka Y *et al.* (2009) Activity of antimicrobial peptides in the presence of polysaccharides produced by pulmonary pathogens. *Journal of Peptide Science*, **15**, 595–600.

Berger KH, Isberg RR (1993) Two distinct defects in intracellular growth complemented by a single genetic locus in *Legionella pneumophila*. *Molecular Microbiology*, **7**, 7–19.

Berger KH, Merriam JJ, Isberg RR (1994) Altered intracellular targeting properties associated with mutations in the *Legionella pneumophila dotA* gene. *Molecular Microbiology*, **14**, 809–822.

Berjeaud J-M, Chevalier S, Schlusselhuber M *et al.* (2016) *Legionella pneumophila*: The paradox of a highly sensitive opportunistic waterborne pathogen able to persist in the environment. *Frontiers in Microbiology*, **7**, 1–16.

Bessalle R, Haas H, Goria A, Shalit I, Fridkin M (1992) Augmentation of the antibacterial activity of magainin by positive-charge chain extension. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **36**, 313–317.

Bevins CL (2006) Paneth cell defensins: key effector molecules of innate immunity. *Biochemical Society Transactions*, **34**, 263–266.

Bishop RE, Gibbons HS, Guina T *et al.* (2000) Transfer of palmitate from phospholipids to lipid A in outer membranes of gram-negative bacteria. *The EMBO Journal*, **19**, 5071–5080.

Blodkamp S, Kadlec K, Gutsmann T *et al.* (2016) Effects of SecDF on the antimicrobial

functions of cathelicidins against *Staphylococcus aureus*. *Veterinary Microbiology*.

Boman HG (1995) Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annual Review of Immunology*, **13**, 61–92.

Boman HG, Agerberth B, Boman A (1993) Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infection and Immunity*, **61**, 2978–84.

Bonifacino JS, Hurley JH (2008) Retromer. *Current Opinion in Cell Biology*, **20**, 427–436.

Boniotto M, Antcheva N, Zelezetsky I *et al.* (2003) A study of host defence peptide β-defensin 3 in primates. *Biochemical Journal*, **714**, 707–714.

Boniotto M, Jordan WJ, Eskdale J *et al.* (2006) Human β-defensin 2 induces a vigorous cytokine response in peripheral blood mononuclear cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **50**, 1433–1441.

Borchardt J, Helbig JH, Lück PC (2008) Occurrence and distribution of sequence types among *Legionella pneumophila* strains isolated from patients in Germany: Common features and differences to other regions of the world. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **27**, 29–36.

Borella P, Guerrieri E, Marchesi I, Bondi M, Messi P (2005) Water ecology of *Legionella* and protozoan: Environmental and public health perspectives. *Biotechnology Annual Review*, **11**, 355–380.

Borges V, Nunes A, Sampaio DA *et al.* (2016) *Legionella pneumophila* strain associated with the first evidence of person-to-person transmission of Legionnaires' disease: a unique mosaic genetic backbone. *Scientific Reports*, **6**, 26261.

Bornstein N, Marmet D, Dumaine MH, Surgot M, Fleurette J (1991) Detection of flagella in 278 *Legionella* strains by latex reagent sensitized with antiflagellum immunoglobulins. *Journal of Clinical Microbiology*, **29**, 953–956.

Bozue JA, Johnson W (1996) Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: Uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion. *Infection and Immunity*, **64**, 668–673.

Brabetz W, Müller-Loennies S, Holst O, Brade H (1997) Deletion of the heptosyltransferase genes *rfaC* and *rfaF* in *Escherichia coli* K-12 results in an Re-type lipopolysaccharide with a high degree of 2-aminoethanol phosphate substitution. *European Journal of Biochemistry*, **247**, 716–724.

Brenner D, Steigerwalt A, McDade J (1979) Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family *Legionellaceae*, familia nova. *Annals of Internal Medecine*, **90**, 656–658.

Brissette CA, Simonson LG, Lukehart SA (2004) Resistance to human beta-defensins is common among oral treponemes. *Oral Microbiology Immunology*, **19**, 403–407.

Brogden K (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?

Nature Reviews Microbiology, **3**, 238–50.

Brombacher E, Urwyler S, Ragaz C *et al.* (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.

Brötz H, Bierbaum G, Leopold K, Reynolds PE, Sahl HG (1998) The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **42**, 154–160.

Brüggemann H, Cazalet C, Buchrieser C (2006a) Adaptation of *Legionella pneumophila* to the host environment: Role of protein secretion, effectors and eukaryotic-like proteins. *Current Opinion in Microbiology*, **9**, 86–94.

Brüggemann H, Hagman A, Jules M *et al.* (2006b) Virulence strategies for infecting phagocytes deduced from the *in vivo* transcriptional program of *Legionella pneumophila*. *Cellular Microbiology*, **8**, 1228–1240.

Bruin JP, Ijzerman EPF, den Boer JW, Mouton JW, Diederen BMW (2011) Wild-type MIC distribution and epidemiological cut-off values in clinical *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **72**, 103–108.

Bruin JP, Koshkolda T, IJzerman EPF *et al.* (2014) Isolation of ciprofloxacin-resistant *Legionella pneumophila* in a patient with severe pneumonia. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **69**, 2869–2871.

Buchau SA (2010) The host defense peptide cathelicidin is required for NK cell- mediated suppression of tumor growth. *Journal of Immunology*, **3**, 1–19.

Bulet P (2004) Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunological Reviews*, **198**, 169–184.

Buscher BA, Conover GM, Miller JL *et al.* (2005) The DotL protein, a member of the TraG-coupling protein family, is essential for viability of *Legionella pneumophila* strain Lp02. *Journal of Bacteriology*, **187**, 2927–2938.

Byfield FJ, Kowalski M, Cruz K *et al.* (2011) Cathelicidin LL-37 increases lung epithelial cell stiffness, decreases transepithelial permeability, and prevents epithelial invasion by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Immunology*, **187**, 6402–9.

Byrne B, Swanson MM (1998) Expression of *Legionella pneumophila* Virulence Traits in Response to Growth Conditions. *Infection and Immunity*, **66**, 3029–3034.

Cambronne ED, Roy CR (2007) The *Legionella pneumophila* IcmSW complex interacts with multiple Dot/Icm effectors to facilitate type IV translocation. *PLoS Pathogens*, **3**, 1837–1848.

Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A *et al.* (2001) Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial rna polymerase. *Cell*, **104**, 901–12.

Campèse C, Descours G, Lepoutre A *et al.* (2015) Legionnaires' disease in France. *Medecine et Maladies Infectieuses*, **45**, 65–71.

Campodonico EM, Chesnel L, Roy CR (2005) A yeast genetic system for the identification and characterization of substrate proteins transferred into host cells by the *Legionella pneumophila* Dot/Icm system. *Molecular Microbiology*, **56**, 918–933.

Campos SK, Chapman J a, Deymier MJ, Bronnimann MP, Ozbun M a (2012) Opposing effects of bacitracin on human papillomavirus type 16 infection: enhancement of binding and entry and inhibition of endosomal penetration. *Journal of Virology*, **86**, 4169–81.

Campos MA, Vargas MA, Regueiro V *et al.* (2004) Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infection and Immunity*, **72**, 7107–7114.

Casteels P, Ampe C, Jacobs F, Vaeck M, Tempst P (1989) Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *The EMBO Journal*, **8**, 2387–2391.

Cazalet C, Buchrieser C (2005) Qu'apprend-on du génome de *Legionella pneumophila*? *Medecine/Sciences*, **21**, 455–457.

Cazalet C, Gomez-Valero L, Rusniok C *et al.* (2010) Analysis of the Legionella longbeachae genome and transcriptome uncovers unique strategies to cause Legionnaires' disease. *PLoS Genetics*, **6**.

Cazalet C, Rusniok C, Brüggemann H *et al.* (2004) Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. *Nature Genetics*, **36**, 1165–1173.

Chakraborty K, Ghosh S, Koley H *et al.* (2008) Bacterial exotoxins downregulate cathelicidin (hCAP-18/LL-37) and human β-defensin 1 (HBD-1) expression in the intestinal epithelial cells. *Cellular Microbiology*, **10**, 2520–2537.

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*. *Infection and Immunity*, **73**, 4272–4280.

Charpentier X, Gabay JE, Reyes M *et al.* (2009) Chemical genetics reveals bacterial and host cell functions critical for type IV effector translocation by *Legionella pneumophila*. *PLoS pathogens*, **5**, e1000501.

Chen J, Clarke KS, de Felipe M *et al.* (2004) *Legionella* Effectors That Promote Nonlytic Release from Protozoa. *Science*, **303**, 1358–1361.

Chen X, Niyonsaba F, Ushio H *et al.* (2005) Synergistic effect of antibacterial agents human beta-defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Dermatological Science*, **40**, 123–32.

Cheng H-Y, Chen Y-F, Peng H-L (2010) Molecular characterization of the PhoPQ-PmrD-PmrAB mediated pathway regulating polymyxin B resistance in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *Journal of Biomedical Science*, **17**, 60.

Cherfils J, Zeghouf M (2013) Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Pharmacological Reviews*, **93**, 269–309.

Chesnokova LS, Slepenkov S V, Witt SN (2004) The insect antimicrobial peptide, I-

pyrrhocoricin, binds to and stimulates the ATPase activity of both wild-type and lidless DnaK. *FEBS Letters*, **565**, 65–69.

Chidiac C, Che D, Pires-Cronenberger S *et al.* (2012) Factors associated with hospital mortality in community-acquired legionellosis in France. *European Respiratory Journal*, **39**, 963–970.

Chien M, Morozova I, Shi S *et al.* (2004) The genomic sequence of the accidental pathogen *Legionella pneumophila*. *Science*, **305**, 1966–1968.

Cirillo SLG, Bermudez LE, El-Etr SH, Duhamel GE, Cirillo JD (2001) *Legionella pneumophila* entry gene *rtxA* is involved in virulence. *Infection and Immunity*, **69**, 508–517.

Cirillo JD, Cirillo SLG, Yan L *et al.* (1999) Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity*, **67**, 4427–4434.

Cirioni O, Giacometti A, Ghiselli R *et al.* (2006) LL-37 protects rats against lethal sepsis caused by gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **50**, 1672–1679.

Clements A, Tull D, Jenney AW *et al.* (2007) Secondary acylation of *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide contributes to sensitivity to antibacterial peptides. *Journal of Biological Chemistry*, **282**, 15569–15577.

Coers J, Kagan JC, Matthews M *et al.* (2000) Identification of Icm protein complexes that play distinct roles in the biogenesis of an organelle permissive for *Legionella pneumophila* intracellular growth. *Molecular Microbiology*, **38**, 719–736.

Cole JN, Nizet V (2016) Bacterial evasion of host antimicrobial peptide defenses. *Microbiology Spectrum*, **4**, 1–22.

Conover GM, Martinez-morales F, Heidtman MI *et al.* (2009) Phosphatidylcholine synthesis is required for optimal function of *Legionella pneumophila* virulence determinants. *Cellular Microbiology*, **10**, 514–528.

Correia AM, Ferreira JS, Borges V *et al.* (2016) Probable Person-to-Person Transmission of Legionnaires' Disease. *New England Journal of Medicine*, **374**, 497–498.

Cowland JB, Borregaard N (1999) The individual regulation of granule protein mRNA levels during neutrophil maturation explains the heterogeneity of neutrophil granules. *Journal of Leukocyte Biology*, **66**, 989–995.

Coxon PY, Summersgill JT, Ramirez JA, Miller RD (1998) Signal transduction during *Legionella pneumophila* entry into human monocytes. *Infection and Immunity*, **66**, 2905–2913.

Crack LR, Jones L, Malavige GN, Patel V, Ogg GS (2012) Human antimicrobial peptides LL-37 and human β-defensin-2 reduce viral replication in keratinocytes infected with varicella zoster virus. *Clinical and Experimental Dermatology*, **37**, 534–543.

Currie SM, Findlay EG, McHugh BJ *et al.* (2013) The human cathelicidin LL-37 has antiviral activity against respiratory syncytial virus. *PLoS One*, **8**, e73659.

D'Auria G, Peris-Bondia NJ-HF, Moya A, Latorre A (2010) *Legionella pneumophila* pangenome

reveals strain-specific virulence factors. *BioMed Central*.

Dalebroux ZD, Edwards RL, Swanson MS (2009) SpoT governs *Legionella pneumophila* differentiation in host macrophages. *Molecular Microbiology*, **71**, 640–658.

Dathe M, Nikolenko H, Meyer J, Beyermann M, Bienert M (2001) Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS Letters*, **501**, 146–150.

Dathe M, Schumann M, Wieprecht T *et al.* (1996) Peptide helicity and membrane surface charge modulate the balance of electrostatic and hydrophobic interactions with lipid bilayers and biological membranes. *Biochemistry*, **35**, 12612–12622.

Dathe M, Wieprecht T (1999) Structural features of helical antimicrobial peptides: Their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1462**, 71–87.

David S, Mentasti M, Tewolde R *et al.* (2016) Evaluation of an optimal epidemiological typing scheme for Legionella pneumophila with whole-genome sequence data using validation guidelines. *Journal of Clinical Microbiology*, **54**, 2135–2148.

Davidson DJ, Currie AJ, Reid GSD *et al.* (2004) The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization. *The Journal of Immunology*, **172**, 1146–1156.

Dean SN, Bishop BM, Van Hoek ML (2011) Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm to alpha-helical peptides: D-enantiomer of LL-37. *Frontiers in Microbiology*, **2**, 1–11.

Deng W, Liou S, Iii GP *et al.* (2003) Comparative Genomics of *Salmonella enterica* Serovar Typhi Strains Ty2 and CT18. *Society*, **185**, 2330–2337.

Derre I, Isberg RR (2005) LidA, a translocated substrate of the *Legionella pneumophila* type IV secretion system, interferes with the early secretory pathway. *Society*, **73**, 4370–4380.

Descours G, Ginevra C, Jacotin N *et al.* (2016) Ribosomal mutations conferring macrolides resistance in *Legionella pneumophila*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.

Descours G, Suet A, Ginevra C *et al.* (2012) Contribution of amoebic coculture to recovery of *Legionella* isolates from respiratory samples: Prospective analysis over a period of 32 months. *Journal of Clinical Microbiology*, **50**, 1725–1726.

Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE (2009) Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): An overview. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, **29**, 313–326.

Dhople V, Krukemeyer A, Ramamoorthy A (2006) The human beta-defensin-3, an antibacterial peptide with multiple biological functions. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, **1758**, 1499–1512.

Didelot X, Bowden R, Wilson DJ, Peto TEA, Crook DW (2012) Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. *Nature Publishing Group*, **13**, 601–612.

Diederen BMW (2008) *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. *Journal of Infection*, **56**, 1–12.

Ding B, Soblosky L, Nguyen K *et al.* (2013) Physiologically-relevant modes of membrane interactions by the human antimicrobial peptide, LL-37, revealed by SFG experiments. *Scientific Reports*, **3**, 1854.

Dominguez A, Alvarez J, Sabria M *et al.* (2009) Factors influencing the case-fatality rate of Legionnaires' disease. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, **13**, 407–412.

Dowling JN, McDevitt DA, Pasculle AW (1984) Disk diffusion antimicrobial susceptibility testing of members of the family *Legionellaceae* including erythromycin-resistant variants of *Legionella micdadei*. *Journal of Clinical Microbiology*, **19**, 723–729.

Dugan AS, Maginnis MS, Jordan JA *et al.* (2008) Human alpha-defensins inhibit BK virus infection by aggregating virions and blocking binding to host cells. *Journal of Biological Chemistry*, **283**, 31125–31132.

Duménil G, Isberg RR (2001) The *Legionella pneumophila* IcmR protein exhibits chaperone activity for IcmQ by preventing its participation in high-molecular-weight complexes. *Molecular Microbiology*, **40**, 1113–1127.

Duménil G, Montminy TP, Tang M, Isberg RR (2004) IcmR-regulated membrane insertion and efflux by the *Legionella pneumophila* IcmQ protein. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 4686–4695.

Duncan C, Prashar A, So J *et al.* (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. *Infection and Immunity*, **79**, 2168–2181.

Duquesne S, Destoumieux-Garzón D, Peduzzi J, Rebuffat S (2007) Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Natural Product Reports*, **24**, 708.

Dürr UHN, Sudheendra US, Ramamoorthy A (2006) LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, **1758**, 1408–1425.

Edelstein PH, Hu B, Higa F *et al.* (2003) IvgA, a novel *Legionella pneumophila* virulence factor. *Infection and Immunity*, **71**.

Eisenberg D (1984) Three-dimentional structure of membrane and surface proteins. *Annual Review of Biochemistry*, **53**, 595–623.

Eisenberg D, Weiss RM, Terwilliger TC (1984) The hydrophobic moment detects periodicity in protein hydrophobicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **81**, 140–144.

Ernst CM, Staubitz P, Mishra NN *et al.* (2009) The bacterial defensin resistance protein MprF consists of separable domains for lipid lysinylation and antimicrobial peptide repulsion. *PLoS Pathogens*, **5**, 1–9.

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2016) *Legionnaires' disease in Europe, 2014*.

Fabretti F, Theilacker C, Baldassarri L *et al.* (2006) Alanine esters of enterococcal lipoteichoic

acid play a role in biofilm formation and resistance to antimicrobial peptides. *Infection and Immunity*, **74**, 4164–4171.

Farelli JD, Gumbart JC, Akey I V. *et al.* (2013) IcmQ in the type 4b secretion system contains an NAD+ binding domain. *Structure*, **21**, 1361–1373.

Faucher SP, Mueller C a., Shuman H a. (2011) *Legionella Pneumophila* transcriptome during intracellular multiplication in human macrophages. *Frontiers in Microbiology*, **2**, 1–18.

Faulkner G, Garduño RA (2002) Ultrastructural analysis of differentiation in *Legionella pneumophila*. *Society*, **184**, 7025–7041.

De Felipe KS, Glover RT, Charpentier X *et al.* (2008) *Legionella* eukaryotic-like type IV substrates interfere with organelle trafficking. *PLoS Pathogens*, **4**, e1000117.

De Felipe KS, Pampou S, Oliver S *et al.* (2005) Evidence for acquisition of *Legionella* type IV secretion substrates *via* interdomain horizontal gene transfer. *Journal of Bacteriology*, **187**, 7716–7726.

Feng Z, Dubyak GR, Lederman MM, Weinberg A (2006) Cutting edge: human beta defensin 3: a novel antagonist of the HIV-1 coreceptor CXCR4. *Journal of Immunology*, **177**, 782–786.

Fernandez-Moreira E, Helbig JH, Swanson MS (2006) Membrane vesicles shed by *Legionella pneumophila* inhibit fusion of phagosomes with lysosomes. *Infection and Immunity*, **74**, 3285–3295.

Fernie-King BA, Seilly DJ, Lachmann PJ (2004) The interaction of streptococcal inhibitor of complement (SIC) and its proteolytic fragments with the human beta defensins. *Immunology*, **111**, 444–452.

Fields B, Robert B, Richard B (2002) *Legionella* and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation. *Journal of Clinical Microbiology*, **16**, 697–699.

Finsel I, Hilbi H (2015) Formation of a pathogen vacuole according to *Legionella pneumophila*: how to kill one bird with many stones. *Cellular Microbiology*, **17**, 935–950.

Finsel I, Ragaz C, Hoffmann C *et al.* (2013) The *Legionella* effector RidL inhibits retrograde trafficking to promote intracellular replication. *Cell Host & Microbe*, **14**, 38–50.

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

Forgac M (2007) Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **8**, 917–929.

Foschiatti M, Cescutti P, Tossi A, Rizzo R (2009) Inhibition of cathelicidin activity by bacterial exopolysaccharides. *Molecular Microbiology*, **72**, 1137–1146.

Franco IS, Shohdy N, Shuman H a (2012) The *Legionella pneumophila* effector VipA is an actin nucleator that alters host cell organelle trafficking. *PLoS Pathogens*, **8**, e1002546.

Frick IM, Åkesson P, Rasmussen M, Schmidtchen A, Björck L (2003) SIC, a secreted protein of *Streptococcus pyogenes* that inactivates antibacterial peptides. *Journal of Biological*

Chemistry, **278**, 16561–16566.

Frohm M, Agerberth B, Ahangari G *et al.* (1997) The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**, 15258–15263.

Fuche F, Vianney A, Andrea C, Doublet P, Gilbert C (2015) Functional type 1 secretion system involved in *Legionella pneumophila* virulence. *Journal of Bacteriology*, **197**, 563–571.

Funderburg N, Lederman MM, Feng Z *et al.* (2007) Human beta-defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 18631–18635.

Gaia V, Fry NK, Afshar B *et al.* (2005) Consensus Sequence-Based Scheme for Epidemiological Typing of Clinical and Environmental Isolates of *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Microbiology*, **43**, 2047–2052.

Ganz T (2003) Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, **3**, 710–20.

Garduño RA, Garduño E, Paul S, Gardun E, Hoffman PS (1998) Surface-associated Hsp60 chaperonin of *Legionella pneumophila* mediates invasion in a HeLa cell model. *Infection and Immunity*, **66**, 4602–4610.

Gaspar AH, Machner MP (2014) VipD is a Rab5-activated phospholipase A1 that protects *Legionella pneumophila* from endosomal fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **111**, 4560–5.

Gast RJ, Moran DM, Dennett MR, Wurtsbaugh WA, Amaral-Zettler LA (2012) Amoebae and *Legionella pneumophila* in saline environments. *Journal of Water and Health*, **9**, 0–18.

Gazit E, Miller IR, Biggin PC, Sansom MS, Shai Y (1996) Structure and orientation of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 within phospholipid membranes. *Journal of Molecular Biology*, **258**, 860–70.

George JR, Pine L, Reeves MW, Harrell WK (1980) Amino acid requirements of *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Microbiology*, **11**, 286–291.

Gifford JL, Hunter HN, Vogel HJ (2005) Lactoferricin: A lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **62**, 2588–2598.

Gilbert RJC, Serra MD, Froelich CJ, Wallace MI, Anderluh G (2014) Membrane pore formation at protein–lipid interfaces. *Trends in Biochemical Sciences*, **39**, 510–516.

Glöckner G, Albert-Weissenberger C, Weinmann E *et al.* (2008) Identification and characterization of a new conjugation/type IVA secretion system (trb/tra) of *Legionella pneumophila* Corby localized on two mobile genomic islands. *International Journal of Medical Microbiology*, **298**, 411–428.

Gombart AF, Borregaard N, Koeffler HP (2005) Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in

myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *The FASEB Journal*, **19**, 1067–1077.

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, Jarraud S *et al.* (2011) Extensive recombination events and horizontal gene transfer shaped the *Legionella pneumophila* genomes. *BMC Genomics*, **12**, 536.

Gordon YJ, Huang LC, Romanowski EG *et al.* (2005) Human cathelicidin (LL-37), a multifunctional peptide, is expressed by ocular surface epithelia and has potent antibacterial and antiviral activity. *Current Eye Research*, **30**, 385–94.

Gorter a D, Eijk PP, van Wetering S *et al.* (1998) Stimulation of the adherence of *Haemophilus influenzae* to human lung epithelial cells by antimicrobial neutrophil defensins. *The Journal of Infectious Diseases*, **178**, 1067–74.

Gorter a D, Hiemstra PS, de Bentzmann S *et al.* (2000) Stimulation of bacterial adherence by neutrophil defensins varies among bacterial species but not among host cell types. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **28**, 105–11.

Gosselin F, Duval JFL, Simonet J *et al.* (2011) Impact of the virulence-associated MAb3/1 epitope on the physicochemical surface properties of *Legionella pneumophila* sg1: An issue to explain infection potential? *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **82**, 283–290.

Graham RMA, Doyle CJ, Jennison A V (2014) Real-time investigation of a *Legionella pneumophila* outbreak using whole genome sequencing. *Epidemiology and Infection*, **142**, 2347–51.

Groth M, Szafranski K, Taudien S *et al.* (2008) High-resolution mapping of the 8p23.1 beta-defensin cluster reveals strictly concordant copy number variation of all genes. *Human Mutation*, **29**, 1247–54.

Gruenheid S, Le Moual H (2012) Resistance to antimicrobial peptides in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, **330**, 81–89.

Guilhelmelli F, Vilela N, Albuquerque P *et al.* (2013) Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Frontiers in Microbiology*, **4**, 353.

Guina T, Yi EC, Wang H, Hackett M, Miller SI (2000) A PhoP-regulated outer membrane protease of *Salmonella enterica* serovar typhimurium promotes resistance to alpha-helical antimicrobial peptides. *Journal of bacteriology*, **182**, 4077–86.

Gunn JS, Ryan SS, Van Velkinburgh JC, Ernst RK, Miller SI (2000) Genetic and functional analysis of a PmrA-PmrB-regulated locus necessary for lipopolysaccharide modification, antimicrobial peptide resistance, and oral virulence of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infection and Immunity*, **68**, 6139–6146.

Guo L, Lim KB, Poduje CM *et al.* (1998) Lipid A acylation and bacterial resistance against

vertebrate antimicrobial peptides. *Cell*, **95**, 189–98.

Hancock RE (1997) Peptide antibiotics. *The Lancet*, **349**, 418–422.

Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM (2001) Isolation and characterization of human β-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 5707–5713.

Hardiman CA, Roy CR (2014) AMPylation is critical for Rab1 localization to vacuoles containing *Legionella pneumophila*. *mBio*, **5**, 1–11.

Harris F, Dennison S, Phoenix D (2009) Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. *Current Protein & Peptide Science*, **10**, 585–606.

Harrison TG, Afshar B, Doshi N, Fry NK, Lee J V. (2009) Distribution of *Legionella pneumophila* serogroups, monoclonal antibody subgroups and DNA sequence types in recent clinical and environmental isolates from England and Wales (2000-2008). *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **28**, 781–791.

Hase K, Eckmann L, Leopard JD, Varki N, Kagnoff MF (2002) Cell differentiation is a key determinant of cathelicidin LL-37 / human cationic antimicrobial protein 18 expression by human colon epithelium. *Society*, **70**, 953–963.

Hase K, Murakami M, Iimura M *et al.* (2003) Expression of LL-37 by human gastric epithelial cells as a potential host defense mechanism against *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, **125**, 1613–1625.

Hassan M, Kjos M, Nes IF, Diep DB, Lotfipour F (2012) Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology*, **113**, 723–736.

Hawkey PM (2003) Mechanisms of quinolone action and microbial response. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **51**, 29–35.

Hayashi T, Miyake M, Fukui T *et al.* (2008) Exclusion of actin-binding protein p57/coronin-1 from bacteria-containing phagosomes in macrophages infected with *Legionella*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **31**, 861–5.

Hazrati E, Galen B, Lu W *et al.* (2006) Human alpha- and beta-defensins block multiple steps in herpes simplex virus infection. *Journal of Immunology*, **177**, 8658–8666.

He K, Ludtke SJ, Worcester DL, Huang HW (1996) Neutron scattering in the plane of membranes: structure of alamethicin pores. *Biophysical Journal*, **70**, 2659–2666.

Hebert GA, Callaway CS, Ewing EP (1984) Comparison of *Legionella pneumophila*, *L. micdadei*, *L. bozemanii*, and *L. dumoffii* by transmission electron microscopy. *Journal of Clinical Microbiology*, **19**, 116–121.

Heidtman M, Chen EJ, Moy M-Y, Isberg RR (2009) Large scale identification of *Legionella pneumophila* Dot/Icm substrates that modulate host cell vesicle trafficking pathways. *Cellular Microbiology*, **11**, 230–248.

Helbig JH, Bernander S, Castellani Pastoris M *et al.* (2002) Pan-European study on culture-

proven Legionnaires' disease: Distribution of *Legionella pneumophila* serogroups and monoclonal subgroups. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **21**, 710–716.

Hell É, Giske CG, Nelson A, Römling U, Marchini G (2010) Human cathelicidin peptide LL37 inhibits both attachment capability and biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Letters in Applied Microbiology*, **50**, 211–215.

Heller R, Höller C, Süssmuth R, Gundermann KO (1998) Effect of salt concentration and temperature on survival of *Legionella pneumophila*. *Letters in Applied Microbiology*, **26**, 64–8.

Herasimenka Y, Benincasa M, Mattiuzzo M *et al.* (2005) Interaction of antimicrobial peptides with bacterial polysaccharides from lung pathogens. *Peptides*, **26**, 1127–1132.

Hilbi H, Segal G, Shuman H a (2001) Icm / Dot-dependent upregulation of phagocytosis by *Legionella pneumophila*. *Molecular Microbiology*, **42**, 603–617.

Hilbi H, Weber S, Finsel I (2011) Anchors for effectors: Subversion of phosphoinositide lipids by *Legionella*. *Frontiers in Microbiology*, **2**, 1–8.

Hindahl MS, Iglewski BH (1984) Isolation and characterization of the *Legionella pneumophila* outer membrane. *Journal of Bacteriology*, **159**, 107–113.

Ho J, Legowska A, Rolka K *et al.* (2011) Peptides Effects of cathelicidin and its fragments on three key enzymes of HIV-1. *Peptides*, **32**, 1117–1122.

Horenkamp FA, Mukherjee S, Alix E *et al.* (2015) *Legionella pneumophila* subversion of host vesicular transport by SidC effector proteins. *Traffic*, **15**, 488–499.

Horwitz MA (1983) Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, **158**, 1319–31.

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

Hsu CH, Chen C, Jou ML *et al.* (2005) Structural and DNA-binding studies on the bovine antimicrobial peptide, indolicidin: Evidence for multiple conformations involved in binding to membranes and DNA. *Nucleic Acids Research*, **33**, 4053–4064.

Hsu F, Zhu W, Brennan L *et al.* (2012) Structural basis for substrate recognition by a unique *Legionella* phosphoinositide phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109**, 13567–13572.

Huang L, Boyd D, Amyot WM *et al.* (2011) The E Block motif is associated with *Legionella pneumophila* translocated substrates. *Cellular Microbiology*, **13**, 227–245.

Hubber A, Roy CR (2010) Modulation of host cell function by *Legionella pneumophila* type IV effectors. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **26**, 261–283.

Hueck CJ (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and

plants. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **62**, 379–433.

Hui CY, Guo Y, He QS *et al.* (2010) *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT confers resistance to urinary cationic peptides. *Microbiology and Immunology*, **54**, 452–459.

Ingmundson A, Delprato A, Lambright DG, Roy CR (2007) *Legionella pneumophila* proteins that regulate Rab1 membrane cycling. *Nature*, **450**, 365–369.

Isberg RR, O'Connor TJ, Heidtman M (2009) The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells. *Nature Reviews Microbiology*, **7**, 13–24.

Islam D, Bandholtz L, Nilsson J *et al.* (2001) Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator. *Nature Medicine*, **7**, 180–185.

Jahn R, Scheller RH (2006) SNAREs — engines for membrane fusion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **7**, 631–643.

Jamilloux Y, Jarraud S, Lina G, Etienne J, Ader F (2012) Légionellose. *M/S Medecin Sciences*, **28**, 639–645.

Jarraud S, Descours G, Ginevra C, Lina G, Etienne J (2013) Identification of *Legionella* in Clinical Samples. *Methods in Molecular Biology*, **954**, 27–56.

Jarraud AS, Reyrolle M, Meugnier H, Forey F, Etienne J (2007) Légionellose. *Encyclopédie Orphanet*.

Jasniewski J, Cailliez-Grimal C, Younsi M, Millière JB, Revol-Junelles AM (2008) Fluorescence anisotropy analysis of the mechanism of action of mesenterocin 52A: Speculations on antimicrobial mechanism. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **81**, 339–347.

Jenssen H, Andersen JH, Uhlin-Hansen L, Gutteberg TJ, Rekdal Ø (2004) Anti-HSV activity of lactoferricin analogues is only partly related to their affinity for heparan sulfate. *Antiviral Research*, **61**, 101–109.

Jenssen H, Hamill P, Hancock REW (2006) Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, **19**, 491–511.

Jeong KC, Sutherland MC, Vogel JP (2015) Novel export control of a *Legionella* Dot/Icm substrate is mediated by dual, independent signal sequences. *Molecular Microbiology*, **96**, 175–188.

Jiang Z, Vasil AI, Hale JD *et al.* (2008) Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic alpha-helical cationic antimicrobial peptides. *Biopolymers - Peptide Science Section*, **90**, 369–383.

Jin T, Bokarewa M, Foster T *et al.* (2004) *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. *Journal of Immunology*, **172**, 1169–1176.

Jin T, Bokarewa M, Foster T *et al.* (2016) *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. *The Journal of Immunology*, **3**, 1169–76.

Jo E-K (2013) Autophagy as an innate defense against Mycobacteria. *Pathogens and Disease*, **67**, 108–18.

Joly S, Maze C, McCray PB, Guthmiller JM (2004) Human beta-defensins 2 and 3 demonstrate strain-selective activity against oral microorganisms. *Journal of Clinical Microbiology*, **42**, 1024–1029.

Jonard L, Banh L, Pressac M, Just J, Bahuau M (2006) Les défensines en physiopathologie humaine. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, **21**, 342–347.

Jones A, Geörg M, Maudsdotter L, Jonsson AB (2009) Endotoxin, capsule, and bacterial attachment contribute to *Neisseria meningitidis* resistance to the human antimicrobial peptide LL-37. *Journal of Bacteriology*, **191**, 3861–3868.

Kagan JC, Stein MP, Pypaert M, Roy CR (2004) *Legionella* subvert the functions of Rab1 and Sec22b to create a replicative organelle. *The Journal of Experimental Medicine*, **199**, 1201–1211.

Kalita A, Verma I, Khuller GK (2004) Role of human neutrophil peptide-1 as a possible adjunct to antituberculosis chemotherapy. *The Journal of Infectious Diseases*, **190**, 1476–80.

Kandler JL, Holley CL, Reimche JL *et al.* (2016) The MisR response regulator is necessary for intrinsic cationic antimicrobial peptide and aminoglycoside resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **60**, 4690–4700.

Kannan K, Vázquez-Laslop N, Mankin AS (2012) Selective protein synthesis by ribosomes with a drug-obstructed exit tunnel. *Cell*, **151**, 508–520.

Kavanagh K, Dowd S (2004) Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **56**, 285–289.

Khan FF, Carpenter D, Mitchell L *et al.* (2013) Accurate measurement of gene copy number for human alpha-defensin DEFA1A3. *BMC Genomics*, **14**, 719.

Khodr A, Kay E, Gomez-Valero L *et al.* (2016) Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Legionella*. *Infection, Genetics and Evolution*.

King NP, Newton P, Schuelein R *et al.* (2015) Soluble NSF attachment protein receptor molecular mimicry by a *Legionella pneumophila* Dot/Icm effector. *Cellular Microbiology*, **17**, 767–784.

Klaenhammer TR (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, **12**, 39–85.

Klein S, Lorenzo C, Hoffmann S *et al.* (2009) Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to various conditions includes tRNA-dependent formation of alanyl-phosphatidylglycerol. *Molecular Microbiology*, **71**, 551–565.

Knappe D, Zahn M, Sauer U *et al.* (2011) Rational design of oncocin derivatives with superior protease stabilities and antibacterial activities based on the high-resolution structure of the oncocin-DnaK complex. *Chembiochem : a European Journal of Chemical Biology*, **12**, 874–6.

Knirel Y a, Moll H, Zähringer U (1996) Structural study of a highly O-acetylated core of *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide. *Carbohydrate Research*, **293**, 223–34.

Koch-Nolte F, Reche P, Haag F, Bazan F (2001) ADP-ribosyltransferases: Plastic tools for inactivating protein and small molecular weight targets. *Journal of Biotechnology*, **92**, 81–87.

Kocianova S, Vuong C, Yao Y (2005) Key role of polygamma- DL-glutamic acid in immune evasion and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Clinical Investigation*, **115**, 688−694.

Koprivnjak T, Peschel A (2011) Bacterial resistance mechanisms against host defense peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **68**, 2243–2254.

Kościuczuk EM, Lisowski P, Jarczak J *et al.* (2012) Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. A review. *Molecular Biology Reports*, **39**, 10957–70.

Kovács M, Halfmann A, Fedtke I *et al.* (2006) A functional *dlt* operon, encoding proteins required for incorporation of D-alanine in teichoic acids in gram-positive bacteria, confers resistance to cationic antimicrobial peptides in Streptococcus pneumoniae. *Journal of Bacteriology*, **188**, 5797–5805.

Kragol G, Lovas S, Varadi G *et al.* (2001) The antibacterial peptide pyrrhocoricin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochemistry*, **40**, 3016–3026.

Krajewski K, Marchand C, Long Y-Q, Pommier Y, Roller PP (2004) Synthesis and HIV-1 integrase inhibitory activity of dimeric and tetrameric analogs of indolicidin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **14**, 5595–5598.

Krinos C, High AS, Rodgers FG (1999) Role of the 25 kDa major outer membrane protein of *Legionella pneumophila* in attachment to U-937 cells and its potential as a virulence factor for chick embryos. *Journal of Applied Microbiology*, **86**, 237–244.

Kristian S a, Datta V, Weidenmaier C *et al.* (2005) D-Alanylation of teichoic acids promotes group A *Streptococcus* antimicrobial peptide resistance, neutrophil survival, and epithelial cell invasion. *Society*, **187**, 6719–6725.

Ku B, Lee KH, Park WS *et al.* (2012) VipD of Legionella pneumophila targets activated Rab5 and Rab22 to interfere with endosomal trafficking in macrophages. *PLoS Pathogens*, **8**, e1003082.

Kubori T, Hyakutake A, Nagai H (2008) *Legionella* translocates an E3 ubiquitin ligase that has multiple U-boxes with distinct functions. *Molecular Microbiology*, **67**, 1307–1319.

Kubori T, Koike M, Bui XT *et al.* (2014) Native structure of a type IV secretion system core complex essential for *Legionella* pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **111**, 11804–11809.

Kwong JC, McCallum N, Sintchenko V, Howden B (2015) Whole genome sequencing in

clinical and public health microbiology. *Pathology*, **47**, 199–210.

Lally ET, Kieba IR, Sato A *et al.* (1997) RTX toxins recognize a beta-2 integrin on the surface of human target cells. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 30463–20469.

Lambert MA, Moss CW (1989) Cellular fatty acid compositions and isoprenoid quinone contents of 23 *Legionella* species. *Journal of Clinical Microbiology*, **27**, 465–473.

Larrick JW, Hirata M, Balint RF *et al.* (1995) Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. *Infection and Immunity*, **63**, 1291–1297.

Lau HY, Ashbolt NJ (2009) The role of biofilms and protozoa in *Legionella* pathogenesis: Implications for drinking water. *Journal of Applied Microbiology*, **107**, 368–378.

Lauth X, Von Köckritz-Blickwede M, McNamara CW *et al.* (2009) M1 protein allows group a streptococcal survival in phagocyte extracellular traps through cathelicidin inhibition. *Journal of Innate Immunity*, **1**, 202–214.

Lee DG, Kim HK, Kim SA *et al.* (2003) Fungicidal effect of indolicidin and its interaction with phospholipid membranes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **305**, 305–310.

Lee CC, Sun Y, Qian S, Huang HW (2011) Transmembrane pores formed by human antimicrobial peptide LL-37. *Biophysical Journal*, **100**, 1688–1696.

Lehrer RI, Barton A, Daher KA *et al.* (1989) Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity. *Journal of Clinical Investigation*, **84**, 553–561.

Lévesque S, Plante P, Mendis N *et al.* (2014) Genomic characterization of a large outbreak of *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains in Quebec City , 2012. *PLoS One*, **9**, e103852.

Lewis LA, Choudhury B, Balthazar JT *et al.* (2009) Phosphoethanolamine substitution of lipid A and resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to cationic antimicrobial peptides and complement-mediated killing by normal human serum. *Infection and Immunity*, **77**, 1112–1120.

Lifshitz Z, Burstein D, Peeri M *et al.* (2013) Computational modeling and experimental validation of the *Legionella* and *Coxiella* virulence-related type-IVB secretion signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**, E707–15.

Lin L, Nonejuie P, Munguia J *et al.* (2015) Azithromycin synergizes with cationic antimicrobial peptides to exert bactericidal and therapeutic activity against highly multidrug-resistant Gram-negative bacterial pathogens. *EBioMedicine*, **2**, 690–698.

Liu PT (2006) Toll-like receptor triggering of a vitamin D–mediated human antimicrobial response. *Science*, **311**, 1770.

Llobet E, Tomas JM, Bengoechea JA (2008) Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. *Microbiology*, **154**, 3877–3886.

Loret JF, Greub G (2010) Free-living amoebae: Biological by-passes in water treatment. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, **213**, 167–175.

Lorin C, Saidi H, Belaid A *et al.* (2005) The antimicrobial peptide dermaseptin S4 inhibits HIV-1 infectivity *in vitro*. *Virology*, **334**, 264–275.

Louesdon S, Charlot-Rougé S, Tourdot-Maréchal R, Bouix M, Béal C (2015) Membrane fatty acid composition and fluidity are involved in the resistance to freezing of *Lactobacillus buchneri* R1102 and *Bifidobacterium longum* R0175. *Microbial Biotechnology*, **8**, 311–8.

De Lucca A, Walsh TJ (1999) Antifungal peptides: novel therapeutic compounds against emerging pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **43**, 1–11.

Lück C, Helbig JH (2013) Legionella - Chapitre 24: Characterization of Legionella Lipopolysaccharide. In: Legionella*: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, pp. 381–390.

Luo Z-Q, Isberg RR (2004) Multiple substrates of the *Legionella pneumophila* Dot/Icm system identified by interbacterial protein transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 841–6.

Lurie-Weinberger MN, Gomez-Valero L, Merault N *et al.* (2010) The origins of eukaryotic-like proteins in *Legionella pneumophila*. *International Journal of Medical Microbiology*, **300**, 470–481.

Ma J, He Y, Hu B, Luo ZQ (2013) Genome sequence of an environmental isolate of the bacterial pathogen *Legionella pneumophila*. *Genome Announc*, **1**, 2010–2011.

Machner MP, Isberg RR (2006) Targeting of host Rab GTPase function by the intravacuolar pathogen *Legionella pneumophila*. *Developmental Cell*, **11**, 47–56.

Machner MP, Isberg RR (2007) A bifunctional bacterial protein links GDI displacement to Rab1 activation. *Science*, **318**, 974–977.

Maisey HC, Quach D, Hensler ME *et al.* (2009) Resistance and systemic virulence. *The FASEB Journal*, **22**, 1715–1724.

Mallegol J, Duncan C, Prashar A *et al.* (2012) Essential roles and regulation of the *Legionella pneumophila* collagen-like adhesin during biofilm formation. *PLoS One*, **7**, 1–15.

Manske C, Hilbi H (2014) Metabolism of the vacuolar pathogen *Legionella* and implications for virulence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **4**, 125.

Marchand A, Augenstreich J, Loiseau C *et al.* (2015) Effect of amino acid substitution in the staphylococcal peptides warnericin RK and PSMa on their anti-*Legionella* and hemolytic activities. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **405**, 159–67.

Marchand a, Verdon J, Lacombe C *et al.* (2011) Anti-*Legionella* activity of staphylococcal hemolytic peptides. *Peptides*, **32**, 845–51.

Mardirossian M, Grzela R, Giglione C *et al.* (2014) The host antimicrobial peptide Bac71-35 binds to bacterial ribosomal proteins and inhibits protein synthesis. *Chemistry and Biology*, **21**, 1639–1647.

Marra A, Blander SJ, Horwitz MA, Shuman HA (1992) Identification of a *Legionella pneumophila* locus required for intracellular multiplication in human macrophages.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **89**, 9607–9611.

Mason KM, Munson RS, Bakaletz LO (2005) A mutation in the *sap* operon attenuates survival of nontypeable *Haemophilus influenzae* in a chinchilla model of otitis media. *Infection and Immunity*, **73**, 599–608.

Massip C, Descours G, Ginevra C, Doublet P (2016) Macrolide resistance in *Legionella pneumophila*: the role of LpeAB efflux pump. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.

Matsiota-Bernard P, Waser S, Vrioni G (2000) Detection of *Legionella pneumophila* DNA in urine and serum samples from patients with pneumonia. *Clinical Microbiology and Infection*, **6**, 223–225.

Matson JS, Yoo HJ, Hakansson K, Dirita VJ (2010) Polymyxin B resistance in el tor *Vibrio cholerae* requires lipid acylation catalyzed by MsbB. *Journal of Bacteriology*, **192**, 2044–2052.

Matsuo M, Oogai Y, Kato F, Sugai M, Komatsuzawa H (2011) Growth-phase dependence of susceptibility to antimicrobial peptides in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*, **157**, 1786–1797.

Matsuzaki K, Yoneyama S, Fujii N *et al.* (1997a) Membrane permeabilization mechanisms of a cyclic antimicrobial peptide, Tachyplesin I, and its linear analog. *Biochemistry*, **36**, 9799–9806.

Matsuzaki K, Yoneyama S, Miyajima K (1997b) Pore formation and translocation of melittin. *Biophysical Journal*, **73**, 831–838.

Mattar EH, Almehdar HA, Yacoub HA, Uversky VN, Redwan EM (2016) Antimicrobial potentials and structural disorder of human and animal defensins. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, **28**, 95–111.

Mayhall CG, Apollo E (1980) Effect of storage and changes in bacterial growth phase and antibiotic concentrations on antimicrobial tolerance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **18**, 784–788.

Mburu YK, Abe K, Ferris LK, Sarkar SN, Ferris RL (2011) Human beta-defensin 3 promotes NF-kB-mediated CCR7 expression and anti-apoptotic signals in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis*, **32**, 168–174.

McCoy A, Liu H, Falla TJ, Gunn J (2001) Identification of *Proteus mirabilis* mutants with increased sensitivity to antimicrobial peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **45**, 2030–2037.

McDade JE, Shepard CC, Fraser DW *et al.* (1977) Isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *The New England Journal of Medecin*, **297**, 1197–1203.

McLeod GI, Spector MP (1996) Starvation- and stationary-phase-induced resistance to the antimicrobial peptide polymyxin B in *Salmonella* Typhimurium is RpoS (sigma S)

independent and occurs through both phoP-dependent and -independent pathways. *Journal of Bacteriology*, **178**, 3683–3688.

Michard C, Sperandio D, Baïlo N *et al.* (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**, 1–14.

Midorikawa K, Ouhara K, Komatsuzawa H *et al.* (2003) *Staphylococcus aureus* susceptibility to innate antimicrobial peptides, beta-defensins and CAP18, expressed by human keratinocytes. *Infection and Immunity*, **71**, 3730–9.

Miyake M, Watanabe T, Koike H, Imai Y (2005) Characterization of *Legionella pneumophila pmiA* , a gene essential for infectivity of protozoa and macrophages. *Society*, **73**, 6272–6282.

Mohamed MF, Abdelkhalek A, Seleem MN (2016) Evaluation of short synthetic antimicrobial peptides for treatment of drug-resistant and intracellular *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports*, **6**, 29707.

Molmeret M, Alli O a T, Radulic M *et al.* (2002a) The C-terminus of IcmT is essential for pore formation and for intracellular trafficking of *Legionella pneumophila* within *Acanthamoeba polyphaga*. *Molecular Microbiology*, **43**, 1139–50.

Molmeret M, Alli OAT, Zink S *et al.* (2002b) *icmT* is essential for pore formation-mediated egress of *Legionella pneumophila* from mammalian and protozoan cells. *Infection and Immunity*, **70**, 69–78.

Molmeret M, Bitar DM, Han L, Kwaik YA (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*. *Infection and Immunity*, **72**, 4040–4051.

Molmeret M, Jones S, Santic M *et al.* (2011) Temporal and spatial trigger of post-exponential virulence-associated regulatory cascades by *Legionella pneumophila* after bacterial escape into the host cell cytosol. *Environmental Microbiology*, **12**, 704–715.

Molofsky AB, Swanson MS (2003) *Legionella pneumophila* CsrA is a pivotal repressor of transmission traits and activator of replication. *Molecular Microbiology*, **50**, 445–461.

Molofsky AB, Swanson MS (2004) Differentiate to thrive: Lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle. *Molecular Microbiology*, **53**, 29–40.

Montreekachon P, Chotjumlong P, Bolscher JGM *et al.* (2011) Involvement of P2X7 purinergic receptor and MEK1/2 in interleukin-8 up-regulation by LL-37 in human gingival fibroblasts. *Journal of Periodontal Research*, **46**, 327–337.

Mookherjee N, Brown KL, Bowdish DME *et al.* (2006) Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37. *The Journal of Immunology*, **176**, 2455–2464.

Moran-Gilad J, Mentasti M, Lazarovitch T *et al.* (2014) Molecular epidemiology of

Legionnaires' disease in Israel. *Clinical Microbiology and Infection*, **20**, 690–696.

Moran-Gilad J, Prior K, Yakunin E *et al.* (2015) Design and application of a core genome multilocus sequence typing scheme for investigation of Legionnaires' disease incidents. *Eurosurveillance*, **20**, 1–9.

Morgera F, Vaccari L, Antcheva N *et al.* (2009) Primate cathelicidin orthologues display different structures and membrane interactions. *The Biochemical Journal*, **417**, 727–35.

Moskowitz SM, Ernst RK, Miller SI (2004) PmrAB, a two-component regulatory system of *Pseudomonas aeruginosa* that modulates resistance to cationic antimicrobial peptides and addition of aminoarabinose to lipid A. *Journal of Bacteriology*, **186**, 575–579.

Mount KLB, Townsend CA, Rinker SD *et al.* (2010) *Haemophilus ducreyi* SapA contributes to cathelicidin resistance and virulence in humans. *Infection and Immunity*, **78**, 1176–1184.

Mousnier A, Schroeder GN, Stoneham CA *et al.* (2014) A new method to determine *in vivo* interactomes reveals binding of the *Legionella pneumophila* effector PieE to multiple Rab GTPases. *mBio*, **5**, 1–10.

Mukherjee S, Liu X, Arasaki1 K *et al.* (2011) Modulation of Rab GTPase function by a protein phosphocholine transferase. *Nature*, **474**, 103–6.

Müller MP, Peters H, Blümer J *et al.* (2010) The *Legionella* effector protein DrrA AMPylates the membrane traffic regulator Rab1b. *Science*, **329**, 946–9.

Murakami T, Nakajima T, Koyanagi Y *et al.* (1997) A small molecule CXCR4 inhibitor that blocks T cell line-tropic HIV-1 infection. *Journal of Experimental Medicine*, **186**, 1389–1393.

Murata T, Delprato A, Ingmundson A *et al.* (2006) The *Legionella pneumophila* effector protein DrrA is a Rab1 guanine nucleotide-exchange factor. *Nature Cell Biology*, **8**, 971–977.

Nagai H, Cambronne ED, Kagan JC *et al.* (2005) A C-terminal translocation signal required for Dot/Icm-dependent delivery of the *Legionella* RalF protein to host cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 826–831.

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.

Nagai H, Kubori T (2011) Type IVB secretion systems of *Legionella* and other gram-negative bacteria. *Frontiers in Microbiology*, **2**, 1–12.

Nagaoka I, Hirota S, Hirata M, Adachi Y (2002) Augmentation of the lipopolysaccharide-neutralizing activities of human cathelicidin CAP18 / LL-37-derived antimicrobial peptides by replacement with hydrophobic and cationic amino acid residues. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **9**, 972–982.

Nagaoka I, Hirota S, Yomogida S, Ohwada A, Hirata M (2000) Synergistic actions of antibacterial neutrophil defensins and cathelicidins. *Inflammation Research*, **49**, 73–79.

Di Nardo A, Vitiello A, Gallo RL (2003) Cutting edge: mast cell antimicrobial activity is mediated by expression of cathelicidin antimicrobial peptide. *The Journal of*

Immunology, **170**, 2274–2278.

National C (2013) Plan du rapport annuel d'activité 2013. , 1–49.

Neuhaus FC, Baddiley J (2003) A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **67**, 686–723.

Neumeister B, Faigle M, Sommer M *et al.* (1998) Low endotoxic potential of *Legionella pneumophila* lipopolysaccharide due to failure of interaction with the monocyte lipopolysaccharide receptor CD14. *Infection and Immunity*, **66**, 4151–4157.

Neunuebel MR, Chen Y, Gaspar1 AH *et al.* (2011) De-AMPylation of hte small GTPase Rab1 by the pahtogen *Legionella pneumophila*. *Science*, **333**, 453–6.

Nevo O, Zusman T, Rasis M, Lifshitz Z, Segal G (2014) Identification of *Legionella pneumophila* effectors regulated by the LetAS-RsmYZ-CsrA regulatory cascade, many of which modulate vesicular trafficking. *Journal of Bacteriology*, **196**, 681–692.

Newton HJ, Sansom FM, Dao J *et al.* (2008) Significant role for *ladC* in initiation of *Legionella pneumophila* infection. *Infection and Immunity*, **76**, 3075–3085.

Nguyen EK, Nemerow GR, Smith JG (2010) Direct evidence from single-cell analysis that human alpha-defensins block adenovirus uncoating to neutralize infection. *Journal of Virology*, **84**, 4041–4049.

Nielsen K, Hindersson P, Hoiby N, Bangsborg JM (2000) Sequencing of the *rpoB* gene in *Legionella pneumophila* and characterization of mutations associated with rifampin resistance in the *Legionellaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **44**, 2679–2683.

Nilsson MF, Sandstedt B, Sørensen O *et al.* (1999) The human cationic antimicrobial protein (hCAP18), a peptide antibiotic, is widely expressed in human squamous epithelia and colocalizes with interleukin-6. *Infection and Immunity*, **67**, 2561–2566.

Ninio S, Celli J, Roy CR (2009) A Legionella pneumophila effector protein encoded in a region of genomic plasticity binds to Dot/Icm-modified vacuoles. *PLoS Pathogens*, **5**, e1000278.

Ninio S, Zuckman-Cholon DM, Cambronne ED, Roy CR (2005) The *Legionella* IcmS-IcmW protein complex is important for Dot/Icm-mediated protein translocation. *Molecular Microbiology*, **55**, 912–926.

Nissen-Meyer J, Nes IF (1997) Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: Their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Archives of Microbiology*, **167**, 67–77.

Niyonsaba F, Ushio H, Hara M *et al.* (2010) Antimicrobial peptides human beta-defensins and cathelicidin LL-37 induce the secretion of a pruritogenic cytokine IL-31 by human mast cells. *Journal of Immunology*, **184**, 3526–3534.

Nuding S, Frasch T, Schaller M, Stange EF, Zabel LT (2014) Synergistic effects of antimicrobial peptides and antibiotics against *Clostridium difficile*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **58**, 5719–5725.

O'Reilly KM a, Urban M a, Barriero T, Betts RF, Trawick DR (2005) Persistent culture-positive *Legionella* infection in an immunocompromised host. *Clinical Infectious Diseases*, **40**, e87–e89.

Ohno A, Kato N (2003) Factors influencing survival of Legionella pneumophila serotype 1 in hot spring water and tap water. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 2540–2547.

Oldfield NJ, Moran AP, Millar LA, Prendergast MM, Ketley JM (2002) Characterization of the *Campylobacter jejuni* heptosyltransferase II gene, *waaF*, provides genetic evidence that extracellular polysaccharide is lipid a core independent. *Journal of Bacteriology*, **184**, 2100–2107.

Ong PY, Ohtake T, Brandt C *et al.* (2002) Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *New England Journal of Medicine*, **347**, 1151–1160.

Oren Z, Lerman JC, Gudmundsson GH, Agerberth B, Shai Y (1999) Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. *The Biochemical Journal*, **341**, 501–13.

Otvos Jr. L, Insug O, Rogers ME *et al.* (2000) Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides. *Biochemistry*, **39**, 14150–14159.

Ouhara K, Komatsuzawa H, Kawai T *et al.* (2008) Increased resistance to cationic antimicrobial peptide LL-37 in methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **61**, 1266–9.

Overhage J, Campisano A, Bains M *et al.* (2008) Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation. *Infection and Immunity*, **76**, 4176–4182.

Padilla E, Llobet E, Dominech-Sanchez A *et al.* (2010) *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **54**, 177–183.

Palusińska-Szysz M, Zdybicka-Barabas A, Pawlikowska-Pawlęga B, Mak P, Cytryńska M (2012) Anti-*Legionella dumoffii* activity of *Galleria mellonella* defensin and apolipophorin III. *International Journal of Molecular Sciences*, **13**, 17048–64.

Palusińska-Szysz M, Zdybicka-Barabas A, Reszczyńska E *et al.* (2016) The lipid composition of *Legionella dumoffii* membrane modulates the interaction with *Galleria mellonella* apolipophorin III. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1861**, 617–29.

Pan X, Lührmann A, Satoh A, Laskowski-Arce MA, Roy CR (2008) Ankyrin repeat proteins comprise a diverse family of bacterial type IV effectors. *Science*, **320**, 1651–4.

Di Paolo G, De Camilli P (2006) Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature*, **443**, 651–657.

Papareddy P, Kalle M, Sørensen OE *et al.* (2012) Tissue factor pathway inhibitor 2 is found in skin and its C-terminal region encodes for antibacterial activity. *PLoS One*, **7**, e52772.

Paramasivan CN, Sulochana S, Kubendiran G, Venkatesan P, Mitchison DA (2005)

Bactericidal action of gatifloxacin, rifampin, and isoniazid on logarithmic- and stationary-phase cultures of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **49**, 627–631.

Park Y, Jang S-H, Lee DG, Hahm K-S (2004) Antinematodal effect of antimicrobial peptide, PMAP-23, isolated from porcine myeloid against *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Peptide Science*, **10**, 304–11.

Park CB, Kim HS, Kim SC (1998) Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **244**, 253–257.

Parra-Lopez C, Baer MT, Groisman EA (1993) Molecular genetic analysis of a locus required for resistance to antimicrobial peptides in *Salmonella typhimurium*. *The EMBO Journal*, **12**, 4053–62.

Payne NR, Horwitz M a (1987) Phagocytosis of *Legionella pneumophila* is mediated by human monocyte complement receptors. *The Journal of Experimental Medicine*, **166**, 1377–1389.

Peracino B, Balest A, Bozzaro S (2010) Phosphoinositides differentially regulate bacterial uptake and Nramp1-induced resistance to *Legionella* infection in *Dictyostelium*. *Journal of Cell Science*, **123**, 4039–4051.

Perego M, Glaser P, Minutello A *et al.* (1995) Incorporation of D-alanine into lipoteichoic acid and wall teichoic acid in *Bacillus subtilis*: Identification of genes and regulation. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 15598–15606.

Peschel A, Jack RW, Otto M *et al.* (2001) *Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with L-lysine. *The Journal of Experimental Medicine*, **193**, 1067–1076.

Peschel A, Otto M, Jack RW *et al.* (1999) Inactivation of the dlt operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 8405–8410.

Petzold M, Thurmer A, Menzel S *et al.* (2013) A structural comparison of lipopolysaccharide biosynthesis loci of *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *BMC Microbiology*, **13**, 198.

Pieta P, Mirza J, Lipkowski J (2012) Direct visualization of the alamethicin pore formed in a planar phospholipid matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109**, 21223–21227.

Plotkowski MC, De Bentzmann S, Pereira SHM *et al.* (1999) *Pseudomonas aeruginosa* internalization by human epithelial respiratory cells depends on cell differentiation, polarity, and junctional complex integrity. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, **20**, 880–890.

Poole K (2007) Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Annals of Medicine*, **39**, 162–176.

Poyart C, Pellegrini E, Marceau M *et al.* (2003) Attenuated virulence of *Streptococcus agalactiae* deficient in D-alanyl-lipoteichoic acid is due to an increased susceptibility to defensins and phagocytic cells. *Molecular Microbiology*, **49**, 1615–1625.

Prieto L, He Y, Lazaridis T (2014) Protein arcs may form stable pores in lipid membranes. *Biophysical Journal*, **106**, 154–61.

Quinones-Mateu ME, Lederman MM, Feng Z *et al.* (2003) Human epithelial beta-defensins 2 and 3 inhibit HIV-1 replication. *Aids*, **17**, F39–48.

Ragaz C, Pietsch H, Urwyler S *et al.* (2008) The *Legionella pneumophila* phosphatidylinositol-4 phosphate-binding type IV substrate SidC recruits endoplasmic reticulum vesicles to a replication-permissive vacuole. *Cellular Microbiology*, **10**, 2416–2433.

Raychaudhury S, Farelli JD, Matthews TPMM *et al.* (2010) Structure and function of interacting IcmR-IcmQ domains from a Type IVb secretion system in *Legionella pneumophila*. *Structure*, **199**, 1442–1448.

Rechnitzer C, Blom J (1989) Engulfment of the Philadelphia strain of *Legionella pneumophila* within pseudopod coils in human phagocytes. Comparison with other *Legionella* strains and species. *APMIS*, **97**, 105–14.

Rekha SR, Rao Muvva SJ, Wan M *et al.* (2015) Phenylbutyrate induces LL-37-dependent autophagy and intracellular killing of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages. *Autophagy*, **11**, 1688–1699.

Reuter S, Harrison TG, Köser CU *et al.* (2013) A pilot study of rapid whole-genome sequencing for the investigation of a *Legionella* outbreak. *BMJ Open*, **3**, e002175.

Rieg S, Huth A, Kalbacher H, Kern W V. (2009) Resistance against antimicrobial peptides is independent of *Escherichia coli* AcrAB, *Pseudomonas aeruginosa* MexAB and *Staphylococcus aureus* NorA efflux pumps. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **33**, 174–176.

Rinker SD, Gu X, Fortney KR *et al.* (2012) Permeases of the sap transporter are required for cathelicidin resistance and virulence of *Haemophilus ducreyi* in humans. *The Journal of Infectious Diseases*, **206**, 1407–14.

Rinker SD, Trombley MP, Gu X, Fortney KR, Bauer ME (2011) Deletion of *mtrC* in *Haemophilus ducreyi* increases sensitivity to human antimicrobial peptides and activates the CpxRA regulon. *Infection and Immunity*, **79**, 2324–2334.

Rivas-Santiago B, Hernandez-Pando R, Carranza C *et al.* (2008) Expression of cathelicidin LL-37 during *Mycobacterium tuberculosis* infection in human alveolar macrophages, monocytes, neutrophils, and epithelial cells. *Infection and Immunity*, **76**, 935–941.

Robey M, Connell WO, Cianciotto NP (2001) Identification of *Legionella pneumophila rcp*, a pagP-like gene that confers resistance to cationic antimicrobial peptides and promotes

intracellular infection. *Infection and Immunity*, **69**, 4276–4286.

Robinson WE, McDougall B, Tran D, Selsted ME (1998) Anti-HIV-1 activity of indolicidin, an antimicrobial peptide from neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, **63**, 94–100.

Robinson CG, Roy CR (2006) Attachment and fusion of endoplasmic reticulum with vacuoles containing *Legionella pneumophila*. *Cellular Microbiology*, **8**, 793–805.

Rogers F, Greaves P, Macrae A, Lewis M (1980) Electron microscopic evidence of flagella and pili on Legionella pneumophila. *Journal of Clinical Pathology*, **33**, 1184–1188.

Rosenfeld Y, Papo N, Shai Y (2006) Endotoxin (lipopolysaccharide) neutralization by innate immunity host-defense peptides: Peptide properties and plausible modes of action. *Journal of Biological Chemistry*, **281**, 1636–1643.

Roy CR, Isberg RR (1997) Topology of *Legionella pneumophila* DotA : an inner membrane protein required for replication in macrophages. *Microbiology*, **65**, 571–578.

Sadowsky a B, Wiater L a, Shuman H a (1993) Identification of *Legionella pneumonphila* genes required for growth within and killing of human macrophages. *Journal of Bacteriology*, **61**, 5361–5373.

Sahl H-G, Pag U, Bonness S *et al.* (2005) Mammalian defensins: structures and mechanism of antibiotic activity. *Journal of Leukocyte Biology*, **77**, 466–475.

Sánchez-Busó L, Guiral S, Crespi S *et al.* (2016) Genomic investigation of a legionellosis outbreak in a persistently colonized hotel. *Frontiers in Microbiology*, **6**, 1556.

Sarker P, Ahmed S, Tiash S *et al.* (2011) Phenylbutyrate counteracts *Shigella* mediated downregulation of cathelicidin in rabbit lung and intestinal epithelia: A potential therapeutic strategy. *PLoS One*, **6**.

Sass V, Pag U, Tossi A, Bierbaum G, Sahl H-G (2008) Mode of action of human beta-defensin 3 against *Staphylococcus aureus* and transcriptional analysis of responses to defensin challenge. *International Journal of Medical Microbiology*, **298**, 619–633.

Sass V, Schneider T, Wilmes M *et al.* (2010) Human beta-defensin 3 Inhibits cell wall biosynthesis in staphylococci. *Infection and Immunity*, **78**, 2793–2800.

Sato E, Imafuku S, Ishii K *et al.* (2013) Vitamin D-dependent cathelicidin inhibits *Mycobacterium marinum* infection in human monocytic cells. *Journal of Dermatological Science*, **70**, 166–172.

Schaik EJ van, Chen C, Mertens K, Weber MM, Samuel JE (2013) Molecular pathogenesis of the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. *Nature Reviews Microbiology*, **11**, 561–573.

Scharf S, Hippenstiel S, Flieger A, Suttorp N, N'Guessan PD (2010a) Induction of human β-defensin-2 in pulmonary epithelial cells by *Legionella pneumophila*: involvement of TLR2 and TLR5, p38 MAPK, JNK, NF-κB, and AP-1. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, **298**, L687–95.

Scharf S, Vardarova K, Lang F *et al.* (2010b) *Legionella pneumophila* induces human beta

defensin-3 in pulmonary cells. *Respiratory Research*, **11**, 93.

Schauber J, Foibodft O, Boe G *et al.* (2007) Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D–dependent mechanism. *Conflict*, **3**, 803–811.

Scheffers D, Pinho M (2005) Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **69**, 585–607.

Schittek B, Hipfel R, Sauer B *et al.* (2001) Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nature Immunology*, **2**, 1133–1137.

Schmidtchen A, Frick IM, Andersson E, Tapper H, Björck L (2002) Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. *Molecular Microbiology*, **46**, 157–168.

Schnaitman CA, Klena JD (1993) Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiological Reviews*, **57**, 655–82.

Schneider B, Schueller C, Utermoehlen O, Haas A (2007) Lipid microdomain-dependent macropinocytosis determines compartmentation of *Afipia felis*. *Traffic*, **8**, 226–240.

Schroeder GN, Petty NK, Mousnier A *et al.* (2010) *Legionella pneumophila* strain 130b possesses a unique combination of type IV secretion systems and novel Dot/Icm secretion system effector proteins. *Journal of Bacteriology*, **192**, 6001–6016.

Scocchi M, Lüthy C, Decarli P *et al.* (2009) The proline-rich antibacterial peptide Bac7 binds to and inhibits *in vitro* the molecular chaperone DnaK. *The International Journal of Peptide Research and Therapeutic*, **15**, 147–155.

Scott CC, Botelho RJ, Grinstein S (2003) Phagosome maturation: A few bugs in the system. *Journal of Membrane Biology*, **193**, 137–152.

Scott MG, Davidson DJ, Gold MR, Bowdish D, Hancock REW (2002) The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. *Journal of Immunology*, **169**, 3883–3891.

Seaman MNJ (2012) The retromer complex - endosomal protein recycling and beyond. *Journal of Cell Science*, **125**, 4693–702.

Seeger EM, Thuma M, Fernandez-Moreira E *et al.* (2010) Lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila* shed in a liquid culture as a nonvesicular fraction arrests phagosome maturation in amoeba and monocytic host cells. *FEMS Microbiology Letters*, **307**, 113–119.

Segal GIL, Shuman H a (1997) Characterization of a new region required for macrophage killing by *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity*, **65**, 5057–5066.

Selsted ME, Novotny MJ, Morris WL *et al.* (1992) Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*, **267**, 4292–4295.

Seo ES, Blaum BS, Vargues T *et al.* (2010) Interaction of human β-defensin 2 (HBD2) with glycosaminoglycans. *Biochemistry*, **49**, 10486–10495.

Sexton J a, Miller JL, Yoneda A, Kehl-fie TE, Vogel JP (2004a) *Legionella pneumophila* DotU

and IcmF are required for stability of the Dot/Icm complex. *Society*, **72**, 5983–5992.

Sexton JA, Pinkner JS, Roth R *et al.* (2004b) The *Legionella pneumophila* PilT homologue DotB exhibits ATPase activity that is critical for intracellular growth. *Society*, **186**, 1658–1666.

Shadoud L, Almahmoud I, Jarraud S *et al.* (2015) Hidden selection of bacterial resistance to fluoroquinolones *in vivo*: The case of *Legionella pneumophila* and humans. *EBioMedicine*, **2**, 1179–1185.

Shafer WM, Qu X, Waring a J, Lehrer RI (1998) Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 1829–1833.

Shah P, Hsiao FS-H, Ho Y-H, Chen C-S (2015) The proteome targets of intracellular targeting antimicrobial peptides. *Proteomics*, 10–11.

Shelton CL, Raffel FK, Beatty WL, Johnson SM, Mason KM (2011) Sap transporter mediated import and subsequent degradation of antimicrobial peptides in *Haemophilus*. *PLoS Pathogens*, **7**.

Shevchuk O, Jäger J, Steinert M (2011) Virulence properties of the *Legionella pneumophila* cell envelope. *Frontiers in Microbiology*, **2**, 74.

Shi X, Halder P, Yavuz H, Jahn R, Shuman HA (2016) Direct targeting of membrane fusion by SNARE mimicry: Convergent evolution of *Legionella* effectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **113**, 201608755.

Shimoda M, Ohki K, Shimamoto Y, Kohashi O (1995) Morphology of defensin-treated *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*, **63**, 2886–91.

Shohdy N, Efe JA, Emr SD, Shuman H a (2005) Pathogen effector protein screening in yeast identifies *Legionella* factors that interfere with membrane trafficking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 4866–71.

Sieprawska-Lupa M, Mydel P, Krawczyk K *et al.* (2004) Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus* -derived proteinases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **48**, 4673–4679.

Sigurdardottir SL, Thorleifsdottir RH, Guzman AM *et al.* (2012) The anti-microbial peptide LL-37 modulates immune responses in the palatine tonsils where it is exclusively expressed by neutrophils and a subset of dendritic cells. *Clinical immunology*, **142**, 139–49.

Silhavy TJ, Kahne D, Walker S (2010) The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **2**, a000414.

Simmaco M, Barra D, Chiarini F *et al.* (1991) A family of bombinin-related peptides from the skin of *Bombina variegata*. *EEuropean Journal of Biochemistry*, **199**, 217–222.

Sirisena DM, MacLachlan PR, Liu SL, Hessel A, Sanderson KE (1994) Molecular analysis of the *rfaD* gene, for heptose synthesis, and the *rfaF* gene, for heptose transfer, in lipopolysaccharide synthesis in *Salmonella* Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, **176**,

2379–2385.

De Smet K, Contreras R (2005) Human antimicrobial peptides: Defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnology Letters*, **27**, 1337–1347.

Smith JG, Silvestry M, Lindert S *et al.* (2010) Insight into the mechanisms of adenovirus capsid disassembly from studies of defensin neutralization. *PLoS Pathogens*, **6**, e1000959.

So EC, Mattheis C, Tate EW, Frankel G, Schroeder GN (2015) Creating a customized intracellular niche : subversion of host cell signaling by *Legionella* type IV secretion system effectors. *Canadian Journal of Microbiology*, **635**, 617–635.

Sochacki KA, Barns KJ, Bucki R, Weisshaar JC (2011) Real-time attack on single *Escherichia coli* cells by the human antimicrobial peptide LL-37. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, E77–81.

Sohlenkamp C, Geiger O (2015) Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiology Reviews*, fuv008.

Sonawane A, Santos JC, Mishra BB *et al.* (2011) Cathelicidin is involved in the intracellular killing of mycobacteria in macrophages. *Cellular Microbiology*, **13**, 1601–17.

Sopena N, Sabrià M, Pedro-Botet ML *et al.* (2002) Factors related to persistence of *Legionella* urinary antigen excretion in patients with legionnaires' disease. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **21**, 845–8.

Sørensen O, Arnljots K, Cowland JB, Bainton DF, Borregaard N (1997) The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is synthesized in myelocytes and metamyelocytes and localized to specific granules in neutrophils. *Blood*, **90**, 2796–803.

Sperandio B, Regnault B, Guo J *et al.* (2008) Virulent *Shigella flexneri* subverts the host innate immune response through manipulation of antimicrobial peptide gene expression. *The Journal of Experimental Medicine*, **205**, 1121–1132.

Spillmann D (2001) Heparan sulfate: Anchor for viral intruders? *Biochimie*, **83**, 811–817.

Spoering AMYL, Lewis KIM (2001) Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *Society*, **183**, 6746–6751.

Starner TD, Swords WE, Mccray PB (2002) Susceptibility of nontypeable *Haemophilus influenzae* to human Beta-defensins is influenced by lipooligosaccharide acylation. *Society*, **70**, 5287–5289.

Steinert M, Heuner K, Buchrieser C, Albert-Weissenberger C, Glöckner G (2007) *Legionella* pathogenicity: Genome structure, regulatory networks and the host cell response. *International Journal of Medical Microbiology*, **297**, 577–587.

Steinstraesser L, Lam MC, Jacobsen F *et al.* (2014) Skin electroporation of a plasmid encoding hCAP-18/LL-37 host defense peptide promotes wound healing. *Molecular Therapy*, **22**, 734–42.

Stone BJ, 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. *Infection and Immunity*, **66**, 1768–1775.

Suarez-Carmona M, Hubert P, Delvenne P, Herfs M (2015) Defensins: "Simple" antimicrobial peptides or broad-spectrum molecules? *Cytokine & Growth Factor Reviews*, **26**, 361–370.

Sun D, Forsman J, Woodward CE (2015a) Amphipathic membrane-active peptides recognize and stabilize ruptured membrane pores: exploring cause and effect with coarse-grained simulations. *Langmuir*, **31**, 752–761.

Sun D, Forsman J, Woodward CE (2015b) Multistep molecular dynamics simulations identify the highly cooperative activity of melittin in recognizing and stabilizing membrane pores. *Langmuir*, **31**, 9388–9401.

Sutherland MC, Nguyen TL, Tseng V, Vogel JP (2012) The <i>Legionella<i> IcmSW complex directly interacts with DotL to mediate translocation of adaptor-dependent substrates. *PLoS Pathogens*, **8**, e1002910.

Tamayo R, Choudhury B, Septer A *et al.* (2005) Identification of *cptA*, a PmrA-regulated locus required for phosphoethanolamine modification of the *Salmonella enterica* serovar typhimurium lipopolysaccharide core. *Journal of Bacteriology*, **187**, 3391–3399.

Tan Y, Arnold RJ, Luo Z-Q (2011) *Legionella pneumophila* regulates the small GTPase Rab1 activity by reversible phosphorylcholination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 21212–7.

Tan JS, File TM, DiPersio JR *et al.* (2001) Persistently positive culture results in a patient with community-acquired pneumonia due to *Legionella pneumophila*. *Clinical infectious diseases*, **32**, 1562–6.

Tan Y, Luo Z-Q (2011) *Legionella pneumophila* SidD is a deAMPylase that modifies Rab1. *Nature*, **475**, 506–9.

Tasiemski A, Vandenbulcke F, Mitta G *et al.* (2004) Molecular characterization of two novel antibacterial peptides inducible upon bacterial challenge in an annelid, the leech *Theromyzon tessulatum*. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 30973–30982.

Tegos GP, Haynes M, Strouse JJ *et al.* (2011) Microbial efflux pump inhibition: tactics and strategies. *Current Pharmaceutical Design*, **17**, 1291–302.

Tenson T, Lovmar M, Ehrenberg M (2003) The mechanism of action of macrolides , lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *Journal of Molecular Biology*, **2836**, 1005–1014.

Territo MC, Ganz T, Selsted ME, Lehrer R (1989) Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils. *Journal of Clinical Investigation*, **84**, 2017–2020.

Tiaden A, Spirig T, Carranza P *et al.* (2008) Synergistic contribution of the *Legionella pneumophila lqs* genes to pathogen-host interactions. *Journal of Bacteriology*, **190**, 7532–7547.

Tijet N, Tang P, Romilowych M *et al.* (2010) New Endemic *Legionella pneumophila* serogroup 1 clones, Ontario, Canada. *Emerging Infectious Diseases*, **16**, 447–454.

Tilney LG, Harb OS, Connelly PS, Robinson CG, Roy CR (2001) How the parasitic bacterium *Legionella pneumophila* modifies its phagosome and transforms it into rough ER: implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane. *Journal of Cell Science*, **114**, 4637–50.

Tokumaru S, Sayama K, Shirakata Y *et al.* (2005) Induction of keratinocyte migration via transactivation of the epidermal growth factor receptor by the antimicrobial peptide LL-37. *Journal of Immunology*, **175**, 4662–4668.

Tossa P, Deloge-Abarkan M, Zmirou-Navier D, Hartemann P, Mathieu L (2006) Pontiac fever: an operational definition for epidemiological studies. *BMC Public Health*, **6**, 112.

Tossi A, Sandri L, Giangaspero A (2000) Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*, **55**, 4–30.

Toulabi L, Wu X, Cheng Y, Mao Y (2013) Identification and structural characterization of a *Legionella* phosphoinositide phosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, **288**, 24518–24527.

Tran AX, Whittimore JD, Wyrick PB *et al.* (2006) The lipid A 1-phosphatase of *Helicobacter pylori* is required for resistance to the antimicrobial peptide polymyxin. *Journal of Bacteriology*, **188**, 4531–4541.

Tripathi S, Tecle T, Verma A *et al.* (2013) The human cathelicidin LL-37 inhibits influenza a viruses through a mechanism distinct from that of surfactant protein d or defensins. *Journal of General Virology*, **94**, 40–49.

Turner J, Cho Y, Dinh N *et al.* (1998) Activities of LL-37 , a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **42**, 2206–2214.

Typas A, Banzhaf M, Gross C a., Vollmer W (2011) From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nature Reviews Microbiology*, **10**, 123–136.

Tzeng Y, Ambrose KD, Zughaier S *et al.* (2005) Cationic antimicrobial peptide resistance in *Neisseria meningitidis*. *Society*, **187**, 5387–5396.

Uchio E, Inoue H, Kadonosono K (2013) Anti-adenoviral effects of human cationic antimicrobial protein-18 / LL-37 , an antimicrobial peptide , by quantitative polymerase chain reaction. *Korean Journal of Ophtalmology*, **27**, 199–203.

Uematsu N, Matsuzaki K (2000) Polar angle as a determinant of amphipathic alpha-helix-lipid interactions: a model peptide study. *Biophysical Journal*, **79**, 2075–2083.

Ulvatne H, Karoliussen S, Stiberg T, Rekdal Ø, Svendsen JS (2001) Short antibacterial peptides and erythromycin act synergically against Escherichia coli. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **48**, 203–208.

Urwyler S, Nyfeler Y, Ragaz C *et al.* (2009) Proteome analysis of *Legionella* vacuoles purified by magnetic immunoseparation reveals secretory and endosomal GTPases. *Traffic*, **10**, 76–87.

Vandamme D, Landuyt B, Luyten W, Schoofs L (2012) A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide. *Cellular Immunology*, **280**, 22–35.

Vandersmissen L, De Buck E, Saels V, Coil DA, 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 Microbiology Letters*, **306**, 168–176.

VanRheenen SM, Duménil G, Isberg RR (2004) IcmF and DotU are required for optimal effector translocation and trafficking of the *Legionella pneumophila* vacuole. *Infection and Immunity*, **72**, 5972–5982.

Vanrheenen SM, Luo ZQ, O'Connor T, Isberg RR (2006) Members of a *Legionella pneumophila* family of proteins with ExoU (Phospholipase A) active sites are translocated to target cells. *Infection and Immunity*, **74**, 3597–3606.

Verdon J, Berjeaud JM, Lacombe C, Héchard Y (2008) Characterization of anti-*Legionella* activity of warnericin RK and delta-lysin I from *Staphylococcus warneri*. *Peptides*, **29**, 978–984.

Verdon J, Falge M, Maier E *et al.* (2009) Detergent-like activity and alpha-helical structure of warnericin RK, an anti-*Legionella* peptide. *Biophysical Journal*, **97**, 1933–40.

Verdon J, Labanowski J, Sahr T *et al.* (2011) Fatty acid composition modulates sensitivity of *Legionella pneumophila* to warnericin RK, an antimicrobial peptide. *BBiochimica et Biophysica Acta*, **1808**, 1146–53.

Vincent CD, Friedman JR, Jeong KC *et al.* (2006) Identification of the core transmembrane complex of the *Legionella* Dot/Icm type IV secretion system. *Molecular Microbiology*, **62**, 1278–1291.

Vincent CD, Friedman JR, Jeong KC, Sutherland MC, Vogel JP (2012) Identification of the DotL Coupling Protein Subcomplex of the *Legionella* Dot/Icm Type IV Secretion System. *Molecular Microbiology*, **85**, 378–391.

Vincent CD, Vogel JP (2006) The *Legionella pneumophila* IcmS-LvgA protein complex is important for Dot/Icm-dependent intracellular growth. *Molecular Microbiology*, **61**, 596–613.

Viner R, Chetrit D, Ehrlich M, Segal G (2012) Identification of two *Legionella pneumophila* effectors that manipulate host phospholipids biosynthesis. *PLoS Pathogens*, **8**.

Vizán JL, Hernández-Chico C, del Castillo I, Moreno F (1991) The peptide antibiotic microcin B17 induces double-strand cleavage of DNA mediated by *E. coli* DNA gyrase. *The EMBO Journal*, **10**, 467–476.

Vogel JP, Andrews HL, Wong SK, Isberg RR (1998) Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*. *Science*, **279**, 873–876.

Vuong C, Kocianova S, Voyich JM *et al.* (2004a) A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *Journal of*

Biological Chemistry, **279**, 54881–54886.

Vuong C, Voyich JM, Fischer ER *et al.* (2004b) Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cellular Microbiology*, **6**, 269–75.

Wachinger M, Kleinschmidt A, Winder D *et al.* (1998) Antimicrobial peptides melittin and cecropin inhibit replication of human immunodeficiency virus 1 by suppressing viral gene expression. *Journal of General Virology*, **79**, 731–740.

Wadowsky RM, Wolford R, McNamara AM, Yee RB (1985) Effect of temperature, pH, and oxygen level on the multiplication of naturally occurring *Legionella pneumophila* in potable water. *Applied and Environmental Microbiology*, **49**, 1197–1205.

Wang T-T, Nestel FP, Bourdeau V *et al.* (2004) Cutting Edge: 1,25-Dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *The Journal of Immunology*, **173**, 2909–2912.

Watarai M, Derre I, Kirby J *et al.* (2001) *Legionella pneumophila* is internalized by a macropinocytotic uptake pathway controlled by the Dot/Icm system and the mouse Lgn1 locus. *Journal of Experimental Medicine*, **194**, 1081–1096.

Weber S, Wagner M, Hilbi H (2014) Live-cell imaging of phosphoinositide dynamics and membrane architecture during *Legionella* infection. *mBio*, **5**, e00839–13–e00839–13.

Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ (2005) The Ras superfamily at a glance. *Journal of Cell Science*, **118**, 843–846.

Wescombe PA, Burton JP, Tagg JR (2007) *Bacteriocins : The diversity of bacteriocins in Gram-positive bacteria.*

Wieprecht T, Dathe M, Beyermann M *et al.* (1997) Peptide hydrophobicity controls the activity and selectivity of magainin 2 amide in interaction with membranes. *Biochemistry*, **2960**, 6124–6132.

Wildman K a H, Lee D, Ramamoorthy A (2003) Mechanism of lipid bilayer disruption by the human antimicrobial peptide, LL-37. *Society*, 6545–6558.

Wilson SS, Wiens ME, Smith JG (2013) Antiviral mechanisms of human defensins. *Journal of Molecular Biology*, **425**, 4965–80.

Wong H, Bowie JH, Carver J a (1997) The solution structure and activity of caerin 1.1, an antimicrobial peptide from the Australian green tree frog, *Litoria splendida*. *European Journal of Biochemistry*, **247**, 545–557.

Worby CA, Mattoo S, Kruger RP *et al.* (2009) The Fic domain: regulation of cell signaling by adenylylation. *Molecular Cell*, **34**, 93–103.

Xu L, Luo Z-Q (2013) Cell biology of infection by *Legionella pneumophila*. *Microbes and Infection*, **15**, 157–67.

Xu L, Shen X, Bryan A *et al.* (2010) Inhibition of host vacuolar H+-ATPase activity by a *Legionella pneumophila* effector. *PLoS Pathogens*, **6**.

Xu Y, Tamamura H, Arakaki R *et al.* (1999) Marked increase in anti-HIV activity, as well as inhibitory activity against HIV entry mediated by CXCR4, linked to enhancement of the binding ability of tachyplesin analogs to CXCR4. *AIDS Research and Human Retroviruses*, **15**, 419–27.

Yang D, Chen Q, Chertov O, Oppenheim JJ (2000) Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. *Journal of Leukocyte Biology*, **68**, 9–14.

Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN *et al.* (1999) Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science*, **286**, 525–528.

Yang D, Chertov O, Oppenheim JJ (2001a) Participation of mammalian defensins and cathelicidins in anti-microbial immunity: receptors and activities of human defensins and cathelicidin (LL-37). *Journal of Leukocyte Biology*, **69**, 691–7.

Yang L, Harroun T a, Weiss TM, Ding L, Huang HW (2001b) Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophysical Journal*, **81**, 1475–1485.

De Yang, Chen Q, Schmidt AP *et al.* (2000) LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, **192**, 1069–74.

Yarbrough ML, Li Y, Kinch LN *et al.* (2009) AMPylation of Rho GTPases by *Vibrio* VopS disrupts effector binding and downstream signaling. *Science*, **323**, 269–272.

Yasin B, Wang W, Pang M *et al.* (2004) Theta defensins protect cells from infection by Herpes simplex virus by inhibiting viral adhesion and entry. *Journal of Virology*, **78**, 5147–56.

Yeaman MR, Yount NY (2003) Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological Reviews*, **55**, 27–55.

Yeo HJ, Savvides SN, Herr AB, Lanka E, Waksman G (2000) Crystal structure of the hexameric traffic ATPase of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system. *Molecular cell*, **6**, 1461–1472.

Yoshioka M, Fukuishi N, Kubo Y *et al.* (2008) Human cathelicidin CAP18/LL-37 changes mast cell function toward innate immunity. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **31**, 212–216.

Yu G, Baeder DY, Regoes RR, Rolff J (2016) Combination effects of antimicrobial peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **60**, 1717–1724.

Yu J-H, Hamari Z, Han K-H *et al.* (2004) Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology*, **41**, 973–81.

Yu J, Mookherjee N, Wee K *et al.* (2007) Host defense peptide LL-37, in synergy with inflammatory mediator IL-1 , augments immune responses by multiple pathways. *The Journal of Immunology*, **179**, 7684–7691.

Yuk J-M, Shin D-M, Lee H-M *et al.* (2009) Vitamin D3 induces autophagy in human

monocytes/macrophages via cathelicidin. *Cell Host & Microbe*, **6**, 231–43.

Zähner D, Zhou X, Chancey ST *et al.* (2010) Human antimicrobial peptide LL-37 induces MefE/Mel-mediated macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **54**, 3516–9.

Zasloff M (1987) Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **84**, 5449–53.

Zhang Y-M, Rock CO (2008) Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, **6**, 222–233.

Zhao C, Ganz T, Lehrer RI (1995) Structures of genes for two cathelin-associated antimicrobial peptides: prophenin-2 and PR-39. *FEBS Letters*, **376**, 130–134.

Zhu W, Banga S, Tan Y *et al.* (2011) Comprehensive identification of protein substrates of the Dot / Icm type IV transporter of *Legionella pneumophila*. *PLoS One*, **6**.

Zou CH, Knirel YA, Helbig JH, Zähringer U, Mintz CS (1999) Molecular cloning and characterization of a locus responsible for O acetylation of the O polysaccharide of *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide. *Journal of Bacteriology*, **181**, 4137–4141.

Zusman T, Aloni G, Halperin E *et al.* (2007) The response regulator PmrA is a major regulator of the *icm/dot* type IV secretion system in *Legionella pneumophila* and *Coxiella burnetii*. *Molecular Microbiology*, **63**, 1508–1523.

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. *Society*, **72**, 3398–3409.