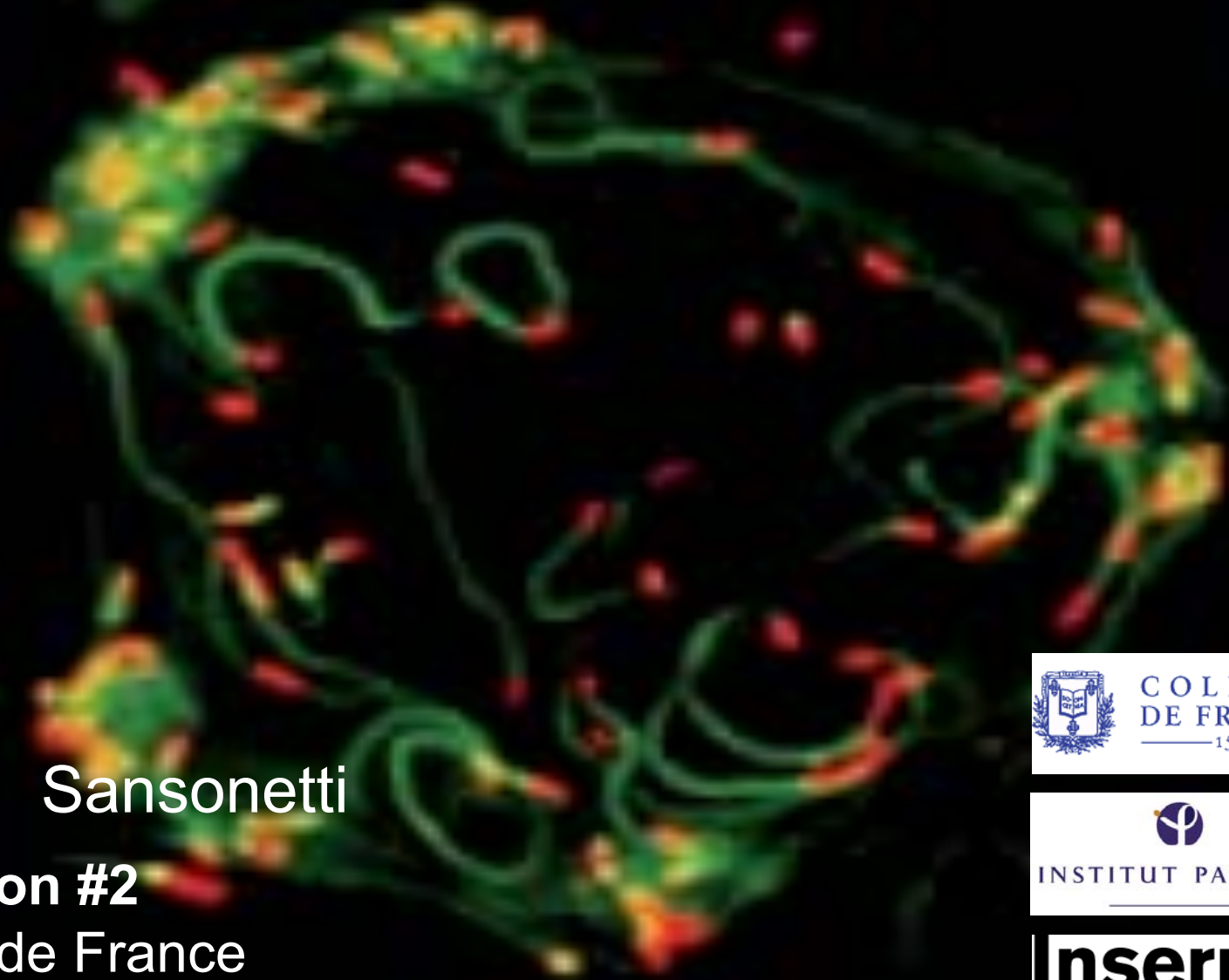


La vie, la mort, le cycle...



Philippe J. Sansonetti

Leçon #2

Collège de France

05 janvier 2012



Bactéries pathogènes intracellulaires et leurs cibles cellulaires

Cellules épithéliales:

Echappement dans le cytoplasme: *Shigella/Listeria*

Vie intravacuolaire: *Salmonella, Chlamydia*

Cellules endothéliales: *Rickettsies, Rochalimea*

Cellules du système immunitaire:

Monocytes/macrophages:

parasitisme aigu: *Legionella, Coxiella*

Parasitisme chronique: *Mycobacterium tuberculosis, Brucella, Coxiella*

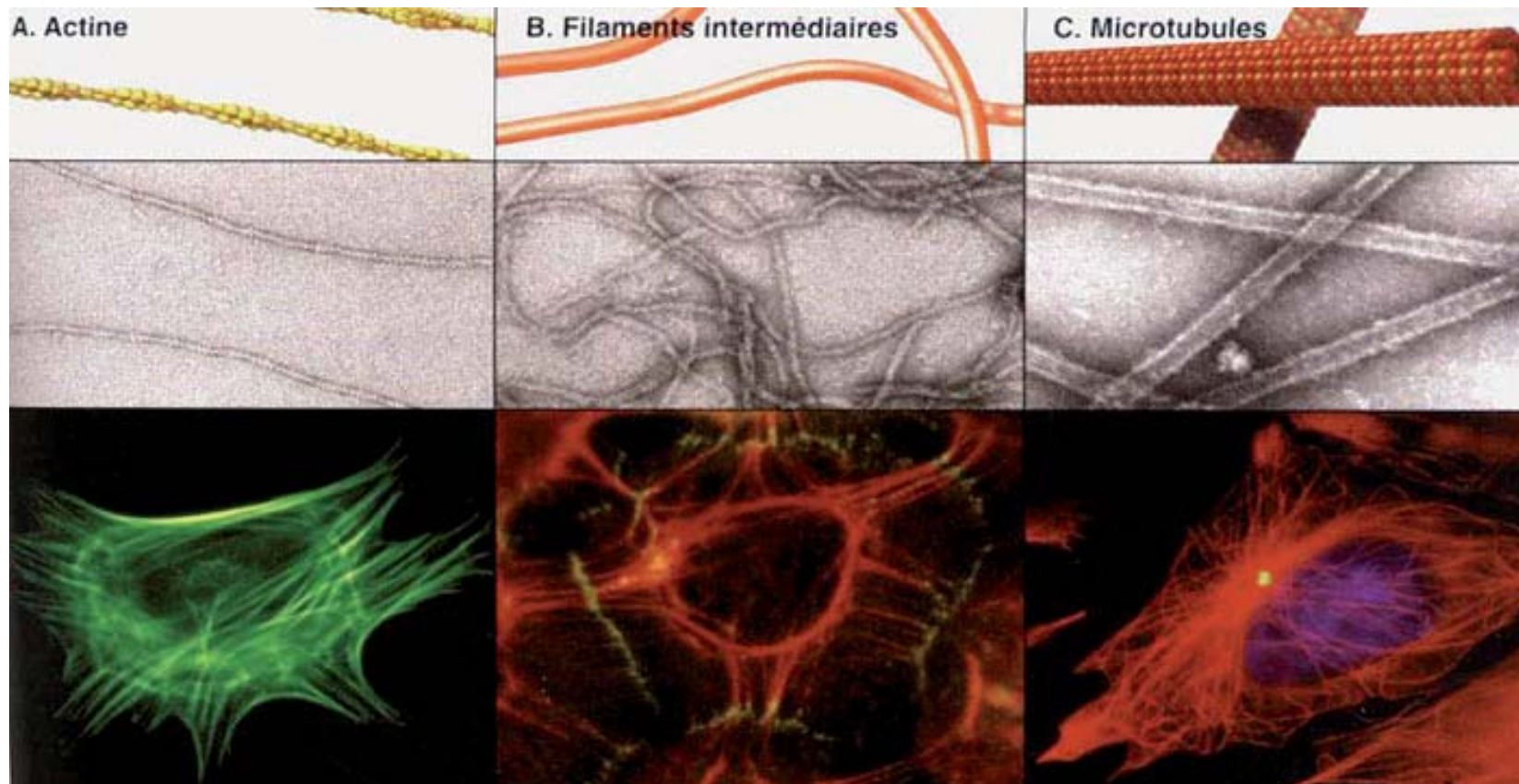
Polynucléaires neutrophiles: *Ehrlichia*

Structure du cytosquelette cellulaire

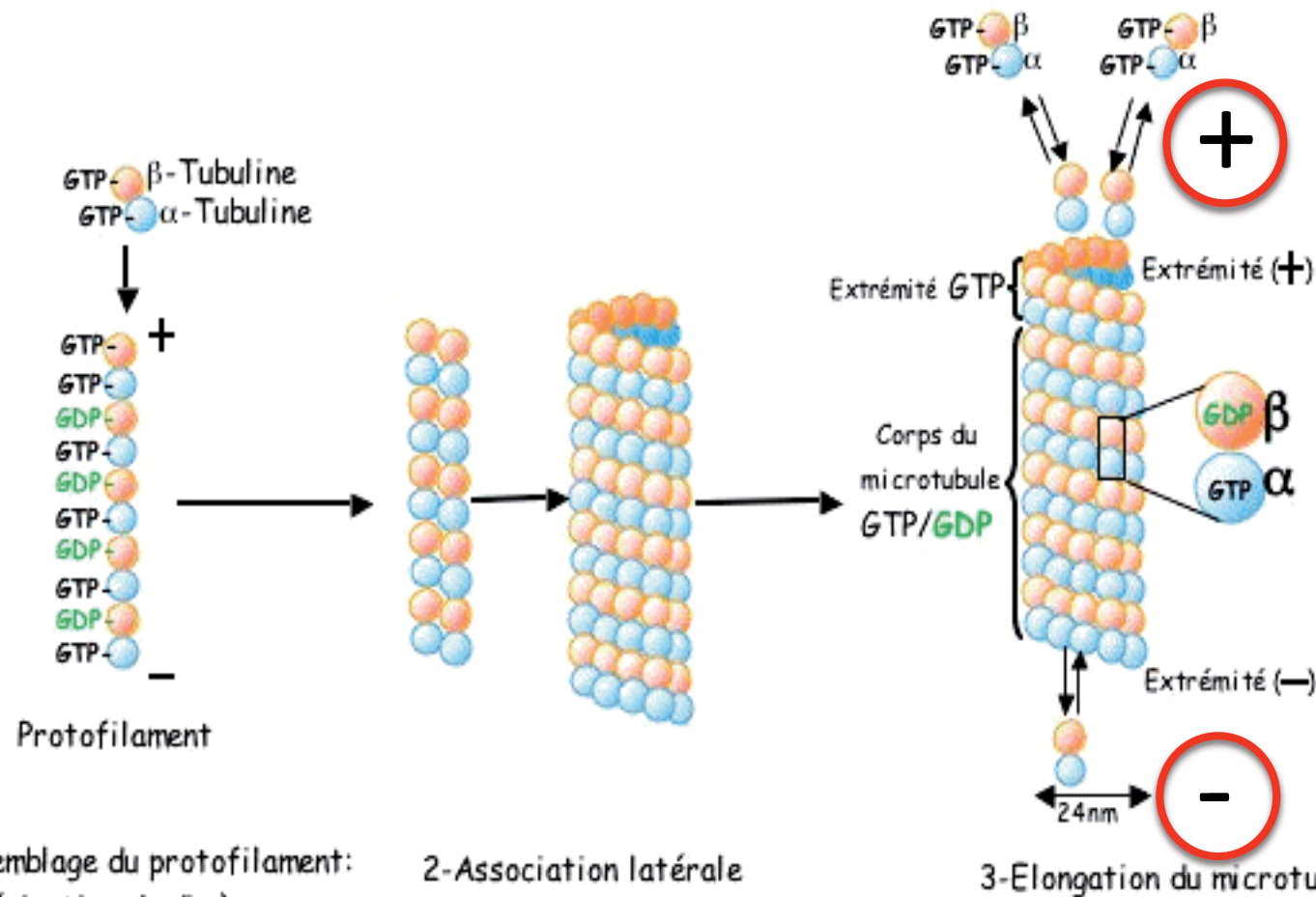
Le cytosquelette est un réseau filamenteux à l'intérieur d'une cellule, lui conférant ses propriétés mécaniques.

Chez les eucaryotes, il est composé de plusieurs types de filaments

- Filaments « souples » (actine polymérisée)
- Microtubules rigides (tubuline)
- Filaments intermédiaires (cytokératines)



Dynamique de la polymérisation des microtubules

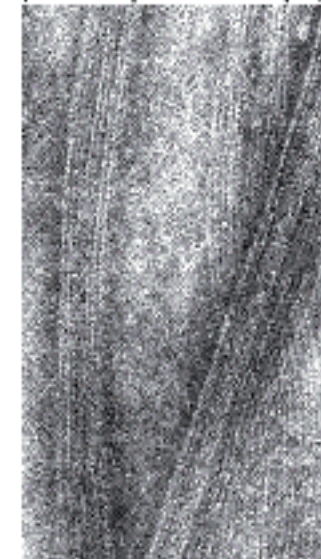


1-Assemblage du protofilament:
polymérisation de dimères
de tubulines α et β

2-Association latérale
de protofilaments

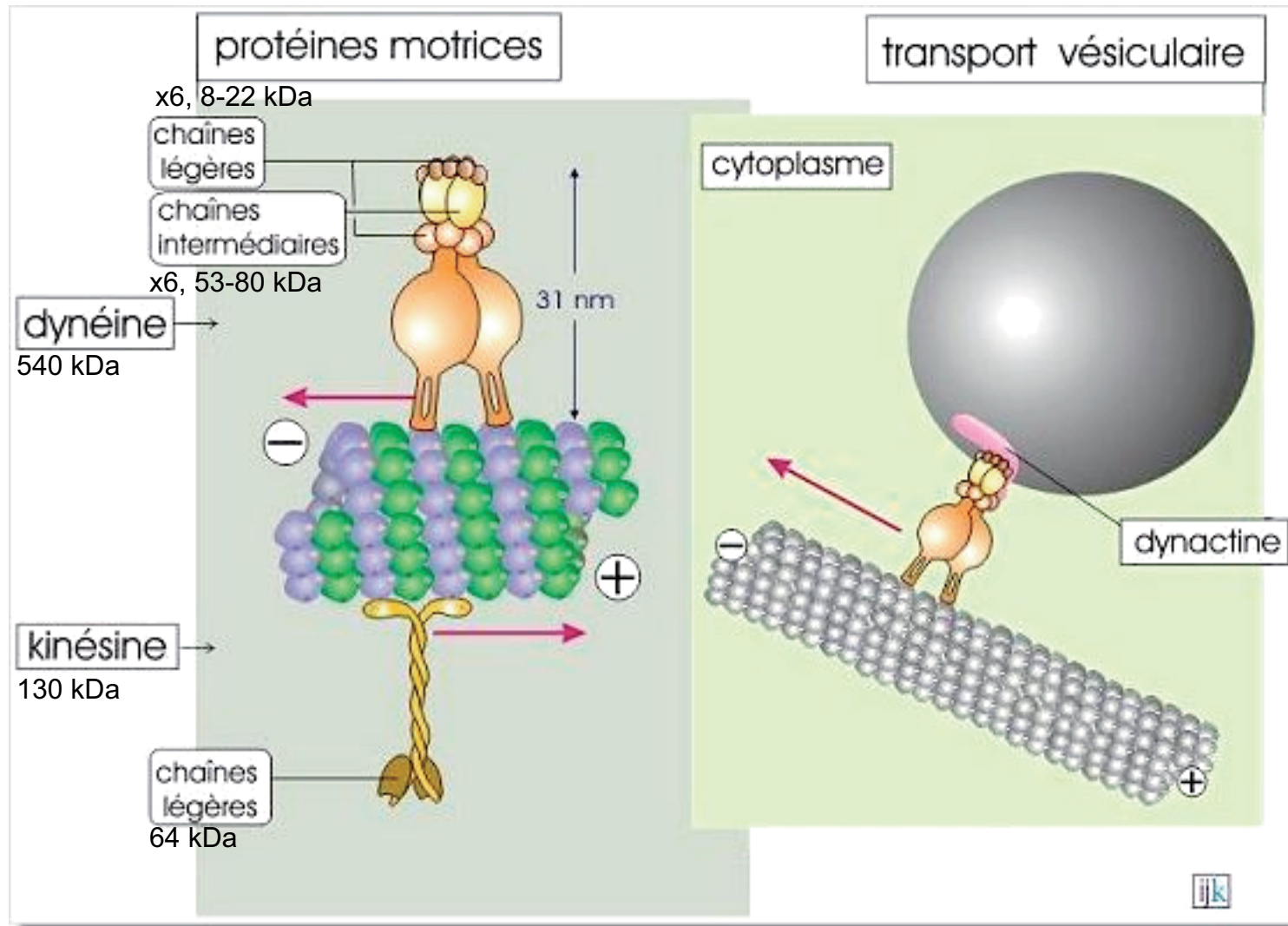
3-Elongation du microtubule

MICROTUBULES
(Microscopie électronique)

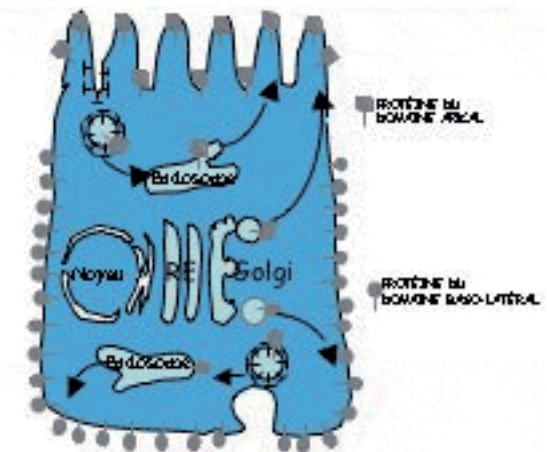
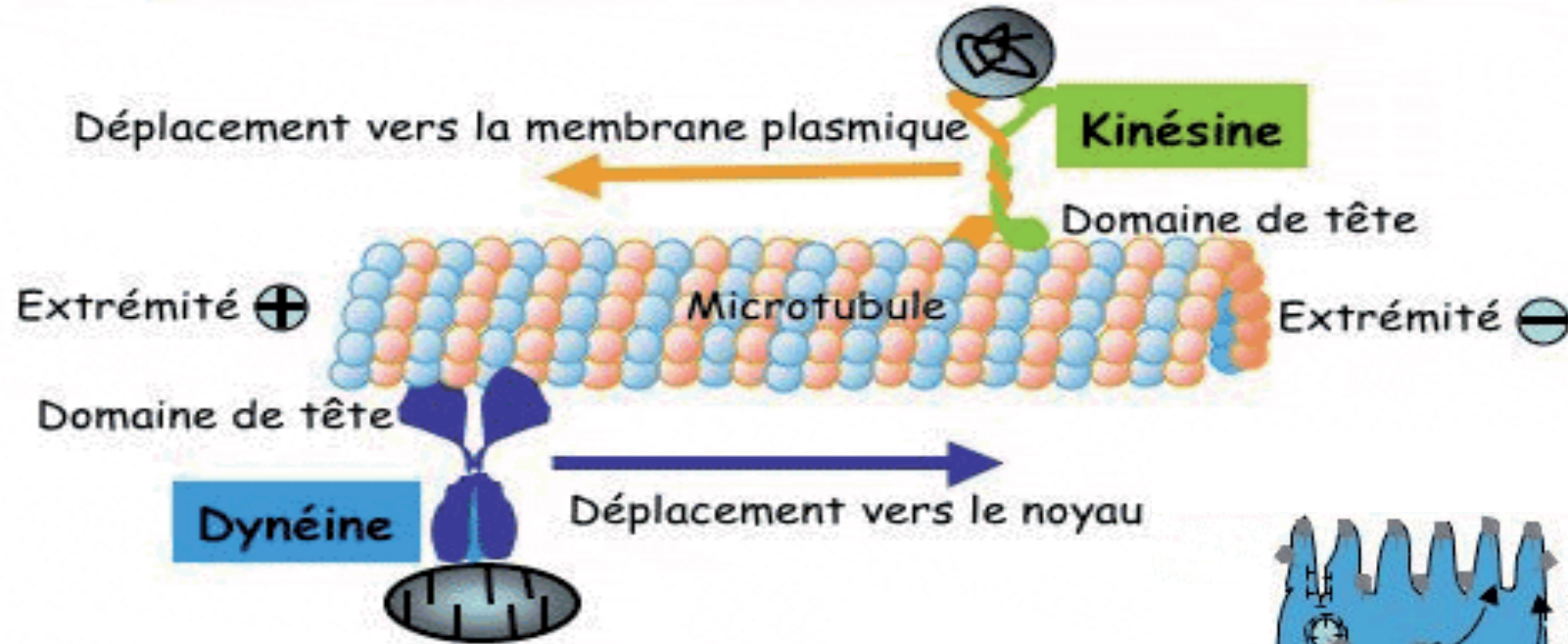


D'après Bloom and Fawcett
Textbook of Histology

Protéines motrices interagissant avec les microtubules



Kinésine et Dynéine: moteurs moléculaires des microtubules



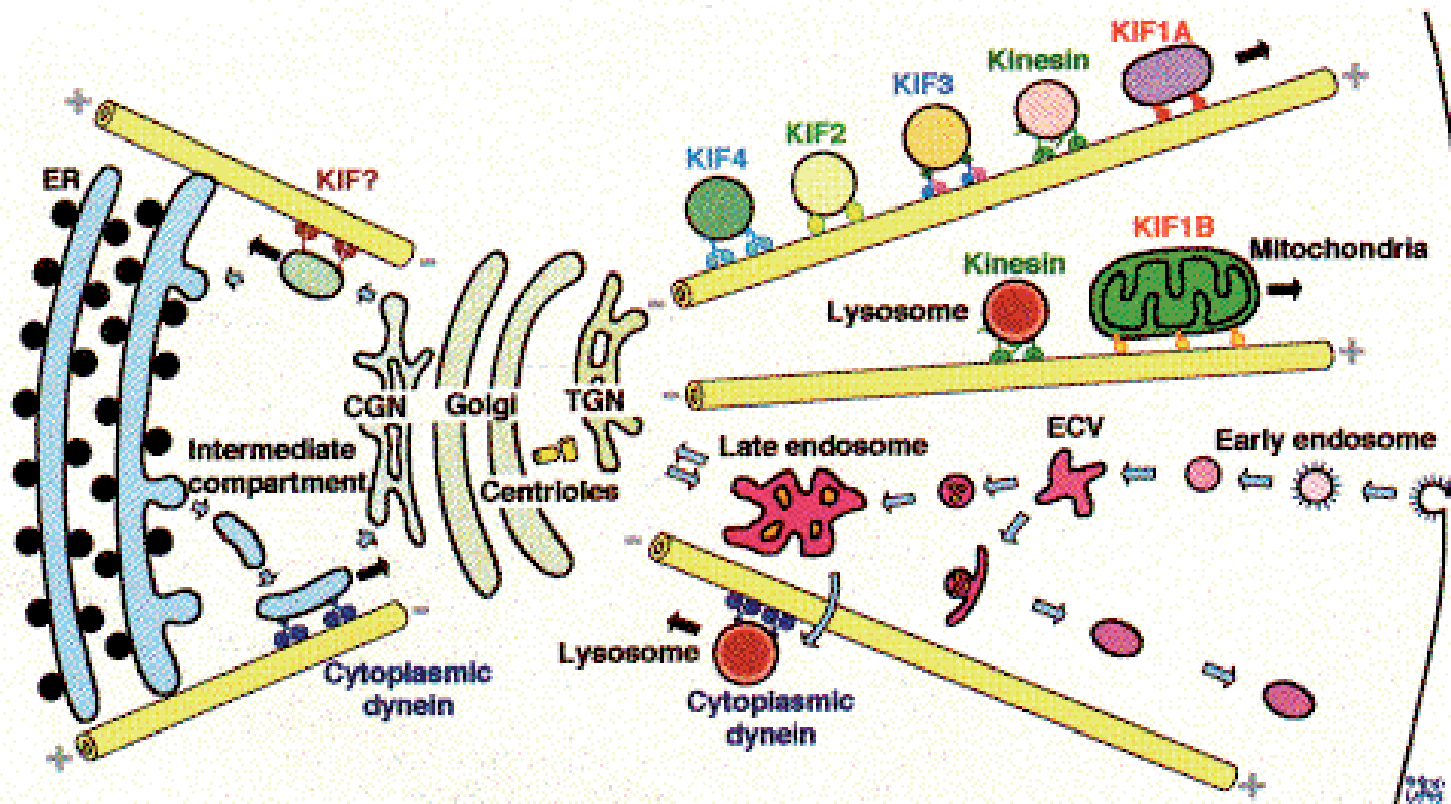
- Transport de vésicules membranaires entre réticulum endoplasmique et appareil de Golgi.
- Tri et adressage des protéines dans les cellules polarisées: les vésicules membranaires issues du Golgi et contenant les protéines destinées au pôle apical ou baso-latéral sont transportées par les protéines motrices le long des microtubules.
- Mouvement des organites: les microtubules sont en grande partie responsables, avec les moteurs associés, de l'organisation spatiale et des mouvements dirigés des organites dans le cytoplasme: mitochondries, chromosomes lors de la division cellulaire (fuseau mitotique et ségrégation des chromosomes).
- Transport viral, battement cils & flagelles

Microtubules servant de rails pour le déplacement des vésicules.

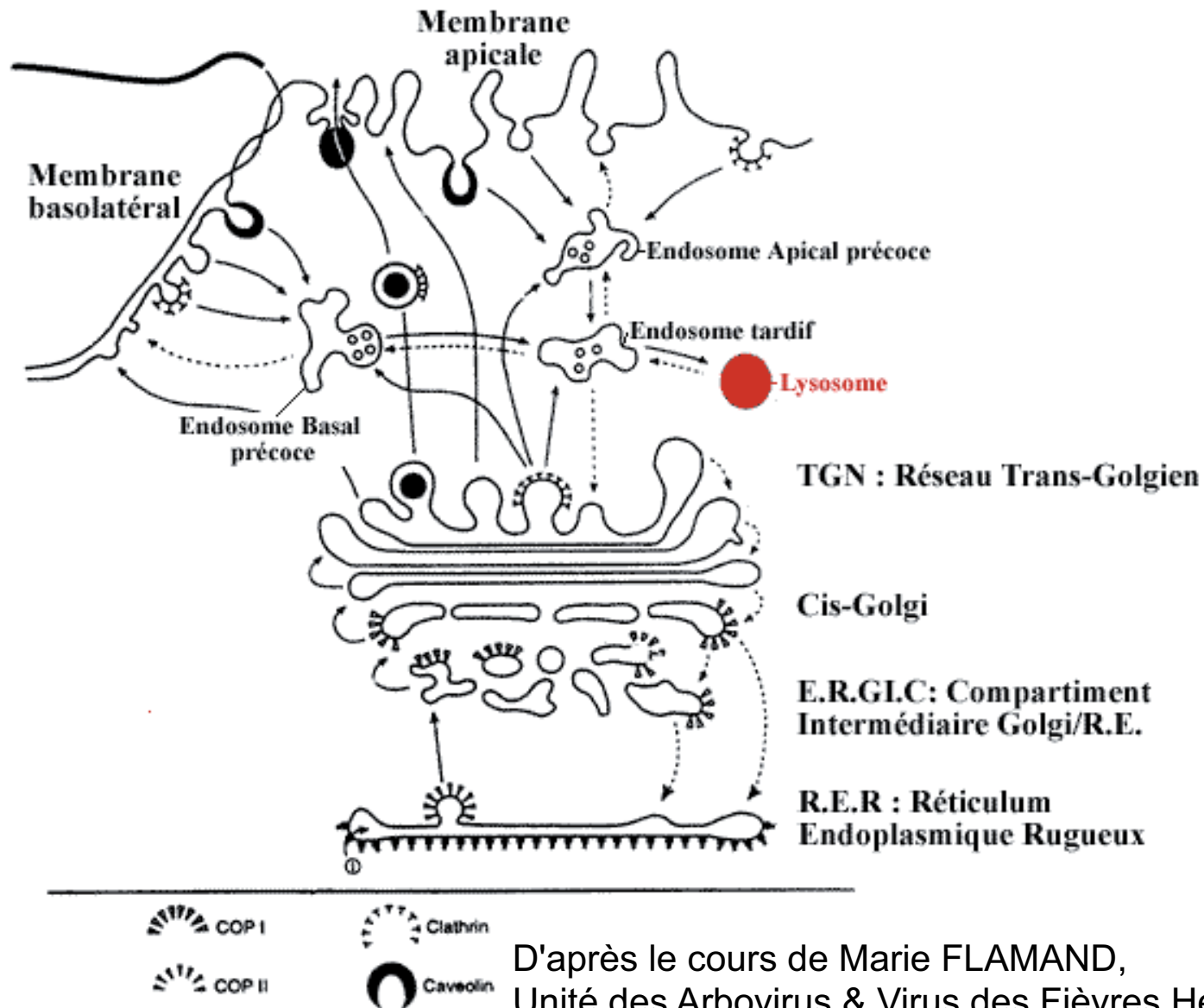
Moteurs moléculaires:

Kinésine: centre vers périphérie (centrifuge, antérograde)

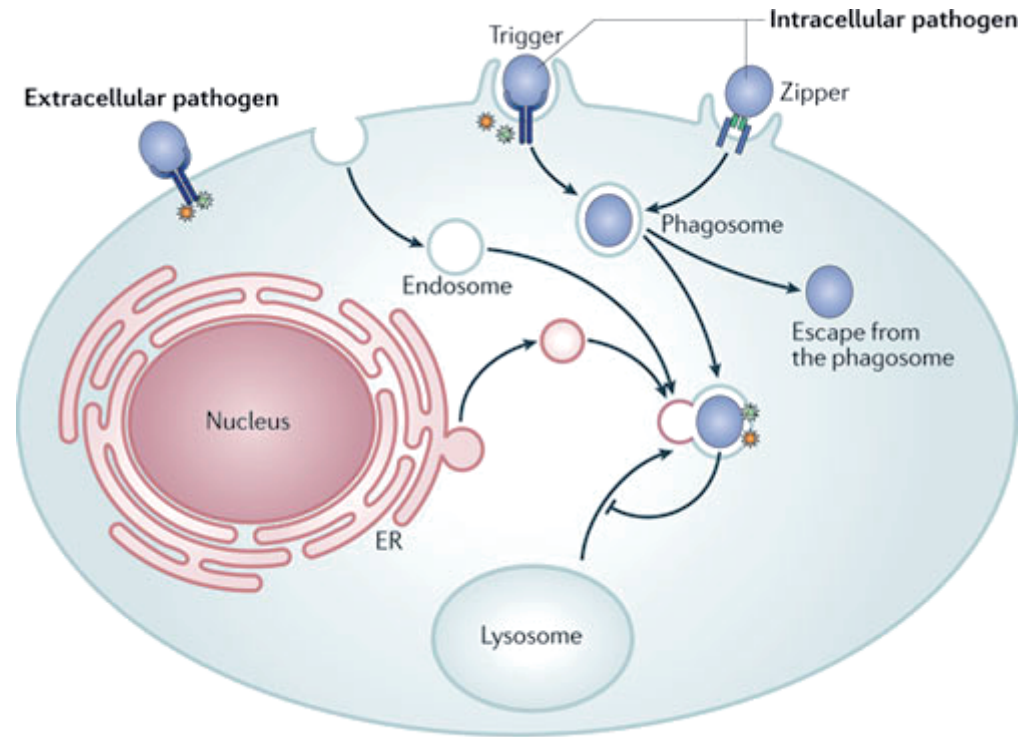
Dynéine: périphérie vers centre (centripète, rétrograde)



La voie endosomale: un ticket aller (sans retour) vers le lysosome



D'après le cours de Marie FLAMAND,
Unité des Arbovirus & Virus des Fièvres Hémorragiques
Institut Pasteur

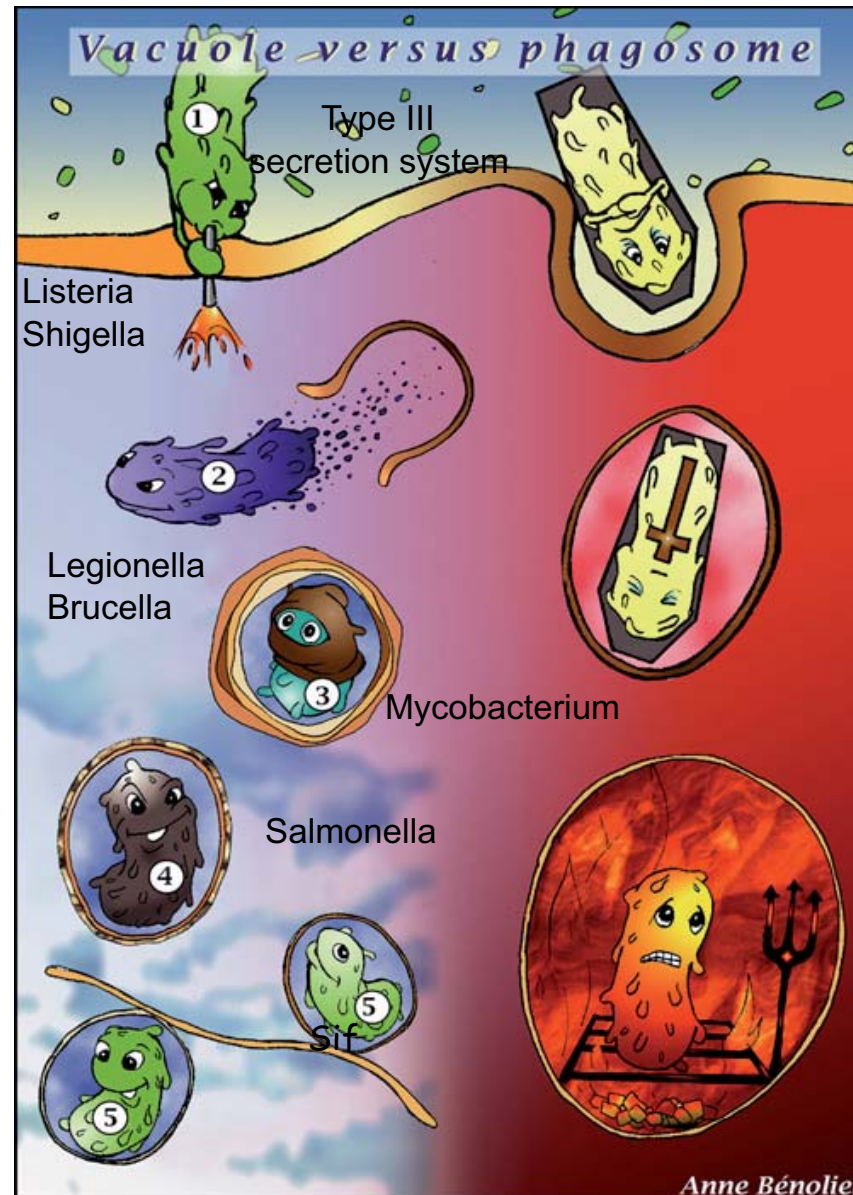


Nature Reviews | **Microbiology**

Mode de vie intracellulaire des bactéries: les bactéries pathogènes peuvent envahir les cellules non phagocytaires comme les cellules épithéliales par deux types de mécanismes: « zipper » et « trigger » (Leçon #1). Après son internalisation, la bactérie peut survivre à l'intérieur de la vacuole d'endocytose (*Salmonella*, *Legionella*) ou échapper dans le cytoplasme cellulaire (*Shigella*, *Listeria*)

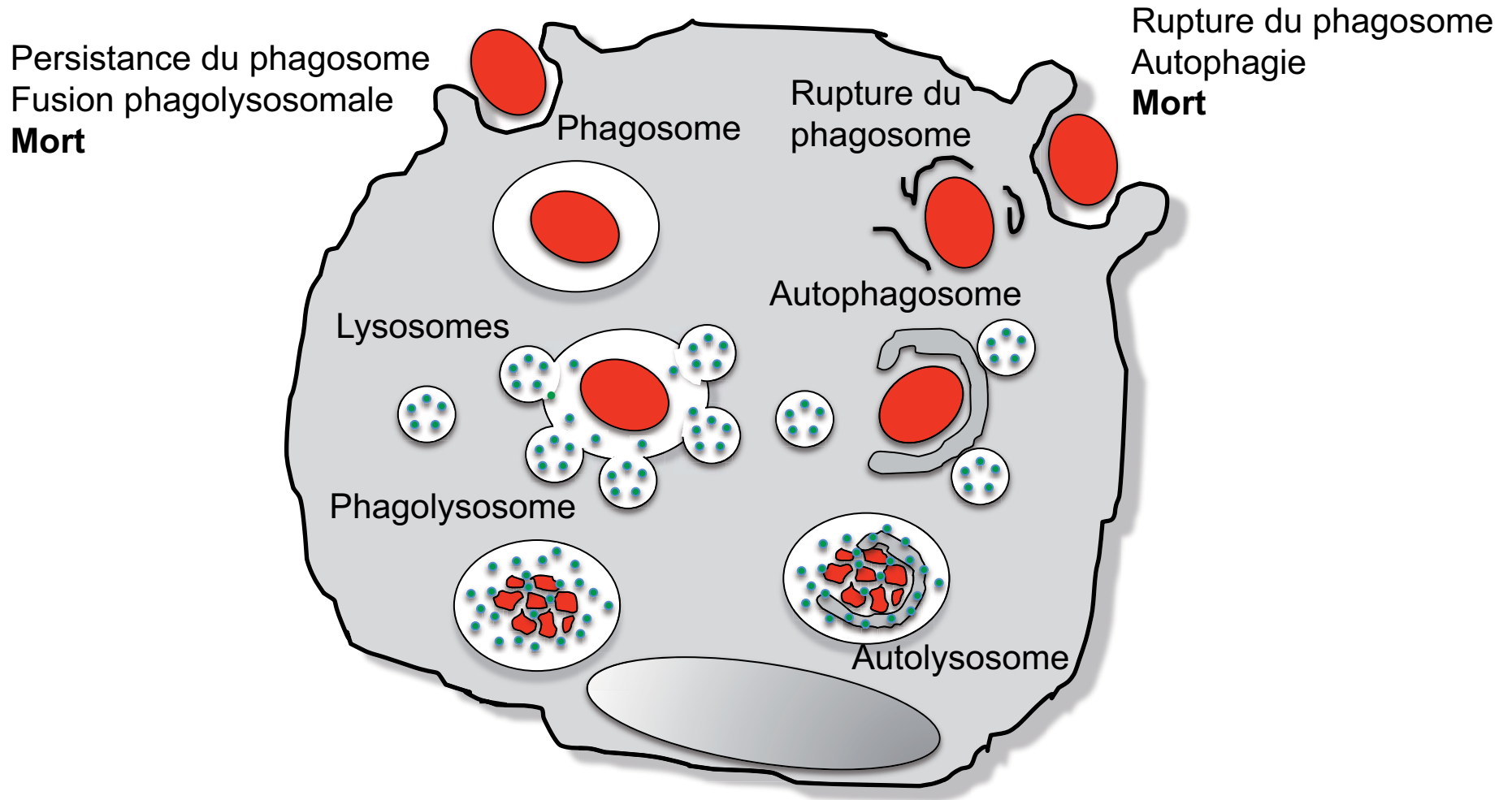
Cossart P, Sansonetti PJ. 2004. Science
Ham et coll. 2011. Nature Rev. Microbiol.

La voie endosomale: un ticket aller (sans retour) vers le lysosome



D'après Méresse S
& Gorvel JP

Bactéries intracellulaires: « chronique d'une mort annoncée » ?



Comment les microorganismes échappent aux voies cellulaires les amenant à la mort ?

On ne considèrera pas les mécanismes de régulation de la réponse immune (Leçon #3)

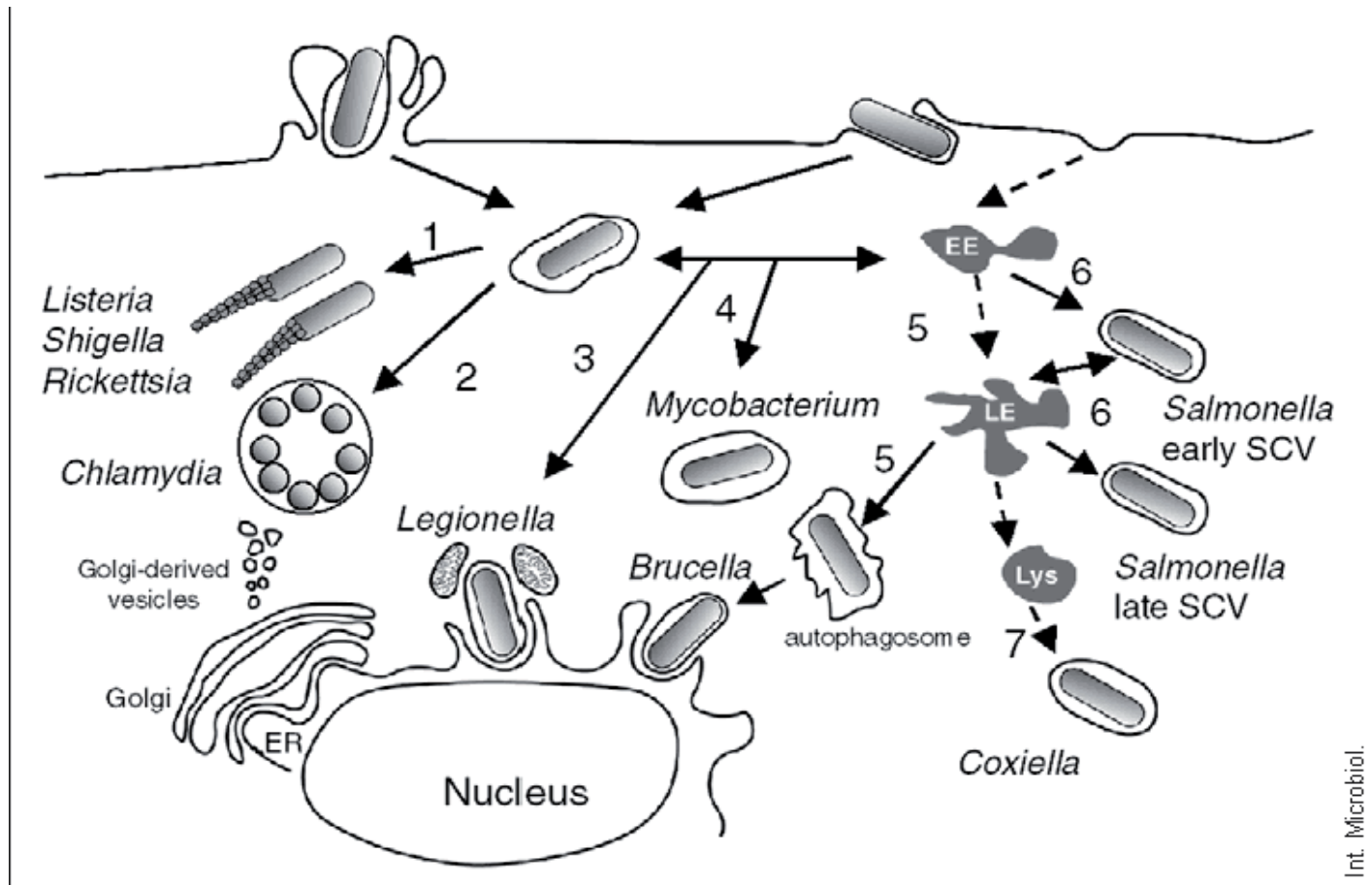
On considèrera les stratégies d'échappement aux compartiments dans lesquels va s'effectuer la bactéricidie

Fascinant de voir la diversité de stratégies moléculaires engendrées par cette pression sélective mutuelle

Comment sortir du couloir de la mort ?

Comment survivre dans le couloir de la mort ?

Stratégies d'échappement à la voie endo-lysosomale



- 1 – Echappement de la bactérie dans le cytosol et mouvement dépendant de l'actine.
- 2 – Diversion de la voie d'endocytose, formation d'une vacuole d'inclusion par capture de vésicules du Golgi.
- 3 – Diversion de la voie d'endocytose au stade d'endosome précoce (EE) et formation d'un compartiment phagosomal dérivé du réticulum endoplasmique (ER).
- 4 – Arrêt de la maturation du phagosome au stade EE.
- 5 – Déviation de la voie d'endocytose au stade d'endosome tardif (LE), formation d'un phagosome de type ER.
- 6 – Arrêt transitoire de maturation du phagosome au stade EE & LE.
- 7 – Survie dans le compartiment lysosomal mature.

Cibles possibles des bactéries pathogènes dans leurs stratégies de survie intracellulaire:

Les supports de la biogénèse et de la dynamique du cytosquelette

Les microtubules/leur régulation

L'actine

Les compartiments intracellulaires:

Endosomes précoces/tardifs/lysosomes

Le réticulum endoplasmique

Le Golgi

La sécrétion...

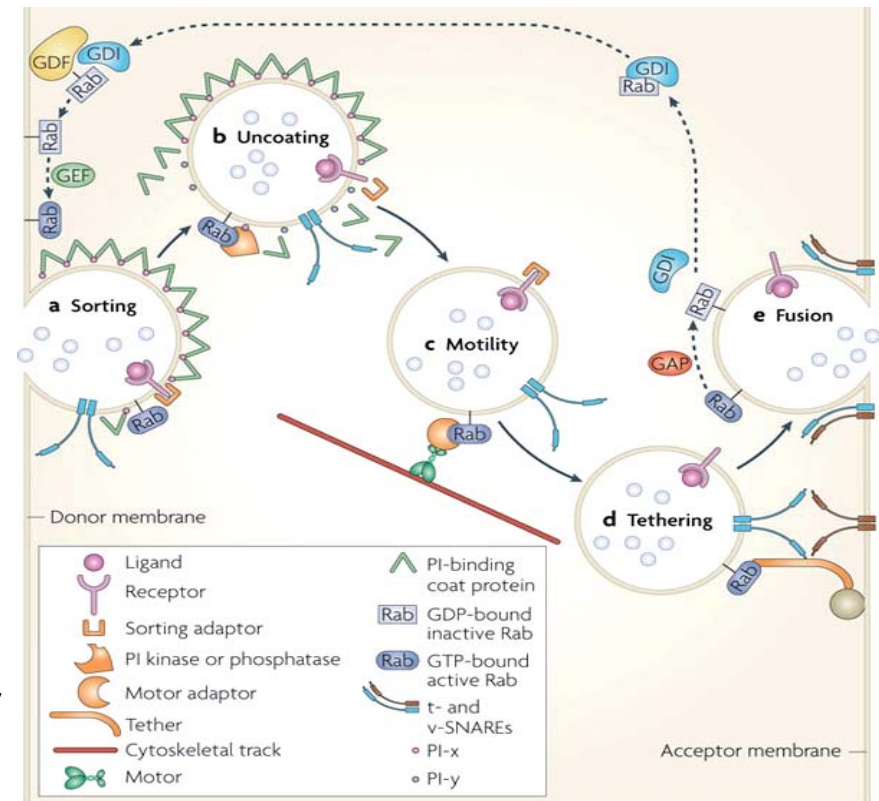
Les régulateurs des compartiments intracellulaires:

Les petites GTPases Rab

Les phosphatidyl-inositols

Etapes distinctes de trafic membranaire contrôlées par les petites GTPases de la famille Rab et leurs effecteurs (orange)

Stenmark H. 2009. Mol. Cell Biol.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

A – Une Rab active (GTP) peut activer un activateur de tri pour ségréger un récepteur dans une vésicule en cours de bourgeonnement.

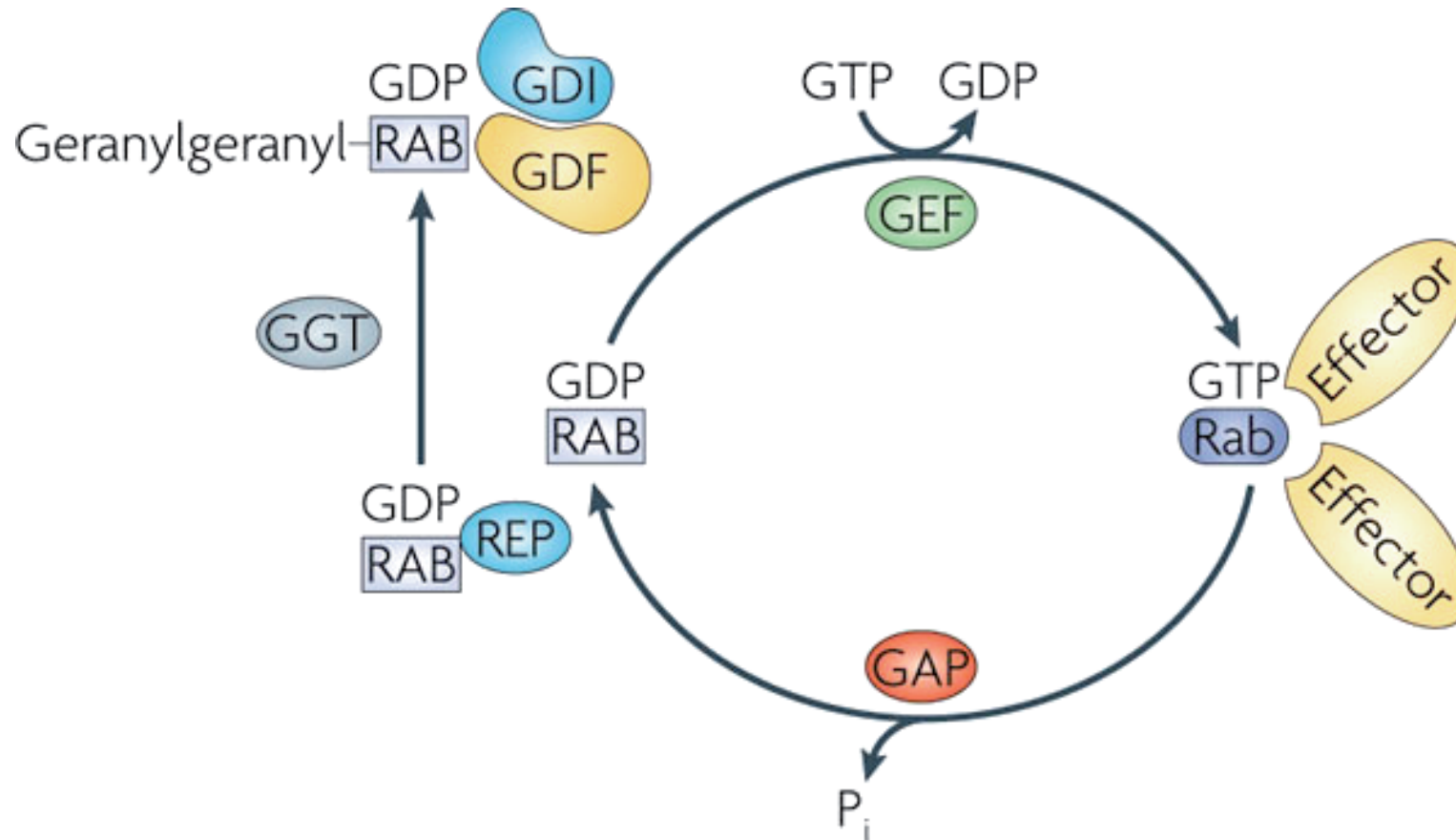
B - Rôle du recrutement de phosphoinositide (Pi) kinases ou phosphatases dans l'établissement de la composition en Pi des vésicules. Une altération de cette composition peut entraîner la perte de leur manteau dont la stabilité est liée à la liaison des Pi.

C – Les petites GTPases Rab peuvent médier le transport vésiculaire le long de microfilaments d'actine ou de microtubules en recrutant des adapteurs/moteurs moléculaires ou en se liant directement aux moteurs moléculaires.

D – Les petites GTPases Rab peuvent médier les étapes précoces de contact et fusion membranaire en recrutant des partenaires moléculaires interagissant avec des molécules de la membrane acceptrice comme les SNARE et leurs modulateurs qui vont causer la fusion membranaire.

Suivant ces évènements les Rab-GTP sont transformées en RaGDP par des GTPases de type GAP et reconverties en Rab-GTP par une molécule GEF (Guanine nucléotide exchange factor).

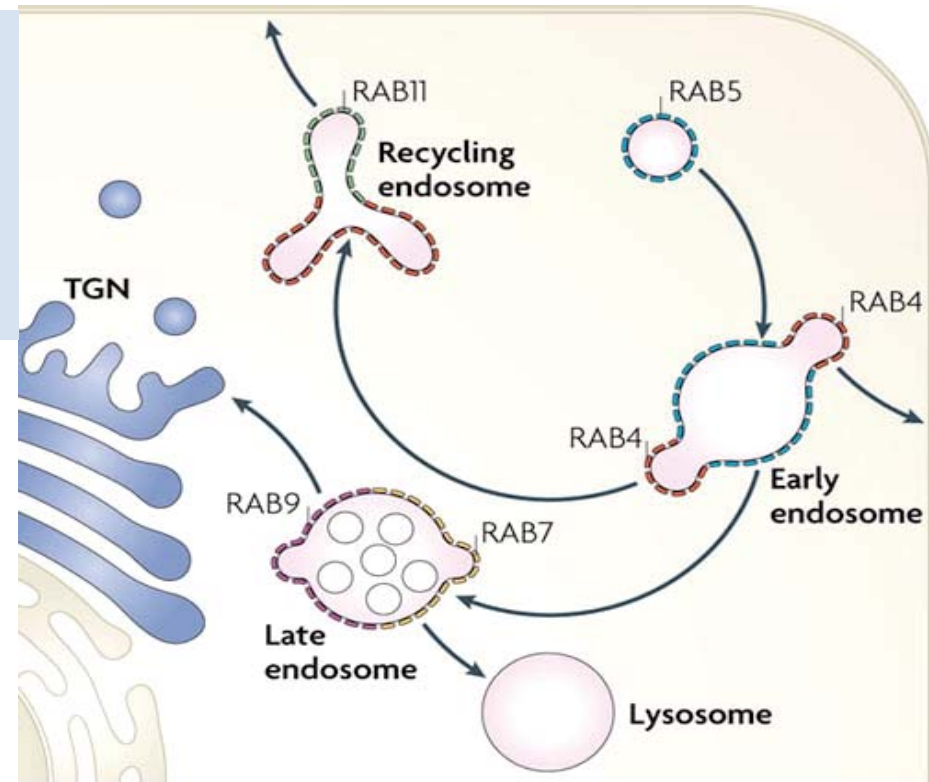
Interconversion entre forme active et inactive des petites GTPases Rab



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Conversion of the GDP-bound Rab into the GTP-bound form occurs through the exchange of GDP for GTP, which is catalysed by a guanine nucleotide exchange factor (GEF) and causes a conformational change. The GTP-bound 'active' conformation is recognized by multiple effector proteins and is converted back to the GDP-bound 'inactive' form through hydrolysis of GTP, which is stimulated by a GTPase-activating protein (GAP) and releases an inorganic phosphate (P_i).

Constitution de microdomaines enrichis en GTPases Rab spécifiques dans la maturation des endosomes.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Les endosomes précoces contiennent des domaines séparés enrichis en Rab5 (bleu) et Rab4 (Rouge) impliqués respectivement dans la fusion des endosomes et dans le recyclage des compartiments endosomaux précoces.

L'endosome de recyclage (« recycling endosome ») contient des domaines enrichis en Rab4 et Rab11 (vert) qui sont respectivement impliqués dans le trafic de vésicules vers les endosomes précoces ou la membrane.

Les endosomes tardifs contiennent des domaines enrichis en Rab7 (jaune) et en Rab9 (pourpre). Ils assurent respectivement le trafic vésiculaire vers les lysosomes et le trans-Golgi network (TGN)

Altération des fonctions des GTPases Rab par des pathogènes

Rab5 et Rab7 sont essentiels, en association, pour assurer la maturation des phagosomes, un prérequis à leur fusion avec les lysosomes pour donner lieu à la formation de phagolysosomes dégradatifs (Desjardins et coll. 1994. J. Cell Biol.). Des pathogènes ont ciblé ce processus précoce pour échapper au « piège » lysosomal (Kinchen JM & Ravichandran KS. 2008. Mol. Cell Biol.)

Helicobacter pylori sécrète une toxine, VacA, qui localise et séquestre Rab7 dans le phagosome créant ainsi une niche protégée pour la bactérie (Terebiznik et coll. 2006. Infect. Immun).

Mycobacterium tuberculosis utilise une stratégie différente en sécrétant des effecteurs qui préviennent l'acquisition de Rab7 par le phagosome (Via et coll. 1997. J. Biol. Chem.)

Salmonella typhimurium via SopB (Mallo et coll. 2008. J. Cell Biol) et ***Listeria monocytogenes*** (Prada-Delgado et coll. 2005. Traffic) sécrètent des effecteurs qui préviennent le recrutement de Rab5 au niveau de la membrane endosomale.

La subversion des GTPases Rab n'est pas réduite à la subversion de la voie d'endocytose.

Certains pathogènes intracellulaires recrutent du matériel membranaire à partir du réticulum endoplasmique (ER) ou du pré-Golgi (intermediate compartment = IC) afin de créer une niche replicative intracellulaire.

Ceci requiert aussi l'implication de petites GTPases de la famille Rab.

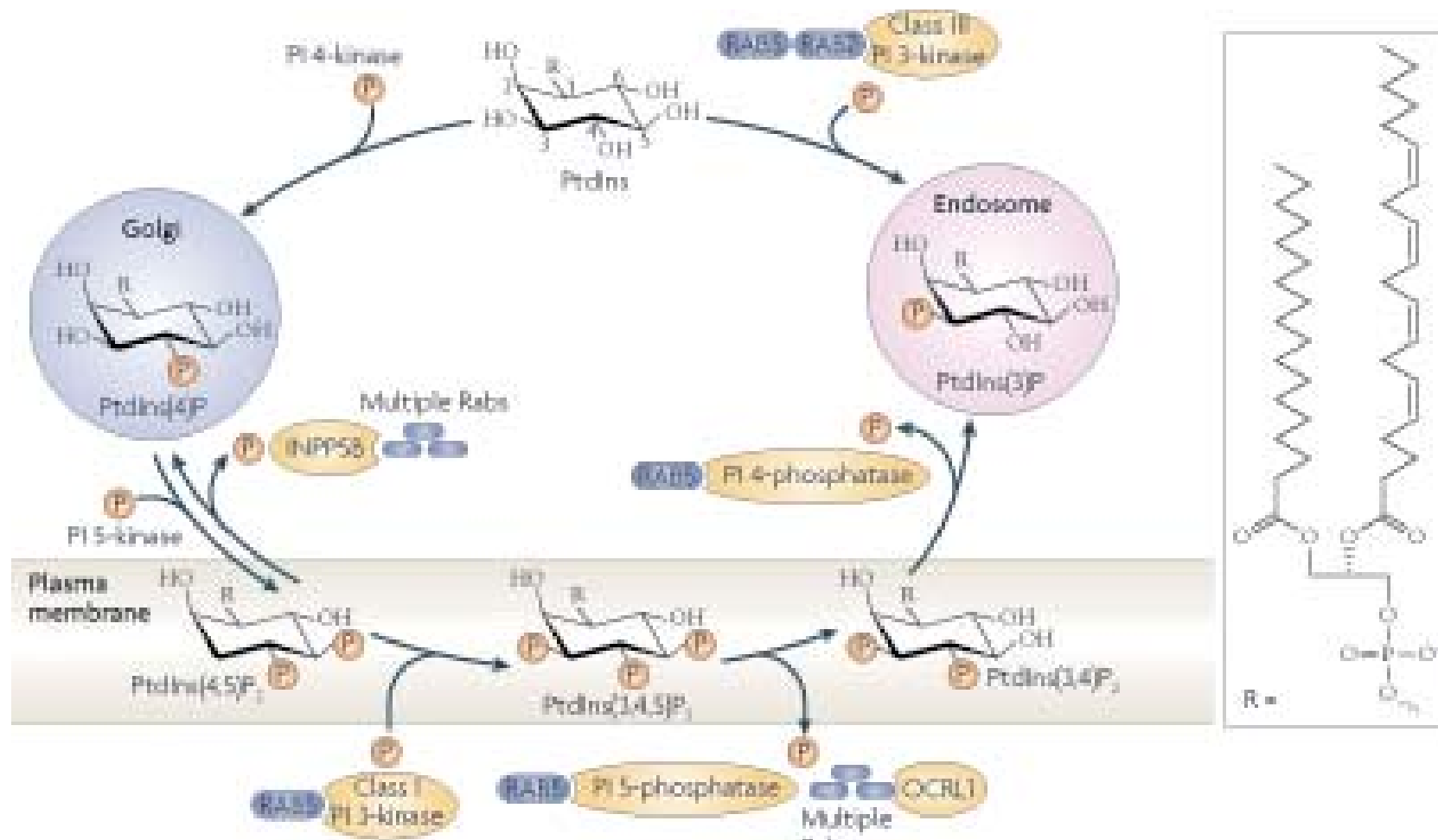
Legionella pneumophila qui infecte les macrophages alvéolaires pulmonaires sécrète deux protéines qui ciblent directement le cycle de la GTPase Rab1 qui est localisée au niveau du ER et du IC (Ingmundson et coll. 2007. Nature; Machner MP & Isberg RR. 2007. Science).

SidM (DrrA) agit comme un GEF/GDF pour Rab1

LepB est un Rab1-GAP.

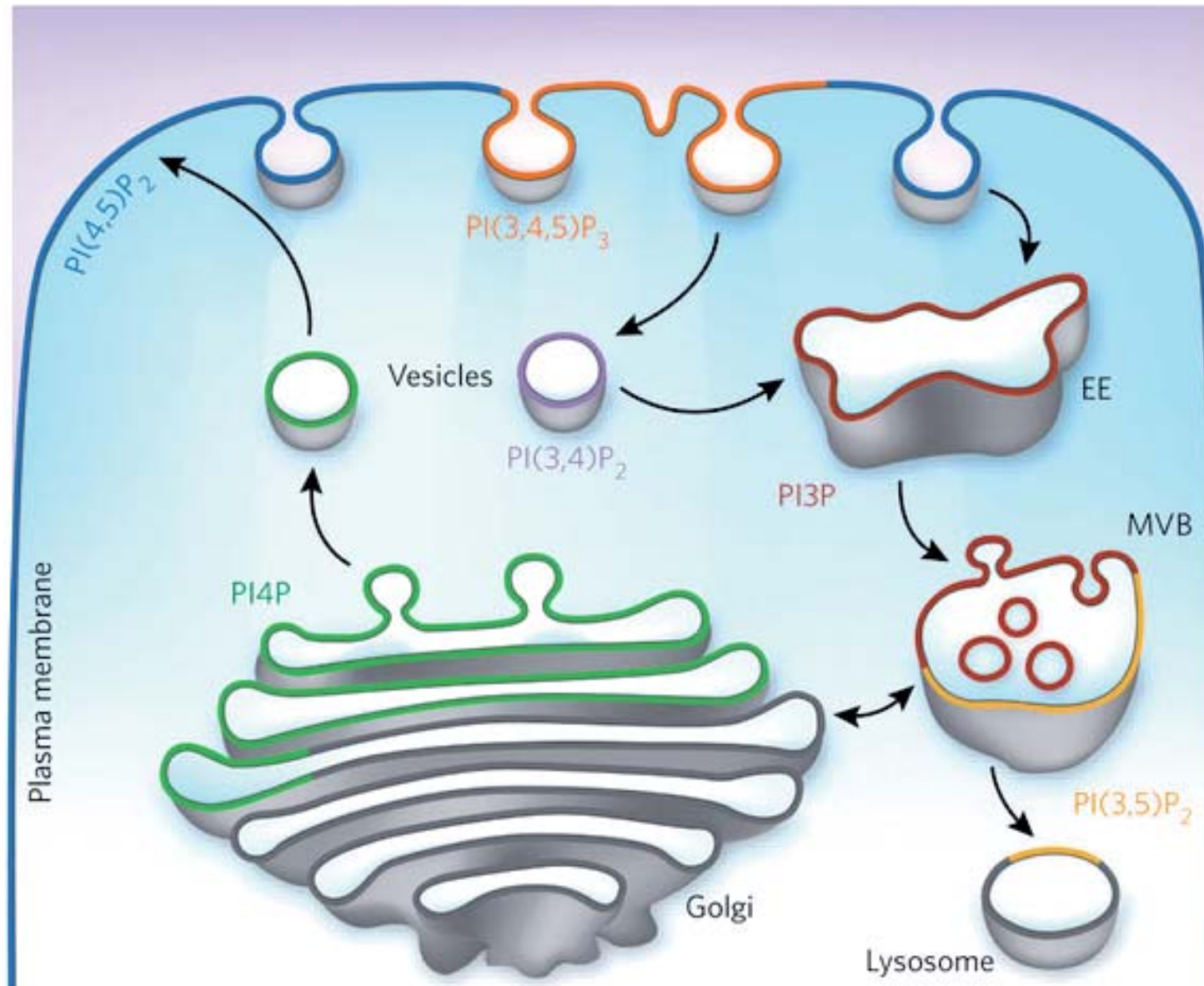
La conséquence fonctionnelle de l'expression de ces protéines est que les vacuoles contenant *L. pneumophila* recrutent Rab1 et se comportent fonctionnellement comme des vésicules appartenant au ER ou au IC (Golgi) qui échappent à la fusion avec les lysosomes.

Phospho-inositides et leur régulation par les petites GTPases Rab



Phosphoinositides and their regulation by Rab GTPases Phosphorylation of the hydroxyl groups at the 3, 4 and 5 carbon positions of the inositol ring of phosphatidylinositol (PtdIns) yields phosphoinositides (PIs), which contribute to membrane identity by recruiting specific proteins, including Rab effectors, to restricted areas of cellular membranes. Several of the PI kinases and phosphatases that regulate the metabolism of specific PIs are activated by Rab GTPases (see the figure). Class III PI 3-kinase, which phosphorylates PtdIns to PtdIns-3-phosphate (PtdIns(3)P) on endosomes, is an effector of RAB5 and RAB7. PI 4-kinase, which phosphorylates PtdIns to PtdIns(4)P, and PI 5-kinase, which phosphorylates PtdIns(4)P to make PtdIns-4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂), have not yet been identified as Rab effectors. INPP5B, which dephosphorylates PtdIns(4,5)P₂ to make PtdIns(4)P, is an effector of multiple Rab GTPases. Class I PI 3-kinase, which phosphorylates PtdIns(4,5)P₂ to make PtdIns-3,4,5-trisphosphate (PtdIns(3,4,5)P₃) at the plasma membrane, is an effector of RAB5. Dephosphorylation of PtdIns(3,4,5)P₃ to PtdIns(3,4)P₂ at the plasma membrane is mediated by PI 5-phosphatase, a RAB5 effector, and by the phosphatase OCRL1, which is an effector of multiple Rabs. Dephosphorylation of PtdIns(3,4)P₂ to PtdIns(3)P is mediated by PI 4-phosphatase, which is a RAB5 effector. Note the involvement of RAB5 in both phosphorylation and dephosphorylation pathways that lead to formation of PtdIns(3)P^{23, 24}. The subcellular localizations of the various PIs are indicated. For simplicity, PtdIns(5)P and PtdIns(3,5)P₂, which have so far not been linked to Rab functions, have been omitted from the figure.

Un « code vésiculaire » des phosphatidyl-inositols



Effecteurs microbiens affectant le métabolisme des phosphatidyl-inositols:

- **Activité phosphatase:**

IpgD de *Shigella* hydrolyse le $PI(4,5)P_2$ en PI_5P (Niebuhr et coll. 2002. EMBO J.), VPA0450 de *Vibrio parahaemolyticus* (Broberg et coll. 2010. Science) entraînent un relâchement de la tension entre la membrane cytoplasmique et le cytosquelette sous-cortical.

SopB de *Salmonella* hydrolyse le $PI(4,5)P_2$ en $PI(4)P$ au sein de la vacuole contenant la bactérie (SCV), ceci diminue en aval le recrutement des protéines Rab et bloque la fusion avec les lysosomes (Mallo et al. 2008. J. Cell Biol.)

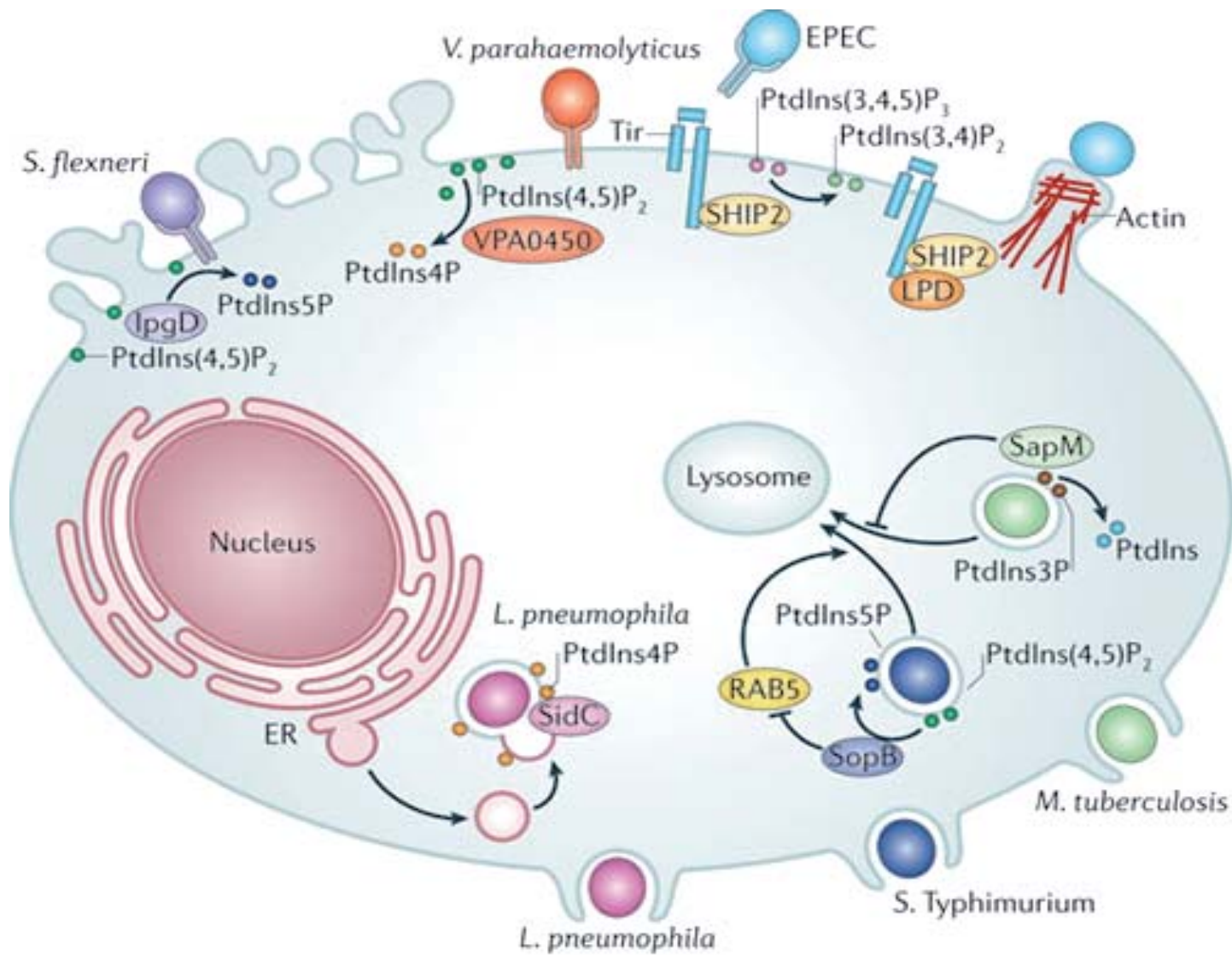
SapM de *Mycobacterium tuberculosis* hydrolyse le $PI(3)P_n$ de la membrane du phagosome, inhibant la fusion phago-lysosomiale (Vergne et coll. 2005. PNAS)

- **Exploitation de phosphatases cellulaires.** Tir recrute SHIP2 (SH domain-containing inositol 5' phosphatase qui enrichit la membrane en $PI(3,4)P_2$ qui recrute la lamellipodine (LPD = RAPH1) pour former le piédestal d'actine au site d'adhésion des **EPEC** (Smith et coll. 2010. Cell Host & Microbe)

-

- **Recrutement de protéines adaptatrices de PI** afin d'acquérir le matériel membranaire nécessaire à la formation de la vacuole replicative. SidC et SdcA de *Legionella pneumophila* s'ancrent au $PI(4)P$ de la vacuole contenant *Legionella* (LCV) et recrutent des membranes appartenant au réticulum endoplasmique afin de « façonner » leur niche replicative (Ragaz et coll. 2008. Cell. Microbiol.).

-



***Salmonella* induces the formation of filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins in epithelial cells**

FRANCISCO GARCIA-DEL PORTILLO, MICHAEL B. ZWICK, KA YIN LEUNG, AND B. BRETT FINLAY*

Biotechnology Laboratory, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada V6T 1Z3

Communicated by Harley W. Moon, August 3, 1993 (received for review May 5, 1993)

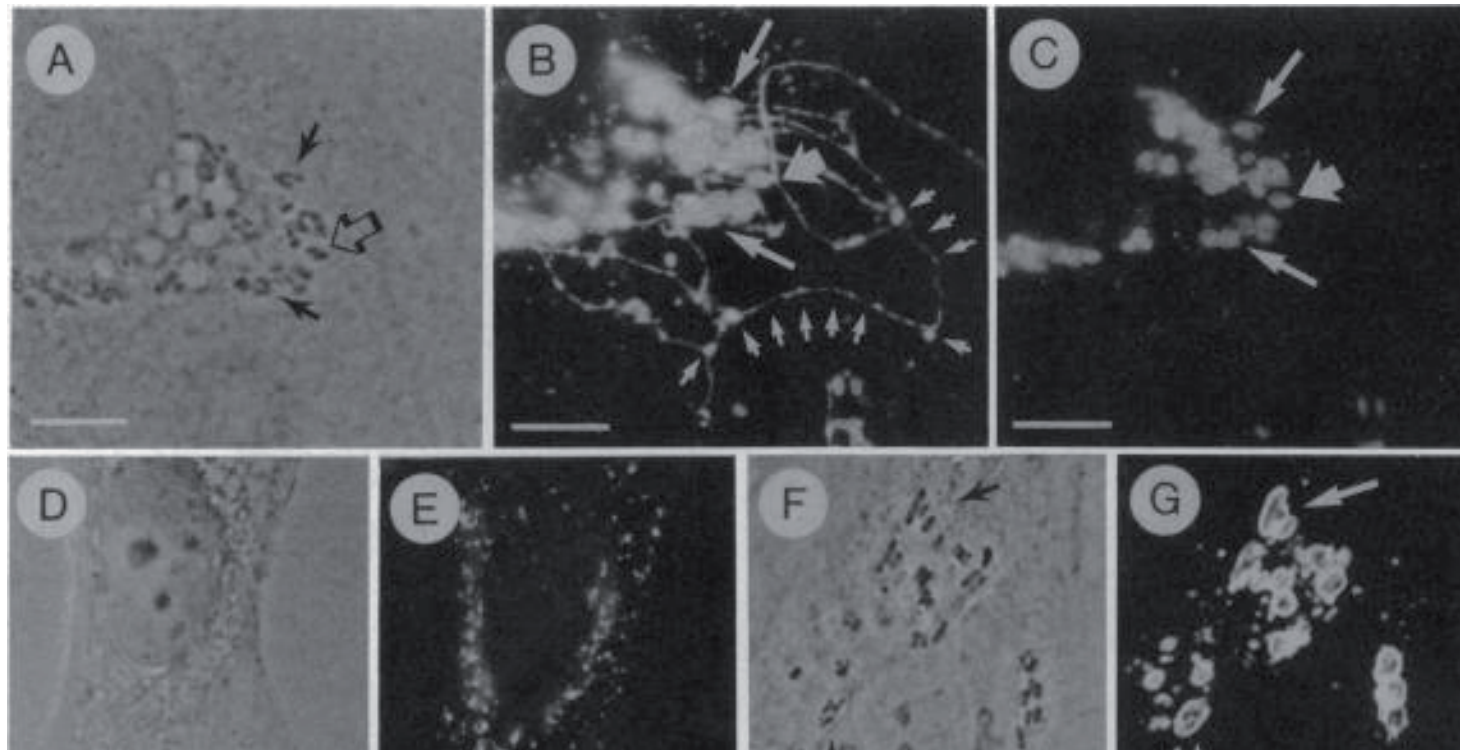
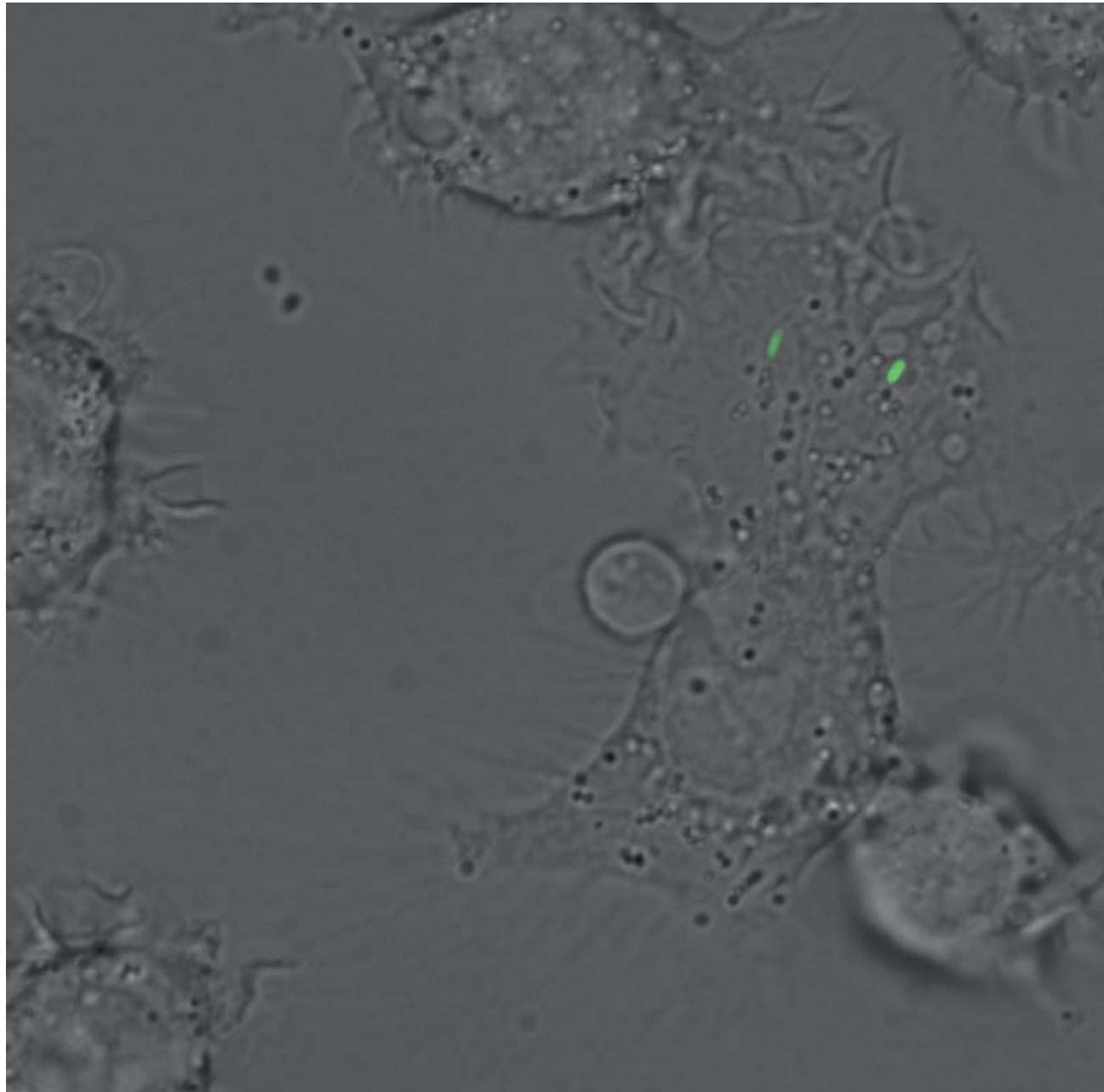


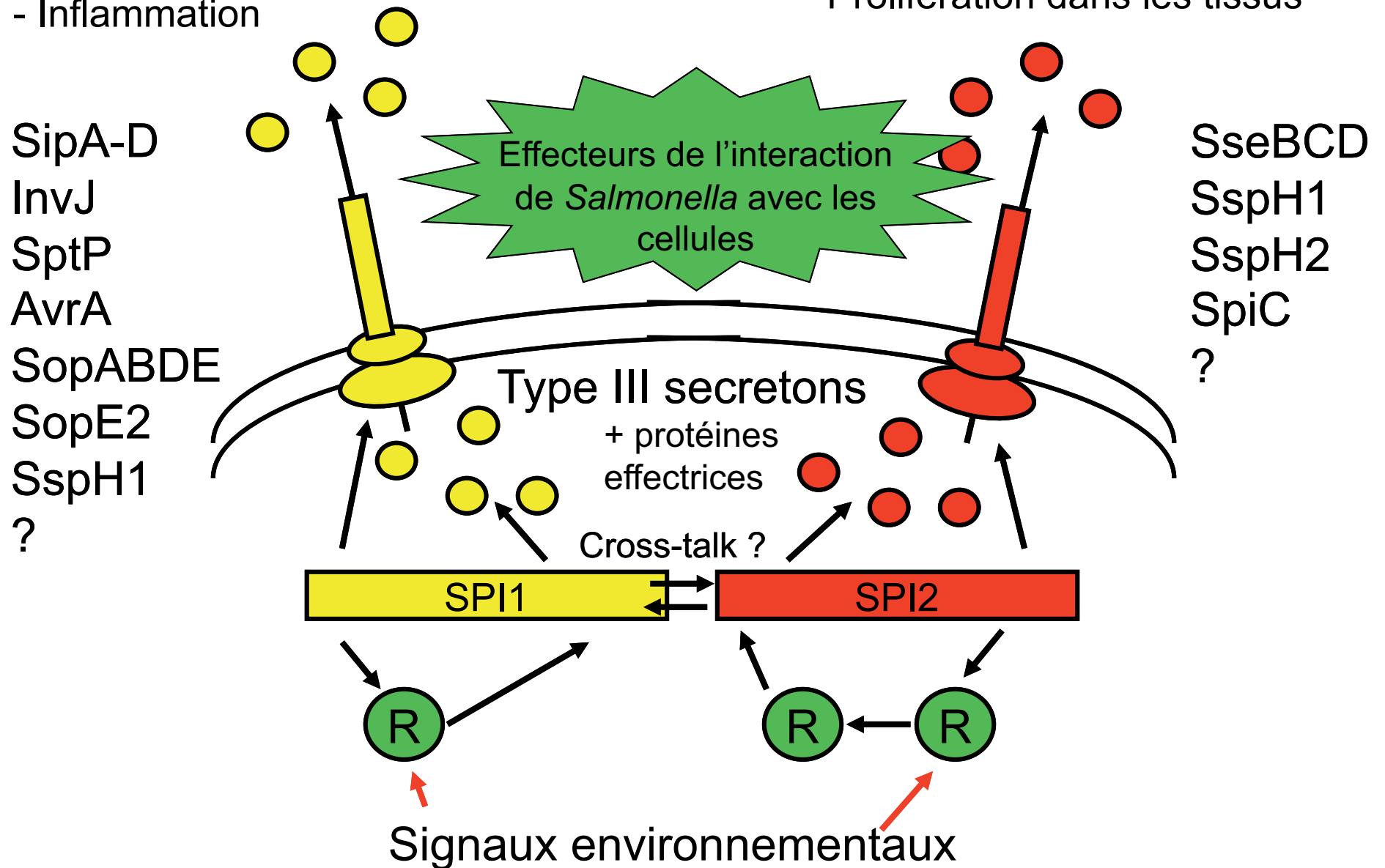
FIG. 1. Filamentous structures containing lgps in *Salmonella*-infected HeLa epithelial cells. (A–C) Phase-contrast image, hlamp-2 distribution, and intracellular bacteria in a *S. typhimurium*-infected cell 6 hr after infection. (D and E) Phase-contrast image and hlamp-2 distribution in an uninfected cell. (F and G) Phase-contrast image and hlamp-2 distribution in a *Y. enterocolitica*-infected cell 6 hr after infection. lgp-containing filamentous structures with periodic swellings are indicated by small arrows, and the location of some intracellular bacteria by large arrows. A wide arrow indicates a probable connection between a lgp filament and bacteria-containing vacuoles. (Bar = 10 μ m.)



Salmonella typhimurium: croissance dans des macrophages (14 h). David Holden

- Réarrangements du cytosquelette
- Entrée dans les cellules
- Apoptose des macrophages
- Inflammation

- Dissémination systémique
- Prolifération intracellulaire
- Remodelage de la vacuole
- Prolifération dans les tissus



SipA-D
 InvJ
 SptP
 AvrA
 SopABDE
 SopE2
 SspH1
 ?

SseBCD
 SspH1
 SspH2
 SpiC
 ?

Effecteurs de l'interaction
 de *Salmonella* avec les
 cellules

Type III secretons
 + protéines
 effectrices

Cross-talk ?

SPI1

SPI2

R

R

R

Signaux environnementaux

Effecteurs de *Salmonella* injectés par Spi1: modulation de la vie intracellulaire

AvrA	1	Regulates <i>Salmonella</i> induced inflammation (Collier-Hyams <i>et al.</i> , 2002; Ye <i>et al.</i> , 2007)	I- κ B α , β -catenin
SipA	1	Mediates <i>Salmonella</i> invasion of epithelial cells by inducing actin bundling and polymerization, promotes formation and maintenance of SCV, induces neutrophil transmigration and also processes and activates caspase-3 (Zhou <i>et al.</i> , 1999; Silva <i>et al.</i> , 2004; Brawn <i>et al.</i> , 2007; Srikanth <i>et al.</i> , 2010)	Actin
SipB	1	Translocon (Kaniga <i>et al.</i> , 1995)	Cholesterol
SipC	1	Promotes bacteria entry (invasion) by mediating actin bundling, component of the translocon (Kaniga <i>et al.</i> , 1995; McGhie <i>et al.</i> , 2001)	Actin
SipD	1	Component of the translocon (Lara-Tejero and Galan, 2009)	
SopA	1	Ubiquitin E3 ligase, promotes bacteria escape from SCV and is required for invasion, promotes neutrophil transmigration (Wood <i>et al.</i> , 2000; Raffatelli <i>et al.</i> , 2005; Zhang <i>et al.</i> , 2006)	
SopB	1	Phosphatidyl inositol phosphatase, promotes bacteria entry, macropinocytosis, regulates SCV localization and formation and promotes fluid secretion during infection, Akt activation (Norris <i>et al.</i> , 1998; Hernandez <i>et al.</i> , 2004; Mallo <i>et al.</i> , 2008; Knodler <i>et al.</i> , 2009)	Inositol phosphates, phosphoinositides
SpiP	1	Contains GTPase activating protein (GAP) and tyrosine activities, reverses <i>Salmonella</i> -induced pro-inflammatory responses (Kubori and Galan, 2003; Humphreys <i>et al.</i> , 2009)	Rac-1 and Cdc42
-	-	-	-

Effecteurs de *Salmonella* injectés par Spi2: modulation de la vie intracellulaire

SpiC	2	Regulates Spi-2 T3SS (Yu <i>et al.</i> , 2002)	Hook3 and TassC
SseF	2	Regulation and maintenance of SCV (Abrahams <i>et al.</i> , 2006)	Microtubules
SseG	2	Regulates SCV positioning (Abrahams <i>et al.</i> , 2006)	Microtubules
SepD	1/2	Promotes bacteria invasion and fluid secretion/accumulation (Jones <i>et al.</i> , 1998; Zhang <i>et al.</i> , 2002)	
SepE	2	Mediates bacteria invasion by promoting membrane ruffling and actin cytoskeletal rearrangements, disrupts tight junctions (Hardt <i>et al.</i> , 1996; Boyle <i>et al.</i> , 2006)	Rac-1 and Cdc42
SepE2	2	Membrane ruffling and disruption of tight junctions (Boyle <i>et al.</i> , 2006)	
SepD2	2	Sifs formation and intracellular replication of bacteria in mouse macrophages (Jiang <i>et al.</i> , 2004)	
SifA	2	Required for Sif formation and SCV membrane integrity, SCV maintenance, C-terminal has GTPase activity (Stein <i>et al.</i> , 1996; Aito <i>et al.</i> , 2006; Ohlson <i>et al.</i> , 2008)	SKIP, Rab7
PipB2	2	Promotes Sifs extension (Knodler and Steele-Mortimer, 2005)	Kinesin-1
PipB	2	Homologous to PipB2, localizes to SCV and Sif and required for cecal colonization in chicks and induction of secretory and inflammatory responses in bovine ligated ileal loops (Wood <i>et al.</i> , 1998; Morgan <i>et al.</i> , 2004).	
SirP	2	Ubiquitin ligase for thioredoxin, targets the human chaperone ERDj3 (Bernal-Bayard and Ramos-Morales, 2009; Bernal-Bayard <i>et al.</i> , 2010)	Thioredoxin, ERDj3
SspH 1	1/2	E3 ubiquitin ligase (Rytkonen and Holden, 2007)	
SspH 2	2	E3 ubiquitin ligase (Quezada <i>et al.</i> , 2006)	
SseJ	2	Antagonizes SifA mediated stability of SCV, negatively regulates Sifs (Ruiz-Albert <i>et al.</i> , 2002)	Cholesterol
SseL	2	Helps to attenuate <i>Salmonella</i> virulence, has de-ubiquitinating activity and is a cysteine protease (Rytkonen <i>et al.</i> , 2007)	
SteB	1/2	Putative piconate reductase, required for <i>Salmonella</i> biofilm formation (Dong <i>et al.</i> , 2008; McGhie <i>et al.</i> , 2009)	
SteC	2	Kinase that promotes F-actin meshwork formation (Poh <i>et al.</i> , 2008)	F-actin
SpvB	2	Depolymerizes actin filaments <i>in vitro</i> (Lesnick <i>et al.</i> , 2001)	Actin
SpvC	2	Phosphothreonine lyase necessary for complete virulence in mice (Mazurkiewicz <i>et al.</i> , 2008)	

Maturation et élongation/tubulation de SCV (1) Maturation

Ces deux étapes intriquées sont essentielles à la croissance intracellulaire de *Salmonella*.

1 – SCV précoce (5 mn): acquisition de marqueurs d'endosomes précoces (EE) = TfnR, EEA1, Rab5

2 – SCV intermédiaire (30 mn): découplage de la voie endosomale pour éviter la formation d'endosomes tardifs (LE) et la fusion phago-lysosomale (Le/Lys).

CEPENDANT: acquisition de Rab7 et mise en place Rab7-dépendante d'un flux de marqueurs du LE/Lys comme Lamp1/2.

3 – SCV mature (60 mn): remplacement des marqueurs précoces LE/Lys = **Rab7, ATPase vacuolaire (v-ATPase)**,

Glycoprotéines de la membrane lysosomiale Lamp-1/2 (Lysosome-associated glycoproteins = Lgp). **JAMAIS de Cathepsine !**

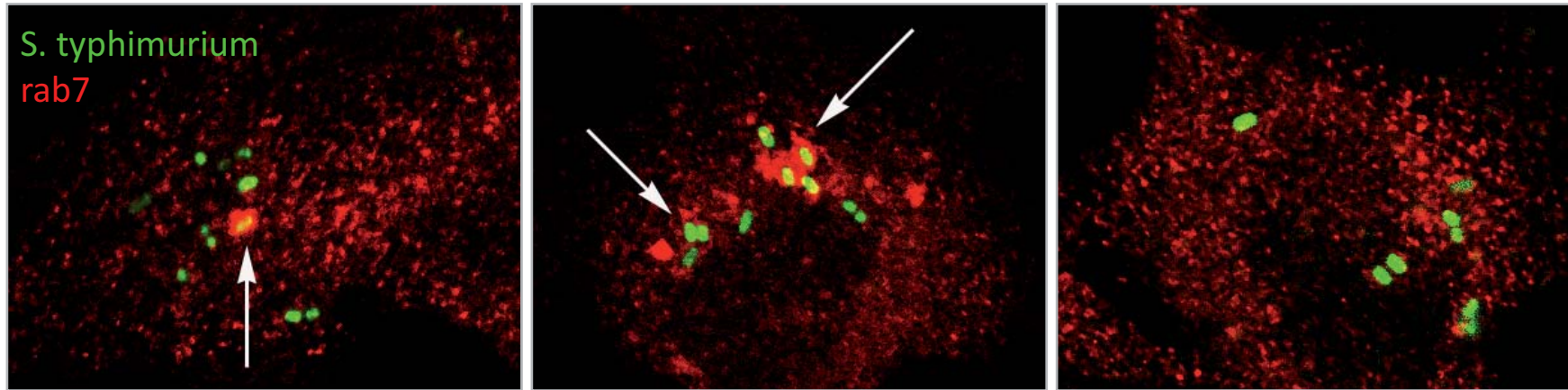
Exclusion des enzymes lysosomales du processus de maturation de SCV...

Drecktrah D et coll. 2007. *Traffic*, 8:212-225

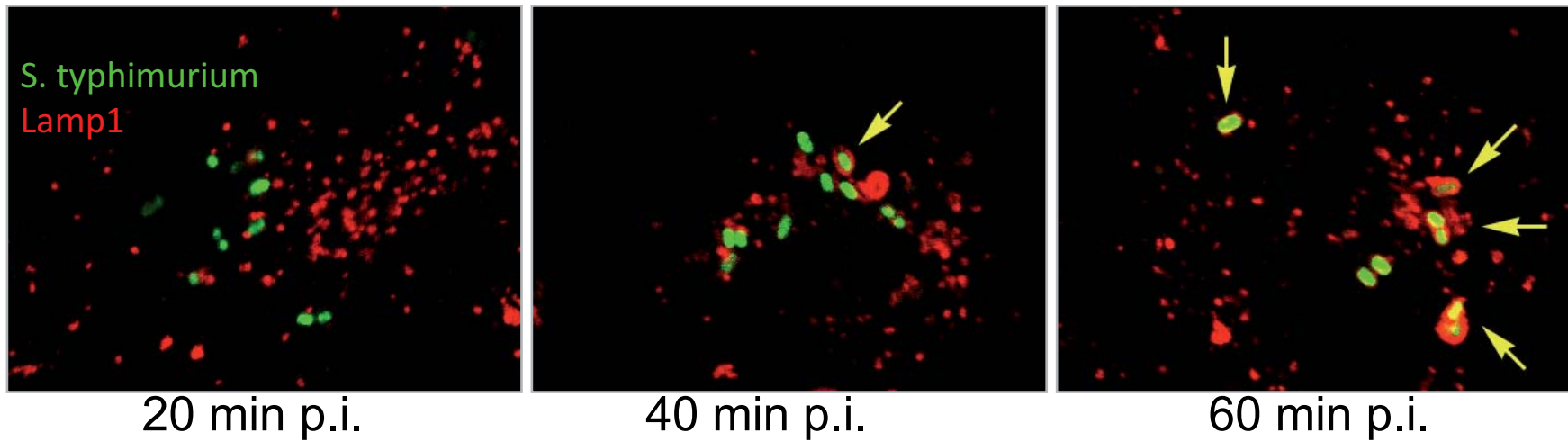
Steele-Mortimer O. 2008. *Curr. Opin. Microbiol.*, 11:38-45

McGhie EJ et coll. 2009. *Curr. Opin. Microbiol.*, 12:119-124

Rab7 s'accumule à la périphérie des SCV...



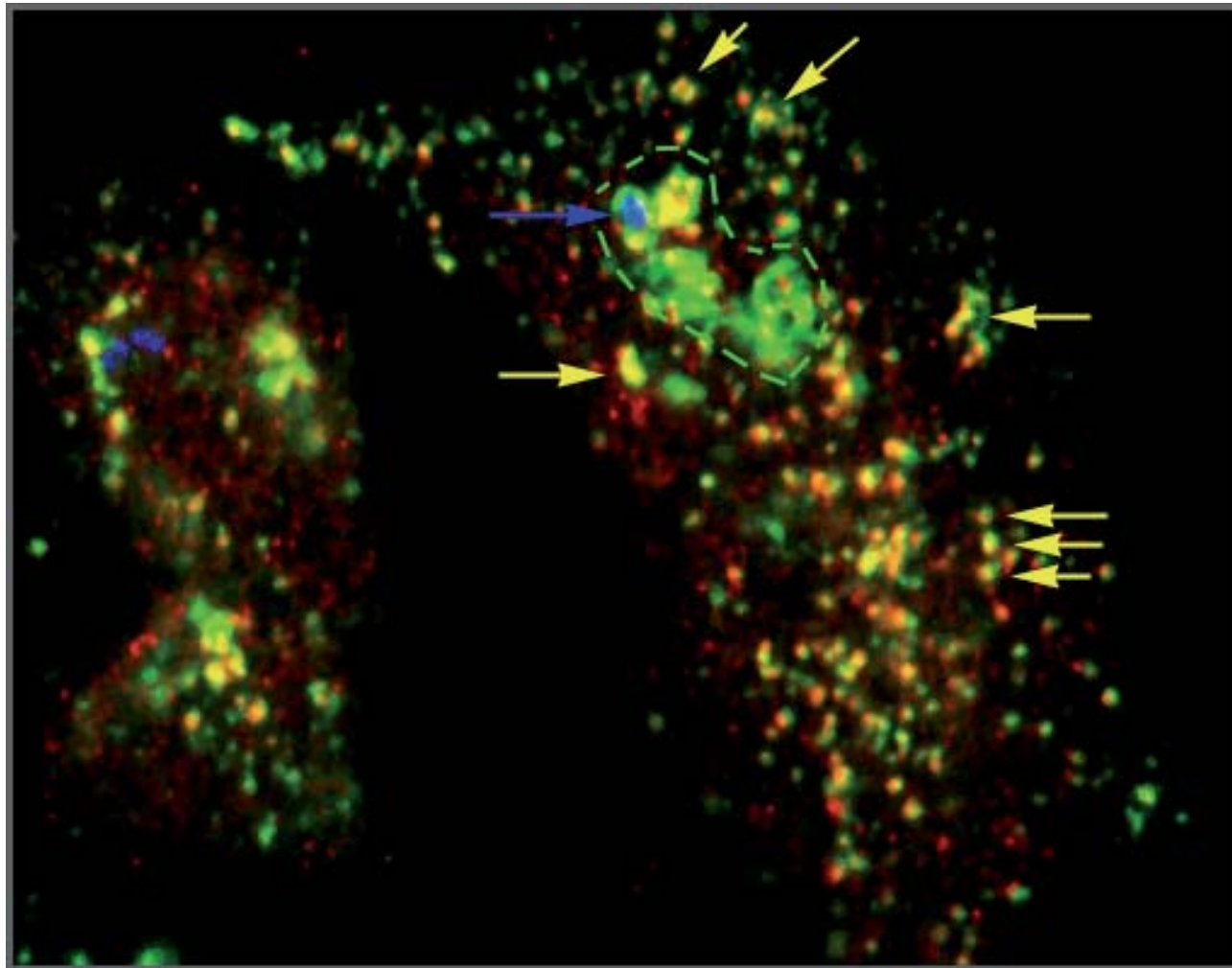
... et précède l'acquisition des marqueurs de LE/Lys (lysoglycoprotéines Lgp)



La Cathepsine D est exclue des agrégats de vésicules rab7/Lgp

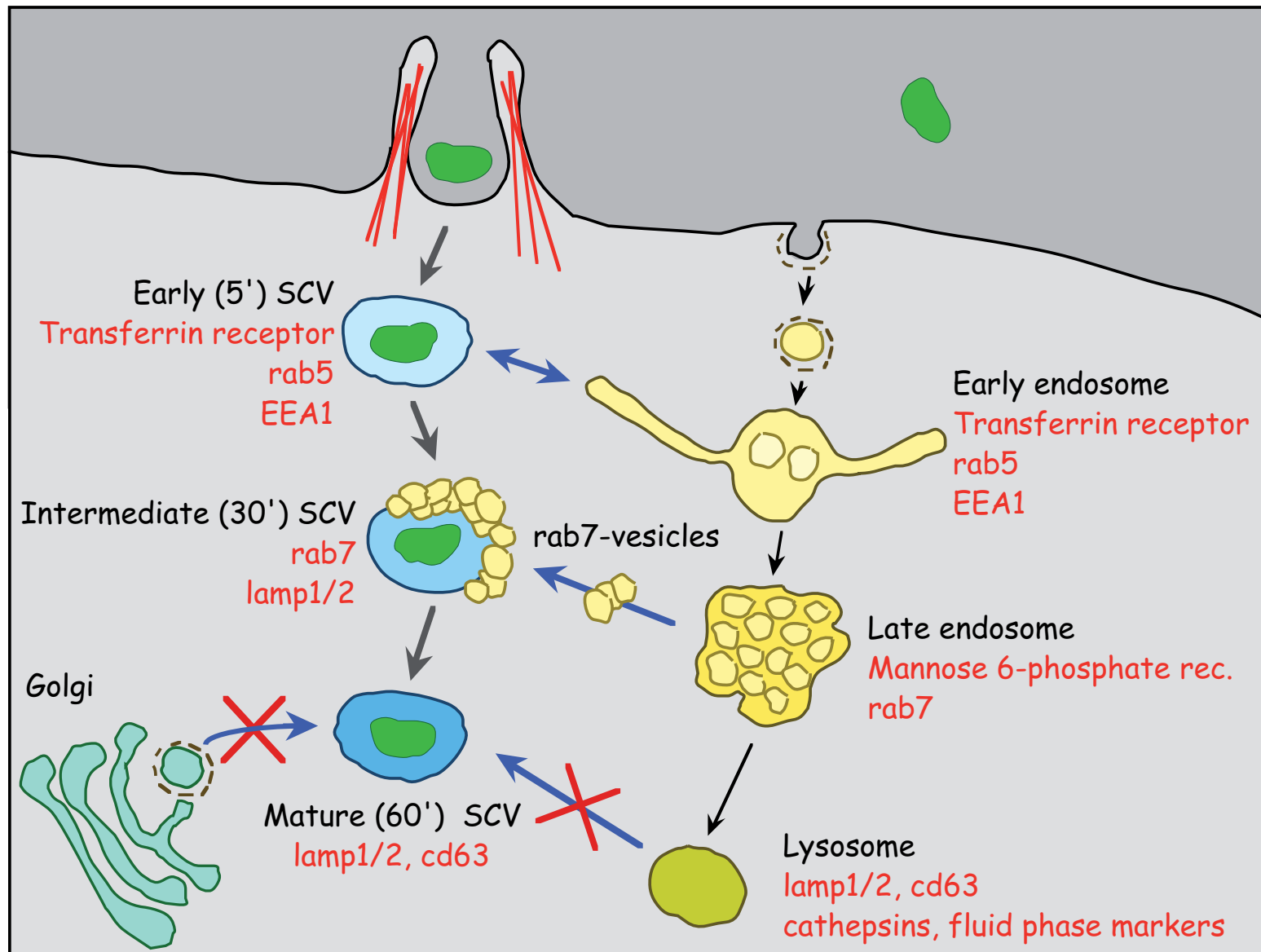
Cath. D / Lamp2 / *S. typhimurium*

HeLa cells
30 mn p.i.



Méresse S et coll.

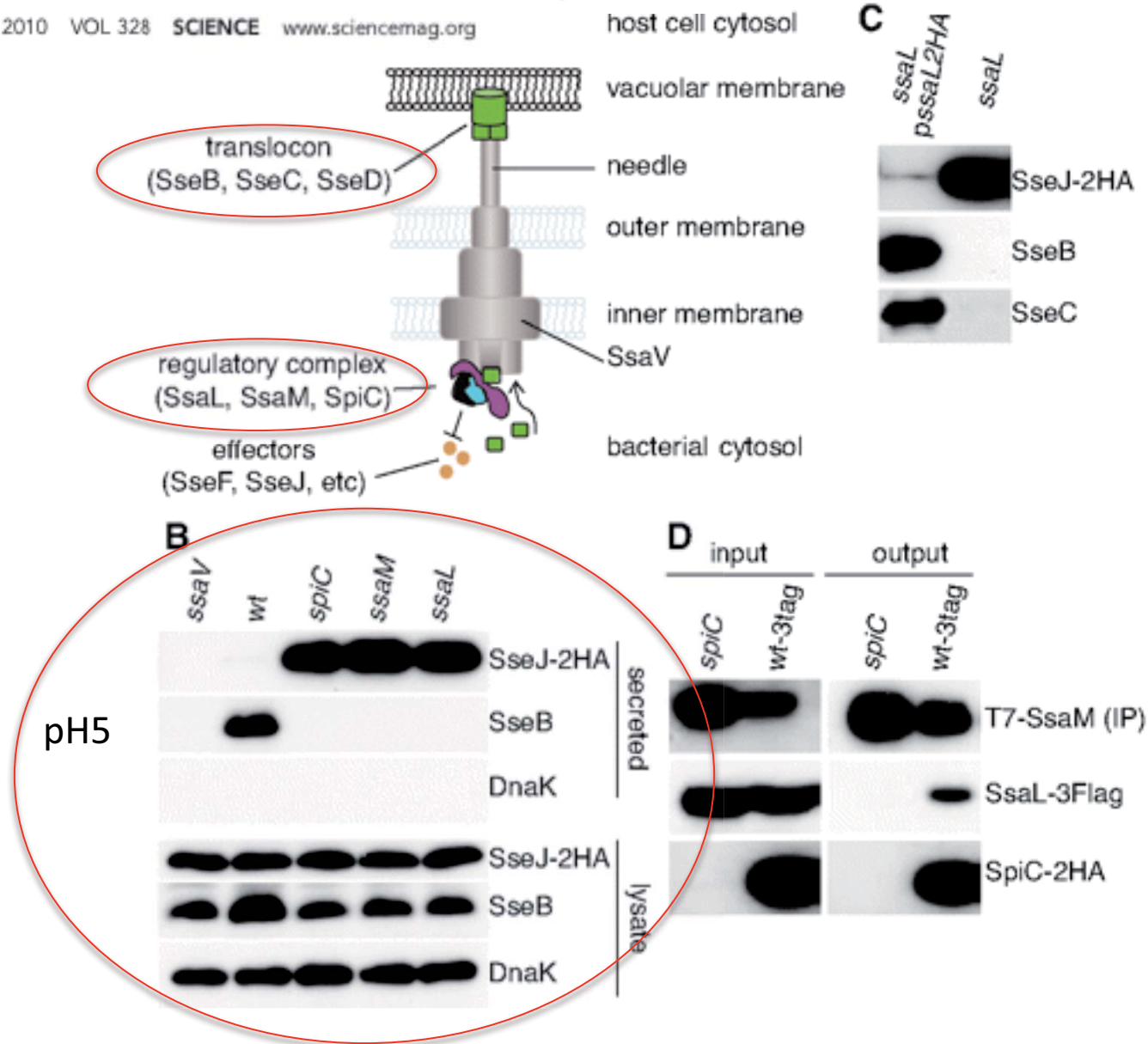
Maturation of the Salmonella-containing vacuole (SCV)



pH Sensing by Intracellular *Salmonella* Induces Effector Translocation

Xiu-Tun Yu, Kieran McGourty, Mei Liu, Kate E. Unsworth,* David W. Holden†

21 MAY 2010 VOL 328 SCIENCE www.sciencemag.org



"Logique" de *Salmonella*

Acquérir les conditions d'un compartiment acide pour activer la sécrétion de Spi2
Eviter l'activité bactéricide des enzymes lysosomiales

La croissance de *Salmonella* augmente dans les cellules dont l'activité lysosomale est réduite

Un travail récent non publié du groupe de David Holden montre que *Salmonella* induit un détournement de l'adressage des enzymes hydrolytiques hors du compartiment lysosomal

La cathepsine, par exemple, se trouve sécrétée dans le milieu extracellulaire dans une forme non maturée inactive

Un effecteur injecté par Spi2 a été identifié qui induit le détournement du récepteur au Mannose-6-phosphate et des enzymes lysosomiales hors de leur compartiment d'adressage naturel

Les effecteurs bactériens de la maturation de SCV

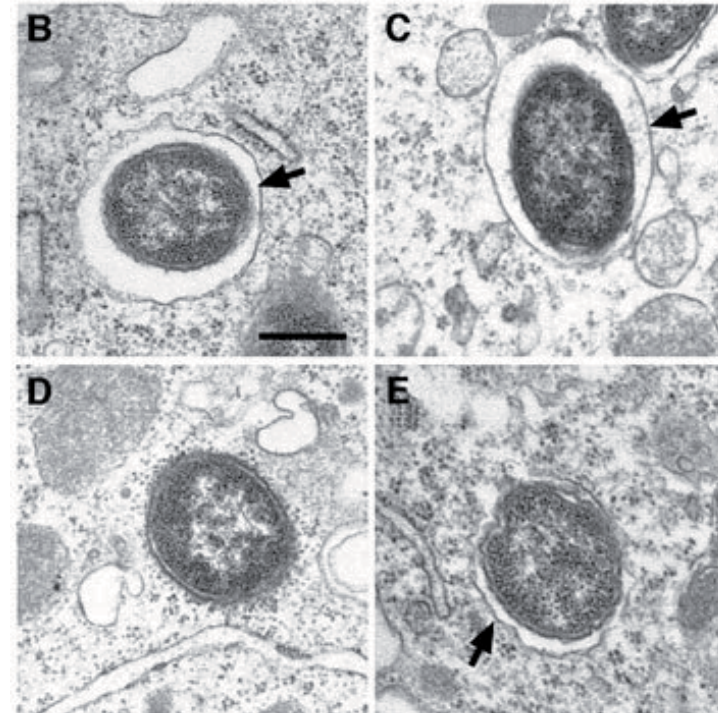
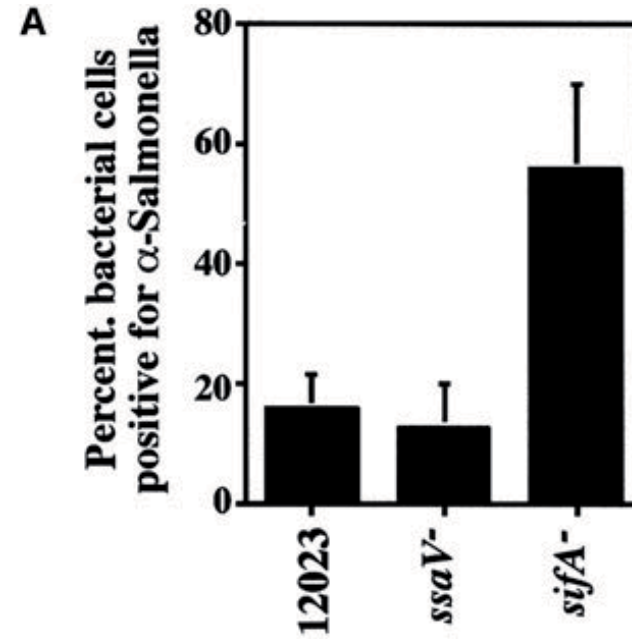
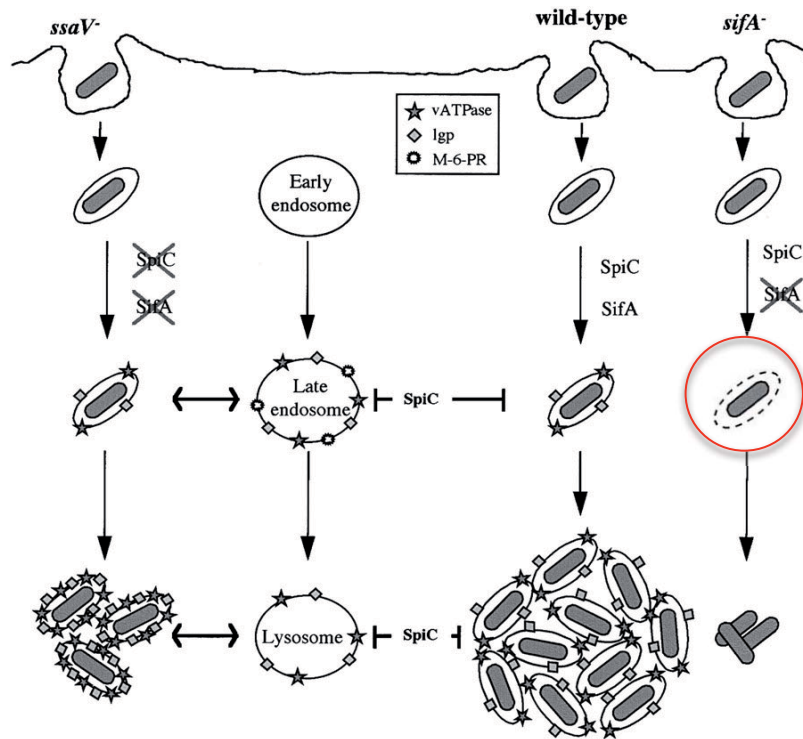
1 – **SCV précoce**: SopE et l'inositol phosphatase SopB sont nécessaires au recrutement de Rab5 qui lie la PI3K Vps34 requise pour le recrutement de LAMP-1 (Mallo GV et coll. 2008. J. Cell Biol., 182:741-752). Vps34 génère du Pi(3)p à la membrane de SVC qui est nécessaire au recrutement de EEA-1 (Steele-Mortimer O. 2008. Curr. Opin. Microbiol., 11:38-45)

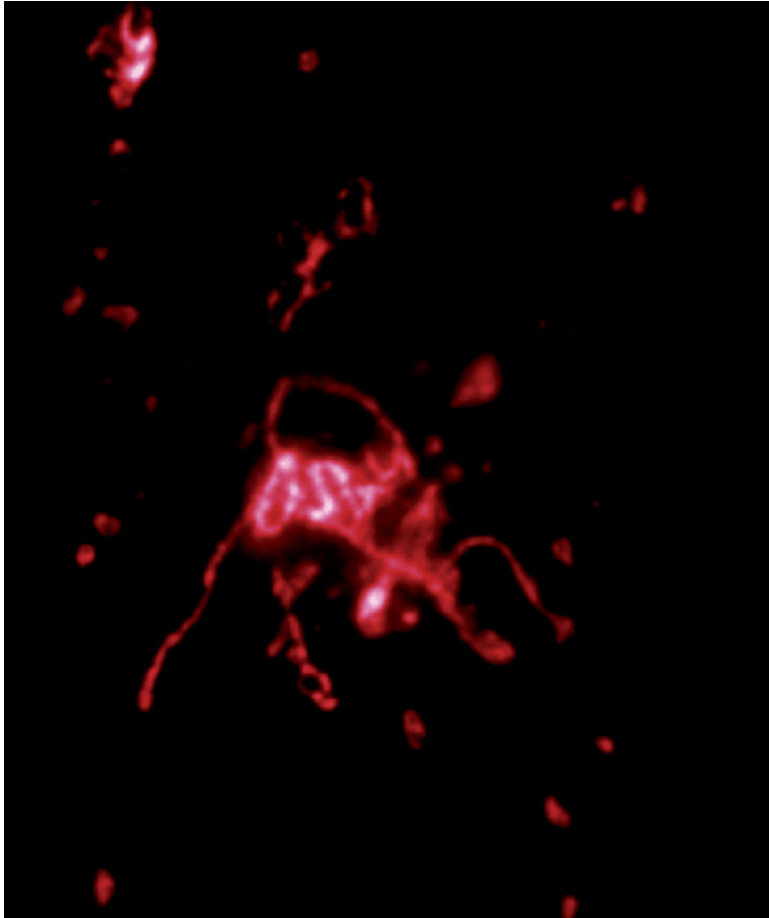
2 – **SCV intermédiaire/tardif**: SopB recrute la protéine de tri Nexin-1 (SNX-1) qui contribue à la disparition de SCV des marqueurs LE/Lys comme le récepteur au mannose-6-phosphate (Bujny MV et coll. 2008. J. Cell Sci., 121:2027-2036). SopB active Akt qui désactive le Rab14-GAP, AS160. Rab14 activé peut ainsi augmenter la multiplication intracellulaire de Salmonella en retardant la fusion lysosomale au niveau des SCV (Kuijl C et coll. 2007. Nature, 450:725-730).

SopB joue un rôle majeur dans la déviation de la voie de maturation de SCV de la voie endosomale classique.

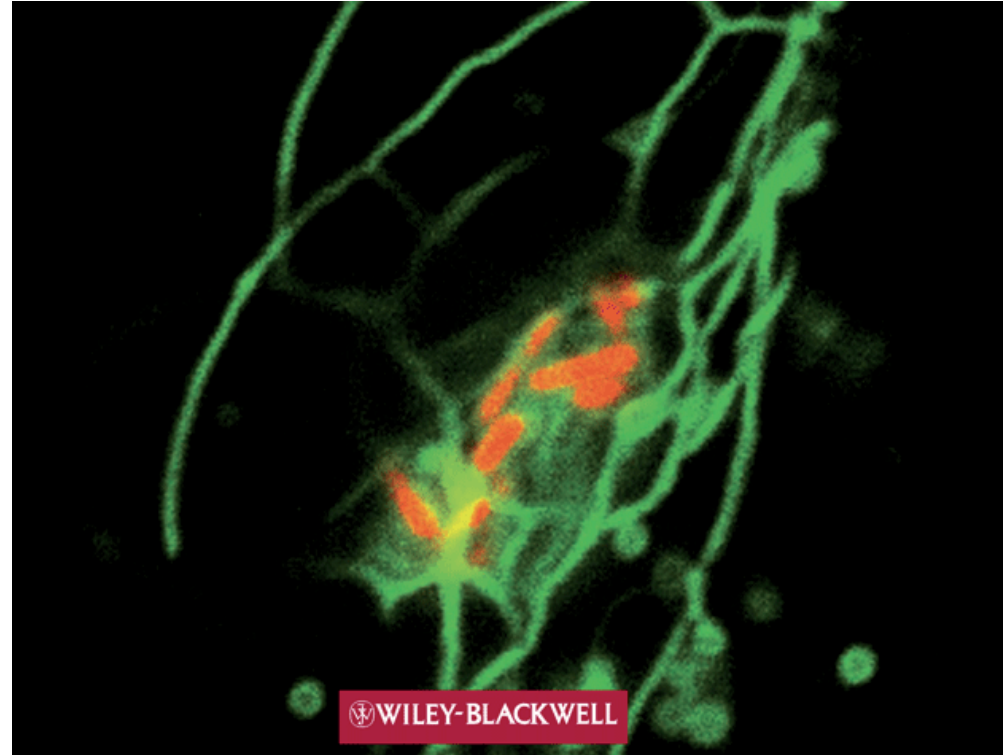
Salmonella maintains the integrity of its intracellular vacuole through the action of SifA

Carmen R.Beuzón, Stéphane Méresse¹,
 Kate E.Unsworth, Javier Ruiz-Albert,
 Steve Garvis, Scott R.Waterman,
 Timothy A.Ryder², Emmanuel Boucrot¹
 and David W.Holden³





Marquage Lysosomal glycoprotein 1
Suvarnapunya & Stein, 2005. Microbiology



NPC1-eGFP 9 h après invasion par *Salmonella typhimurium*
Drecktrah et coll. 2008. Traffic, 9:2117-2129.

De SCV à Sif

Maturation et élongation/tubulation de SCV (2) Tubulation et formation des Sif (*Salmonella*-induced filaments)

Au cours de sa maturation, SCV migre vers la région périnucléaire en partie grâce au recrutement de Rab7-interacting lysosomal protein (RILP) qui à son tour s'associe avec la dynéine (Ramsden AE et coll. 2007. Trends Microbiol., 15:516-524).

Cette proximité de la région périnucléaire, donc du ER et du Golgi, pourrait faciliter le recrutement de matériel membranaire en déroutant à son profit le trafic vésiculaire issu de ces deux organites.

SifA, SseG et SseF sont des effecteurs nécessaires au reroutage du transport exocytique vers SCV (Kuhle V et coll. 2006. Traffic, 7:716-730).

- SseG et SseF pourraient maintenir SCV dans la région périnucléaire en formant un complexe fonctionnel qui accroche SCV au Golgi ou manipule la fonction motrice de la dynéine (Ramsden et coll. 2007)

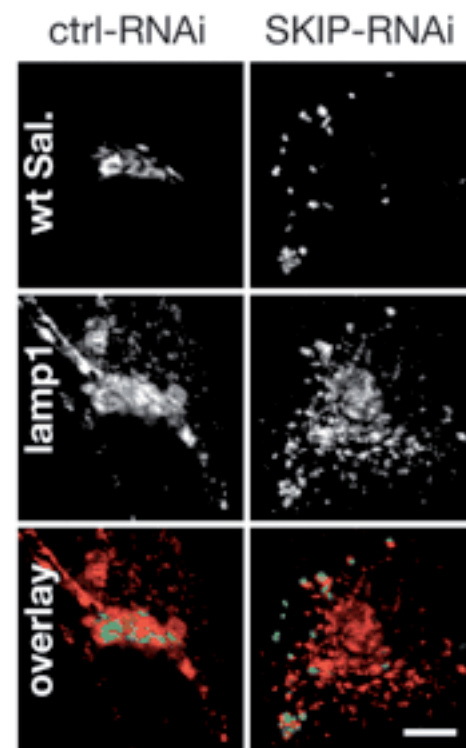
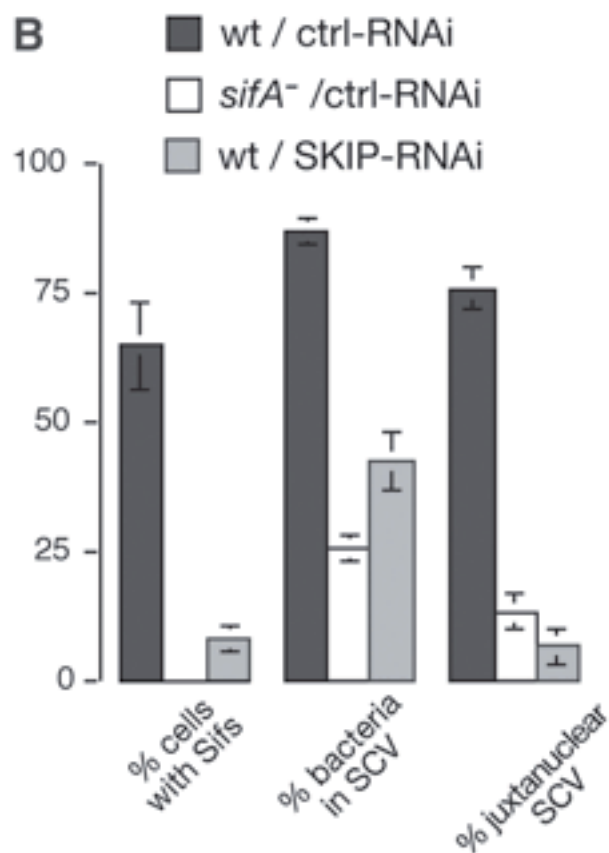
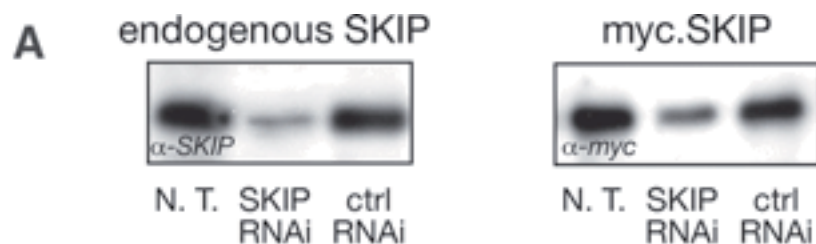
- En contraste, SifA lie SKIP (SifA & kinesin interacting protein) pour réguler négativement le recrutement vers SCV de la kinésine induisant un mouvement vers les extrémités + des microtubules (Henri T et coll. 2006. PNAS, 103:13497-13502; Boucrot E et coll. 2005. Science, 308:1174-1178)

Plusieurs heures après l'infection, un réseau d'actine s'assemble autour de SCV. Sa stabilisation est due à SipA et à une série d'autres effecteurs agissant comme stabilisateurs (SteC, SseI) (Brawn LC et coll. 2007. Cell Host & Microbe, 1:63-75) ou comme inhibiteurs (SspH2, SpvB)

The Intracellular Fate of *Salmonella* Depends on the Recruitment of Kinesin

Emmanuel Boucrot,¹ Thomas Henry,¹ Jean-Paul Borg,²
Jean-Pierre Gorvel,¹ Stéphane Méresse^{1*}

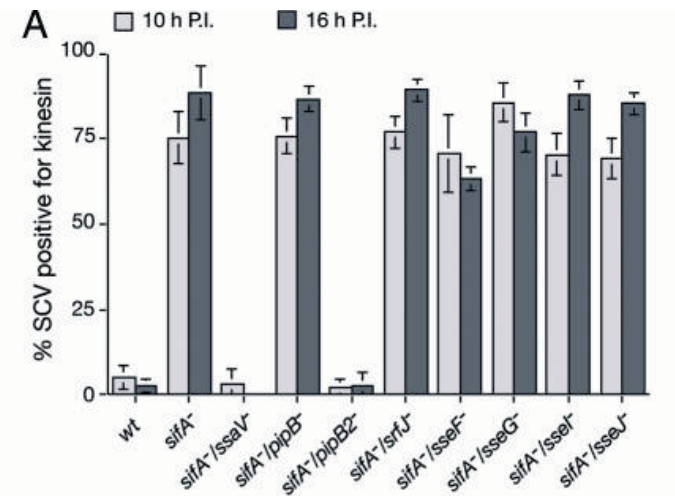
20 MAY 2005 VOL 308 SCIENCE www.sciencemag.org



The Salmonella effector protein PipB2 is a linker for kinesin-1

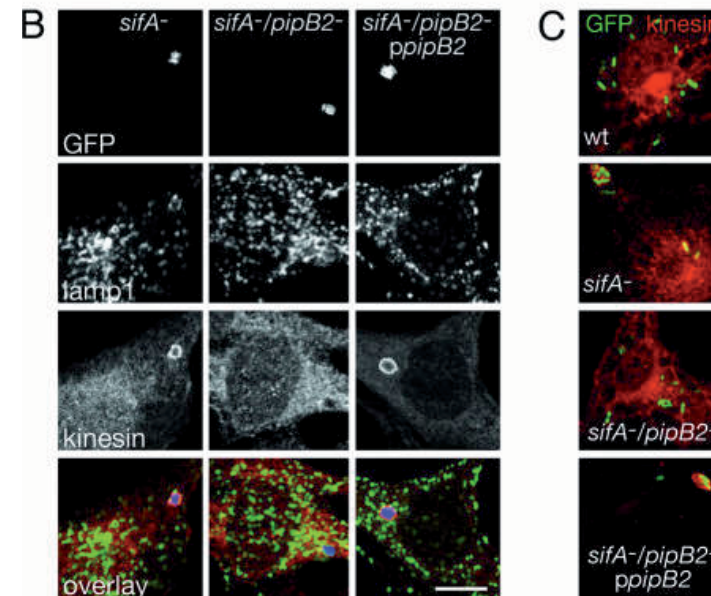
Thomas Henry*, Carole Couillault*, Patrick Rockenfeller*, Emmanuel Boucrot*, Audrey Dumont*, Nina Schroeder*, Aurélie Hermant†, Leigh A. Knodler‡, Patrick Lecine†, Olivia Steele-Mortimer

PNAS | September 5, 2006 | vol. 103 | no. 36 | 13497–13502

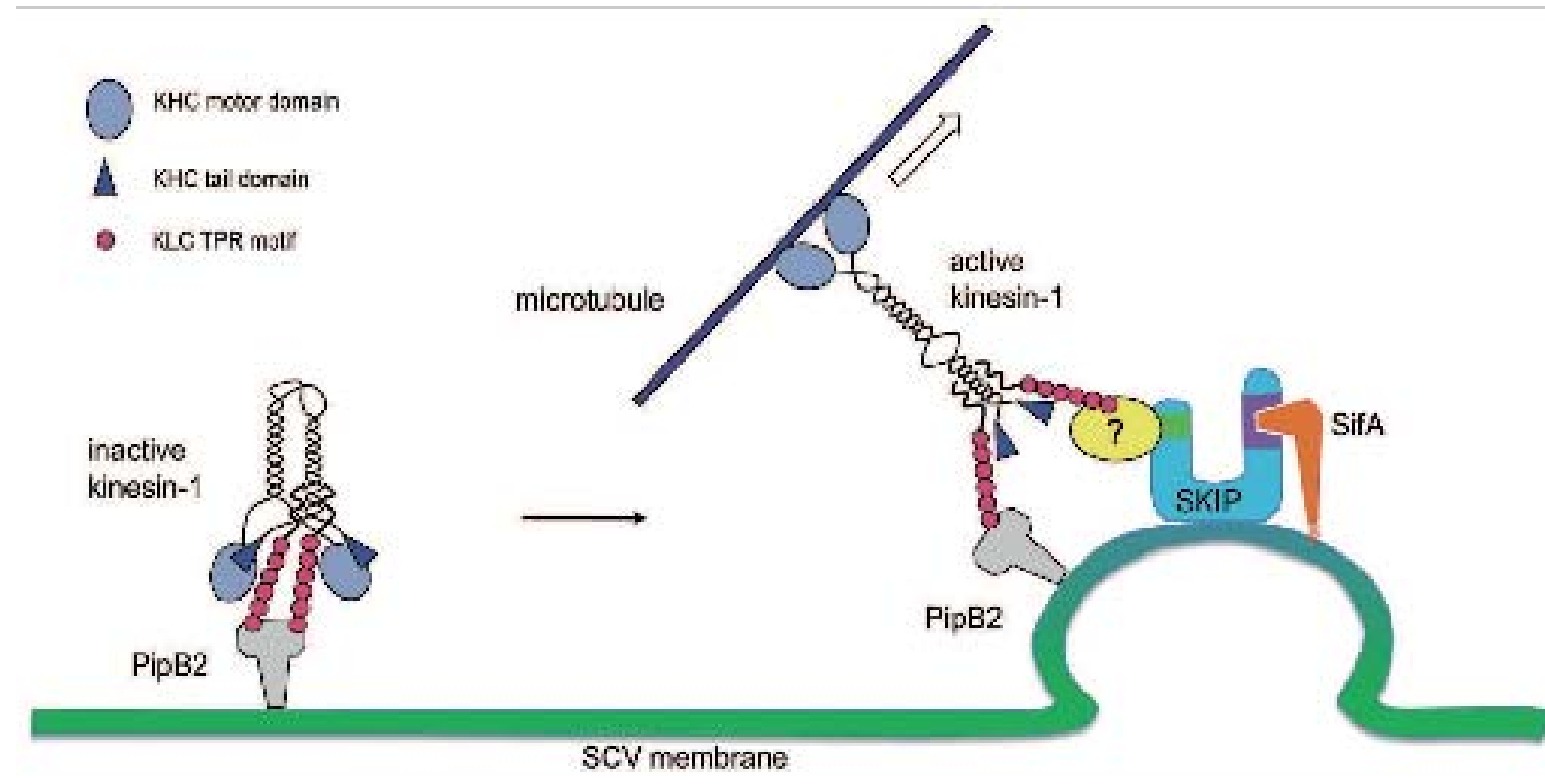


L'effecteur injecté par Spi2, PipB2 interagit avec la chaîne légère de la kinésine, le moteur moléculaire qui gouverne le transport antérograde des vésicules le long des microtubules.

PipB2 est recruté à la membrane de SCV.



Un modèle du recrutement / régulation de la kinésine-1 par les effecteurs de *Salmonella*

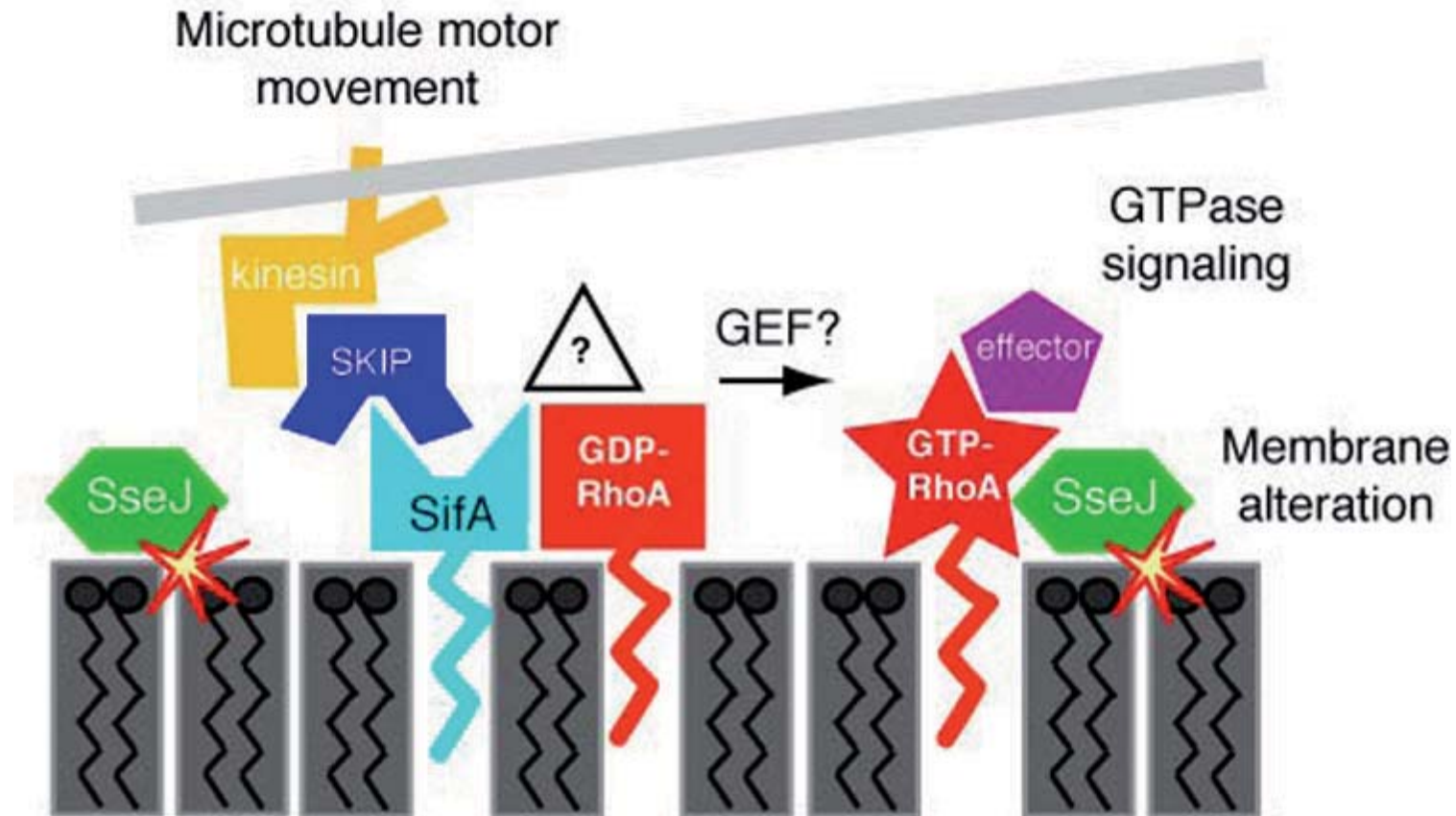


PipB2 recrute la kinésine-1 directement à la membrane de SCV grâce à une interaction directe avec le domaine KLT TRR, chaîne légère (gauche).

L'activation de la kinésine-1 n'est pas déclenchée par cette interaction, mais requiert la liaison additionnelle de SKIP, dont le PH-domaine interagit avec SifA (droite). L'activation de la kinésine-1 liée à SCV entraîne son engagement avec les microtubules. Alors que PipB2 se lie directement à kinésine-1, une autre protéine adaptatrice (ou un complexe) est nécessaire (jaune) pour assurer l'interaction entre le RUN-domaine de SKIP et KLC (Leone P & Méresse S. 2011. *Virulence*, 2:63-66)

Coopérativité de SifA, SseJ, SKIP et Rho-GTPases pour assurer la tubulation membranaire des endosomes

Ohlson MB et coll. 2008. Cell Host & Microbe

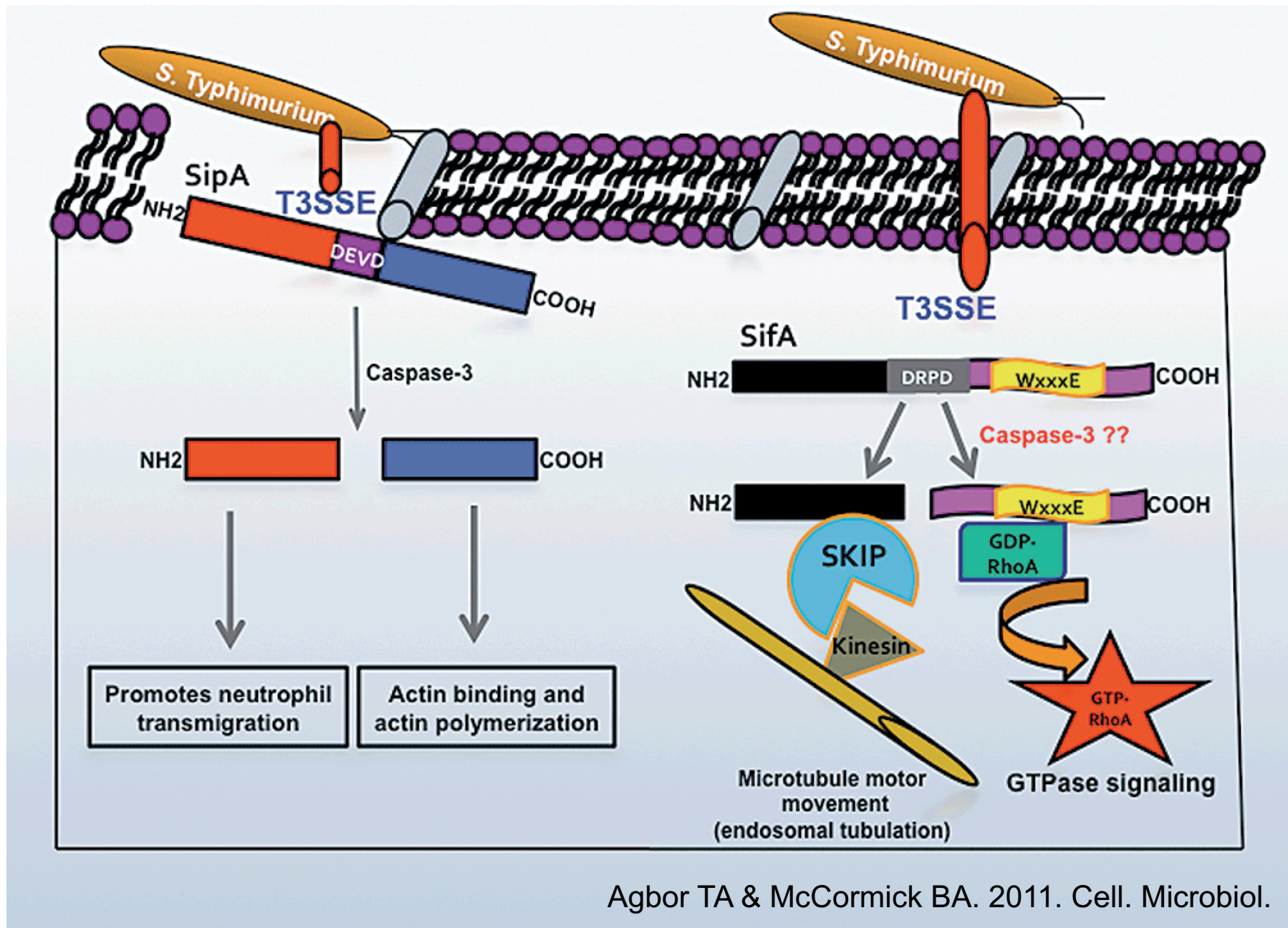


SifA est essentiel pour assurer la tubulation du phagosome de *Salmonella* (SCV) et lie la protéine de liaison à la kinésine SKIP. L'expression de SifA et SseJ induit la tubulation des endosomes cellulaires comme *Salmonella*. RhoA,B et C liés au GTP induisent aussi la tubulation des endosomes ! Lorsque co-exprimés avec SseJ. Ceci indique que SifA exprime une fonction Rho-GTP-like. ou active Rho.

La structure de SifA en association avec le PH domain de SKIP montre deux domaines distincts:

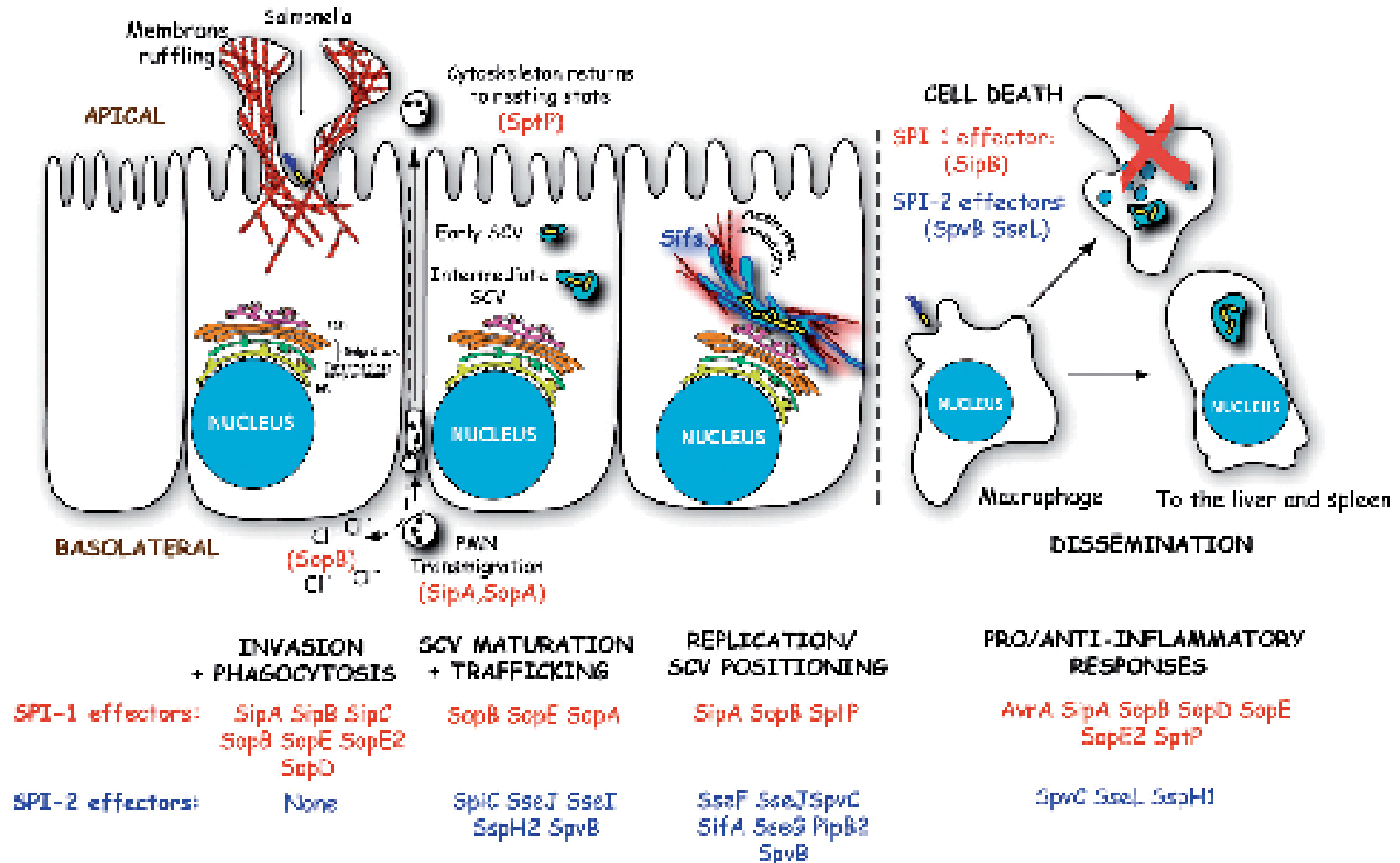
Un domaine N-terminal qui lie SKIP

Un domaine C-terminal homologue à SopE qui est une protéine Rho-GEF...



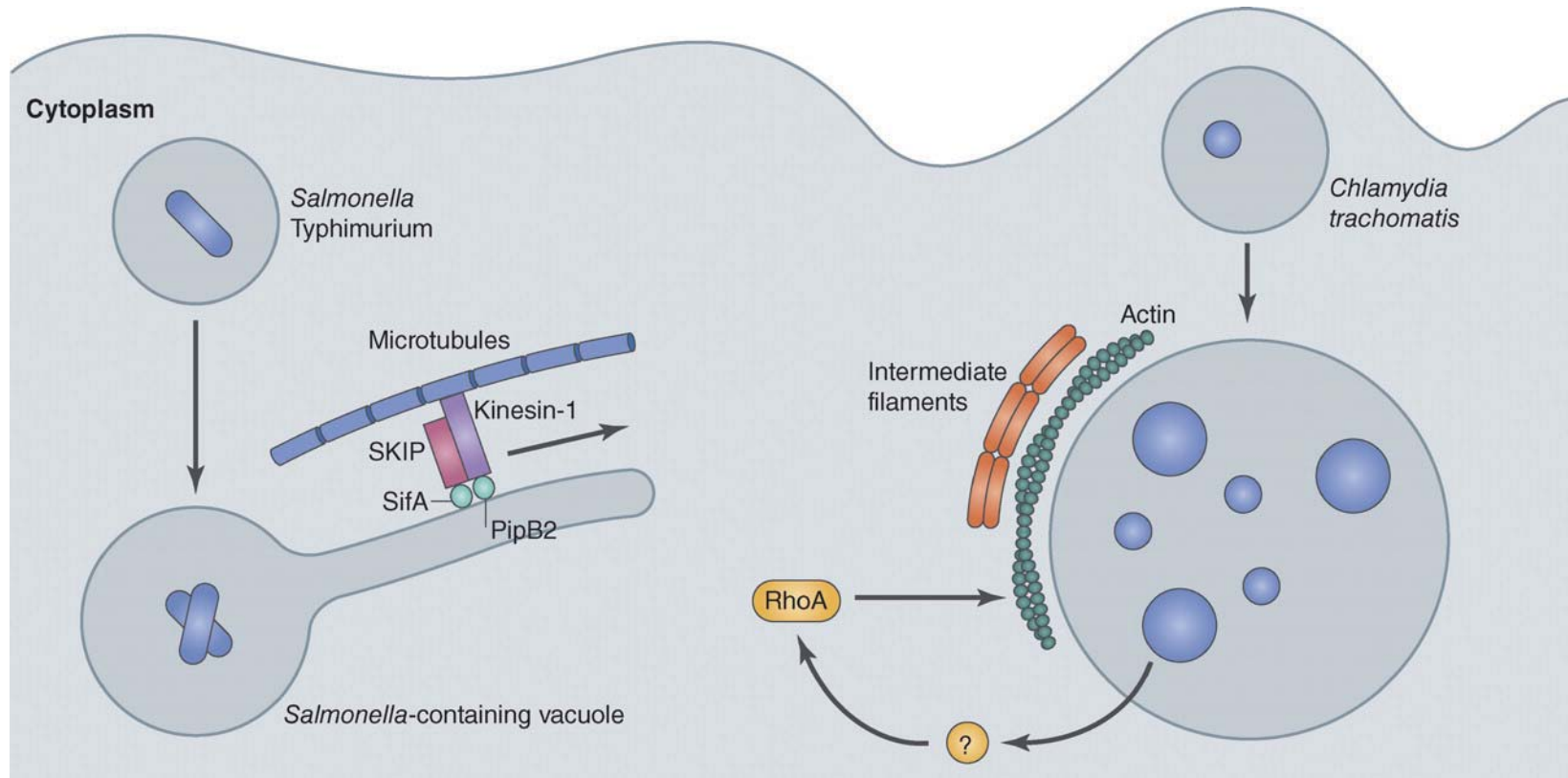
Agbor TA & McCormick BA. 2011. Cell. Microbiol.

Subversion de la barrière épithéliale intestinale par *Salmonella*



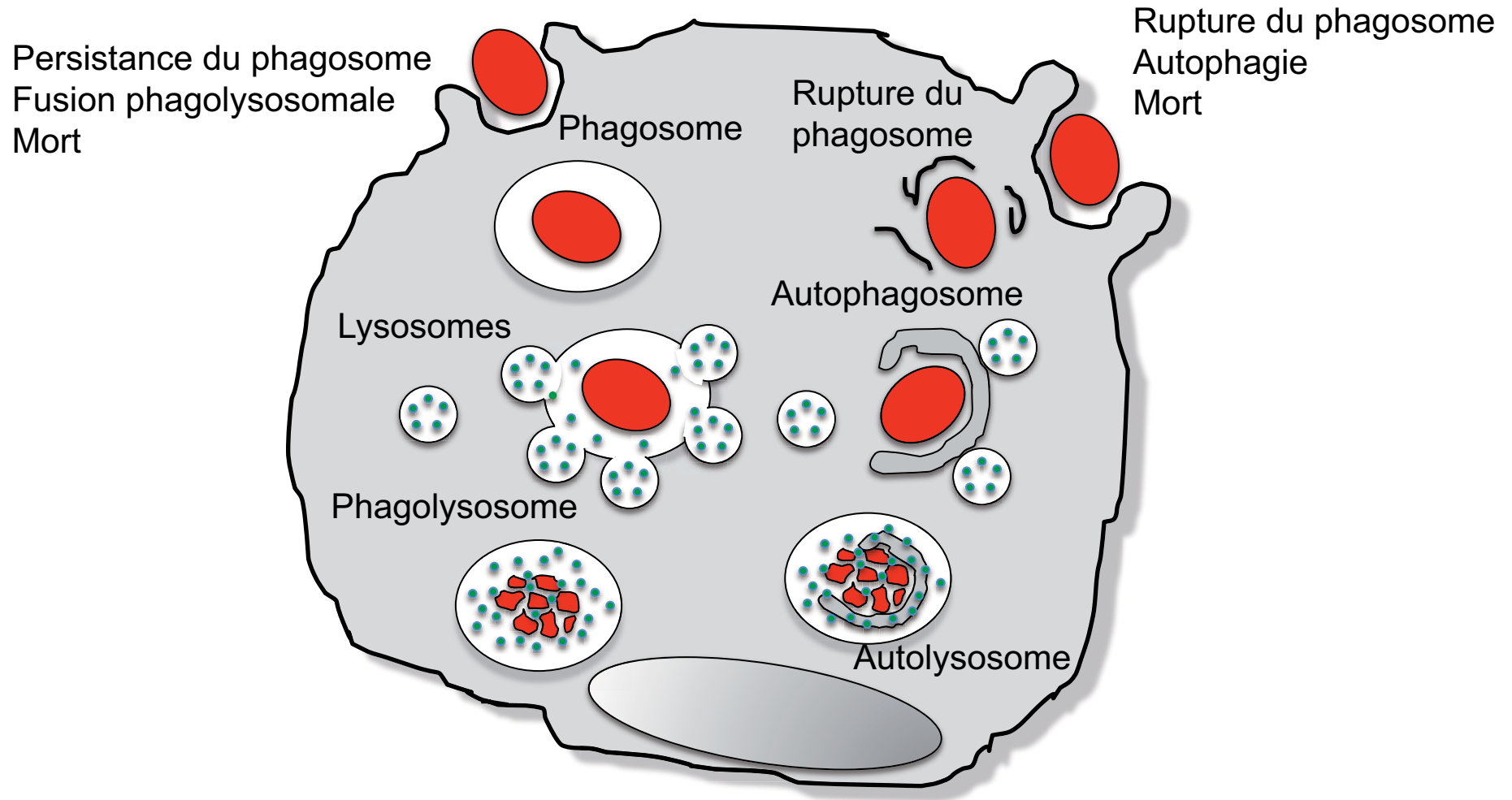
Current Opinion in Microbiology

Intracellular bacteria subvert the eukaryotic cytoskeleton to create a replicative niche.

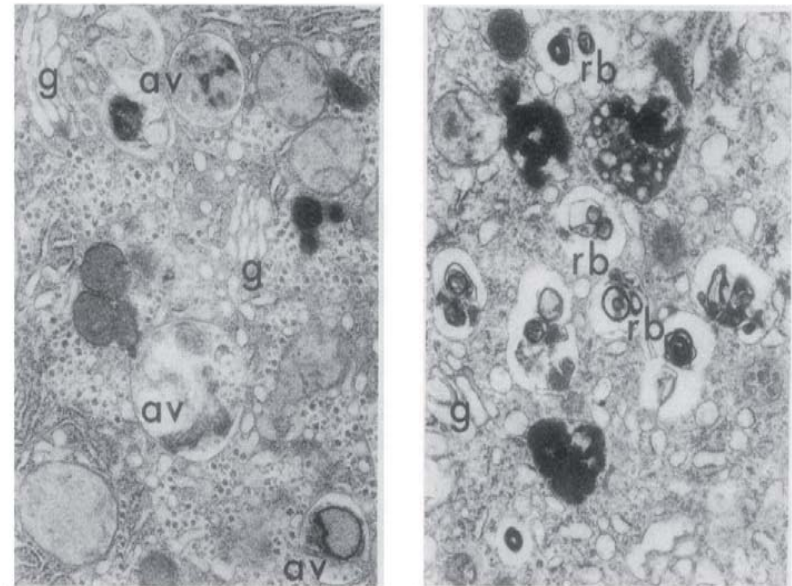
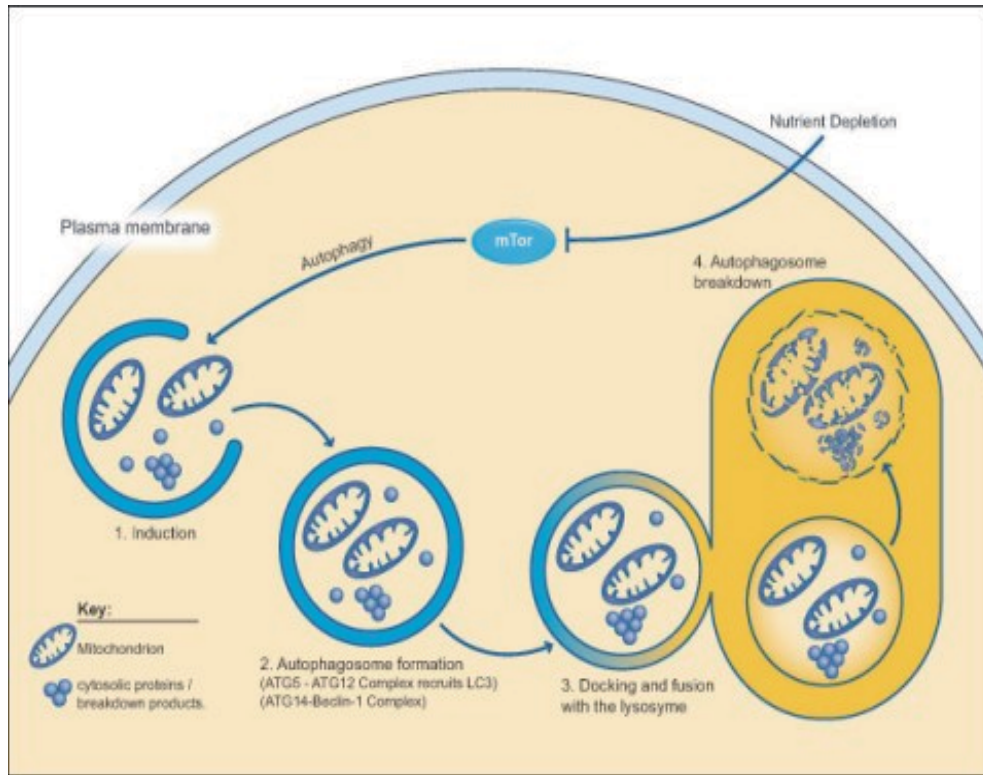


Alix E et al. J Cell Biol doi:10.1083/jcb.201105019

Bactéries intracellulaires: « chronique d'une mort annoncée »



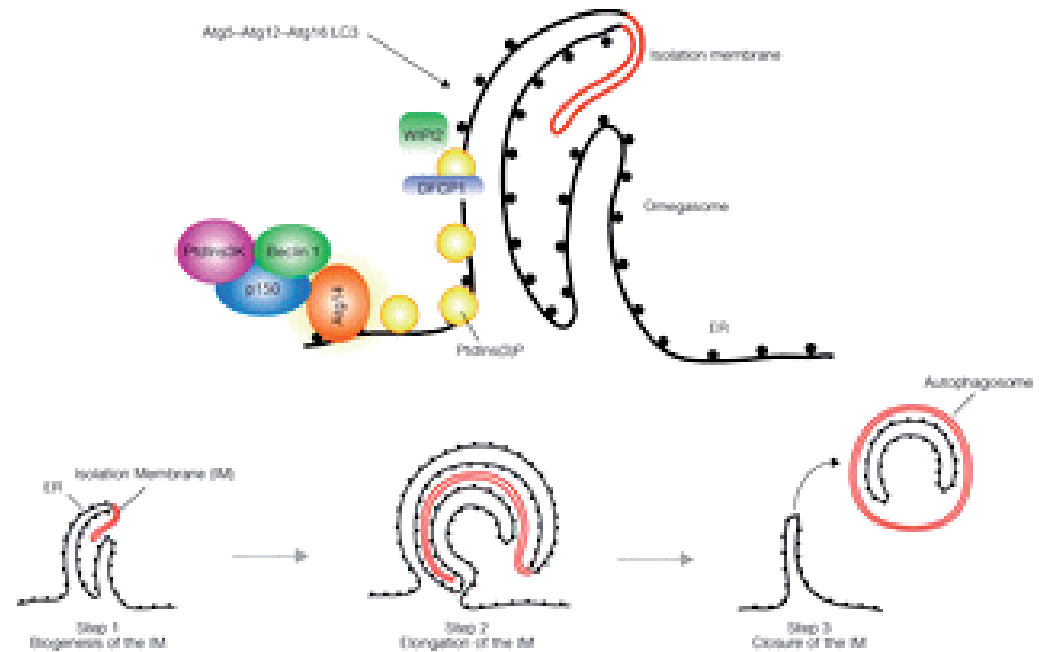
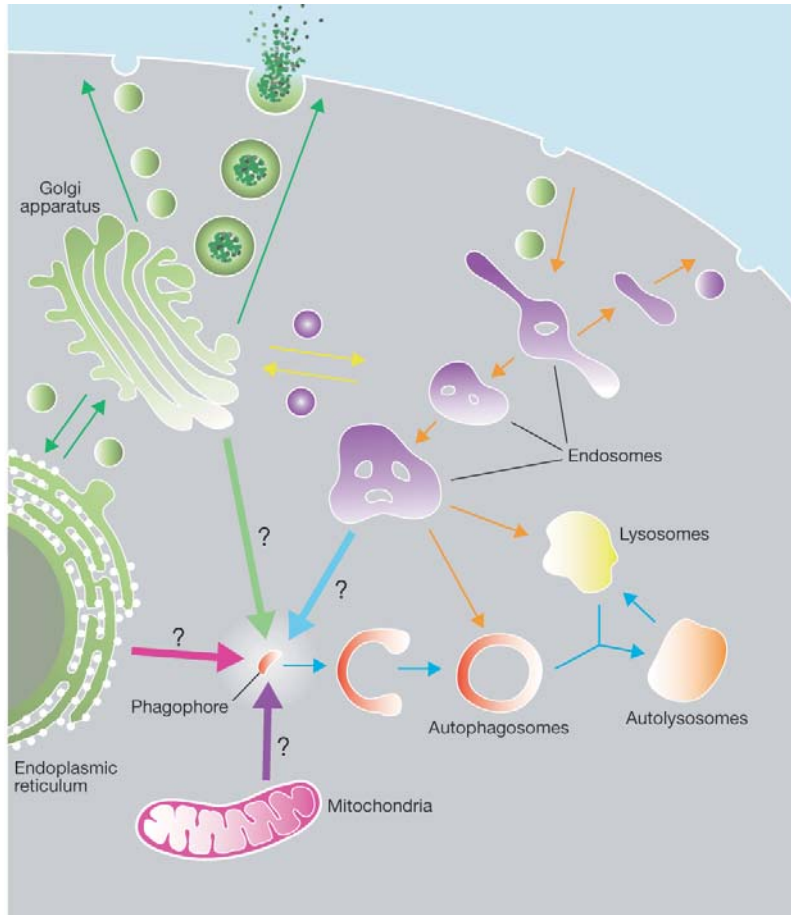
Quatre étapes de l'autophagie



Vacuoles d'autophagie (foie)

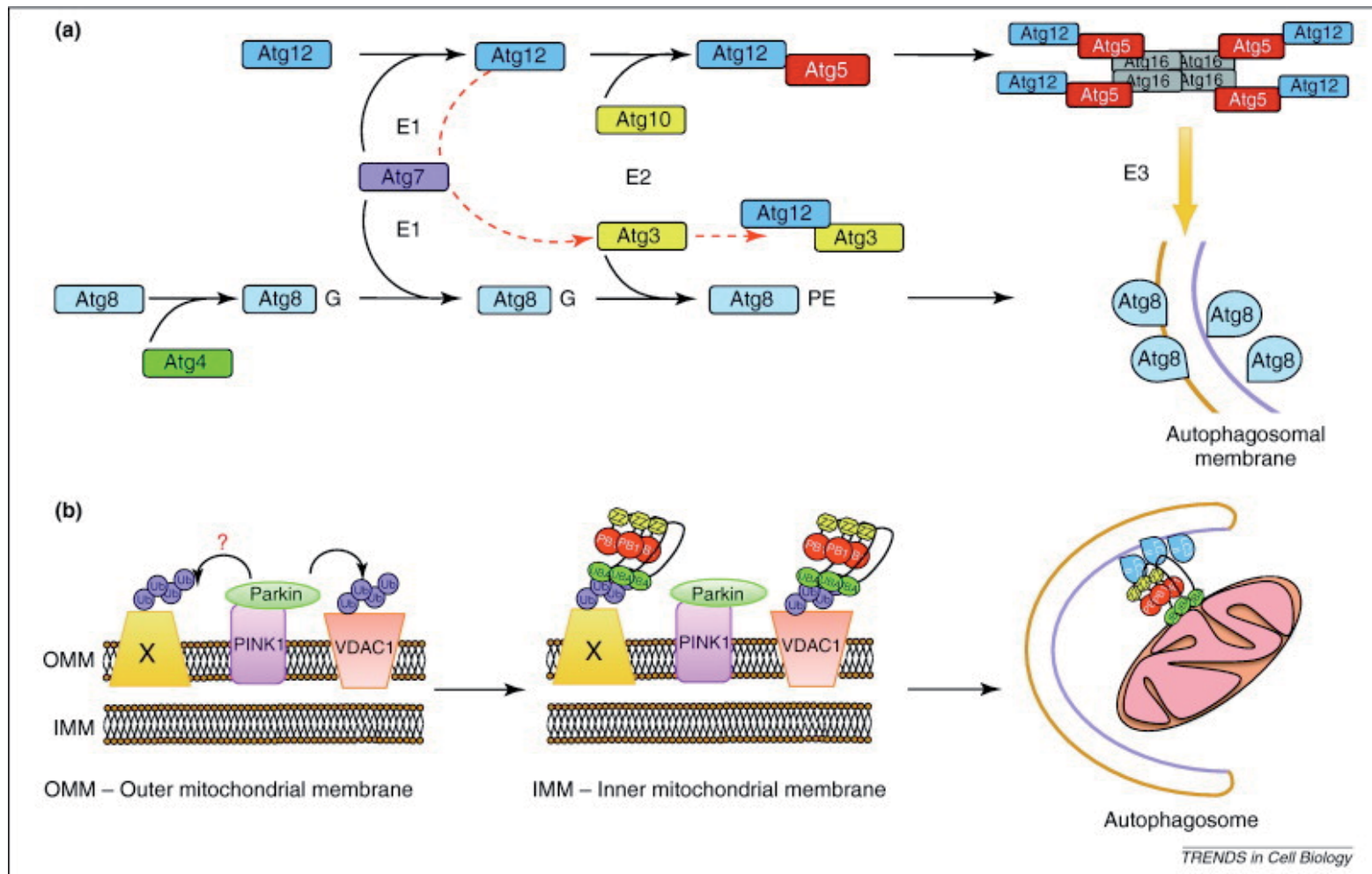
- 1 – Induction: faisant suite à un stimulus interne ou externe (déplétion en nutriments, ischémie) mTOR est inhibé, déclenchant l'autophagie (Atg1 /13 impliqués chez la levure)
- 2 – Formation de l'autophagosome: des protéines cytosoliques, des organelles, voire des microorganismes sont séquestrés par une double membrane dont l'origine est encore incertaine. La formation de cette vésicule est déterminée/coordonnée par des protéines Atg, en particulier Atg5 et Atg12 qui assurent le recrutement de LCR3 (Atg8). Beclin1 forme un complexe avec Atg14.
- 3 – « Docking » et fusion du lysosome
- 4 – Dégradation de la vésicule d'autophagie. Rôle de Lamp2

Sources potentielles de membranes pour les autophagosomes: Golgi, ER, mitochondries



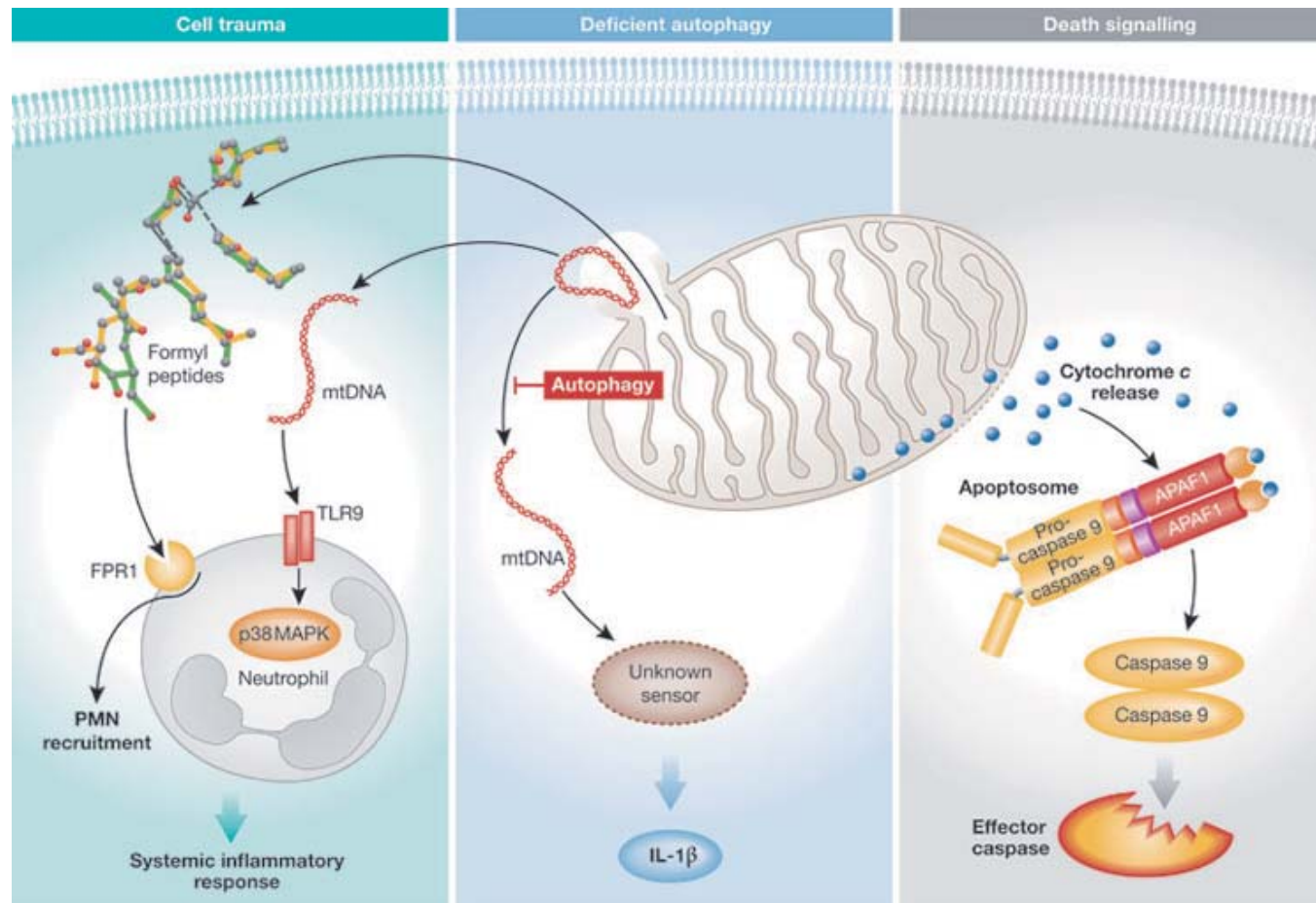
Modèle de recrutement des protéines Atg et DFCP1 aux membranes dérivées du ER et formation de l'autophagosome

(a) PtdIns(3)P is generated by the Vps34 kinase complex which is recruited to this site by Atg14. PtdIns(3)P is then recognized by the effectors DFCP1 and WIPI2. The phagophore shown in red extends from this PtdIns(3)P-rich structure



Regulation of autophagy by ubiquitylation. (a) The Ub-like proteins Atg8 (LC3/GABARAP in higher eukaryotes), Atg5 and Atg12 all undergo a Ub-like conjugation via the action of E1-(Atg7) and E2 (Atg10, Atg3)-like enzymes. Atg8 is primed by C-terminal cleavage by the protease Atg4, which exposes a C-terminal glycine and is then conjugated to PE. Atg12 is conjugated directly to Atg5 and forms a complex with Atg16 that possesses E3-like activity, driving Atg8-PE incorporation into expanding autophagosomes. An alternative conjugation is reported between the E2-like enzyme Atg3 and Atg12, which requires Atg7 (red broken line). (b) The E3-ligase Parkin is recruited to damaged mitochondria via the serine/threonine kinase PINK1 where it can ubiquitylate the target substrate VDAC1 (voltage dependent anion channel 1) with K27- and K63-linked polyUb chains. These chains serve to recruit p62/SQSTM1 and incorporate damaged mitochondria into autophagosomes. However, recent evidence suggests that VDAC1 is dispensable for Parkin mediated-mitochondrial clearance and that there might be other ubiquitylated proteins (Protein X) that recruit p62 (PB1, Phox and Bem1p domain; Znf, Zinc Finger domain; UBA, Ubiquitin-associated domain).

Mitochondries et immunité innée



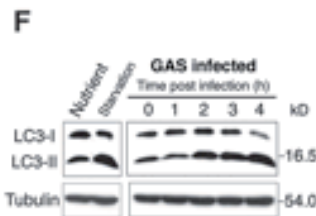
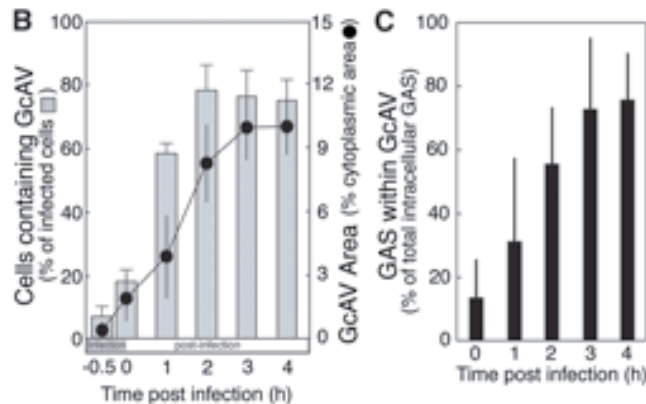
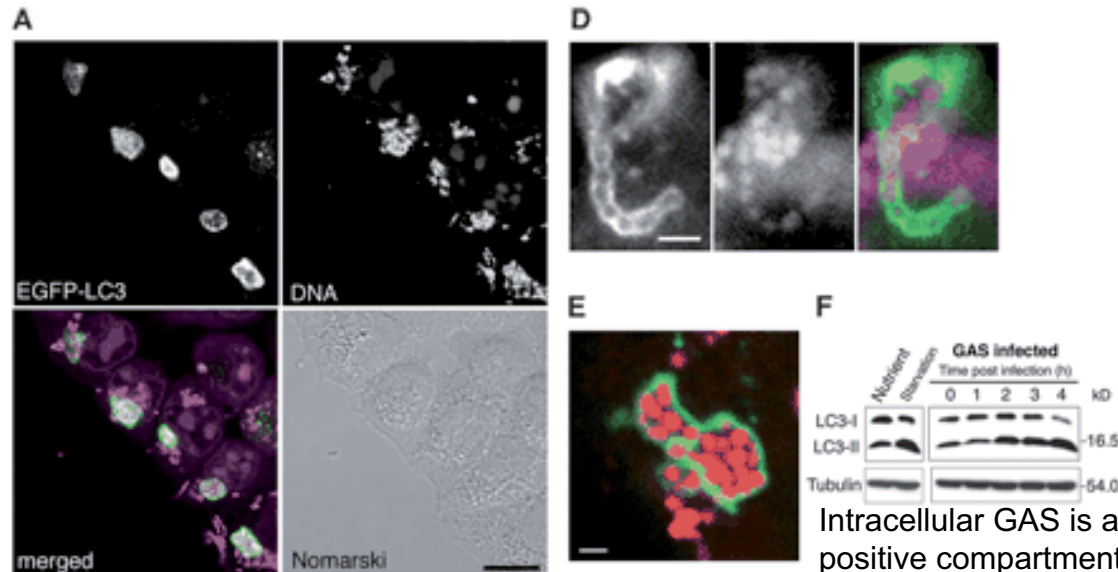
Arnoult et coll. 2011. EMBO Reports

Release of mitochondrial DAMPs triggers cell death and inflammatory pathways. (A) Severe trauma can induce the release of mitochondrial DNA (mtDNA), which is detected by TLR9 located on the neutrophil surface, and thus activates p38 MAP kinase. N-formyl peptides are released by mitochondria and recruit polymorphonuclear neutrophils (PMNs) by binding to the formyl-peptide receptor 1 (FPR1) expressed on their surface. (B) Autophagy-deficient cells accumulate defective mitochondria, which release mtDNA into the cytosol, triggering activation of the inflammasome through an undefined cytosolic sensor. (C) Cell death signals induce the release of cytochrome c into the cytosol, leading to the recruitment of APAF1 and pro-caspase 9 into a multiprotein complex known as the apoptosome. After activation, caspase 9 induces apoptosis by cleaving effector caspases. DAMP, danger-associated molecular pattern; IL, interleukin; MAPK, mitogen-activated protein kinase; TLR, Toll-like receptor.

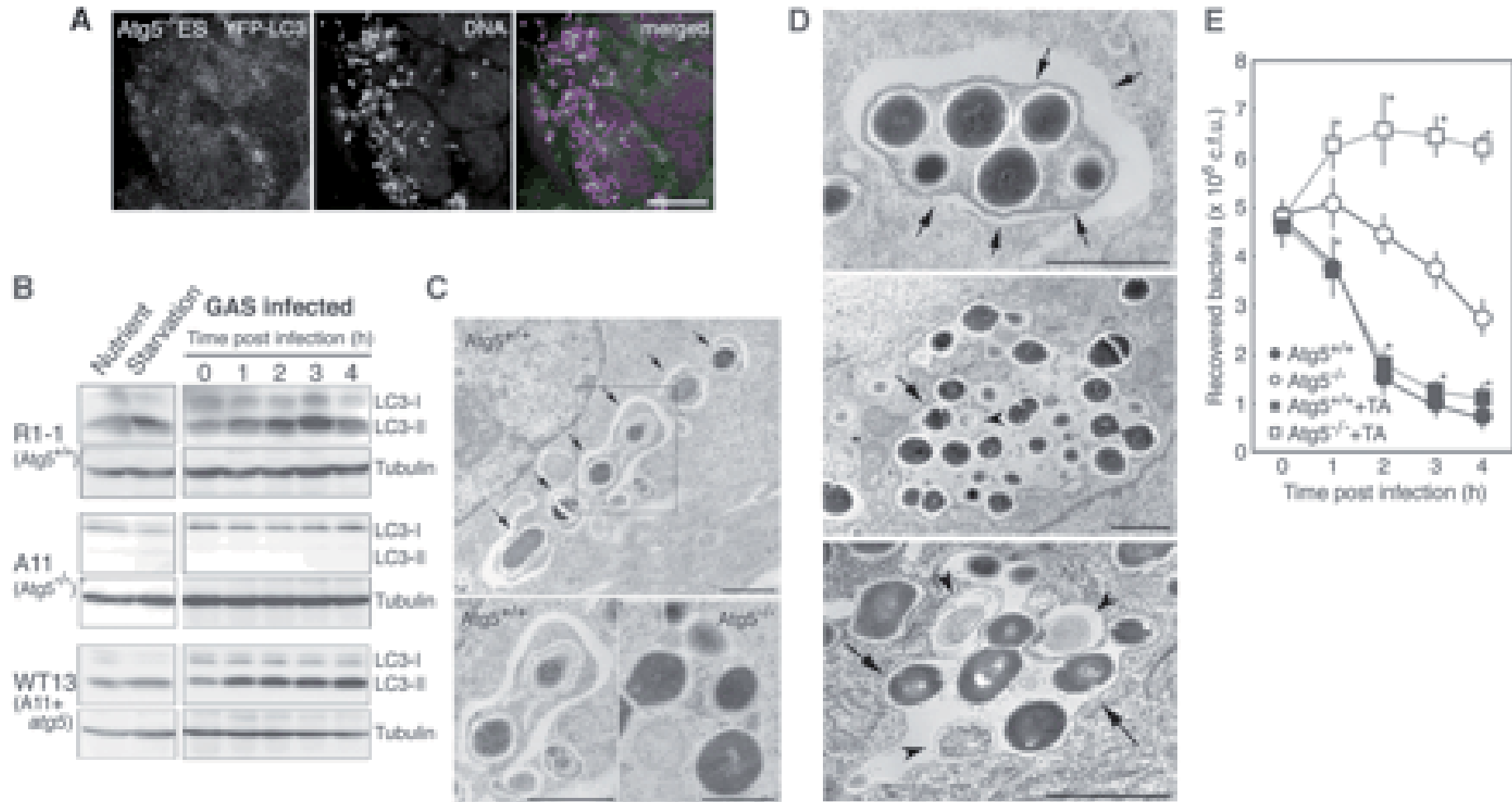
Autophagy Defends Cells Against Invading Group A *Streptococcus*

www.sciencemag.org SCIENCE VOL 306 5 NOVEMBER 2004

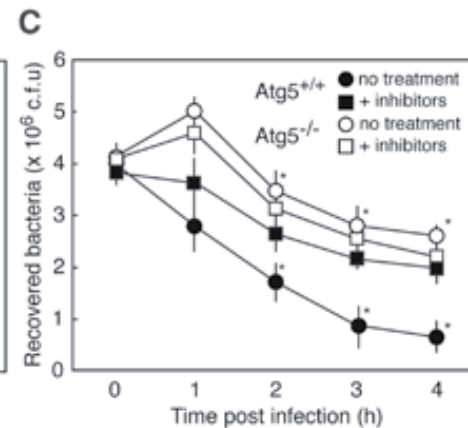
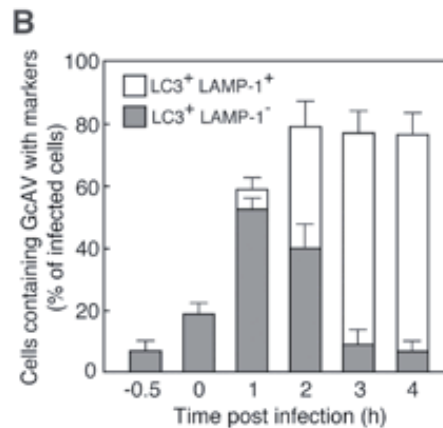
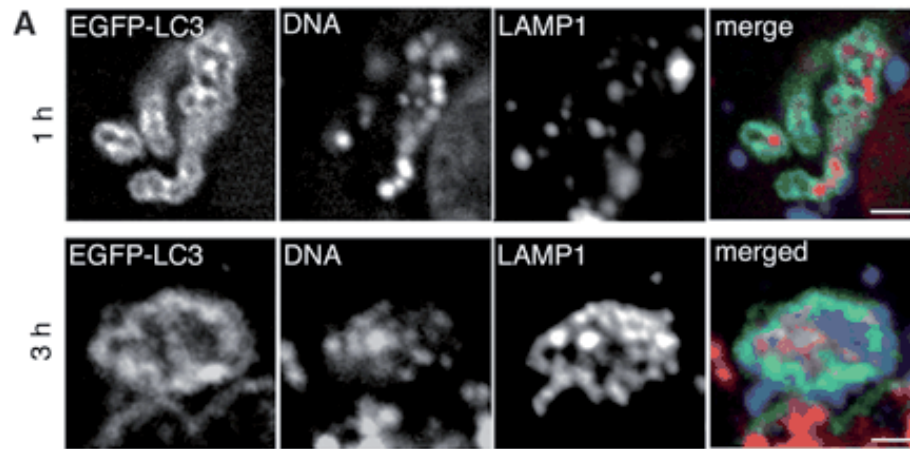
Ichiro Nakagawa,^{1,3*} Atsuo Amano,^{2,4} Noboru Mizushima,^{3,5}
 Akitsugu Yamamoto,⁶ Hitomi Yamaguchi,⁷ Takahiro Kamimoto,⁷
 Atsuki Nara,^{6,7} Junko Funao,¹ Masanobu Nakata,¹ Kayoko Tsuda,⁷
 Shigeyuki Hamada,¹ Tamotsu Yoshimori^{4,7*}



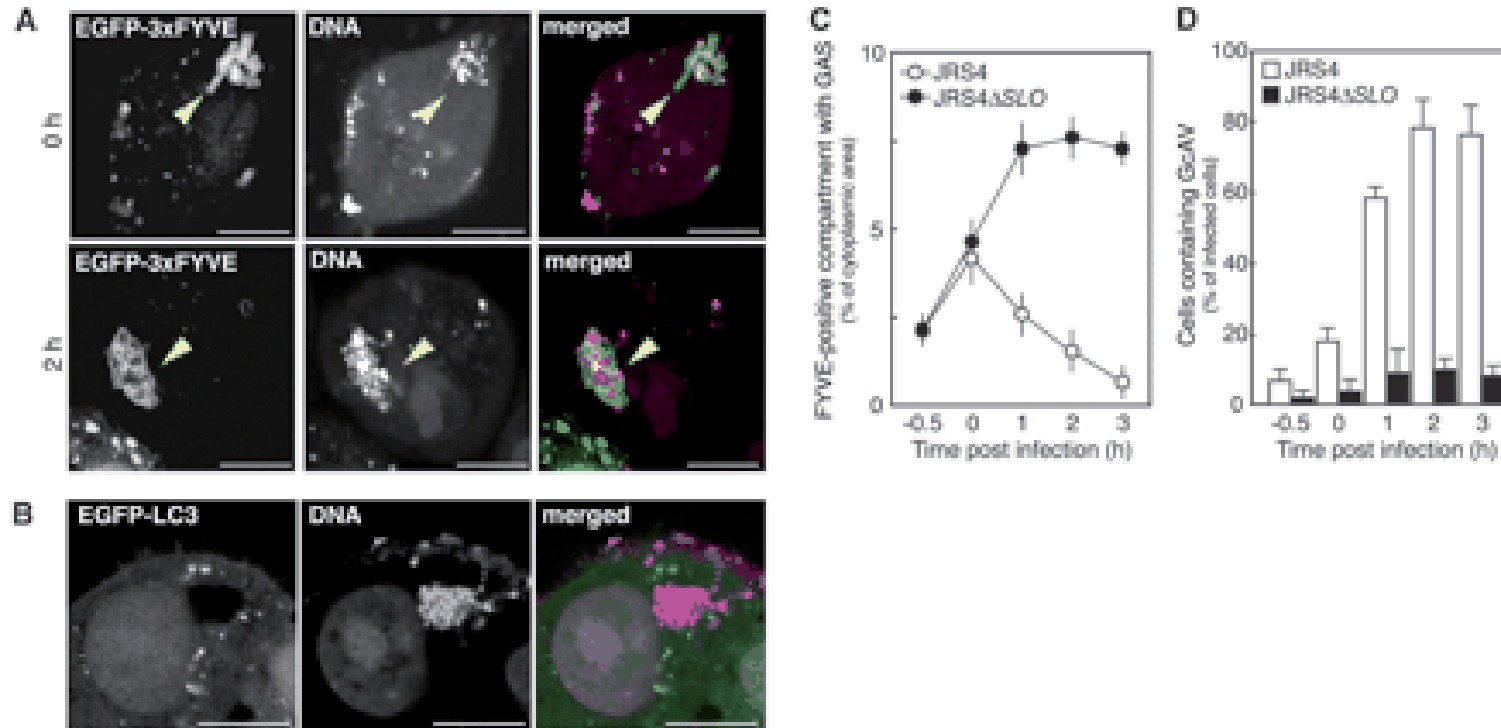
Intracellular GAS is acquired by LC3-positive compartments. (A) LC3-positive compartments (green) sequestered intracellular GAS in HeLa cells expressing enhanced green fluorescent protein (EGFP)-LC3 at 3 hours after infection. After incubating with GAS for 1 hour, infected cells were cultured for 3 hours with antibiotics to kill extracellular GAS. Cellular and bacterial DNA were stained with propidium iodide (PI, magenta). Bar, 10 μ m. (B) The number of cells bearing GcAVs (gray bars; means \pm SE, n = 20) was counted and the area of GcAVs was measured by Image-J software (black circles; means \pm SE, n = 20). The micrographs at each point are shown in fig. S1. (C) The total area of GAS within GcAVs was calculated as the percentage of total area of the invaded GAS. (D) High-resolution microscope image of a GcAV (green) and GAS (magenta) at 1 hour after infection. Bar, 2 μ m. (E) Confocal microscopic image of a GcAV at 3 hours after infection (LC3, green; DNA, red). The three-dimensional image is available as movie S1. Bar, 2 μ m. (F) Immunoblot analysis of LC3-II in GAS-infected HeLa cells. In (B) and (C), data are representative of at least three independent experiments.



Atg5 deficiency allows GAS survival within host cells. (A) Intracellular GAS were not acquired by LC3-positive compartments in Atg5-deficient ES cells at 3 hours after infection. Yellow fluorescent protein (YFP)-LC3, green; PI-stained DNA, magenta. Bar, 10 μ m. (B) LC3-II was not formed after GAS infection of Atg5^{-/-} ES cells (A11) but formed in Atg5^{+/+} (R1) and Atg5 cDNA transformant of A11 (WT13). (C) Ultrastructural observations of GAS-infected Atg5^{+/+} ES cells and Atg5^{-/-} ES cells. The lower left panel is the magnified image of the area indicated by the box in the upper panel. Arrows indicate the cisternae surrounding naked GAS. Bars, 1 μ m. (D) Ultrastructural observations of GAS-infected HeLa cells. We observed the multiple-membrane-bound compartment containing intact cytosol and GAS at 1 hour after infection (upper panel) and the single membrane-bound compartment with degraded cytosol and GAS (arrowhead) at 4 hours after infection (middle and lower panels). Arrows indicate the membranes of the compartments. Bars, 1 μ m. (E) Viability of intracellular GAS in Atg5^{+/+} (closed symbols) and Atg5^{-/-} (open symbols) cells was measured in the presence (squares) or absence (circles) of tannic acid (TA; final concentration, 0.5%) (9). Data are representative of at least three independent experiments. *P < 0.01.

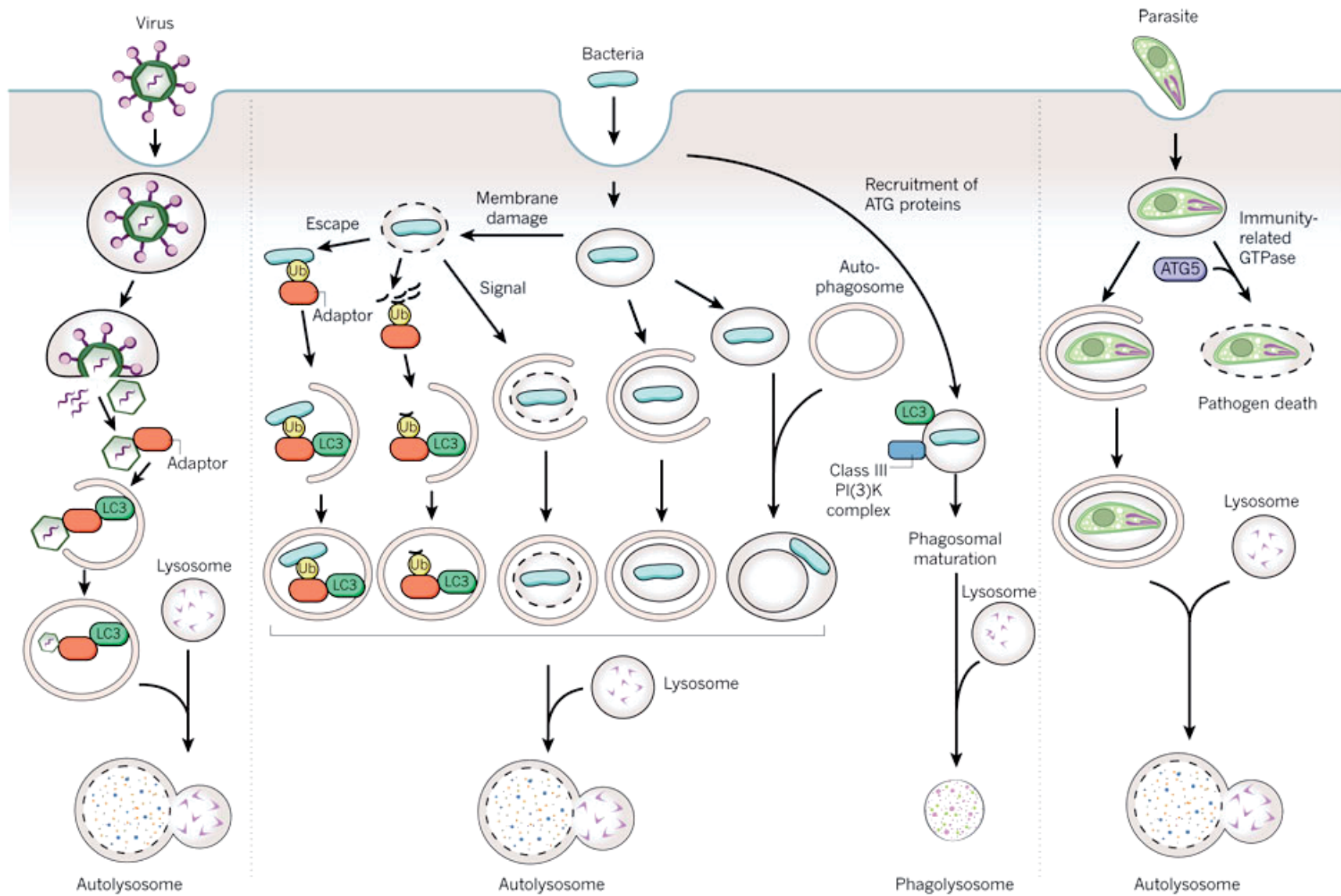


Fusion of GcAVs with lysosomes. (A) Confocal microscopic images of GAS (red)–containing LC3-positive compartments (green) fused with lysosomes (blue). After fixation, lysosomes were stained with an antibody to LAMP-1 (blue). Bars, 2 μ m. (B) Increase of GcAVs fused with lysosomes with time. After fixation, cells were stained with an antibody to LAMP-1. The numbers of cells, including LAMP-1–positive or –negative GcAVs, was counted (means \pm SE, $n = 20$). (C) Decrease of intracellular GAS in Atg5^{+/+} cells was inhibited by addition of the lysosomal enzyme inhibitors (+inhibitors; 1 mg/ml of leupeptin and 10 μ M E64d). The numbers of intracellular GAS were determined by bacterial viability assay (mean CFU \pm SE).



The hemolytic toxin (Streptolysin O; SLO)-deficient GAS cannot escape from endosomes and are not acquired by LC3-positive compartments. (A) Confocal microscopic images of GAS (magenta) and FYVE domain of EEA-1 (green)-positive endosomes in FYVE-EGFP-transfected HeLa cells with a SLO-deficient mutant of JRS4 (JRS4ΔSLO). Yellow arrowheads indicate the location of GAS in the endosomes. (B) JRS4ΔSLO (magenta) was not acquired by LC3-positive compartments. HeLa cells expressing EGFP-LC3 (green) were infected with JRS4ΔSLO for 1 hour. After fixation, cells were stained with PI (magenta). Bars, 10 μm. (C) JRS4ΔSLO failed to escape from early endosomes. FYVE-EGFP-transfected HeLa cells were infected with GAS. The area of GAS colocalized with the markers was measured by Image-J software (means ± SE, n = 20). (D) GcAVs were formed by infection of GAS JRS4 but not by JRS4ΔSLO (means ± SE, n = 20).

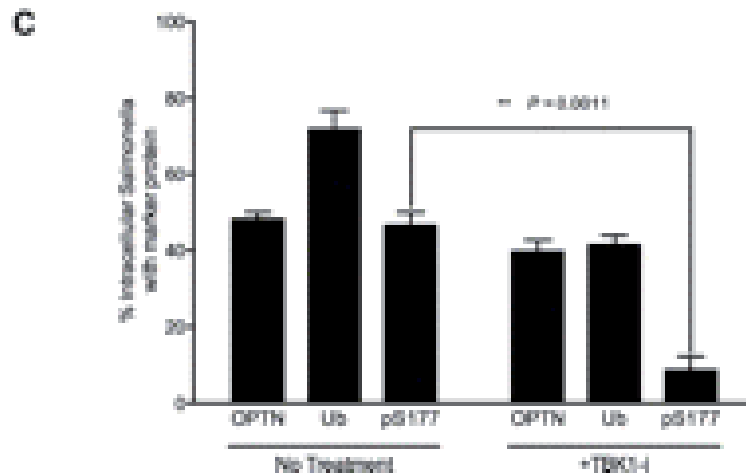
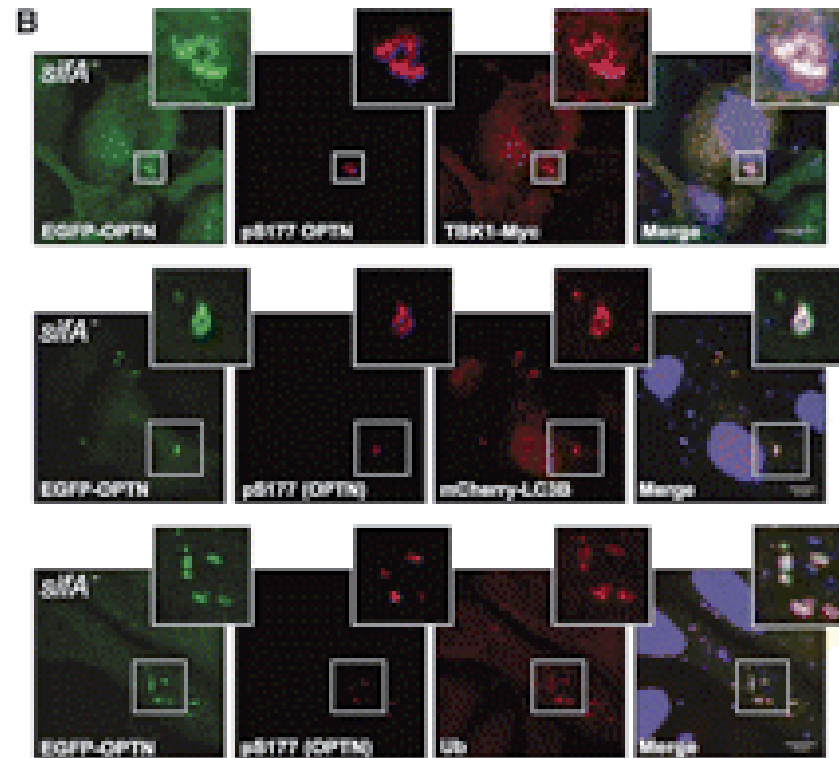
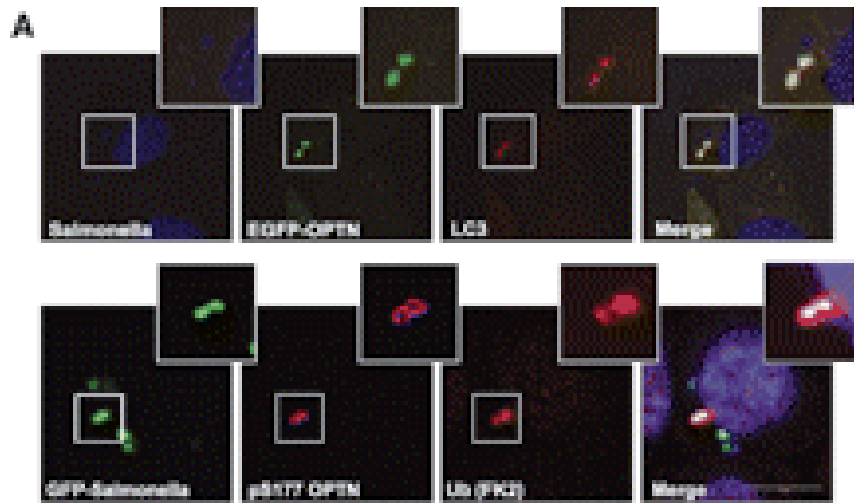
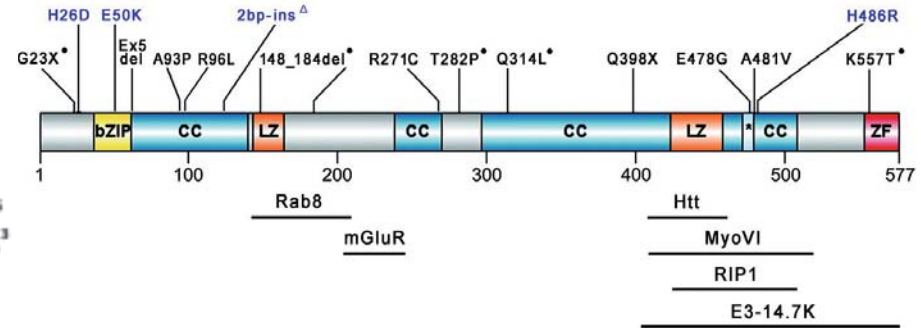
Several bacterial species, including *Rickettsia conorii*, *Listeria monocytogenes*, *Porphyromonas gingivalis*, *Brucella abortus*, and *Legionella pneumophila*, reside within double-membrane-bound compartments resembling autophagosomes after the invasion of host cells. However, the significance of this localization has not been clear. Here we have demonstrated that autophagy can play a role in bacterial invasion of host cells.



Phosphorylation of the Autophagy Receptor Optineurin Restricts *Salmonella* Growth

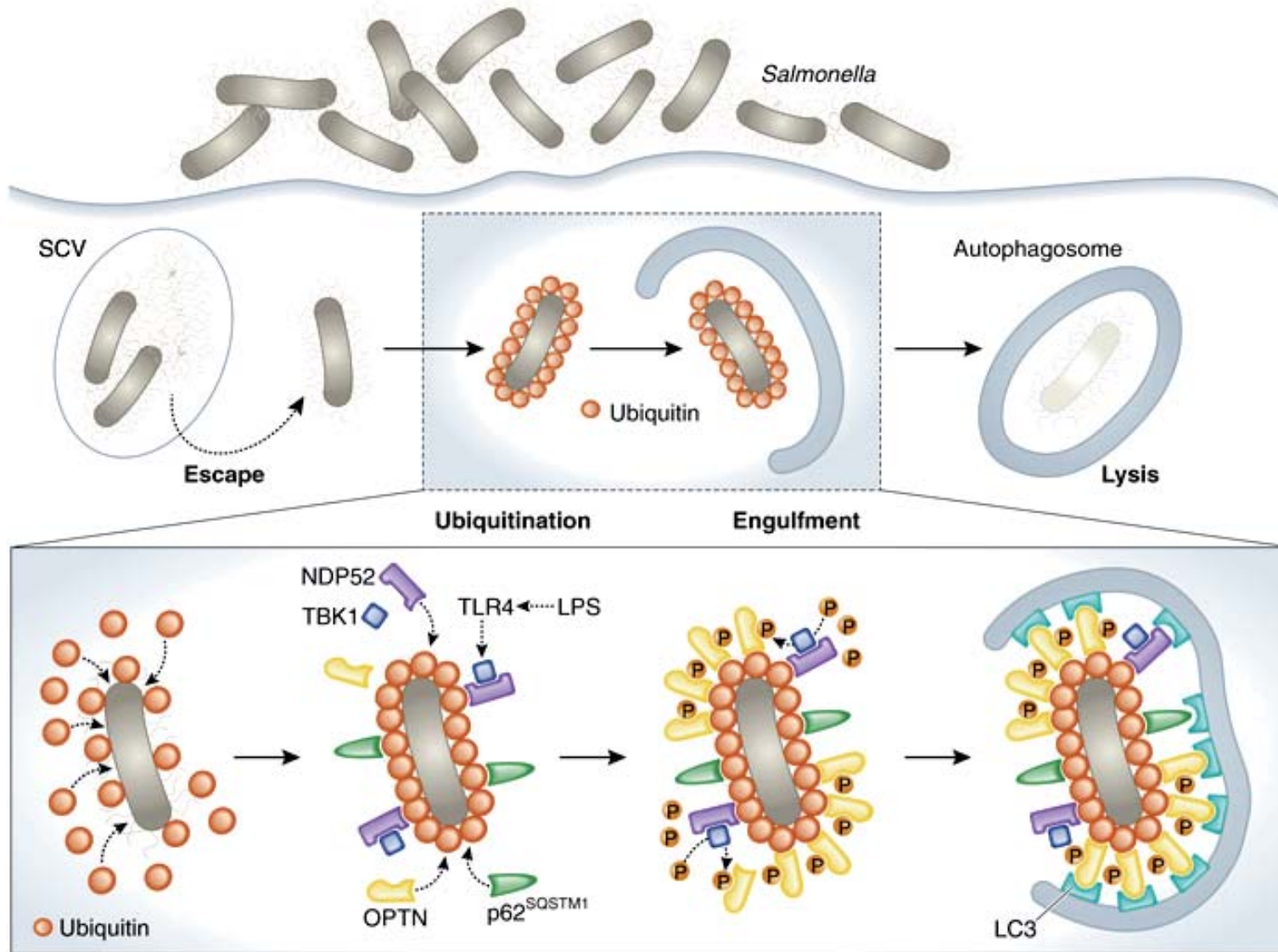
Philipp Wild,¹ Hesso Farhan,² David G. McEwan,¹ Sebastian Wagner,³ Vladimir V. Rogov,^{4,5} Nathan R. Brady,⁶ Benjamin Richter,¹ Jelena Korac,⁷ Oliver Waidmann,¹ Chunaram Choudhary,³ Volker Dötsch,⁴ Dirk Bumann,² Ivan Dikic^{1,7*}

8 JULY 2011 VOL 333 SCIENCE

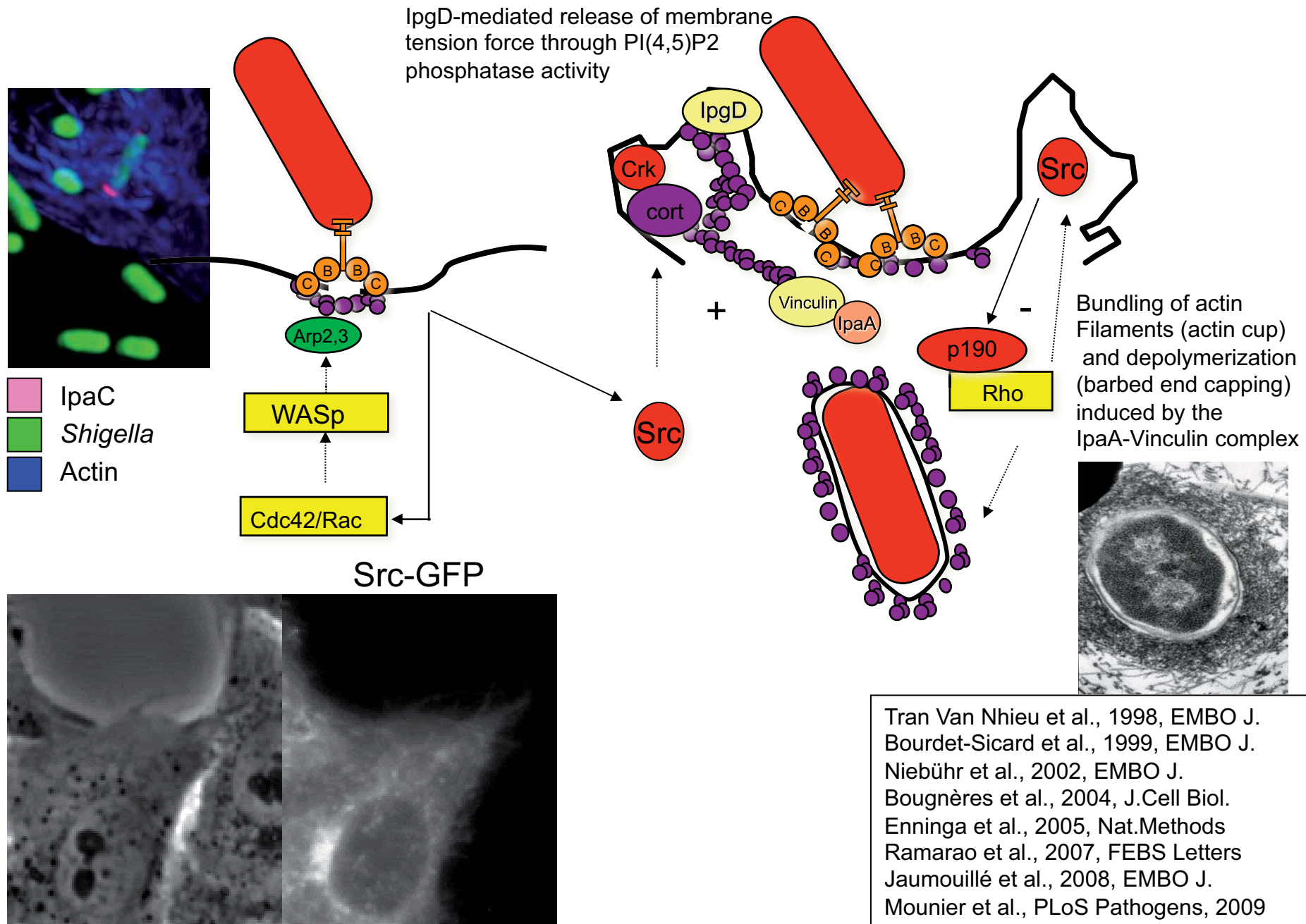


OPTN phosphorylée colocalise avec les Salmonelles cytosoliques (SifA-) positives pour le marquage ubiquitine et LC3B

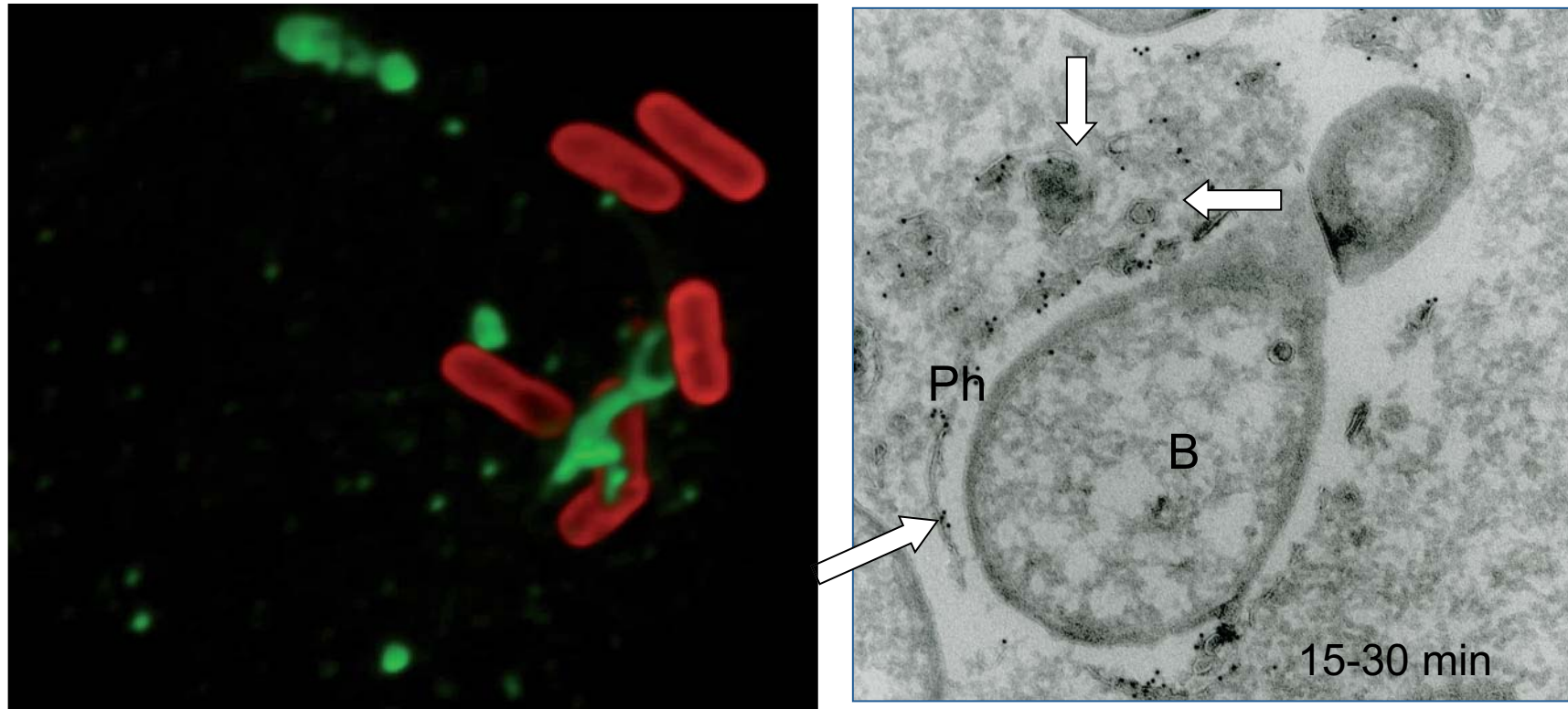
Phosphorylation en Ser177 de l'Optineurine par TBK1 et ciblage de Salmonella par l'autophagie



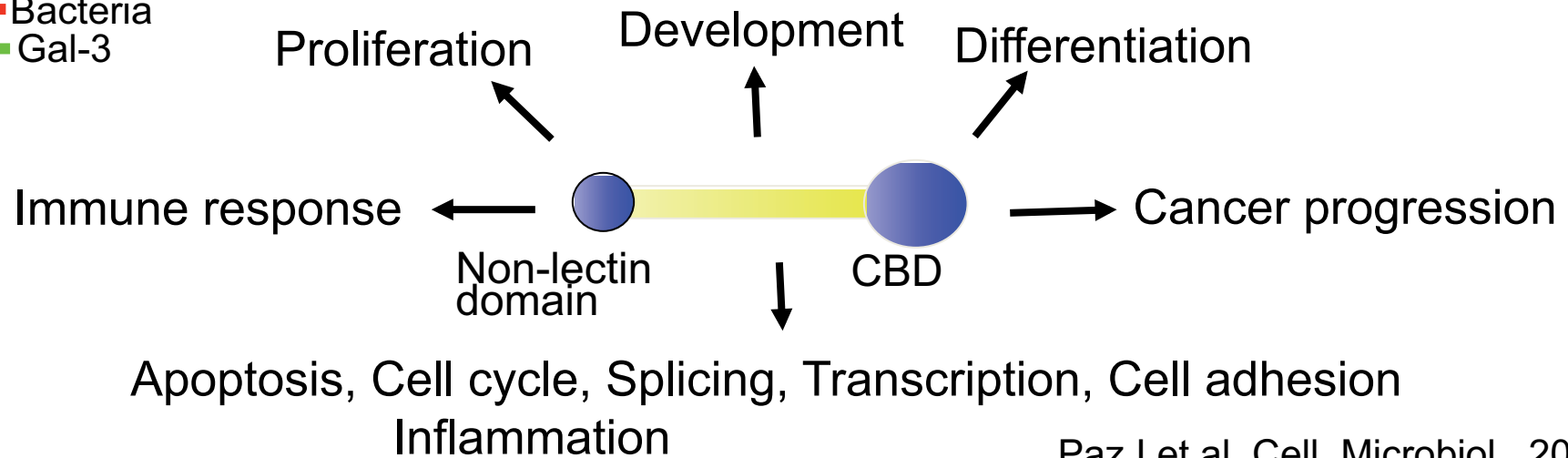
Src signaling and amplification of actin polymerization at *Shigella* entry sites



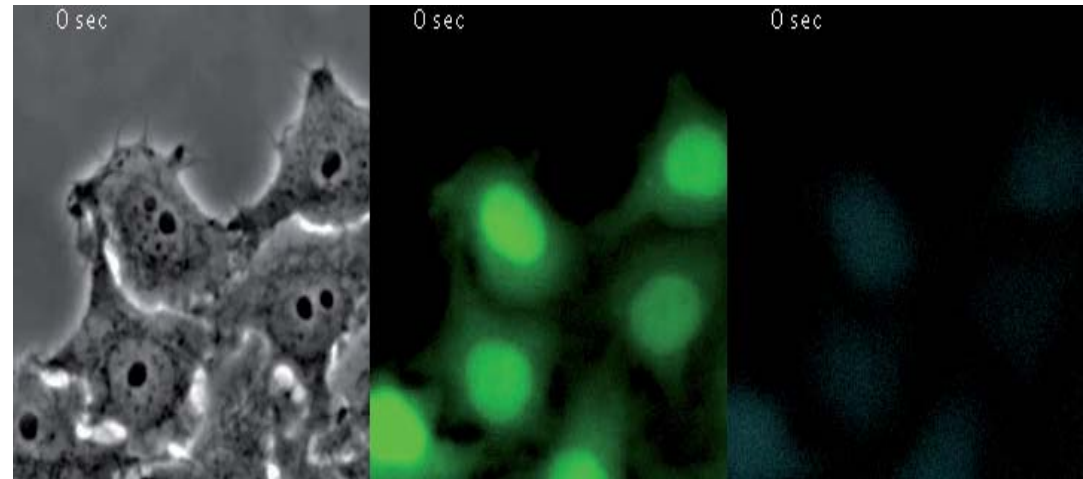
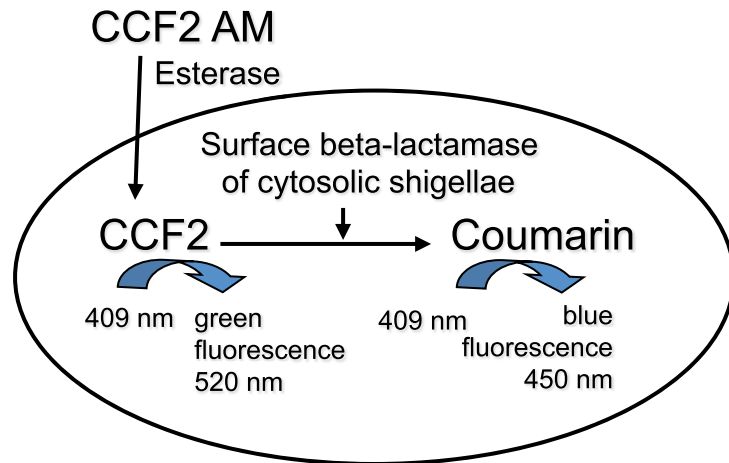
Gal-3 localizes to the phagosomal membrane and fusing structures



█ Bacteria
█ Gal-3

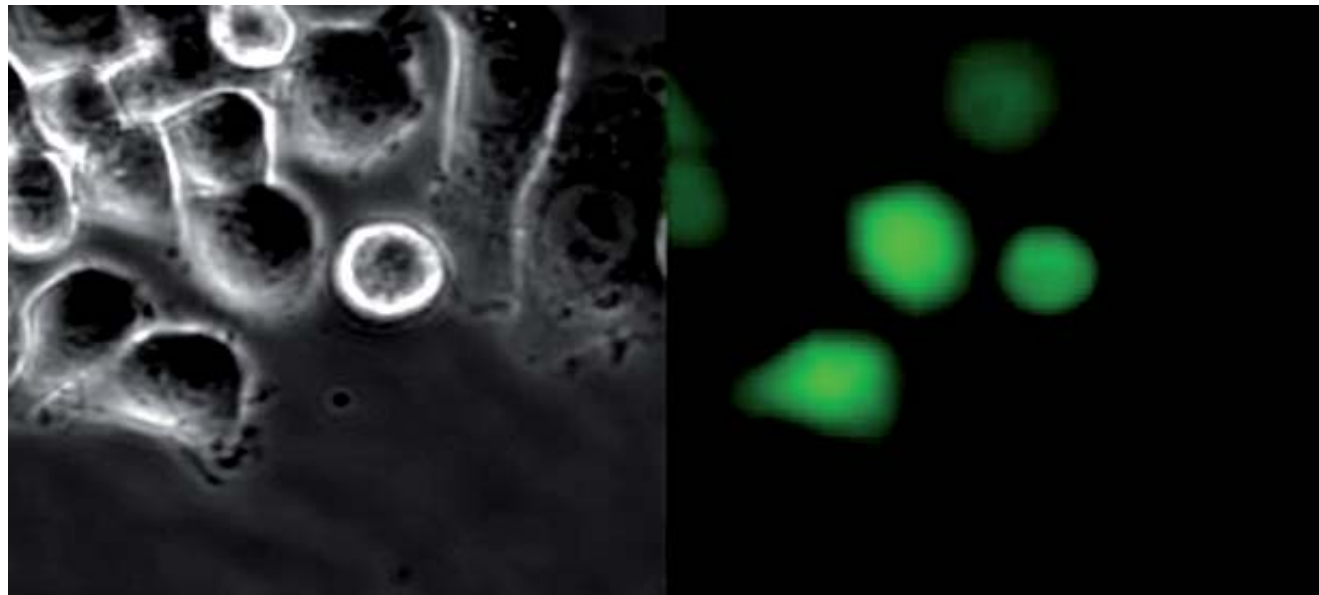


Ray & al., Cell.Microbiol. 2010



Paz & al., Cell.Microbiol., 2010

M90T-HeLa

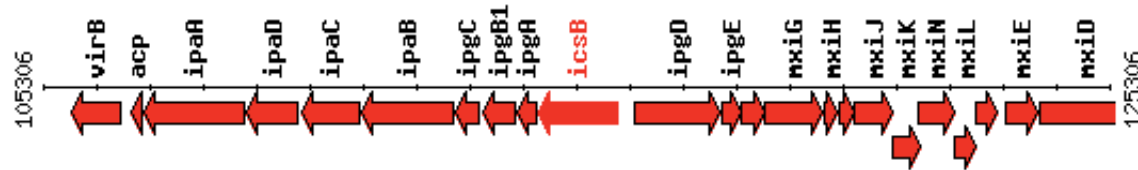


GFP-Gal-3

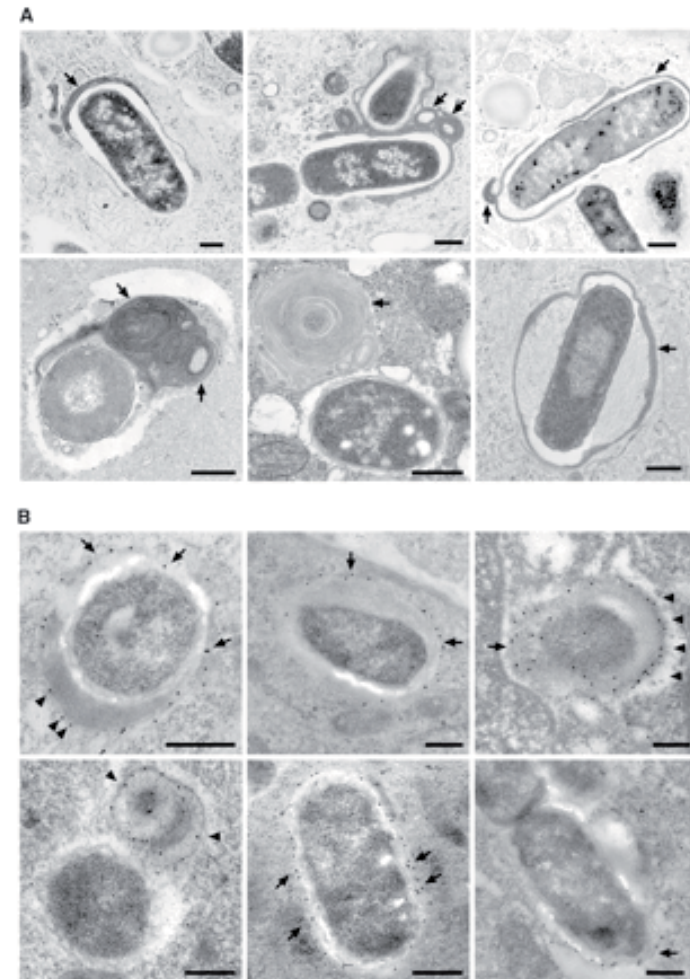
Escape of Intracellular *Shigella* from Autophagy

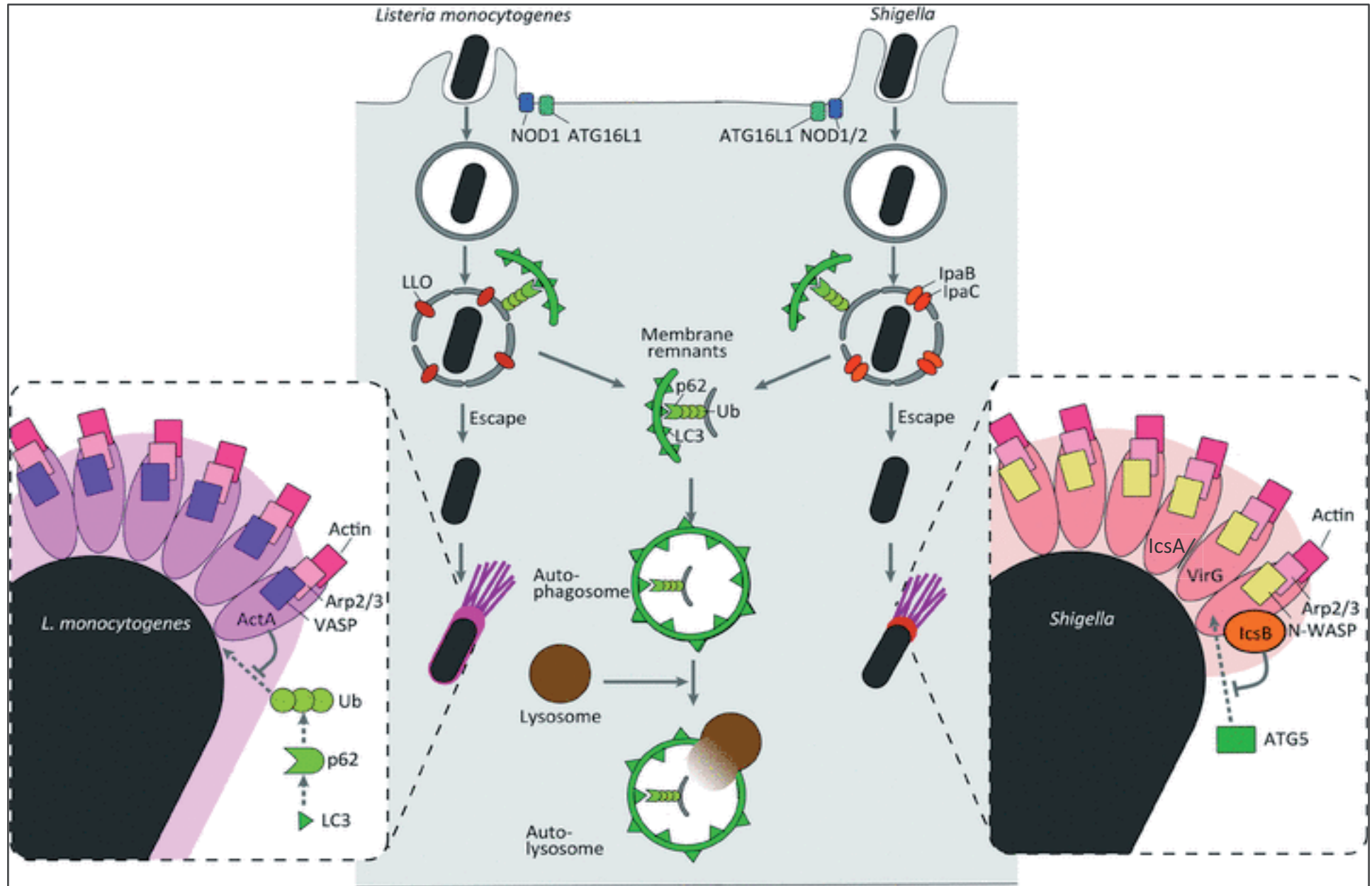
Michinaga Ogawa,¹ Tamotsu Yoshimori,^{3,6} Toshihiko Suzuki,^{1,5}
Hiroshi Sagara,² Noboru Mizushima,^{4,5} Chihiro Sasakawa^{1,6*}

SCIENCE VOL 307 4 FEBRUARY 2005



Multilamellar structures enclosing Δ icsB in MDCK cells. (A) MDCK cells infected with Δ icsB were observed by EM 4 hours later. Multilamellar structures surround the bacterium (arrows). (B) GFP-LC3 (arrows) is localized in the multilamellar structures (arrowheads) surrounding the bacterium, under immunogold EM. Scale bars, 0.5 μ m.



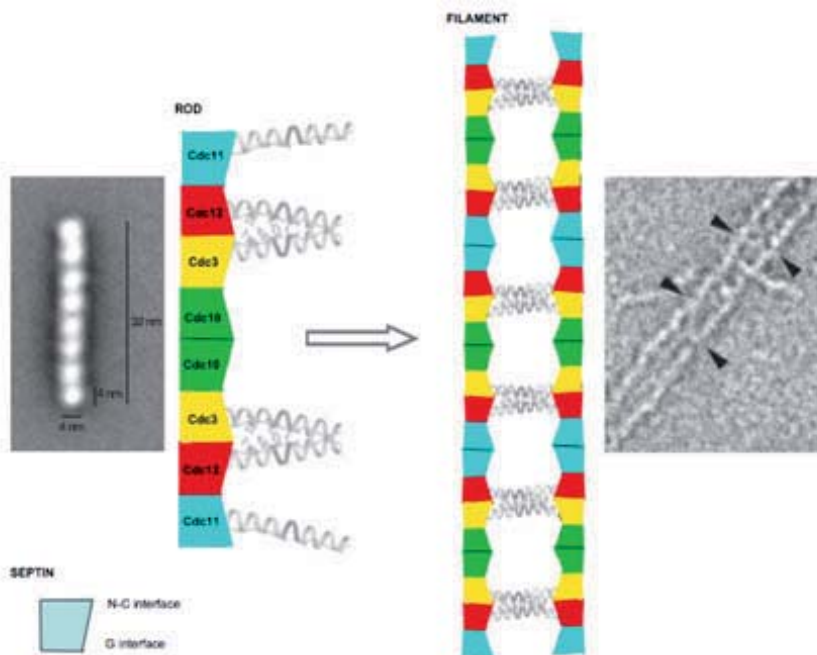
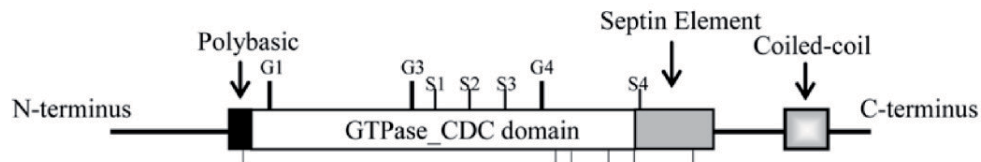


Dupont N et coll. 2009. Cell Host & Microbe

Entrapment of Intracytosolic Bacteria by Septin Cage-like Structures

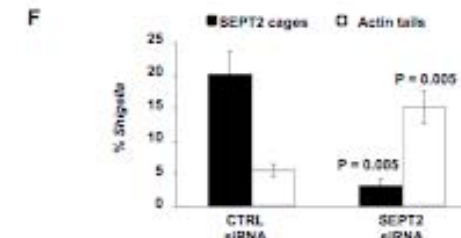
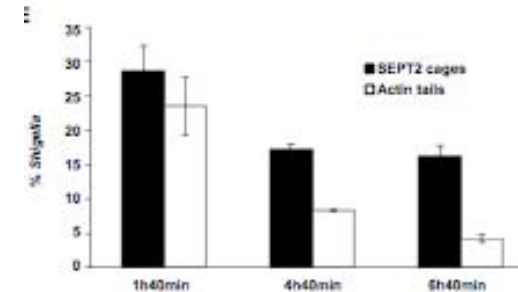
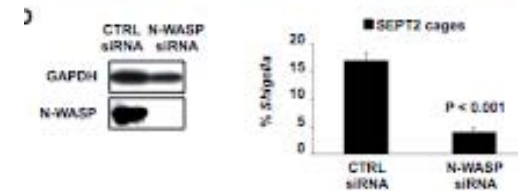
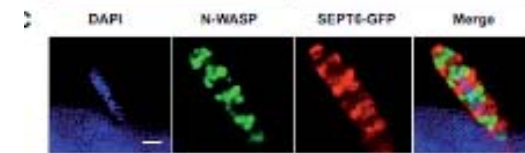
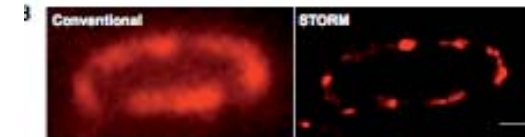
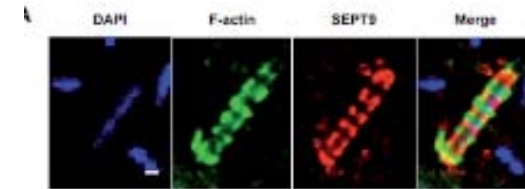
Serge Mostowy,^{1,6,7,*} Matteo Bonazzi,^{1,6,7} Mélanie Anne Hamon,^{1,6,7} To Nam Tham,^{1,6,7} Adeline Mallet,² Mickaël Lelek,^{3,8} Edith Gouin,^{1,6,7} Caroline Demangel,⁴ Roland Brosch,⁴ Christophe Zimmer,^{3,8} Anna Sartori,² Makoto Kinoshita,⁹ Marc Lecuit,^{5,10,11} and Pascale Cossart^{1,6,7,*}

Cell Host & Microbe 8, 433–444, November 18, 2010

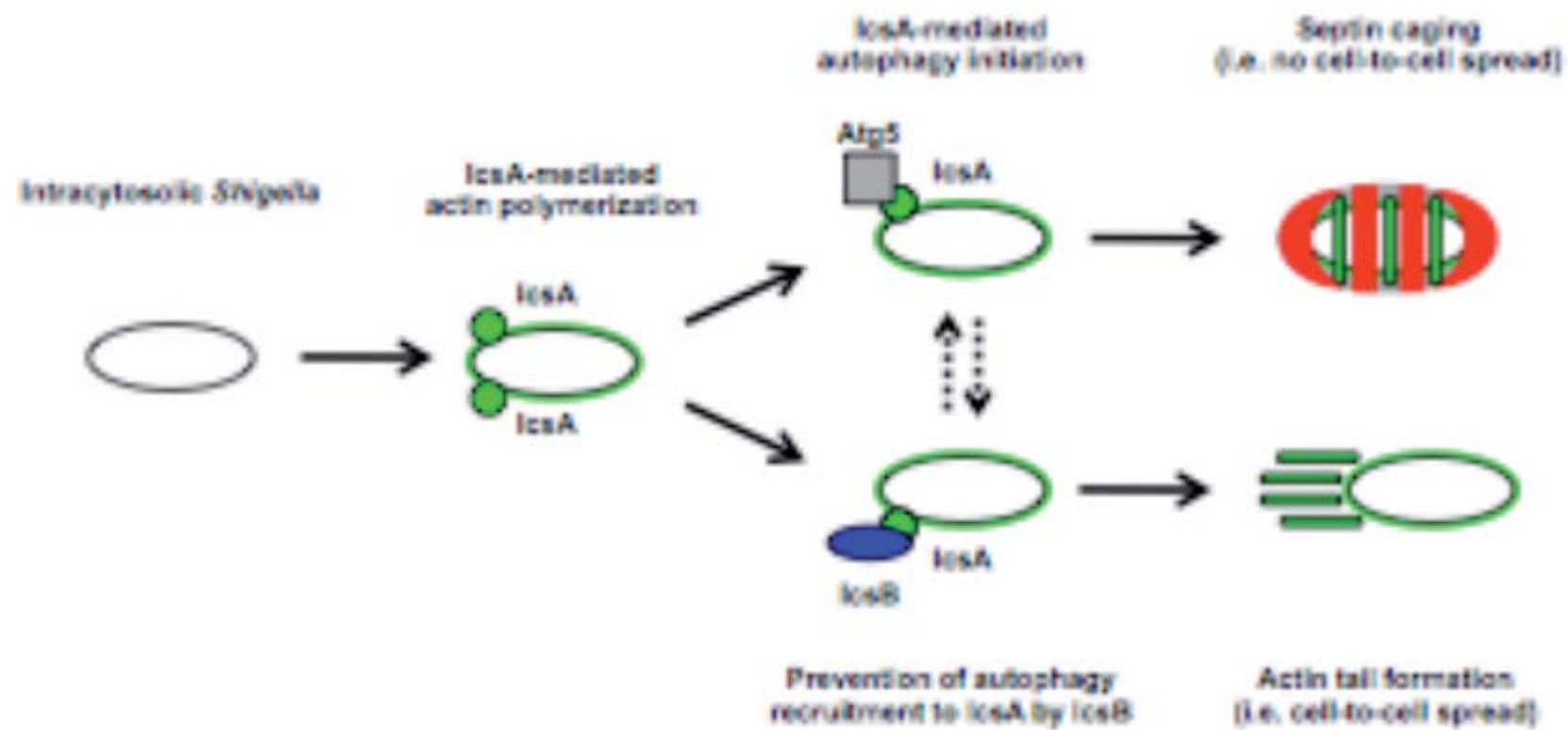


Eva Novales lab.

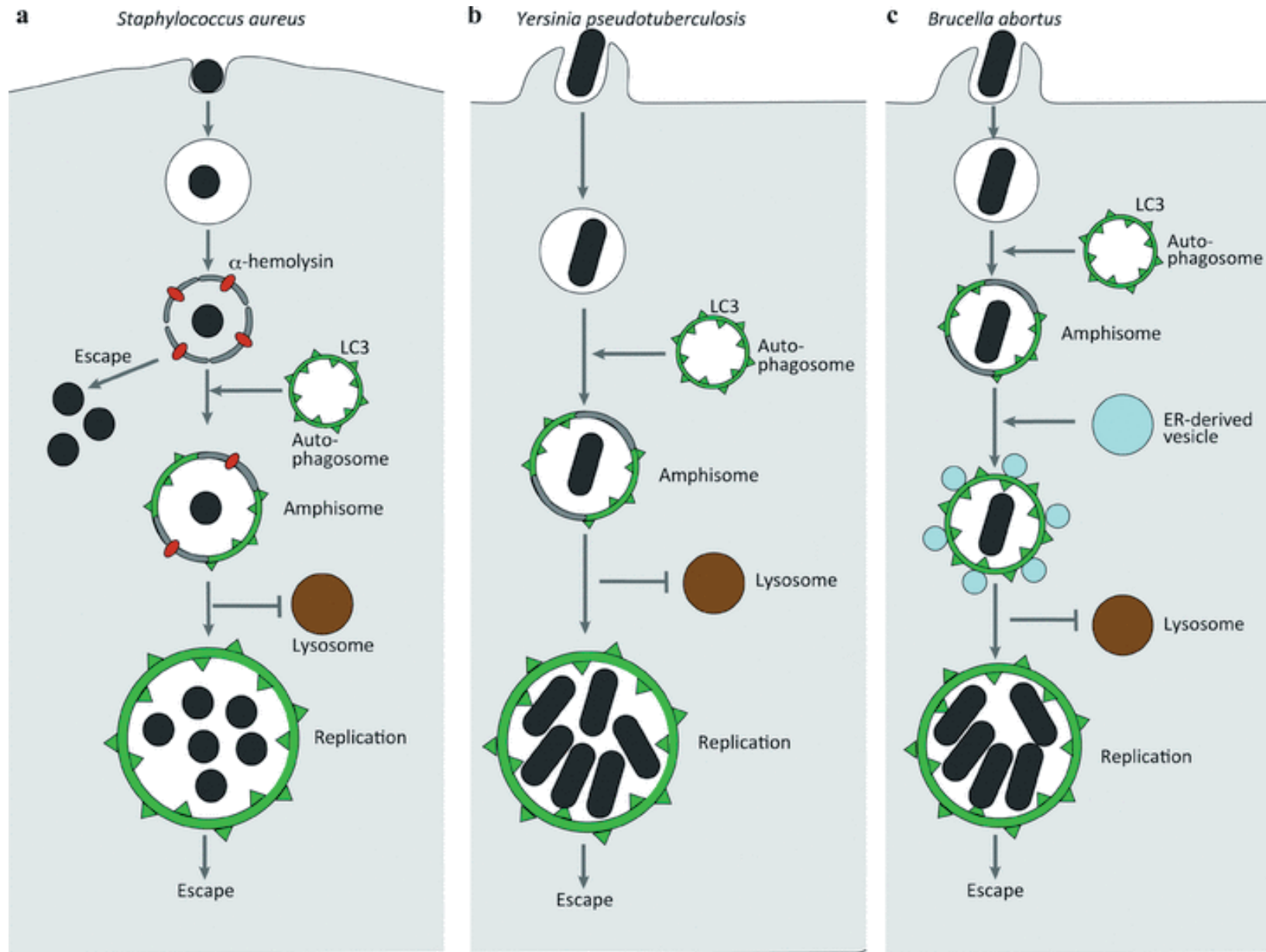
Bertin & coll. 2008. PNAS



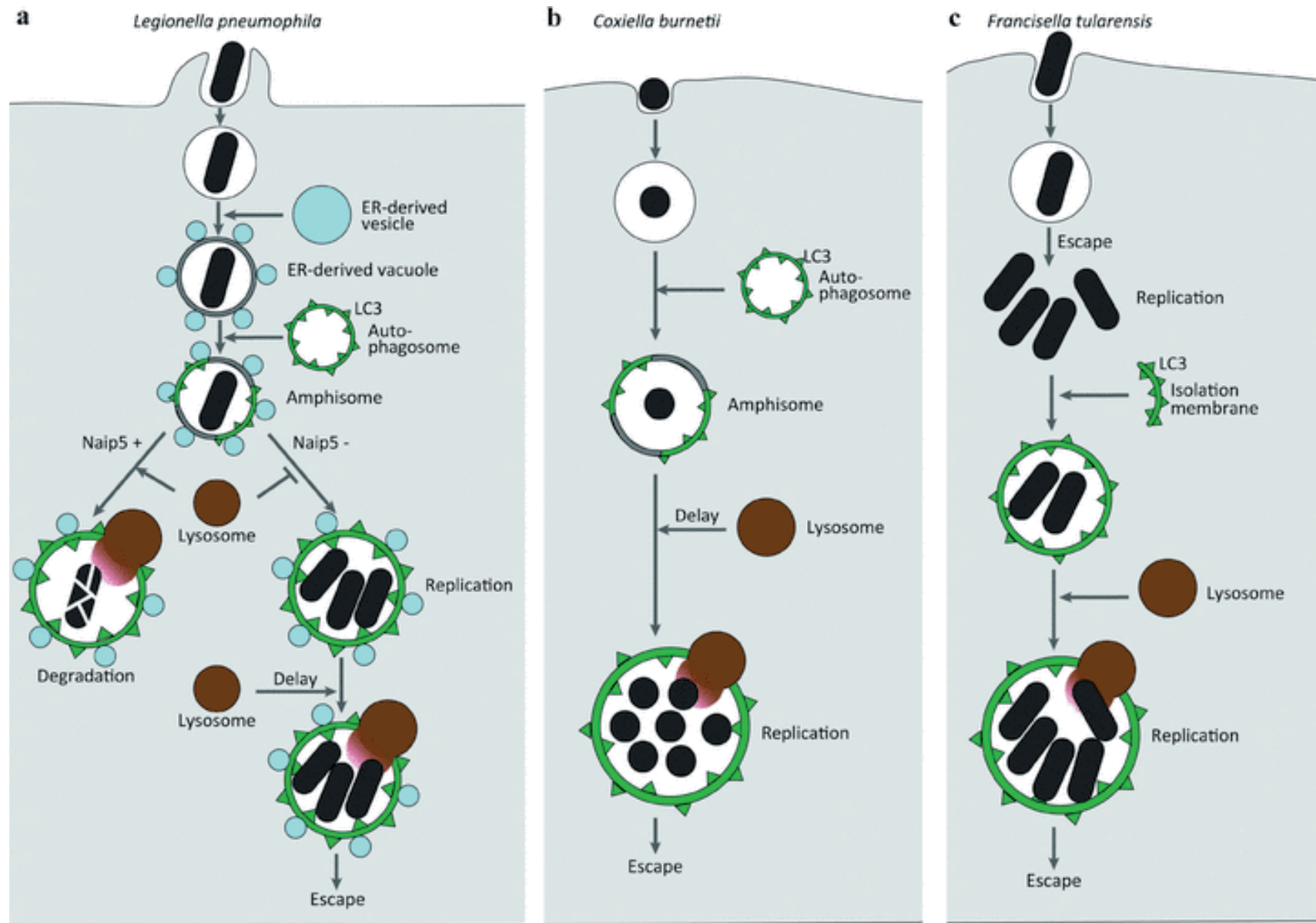
Mostowy S et coll. 2010. Cell Host & Microbe



Survie à l'autophagie: un thème commun pour les pathogènes



Survie à l'autophagie: un thème commun pour les pathogènes



Ogawa M. 2011. Microbiol. Immunol.