

UNIVERSITE PARIS.DIDEROT (Paris 7) SORBONNE PARIS CITE

ED BioSPC : Ecole Doctorale Bio Sorbone Paris Cité
Doctorat en Biologie, spécialité Microbiologie Procaryote et Eucaryote

Thèse présentée par
Julien MALET

Altération du protéome de la cellule hôte en réponse à l'infection par *Listeria monocytogenes*

Dirigée par le Prof. Pascale COSSART

Soutenue le 17 novembre 2016

Jury

Prof. Marc Nadal (Président)
Prof. Jean Gruenberg (Rapporteur)
Dr. Alice Lebreton (Rapportrice)
Prof. Jean-Pierre Gorvel (Examineur)
Dr. David Ribet (Examineur)
Prof. Pascale COSSART (Directrice de thèse)



Table des matières

| | |
|--|------------|
| Introduction | 7 |
| 1. <i>Listeria monocytogenes</i> : historique, épidémiologie, et pathophysiologie | 8 |
| 1.1. Historique..... | 8 |
| 1.2. Épidémiologie et phylogénie..... | 9 |
| 1.3. Déroulement de l'infection par <i>Listeria</i> à l'échelle de l'organisme..... | 12 |
| 2. Réplication intracellulaire de <i>Listeria</i> | 16 |
| 2.1. Principaux facteurs de virulence de <i>Listeria</i> associés au cycle de réplication intracellulaire..... | 17 |
| 2.2. La LLO, le « couteau suisse » de <i>Listeria</i> | 28 |
| 3. Protéolyse et pathogènes | 31 |
| 3.1. La protéolyse, une modification post-traductionnelle essentielle..... | 31 |
| 3.2. Le système ubiquitine-protéasome..... | 33 |
| 3.3. Les lysosomes..... | 35 |
| 3.4. Protéolyse induite par des pathogènes bactériens..... | 38 |
| 3.5. Protéolyse et <i>Listeria</i> | 40 |
| Objectifs de la thèse | 44 |
| Résultats | 45 |
| 1. Altération des fonctions lysosomales par <i>Listeria monocytogenes</i> | 46 |
| 1.1. Résumé..... | 46 |
| 1.2. Résultats..... | 46 |
| 2. Modifications du protéome durant l'infection par <i>Listeria monocytogenes</i> | 59 |
| 2.1. Caractérisation des modifications du protéome de l'hôte en réponse à la LLO...59 | |
| 2.2. Validation des cibles identifiées comme dégradées en réponse à la LLO.....63 | |
| 2.3. Mécanisme(s) de dégradation des protéines de l'hôte en réponse à la LLO.....64 | |
| 2.4. Conséquences fonctionnelles des dégradations induites par la LLO sur la physiologie cellulaire.....66 | |
| 2.5. Matériels et méthodes.....69 | |
| Discussion et perspectives | 72 |
| 1. Altération des fonctions lysosomales par <i>Listeria monocytogenes</i>73 | |
| 2. Modifications du protéome durant l'infection par <i>Listeria monocytogenes</i>77 | |
| Bibliographie | 84 |
| Annexes | 104 |

Table des Figures

| | |
|---|----|
| Figure 1. <i>Listeria monocytogenes</i> | 9 |
| Figure 2. Phylogénie du genre <i>Listeria</i> | 10 |
| Figure 3. Diversité des complexes clonaux de <i>Listeria monocytogenes</i> | 12 |
| Figure 4. Listériose humaine | 13 |
| Figure 5. Cycle intra-cellulaire de <i>Listeria</i> | 17 |
| Figure 6. Régulation transcriptionnelle de la virulence par PrfA | 18 |
| Figure 7. Entrée de <i>Listeria</i> dépendante des internalines : le mécanisme de « zipper » | 19 |
| Figure 8. Structure des domaines internalines d'InlA et B en complexe avec leurs récepteurs..... | 20 |
| Figure 9. Structure et fonctionnement de la Listeriolysine O. | 24 |
| Figure 10. Mécanisme de polymérisation des comètes d'actine. | 26 |
| Figure 11. Structure du protéasome et mécanisme d'ubiquitylation..... | 35 |
| Figure 12. Principe de l'analyse protéomique de la dégradation de protéines de l'hôte en réponse à la LLO | 60 |
| Figure 13. Etude fonctionnelle des protéines dégradées en réponse à la LLO..... | 62 |
| Figure 14. Validation des cibles dégradées en réponse à la LLO. | 63 |
| Figure 15. Validation des évènements de dégradation durant l'infection par <i>Listeria</i> | 64 |
| Figure 16. Caractérisation des mécanismes de dégradation induits par la LLO | 66 |
| Figure 17. Effet de la dégradation d'Ube2N et Ube2K sur la physiologie des cellules hôtes et sur l'efficacité d'infection par <i>Listeria</i> | 68 |
| Figure 18. Modifications du protéome de la cellule hôte durant l'infection par <i>Listeria monocytogenes</i> | 83 |

Abréviations utilisées dans ce manuscrit

| | |
|---------------|--|
| ActA | Actin assembly-inducing protein |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| ARN | Acide ribonucléique |
| BHE | Barrière hémato-encéphalique |
| BHI | Brain-heart infusion medium |
| c-Met | Hepatocyte growth factor receptor |
| CDC | Cholesterol dependant cytolysin |
| CHX | Cycloheximide |
| Drp1 | Dynamamin-related protein 1 |
| DSG2 | Desmoglein 2 |
| eIF2 α | Eukaryotic Initiation Factor 2 α |
| HBMEC | Cellules endothéliales de vaisseaux cérébraux |
| HRP / DAB | Horseradish peroxidase/diaminobenzidine |
| hTert | human Telomerase reverse transcriptase |
| InIA | Internaline A |
| InIB | Internaline B |
| LLO | Listeriolysine O |
| LMP | Lysosome Membrane Permeabilization |
| LRR | Leucin Rich Repeat |
| LYNUS | Lysosome nutrient sensing |
| M6P | Mannose-6-Phosphate |
| M6PR | Mannose-6-Phosphate Receptor |
| Mff | Mitochondrial fission factor |
| MLST | <i>Multi-Locus Sequence Typing</i> |
| Mpl | Métalloprotéase de <i>Listeria monocytogenes</i> |
| mTOR | Mammalian target of rapamycin complex 1 |
| NF κ B | Nuclear factor-kappa B |
| PC-PLC | Phosphatidylcholine-specific phospholipase C |
| PCPB1 | Poly(rC)-binding protein 1 |
| PFGE | <i>Pulse Field Gel Electrophoresis</i> |
| PFO | Perfringolysine O |
| PFT | Pore forming toxin |
| PHTP1 | 14 kDa phosphohistidine phosphatase |
| PI-PLC | Phosphatidylinositol-specific phospholipase C |
| PLY | Pneumolysine |
| RE | Réticulum Endoplasmique |
| ROS | Reactive Oxygen Species |
| SILAC | <i>Stable Isotope Labelling by Amino acids in Cell culture</i> |
| siRNA | short interfering RNA |
| SUMO | Small Ubiquitin-like MOdifier |
| TFEB | Transcription factor EB |
| TLCK | Tosyl-L-lysyl-chloromethane hydrochloride |
| TPCK | Tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone |

| | |
|-------|---------------------------------------|
| Ube2K | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 K |
| Ube2N | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N |
| Ube2V | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 V |
| UPEC | Uropathogenic <i>Escherichia coli</i> |
| WASP | Wiskott-Aldrich Syndrome Protein |
| WGS | <i>Whole Genome Sequencing</i> |

Remerciements

Je remercie les membres de mon jury pour le temps précieux qu'ils ont accordé à l'évaluation de ce manuscrit et de mes travaux thèse lors de ma soutenance : Jean Gruenberg et Alice Lebreton en leur qualité de rapporteurs, Jean Pierre Gorvel et David Ribet en tant qu'examinateurs et Marc Nadal en Président du jury.

Je remercie l'équipe de l'école doctorale BioSPC ainsi que tout l'Institut Pasteur pour avoir permis la réalisation de ces travaux.

Merci à Jean Gruenberg et Alice Lebreton pour leurs commentaires et remarques sur le manuscrit de thèse et mes travaux, ce qui a grandement aidé à leurs aboutissements.

Je remercie infiniment Pascale de m'avoir ouvert les portes du laboratoire pour mon stage de master qui fut le début de cette grande aventure, il y a maintenant plus de trois ans. Merci aussi pour toutes les opportunités que tu m'as offertes, pour ton enthousiasme et ton soutien indéfectible pour mes projets.

Quant à David, je ne répèterai jamais assez que je suis fier d'avoir été ton élève. Tu m'as appris les techniques, l'art de présenter des résultats, perfectionné ma rigueur scientifique et tu étais surtout toujours présent pour moi. J'espère que cette expérience t'a été aussi gratifiante et plaisante qu'elle l'a été pour moi. Durant ces années, j'ai en tout cas pu te voir évoluer et t'affirmer en tant que chercheur (et maintenant Professeur) et espère avoir pu contribuer à ton succès.

Les travaux que j'ai entrepris n'auraient bien sûr pas été possibles sans l'aide des membres de l'unité (anciens et actuels). Ca a été un réel plaisir d'apprendre à les connaître et de travailler à leur côté. Je remercie Francis Impens pour la spectrométrie de masse et son expertise en biochimie. Merci à Marie-Anne pour les manipulations des modèles animaux.

Je remercie les membres de la pièce 22 : Edith Gouin et Olivier Dussurget pour leur aide, conseils et soutien au quotidien ainsi que Juan Jose Quereda Torres, Serena Boscaini, Andrej Prokop et Andreas Kühbacher. Je ne peux malheureusement pas citer tous mes collaborateurs mais sachez que l'esprit d'équipe qui règne au laboratoire est un vrai moteur de notre réussite et que je pense tout le monde a été essentiel.

Une thèse, c'est aussi beaucoup de rencontres donc je tiens à remercier les membres de la StaPa et des associations de jeunes chercheurs pour les bons moments passés ensemble.

Je remercie bien sûr ma famille sans qui je ne serais pas là. Merci à mes parents qui m'ont toujours soutenu, à ma mère et son optimisme et mon père qui m'a inculqué l'amour de la biologie.

Merci à Mélanie, ma compagne, pour toutes ces années passées à tes côtés. Supporter le thésard n'a pas été facile, j'espère que tu supporteras mieux le docteur.

A tout ceux que j'ai pu oublié : encore merci.

Introduction

1. *Listeria monocytogenes* : historique, épidémiologie, et pathophysiologie

1.1. Historique

L'identification de *Listeria monocytogenes* remonte à 1911. Le suédois G. Hülphers isole à l'époque une bactérie à partir de foyers nécrotiques de foies de lapins malades qu'il appelle *Bacillus hepatis* (Hulphers, 1911). En 1926 vient la description détaillée par E.G.D. Murray d'une bactérie Gram-positif responsable d'une épizootie chez des lapins de laboratoire à Cambridge qu'il nomme *Bacterium monocytogenes* (Murray and Webb, 1926). L'année suivante, en Afrique du Sud, J.H.H. Pirie isole et décrit une bactérie responsable de l'infection de gerbilles qu'il appellera *Listerella hepatica* (en l'honneur du chirurgien Joseph Lister, fondateur de la microbiologie moderne et des techniques d'asepsie) (Pirie, 1927). Se rendant compte qu'ils travaillaient sur la même bactérie, Murray et Pirie décidèrent de renommer la bactérie *Listerella monocytogenes*. Pour des raisons taxonomiques, le genre sera renommé *Listeria* et la bactérie prendra ainsi son nom définitif de *Listeria monocytogenes* en 1940 (Figure 1) (Pirie, 1940).

En parallèle à ces premières études chez l'animal, le docteur J. Dumont reçoit en 1918, en Champagne (France), un soldat italien en état de méningite fébrile qui décèdera 3 jours après son admission. Le docteur Dumont isole à partir du liquide céphalo-rachidien de ce patient la bactérie responsable de cette méningite. En 1919, il demande une étude bactériologique poussée à son collègue, le docteur L. Cotoni, connu pour ses recherches à l'Institut Pasteur sur les pneumocoques. Ce dernier identifie une bactérie de type Gram-positif proche du bacille du rouget du porc et la décrit dans une publication en 1921 (Dumont and Cotoni, 1921). Vingt ans plus tard, il ré-étudie ce germe et confirme son appartenance au genre appelé à l'époque *Listerella*, ce qui fait de ce cas de méningite le premier cas d'infection humaine à *Listeria* publié en France (Cotoni, 1942).

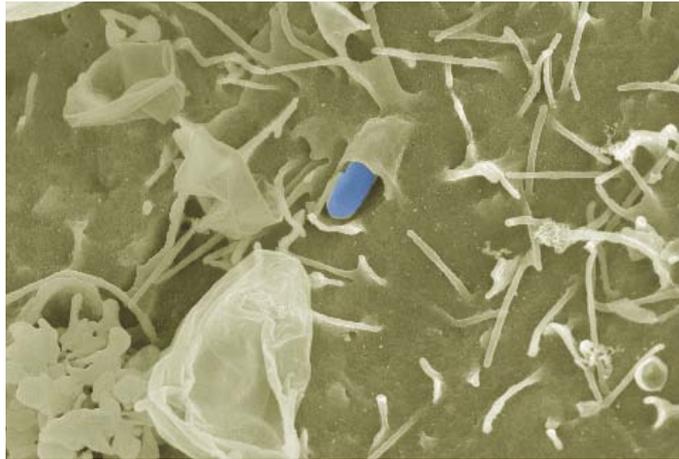


Figure 1. *Listeria monocytogenes*. Image prise au microscope électronique (fausses couleurs, grossissement x4,500) d'une *Listeria* (en bleu) envahissant une cellule épithéliale (photo aimablement fournie par Juan Jose Quereda Torres, non publiée).

Malgré la gravité des cas, il faudra attendre les années 1970-80 et l'augmentation des épidémies de listériose liées à la consommation de produits contaminés (notamment les salades de choux, les fromages à pâte molle et la charcuterie) pour que *Listeria monocytogenes* soit catégorisée comme pathogène transmis par l'alimentation (Schlech et al., 1983; Schuchat and Swaminathan, 1991).

1.2. Épidémiologie et phylogénie

1.2.1. Principales espèces de *Listeria* : du saprophyte au pathogène modèle

Le genre *Listeria* appartient à la famille des Firmicutes et comprend à l'heure actuelle 17 espèces. Les bactéries appartenant à ce genre sont des bacilles de type Gram-positif, sans capsule, non sporulants et dont le génome contient un faible taux de G/C (Orsi and Wiedmann, 2016) (Figure 2). Bien que ces différentes espèces de *Listeria* puissent occuper des niches similaires dans l'environnement (rivières, eaux usées et sols) où elles vivent en saprophytes, deux espèces, *Listeria monocytogenes* et *Listeria ivanovii*, ont été reconnues comme pathogènes pour l'homme et les animaux (Guillet et al., 2010; Vazquez-Boland et al., 2001). *Listeria monocytogenes* est responsable de la majorité des cas de listériose humaine, alors que *Listeria ivanovii* est plus rarement associée à l'homme mais plus répandue dans les infections animales, notamment chez les ruminants.

Les analyses génomiques réalisées sur le genre *Listeria* suggèrent une évolution du genre par gain et perte successives d'un ou plusieurs facteurs de virulence et/ou îlot de pathogénicité (Orsi and Wiedmann, 2016). Ces gènes, nécessaires à la virulence, permettent notamment aux espèces *Listeria monocytogenes* et *ivanovii* d'envahir et de se

répliquer à l'intérieur des cellules de l'hôte, faisant de ces bactéries des pathogènes intracellulaires facultatifs.

En quelques décennies, l'étude des mécanismes d'infection par *Listeria monocytogenes* a permis d'effectuer de nombreuses avancées en microbiologie (Toledo-Arana et al., 2009), en biologie cellulaire (Lebreton et al., 2015) et en immunologie (Witte et al., 2012; 2016), faisant ainsi de cette bactérie un modèle d'organisme pathogène (Cossart, 2011).

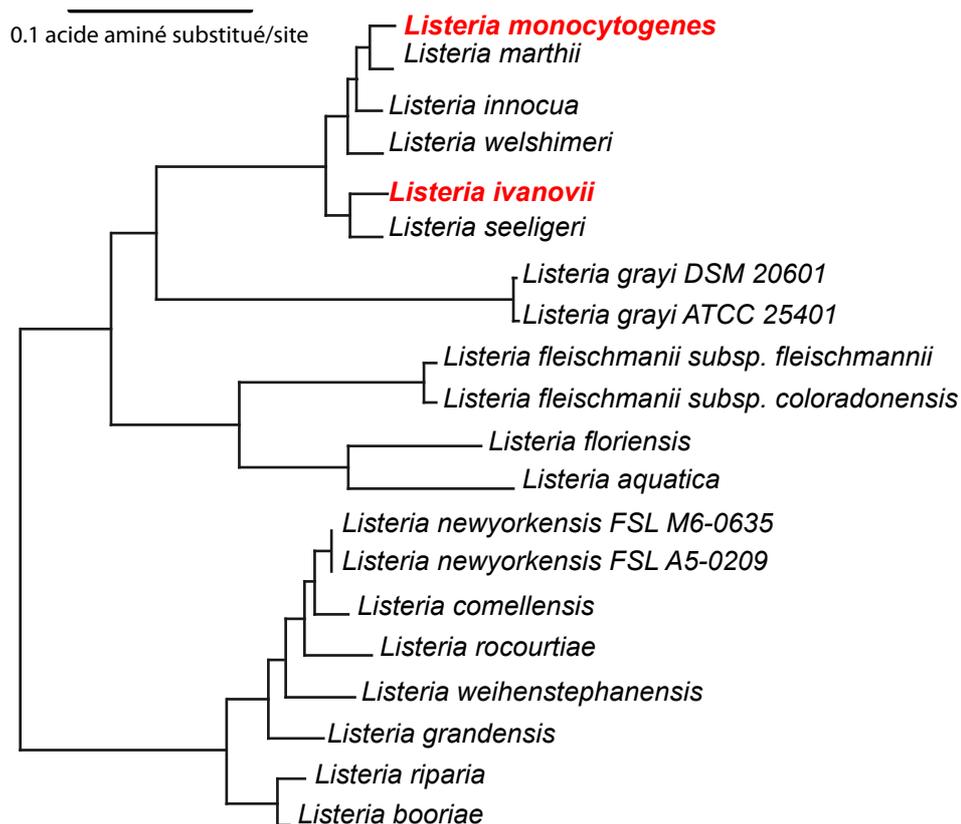


Figure 2. Phylogénie du genre *Listeria*. Arbre phylogénétique des 17 espèces de *Listeria* connues à ce jour. *Listeria monocytogenes* est l'espèce principalement associée à la listériose humaine (figure tirée de Weller et al., 2015).

1.2.2. Variabilité au sein de l'espèce *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes est l'espèce du genre *Listeria* la mieux caractérisée. Elle est divisée en plusieurs populations appelées lignages qui possèdent chacune des caractéristiques phénotypiques ou génétiques précis. La définition de ces lignages a évolué au court du temps selon les techniques utilisées pour identifier les souches de *Listeria monocytogenes* (Orsi et al., 2011). Les premières discriminations des différentes souches de *Listeria* s'effectuaient par sérotypage basé sur des antigènes bactériens de la paroi et du flagelle (Paterson, 1940). 13 sérotypes différents ont été décrits et, parmi ceux ci, seuls quelques uns sont responsables de la majorité des cas de listériose humaine (les sérotypes 1/2a, 1/2b et 4b sont présents dans près de 95% des cas chez l'homme) (Swaminathan and Gerner-

Smidt, 2007). Plusieurs méthodes de typage ont ensuite été développées pour analyser les génomes, l'évolution et l'épidémiologie des souches de *Listeria monocytogenes* par les laboratoires de référencement.

Le sérotypage immun a peu à peu été remplacé par le sérogroupage PCR qui permet une distinction rapide, efficace et à moindre coût des souches les plus pathogènes de *Listeria*. La technique est basée sur l'amplification du gène *prs* présent chez toutes les souches de *Listeria* et de 4 autres gènes (*Imo1118*, *Imo0737*, *ORF2110*, *ORF2819*) dont la présence ou absence permet de différencier plusieurs familles de souches appelées sérogroupes PCR (Doumith et al., 2004).

Cette méthode a cependant un faible pouvoir discriminatoire et a dû être complétée par d'autres techniques comme l'analyse PFGE (*Pulse Field Gel Electrophoresis*) de grands fragments de restriction. Pour cette technique, l'ADN génomique est digéré par les enzymes de restriction *AscI* et *ApaI* qui produisent de grands fragments (20 à 700 kb). L'électrophorèse en champ pulsé des fragments fournit des profils de migration assez spécifiques pour distinguer des échantillons provenant d'une même source. Ce type d'analyse reste cependant difficile à standardiser, rendant les comparaisons de résultats entre laboratoires difficiles.

Les techniques basées sur le séquençage ont enfin permis de regrouper les souches en groupes phylogénétiquement proches. La technique de MLST (*Multi-Locus Sequence Typing*) est basée sur le séquençage de 7 gènes de ménage (*abcZ*, *bglA*, *cat*, *dapE*, *dat*, *ldh*, *lhkA*). La diversité allélique de ces gènes permet de classer les souches en groupes appelés complexes clonaux selon le partage d'au moins 6 allèles identiques sur les 7 gènes analysés (Figure 3) (Cantinelli et al., 2013; Orsi et al., 2011; Ragon et al., 2008).

Le séquençage à haut débit étant de plus en plus accessible, le WGS (*Whole Genome Sequencing* ou séquençage du génome entier) peut maintenant être utilisé comme outil pour le typage des souches, augmentant considérablement la capacité de différenciation de 2 souches génétiquement très proches.

L'évolution des techniques de référencement, alliée à la mise en place de protocoles de surveillance robustes, a permis des avancées majeures dans le contrôle sanitaire de la listériose. Aux Etats-Unis comme en France, ces progrès ont amélioré la détection et la résolution d'épidémies de listériose (Jackson et al., 2016). Les données rassemblées grâce aux plans de surveillance nationaux sont très exhaustives : en France en 2014, 98,7% des échantillons de patients atteints de listériose et 1271 échantillons d'origine alimentaire ont été reçus et analysés par le Centre National de Référence des *Listeria*. Ces données permettent de caractériser la dynamique des populations de *Listeria* et de comprendre les bases génétiques de la virulence des souches cliniques. Une étude récente a notamment identifié des complexes clonaux fortement associés à certaines pathophysiologies

(méningites et listérioses materno-foetales). L'analyse du génome de ces complexes clonaux a mis en évidence la présence de nouveaux facteurs de virulence pouvant contribuer au tropisme (neural ou placentaire) observé (Maury et al., 2016) (Ragon et al., 2008)

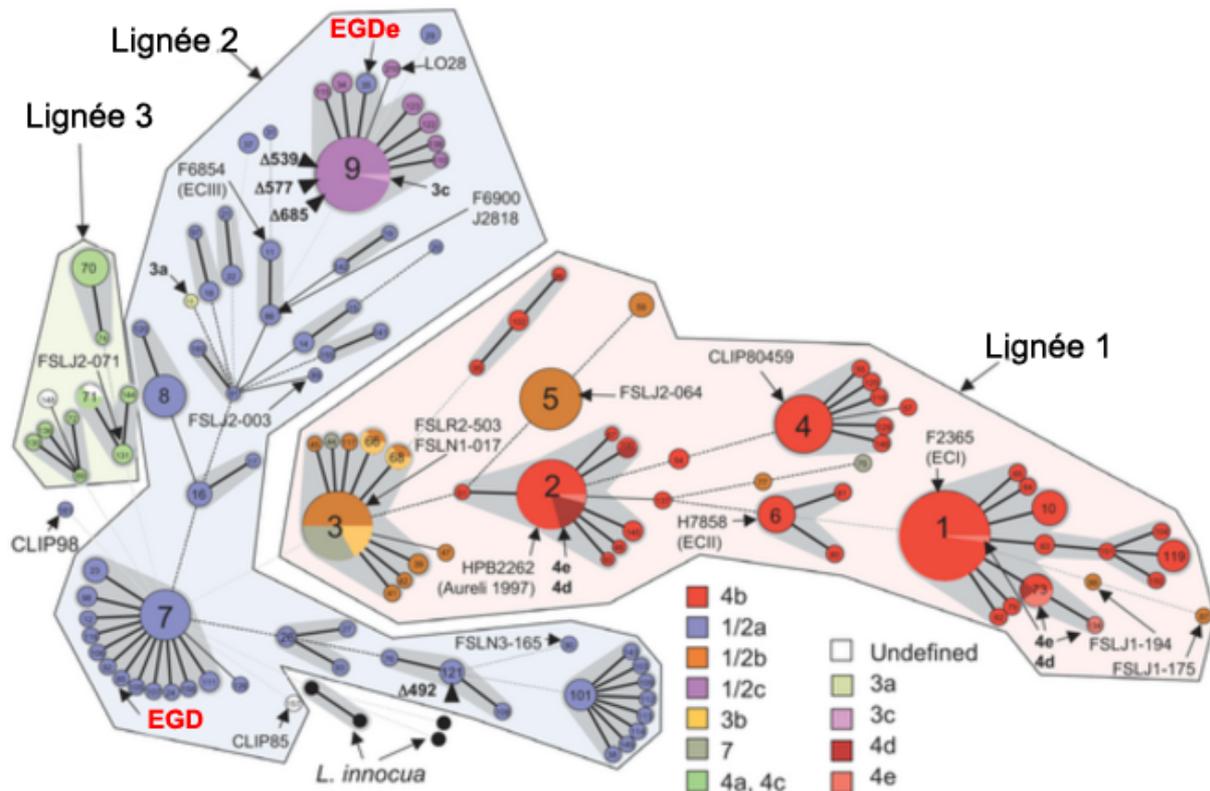


Figure 3. Diversité des complexes clonaux de *Listeria monocytogenes*. Arbre couvrant de poids minimal réalisé à partir des séquences MLST de 360 souches de *Listeria monocytogenes* et 4 souches de *Listeria innocua*. Les souches sont réparties en 3 lignées majeurs (polygones colorés), 12 sérotypes et en complexes clonaux (zones grises). EGD est la souche de référence de *Listeria monocytogenes* utilisée dans les travaux présentés dans ce manuscrit (figure tirée de Ragon et al., 2008).

1.3. Déroulement de l'infection par *Listeria* à l'échelle de l'organisme

1.3.1. *Listeria* est un pathogène transmis par l'alimentation

La listériose est une maladie rare (5,7 cas par million d'habitants en France en 2014, soit environ 350 cas par an (Lecuit et al., 2015)) avec un taux de mortalité élevé (de 20 à 30%). Elle cible plus particulièrement des populations à risque telles que les femmes enceintes, les nouveau-nés et les personnes âgées ou immunodéprimées (Swaminathan and Gerner-Smidt, 2007). *Listeria monocytogenes* (que nous appellerons *Listeria* dans le reste de ce manuscrit) est une bactérie pouvant croître à 4°C, à des pH acides ou à de fortes concentrations en sel, des conditions rencontrées dans les chaînes de production et de stockage des aliments mais aussi durant le passage dans l'intestin de l'hôte (Gahan, 2014).

L'ingestion d'aliments contaminés par l'homme peut entraîner des formes non-invasives de listériose, caractérisées par des gastro-entérites, pouvant passer inaperçues. Les formes invasives, beaucoup plus graves, se présentent sous 3 formes : septicémies (atteintes de la circulation sanguine), méningites (atteintes du système nerveux central) et (chez les femmes enceintes) formes materno-foetales ou néonatales. Ces différentes formes reflètent la capacité de *Listeria* à traverser plusieurs barrières immunitaires : la barrière intestinale, la barrière hémato-encéphalique et la barrière hémato-placentaire (Figure 4).

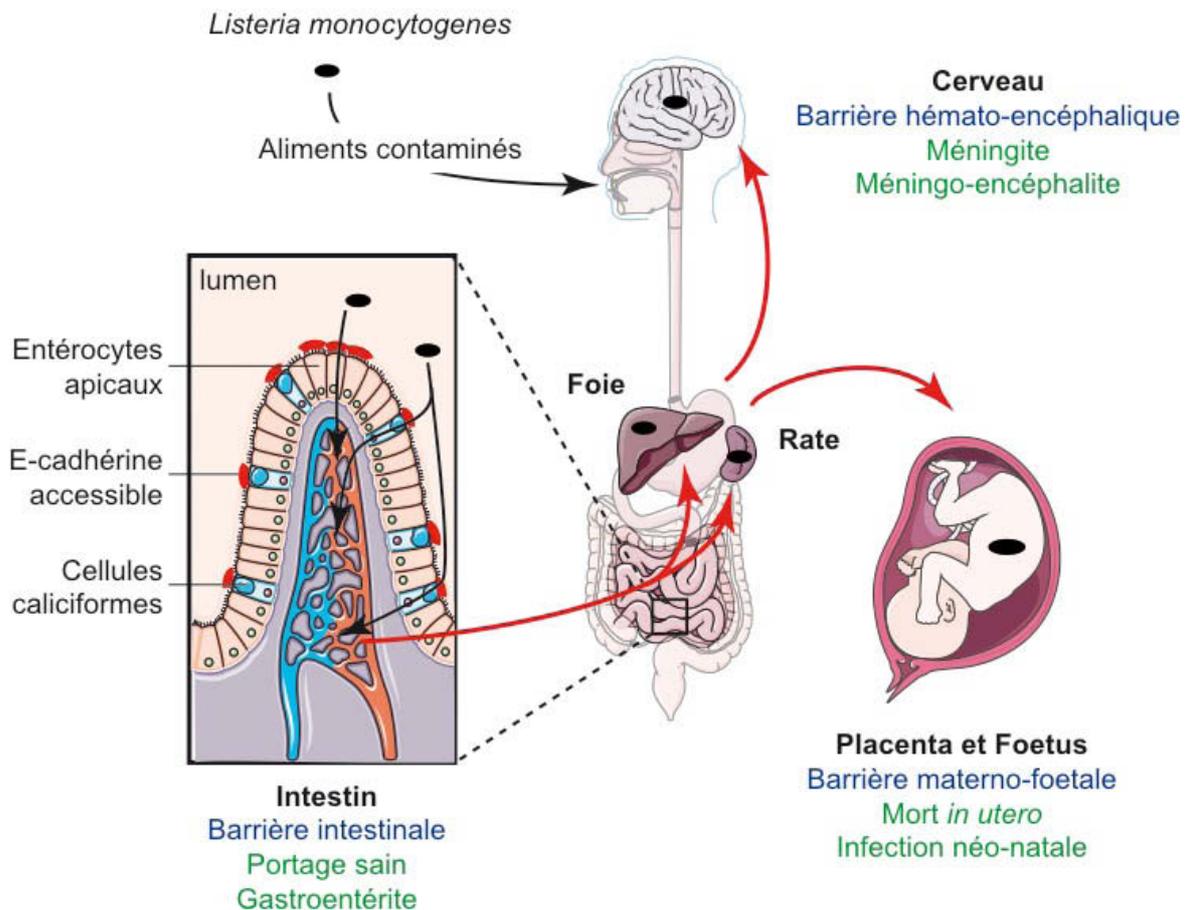


Figure 4. Listériose humaine. Suite à l'ingestion d'aliments contaminés, *Listeria* colonise l'intestin et traverse la barrière intestinale (au niveau des cellules exposant la E-cadhérine, en rouge, à leur surface) pour atteindre la circulation sanguine et rejoindre le foie et la rate. Si l'infection n'est pas contenue, *Listeria* colonise ensuite le cerveau et, dans le cas d'infection de femmes enceintes, le placenta et le fœtus en traversant les barrières associées (figure réalisée grâce la banque d'image Servier : <http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>).

1.3.2. Mécanismes de traversée de la barrière intestinale

Une fois ingérée, *Listeria* traverse le tube digestif et parvient à franchir la barrière intestinale par différents mécanismes.

Listeria peut traverser la barrière intestinale en envahissant des cellules de l'épithélium intestinal. Ceci est possible grâce à l'interaction d'une protéine membranaire de *Listeria*, appelée Internaline (InlA), avec un récepteur de la surface des cellules hôtes, la E-cadhérine. La E-cadhérine est un récepteur transmembranaire exprimé par certaines

cellules épithéliales. Il assure la cohésion des cellules au niveau des jonctions adhérentes. Ces jonctions sont formées par l'interaction homophile, dépendante du calcium, des domaines extracellulaires de 2 molécules d'E-cadhérine de deux cellules adjacentes. Par conséquent, les molécules d'E-cadhérine présentes au niveau des jonctions intercellulaires ne présentent pas de domaines d'interactions « accessibles » pour *Listeria*. Certaines cellules de l'épithélium intestinal, comme les cellules caliciformes, sécrétrices du mucus intestinal, et certains entérocytes à l'apex des villosités intestinales (dans les zones d'extrusion de cellules épithéliales apoptotiques), expriment de la E-cadhérine sur leur surface apicale non impliquée dans des jonctions cellules-cellules et donc accessibles pour *Listeria*. Ces cellules constituent une porte d'entrée pour la traversée de l'épithélium intestinal par la bactérie (Figure 4). En effet, l'interaction entre InlA et la E-cadhérine au niveau apical des cellules épithéliales induit l'internalisation de *Listeria* dans une vacuole endocytique (voir paragraphe 2.1.2 pour la description des mécanismes moléculaires impliqués). Cette vacuole est ensuite transférée par un mécanisme de type transcytose au pôle basal de la cellule grâce au réseau de microtubules. La bactérie est alors libérée de l'autre côté de la barrière intestinale, au niveau de la *lamina propria* (Lecuit, 2001; Nikitas et al., 2011; Pentecost et al., 2006).

La traversée de la barrière intestinale peut aussi se faire par les cellules M au niveau des plaques de Peyer. Les plaques de Peyer sont des organes lymphoïdes secondaires situés dans la partie distale de l'intestin grêle. Ils sont formés d'agrégats de follicules lymphoïdes (riches en lymphocytes B), entourés d'une zone riche en lymphocytes T et séparés de la lumière intestinale par un épithélium riche en cellules M. Ces cellules M échantillonnent le contenu intestinal et transfèrent les antigènes présents dans la lumière vers les cellules présentatrices d'antigènes sous-jacentes. *Listeria* peut être endocytée par ces cellules M et transférée dans la muqueuse sous-jacente (Corr et al., 2006; Pron et al., 1998). Cette voie d'entrée « passive » pour la bactérie est « InlA-indépendante ». Elle est cependant considérée comme moins efficace que la voie d'entrée « InlA-dépendante » et ne serait pas liée à une dissémination systémique importante (Melton-Witt et al., 2012).

Une fois passée la barrière intestinale, *Listeria* accède ensuite aux ganglions lymphatiques mésentériques, puis au foie et à la rate par le système circulatoire. La majorité des bactéries est alors phagocytée et dégradée par les macrophages résidents dans ces organes (notamment les cellules de Kupffer dans le foie). Certaines bactéries peuvent cependant échapper à la dégradation et se répliquer dans ces macrophages ou envahir activement et se multiplier dans des cellules non-phagocytaires comme les hépatocytes.

La réplication de *Listeria* dans le foie induit une réponse immunitaire complexe, dynamique et modifie profondément la population de macrophages résidents. Les cellules de Kupffer et les hépatocytes infectés secrètent des chémokines permettant le recrutement de

neutrophiles et de macrophages circulants et la formation de micro-abcès. Chez les individus immunocompétents, des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques sont recrutés au niveau de ces micro-abcès et détruisent les cellules infectées, permettant ainsi la résolution de l'infection (Vazquez-Boland et al., 2001). Les macrophages circulants recrutés aux foci d'infection ont un rôle majeur dans le retour à l'homéostasie. Une fois recrutés, ces macrophages adoptent un profil bactéricide et pro-inflammatoire. Ils se répliquent ensuite intensément sous l'action coordonnée des chémokines secrétées par les hépatocytes et par les neutrophiles pour remplacer les cellules de Kupffer mortes par nécroptose lors de l'infection. Les macrophages adoptent ensuite un profil anti-inflammatoire et participent au retour à l'homéostasie et à au renouvellement du pool de macrophages hépatiques (Blériot et al., 2015).

Chez les individus immunodéprimés, l'infection n'est pas contenue. Les bactéries se multiplient, retournent dans la circulation sanguine puis traversent la barrière hémato-encéphalique, causant des méningites, ou, chez la femme enceinte, traversent la barrière foeto-placentaire pour atteindre le fœtus.

1.3.3. Traversée de la barrière hémato-encéphalique et infection du système nerveux central

Les cas de méningites et d'encéphalites représentent 22% des cas de listériose en France (Lecuit et al., 2015) et sont dus à la traversée de la barrière hémato-encéphalique (BHE) par *Listeria*. Les bactéries pathogènes peuvent traverser la BHE par transcytose, paracytose, transmigration d'une cellule infectée (souvent un macrophage circulant) ou rupture de la BHE (Doran et al., 2013). Les mécanismes utilisés par *Listeria* ne sont pas élucidés mais plusieurs hypothèses ont été avancées.

Il a été montré que *Listeria* était capable d'induire son entrée dans des modèles *in vitro* de cellules endothéliales de vaisseaux cérébraux (HBMEC) puis de se répliquer dans ces cellules. Il a aussi été montré que la bactérie pouvait infecter des macrophages et, grâce à des modèles de co-culture *in vitro*, pouvait passer d'un macrophage infecté à un autre type cellulaire (cellules épithéliales, fibroblastes ou HBMEC) (Greiffenberg et al., 1998).

Plusieurs études *in vivo* ont mis en évidence des cas de transmigration de macrophages infectés par *Listeria* (stratégie de type « cheval de Troie ») (Drevets et al., 2004; 2010). En effet, *Listeria* a la capacité de survivre dans le cytoplasme de macrophages circulants. Ceux-ci serviraient ensuite de cargo pour rejoindre la BHE puis, par transmigration, permettraient d'atteindre le système nerveux central (Drevets et al., 2004; 2010). En parallèle, il a été proposé que *Listeria* puisse modifier l'expression de récepteurs de surface des cellules infectées, et induire le recrutement de cellules leucocytaires (Wilson and Drevets, 1998). Ceci permettrait la création d'un environnement inflammatoire qui

déstabiliserait la BHE et favoriserait le passage de *Listeria* vers le système nerveux central (Disson and Lecuit, 2012). La création d'un modèle d'étude *in vivo* pertinent pour étudier la traversée de la barrière hémato-encéphalique et le tropisme neural de *Listeria* lors de la neurolistériose reste encore à développer (Disson and Lecuit, 2013). On peut toutefois noter l'existence d'un modèle d'infection *in vitro* à partir de cultures de coupes de cerveaux de bovins mimant la diversité et la complexité des types cellulaires encéphaliques (Guldimann et al., 2012).

1.3.4. Mécanisme de traversée de la barrière materno-fœtale

La traversée de la barrière materno-fœtale se fait au niveau du syncytiotrophoblaste, une couche de cellules fusionnées les unes avec les autres constituant la surface d'échange principale entre les circulations sanguines maternelle et fœtale. Contrairement à la traversée de la barrière intestinale, dépendante uniquement d'InIA, l'entrée de *Listeria* au niveau du syncytiotrophoblaste requiert l'action conjointe d'InIA et d'une autre internaline de surface de la bactérie, InIB, qui interagit avec c-Met (hepatocyte growth factor receptor), un récepteur transmembranaire exprimé à la surface des cellules hôtes (voir paragraphe 2.1.2 pour la description des mécanismes moléculaires impliqués) (Disson et al., 2008; Dramsi et al., 1995; Khelef et al., 2006; Vazquez-Boland et al., 2001). La nécessité de ces deux internalines s'explique par le fait que l'entrée dépendante d'InIA requiert l'activation de la Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) de l'hôte. Cette kinase est activée constitutivement dans les cellules intestinales mais est peu active dans les cellules du syncytiotrophoblaste. L'interaction entre InIB et c-Met permet d'induire l'activation de la PI3K, ce qui potentialise l'entrée dépendante d'InIA (Gessain et al., 2015). *Listeria* colonise ensuite le placenta, où elle provoque des abcès et des chorioamniotites (infection aiguë de la cavité amniotique), puis le fœtus (par la circulation fœtale ou l'ingestion de liquide amniotique contaminé). Ces atteintes sont associées à des accouchements prématurés, des avortements et des infections périnatales à forte mortalité (Lecuit, 2007).

2. Réplication intracellulaire de *Listeria*

Dans le cas de la traversée de la barrière intestinale, *Listeria* pénètre dans les cellules, les traverse à l'intérieur d'une vacuole d'internalisation, puis est libérée vers la lamina propria par exocytose. La bactérie n'est dans ce cas pas libre dans le cytoplasme de la cellule. Dans d'autres types cellulaires *in vitro*, *Listeria*, après avoir induit son internalisation, peut s'échapper de la vacuole qui la contient grâce à l'action coordonnée de la LLO et des phospholipases (PlcA et PlcB). Une fois libre dans le cytoplasme, *Listeria* se réplique puis se déplace dans le cytosol en polymérisant l'actine de la cellule de l'hôte grâce à une

protéine de surface nommée ActA (Kocks et al., 1992). La force conférée par la polymérisation d'actine permet à la bactérie de déformer la membrane plasmique de la cellule infectée, de former une protrusion et de passer dans la cellule adjacente. *Listeria* se retrouve alors dans une vacuole à double membrane dite « secondaire » dont elle pourra s'échapper de nouveau (Figure 5). Ce cycle de réplication intracellulaire permet à *Listeria* de se propager dans un tissu ou un organe en évitant le système immunitaire circulant (Tilney and Portnoy, 1989).

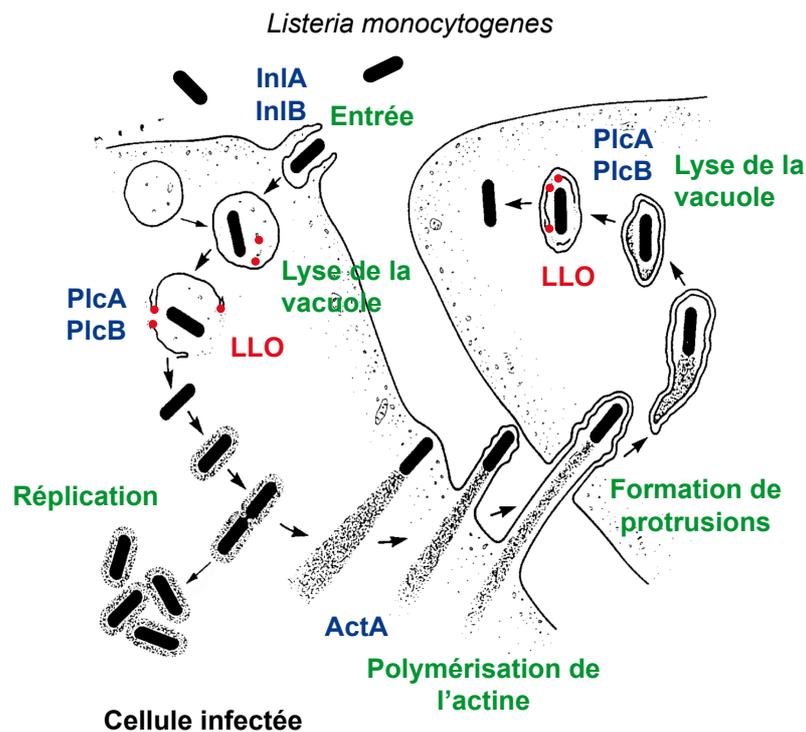


Figure 5. Cycle intra-cellulaire de *Listeria*. Etapes successives du cycle intracellulaire de *Listeria* (en vert) et principaux facteurs de virulence associés (en bleu et rouge) (figure adaptée de Tilney and Portnoy, 1989).

2.1. Principaux facteurs de virulence de *Listeria* associés au cycle de réplication intracellulaire

2.1.1. Contrôle de l'expression des facteurs de virulence par PrfA

PrfA est un facteur de transcription contrôlant le passage d'un mode de vie « saprophyte » à un mode « pathogène » chez *Listeria*. Il régule l'expression de gènes de virulence majeurs comme les gènes de l'îlot de pathogénicité 1 de *Listeria* ou LIPI-1 (*Listeria* Pathogenicity island 1), à savoir *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA*, *plcB* et *orfX*, le locus comprenant *inIA* et *inIB*, le gène *inIC* et le gène *hpt* (Scotti et al., 2007; Vazquez-Boland et al., 2001) (Figure 6). PrfA induit la transcription des gènes cibles en se liant à une séquence consensus située environ 35 pb en amont du promoteur de ces gènes. L'expression et l'activité de PrfA sont régulées à plusieurs niveaux. La transcription de *prfA* est activée par le facteur de réponse au stress sigma B et, par rétrocontrôle positif, par PrfA lui-même (Figure 6). La traduction de *prfA* est sous contrôle d'un « thermosenseur » et d'un riboswitch dépendant du S-adenosylmethionine. Le thermosenseur agit en *cis* et est situé dans l'extrémité 5'UTR (UnTranslated Region) de *prfA*. Il adopte en dessous de 30°C une conformation empêchant la fixation du ribosome sur la séquence Shine-Dalgarno de *prfA*. Le riboswitch dépendant du S-adenosylmethionine est situé dans l'extrémité 5'UTR de *sreA* et *sreB* et agit en *trans* sur l'extrémité 5'UTR de *prfA*, empêchant la reconnaissance de la séquence Shine-Dalgarno (Johansson et al., 2002; Loh et al., 2009). Enfin, l'activité de PrfA est régulée de façon allostérique par le glutathion, un cofacteur produit par *Listeria* mais aussi par la cellule hôte, permettant une activation optimale du facteur de transcription lors du cycle intra-cellulaire de la bactérie (Reniere et al., 2015).

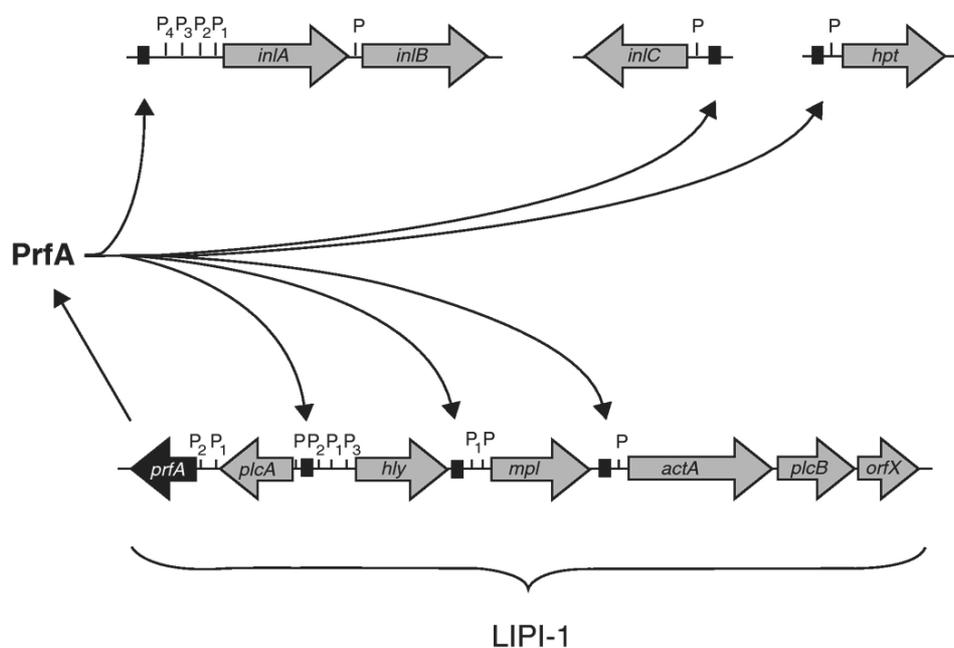


Figure 6. Régulation transcriptionnelle de la virulence par PrfA. Les gènes régulés par PrfA sont répartis sur 4 loci : l'îlot de pathogénicité 1 de *Listeria* (LIPI-1), l'opéron *inIAB* et les monocistrons *inIC* et *hpt*. Les sites de fixation de PrfA sont représentés par des carrés noirs et les promoteurs connus par un « P » (schéma issu de (Scotti et al., 2007))

2.1.2. Mécanismes d'entrée dans les cellules non-phagocytaires

L'entrée de *Listeria* dans des cellules non phagocytaires est déclenchée, comme décrit précédemment, par l'interaction d'InIA ou InIB avec leur récepteurs respectifs, l'E-cadhérine et c-Met. Cette interaction déclenche une cascade d'événements aboutissant au réarrangement du cytosquelette d'actine, le recrutement de la machinerie d'endocytose au niveau du récepteur engagé, puis l'internalisation de la bactérie par un mécanisme de type « zipper » (Figure 7) (Pizarro-Cerda et al., 2012).

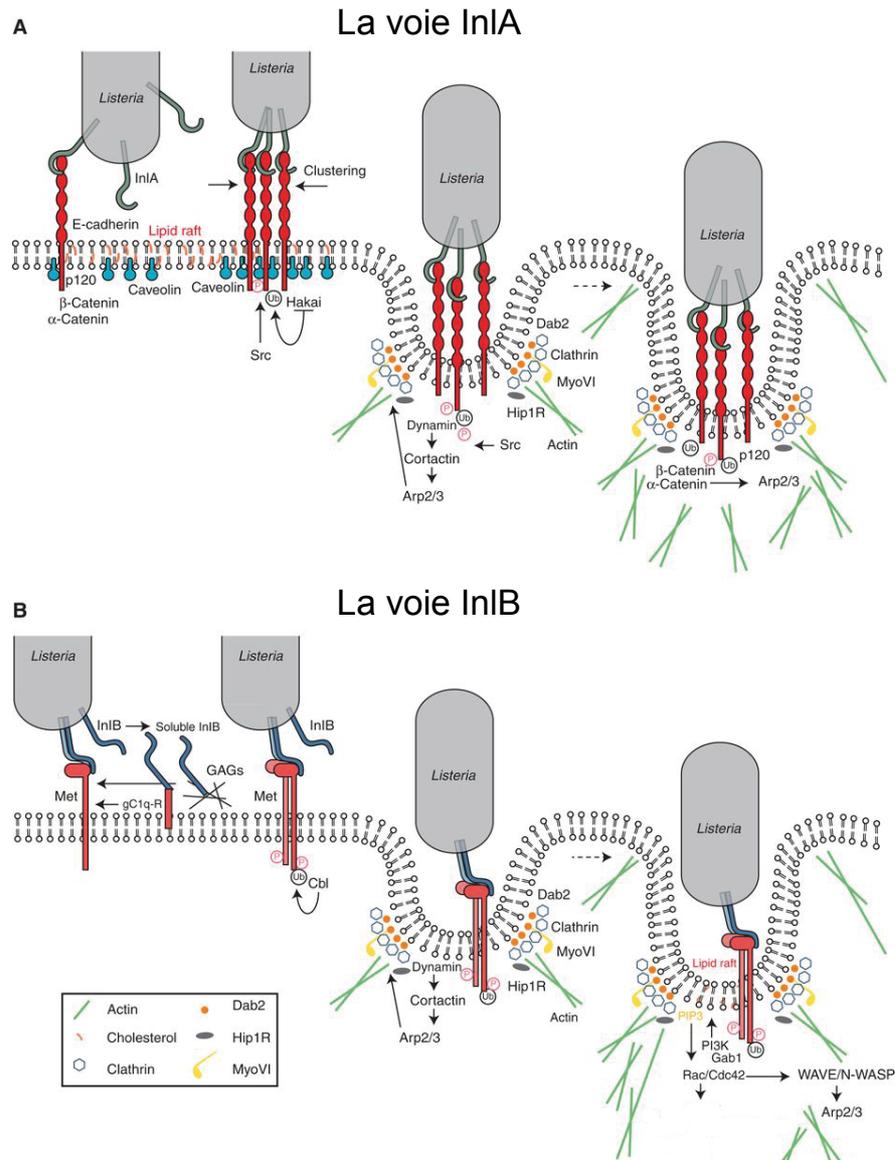


Figure 7. Entrée de *Listeria* dépendante des internalines : le mécanisme de « zipper ». Les voies d'entrée dépendantes d'InIA (A) et d'InIB (B) mettent en jeu plusieurs cascades de signalisation permettant le remodelage de l'actine et de la membrane (illustration issue de (Pizarro-Cerda et al., 2012)).

Les protéines InIA et InIB appartiennent à une famille regroupant près de 25 protéines chez *Listeria* caractérisées par la présence d'un domaine « internaline » en N-terminal. Ce domaine comprend une séquence signal de sécrétion, une coiffe stabilisatrice (« cap » domain) et des répétitions riches en leucine (Leucin Rich Repeat ou LRR). Les motifs LRR (d'une vingtaine d'acides aminés) sont essentiels pour l'interaction avec les récepteurs de ces protéines. Ces motifs forment une unité structurale qui consiste en un feuillet β suivi d'une hélice α . Le nombre de motifs LRR participe à la conformation du domaine internaline (Figure 8). Le mode d'ancrage des internalines à la paroi de *Listeria* varie et regroupe les internalines en 3 familles : les internalines à motif LPXTG liées de façon covalente à la membrane, les internalines à motif GW et WxL, et les internalines sécrétées (Bierne et al., 2007). InIA est une internaline à motif LPXTG. Une fois transloquée à la membrane, son motif LPXTG est reconnu et clivé par la Sortase A entre la thréonine et la glycine puis l'internaline est transférée au peptidoglycane en formation grâce à l'activité transpeptidase de la Sortase A. InIB fait partie de la famille des internalines à motif GW. Une fois sécrétée, elle est retenue dans la paroi grâce à l'interaction entre son domaine GW et les acides lipotéichoïques (Jonquieres et al., 1999). A noter que l'interaction avec la paroi bactérienne est faible et que la liaison aux récepteurs à la surface de l'hôte (comme c-Met décrit plus bas) induit ou requiert le détachement d'InIB de la paroi bactérienne. Cette protéine agirait alors en tant que facteur soluble à l'interface entre les surfaces de l'hôte et de la bactérie (Jonquieres et al., 2001).

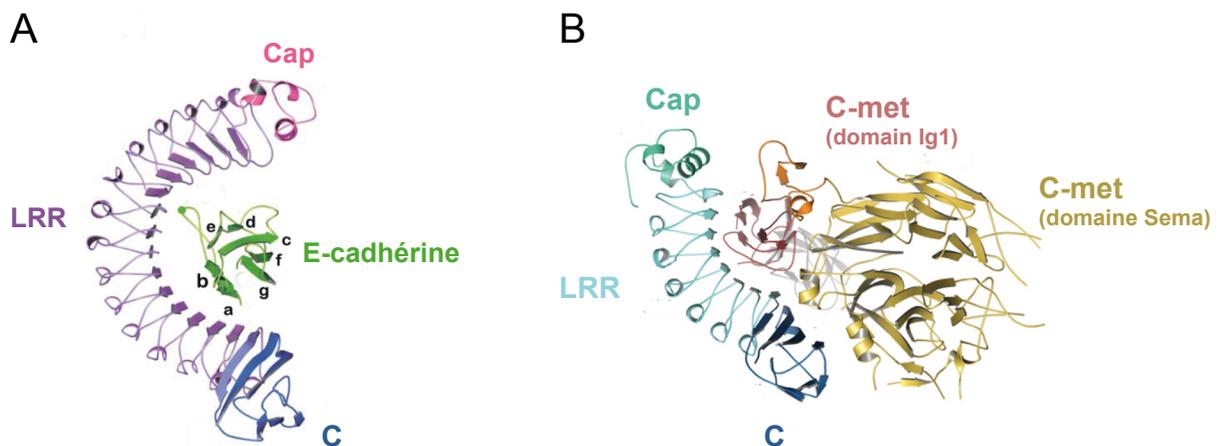


Figure 8. Structure des domaines internalines d'InIA et B en complexe avec leurs récepteurs. (A) InIA en complexe avec le domaine N-terminal de l'E-cadhérine humaine (en vert). InIA possède en N-terminal une coiffe (en rose) puis les 15 LRR (en violet) qui opèrent la liaison avec la E-cadhérine, et un domaine globulaire (en bleu) qui se prolonge en direction de la paroi (structure tirée de (Schubert et al., 2002)). (B) InIB en complexe avec C-met (en jaune et rouge). InIB possède une coiffe (en vert claire) en N-terminal puis 7 LRR (en bleu claire) qui opèrent la liaison avec le domaine Ig1 de c-Met, et un domaine globulaire (en bleu) qui se prolonge en direction de la paroi (structures tirée de (Niemann et al., 2007)).

InIA et E-cadhérine

Comme décrit précédemment, l'E-cadhérine est un récepteur transmembranaire exprimé par certaines cellules épithéliales et impliqué dans la formation des jonctions adhérentes entre deux cellules adjacentes. Le domaine cytoplasmique des E-cadhérines est ancré au réseau d'actine par l'intermédiaire des caténines (α , β et p120). La présence de ce récepteur à la surface des cellules est régulée de façon dynamique par endocytose et recyclage intra-cellulaire (Fujita et al., 2002). Cette dynamique met en jeu une cascade de signalisation qui est détournée par *Listeria* pour induire son internalisation (Figure 7.A).

Le domaine LRR de la protéine InIA, présent à la surface de la bactérie, interagit avec le domaine extracellulaire des E-cadhérines libres (non engagées dans une liaison homophilique) (Schubert et al., 2002). Il s'ensuit une agglomération des complexes InIA/E-cadhérine au niveau de radeaux lipidiques de la membrane de l'hôte, qui activent différentes voies de signalisation comme la voie des caténines et la voie Src aboutissant au remodelage du cytosquelette d'actine par le complexe Arp2/3 et permettant l'entrée de *Listeria* (Lecuit et al., 2000),(Seveau, 2004),(Sousa et al., 2005).

La liaison InIA/E-cadhérine active une autre voie de remodelage d'actine proche de celle impliquée dans la formation des jonctions d'adhérence (Bonazzi et al., 2012). Cette voie est dépendante de la tyrosine kinase Src et du recrutement de la clathrine. La kinase Src a deux rôles : elle phosphoryle à la fois la cortactine, qui recrute Arp2/3 à la membrane (Sousa et al., 2007), et le domaine cytoplasmique de l'E-cadhérine. L'E-cadhérine phosphorylée est ensuite ubiquitylée grâce au recrutement de l'E3 ubiquitine-ligase Hakai (Bonazzi et al., 2008). L'E-cadhérine ubiquitylée recrute ensuite différents partenaires : l'adaptateur Dab2, la clathrine, Hip1R (un partenaire liant l'actine) et la myosine VI (Bonazzi et al., 2011). Des amas de clathrine sont alors formés au niveau du point d'entrée de *Listeria*, permettant le recrutement d'Arp2/3 puis le remodelage du cytosquelette d'actine en faisceaux. La myosine VI fournit alors la force motrice nécessaire à la déformation de la membrane et l'internalisation de *Listeria*.

InIB et c-Met

Le récepteur c-Met est un récepteur à tyrosine kinase transmembranaire exprimé dans la plupart des cellules épithéliales et endothéliales (Cossart, 2002). Son seul ligand endogène connu est le facteur de croissance des hépatocytes (Hepatocyte Growth Factor ou HGF) et sa liaison à c-Met induit la dimérisation et l'autophosphorylation du récepteur. Il a été montré qu'InIB peut se lier à c-Met grâce à son domaine LRR, mimant ainsi l'activation normalement induite par HGF, et induisant l'entrée de *Listeria* par remodelage du cytosquelette de l'hôte (Niemann et al., 2007; Shen et al., 2000) (Figure 7.B).

Comme lors de l'interaction InIA/E-cadhérine, ce remodelage nécessite le recrutement de la clathrine. L'autophosphorylation du domaine cytoplasmique de c-Met permet le recrutement de l'ubiquitine ligase Cbl qui ubiquityle c-Met et permet la formation d'un manteau de clathrine, comme précédemment décrit, et la polymérisation de l'actine par Arp2/3 (Bonazzi et al., 2011; Ireton et al., 1999; Veiga et al., 2007).

Une autre vague de réarrangement du cytosquelette d'actine spécifique à la voie InIB met en jeu l'activation de PI3K. La phosphorylation de c-Met permet le recrutement des adaptateurs protéiques Gab1, Cbl et Shc qui recrutent ensuite la PI3K (Ireton et al., 1996). La fonction de la PI3K est de phosphoryler les phosphoinositides, une classe de phospholipides agissant comme messagers secondaires dans de nombreuses voies de signalisation cellulaire. L'agrégation de complexes InIB/c-Met au niveau de radeaux lipidiques de la membrane de l'hôte permet l'accumulation locale des phosphoinositides, qui seront phosphorylés par la PI3K, et le recrutement de facteurs permettant la polymérisation d'actine par Arp2/3, facilitant ainsi l'entrée de *Listeria* (Pizarro-Cerda et al., 2012; Seveau, 2004; Seveau et al., 2007).

2.1.3. Rôle des protéines bactérienne LLO, PlcA et PlcB dans la sortie de la vacuole

Suite à son entrée dans les cellules de l'hôte, *Listeria* est enfermée dans une vacuole d'internalisation. Elle est capable de sortir de cette vacuole et d'atteindre le cytoplasme de la cellule hôte. La sortie de la vacuole fait intervenir la Listériolysine O (LLO), une toxine permettant la formation de pores dans la membrane de la vacuole, et 2 phospholipases bactériennes (PI-PLC et PC-PLC). Lors de la phagocytose de *Listeria* par des macrophages, la LLO forme des pores dans la membrane du phagosome. Ces pores perturbent le pH des vacuoles ainsi que leur concentration en calcium, empêchant ainsi leur maturation et leur fusion avec les lysosomes (Henry et al., 2006; Shaughnessy et al., 2006).

La Listériolysine O

La LLO est codée par le gène *hly* de *Listeria*. Cette toxine confère un caractère hémolytique à *Listeria* et a été très rapidement décrite comme nécessaire à la virulence *in vivo* en permettant la sortie des vacuoles primaires et secondaires (Cossart et al., 1989; Gaillard et al., 1986; Portnoy et al., 1988). Elle appartient à la famille des cytolysines dépendantes du cholestérol (Cholesterol Dependent Cytolysine ou CDC), principalement produites par des bactéries de type Gram-positif comme *Clostridium*, *Streptococcus* et *Listeria*. Ces toxines possèdent de fortes homologies de séquences entre elles (40% à 70%), une structure tridimensionnelle et un mécanisme d'action conservé. Un monomère de LLO (ou d'une autres CDC) comprend un peptide signal (clivé lors de la sécrétion) et 4 domaines D1 à D4 :

les domaines D1 et D3 portent la fonction perforatrice et le domaine D2 les lie au domaine D4 qui permet la fixation à la membrane (Figure 9.A et 9.B). La LLO se fixe au cholestérol des membranes de l'hôte via la thréonine 515 et la leucine 516 du domaine D4 (Farrand et al., 2010). Les monomères associés aux membranes s'oligomérisent ensuite de façon séquentielle pour former des « pré-pores » en anneau (36 monomères en moyenne) ou en arc (20 monomères en moyenne) (Figure 9.D) (Leung et al., 2014; Ruan et al., 2016). L'oligomérisation et la stabilisation du « pré-pore » seraient facilitées par les charges complémentaires des domaines D1 et D3 à l'interface entre deux monomères (Köster et al., 2014). Une fois ces « pré-pores » formés en anneau ou en arc, les monomères subissent simultanément plusieurs changements de conformation permettant la formation du pore proprement dit. Tout d'abord, le domaine D3 de chaque monomère s'allonge. Plus précisément, les deux structures TMH1 et TMH2 (Trans Membrane Hairpin) du domaine D3 passent d'une structure hélice-tour-hélice à une structure en épingle à cheveux β amphiphatique qui sont les unités structurales du « tonneau β » qui formera le pore inséré dans la membrane (Shatursky et al., 1999). Les données cristallographiques et de microscopie électronique montrent que le domaine D2 subit ensuite une rotation vers la membrane et entraîne avec lui les domaines D1 et D3 dans un « effondrement vertical » (vertical collapse) (Reboul et al., 2014). Les motifs TMH1 et TMH2 sont alors insérés dans la membrane de l'hôte et forment avec les autres domaines adjacents cette structure en « tonneau β » dont la face interne, hydrophile, favorise l'éjection de la membrane. Lors de la formation d'arc par les monomères, il y a possibilité de former des pores délimités pour un côté par la LLO et pour l'autre côté par la membrane de l'hôte.

Une des particularités de la LLO réside en son activité optimale dans les vacuoles endocytiques et phagocytaires (Schnupf and Portnoy, 2007). En effet, la LLO est la seule CDC dont l'activité est décrite comme étant directement sensible au pH (elle est principalement active à pH acide). Cette sensibilité au pH est rendue possible par la présence d'une « triade acide » formée par les acides aminés Glu-247, Asp-208 et Asp-320 (Bavdek et al., 2011; Glomski et al., 2002; Schuerch et al., 2005). Ces acides aminés sont uniquement présents chez *Listeria* et sont situés près des domaines TMH. A pH neutre et à 37°C (conditions rencontrées dans le cytoplasme des cellules infectées), ces acides aminés sont déprotonés et induisent un changement irréversible de conformation de la LLO qui ne peut alors plus s'oligomériser ni former de pores (Köster et al., 2014; Podobnik et al., 2015). Cette dénaturation de la LLO est cependant un processus lent (plusieurs minutes) permettant aux monomères sécrétés par des *Listeria* extra-cellulaires de conserver quelques temps leur activité (Seveau, 2014).

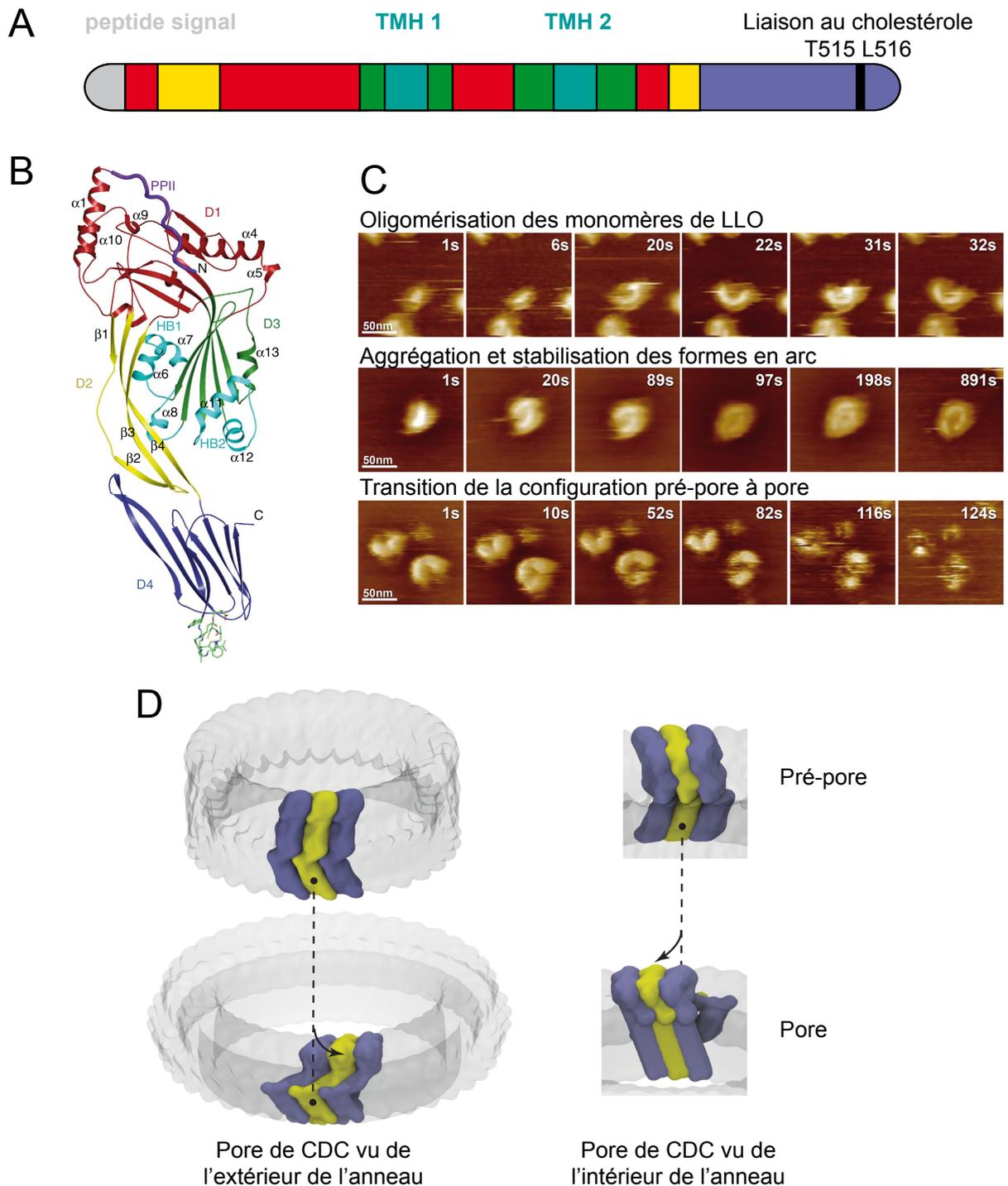


Figure 9. Structure et fonctionnement de la Listeriolysine O. (A) Représentation schématique des différents domaines de LLO. Le peptide signal est indiqué en gris, le domaine D1 en rouge, le domaine D2 en jaune, le domaine D3 (qui comprend les TMH1 et TMH2 en azur) en vert puis le domaine D4 en violet. (B) Structure cristallographique de la LLO (tirée de (Köster et al., 2014)). Le code couleur est le même qu'en (A). (C) Cinétique d'assemblage des pores de LLO observée en microscopie à force atomique à haute vitesse (HS-AFM, image tirée de (Ruan et al., 2016)). Les monomères de LLO s'oligomérisent en pré-pore (en arc ou en cercle) en quelques dizaines de secondes. Les arcs adjacents peuvent s'associer de façon stable avant la transition de pré-pore à pore. (D) Modélisation 3D du passage de pré-pore à pore (figure tirée de (Reboul et al., 2014)). A gauche, une vue de l'extérieur de l'anneau de CDC. On peut observer la torsion du domaine D2 qui permet «l'effondrement vertical» de la structure. A droite, une vue de l'intérieur de l'anneau de CDC qui met en évidence le changement de conformation des domaines TMH1 et TMH2 qui s'insèrent dans la membrane. La flèche permet d'imager le mouvement emprunté par les domaines D1 et D3 par rapport au domaine D4 pendant la transition pré-pore à pore.

Les phospholipases

Les phospholipases PI-PLC et PC-PLC (codées par *plcA* et *plcB*, respectivement) secrétées par *Listeria* participent, avec la LLO, à la destruction des vacuoles d'internalisation. Le besoin de ces enzymes pour la rupture vacuolaire dépend du type cellulaire infecté. Dans la plupart des cellules phagocytaires, la LLO est strictement nécessaire à la sortie de la vacuole (Portnoy et al., 1988), les phospholipases favorisent quant à elles la rupture de la vacuole d'internalisation mais ne sont pas à elles seules suffisantes pour permettre la rupture (Raveneau et al., 1992; Smith et al., 1995). Dans les cellules épithéliales comme les HeLa, des mutants n'exprimant pas la LLO peuvent s'échapper de la vacuole et se répliquer dans la cellule infectée. Dans ce cas, la rupture des vacuoles primaires et secondaires est accomplie par les phospholipases (Gründling et al., 2003; Marquis et al., 1995; Smith et al., 1995). Ces deux lipases ont une activité optimale à pH acide qui correspond à l'environnement rencontré dans les vacuoles d'internalisation. Elles y hydrolysent la liaison ester entre le glycérol et le phosphate du groupe polaire des phospholipides des membranes, ce qui permet de déstabiliser la bicouche lipidique de la vacuole d'internalisation. PI-PLC est spécifique des phosphatidylinositols (Leimeister-Wächter et al., 1991) alors que la PC-PLC a un spectre de substrat plus étendu mais ne cible pas les phosphatidylinositols (Geoffroy et al., 1991; Huang et al., 2016). Alors que la PI-PLC est directement activée après sécrétion, la PC-PLC est retenue dans la paroi sous la forme d'une pro-lipase. L'acidification de la vacuole permet l'activation d'une métalloprotéase sécrétée par *Listeria*, nommée Mpl, qui clive, libère et active la PC-PLC (Raveneau et al., 1992; Snyder and Marquis, 2003; Yeung et al., 2005).

2.1.4. Adaptation au milieu intra-cellulaire

Une fois sortie de la vacuole d'internalisation, *Listeria* se réplique dans le cytoplasme des cellules infectées avec un temps de doublement d'environ 50 minutes (Gaillard et al., 1987). L'accès au cytoplasme de la cellule constitue un changement de milieu drastique pour *Listeria* qui adapte rapidement son métabolisme en conséquence. Le milieu intra-cellulaire s'apparente à un milieu de culture riche que *Listeria* utilise comme source de carbone et d'acides aminés (Eylert et al., 2008; Marquis et al., 1993). Des études transcriptomiques ont montré que l'expression de 17 % à 20 % des gènes bactériens est modifiée lors de la phase intra-cellulaire afin d'adapter le métabolisme bactérien. Ces modifications d'expression concernent des gènes mis en jeu dans l'acquisition et le catabolisme du glycérol, du glucose-6-phosphate ou l'éthanolamine de l'hôte. Ceci aboutit à l'inhibition de la glycolyse en faveur de la voie des pentose-phosphates (Chatterjee et al., 2006; Joseph et al., 2005).

2.1.5. ActA et motilité intra-cytoplasmique

En parallèle de la phase de réplication intracytosolique, *Listeria* peut s'entourer d'un réseau de filaments d'actine et de protéines liant l'actine. Rapidement, ces filaments s'organisent en comètes à partir d'un pôle de la bactérie, ce qui permet le déplacement de *Listeria* dans le cytoplasme (Gouin et al., 1999; 2005). Cette réorganisation locale de l'actine de l'hôte est possible grâce à la protéine bactérienne ActA (Kocks et al., 1993). ActA est une protéine exprimée à la surface de *Listeria* qui mime les protéines de l'hôte de la famille des Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP) et permet le recrutement et l'activation de la protéine Arp2/3 (Welch et al., 1997; 1998). Arp2/3 permet la nucléation et la polymérisation de l'actine en faisceaux denses à partir d'un pôle de la bactérie (Lambrechts et al., 2008). La modélisation de ces faisceaux à partir de cryo-électro-tomographies a récemment permis de caractériser les forces impliquées dans la propulsion de la bactérie. Le réseau extrêmement dense et ramifié d'actine à l'arrière des bactéries rappelle celui observé dans les fibres de stress ou les filopodes des cellules eucaryotes. Ce réseau s'accumule et se densifie autour de la bactérie en augmentant les tensions à sa surface. La libération de ces tensions génère la force de propulsion utilisée par *Listeria* (Figure.10) (Jasnin and Crevenna, 2016; Jasnin et al., 2013).

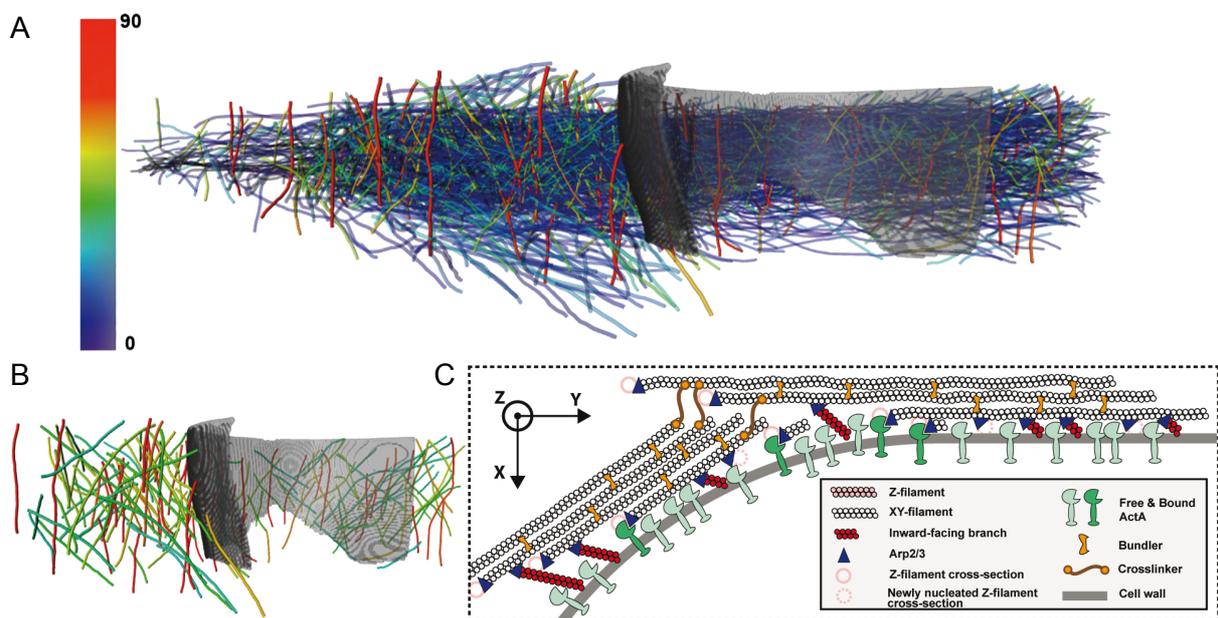


Figure 10. Mécanisme de polymérisation des comètes d'actine. Reconstruction 3D à partir de cryo-électro-tomographies du réseau de filament d'actine constituant la comète entourant la bactérie. (A) La bactérie est vue de côté, les filaments dans l'axe horizontal de la bactérie sont représentés en bleu (0° de déviation par rapport à l'axe de la bactérie) : les filaments sont parallèles à l'axe ou rouge (90° de déviation, les filaments sont perpendiculaires à la bactérie). (B) La bactérie est vue de côté, seuls les filaments perpendiculaires à l'axe horizontal de la bactérie sont représentés. (C) Modèle de la propulsion bactérienne par polymérisation d'actine (bactérie vue de dessus). Les filaments sont polymérisés parallèlement à l'axe de la bactérie (XY-filament) puis perpendiculairement (Z-filament) à l'axe horizontal. L'accumulation de filaments orientés vers la bactérie crée un réseau de faisceaux d'actine dont la densité génère les forces de propulsion (figures tirées de Jasnin et al., 2013).

ActA, et plus généralement la mobilité intra-cellulaire de *Listeria*, est cruciale pour l'infection car elle permet la dissémination de la bactérie de cellule en cellule. En effet, la propagation de *Listeria* vers des cellules adjacentes est possible lorsque la bactérie, en mouvement, atteint la membrane plasmique de la cellule infectée. *Listeria* forme alors une protrusion vers la cellule adjacente où elle pénètre et se retrouve enfermée dans une vacuole dite secondaire à double membrane dont elle s'échappe grâce à l'action combinée de la LLO, de la PI-PLC et de la PC-PLC. Un mutant $\Delta actA$, incapable de se mouvoir et de se propager de cellules à cellules, est complètement avirulent *in vitro* et *in vivo* (Birmingham et al., 2007; Domann et al., 1992; Kocks et al., 1992). En plus de participer à la polymérisation de l'actine, ActA permet également à *Listeria* d'éviter la dégradation par la voie de l'autophagie indépendamment de la mobilité intra-cellulaire. Cette protection est rendue possible grâce au recrutement par ActA des protéines de l'hôte N-VASP et Arp2/3. Celles-ci recouvrent la bactérie et empêchent les étapes clés de l'autophagie comme l'ubiquitylation de la bactérie et le recrutement de p62 et LC3 (Yoshikawa et al., 2009). Plus récemment, il a été montré qu'ActA, exprimée durant la phase intestinale de l'infection par *Listeria*, est nécessaire à la formation de biofilms de *Listeria* dans l'intestin. Les protéines ActA qui recouvrent les bactéries forment des liaisons homophiliques et favorisent ainsi l'agrégation des bactéries. La formation de ces biofilms augmente la rétention de *Listeria* dans l'intestin (Travier et al., 2013). ActA a aussi été montrée comme favorisant l'entrée de *Listeria* dans les cellules épithéliales (Suárez et al., 2001). Une souche de *Listeria innocua* non invasive exprimant ActA est capable d'envahir des cellules épithéliales. L'entrée prend place dans les microvilli qui favorisent l'adhésion de la bactérie et se réorganisent en structures semblables à des lamellipodes qui recouvrent progressivement la bactérie jusqu'à son internalisation. Une des hypothèses avancées par les auteurs pour expliquer son rôle dans l'entrée des bactéries serait qu'ActA lierait des héparanes sulfate à la surface de la cellule hôte. Il est important de noter que ce processus est très semblable au processus dit de « viral surfing » utilisé par certains virus pour favoriser leur internalisation (Lehmann et al., 2005). Ceux-ci interagissent fortement avec les héparanes sulfate à la surface des filopodes de la cellule et, grâce au réseau d'actine F et de myosine sous-jacent, engagent un mouvement rétrograde jusqu'aux zones de forte endocytose (Oh et al., 2010).

La force générée par la polymérisation de l'actine n'est cependant pas la seule cause du passage de cellule à cellule : *Listeria* facilite ce processus en sécrétant différents facteurs et en détournant certaines machineries de l'hôte.

La protéine de l'hôte Tuba est ainsi ciblée par *Listeria* pour favoriser le passage de cellule à cellule. Tuba est une protéine impliquée dans le maintien de la forme des cellules de l'épithélium intestinal et dans les jonctions serrées entre ces cellules (Otani et al., 2006). InIC, une internaline sécrétée par *Listeria*, peut se lier à la protéine Tuba (Polle et al., 2014)

et empêcher son interaction avec les protéines N-WASP (Rajabian et al., 2009) ou COPII (Gianfelice et al., 2015). Ceci entraîne une déstabilisation des jonctions inter-cellulaires et une diminution de la tension corticale des cellules épithéliales, ce qui facilite la formation des protrusions.

Les mécanismes de formation des protrusions ne sont cependant pas encore totalement élucidés. Le complexe nucléateur d'actine Arp2/3 ne serait, par exemple, que partiellement mis en jeu dans la polymérisation d'actine dans les protrusions. A l'approche de la membrane, le complexe est en effet progressivement remplacé par un réseau de formines et de Rho-GTPases qui poursuivent la polymérisation des fibres d'actines en cours d'élongation (Fattouh et al., 2015). Une autre étude a proposé un nouveau modèle d'invasion des macrophages par formation de protrusion. Ce modèle implique les dommages faits à la membrane de la cellule hôte pendant la formation des protrusions (Czuczman et al., 2014). Ces dommages activeraient des récepteurs à la surface des macrophages adjacents qui permettraient l'endocytose de la protrusion, considérée alors comme un fragment de cellule morte, et de la bactérie qu'elle contient par un mécanisme nommé « efférocytose ».

2.2. La LLO, le « couteau suisse » de *Listeria*

La LLO a initialement été décrite comme nécessaire à la sortie de *Listeria* de la vacuole d'internalisation mais son action n'est en fait pas restreinte à cette seule vacuole. La transcription du gène *hly* n'est pas limitée aux bactéries intracellulaires. Les bactéries extra-cellulaires peuvent sécréter de la LLO qui cible les membranes plasmiques des cellules hôtes. Malgré une activité optimale à pH acide (proche de 5), la LLO conserve une activité résiduelle dans le milieu extra-cellulaire (pH neutre ; 37°C), pour une courte période, et peut ainsi former des pores dans les membranes plasmiques (Bavdek et al., 2007; Vadia et al., 2011). Ces pores ont un fort potentiel d'activation de différentes voies de signalisation et modifient significativement la biologie de la cellule hôte, notamment en modulant les flux d'ions, comme le potassium ou le calcium (Repp et al., 2002), ou les phosphoinositides (SIBELIUS et al., 1996). Des études utilisant la toxine LLO purifiée ou des mutants de *Listeria* ne produisant pas la toxine ont ainsi montré que la LLO peut induire l'activation de la voie des MAP-kinases (Tang et al., 1996), la modification de l'expression de certaines cytokines (Nishibori et al., 1996), l'induction de la voie NF-KB (Kayal et al., 1999) ou l'activation de certains facteurs d'adhésion (Krüll et al., 1997).

La LLO joue d'autre part un rôle prépondérant dans les mécanismes utilisés par *Listeria* pour interférer avec le fonctionnement de différents organites de la cellule hôte.

La machinerie endocytique

Une étape cruciale et limitante du cycle intracellulaire de *Listeria* dans les cellules non-phagoctyaires est son internalisation. Les Internalines InlA et InlB permettent l'entrée de *Listeria* dans plusieurs types cellulaires par un mécanisme dit « en zipper ». Toutefois, il a aussi été montré que la LLO pouvait augmenter l'efficacité d'internalisation des bactéries dans des cellules épithéliales en induisant un influx de calcium intracellulaire (Dramsai and Cossart, 2003). Il a également été proposé que la LLO, seule, pouvait promouvoir l'entrée de bactéries dépourvues d'internalines en favorisant le recrutement de la machinerie d'endocytose (Vadia et al., 2011). Ce dernier mécanisme fait intervenir à la fois un influx de calcium et un efflux de potassium dû à la perforation de la membrane plasmique par la LLO (Vadia and Seveau, 2014).

Les mitochondries

Les mitochondries sont des organites essentiels de la cellule, nécessaires à la production d'ATP et à plusieurs voies métaboliques. Elles agissent aussi comme une plateforme de signalisation en intégrant une multitude de signaux et peuvent reprogrammer le destin de la cellule, notamment en déclenchant le processus d'apoptose. La morphologie de cet organe est extrêmement dynamique et corrélée à son activité. Durant l'infection par *Listeria*, le réseau mitochondrial subit une fragmentation transitoire (de 1h à 3h après infection), accompagnée par une perte du potentiel de membrane, une inhibition de la chaîne respiratoire et une chute de la production d'ATP (Stavru et al., 2011). Le facteur bactérien induisant cette fragmentation atypique est la LLO à travers la formation de pores perméables au calcium dans la membrane plasmique de la cellule hôte. Le processus canonique de fragmentation des mitochondries implique un complexe formé par le réticulum endoplasmique (RE), l'actine et la protéine Drp1. Celle-ci s'associe au récepteur mitochondrial Mff puis s'oligomérisent en spirale autour de la mitochondrie. La contraction de cette spirale de Drp1 permet la séparation des mitochondries. Durant l'infection, le récepteur mitochondrial Mff est dégradé, empêchant ainsi le recrutement de Drp1. La fragmentation des mitochondries est toutefois observée durant l'infection par *Listeria*. Cette fragmentation est atypique car elle implique toujours la contraction du RE et de l'actine mais sans recrutement de Drp1. D'autres protéines que Drp1 seraient donc impliquées dans ce processus atypique de fission mitochondriale, induit par la LLO (Stavru et al., 2013). La régulation de la dynamique mitochondriale est une étape importante pour le déroulement de l'infection : un réseau mitochondrial hyperfusionné favorise l'infection alors qu'un réseau pré-fragmenté diminue l'efficacité d'infection.

Le réticulum endoplasmique

Le RE est le siège de la synthèse, du repliement, des modifications post-traductionnelles et du tri des protéines en cours de sécrétion. Il contient, comme les mitochondries, une partie importante des stocks de calcium intracellulaire. En cas d'altération des fonctions du RE, la cellule subit un stress appelé « stress du réticulum endoplasmique » (stress RE), souvent caractérisé par une accumulation de protéines mal repliées. Cette accumulation déclenche la voie des *Unfolded Protein Response* (ou UPR) permettant de rétablir les fonctions du RE. Cette voie est contrôlée par 3 facteurs, PERK, ATF6 et IRE1, qui détectent le stress RE et activent des facteurs de transcription permettant un retour à l'homéostasie (Bravo et al., 2013; Schröder and Kaufman, 2005). Durant l'infection par *Listeria*, on peut observer une perte de marquage par la sonde « ER-tracker » (un marqueur fluorescent du RE) (Gekara et al., 2007), ainsi qu'une diminution de l'activation de PERK, ATF6 et IRE1 (Pillich et al., 2012), ce qui est caractéristique d'un stress RE et d'une activation de la voie UPR. La LLO extra-cellulaire est ici encore impliquée dans l'activation de cette voie. Toutefois, l'influx massif de calcium ne semble pas être à l'origine de la déstabilisation du RE (Gekara et al., 2007). Il a été montré que l'induction chimique de l'UPR défavorise l'infection par *Listeria*, indiquant un rôle protecteur de cette réponse cellulaire face à l'infection (Pillich et al., 2012). Ces résultats corroborent ceux d'une étude d'une autre toxine formant des pores, Cry1A, produite par *Bacillus thuringiensis* (Bischof et al., 2008). Cette toxine active la voie UPR, sans déclencher de stress RE, en activant la voie MAPK et en stimulant directement un facteur régulateur de l'UPR. Cette cascade permet à l'hôte de résister à l'action de la toxine Cry1A et constitue une réponse immunitaire innée.

Le noyau

L'ADN eucaryote est présent dans le noyau sous une forme condensée appelée chromatine dont la compaction influe sur l'accessibilité des gènes et leur transcription. La compaction de l'ADN est organisée autour de structures appelées nucléosomes comprenant une portion d'ADN (147 paires de bases) enroulée autour d'un octamère d'histones (histones H2A, H2B, H3 et H4 ; l'histone H1 stabilise quant à elle la compaction entre nucléosomes). La compaction des nucléosomes est régulée par des modifications post-traductionnelles des extrémités N-terminales des histones orientées à l'extérieur des nucléosomes. Les modifications des histones jouent un rôle prépondérant dans l'expression des gènes associés et constituent un système de régulations épigénétiques. Durant l'infection, *Listeria* altère les modifications post-traductionnelles des histones et peut ainsi reprogrammer l'expression génétique de la cellule hôte.

La perforation de la membrane plasmique par la LLO induit une déphosphorylation massive d'un résidu sérine des histones H3 (S10) et une déacétylation massive des histones H4 dans les étapes précoces de l'infection. Le signal induisant la déphosphorylation de H3 est l'efflux de potassium de la cellule induit par les pores de LLO. Il peut être reproduit partiellement en utilisant des ionophores au potassium (Hamon and Cossart, 2011). Les modifications post-traductionnelles d'histones induites par la LLO sont corrélées à une diminution de l'expression de gènes impliqués dans l'immunité (*cxc12*, une chemokine pro-inflammatoire ; *irf3*, un facteur de transcription de la voie interféron ; *dusp4*, un activateur de la voie MAPK ; *egr1*, un facteur de transcription impliqué dans la mise en place du système immunitaire) (Hamon et al., 2007). Il est important de noter que ces modifications sont aussi induites par d'autres toxines de la famille des CDC telles que la Perfringolysine (produite par *Clostridium perfringens*) et la Pneumolysine (produite par *Streptococcus pneumoniae*). Ces modifications d'histones pourraient donc constituer un mécanisme conservé par différents pathogènes pour réguler le transcriptome des cellules hôtes.

3. Protéolyse et pathogènes

3.1. La protéolyse, une modification post-traductionnelle essentielle

Au même titre que la phosphorylation, la méthylation ou l'ubiquitylation, la protéolyse est considérée comme un type particulier de modifications post-traductionnelles. Elle diffère cependant de ces dernières par son caractère irréversible. La protéolyse consiste en l'hydrolyse d'une ou plusieurs des liaisons peptidiques reliant les acides aminés d'une protéine. Elle peut être totale (on parle alors de dégradation) ou partielle. La protéolyse est une fonction biologique essentielle des cellules procaryotes et eucaryotes. Elle permet de retirer les peptides signaux des protéines et de les adresser à des compartiments spécifiques, d'activer des précurseurs protéiques, d'assurer l'équilibre de certaines voies métaboliques ou l'activation de voies de signalisation en régulant la quantité d'enzymes mise en jeu, d'éliminer les protéines endommagées et d'assurer le recyclage des acides aminés de la cellule. La protéolyse est nécessaire à de nombreux pathogènes pour envahir leur hôte, en inhibant le système immunitaire ou détournant les fonctions de certaines protéines de l'hôte (voir paragraphes suivants).

Les réactions de protéolyse sont catalysées par les enzymes appelées protéases (ou peptidases ou protéinases). Toutes les cellules vivantes possèdent des protéases qui sont répertoriées dans de multiples bases de données. La base de données MEROPS

(<http://merops.sanger.ac.uk/>) classe les protéases selon leur homologie de séquence primaire. Elle répertorie aussi les inhibiteurs de protéases existant chez de nombreux organismes. La base de données MEROPS indique que le génome humain code pour 1208 protéases (connues ou putatives) et que celui de *Listeria monocytogenes* code pour 267 protéases (connues ou putatives).

Le site actif d'une protéase comprend 2 à 3 résidus d'acides aminés (dyade ou triade catalytique) qui permettent de cliver une ou plusieurs liaisons peptidiques du substrat. Il existe plusieurs méthode de classification des protéases : selon la localisation du site de clivage du substrat ou selon le type catalytique. Si la protéase clive le substrat aux extrémités N- ou C-terminales libres, c'est une exopeptidase, sinon c'est une endopeptidase. Les exopeptidases sont sous-divisées selon l'extrémité qu'elles clivent, soit N-Terminale (aminopeptidase) soit C-terminales (carboxipeptidase), et le nombre d'acides aminés libérés avec l'extrémité (dipeptidyl-peptidase, tripeptidyl-peptidase, etc.).

La classification selon le type catalytique comprend 6 familles : les protéases à aspartate, glutamate, sérine, thréonine, cystéine ou les métalloprotéases. Les familles dépendent de la façon dont l'hydrolyse de la liaison peptidique est effectuée. L'hydrolyse est une réaction acido-basique : une attaque nucléophile est réalisée sur la liaison peptidique, ce qui induit la perte d'un proton puis l'hydrolyse de la liaison. Le type catalytique dépend de la nature du groupement qui réalise l'attaque nucléophile. Dans le cas des protéases à sérine, thréonine ou cystéine, le groupement nucléophile est soit une fonction hydroxyle (sérine et thréonine) soit une fonction thiol (cystéine). Dans le cas des protéases à aspartate, glutamate et des métalloprotéases, le groupement nucléophile est une molécule d'eau activée qui attaque la liaison peptidique. L'activation de cette molécule d'eau consiste en la réduction partielle d'un de ces atomes d'oxygène par un groupement carboxyle d'une chaîne latérale d'un acide aminé aspartate ou glutamate, ou par un ion métal lié à un acide aminé.

Il existe dans les cellules eucaryotes deux systèmes majeurs de dégradation des protéines par protéolyse. L'un est un complexe multiprotéique lié à la machinerie d'ubiquitylation appelé protéasome. L'autre est un organite acide, le lysosome, contenant plusieurs familles de protéases mais également des lipases, des nucléases et des glycosidases.

En plus du protéasome, d'autres classes de protéases sont retrouvées abondamment dans le cytoplasme comme les caspases et les calpaïnes. Les caspases sont des peptidases à cystéine clivant après un acide aspartique. Elles sont maintenues inactives dans le cytoplasme sous forme de pro-caspases et sont activées par clivage dans des structures oligomériques : l'inflammasome et l'apoptosome. Les calpaïnes sont des peptidases à cystéines dont l'activité est dépendante de la concentration en calcium. Elles sont mises en

jeu dans la transduction de signaux cellulaires, la mobilité cellulaire, le trafic des membranes ou, dans le cas d'une activation excessive, la mort cellulaire.

3.2. Le système ubiquitine-protéasome

Il s'agit du système primaire de dégradation des protéines eucaryotes. Il est formé par un complexe de protéases dont l'activité requiert l'hydrolyse d'ATP. Ce complexe permet le clivage des protéines en polypeptides qui seront ensuite digérés par des oligopeptidases.

Le protéasome possède une structure cylindrique et a une masse d'environ 2,5 MDa. Il est composé de 2 sous-complexes : un cœur catalytique (20S) et un complexe régulateur (19S). Le cœur catalytique est formé par 4 structures heptamériques circulaires superposées formées par les sous-unités α et β . Les sous-unités α ont un rôle structural (en permettant la liaison au complexe régulateur 19S) et les sous-unités β portent la fonction catalytique (protéases à sérine de type chymotrypsine). Le confinement de l'activité protéolytique est assuré par la structure du complexe, les sites catalytiques étant présents sur la face interne du complexe 20S (Figure 11).

L'activité est aussi restreinte par le complexe régulateur 19S qui assure la spécificité des substrats présentés au complexe catalytique ainsi que leur dépliement (nécessaire au passage dans le cylindre catalytique dont le diamètre est limité à 13 Å) qui est dépendant de l'hydrolyse d'ATP. Le complexe régulateur 19S est formé de 19 sous-unités formant deux sous-complexes : la « base » et le « couvercle ». L'hydrolyse de l'ATP est réalisée par 6 sous-unités qui forment la « base », fournissant l'énergie nécessaire à l'ouverture du canal et le dépliement de la protéine cible. Les sous-unités situées dans le « couvercle » sont des « ubiquitine ligases » et des déubiquitinases. Elles permettent la reconnaissance du substrat poly-ubiquitylé adressé au protéasome ainsi que le recyclage des chaînes d'ubiquitine associées au substrat.

L'ubiquitylation est une modification post-traductionnelle réversible. Elle consiste en la fixation covalente d'une ou plusieurs molécules d'ubiquitine (un petit polypeptide de 8,6 kDa) sur une protéine cible par l'intermédiaire d'une réaction mettant en jeu des enzymes d'activation (E1), des enzymes de conjugaison (E2) et des enzymes de liaison (E3). Les protéines cibles peuvent être modifiées sur les chaînes latérales des résidus lysine par une ubiquitine (mono-ubiquitylation) ou par plusieurs ubiquitines associées en chaîne (les ubiquitines étant elles-mêmes associées par leurs lysines K6, K11, K27, K29, K33, K48 ou K63). Les chaînes K48 sont le plus souvent des signaux d'adressage au protéasome (Ciechanover, 2005; Förster et al., 2013; Pickart and Cohen, 2004).

Les pathogènes bactériens peuvent détourner le système ubiquitine-protéasome en sécrétant des effecteurs dans la cellule hôte qui favorisent ou inhibent la dégradation de

différentes protéines. Ces bactéries peuvent ainsi soit réguler la demi-vie de certains de leurs effecteurs, soit modifier la demi-vie de facteurs de l'hôte jouant un rôle important dans l'infection.

Legionella pneumophila est un pathogène intracellulaire qui détourne les fonctions de l'hôte en sécrétant près de 300 effecteurs dans la cellule infectée. *Legionella* contrôle la machinerie d'ubiquitylation de l'hôte pour induire la dégradation par le protéasome de l'effecteur bactérien SidH (Kubori et al., 2010). Cet effecteur est sécrété dès les premières minutes d'infection et s'accumule dans le cytoplasme de l'hôte. *Legionella* sécrète ensuite LubX, une protéine similaire aux enzymes de liaison (E3) de l'hôte et qui lie spécifiquement SidH pour induire sa poly-ubiquitylation par des chaînes K-48 et sa dégradation par le protéasome.

Les facteurs de l'hôte ciblés de manière récurrente par les pathogènes sont souvent associés à la voie de l'inflammation NF- κ B (la régulation de cette voie reposant sur l'ubiquitylation de nombreux effecteurs (Collins and Brown, 2010)). *Shigella* sécrète la protéine IpaH, une E3 ubiquitine ligase liant plusieurs protéines de l'hôte (Rohde et al., 2007). IpaH retarde l'activation de l'inflammation en induisant la poly-ubiquitylation par des chaînes K-48 de NEMO (le régulateur de la voie canonique NF- κ B) et sa dégradation par le protéasome (Ashida et al., 2010).

Enfin, les bactéries peuvent aussi empêcher la dégradation des protéines par le protéasome en inhibant leur ubiquitylation. L'ubiquitylation est une réaction réversible : les déubiquitinases permettent de retirer les ubiquitines des protéines modifiées. Ces déubiquitinases sont des protéases à cystéine ou des métalloprotéases capables d'hydrolyser la liaison entre la lysine modifiée et l'ubiquitine (Komander et al., 2009). *Salmonella typhimurium* et *Chlamydia trachomatis* sécrètent des enzymes avec une activité déubiquitinase : SseL (Rytönen et al., 2007) et *ChlaDUB1* (Misaghi et al., 2006), respectivement. Durant l'infection par ces bactéries, ces déubiquitinases sont sécrétées et peuvent modifier l'ubiquitylation de différentes protéines de l'hôte comme I κ B- α , un régulateur négatif de la voie NF- κ B (Le Negrate et al., 2008a; 2008b) Mesquita et al., 2013 ; (Fiskin et al., 2016; Mesquita et al., 2013).

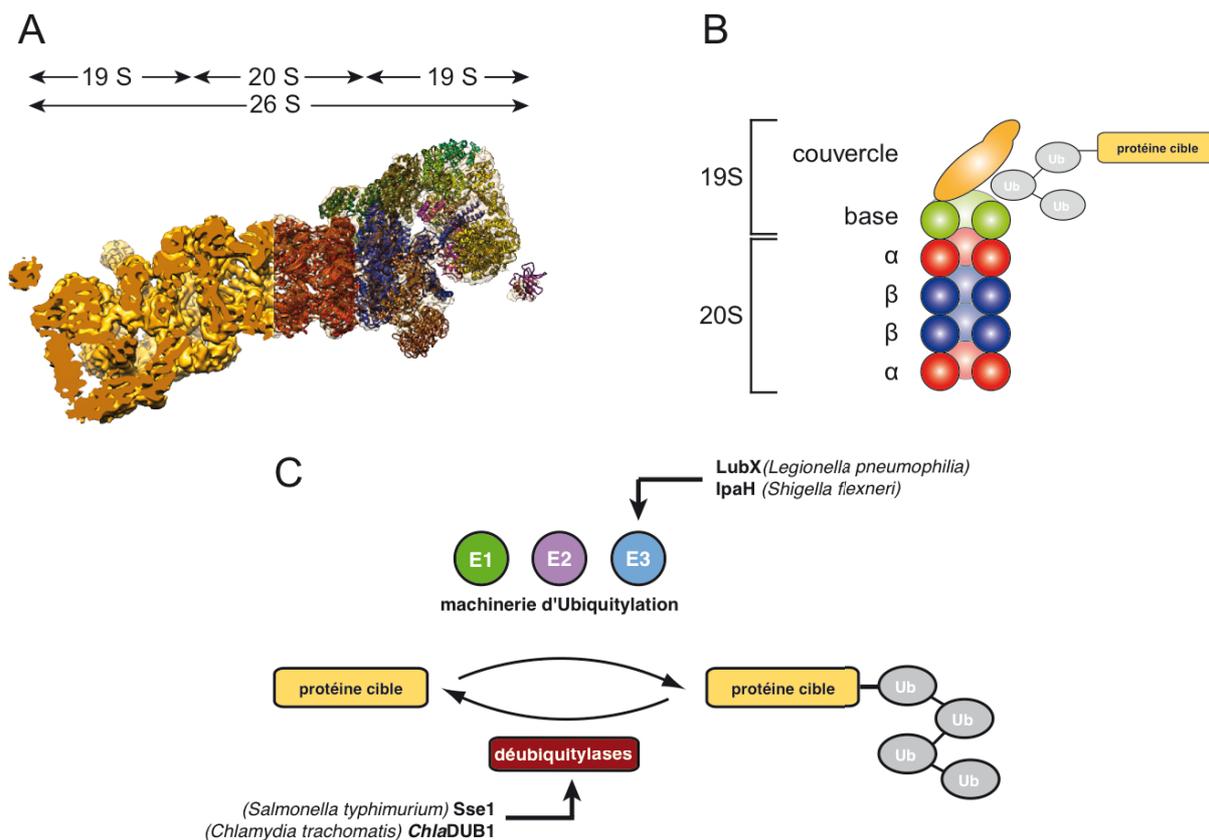


Figure 11. Structure du protéasome et mécanisme d'ubiquitylation. (A) Reconstruction 3D du protéasome 26S de *Saccharomyces cerevisiae* à partir de cryo-EM (tiré de Beck et al., 2012) la partie gauche représente une coupe de la structure où on distingue une moitié de la cavité catalytique. (B) Schéma du protéasome en configuration 19S-20S. La sous-unité « couvercle » du 19S reconnaît les protéines poly-ubiquitylées. Le tag poly-ubiquitine est retiré par la sous-unité « base » puis la protéine cible est dépliée et guidée dans la cavité catalytique pour être dégradée par les sous-unités β . (C) L'Ubiquitylation est une modification covalente réversible catalysée par un ensemble de 3 enzymes. La liaison isopeptidique fixant l'ubiquitine à sa cible peut être clivée par des déubiquitylases. Les bactéries pathogènes peuvent détourner la machinerie d'ubiquitylation en sécrétant des enzymes proches de celles de l'hôte, et perturber le répertoire de protéines ubiquitylées des cellules infectées.

3.3. Les lysosomes

Les lysosomes sont des compartiments indispensables au système endo-membranaire des cellules eucaryotes. L'autophagie, l'endocytose ainsi que la phagocytose sont autant de voies qui mettent en jeu la fusion d'une vésicule avec un lysosome dans le but de recycler ou détruire leur contenu (organites, macro-molécules, récepteurs, contenu extra-cellulaire ou bactéries). L'activité catabolique est réalisée par l'action concertée de plus de 50 enzymes (protéases, lipases, nucléases, glycosidases) présentes à l'intérieur des lysosomes (Sleat et al., 2007). L'activité de ces enzymes est régulée par une compartimentalisation physique et chimique. En effet, ces enzymes sont activées et présentent une activité optimale uniquement dans l'environnement lysosomal réducteur et acide. Cet environnement acide est maintenu constant grâce aux pompes à protons vacuolaires dépendantes de l'ATP (V-ATPase). Ces complexes multi-protéiques fonctionnent à l'opposé de l'ATP synthase mitochondriale : l'hydrolyse de l'ATP permet le

transport de protons vers l'intérieur des lysosomes. La balance osmotique lysosomale est équilibrée grâce à plusieurs transporteurs d'ions (les co-transporteurs de chlore, les échangeurs protons/sodium ou les canaux à calcium (Scott and Gruenberg, 2011)). La membrane lysosomale est elle-même protégée de l'activité des hydrolases par la présence d'un manteau de protéines intra-membranaires fortement glycosylées : les LAMP (Lysosomal Associated Membrane Protein).

La majorité de l'activité protéolytique des lysosomes est assurée par les cathepsines. Ce sont des protéases lysosomales différenciés par la nature de leur site actif (aspartate, sérine ou cystéine). Ces cathepsines ont été découvertes il y a une trentaine d'années et partagent comme caractéristiques le fait d'être activées par clivage dans le lysosome et de fonctionner de manière optimale à pH acide même si certaines conservent leur activité pour quelque temps à pH neutre.

En règle générale, le transport des enzymes nouvellement synthétisées vers les lysosomes implique l'ajout d'un résidu mannose-6-phosphate (M6P) lorsqu'elles traversent le *cis*-Golgi. Lorsqu'elles atteignent le *trans*-Golgi, les enzymes couplées au M6P sont recrutées par des récepteurs spécifiques (M6PR), qui s'associent ensuite à la protéine adaptatrice AP-1, permettant ainsi le transport de ces enzymes dans des vésicules couvertes de clathrines. Ces vésicules sont amenées jusqu'aux endosomes où les enzymes se dissocient du M6PR. Par des événements de fusion de vésicules, ces enzymes sont ensuite transportées des endosomes jusqu'aux lysosomes où elles sont activées par clivage.

Les protéines membranaires lysosomales (comme LAMP-1, LAMP-2 ou LIMP) atteignent les lysosomes sans marquage par un tag M6P. Elles subissent à la place un transport dit indirect ou direct selon que la protéine est transportée du réseau transgolgien aux lysosomes en passant ou non par la membrane plasmique (Saftig and Klumperman, 2009). Lors du transport indirect, la protéine membranaire lysosomale est transportée du trans-Golgi à la membrane plasmique, puis endocytée via la protéine adaptatrice AP-2 dans des vésicules couvertes de clathrine, qui sont alors amenées jusqu'aux endosomes puis aux lysosomes (Janvier and Bonifacino, 2005). Lors du transport direct du trans-Golgi aux endosomes (puis lysosomes), plusieurs scénarios ont été décrits. Certains impliquent la protéine adaptatrice AP-3 et des vésicules à clathrine (Ihrke et al., 2004), d'autres des vésicules sans clathrine, mais couvertes par les protéines hVps41 et VAMP7 (des récepteurs de type HOPE et SNARE permettant la fusion des vésicules avec les compartiments lysosomaux (Pols et al., 2013)).

En plus des fonctions cataboliques, les lysosomes se sont vus attribuer d'autres fonctions telles que celle de plateforme de signalisation ou d'inducteur de la mort cellulaire.

Le lien entre mort cellulaire et perméabilisation des lysosomes est un concept ancien initialement décrit par Christian de Duve : la forte concentration en hydrolases dans les lysosomes laisse à penser que toute atteinte à l'intégrité de cet organite permettrait la libération de leur contenu et induirait la mort cellulaire suite à l'hydrolyse de composants cytosoliques (de Duve, 1983). La perméabilisation des lysosomes (Lysosome Membrane Permabilization ou LMP) peut être une cause directe ou un facteur d'amplification de la mort cellulaire. Les acteurs de la mort cellulaire dépendante des lysosomes sont majoritairement les protéases qu'ils renferment, c'est-à-dire les cathepsines. L'activité de certains inducteurs d'apoptose, comme le TNF- α (Guicciardi et al., 2000), la liaison au récepteur de mort Fas (Deiss et al., 1996), les radiations UV (Bivik et al., 2006) ou des agents génotoxiques (Oberle et al., 2010) repose sur la déstabilisation de la membrane des lysosomes. La LMP est caractérisée par une augmentation du pH lysosomal, observable par perte du marquage des lysosomes par des marqueurs fluorescents pH-dépendants, et par la libération des cathepsines vers le cytosol de la cellule. Une fois dans le cytosol, les cathepsines clivent et activent directement des médiateurs de la mort cellulaire tels que Bid (Appelqvist et al., 2012), Bax/Bak (Boya et al., 2003) ou les caspases (Conus et al., 2008).

Certaines bactéries pathogènes ont adopté un mode de vie intra-cellulaire. Elles établissent leur niche répliquative à l'intérieur d'une cellule hôte d'où elles puisent des nutriments et évitent le système immunitaire. L'entrée de ces bactéries dans la cellule se fait par phagocytose ou endocytose. Les bactéries pathogènes ont développé plusieurs stratégies de survie intra-cytoplasmique dont un point commun est d'éviter la dégradation par les lysosomes. Les bactéries comme *Listeria*, *Shigella* et *Rickettsia* déstabilisent rapidement leur vacuole d'internalisation pour s'en échapper, évitant ainsi la fusion avec les lysosomes et leur destruction. Ces bactéries se répliquent ensuite dans le cytosol de la cellule infectée en évitant l'autophagie.

D'autres pathogènes résident dans des vacuoles dont la composition est entièrement remodelée par des facteurs sécrétés par la bactérie, permettant ainsi la survie de la bactérie dans la cellule. Ces vacuoles présentent différentes caractéristiques plus ou moins proche des compartiments lysosomaux selon le processus de maturation de la vacuole. *Coxiella burnetii*, un pathogène intracellulaire obligatoire responsable de la fièvre Q, survit dans une vacuole qui possède les caractéristiques d'un lysosome à savoir un pH acide, des hydrolases telles que la cathepsine D, la pompe à proton V-ATPase, les protéines membranaires LAMP, Rab7, etc. (Voth and Heinzen, 2007). La vacuole de *Salmonella* est légèrement acide et possède les marqueurs membranaires LAMP-1, soutenant l'hypothèse d'une fusion partielle avec les compartiments lysosomaux. La vacuole ne contient cependant pas d'hydrolases de la cellule hôte car *Salmonella* interfère avec la

biogénèse des lysosomes, notamment en inhibant le trafic des hydrolases dépendant du récepteur au manose-6-phosphate (McGourty et al., 2012). La maturation de la vacuole de *Mycobacterium tuberculosis* est, quant à elle, bloquée dès les premières étapes de phagocytose et ne fusionne pas avec lysosomes. Bien qu'elle présente le marqueur membranaire LAMP1 et des formes non matures des hydrolases de l'hôte, il est suggéré que ces protéines atteignent la vacuole de *Mycobacterium* directement à partir du système biosynthétique sans transiter par les lysosomes.

Dans le cas de *Listeria*, la déstabilisation de la vacuole d'internalisation et l'inhibition de la fusion avec les lysosomes passent par la sécrétion de la LLO et des phospholipases, comme décrit précédemment. On peut toutefois noter que l'interaction et la manipulation du système endo-membranaire de la cellule l'hôte par *Listeria* est complexe et implique d'autres facteurs bactériens. Une fois phagocytée par des macrophages, *Listeria* secrète l'enzyme GADPH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase). Celle-ci recrute la Rho-GTPase Rab5a au niveau du phagosome puis l'inhibe, empêchant ainsi les événements de fusion endosome-endosome et par conséquent la fusion avec les lysosomes (Alvarez-Dominguez et al., 2008). Dans l'éventualité d'une fusion avec les lysosomes, *Listeria* peut résister à l'action de certaines hydrolases grâce aux enzymes PgdA et OatA. Celles-ci régulent l'acétylation du peptidoglycane de la paroi cellulaire, permettant ainsi de masquer des sites de clivages reconnus par des hydrolases telles que le lysozyme (Aubry et al., 2011; Boneca et al., 2007).

3.4. Protéolyse induite par des pathogènes bactériens

La protéolyse peut être utilisée ou détournée par les agents pathogènes durant le processus infectieux. On peut discerner deux stratégies mettant en jeu la protéolyse par les pathogènes : soit ceux-ci produisent une protéase qui peut cibler et cliver des protéines de l'hôte, soit certaines protéases de l'hôte sont activées en réponse à l'infection. Dans ce dernier cas, la protéolyse induite par l'infection peut soit favoriser l'infection, soit constituer une réponse de défense de la cellule contre les pathogènes.

Il existe de nombreux exemples de protéines de l'hôte clivées par des effecteurs bactériens :
- l'immunité humorale mise en place contre les bactéries inclut la sécrétion d'anticorps et l'activation du système du complément. Ces éléments assurent l'inactivation de facteurs bactériens et la destruction des pathogènes dès les premières phases de l'infection. *Streptococcus pyogenes* et *Staphylococcus aureus*, des bactéries responsables d'infections systémiques, échappent au système du complément en sécrétant des protéases capables de dégrader ou de cliver le complément C3. *Streptococcus pyogenes* secrète une protéase

à cystéine, SpeB, qui dégrade complètement C3 et inhibe ainsi toutes les voies d'activation du complément. Ceci permet d'inhiber la lyse de la bactérie, sa phagocytose et le recrutement de neutrophiles au niveau des foyers d'infection (Terao et al., 2008). *Staphylococcus aureus* sécrète une métalloprotéase dépendante du zinc : l'aureolysine. L'aureolysine induit également la dégradation de C3, mais par un mécanisme différent de SpeB. L'aureolysine clive C3 au niveau de son site d'activation, permettant normalement la libération des fragments C3a et C3b, qui sont alors inactivés par des inhibiteurs circulants endogènes de l'hôte (le facteur H et le facteur I) (Laarman et al., 2011).

- L'E-cadhérine, impliquée dans la formation des jonctions serrées maintenant la cohésion entre les cellules épithéliales peut être ciblée par des facteurs bactériens. *Bacteroides fragilis*, un entéropathogène, sécrète la fragilysine, une métalloprotéase dépendante du zinc qui clive les E-cadhérines de surface pour déstabiliser l'épithélium et favoriser l'accès à l'espace inter-cellulaire. Ce clivage peut aussi induire la translocation de la β -caténine au niveau du noyau aboutissant à la prolifération des cellules et à une désorganisation de l'épithélium (Wu et al., 1998; 2007). La E-cadhérine est également ciblée par *Helicobacter pylori*, un entéro-pathogène capable d'envahir l'épithélium intestinal et d'induire sa trans-différentiation dans les cas d'ulcères gastriques chroniques. *Helicobacter pylori* induit ces changements drastiques par différents mécanismes, comme la sécrétion de la chaperonne/protéase à sérine HtrA qui clive la E-cadhérine (Hoy et al., 2010; Murata-Kamiya et al., 2007). De façon intéressante, cette dernière activité n'est pas retrouvée chez les homologues de HtrA présents chez des bactéries non pathogènes où HtrA est impliquée dans la réponse au stress et la survie de la bactérie en milieu oxydatif.

- Les Rho-GTPases forment une famille de protéines contrôlant plusieurs aspects de la biologie de la cellule tels que la dynamique du cytosquelette, la mobilité cellulaire et les interactions entre organites. Ce sont des « interrupteurs moléculaires » liés aux membranes de différents compartiments grâce à leur extrémité C-terminale modifiée par un lipide (ajout d'un farnésyl ou d'un géranyl-géranyl sur une cystéine). Le retrait de ce lipide permet la séquestration de la Rho-GTPase dans le cytoplasme et l'inhibition de son activité. Grâce à son système de sécrétion de type 3, *Yersinia enterocolitica* libère dans la cellule cible YopT, une protéase spécifique de ces Rho-GTPases. Cette protéase clive spécifiquement les RhoGTPases en aval de la cystéine portant la modification lipidique et bloque ainsi l'association de la Rho-GTPase aux membranes cellulaires (Shao et al., 2003; 2002). Dans le contexte de l'infection, l'inactivation de ces Rho-GTPase (Rac1, Cdc42 et RhoA) permet de bloquer le remodelage de l'actine nécessaire à la phagocytose des bactéries (Mohammadi and Isberg, 2009). De la même manière, *Shigella flexneri*, un pathogène intracellulaire, cible les GTPases de l'hôte myristoylées (la myristoylation consiste en l'ajout d'un acide myristique sur l'amine d'une glycine à l'extrémité N-terminale de la protéine). La

myristoylation des Rho-GTPases permet de réguler les interactions protéines-protéines et protéines-membranes. *Shigella* sécrète dans la cellule hôte, grâce à son système de sécrétion de type III, une protéase à cystéine, IpaJ, qui clive la glycine myristoylée des GTPases de l'hôte associées au Golgi comme ARF1 (Burnaevskiy et al., 2015). L'élimination du groupement myristate d'ARF1, par exemple, empêche son association au Golgi et son rôle dans le transport des vésicules cargos. Ceci déstabilise et altère les fonctions du Golgi comme la sécrétion d'hormones (Burnaevskiy et al., 2013). Ce processus de déstabilisation semble favoriser l'infection car les mutants de *Shigella* n'exprimant pas IpaJ sont moins virulents.

Parallèlement à ces effecteurs bactériens possédant une activité protéolytique, la protéolyse de facteurs de l'hôte peut également être réalisée par une protéase cellulaire dont l'activation est induite par la bactérie lors de l'infection. On peut prendre l'exemple de l'alpha-hémolysine HlyA des bactéries UPEC (Uropathogenic *Escherichia coli*). Cette protéine, comme la LLO, a la capacité de former des pores dans les membranes de l'hôte. Dans le cas de HlyA, la formation des pores est associée à l'activation de certaines protéases à sérine de l'hôte qui dégradent différents composants du cytosquelette et des régulateurs de la voie NF- κ B. La dégradation de ces cibles a pour effet, dans ce cas aussi, de promouvoir l'infection de l'hôte par le pathogène (Dhakal and Mulvey, 2012).

3.5. Protéolyse et *Listeria*

3.5.1. Les multiples rôles de Mpl : la protéase sécrétée par *Listeria*

Dans le cas de l'infection par *Listeria monocytogenes*, une seule protéase sécrétée par la bactérie a été décrite comme mise en jeu lors de l'infection : la métalloprotéase Mpl (Domann et al., 1991; Mengaud et al., 1991). Cette protéase de 60 kDa s'accumule sous forme de zymogène (forme inactive) dans l'espace entre la paroi et la membrane bactérienne. Lors du passage de cellule à cellule, *Listeria* rencontre un pH acide dans la vacuole secondaire qui favorise l'auto-activation (en cis ou en trans) de Mpl et le passage de la pro-forme à la forme mature (Bitar et al., 2008; Forster et al., 2011). Une fois activée, Mpl permet la maturation de PC-PLC qui peut alors hydrolyser les phospholipides de la vacuole secondaire (Marquis et al., 1995; Yeung et al., 2005).

Plus récemment, il a été proposé que Mpl possède d'autres cibles à la surface de *Listeria* comme ActA (Alvarez and Agaisse, 2016). Mpl permettrait le clivage d'ActA de la surface de la bactérie durant la formation des protrusions dans les cellules adjacentes. Il a été montré qu'un mutant n'exprimant pas Mpl ou une forme non clivable d'ActA présente plus de protéine ActA à surface et est plus associé à des protrusions non résolues (pas de passage

dans les cellules adjacentes). Les données publiées n'ont pas mis à ce jour en évidence l'existence de protéines de l'hôte dégradées par Mpl.

3.5.1. Activité protéolytique durant l'infection

En parallèle de Mpl, il existe quelques exemples d'évènements de protéolyse associés à l'infection par *Listeria* reposant sur l'activation de protéases de l'hôte. Ces cascades protéolytiques induites mettent par exemple en jeu des protéases à cystéines impliquées dans les complexes multi-protéiques de inflammasome (les caspases) ou des protéases dépendantes du calcium (les calpaïnes). Ces cascades permettent à l'hôte de répondre à l'infection.

Une étude a montré que la libération de *Listeria* dans le cytoplasme de macrophage s'accompagne d'une augmentation tardive de la concentration en calcium intracellulaire (8 heures post-infection) qui permet l'activation des calpaïnes cytosoliques. Celles-ci clivent et activent ensuite IL-1 α , une cytokine pro-inflammatoire participant à la réponse de l'hôte anti *Listeria* (Dewamitta et al., 2010).

La cascade protéolytique dépendante des caspases a lieu principalement dans les cellules phagocytaires. Elle repose sur l'activation de l'inflammasome qui constitue une des réponses majeure de l'immunité innée à l'infection par *Listeria* (Witte et al., 2012)). L'inflammasome est un complexe multi-protéique cytosolique composé d'un module intégrant plusieurs signaux de dangers (notamment ceux produits par les pathogènes) et d'un module effecteur constitué de protéases de la famille des caspases. Ces protéases permettent la maturation de différents médiateurs de l'inflammation comme les interleukines. *Listeria* active cette cascade protéolytique de multiples façons. Plusieurs études ont montré que la libération de *Listeria* dans le cytosol était associée à l'activation des inflammasomes dépendant d'AIM2 ou NLRP3. Ceux ci activent la caspase 1 qui permet le clivage d'IL-1 β et d'IL-18 (des cytokines pro-inflammatoires) et leur sécrétion. AIM2 reconnaît l'ADN double brin de *Listeria* libéré suite à la lyse de la bactérie dans le cytosol (un événement qui reste rare (Rathinam et al., 2010; Sauer et al., 2010)). NLRP3 est lui connu pour détecter des signaux de danger tels qu'un surplus d'ATP, un efflux de potassium ou des cristaux d'acide urique (Mariathasan et al., 2006). Le facteur par lequel des *Listeria* intracellulaires activent NLRP3 reste pour l'instant inconnu (Kim et al., 2010; Wu et al., 2010). D'autres données suggèrent que *Listeria* activerait NLRP3 indépendamment de la sortie de la vacuole d'internalisation, via la formation de pores dans la membrane plasmique par la LLO extracellulaire. L'efflux de potassium constituerait notamment un signal reconnu par NLRP3 qui permettrait l'activation de la caspase 1 (Franchi et al., 2007; Hamon and Cossart, 2011; Meixenberger et al., 2010).

La liste des caspases activées par l'infection ainsi que leurs cibles ne se limitent pas seulement à la caspase 1 et aux interleukines. Des études ont en effet montré l'activation de la caspase 7 en réponse à l'infection par *Listeria* (Cassidy et al., 2012) ou découvert une nouvelle cible de la caspase 1, SREBP (Sterol Regulatory Element Binding Proteins), clivée suite à l'efflux de potassium (Gurcel et al., 2006). Dans les deux cas, le phénomène déclenché permet de maintenir la stabilité de la membrane et la survie de la cellule.

Enfin, il a été montré que la LLO extra-cellulaire peut déclencher la dégradation de certaines protéines de l'hôte telles qu'Ubc9, hTERT1, Mff ou Mre11. Ces événements de dégradation ont la particularité d'être indépendants du protéasome.

La protéine hTERT est une sous unité catalytique de la télomérase avec une fonction de reverse-transcriptase. Elle est principalement impliquée dans le maintien des extrémités télomériques. *Listeria* induit une dégradation de la protéine hTERT durant l'infection. Cette dégradation est dépendante de la LLO extra-cellulaire et repose sur l'influx de calcium dans la cellule hôte qui activerait une protéase dépendante du calcium différente des calpaïnes et encore non identifiée à ce jour. La dégradation de hTERT régule négativement la réplication de *Listeria* mais le mécanisme d'inhibition mis en jeu reste à déterminer (Samba-Louaka et al., 2012).

Mre11 fait partie d'un complexe permettant de détecter les cassures de l'ADN et de mettre en place une réponse nécessaire à la réparation des dommages dans le génome. Durant l'infection, *Listeria* induit des cassures dans l'ADN de l'hôte et inhibe en même temps la réponse aux dommages à l'ADN en induisant la dégradation de Mre11. Encore une fois, cette dégradation est dépendante de la sécrétion de LLO et de la formation de pores dans la membrane plasmique. Ces pores activeraient une protéase à aspartate dont l'activité dépendante du calcium permettrait la dégradation de Mre11. En inhibant différentes voies de réparation de l'ADN, il a été montré que les mécanismes de réparation de l'ADN inhibaient la réplication de *Listeria* (Samba-Louaka et al., 2014).

Comme décrit plus haut, Mff (Mitochondria Fission Factor) est une protéine recrutée aux sites de fragmentation des mitochondries. C'est un récepteur de la protéine Drp1 qui s'oligomérisent autour des mitochondries pour permettre leur fragmentation. L'infection par *Listeria* active une voie de fragmentation des mitochondries alternative indépendante de Mff et Drp1, car la protéine Mff est dégradée durant l'infection. Les expériences réalisées en milieu sans calcium semblent indiquer que la dégradation de Mff repose en partie sur l'influx de calcium induit par la LLO (Stavru et al., 2013).

Ubc9 est une enzyme essentielle de la machinerie de SUMOylation, une modification post-traductionnelle importante pour la régulation de la fonction des protéines eucaryotes. La dégradation d'Ubc9 induite par LLO durant l'infection dépend en partie d'une protéase à

aspartate. La SUMOylation étant une réaction réversible et Ubc9 une enzyme essentielle à cette voie enzymatique, sa dégradation aboutit à une déSUMOylation de certaines protéines de l'hôte, notamment des facteurs de transcription (Impens et al., 2014; Ribet et al., 2010). En altérant la SUMOylation, *Listeria* est ainsi capable de contrôler l'activité de plusieurs protéines de l'hôte pour favoriser l'infection. La dégradation d'Ubc9 est également induite par d'autres toxines proches de la LLO telles que la perfringolysine O (PFO, sécrétée par *Clostridium perfringens*) ou encore la pneumolysine (PLY, sécrétée par *Streptococcus pneumoniae*), laissant penser que ces événements de dégradation ont aussi lieu durant l'infection par d'autres pathogènes (Ribet et al., 2010).

Ces différents travaux suggèrent que plusieurs facteurs de l'hôte importants pour l'infection sont dégradés en réponse à la LLO, même si aucune étude globale n'a pour l'instant été réalisée pour caractériser l'ensemble des cibles dégradées.

Objectifs de la thèse

L'objectif de ma thèse était de caractériser les altérations du protéome des cellules de l'hôte induites au cours de l'infection par *Listeria monocytogenes*. Mes travaux se sont en particulier axés sur l'identification de protéases de l'hôte, activées en réponse à *Listeria*, et aux dégradations de certains facteurs cellulaires pouvant jouer un rôle dans le déroulement de l'infection.

La première partie de mes travaux s'est focalisée sur les conséquences de l'infection par *Listeria* sur les lysosomes de la cellule hôte. Le système endo-membranaire (constitué notamment par le réticulum endoplasmique, les vacuoles endocytiques et la membrane plasmique) est une cible majeure de *Listeria*. Les lysosomes sont des organites très dynamiques à l'interface entre les différents compartiments du système endo-membranaire dont le rôle exact dans l'infection par *Listeria* reste mal connu. Mes recherches ont visé à déterminer si *Listeria* interférait avec les fonctions des lysosomes durant l'infection, et plus particulièrement si la bactérie modifiait l'activité des protéases lysosomales.

La seconde partie de mes travaux a consisté à caractériser les modifications du protéome de la cellule hôte en réponse à l'infection. Plusieurs travaux préalables, réalisés par le laboratoire, ont mis en évidence que la LLO activait une (ou plusieurs) protéase(s) cellulaire(s) et induisait la dégradation de certaines protéines de l'hôte jouant un rôle important dans l'infection. Mon objectif était d'identifier de façon globale les modifications du protéome induite par la LLO au cours de l'infection, et de caractériser le rôle potentiel de ces dégradations dans le déroulement de l'infection par *Listeria*

Résultats

1. Altération des fonctions lysosomales par *Listeria monocytogenes*

1.1. Résumé

Listeria interfère avec plusieurs organites de la cellule hôte au cours de l'infection. Parmi les facteurs de virulence de *Listeria*, la Listériolysine O, via la formation de pores dans la membrane plasmique de l'hôte, joue un rôle essentiel dans les perturbations fonctionnelles des organites de la cellule comme les mitochondries, le réticulum endoplasmique et le noyau. Un des axes de recherche de mon doctorat était de déterminer si *Listeria*, au cours de l'infection, modifiait le fonctionnement d'un organite essentiel de la cellule hôte : le lysosome.

J'ai pu montrer que la LLO, au cours de l'infection par *Listeria*, altérait l'intégrité des lysosomes de la cellule hôte. Les pores formés par la LLO au niveau de la membrane plasmique induisent une perméabilisation des lysosomes caractérisée par la perte de leur acidité et la libération du contenu lysosomal. Certaines cathepsines (une classe de protéases lysosomales) sont en effet transloquées dans le cytosol où elles retiennent transitoirement leur activité. J'ai pu de plus montrer que d'autres toxines apparentées à la LLO comme la Perfringolysine O (PFO) et la Pneumolysine (PLY), ciblent également les lysosomes et induisent leur perméabilisation, suggérant ainsi que ce mécanisme soit partagé par différentes classes de pathogènes bactériens. Les lysosomes jouant un rôle central dans la physiologie des cellules et dans la défense contre l'invasion par des pathogènes bactériens, mes travaux suggèrent que l'infection par *Listeria* aboutit, dans certains types cellulaires, à une altération de certaines fonctions cellulaires importantes dépendantes des lysosomes.

1.2. Résultats

RESEARCH ARTICLE

Alteration of epithelial cell lysosomal integrity induced by bacterial cholesterol-dependent cytolysins

Julien Karim Malet^{1,2,3,4} | Pascale Cossart^{1,2,3} | David Ribet^{1,2,3}

¹Unité des Interactions Bactéries-Cellules, Institut Pasteur, F-75015 Paris, France

²Inserm, U604, F-75015 Paris, France

³INRA, USC2020, F-75015 Paris, France

⁴Univ. Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, F-75015 Paris, France

Correspondence

Pascale Cossart and David Ribet, Unité des Interactions Bactéries-Cellules, Institut Pasteur, F-75015 Paris, France.
Email: pascale.cossart@pasteur.fr; david.ribet@inserm.fr

Funding information

Institut Pasteur, INSERM, INRA, National Research Agency, Grant/Award Number: (ANR; ERANET Infect-ERA PROANTILIS ANR-13-IFEC-0004-02). French Government's Investissement d'Avenir program, Laboratoire d'Excellence "Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases", Grant/Award Number: (ANR-10-LABX-62-IBEID). European Research Council (ERC), Grant/Award Number: (Advanced Grant #233348 MODELIST, H2020-ERC-2014-ADG 670823-BacCellEpi). Fondation Louis-Jeantet, Fondation le Roch les Mousquetaires

Abstract

Bacterial pathogens can interfere during infection with host cell organelles, such as mitochondria, the endoplasmic reticulum-Golgi system or nuclei. As important cellular functions are often compartmentalized in these organelles, their targeting allows pathogens to manipulate key host functions during infection. Here, we identify lysosomes as a new class of organelles targeted by the pathogenic bacterium *Listeria monocytogenes*. We demonstrate that extracellular *Listeria*, via secretion of the pore-forming toxin listeriolysin O, alters lysosomal integrity in epithelial cells but not in macrophages. Listeriolysin O induces lysosomal membrane permeabilization and release of lysosomal content, such as cathepsins proteases, which remain transiently active in the host cytosol. We furthermore show that other bacterial pore-forming toxins, such as perfringolysin O and pneumolysin, also induce lysosomes alteration. Together, our data unveil a novel activity of bacterial cholesterol-dependent cytolysins.

1 | INTRODUCTION

Listeria monocytogenes is a Gram-positive pathogen responsible for human listeriosis, a leading cause of deaths due to food-transmitted bacterial pathogens. After ingestion of contaminated food, *Listeria* can breach the intestinal and blood-brain barriers, leading to febrile gastroenteritis, septicemia, and meningitis. In pregnant women, *Listeria* can furthermore breach the placental barrier leading to abortion or neonatal infections.

At the cell level, *Listeria* has the ability to enter and replicate in both phagocytic and nonphagocytic cells (Cossart, 2011; Pizarro-Cerda, Kuhbacher, & Cossart, 2012). *Listeria*'s intracellular life cycle involves hijacking of host-cell pathways and interference with host cell organelles (Lebreton, Stavru, & Cossart, 2015). Indeed, it has been

reported that *Listeria* alters the dynamic of mitochondria fission/fusion events (Stavru, Bouillaud, Sartori, Ricquier, & Cossart, 2011; Stavru, Palmer, Wang, Youle, & Cossart, 2013), activates the endoplasmic reticulum (ER) stress responses (Pilllich, Loose, Zimmer, & Chakraborty, 2012), and reshapes host nuclear functions by altering histone modifications and chromatin condensation (Eskandarian et al., 2013; Hamon et al., 2007; Hamon & Cossart, 2011; Lebreton et al., 2011). Among the different virulence factors of *Listeria* involved in these alterations of host organelle functions, the listeriolysin O (LLO) toxin plays a central role (reviewed in Hamon, Ribet, Stavru, & Cossart, 2012). This pore-forming toxin was first reported for its role in the destabilization of the internalization vacuole and escape of bacteria in the host cell cytosol (Cossart et al., 1989; Gaillard, Berche, & Sansonetti, 1986; Kathariou, Metz, Hof, & Goebel, 1987; Portnoy, Jacks, & Hinrichs,

1988). Several studies have now established that LLO can also be secreted by extracellular *Listeria* and forms pores in the host plasma membranes (reviewed in Hamon et al., 2012). These pores allow potassium efflux and calcium influx, which alter the ionic balance of the host cell and trigger several signaling pathways leading to inflammasome activation and IL-1 β secretion, mitochondria fragmentation, or histone posttranslational modifications (Hamon & Cossart, 2011; Meixenberger et al., 2010; Stavru et al., 2011; Stavru et al., 2013). Pores formed at the plasma membrane can also alter other cellular processes, independently of ion fluxes, such as SUMOylation (Impens, Radoshevich, Cossart, & Ribet, 2014; Ribet et al., 2010).

The endomembrane system is a privileged target of *Listeria* during infection (Lebreton et al., 2015). In nonphagocytic cells, internalization of *Listeria* and its escape from the internalization vacuole requires tight control of the host endocytic compartments (Hamon et al., 2012; Pizarro-Cerda et al., 2012). In professional phagocytes such as macrophages, survival of *Listeria* is promoted by intracellular secretion of LLO. This toxin alters phagosome integrity, delays their acidification, inhibits their fusion with lysosomes, and eventually participates in the disruption of phagosomal membranes (Henry et al., 2006; Shaughnessy, Hoppe, Christensen, & Swanson, 2006).

In contrast to the reported effect of LLO on host endosomes or phagosomes, the consequences of *Listeria* infection on lysosomes remain poorly characterized. Lysosomes are single membrane-bound cytoplasmic organelles specialized in the degradation and recycling of macromolecules. These dynamic vacuoles are characterized by low pH and contain numerous hydrolases, such as cathepsins, as well as specific membrane proteins. Lysosomes are able to fuse and thus to degrade the content

of a wide range of vesicles, including endocytic and phagocytic vacuoles, autophagosomes, or post-Golgi originating vacuoles. Besides their catabolic properties, lysosomes have been shown to have broader functions in cell homeostasis and are involved in secretion, membrane repair, cell growth, or cell death (Aits & Jaattela, 2013; Andrews, Almeida, & Corrotte, 2014; Luzio, Hackmann, Dieckmann, & Griffiths, 2014; Settembre, Fraldi, Medina, & Ballabio, 2013).

Since their first description by Christian DeDuve in 1950s, lysosomes were often referred to as “suicide bags”, as lysosomal membrane damage results in leakage of lysosomal content to the cytosol, which can then trigger apoptosis, pyroptosis, or necrosis (Boya & Kroemer, 2008; Repnik, Stoka, Turk, & Turk, 2012). Indeed, various components, such as H₂O₂ or sphingosine, can increase lysosomal membrane permeability, leading to the neutralization of lysosomal lumen and the release of cathepsins and other hydrolases into the cytosol (Boya & Kroemer, 2008). The consequences of lysosomal membrane permeabilization (LMP) vary according to the extent of lysosomal damage and the cell type. While extensive LMP is often linked to necrosis or apoptosis, moderate LMP may trigger oxidative stress, due to the release of protons from the lysosomes into the cytosol and reduction of lysosomal catabolic capacities (Appelqvist, Waster, Kagedal, & Ollinger, 2013; Boya & Kroemer, 2008; Repnik, Hafner Cesen, & Turk, 2014).

Here, we investigated whether *Listeria* interferes with host lysosome functions during infection. We demonstrated that the bacterial pore-forming toxin LLO triggers host lysosomes permeabilization and release of lysosomal proteases such as cathepsins in the cytosol. Our results identify host lysosomes as new targets of *Listeria* during infection.

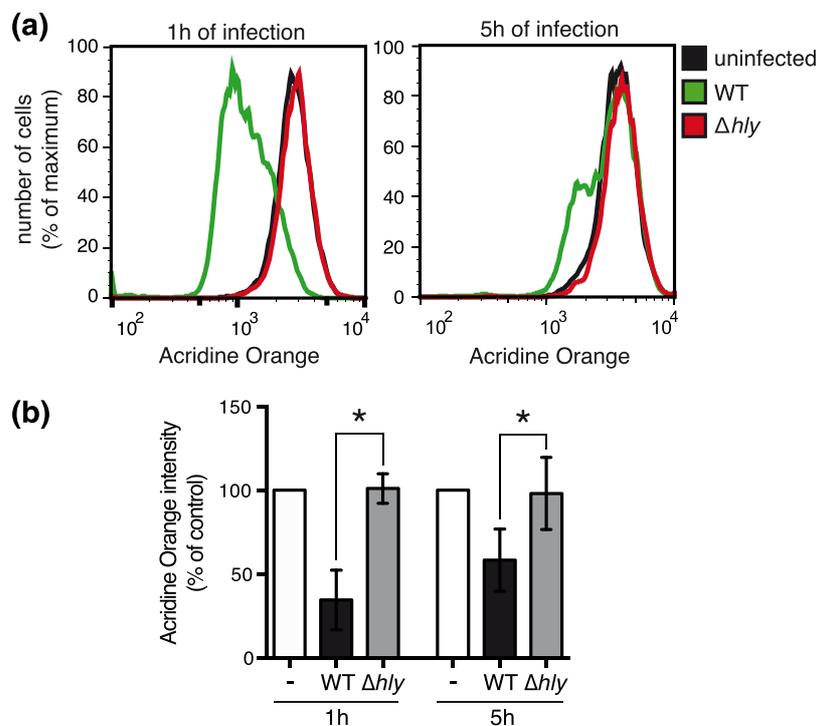


FIGURE 1 Neutralization of host acidic compartments during *Listeria* infection. Acridine orange-stained HeLa cells were infected for 1 or 5 hr with wild-type (WT) or Δhly *Listeria monocytogenes*. (a) Representative flow cytometry analysis of uninfected or infected acridine orange-stained HeLa cells. (b) Data represent the geometric mean of acridine orange fluorescence in infected cells normalized to that of uninfected cells, as measured by flow cytometry analysis (mean \pm SD from at least three independent experiments; *, $p < 0.05$; unpaired two-tailed Student's t test)

2 | RESULTS

2.1 | *Listeria* infection neutralizes host cell acidic compartments

In order to determine whether *Listeria* alters host lysosome integrity during infection, we stained cells with acridine orange (AO), a lysosomotropic dye that emits red fluorescence when accumulating in acidic compartments such as lysosomes. AO-stained HeLa cells were infected with *L. monocytogenes* for 1 or 5 hr, fixed and analyzed by flow cytometry. We observed that infection by *L. monocytogenes* induces a significant decrease in AO fluorescence intensity, both at 1 or 5 hr of infection, which indicates a neutralization of host acidic compartments (Figure 1). To decipher whether the pore-forming toxin LLO was involved in this process, we infected HeLa cells with a *Listeria* mutant deleted for *hly*, the gene coding for LLO. Of note, in HeLa cells, LLO is not strictly required for bacterial escape from the internalization vacuole and Δhly *Listeria* are thus able to reach the host cytosol and replicate intracellularly in this cell type (Gründling, Gonzalez, & Higgins, 2003). Strikingly,

infection of cells with a Δhly *Listeria* mutant does not affect AO fluorescence intensity, suggesting that LLO is the virulence factor responsible for the observed loss of acidity of host compartments (Figure 1).

To confirm the involvement of LLO in this process, we treated AO-stained HeLa cells with sublytic concentrations of purified LLO (from 0.3 to 3 nM). Flow cytometry analysis showed that purified LLO can trigger a dose-dependent and time-dependent decrease of AO fluorescence intensity of treated cells (Figure 2a,b). Neutralization of acidic compartments in response to LLO was further confirmed by microscopic analysis of cells stained with LysoTracker, another acidophilic dye (Figure 2c).

We further assessed whether LLO-induced loss of AO fluorescence intensity is pore-dependent using an LLO mutant, LLO^{W492A}, able to bind to cell membrane but unable to form pores (Ribet et al., 2010). HeLa cells treated with LLO^{W492A} do not show a decrease in AO fluorescence intensity indicating that pore formation is critical to induce changes in host compartments acidity (Figure 2d).

We then determined whether LLO alters the acidity of intracellular compartments in other cell lines. Hep G2, a human liver epithelial

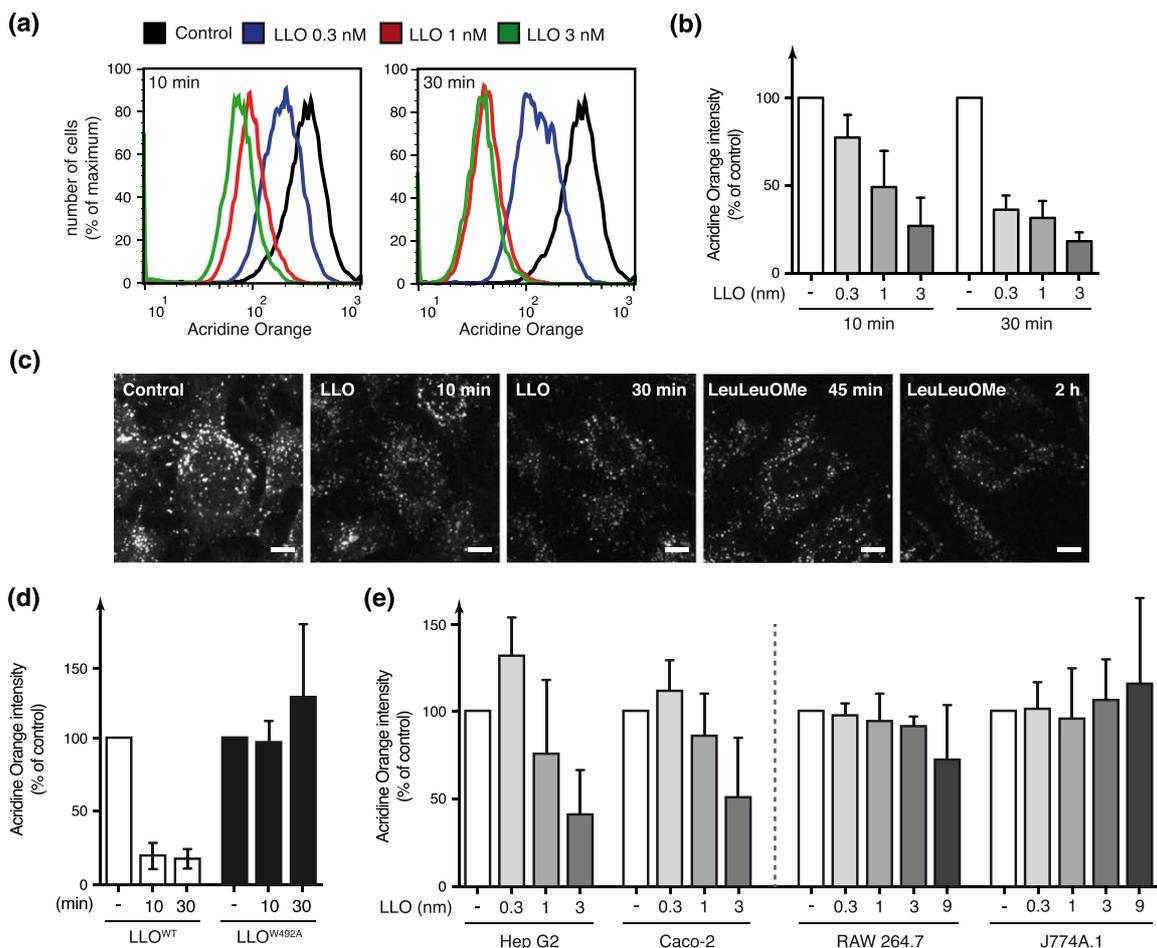


FIGURE 2 Neutralization of host acidic compartments in response to extracellular LLO. (a) Representative flow cytometry analysis of acridine orange-stained HeLa cells treated with different concentrations of purified LLO, for 10 or 30 min. (b, d) Geometric mean of acridine orange fluorescence in HeLa cells treated with various concentrations of LLO (b) or with 3 nM wild-type LLO or the pore-deficient LLO^{W492A} mutant (d), normalized to that of untreated cells, as measured by flow cytometry analysis (mean \pm SD from at least three independent experiments). (c) Microscopic analysis of HeLa cells stained with LysoTracker and treated with 3 nM LLO or 2 mM of the LMP inducer L-leucyl-L-leucine-methyl ester (LeuLeuOMe) (scale bar; 2 μ m). (e) Geometric mean of acridine orange fluorescence in Hep G2, Caco-2, RAW264.7, or J774A.1 cells after 30 min of treatment with increasing concentrations of LLO, normalized to that of untreated cells (mean \pm SD from at least three independent experiments)

cell line; Caco-2, a human intestinal cell line; RAW 264.7 and J774A.1, two murine macrophage-like cell lines were stained with AO and treated with various concentrations of LLO. We observed a dose-dependent decrease in AO fluorescence intensity in Hep G2 and Caco-2 cells lines in response to LLO, indicating that this toxin alters intracellular compartments acidity in different epithelial cell types (Figure 2e). Interestingly, no variation in AO fluorescence was observed in macrophages treated with LLO (even at a high LLO concentration of 9 nM), suggesting that alteration of acidic compartments in response to LLO is cell-type specific and does not occur in macrophages (Figure 2e).

Previous reports established that host plasma membrane wounding by pore-forming toxins such as LLO induces a calcium-dependent fusion of membrane proximal lysosomes with the damaged membrane, which is critical for the resealing of wounded cells (Andrews et al., 2014; Jaiswal, Andrews, & Simon, 2002; Reddy, Caler, & Andrews, 2001; Tam et al., 2010). To confirm that our observed LLO-dependent loss of AO fluorescence intensity is not due to lysosomal fusion with the plasma membrane, and thus to the release of lysosomal content in the extracellular milieu, we repeated our experiments in the presence of the calcium chelator EGTA to block LLO-dependent calcium influx and lysosomes fusion to the plasma membrane. We validated that EGTA efficiently inhibits LLO-induced lysosomes fusion with the plasma membrane by monitoring the release of lysosomal acid sphingomyelinase in the supernatant of cells treated with LLO (Figure S1). Whereas EGTA inhibited lysosomes fusion with the plasma membrane, it did not block the decrease in AO fluorescence intensity observed in HeLa cells treated with LLO (Figure 3). This result confirms that LLO triggers the neutralization of intracytoplasmic lysosomes. To definitely rule out a role for calcium in LLO-induced neutralization of host lysosomes, we repeated our experiments in the presence of the cell permeant calcium chelator BAPTA-AM. Pre-incubation with BAPTA-AM alone, or with BAPTA-AM and EGTA, does not inhibit the decrease in AO fluorescence triggered by LLO, indicating that neither extra-cellular calcium influx nor calcium mobilized from intracellular stores is involved in this process (Figure 3).

Altogether, our results indicate that LLO, secreted by *Listeria* during infection, modifies the acidity of intracellular compartments such as lysosomes, which may reflect LMP (Boya et al., 2003; Erdal et al., 2005).

2.2 | *Listeria* triggers host cell lysosomes permeabilization during infection

To assess whether host lysosomes are permeabilized in response to LLO, we monitored if intralysosomal proteins such as Cathepsin D (CtsD), a lysosomal aspartyl-protease, can be translocated from the lysosomes to the cytosol after exposure to the toxin. HeLa cells were first treated or not with LLO, lysed mechanically, and fractionated to obtain lysosome-depleted cytosolic fractions. The absence of lysosomal components in the cytosolic fractions was controlled by immunoblot analysis of LAMP1, a lysosomal transmembrane glycoprotein (Figure 4a). Compared to non treated cells, we observed a significant increase in the level of the mature CtsD heavy chain (27 kDa) in the cytosolic fractions of cells treated with LLO, indicating that mature CtsD has been released from lysosomes to the cytosol, and demonstrating that LLO does trigger LMP (Figure 4a). Quantification of CtsD signal showed that only a fraction of lysosomes are permeabilized in response to LLO, or that only a fraction of intralysosomal Cathepsin D is transferred to the cytosol.

Cathepsins, once released from the lysosomes, can be inactivated either by the neutral pH of the cytosol or by intracellular inhibitors such as stefins and serpins (Lee, Gulnik, & Erickson, 1998; Repnik et al., 2012; Turk et al., 1995). Some cathepsins, however, were shown to retain their proteolytic activity at neutral pH for several hours (Kirschke, Wiederanders, Bromme, & Rinne, 1989; Pratt, Sekedat, Chiang, & Muir, 2009). Thus, cathepsins released from lysosomes may be transiently active in the cytosol. To assess if cytosolic cathepsins released in response to LLO retain some proteolytic activity, we monitored cathepsins activity in cytosolic fractions of LLO-treated cells using cathepsins-specific fluorogenic substrates. We observed a significant threefold increase in cathepsins activity in cytosolic fractions of LLO-treated cells compared to control cells (Figure 4b). This confirms that cathepsins can be translocated from lysosomes to the cytosol and that these cathepsins remain, at least transiently, proteolytically active even at the neutral pH of the cytosol.

In order to show that the LMP observed in response to purified LLO is also induced during bacterial infection, we performed the same experiments on HeLa cells infected for 1 or 5 hr with *Listeria*. Again, we could detect an increase in cathepsin activity in the cytosolic fractions of cells infected for 1 hr with WT *Listeria*, which correlates with an increased level of CtsD in these fractions (Figure 4c,d). These results

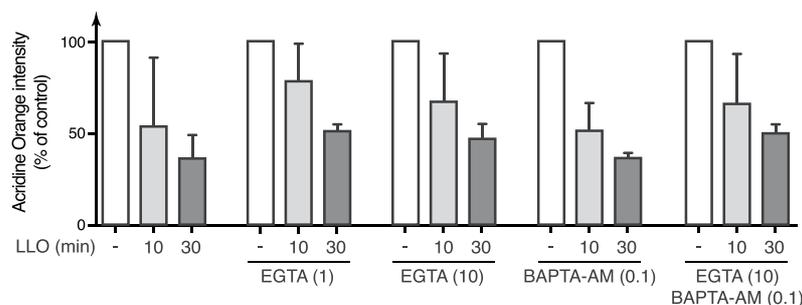


FIGURE 3 LLO-induced neutralization of acidic compartments is calcium-independent. Geometric mean of acridine orange fluorescence, as measured by flow cytometry analysis, in HeLa cells pre-incubated with 1 or 10 mM EGTA, or with 0.1 mM BAPTA-AM, and treated with 3 nM LLO (mean \pm SD from at least three independent experiments)

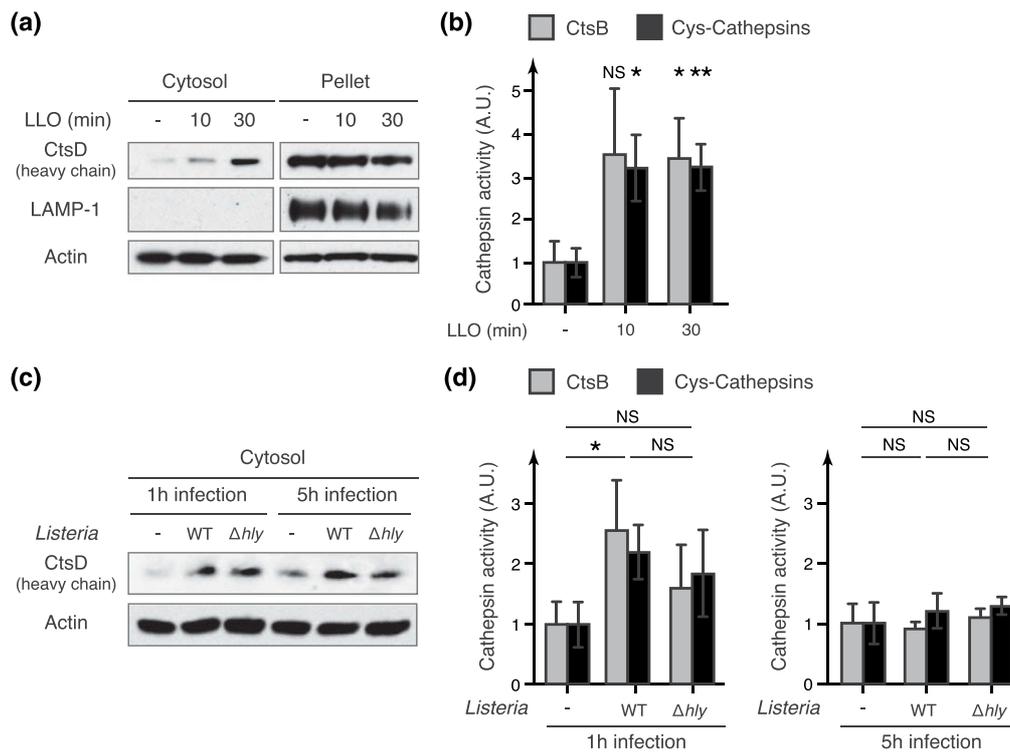


FIGURE 4 Release of active lysosomal proteases in the host cytosol in response to LLO. HeLa cells were treated with 3 nM purified LLO, or infected with wild-type (WT) or Δhly *Listeria monocytogenes* for 1 or 5 hr. (a, c) Immunoblot analysis using anti-cathepsin D (CtsD), anti-lysosomal-associated membrane protein-1 (LAMP-1) and anti-actin antibodies of cell fractions from HeLa cells treated with LLO or infected with *Listeria* ("cytosol" = cytosolic fraction devoid of lysosomes; "pellet" = fraction containing lysosomes). (b, d) Quantification of cathepsin activity in cytosolic fractions from HeLa cells, treated with LLO or infected with *Listeria*, normalized to that of control cells ("CtsB" = substrate specific for cathepsin B; "cys-cathepsins" = substrate specific for cathepsins belonging to cysteine proteases) (mean \pm SD from three independent experiments; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; NS = not significant; unpaired two-tailed Student's *t* test)

confirm that host cell lysosomes are permeabilized during infection. Infection with the Δhly mutant also showed a slight increase in cytosolic cathepsin levels and activity compared to uninfected cells, suggesting that LLO-independent LMP may occur during infection in HeLa cells (Figure 4c,d). Interestingly, cytosolic cathepsins activity could not be detected after 5 hr of infection, suggesting that cathepsins released to the cytosol are only transiently active and lose their activity after a few hours (Figure 4d).

As LMP may be a downstream consequence of cell death (Boya & Kroemer, 2008; Vanden Berghe et al., 2010), we finally monitored cell mortality after treatment with purified LLO or infection with *Listeria*. HeLa cells were treated with 3 nM LLO for 30 min or infected for 5 hr with WT and Δhly *Listeria* mutant. Cells were then labeled with a fluorescent dye allowing quantification of dead cells (see Experimental Procedures). Less than 10% of dead cells were observed in all tested conditions, indicating that neither LLO nor *Listeria* infection induces cell death in our experimental settings (Figure S2). Thus, the observed LLO-induced LMP is not a downstream consequence of cell death.

2.3 | LLO-dependent Ubc9 degradation is independent of lysosomal permeabilization

We have previously demonstrated that plasma membrane perforation by LLO triggers the degradation of Ubc9, an essential enzyme of the

host SUMOylation machinery, and a remodeling of the host cell SUMOylome (Impens et al., 2014; Ribet et al., 2010). This degradation can be partially blocked by an aspartyl-protease inhibitor (Ribet et al., 2010). As several lysosomal proteases, such as Cathepsin D and Cathepsin E, belong to the family of aspartyl-proteases, we assessed whether lysosomal proteases released by LMP might be involved in LLO-induced Ubc9 degradation. To do so, we inactivated lysosomal proteases by using a well-established protocol based on horseradish peroxidase (HRP)-mediated chemical crosslinking, which selectively targets endosomes and lysosomes (Laulagnier et al., 2011; Stoorvogel, 1998). HeLa cells were incubated with HRP at 37 °C for 15 min (pulse) to internalize HRP into endosomes by fluid-phase endocytosis. After a chase period, allowing HRP to reach late endosome and lysosomes through the endocytic pathway, cells were incubated with H₂O₂ and 3,3'-diaminobenzidine (DAB) that diffuses through cell membranes. The peroxidase activity of HRP-containing compartments triggers polymerization of DAB monomers and selective fixation of these organelles through chemical crosslinking of the luminal and integral membrane protein to the DAB polymer.

We quantified lysosomal cathepsins activity after HRP/DAB-mediated crosslinking of lysosomes and demonstrated that these proteases were indeed inactivated by this chemical treatment (Figure 5a). We then monitored Ubc9 degradation in response to LLO in HeLa cells pretreated or not with HRP/DAB. No significant

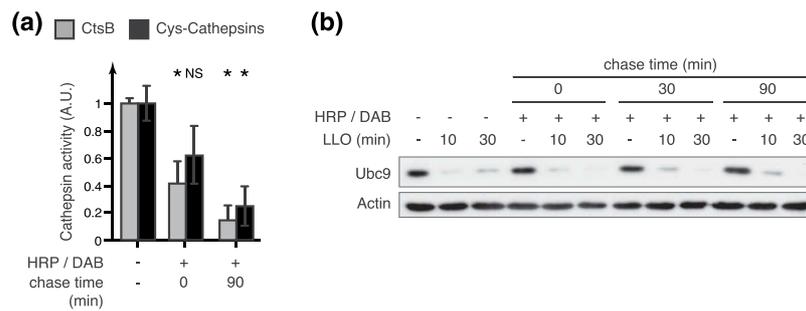


FIGURE 5 Inhibition of lysosomal proteases does not block LLO-dependent Ubc9 degradation. HRP was endocytosed in HeLa cells for 15 min. After different chasing period (0, 30, or 90 min), cells were incubated with DAB and H_2O_2 to cross-link lysosomal content. (a) Quantification of cathepsin activity in HeLa whole cell extracts treated or not with HRP/DAB (“CtsB” = substrate specific for cathepsin B; “Cys-cathepsins” = substrate specific for cathepsins belonging to cysteine-proteases) (mean \pm SD from at least three independent experiments; *, $p < 0.05$; NS, not significant; unpaired two-tailed Student’s t test). (b) Immunoblot analysis using anti-Ubc9 and anti-actin antibodies of whole cell extracts from HeLa cells pretreated with HRP/DAB and incubated with 3 nM LLO for 10 or 30 min

differences in Ubc9 degradation could be observed in HeLa cells pre-incubated with HRP/DAB compared to control cells (Figure 5b). These results suggest that Ubc9 degradation is independent of lysosomal proteases released into the cytosol after exposure to LLO.

2.4 | Host lysosomal permeabilization is triggered by other bacterial pore-forming toxins

Listeriolysin O belongs to the family of cholesterol-dependent cytolysins (CDCs), which includes toxins secreted by several extracellular pathogens (Hamon et al., 2012; Peraro & van der Goot, 2016). To decipher whether other bacterial pore-forming toxins may also induce host-cell lysosomal permeabilization, we treated AO-stained HeLa cells with Perfringolysin O (PFO; secreted by *Clostridium perfringens*) or Pneumolysin (PLY; secreted by *Streptococcus pneumoniae*). We observed that these two other CDCs also lead to a concentration-dependent decrease in acridine-orange fluorescence intensity, as observed with LLO (Figure 6a). To assess whether pore-forming activity of PFO and PLY was required to trigger LMP, as observed for LLO, we purified mutated versions of these toxins that are unable to form pores (PFO^{W467A} and PLY^{W436A}, designed by homology to LLO^{W492A}). Treatment of AO-stained HeLa cells with these nonhaemolytic toxins does not induce a decrease in fluorescence intensity, demonstrating that pores formation is strictly required for these CDCs to trigger lysosomal permeabilization in epithelial cells (Figure 6b). These results suggest that alteration of host lysosomes integrity may occur in response to infection by different pathogenic bacteria secreting pore-forming toxins in the extracellular milieu.

3 | DISCUSSION

In this study, we identify lysosomes as a new host cell organelle targeted by *L. monocytogenes* during infection. We show that secretion of LLO by *Listeria* triggers host lysosome loss of integrity, leading to their neutralization and the translocation of active lysosomal proteases in the host cytosol.

Many bacterial pathogens have evolved the ability to interfere with host cell organelles (Escoll, Mondino, Rolando, & Buchrieser, 2016; Lebreton et al., 2015). Important cellular functions are compartmentalized in these organelles, such as DNA maintenance and gene expression in the nucleus, sorting of newly synthesized proteins and lipids in the ER and in the Golgi or bioenergetics and programmed cell death in mitochondria. Targeting of these organelles allows bacteria to manipulate key functions of the host cell in order to promote infection. Besides the numerous examples of bacteria targeting either mitochondria, the ER-Golgi system or the nucleus, only few pathogenic bacteria were previously reported to target lysosomes. *Vibrio parahaemolyticus* constitutes one such example, as it can translocate into host cells the cytotoxic VepA effector protein, which induces LMP through the targeting of the subunit C of lysosomal V-ATPase (Matsuda, Okada, Kodama, Honda, & Iida, 2012). *Pseudomonas aeruginosa* is another example that secretes a toxic metabolite called pyocyanin, inducing LMP and apoptosis in neutrophils (Prince et al., 2008). Infection with *S. pneumoniae* was also shown to trigger LMP and apoptosis of host macrophages (Bewley et al., 2011). The involved mechanism is complex and partially requires the pneumolysin toxin but not its pore-forming activity, as well as additional bacterial factors (Bewley et al., 2014). This mechanism differs from the one observed in our study in epithelial cells, which strictly requires PLY pore-forming activity (Figure 6b). Finally, the α -toxin from *Clostridium septicum*, which belongs to a different family of pore forming toxins than CDCs, was shown to trigger programmed necrosis in myoblast cells and cathepsins release from lysosomes (Kennedy, Smith, Lyras, Chakravorty, & Rodd, 2009). The mechanism involves pores-mediated calcium influx and is associated with cell necrosis, which, again, differs from the mechanism observed here with LLO (Figure 3 and Figure S2).

Here, in the case of *L. monocytogenes*, we identified that LLO induces lysosomes permeabilization in epithelial cells but not in macrophages. In epithelial cells, it remains to be determined whether LLO and other CDCs directly target lysosomes and form active pores in lysosomal membranes or if pore formation at the level of the plasma membrane triggers signaling cascades leading, indirectly, to LMP. Indeed, large pores such as those formed by LLO and other

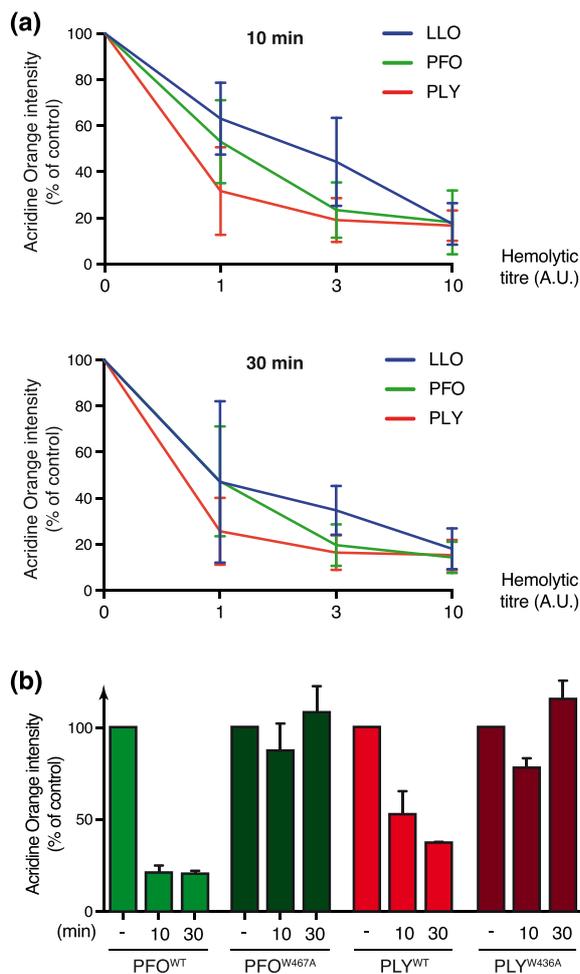


FIGURE 6 Neutralization of host acidic compartments induced by PFO and PLY toxins. Acridine orange-stained HeLa cells were treated with wild-type or pore-deficient LLO, PFO, or PLY toxins for 10 or 30 min. (a) Wild-type toxins were used at various hemolytic titres (a titre of 10 A.U. corresponds to the hemolytic activity of 3 nM LLO). (b) Wild-type toxins were used at a hemolytic titre of 10 A.U. Mutant toxins were used at similar protein concentration than the corresponding wild-type. Geometric means of acridine orange fluorescence, as measured by flow cytometry analysis are represented, normalized to that of untreated cells (mean \pm SD from three independent experiments)

CDCs are rapidly repaired, compared to smaller pores formed by other class of toxins (Gonzalez et al., 2011; Idone et al., 2008). Endocytosis of membrane-bound toxins is one possible repair mechanism of perforated plasma membranes (Andrews et al., 2014; Corotte et al., 2013; Corotte, Fernandes, Tam, & Andrews, 2012). One could envisage that endocytosed CDCs pores traffic through the cell and fuse with lysosomal membranes leading to their permeabilization. Pores formed at the plasma membrane may also constitute an entry gate for toxin monomers to reach intracellular targets such as lysosomes. On the other hand, pores in the plasma membrane are known to trigger several signaling cascades. One of these cascades may indirectly lead to lysosome permeabilization, which can be triggered in response for example to oxidative stress or DNA damage (Boya & Kroemer, 2008).

While release of cathepsins during LMP was shown to induce apoptosis in some instances (Boya & Kroemer, 2008), we could not detect activation of caspase 3 nor induction of cell death in HeLa cells treated with LLO or infected with *Listeria* (Figure S2). These results are consistent with previous studies showing that exposure to LLO or infection by *Listeria* does not trigger classical apoptosis in HeLa cells, in contrast to infection by other bacterial pathogens such as *Shigella flexneri* or *Salmonella Typhimurium* (Stavru et al., 2011; Tattoli et al., 2008). This absence of cell death induction, despite LMP, may result from a limited amount of destabilized lysosomes, and thus a limited amount of released cathepsins, or from the only transient activity of cathepsins detected in the cytosol after infection. The rapid resealing of LLO pores in epithelial cells may also contribute to the lack of accumulation of permeabilized lysosomes over time (Andrews et al., 2014; Gonzalez et al., 2011; Idone et al., 2008; Peraro & van der Goot, 2016).

One interesting hypothesis would be that LLO-induced LMP has different consequences depending on the cell type and may participate to cell death induction in only a specific subset of host cells. Apoptosis induced in response to *Listeria* infection has indeed been previously reported *in vivo* (Carrero & Unanue, 2012). At the liver level, hepatocytes can die from apoptosis following infection, independently of circulating immune cells, which then triggers the release of neutrophils chemoattractants (Rogers, Callery, Deck, & Unanue, 1996). Intracerebral infection leads to apoptosis of specific neurons from the hippocampal region (Schluter et al., 1998). Finally, LLO can induce apoptosis of T lymphocytes at infective loci by both caspase-dependent and caspase-independent pathways. One proposed mechanism is that LLO triggers the release of granzyme from lytic granules to the lymphocyte cytosol (Carrero, Vivanco-Cid, & Unanue, 2008). As lytic granules are functionally related to lysosomal compartments, this mechanism interestingly echoes our observed LLO-dependent release of lysosomal cathepsins in epithelial cells.

Previous studies have reported a role for LLO in the alteration of *Listeria* internalization vacuole integrity, following bacterial entry (Henry et al., 2006; Shaughnessy et al., 2006). These effects are mediated by LLO secreted intracellularly by engulfed bacteria and are restricted to the internalization vacuoles. In this study, we report an independent role of LLO, which, when secreted extracellularly, triggers host lysosomes permeabilization. The fact that other toxins, secreted by strictly extracellular pathogens, also induce lysosomes alterations strengthens our conclusions that LLO, as other CDCs, act in this case from the outside of host cells.

In conclusion, we have identified lysosomes as a previously overlooked target of *Listeria* infection. As lysosomes play a central role in the cell homeostasis, our study suggests that *Listeria* infection may affect important cellular pathways linked to lysosomal functions, which may be cell type-dependent. This alteration of host lysosomal functions may either be beneficial for *Listeria* and thus participates to the strong attenuated virulence of the *Listeria* Δ hly mutant, or, conversely, be sensed as a danger signal triggering host antibacterial responses. This study provides another example of the role of extracellular LLO on the modulation of host cell activities and possibly of cells that are not invaded by *Listeria*, in addition to the initially described role of this toxin in bacterial escape from the

internalization vacuole. Our results also suggest that other pore-forming toxin secreting pathogens may target host lysosomes and trigger host lysosomal permeabilization during infection. Finally, our study identifies LLO as an interesting tool to study mechanisms and consequences of lysosomal permeabilization in cell physiology and diseases.

4 | EXPERIMENTAL PROCEDURES

4.1 | Cell culture

HeLa cells (American Type Culture Collection (ATCC) CCL-2), Hep G2 (ATCC HB-8065), Caco-2 (ATCC HTB-37), RAW 264.7 (ATCC TIB-71), and J774 A.1 (ATCC TIB-67) were cultivated at 37 °C in a 10% CO₂ atmosphere in Minimum Essential Medium (MEM) (Invitrogen). Culture media for HeLa and Hep G2 cells were supplemented with 2 mM Glutamax (Invitrogen), 10% Fetal Bovine Serum (FBS), MEM nonessential aminoacids (Invitrogen), and 1 mM sodium pyruvate. Culture medium for Caco-2 cells was supplemented with 2 mM Glutamax, 20% FBS, MEM nonessential aminoacids, and 1 mM sodium pyruvate. Culture medium for RAW 264.7 and J774A.1 cells was supplemented with 4 mM Glutamax, 10% FBS, and 1 mM sodium pyruvate.

4.2 | Bacterial strains

Listeria strains were grown in brain heart infusion broth or agar plates (BD Difco) at 37 °C. Strains used in this study were *L. monocytogenes* EGD (BUG 600), the corresponding isogenic deletion mutants EGD Δ hly (BUG 3650; see below), and chromosomally GFP-tagged EGD (EGD-GFP; BUG 2539) (Balestrino et al., 2010) and EGD Δ hly (EGD Δ hly-GFP; BUG 2786; see below).

4.3 | Generation of Δ hly mutant strains

To generate *L. monocytogenes* EGD Δ hly strain (BUG 3650), two ~1,000 pb fragments flanking *hly* gene were PCR amplified from EGD chromosomal DNA. The primers used for the *hly* 5' flanking fragment were 5'-ATACAGTCGACTTATTGTCGCT-3' and 5'-TACAAACGCGTGGGTTTCACTC-3', and the primers used for the 3' fragment were 5'-AACCCACGCGTTTGTAAGTAA-3' and 5'-TGTATAGATCTAAGCGCTGAAA-3'. After restriction of the amplified 5' and 3' fragments with *Sall* and *MluI*, and *MluI* and *BglII*, respectively, 5' and 3' fragments were coligated in the thermosensitive pMAD plasmid (Arnaud, Chastanet, & Debarbouille, 2004) digested by *Sall* and *BglII*, yielding the pMAD- Δ hly plasmid (BUG3621). This plasmid was electroporated into *L. monocytogenes* strain EGD, and gene deletion was performed as described in (Arnaud et al., 2004). Deletion of the entire *hly* gene was confirmed by sequencing.

Chromosomally GFP-tagged EGD Δ hly strain (BUG 2786) was obtained by electroporating pAD-cGFP plasmid into EGD Δ hly strain as described in Balestrino et al., 2010.

4.4 | Bacterial infections

HeLa cells were seeded at a density of 5×10^5 cells per 960 mm² wells the day before infection. Bacteria were cultured overnight at 37 °C, then subcultured 1:20 in brain heart infusion until exponential-phase (OD_{600 nm} of 1.0), and washed 4 times in PBS. HeLa cells were serum-starved for 2 hr before infection. Bacteria were added to cells at a multiplicity of infection of 50 and centrifuged on cells for 5 min at 200×g. After 1 hr of infection, cells were washed and harvested, or incubated for four additional hours with fresh medium supplemented with 10% FBS and 50 µg/ml gentamicin (Euromedex) to kill extracellular bacteria.

4.5 | Pore-forming toxins treatment

Bacterial expression vectors for wild type of pore-deficient toxins were generated by inserting genes coding for C-terminally His₆-tagged LLO, PFO, and PLY toxins in pET29b plasmid (Novagen) (pET29b-His₆-LLO^{WT}, BUG1965 (Glomski, Gedde, Tsang, Swanson, & Portnoy, 2002); pET29b-His₆-PFO^{WT}, BUG3888; pET29b-His₆-PLY^{WT}, BUG3889). Punctual mutations were introduced in these plasmids by PCR mutagenesis to generate expression vectors for pore-deficient toxins (pET29b-His₆-LLO^{W492A}, BUG2664 (Ribet et al., 2010); pET29b-His₆-PFO^{W467A}, BUG4081; pET29b-His₆-PLY^{W436A}, BUG4082). These vectors were then used to purify pore-forming toxins from *E. coli* cell extracts as previously described (Glomski et al., 2002). Purified pore-forming toxins were then added directly in culture medium of cells serum-starved for 2 hr as indicated in the text.

4.6 | Fluorescent staining of lysosomes

For LLO or LeuLeuOMe treatments, cells were incubated with either 5 mM Acridine Orange (ThermoFisher) for 15 min or 500 nM LysoTracker Red (ThermoFisher) for 30 min, then washed 3 times with MEM before treatment with 3 nM LLO or 2 mM LeuLeuOMe (H-Leu-Leu-OMe-HBr; Bachem). Cells infected for 1 or 5 hr with chromosomally GFP-tagged *Listeria* were stained for 15 min with Acridine Orange 2 hr before infection or 2 hr postinfection, respectively. Cells stained with Acridine Orange were harvested using a 1 mM EDTA-1 mM EGTA-PBS solution, pelleted, and fixed for 20 min using Cytofix/cytoperm solutions (BD Biosciences). Acridine Orange fluorescence was quantified by flow cytometry (excitation 488 nm; detection window: 665–715 nm). Forward- and side-scatter light was used to identify viable cells, and at least 5,000 events were captured and analyzed using FlowJo software. Cells stained with LysoTracker were incubated in phenol red-free DMEM and directly imaged on a Axiobserver Z1 confocal microscope (Zeiss) in prewarmed culture chamber for live-cell imaging. Images were analyzed with the ImageJ software. All displayed images are representative fields of at least three independent experiments.

4.7 | Chelation of extra- and intracellular calcium

HeLa cells were pre-incubated, 20 min before LLO treatment, in MEM supplemented with 1 or 10 mM EGTA, or with 0.1 mM BAPTA-AM (Sigma-Aldrich). After removal of the medium, cells were

incubated again in MEM supplemented with EGTA or BAPTA-AM, and with 3 nM LLO.

4.8 | Cell fractionation

Fractionation of cells was carried out by mechanical lysis and ultracentrifugation. Cells were seeded at 5×10^6 cells per 100 mm dishes the day before LLO treatment or *Listeria* infection. After treatment, cells were gently scrapped in 0.5% BSA-PBS and centrifuged at $300 \times g$ for 5 min at 4 °C. Pellets were then washed with chilled homogenization buffer (8% sucrose, 3 mM imidazole, 1 mM $MgCl_2$) and pelleted at $2000 \times g$ for 10 min at 4 °C. Cells were resuspended again in homogenization buffer supplemented with either 0.05% gelatine for cathepsins activity assays or 0.05% gelatine, 0.5 mM EGTA, and protease inhibitors (complete protease inhibitor cocktail tablets; Roche) for immunoblot analysis. Cell disruption was carried out by multiple passages through a 25G 5/8 in. needle. Cell lysates were then centrifuged at $200 \times g$ for 5 min at 4 °C. The supernatant was additionally centrifuged for 1 hr at $55,000 \times g$ at 4 °C. The final supernatants correspond to cytosolic fractions devoid of lysosomes. The corresponding pellets, containing lysosomes, were kept for further immunoblot analysis.

4.9 | Immunoblot analysis

For immunoblot analysis, HeLa cells or subcellular fractions were mixed with Laemmli buffer (125 mM Tris-HCl [pH 6.8], 4% SDS, 20% glycerol, 100 mM dithiothreitol [DTT], 0.02% bromophenol blue), sonicated, boiled for 5 min, and protein content was resolved by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins were then transferred on PVDF membranes (GE Healthcare) and detected after incubation with specific antibodies using Pierce ECL 2 Western Blotting Substrate (Fisher Scientific). The following primary antibodies were used for immunoblot analysis: mouse anti-actin (A5441; Sigma-Aldrich; 1:10,000 dilution), mouse anti-LAMP1 (555798 ; BD Pharmingen; 1:500 dilution), mouse anti-Ubc9 (610748 ; BD Transduction Lab; 1:1,000 dilution), and goat anti-cathepsin D (sc-6486 ; Santa-Cruz; 1:500 dilution). Anti-mouse and anti-goat HRP-conjugated antibodies were used as secondary antibodies (Abliance; 1:8,000 and 1:4,000 dilution, respectively). All displayed immunoblots are representative of at least three independent experiments.

4.10 | HRP-mediated chemical crosslinking of lysosomes

HeLa cells, seeded at 2.10^5 cells per 400 mm² wells the day before treatment, were serum-starved for 2 hr in MEM and then incubated with 5 mg/ml HRP in MEM, buffered at pH 7.5 with 12 mM HEPES, for 15 min at 37 °C. Cells were then washed 3 times with 5% BSA-PBS, followed or not by a 30 or 90 min chase period in HRP-free MEM without FBS at 37 °C. Cells were incubated on ice with PBS containing 100 µg/ml DAB and 0.003% H_2O_2 for 30 min. After three washes with PBS and one with MEM without FBS, cells were transferred again at 37 °C for 5 min and then treated with purified LLO. Cells were finally lysed either in Laemmli buffer for immunoblot analysis, or in 8.6% Sucrose; 20 mM HEPES; 10 mM KCl; 1.5 mM $MgCl_2$; 1 mM EDTA; 8 mM DTT; 1% NP-40 for quantification of cathepsins activity.

4.11 | Cathepsins activity assay

Proteolytic activity of cathepsins was determined using fluorogenic substrates specific for cysteine cathepsins (Z-FR-AMC) or for Cathepsin B (Z-RR-AMC) (Enzo Life Science). Fifty microliter of whole cell lysates or cytosolic fractions were transferred to microtitre plates and mixed with 50 µL Cathepsin Reaction Buffer (100 mM Sodium Acetate, 16 mM DTT, 16 mM EDTA, and 50 µM fluorogenic substrate; pH 7.0). Cathepsins activity was determined by measuring absorbance at 450 nm using a TriStar LB 941 system (Berthold) and by calculating the maximum rate of AMC release in each condition.

4.12 | Caspase 3 activity assay

Measurements of caspase-3 activity were performed using Colorimetric Caspase 3 Assay Kit (Sigma) according to manufacturer's instruction. After indicated treatments, HeLa cells were lysed at 4 °C and centrifuged. Supernatants were incubated with caspase 3-specific substrate (Ac-DEVD-pNA substrate) overnight. P-Nitroaniline (pNa) production was determined by measuring absorbance at 405 nm using a Tristar LB 941 system (Berthold), and pNa calibration curves were used to calculate caspase activities.

4.13 | Acid sphingomyelinase activity assay

HeLa cells, seeded at 1.10^5 cells per 200 mm² wells the day before treatment, were serum-starved for 2 hr in MEM before treatment with EGTA or BAPTA-AM. Supernatants, recovered after 30 min of 3 nM LLO treatment, were centrifuged for 5 min at $13,000 \times g$ to remove cell remnants. Quantification of acid sphingomyelinase activity in 50 µL of these supernatants was then performed using the Acid Sphingomyelinase Assay Kit (Abcam), following manufacturer's instruction and by measuring fluorescence on a Tristar LB 491 system (excitation 530 nm/emission 590 nm; Berthold).

4.14 | Quantification of cell death

Cell viability was determined using LIVE/DEAD[®] Fixable Red Dead Cell Staining Kit (ThermoFischer). HeLa cells were seeded at 3.2×10^5 cells per 960 mm² 2 days before LLO treatment or *Listeria* infection. After treatment, cells were detached with 0.05% Trypsin-EDTA (Life Technologies), washed in PBS and stained for 30 min with LIVE/DEAD[®] fluorescent dye. Cells were then washed in PBS, fixed for 30 min in IC Fixation Buffer (eBioscience), and washed again. Quantification of dead cells was performed by flow cytometry analysis (excitation 561 nm; detection window: 590–630 nm). Forward- and side-scatter light was used to exclude cellular fragments, and at least 10,000 events were captured and analyzed using FlowJo software.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank J. Gruenberg and R. Schekman for the helpful discussion, M. Hamon for the help with flow cytometry experiments, J. J. Quereda for the construction of the *Listeria* EGD Δhly strain and F. Stavru for the construction of the GFP-tagged *Listeria* EGD Δhly strain. Work in P.C.'s laboratory received financial support from Institut Pasteur,

INSERM, INRA, National Research Agency (ANR; ERANET Infect-ERA PROANTILIS ANR-13-IFEC-0004-02), the French Government's Investissement d'Avenir program, Laboratoire d'Excellence "Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases" (ANR-10-LABX-62-IBEID), the European Research Council (ERC) (Advanced Grant #233348 MODELIST, H2020-ERC-2014-ADG 670823-BacCellEpi), the Fondation le Roch les Mousquetaires and the Fondation Louis-Jeantet. J. M. is supported by a fellowship from Paris Diderot University; P. C. is a Senior International Research Scholar of the Howard Hughes Medical Institute and D. R. is a Research Associate from INSERM.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

AUTHOR CONTRIBUTION

D. R. and P. C. conceived and designed the study. D. R., P. C., and J. M. wrote the paper. D. R. and J. M. performed and analyzed the experiments. All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

REFERENCES

- Aits, S., & Jaattela, M. (2013). Lysosomal cell death at a glance. *Journal of Cell Science*, *126*, 1905–1912.
- Andrews, N. W., Almeida, P. E., & Corotte, M. (2014). Damage control: Cellular mechanisms of plasma membrane repair. *Trends in Cell Biology*, *24*, 734–742.
- Appelqvist, H., Waster, P., Kagedal, K., & Ollinger, K. (2013). The lysosome: From waste bag to potential therapeutic target. *Journal of Molecular Cell Biology*, *5*, 214–226.
- Arnaud, M., Chastanet, A., & Debarbouille, M. (2004). New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*, 6887–6891.
- Balestrino, D., Hamon, M. A., Dortet, L., Nahori, M. A., Pizarro-Cerda, J., Alignani, D., ... Toledo-Arana, A. (2010). Single-cell techniques using chromosomally tagged fluorescent bacteria to study *Listeria monocytogenes* infection processes. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*, 3625–3636.
- Bewley, M. A., Marriott, H. M., Tulone, C., Francis, S. E., Mitchell, T. J., Read, R. C., ... Dockrell, D. H. (2011). A cardinal role for cathepsin d in coordinating the host-mediated apoptosis of macrophages and killing of pneumococci. *PLoS Pathogens*, *7*, e1001262.
- Bewley, M. A., Naughton, M., Preston, J., Mitchell, A., Holmes, A., Marriott, H. M., ... Dockrell, D. H. (2014). Pneumolysin activates macrophage lysosomal membrane permeabilization and executes apoptosis by distinct mechanisms without membrane pore formation. *MBio*, *5*, e01710–e01714.
- Boya, P., & Kroemer, G. (2008). Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene*, *27*, 6434–6451.
- Boya, P., Andreau, K., Poncet, D., Zamzami, N., Perfettini, J. L., Metivier, D., ... Kroemer, G. (2003). Lysosomal membrane permeabilization induces cell death in a mitochondrion-dependent fashion. *The Journal of Experimental Medicine*, *197*, 1323–1334.
- Carrero, J. A., & Unanue, E. R. (2012). Mechanisms and immunological effects of apoptosis caused by *Listeria monocytogenes*. *Advances in Immunology*, *113*, 157–174.
- Carrero, J. A., Vivanco-Cid, H., & Unanue, E. R. (2008). Granzymes drive a rapid listeriolysin O-induced T cell apoptosis. *Journal of Immunology*, *181*, 1365–1374.
- Corotte, M., Almeida, P. E., Tam, C., Castro-Gomes, T., Fernandes, M. C., Millis, B. A., ... Andrews, N. W. (2013). Caveolae internalization repairs wounded cells and muscle fibers. *eLife*, *2*, e00926.
- Corotte, M., Fernandes, M. C., Tam, C., & Andrews, N. W. (2012). Toxin pores endocytosed during plasma membrane repair traffic into the lumen of MVBs for degradation. *Traffic*, *13*, 483–494.
- Cossart, P. (2011). Illuminating the landscape of host-pathogen interactions with the bacterium *Listeria monocytogenes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*, 19484–19491.
- Cossart, P., Vicente, M. F., Mengaud, J., Baquero, F., Perez-Diaz, J. C., & Berche, P. (1989). Listeriolysin O is essential for virulence of *Listeria monocytogenes*: Direct evidence obtained by gene complementation. *Infection and Immunity*, *57*, 3629–3636.
- Erdal, H., Berndtsson, M., Castro, J., Brunk, U., Shoshan, M. C., & Linder, S. (2005). Induction of lysosomal membrane permeabilization by compounds that activate p53-independent apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*, 192–197.
- Escoll, P., Mondino, S., Rolando, M., & Buchrieser, C. (2016). Targeting of host organelles by pathogenic bacteria: A sophisticated subversion strategy. *Nature Reviews. Microbiology*, *14*, 5–19.
- Eskandarian, H. A., Impens, F., Nahori, M. A., Soubigou, G., Coppee, J. Y., Cossart, P., & Hamon, M. A. (2013). A role for SIRT2-dependent histone H3K18 deacetylation in bacterial infection. *Science*, *341*, 1238858.
- Gaillard, J. L., Berche, P., & Sansonetti, P. (1986). Transposon mutagenesis as a tool to study the role of hemolysin in the virulence of *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, *52*, 50–55.
- Glomski, I. J., Gedde, M. M., Tsang, A. W., Swanson, J. A., & Portnoy, D. A. (2002). The *Listeria monocytogenes* hemolysin has an acidic pH optimum to compartmentalize activity and prevent damage to infected host cells. *The Journal of Cell Biology*, *156*, 1029–1038.
- Gonzalez, M. R., Bischofberger, M., Frêche, B., Ho, S., Parton, R. G., & van der Goot, F. G. (2011). Pore forming toxins induce multiple cellular responses promoting survival. *Cellular Microbiology*, *13*, 1026–1043.
- Gründling, A., Gonzalez, M. D., & Higgins, D. E. (2003). Requirement of the *Listeria monocytogenes* broad-range phospholipase PC-PLC during infection of human epithelial cells. *Journal of Bacteriology*, *185*, 6295–6307.
- Hamon, M. A., & Cossart, P. (2011). K⁺ efflux is required for histone H3 dephosphorylation by *Listeria monocytogenes* listeriolysin O and other pore-forming toxins. *Infection and Immunity*, *79*, 2839–2846.
- Hamon, M. A., Batsche, E., Regnault, B., Tham, T. N., Seveau, S., Muchardt, C., & Cossart, P. (2007). Histone modifications induced by a family of bacterial toxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*, 13467–13472.
- Hamon, M. A., Ribet, D., Stavru, F., & Cossart, P. (2012). Listeriolysin O: the Swiss army knife of *Listeria*. *Trends in Microbiology*, *20*, 360–368.
- Henry, R., Shaughnessy, L., Loessner, M. J., Alberti-Segui, C., Higgins, D. E., & Swanson, J. A. (2006). Cytolysin-dependent delay of vacuole maturation in macrophages infected with *Listeria monocytogenes*. *Cellular Microbiology*, *8*, 107–119.
- Idone, V., Tam, C., Goss, J. W., Toomre, D., Pypaert, M., & Andrews, N. W. (2008). Repair of injured plasma membrane by rapid Ca²⁺-dependent endocytosis. *The Journal of Cell Biology*, *180*, 905–914.
- Impens, F., Radoshevich, L., Cossart, P., & Ribet, D. (2014). Mapping of SUMO sites and analysis of SUMOylation changes induced by external stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*, 12432–12437.
- Jaiswal, J. K., Andrews, N. W., & Simon, S. M. (2002). Membrane proximal lysosomes are the major vesicles responsible for calcium-dependent exocytosis in nonsecretory cells. *The Journal of Cell Biology*, *159*, 625–635.
- Kathariou, S., Metz, P., Hof, H., & Goebel, W. (1987). Tn916-induced mutations in the hemolysin determinant affecting virulence of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology*, *169*, 1291–1297.

- Kennedy, C. L., Smith, D. J., Lyras, D., Chakravorty, A., & Rodd, J. I. (2009). Programmed cellular necrosis mediated by the pore-forming alpha-toxin from *Clostridium septicum*. *PLoS Pathogens*, 5, e1000516.
- Kirschke, H., Wiederanders, B., Bromme, D., & Rinne, A. (1989). Cathepsin S from bovine spleen. Purification, distribution, intracellular localization and action on proteins. *Biochemical Journal*, 264, 467–473.
- Laulagnier, K., Schieber, N. L., Maritzen, T., Haucke, V., Parton, R. G., & Gruenberg, J. (2011). Role of AP1 and Gadin in the traffic of secretory endo-lysosomes. *Molecular Biology of the Cell*, 22, 2068–2082.
- Lebreton, A., Lakisic, G., Job, V., Fritsch, L., Tham, T. N., Camejo, A., ... Bierné, H. (2011). A bacterial protein targets the BAHD1 chromatin complex to stimulate type III interferon response. *Science*, 331, 1319–1321.
- Lebreton, A., Stavru, F., & Cossart, P. (2015). Organelle targeting during bacterial infection: Insights from *Listeria*. *Trends in Cell Biology*, 25, 330–338.
- Lee, A. Y., Gulnik, S. V., & Erickson, J. W. (1998). Conformational switching in an aspartic proteinase. *Nature Structural Biology*, 5, 866–871.
- Luzio, J. P., Hackmann, Y., Dieckmann, N. M., & Griffiths, G. M. (2014). The biogenesis of lysosomes and lysosome-related organelles. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6, a016840.
- Matsuda, S., Okada, N., Kodama, T., Honda, T., & Iida, T. (2012). A cytotoxic type III secretion effector of *Vibrio parahaemolyticus* targets vacuolar H⁺-ATPase subunit c and ruptures host cell lysosomes. *PLoS Pathogens*, 8, e1002803.
- Meixenberger, K., Pache, F., Eitel, J., Schmeck, B., Hippenstiel, S., Slevogt, H., ... Opitz, B. (2010). *Listeria monocytogenes*-infected human peripheral blood mononuclear cells produce IL-1beta, depending on listeriolysin O and NLRP3. *Journal of Immunology*, 184, 922–930.
- Peraro, M. D., & van der Goot, F. G. (2016). Pore-forming toxins: Ancient, but never really out of fashion. *Nature Reviews. Microbiology*, 14, 77–92.
- Pillich, H., Loose, M., Zimmer, K. P., & Chakravorty, T. (2012). Activation of the unfolded protein response by *Listeria monocytogenes*. *Cellular Microbiology*, 14, 949–964.
- Pizarro-Cerda, J., Kuhbacher, A., & Cossart, P. (2012). Entry of *Listeria monocytogenes* in mammalian epithelial cells: An updated view. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2, pii: a010009.
- Portnoy, D. A., Jacks, P. S., & Hinrichs, D. J. (1988). Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. *The Journal of Experimental Medicine*, 167, 1459–1471.
- Pratt, M. R., Sekedat, M. D., Chiang, K. P., & Muir, T. W. (2009). Direct measurement of cathepsin B activity in the cytosol of apoptotic cells by an activity-based probe. *Chemistry & Biology*, 16, 1001–1012.
- Prince, L. R., Bianchi, S. M., Vaughan, K. M., Bewley, M. A., Marriott, H. M., Walmsley, S. R., ... Whyte, M. K. (2008). Subversion of a lysosomal pathway regulating neutrophil apoptosis by a major bacterial toxin, pyocyanin. *Journal of Immunology*, 180, 3502–3511.
- Reddy, A., Caler, E. V., & Andrews, N. W. (2001). Plasma membrane repair is mediated by Ca²⁺-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell*, 106, 157–169.
- Repnik, U., Hafner Cesen, M., & Turk, B. (2014). Lysosomal membrane permeabilization in cell death: Concepts and challenges. *Mitochondrion*, 19(Pt A), 49–57.
- Repnik, U., Stoka, V., Turk, V., & Turk, B. (2012). Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1824, 22–33.
- Ribet, D., Hamon, M., Gouin, E., Nahori, M. A., Impens, F., Neyret-Kahn, H., ... Cossart, P. (2010). *Listeria monocytogenes* Impairs SUMOylation for efficient infection. *Nature*, 464, 1192–1195.
- Rogers, H. W., Callery, M. P., Deck, B., & Unanue, E. R. (1996). *Listeria monocytogenes* Induces apoptosis of infected hepatocytes. *Journal of Immunology*, 156, 679–684.
- Schluter, D., Domann, E., Buck, C., Hain, T., Hof, H., Chakravorty, T., & Deckert-Schluter, M. (1998). Phosphatidylcholine-specific phospholipase C from *Listeria monocytogenes* is an important virulence factor in murine cerebral listeriosis. *Infection and Immunity*, 66, 5930–5938.
- Settembre, C., Fraldi, A., Medina, D. L., & Ballabio, A. (2013). Signals from the lysosome: A control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 14, 283–296.
- Shaughnessy, L. M., Hoppe, A. D., Christensen, K. A., & Swanson, J. A. (2006). Membrane perforations inhibit lysosome fusion by altering pH and calcium in *Listeria monocytogenes* vacuoles. *Cellular Microbiology*, 8, 781–792.
- Stavru, F., Bouillaud, F., Sartori, A., Ricquier, D., & Cossart, P. (2011). *Listeria monocytogenes* Transiently alters mitochondrial dynamics during infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 3612–3617.
- Stavru, F., Palmer, A. E., Wang, C., Youle, R. J., & Cossart, P. (2013). Atypical mitochondrial fission upon bacterial infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 16003–16008.
- Stoorvogel, W. (1998). Analysis of the endocytic system by using horseradish peroxidase. *Trends in Cell Biology*, 8, 503–505.
- Tam, C., Idone, V., Devlin, C., Fernandes, M. C., Flannery, A., He, X., ... Andrews, N. W. (2010). Exocytosis of acid sphingomyelinase by wounded cells promotes endocytosis and plasma membrane repair. *The Journal of Cell Biology*, 189, 1027–1038.
- Tattoli, I., Lembo-Fazio, L., Nigro, G., Carneiro, L. A., Ferraro, E., Rossi, G., ... Bernardini, M. L. (2008). Intracellular bacteriolysis triggers a massive apoptotic cell death in *Shigella*-infected epithelial cells. *Microbes and Infection*, 10, 1114–1123.
- Turk, B., Bieth, J. G., Bjork, I., Dolenc, I., Turk, D., Cimerman, N., ... Turk, V. (1995). Regulation of the activity of lysosomal cysteine proteinases by pH-induced inactivation and/or endogenous protein inhibitors, cystatins. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 376, 225–230.
- Vanden Berghe, T., Vanlangenakker, N., Parthoens, E., Deckers, W., Devos, M., Festjens, N., ... Vandenaebelle, P. (2010). Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell Death and Differentiation*, 17, 922–930.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

How to cite this article: Malet, J. K., Cossart, P., and Ribet, D. (2016), Alteration of epithelial cell lysosomal integrity induced by bacterial cholesterol-dependent cytolysins, *Cellular Microbiology*, doi: 10.1111/cmi.12682

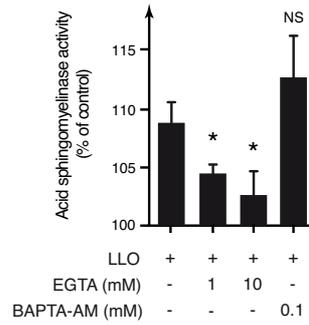


Figure S1. Inhibition of LLO-induced lysosome fusion with the plasma membrane.

Quantification of acid sphingomyelinase activity in supernatants from HeLa cells pre-treated or not with calcium chelators, and then exposed to 3 nM LLO for 30 min. Activities are expressed as percentages compared to cells not treated with LLO (mean \pm S.D. from 3 independent experiments; *, $p < 0.05$; NS, not significant; unpaired two-tailed Student's t-test).

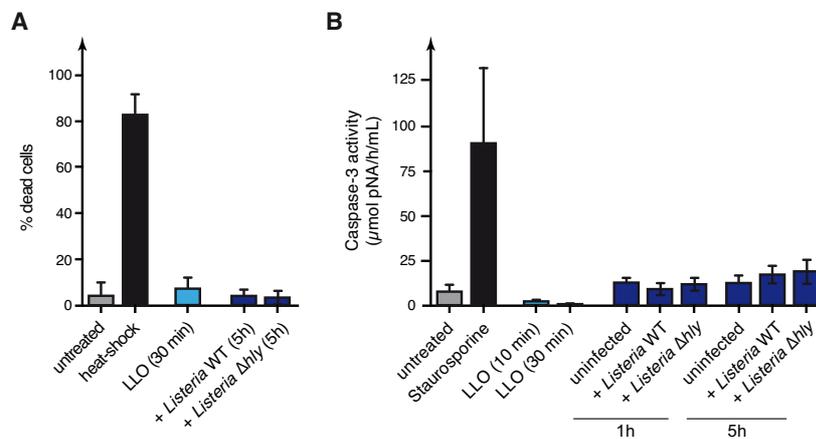


Figure S2. LLO treatment or *Listeria* infection do not trigger cell death in HeLa cells

(A) Quantification of cell death by flow cytometry analysis. HeLa cells were heat-shocked at 60°C for 10 min, infected with WT or Δhly *L. monocytogenes* for 5h, or treated with 3 nM LLO for 30 min. Cell death was quantified using a membrane integrity-based viability assay (mean \pm s.d. from 3 independent experiments). (B) Quantification of caspase-3 activity in HeLa cells treated with 1 μ M staurosporine for 3h, 3 nM LLO, or infected with WT or Δhly *L. monocytogenes* (mean \pm s.e.m. from 4 independent experiments).

2. Modifications du protéome durant l'infection par *Listeria monocytogenes*

2.1. Caractérisation des modifications du protéome de l'hôte en réponse à la LLO

Afin d'identifier les protéines de l'hôte potentiellement dégradées en réponse à la LLO, nous avons effectué une analyse protéomique quantitative basée sur la technique SILAC (*Stable Isotope Labelling by Amino acids in Cell culture*). Cette approche permet le marquage différentiel de deux populations de cellules : dans notre cas une population de cellules HeLa contrôle et une population de cellules traitées par la listériolysine O à des concentrations sub-lytiques (3 nM pendant 20 min). Les deux populations de cellules sont ensuite lysées et leur contenu protéique est digéré par la trypsine et analysé par spectrométrie de masse. Le marquage SILAC permet, pour chaque peptide identifié, de déterminer les quantités relatives dans les populations d'origine. Une protéine présente en quantité significativement plus faible dans les cellules incubées avec la LLO que dans les cellules contrôles sera considérée comme dégradée en réponse à l'exposition à cette toxine (le traitement par la LLO étant court, il est peu probable qu'une régulation transcriptionnelle soit impliquée ici).

Afin de déterminer si les événements de dégradation potentiellement identifiés font intervenir le protéasome, nous avons réalisé l'expérience en présence et en absence de MG-132, un inhibiteur du protéasome (Figure 12.A). Le résultat d'une de ces analyses est représenté en Figure 12.B. Les protéines dont la quantité dans la condition « +LLO » est inférieure à la moitié de la quantité dans la condition « contrôle » (c'est-à-dire avec un $\log_2(\text{CTRL/LLO}) > 1$) sont considérées comme dégradées.

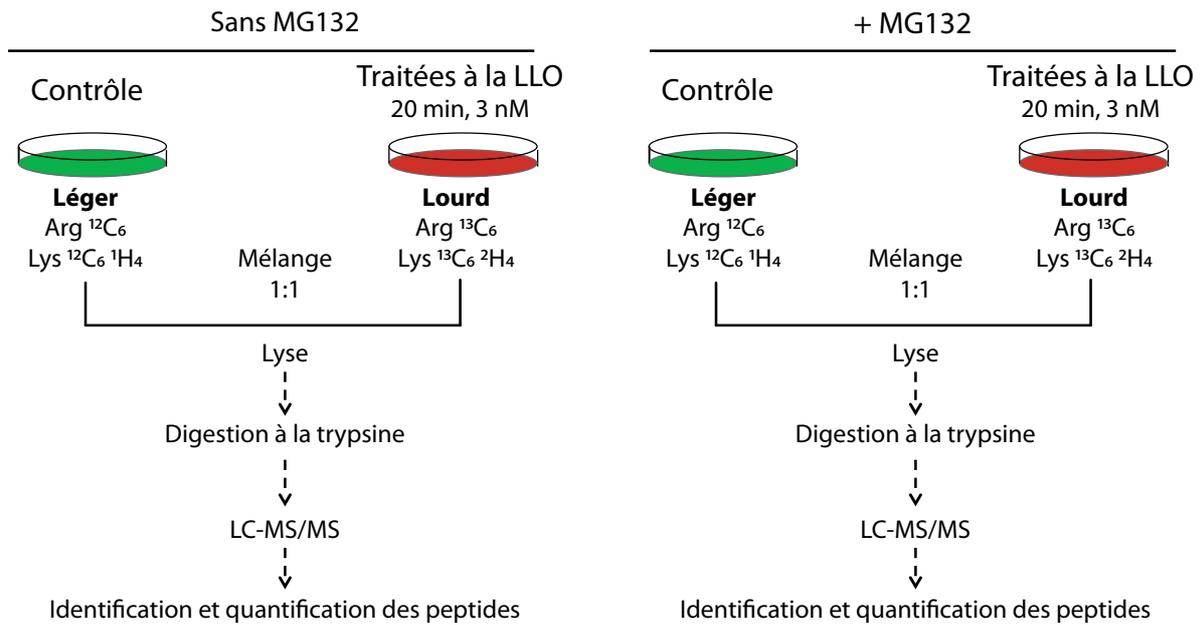
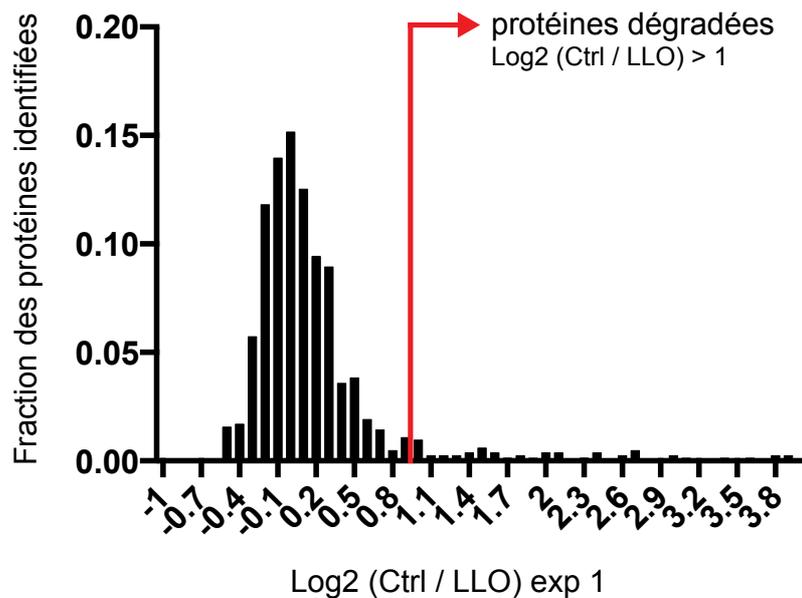
A**B**

Figure 12. Principe de l'analyse protéomique de la dégradation de protéines de l'hôte en réponse à la LLO. (A) Schéma du protocole utilisé : les cellules HeLa sont cultivées en milieu SILAC contenant ou non de l'arginine et de la lysine marquées avec des isotopes lourds. Dans une condition, les cellules sont traitées avec la LLO purifiée pendant 20 minutes à 3 nM, dans l'autre condition, les cellules ne sont pas traitées. Une expérience similaire est réalisée en présence de 20 μM de MG-132 pour inhiber le protéasome. Après traitement à la LLO, les cellules sont récoltées, lysées puis le contenu protéique est digéré à la trypsine avant d'être analysé par spectrométrie de masse. (B) Graphique d'analyse d'une expérience représentative, indiquant la fréquence des protéines identifiées en fonction du \log_2 du rapport de leur quantité respective dans les conditions CTRL et LLO. Une protéine P sera considérée comme dégradée si $\log_2(\text{CTRL}/\text{LLO}) > 1$, c'est-à-dire si la quantité de P dans la condition « +LLO » est 2 fois plus faible que dans la condition « CTRL ».

L'analyse de 2 séries d'expériences nous a permis d'identifier et de quantifier 1018 protéines de l'hôte. Sur l'ensemble de ces protéines, 92 protéines sont apparues comme

dégradées suite au traitement à la LLO. Ce résultat montre que les protéines précédemment identifiées comme dégradées en réponse à la LLO, à savoir Ubc9, Mff, Mre11 ou hTERT, font en fait partie d'un ensemble plus important de cibles dégradées en réponse à l'exposition à cette toxine. D'autre part, la grande majorité des protéines dégradées le sont également en présence de MG132, indiquant que les mécanismes de dégradation impliqués ne font pas intervenir le protéasome.

L'analyse de la masse moléculaire moyenne des protéines identifiées semble indiquer un léger biais des protéines dégradées vers des masses moléculaires plus faibles (43 kDa en moyenne contre 63 kDa en moyenne pour les protéines totales). Les deux populations montrent par contre un point isoléctrique moyen similaire : 6,82 pour la population totale et 6,85 pour les protéines dégradées (Figure 13.A).

Une analyse des catégories fonctionnelles auxquelles appartiennent ces protéines dégradées a montré une surreprésentation des protéines avec une activité aldoketoréductase (impliquée dans le maintien de l'équilibre rédox de la cellule), des protéines capables de lier l'ubiquitine, et des protéines impliquées dans l'épissage des ARNm ou la différenciation des cellules épithéliales (Figure 13.B). Nous n'avons pas observé d'enrichissement des protéines dégradées dans un compartiment cellulaire particulier, suggérant que ces dégradations pouvaient avoir lieu aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme des cellules. Nous avons enfin effectué une analyse des connexions établies entre les protéines dégradées, à partir de la base de données STRING (score de confiance >0,4). Cette analyse nous a permis d'identifier différents réseaux de protéines dont les interactions sont fortement altérés en réponse à l'exposition à la LLO, et donc au cours de l'infection par *Listeria* (Figure 13.C).

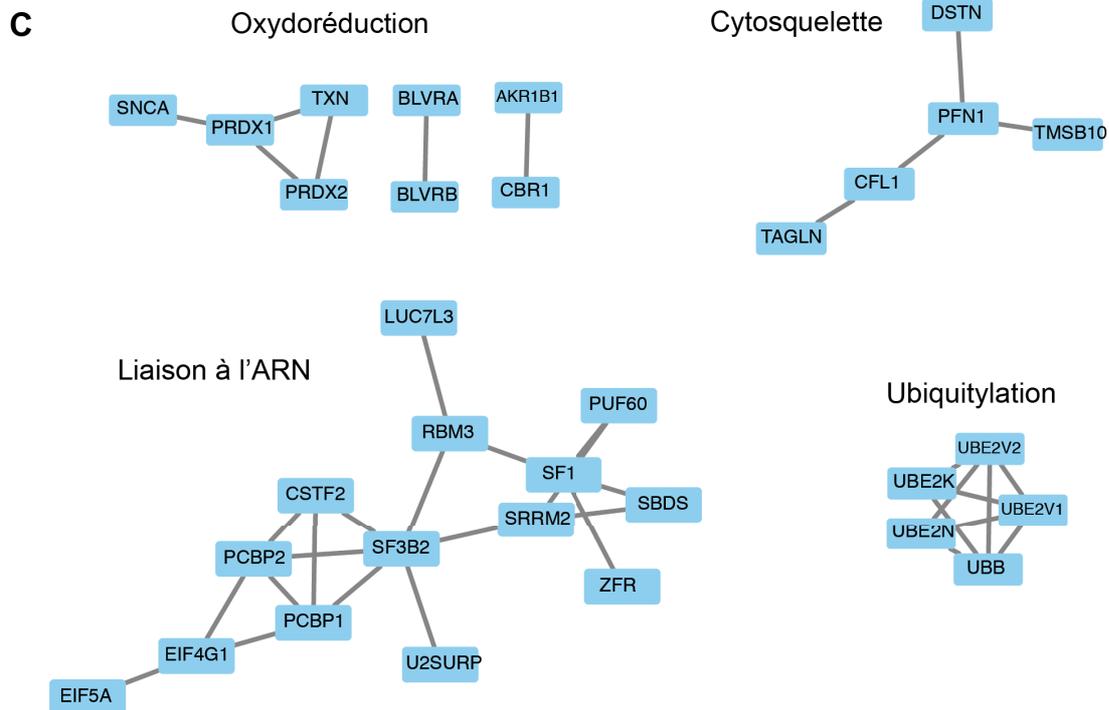
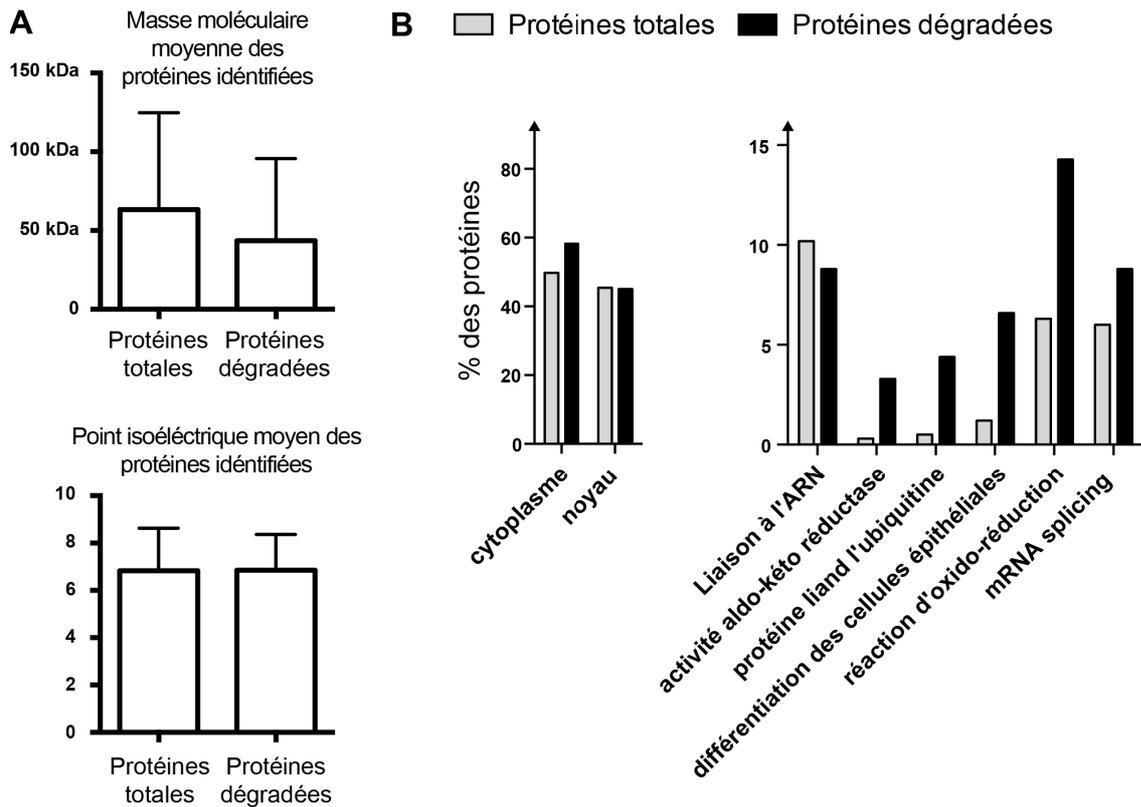


Figure 13. Etude fonctionnelle des protéines dégradées en réponse à la LLO. (A) Comparaison de la masse moléculaire moyenne (en haut) et du point isoélectrique moyen (en bas) des protéines identifiées. (B) Analyse des « GO term » (Gene Ontology term) associés aux protéines analysées (en gris : analyse effectuée sur l'ensemble des 1018 protéines quantifiées ; en noir : analyse effectuée sur les 92 protéines dégradées en réponse à la LLO *listeria* (Analyse effectuée à partir des données du site DAVID ; <https://david.ncicrf.gov/>). (C) Exemples de réseaux d'interactions existants pour les protéines dégradées en réponse à la LLO (définis d'après la base de donnée STRING ; score de confiance>0,4 ; <http://www.string-db.org>)

2.2. Validation des cibles identifiées comme dégradées en réponse à la LLO

Afin de valider par une autre approche expérimentale que la spectrométrie de masse la dégradation des protéines identifiées précédemment, nous avons suivi par Western Blot la dégradation des cibles suivantes : Ube2K (Ubiquitin-conjugating enzyme E2 K), Ube2N (Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N), Stefin B, PCBP1 (Poly(rC)-binding protein 1), PHTP1 (14 kDa phosphohistidine phosphatase), Thioredoxine, DSG2 (Desmoglein 2), Cyclophilin A et Ubc9 (déjà connue comme dégradée en réponse à la LLO (Ribet et al., 2010)). Nous avons analysé les lysats de cellules pré-traitées avec du MG-132 et traitées pendant 10 ou 30 minutes avec de la LLO purifiée (Figure 14). Nous avons pu confirmer que la quantité de ces protéines candidates diminuait de façon significative en réponse à la toxine, y compris en présence de MG-132, confirmant que ces protéines sont bien dégradées après exposition à la LLO, de façon indépendante du protéasome.

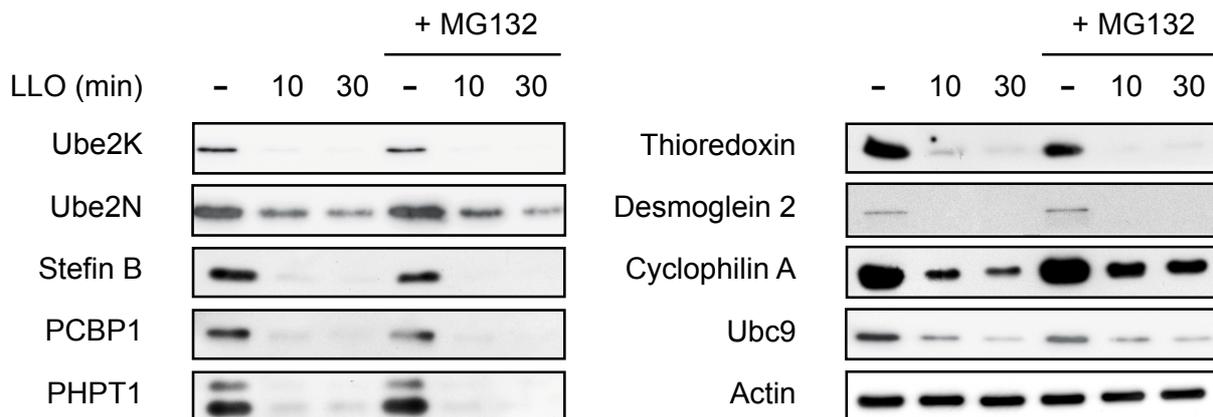


Figure 14. Validation des cibles dégradées en réponse à la LLO. Analyse par Western Blot de cellules HeLa pré-traitées ou non par du MG-132 puis traitées pendant 10 ou 30 minutes avec 3 nM de LLO purifiée. L'actine sert de contrôle de charge.

Nous avons ensuite voulu confirmer si ces évènements de dégradation, identifiés en utilisant la toxine LLO purifiée, se produisaient également dans le contexte de l'infection par *Listeria*. Nous avons d'abord réalisé une infection *in vitro* de cellules HeLa avec des bactéries exprimant la toxine LLO (WT) ou des mutants ne l'exprimant pas (Δhly). Les cellules ont été infectées pendant 1h puis directement lysées, ou lavées et incubées pendant 4h en présence de gentamicine pour tuer les bactéries extra-cellulaires avant d'être lysées. Les cellules ont ensuite été lysées et analysées par Western Blot. Nous avons pu observer une diminution de la quantité des protéines analysées en réponse à l'infection par la souche WT mais pas par la souche Δhly (Figure 15.A). Ces résultats permettent de confirmer que les protéines identifiées précédemment sont bien dégradées dans le contexte de l'infection

bactérienne, et de façon LLO-dépendante. En fonction des protéines analysées, nous avons pu noter une différence dans la cinétique de dégradation : certaines protéines sont dégradées dès 1h après infection, d'autres seulement après 5h.

Nous avons ensuite suivi la dégradation de ces protéines dans le contexte d'une l'infection *in vivo*. Des souris Balb/c ont été infectées par voie intraveineuse, puis sacrifiées 72h post-infection. Le contenu protéique des rates de souris contrôles ou infectées a ensuite été analysé par Western Blot. Comme précédemment, nous avons pu observer la diminution de la quantité des protéines Ubc9, Ube2N et Ube2K, indiquant que ces protéines sont dégradées au cours de l'infection dans un modèle *in vivo* (Figure 15.B).

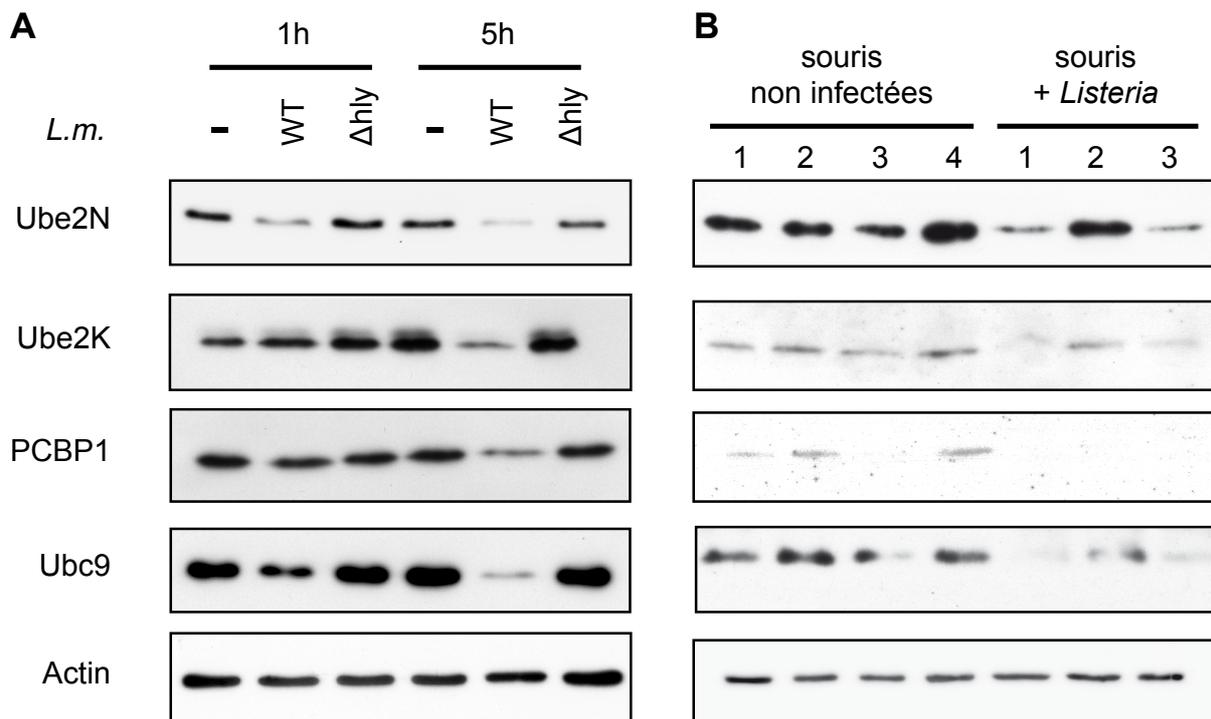


Figure 15. Validation des événements de dégradation durant l'infection par *Listeria*. (A) Analyse par Western Blot de lysats de cellules HeLa infectées par *Listeria monocytogenes* (souche EGD). Les cellules sont cultivées en milieu sans sérum pendant 2 heures avant infection. Les bactéries sont cultivées en phase exponentielle en milieu BHI, lavées, ajoutées dans le milieu de culture des HeLa à une multiplicité d'infection (MOI) de 50. Après une heure d'incubation à 37°C, les cellules sont lavées puis incubées 30 minutes ou 3h30 dans du milieu contenant du sérum et de la gentamicine (50 µg/mL) avant d'être lysées. (B) Analyse par Western Blot de lysats de rate de souris infectées par *Listeria* pendant 72h. Les souris (Balb/c) sont infectées par 5.10^5 bactéries par injection intraveineuse puis sacrifiées après 72h d'infection pour prélever les rates, les lyser et les analyser par Western Blot.

2.3. Mécanisme(s) de dégradation des protéines de l'hôte en réponse à la LLO

L'analyse protéomique et la validation par western blot des cibles identifiées ont montré que les événements de dégradation induits par la LLO sont indépendants du protéasome. Nous avons voulu caractériser plus en détail les mécanismes aboutissant aux dégradations

observées. Pour cela, nous avons analysé par Western Blot la dégradation des protéines de l'hôte induite par la LLO dans des cellules où certaines voies de dégradation étaient inhibées soit chimiquement, soit génétiquement.

Nous avons d'abord confirmé le caractère post-traductionnel des événements observés en pré-traitant des cellules HeLa à la cycloheximide, un inhibiteur de la traduction (Figure 16.A). Nous avons pu observer que les protéines Ube2K, Ube2N et Ubc9 ont normalement une demi-vie de plus de 8 heures et que la LLO réduit fortement cette demi-vie. Cette diminution de demi-vie confirme que la LLO agit de façon post-traductionnelle, en induisant la dégradation de ces protéines et non un arrêt de leur traduction.

L'implication éventuelle de la machinerie d'autophagie a ensuite été testée en traitant des cellules déficientes pour cette voie de dégradation, à savoir des MEFs n'exprimant pas Atg5, une E3 ubiquitine ligase nécessaire à la formation de l'autophagosome (Figure 16.B). L'addition de LLO dans le milieu de culture de MEFs *atg5^{-/-}* induit une dégradation d'Ubc9 ce qui suggère que l'autophagie n'est pas impliquée dans ce mécanisme de dégradation.

Nous avons ensuite testé l'implication de certaines protéases à sérine dans les processus de dégradation induits par la LLO (Figure 16.C). En effet, il a été montré qu'HlyA, une toxine formatrice de pores sécrétées par des UPEC (UroPathogenic *E. coli*), activait une mésotrypsine de l'hôte, une protéase à sérine, qui induisait alors la dégradation de plusieurs protéines de la cellule (Dhakal and Mulvey, 2012). Nous avons testé l'implication des protéases à sérines de types trypsine et chymotrypsine en pré-traitant les cellules avec des inhibiteurs spécifiques de ces familles de protéase, respectivement le TLCK et le TPCK. Nous n'avons pas observé d'inhibition de la dégradation d'Ubc9 en réponse à la LLO en présence de ces inhibiteurs. Ceci suggère que les mécanismes de dégradation induits par la LLO et par HlyA sont différents. De façon similaire, nous avons pu exclure le rôle de certaines métalloprotéases comme ADAM-10 dans la dégradation d'Ubc9 grâce à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques (GI254023X) (Inoshima et al., 2011) (Figure 16.C)

Enfin, comme nous l'avons présenté précédemment au cours de notre étude sur les lysosomes (manuscrit 1), nous avons testé l'implication des protéases lysosomales dans ce processus (Figure 16.D). Notre hypothèse était que la LLO, en induisant la perméabilisation des lysosomes, permettait la libération de protéases lysosomales vers le cytoplasme qui dégraderaient alors différents facteurs de l'hôte. L'inhibition des protéases lysosomales par un traitement de type HRP/DAB (Horseradish peroxidase/diaminobenzidine) ne bloque pas la dégradation d'Ubc9 induite par la LLO. Ce résultat nous permet d'exclure un rôle des protéases lysosomales dans la dégradation d'Ubc9.

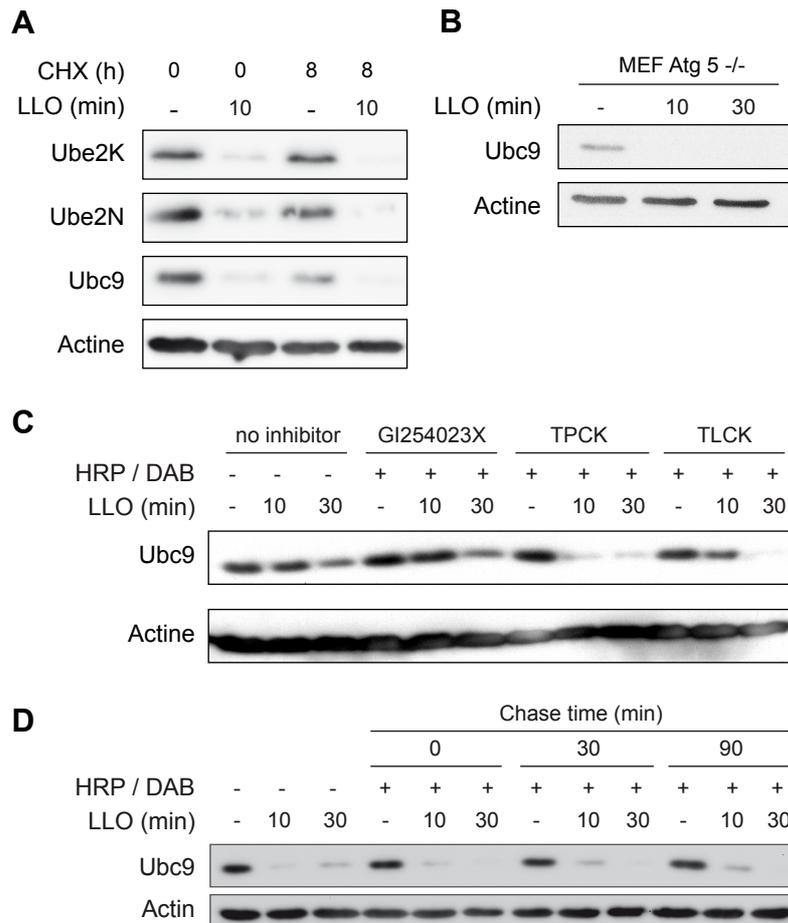


Figure 16. Caractérisation des mécanismes de dégradation induits par la LLO. (A) Analyse par Western blot de la demi-vie des protéines Ubc9, Ube2K et Ube2N en absence ou en présence de LLO. Les cellules HeLa sont traitées par la cycloheximide (CHX), un inhibiteur de la traduction cellulaire, pour estimer la demi-vie des protéines. La demi-vie après traitement à la LLO est ensuite déterminée. (B) Rôle de l'autophagie dans la dégradation d'Ubc9. Des MEF *atg5*^{-/-} déficientes pour la voie de l'autophagie sont traitées par la LLO pendant 10 ou 30 minutes puis lysées. La dégradation de la protéine Ubc9 est ensuite analysée par Western Blot. (C) Rôle des métalloprotéases et des protéases de types chymotrypsine et trypsine dans la dégradation d'Ubc9. Analyse par Western Blot de la dégradation d'Ubc9 dans des lysats de cellules traitées ou non avec un inhibiteur de métalloprotéases (GI254023X), un inhibiteur de sérines protéases de type sérine (TLCK) ou un inhibiteur de sérines protéases de type chymotrypsine (TPCK). (D) Rôle des protéases lysosomales dans la dégradation d'Ubc9. Analyse par Western Blot de la dégradation d'Ubc9 dans des lysats de cellules traitées ou non au HRP/DAB.

2.4. Conséquences fonctionnelles des dégradations induites par la LLO sur la physiologie cellulaire

Nous avons voulu déterminer l'impact de la dégradation de certaines des protéines de l'hôte sur la physiologie cellulaire et sur l'efficacité de répllication de *Listeria* dans les cellules. Nous nous sommes intéressés aux protéines Ube2K et Ube2N, des enzymes de conjugaison de type E2 de la machinerie d'ubiquitylation. Ube2K et Ube2N permettent la formation de chaînes de polyubiquitine de type « K48 » et « K63 », respectivement. Ces chaînes diffèrent par le nombre d'ubiquitines impliquées et leur géométrie de liaison, et les

conséquences de leur ajout sur une protéine cible seront différentes. Par exemple, les chaînes « K48 » sont en règle générale une marque d'adressage au protéasome, tandis que les chaînes « K63 » participent à la régulation de voies de signalisation comme la voie NF- κ B ou la réponse aux dommages à l'ADN.

Afin de tester l'effet de la dégradation de protéines Ube2K et Ube2N sur la réplication de *Listeria*, nous avons « mimé » leur dégradation en traitant les cellules avec des siRNA ciblant ces protéines. Nous avons ensuite infecté ces cellules avec une souche de *Listeria* WT, exprimant la LLO, ou une souche Δhly , ne produisant pas la LLO, et donc incapable d'induire la dégradation de ces protéines en temps normal. Après 1h30 et 24h d'infection, les cellules infectées sont lysées puis étalées sur boîtes BHI pour dénombrer les bactéries intracellulaires viables. Ceci nous a permis de calculer un taux de réplication à 24h, correspondant au rapport du nombre de bactéries obtenues après 24h d'infection sur le nombre de bactéries obtenues après 1h30 (Figure 17.A).

Nous avons pu observer une augmentation de l'efficacité de réplication du mutant Δhly dans les cellules traitées avec les siRNA dirigés contre Ube2K et Ube2N par rapport aux cellules traitées avec un siRNA contrôle. Ces résultats semblent indiquer qu'Ube2N et d'Ube2K ont un rôle inhibiteur sur la réplication de *Listeria*, et donc que leur dégradation favoriserait l'infection. De façon intéressante, l'augmentation d'efficacité d'infection avec les siRNA anti-Ube2K et Ube2N est moins importante avec la souche WT qui produit la LLO, et qui donc peut spontanément induire la dégradation de ces protéines, même en absence de siRNA.

Étant donné le rôle important des enzymes Ube2K et Ube2N dans la machinerie d'ubiquitylation, nous avons voulu déterminer les conséquences de la dégradation de ces enzymes sur l'ubiquitylation des protéines de la cellule hôte. Nous avons d'abord analysé par Western Blot le niveau global d'ubiquitylation des protéines de l'hôte dans des extraits totaux de cellules infectées pendant 5h par *Listeria* WT ou Δhly . Nous avons pour cela utilisé un anticorps reconnaissant à la fois les protéines mono et polyubiquitylées (Figure 17.B). Nous avons pu observer une diminution importante du taux global d'ubiquitylation après 5h d'infection avec la souche WT, mais pas avec le mutant Δhly . Ce résultat indique que l'infection par *Listeria* altère profondément le profil d'ubiquitylation de la cellule hôte, de façon LLO-dépendante. Ceci corrèle parfaitement avec la dégradation observée des protéines Ube2K et Ube2N, qui perturbe l'équilibre dynamique ubiquitylation/déubiquitylation vers les formes dé-ubiquitylées des protéines ciblées.

Afin de vérifier que la diminution de protéines ubiquitylées n'était pas due à leur dégradation par le protéasome, nous avons inhibé le protéasome en prétraitant pendant 5h des cellules HeLa avec 10 μ M de MG-132. Nous avons ensuite traité ces cellules par la LLO et analysé par Western Blot soit le profil d'ubiquitylation global, soit les protéines

spécifiquement modifiées par des chaînes de type « K48 » ou « K63 » grâce à des anticorps reconnaissant uniquement ce type de chaînes (Figure 17.C). Nous avons pu constater que la quantité de protéines modifiées par des chaînes d'ubiquitine est plus élevée en présence de MG132, ce qui traduit une inhibition de la dégradation de ces protéines par le protéasome et donc une stabilisation des protéines ubiquitylées. Malgré la présence de MG132, nous observons toujours une diminution importante de la quantité de protéines ubiquitylées après 10 et 30 minutes de traitement à la LLO, ce qui confirme que ces protéines sont déubiquitylées et non dégradées par le protéasome.

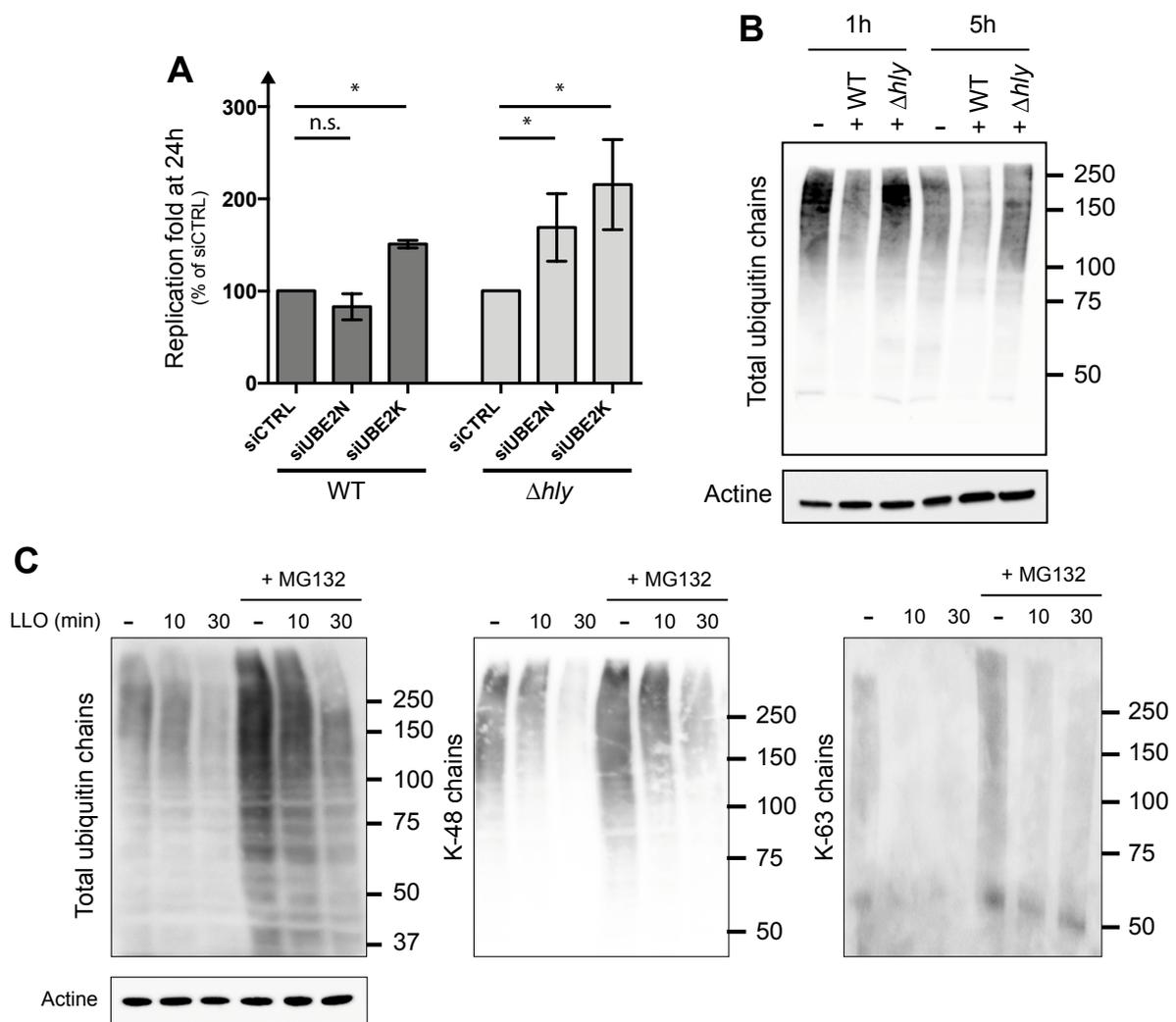


Figure 17. Effet de la dégradation d'Ube2N et Ube2K sur la physiologie des cellules hôtes et sur l'efficacité d'infection par *Listeria*. (A) Effet de l'inhibition par siRNA de l'expression d'Ube2K et Ube2N sur la réplication de *Listeria* après 24h d'infection. Les cellules HeLa sont traitées par des siRNA contrôle ou spécifiques d'Ube2N et Ube2K 48h avant l'infection. Les cellules sont infectées par *Listeria monocytogenes* (souche EGD) WT ou une souche n'exprimant pas la LLO (souche Δhly) pendant 1 heure à une multiplicité d'infection (MOI) de 50. Les cellules sont ensuite lavées et incubées pendant 30 minutes ou 22h30 dans du milieu contenant de la gentamicine (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Les cellules infectées sont ensuite lysées et étalées sur boîtes BHI pour dénombrer les bactéries intracellulaires viables. Le taux de réplication correspond au rapport du nombre de bactéries intracellulaires obtenues à 24h sur le nombre de bactéries obtenues à 1h30 (les taux sont exprimés en pourcentage du taux de réplication obtenu dans les cellules traitées avec un siRNA contrôle). (B) Analyse des protéines modifiées par des chaînes d'ubiquitine dans des cellules non-infectées (-) ou infectées pendant 5h par une souche de *Listeria monocytogenes* WT ou Δhly . Les lysats de cellules sont analysés avec un

anticorps reconnaissant les protéines mono et poly-ubiquitylées (anticorps FK2). (C) Analyse de cellules HeLa pré-traitées ou non avec l'inhibiteur du protéasome MG132 puis incubées avec la LLO pendant 10 ou 30 minutes. Les lysats de cellules sont analysés avec un anticorps reconnaissant spécifiquement les protéines mono et poly-ubiquitylées (anticorps FK2) ou les chaînes d'ubiquitine de type « K48 » ou « K63 ».

2.5. Matériels et méthodes

Cultures cellulaires

Les cellules HeLa (American Type Culture Collection (ATCC) CCL-2) et les MEF *atg5^{-/-}* (don de Cheryl Birmingham) sont cultivées en milieu MEM + Glutamax-I™ (Invitrogen) complémenté avec 10 % de sérum de veau foetal, du pyruvate et des acides aminés non essentiels (Invitrogen) à 37°C dans une atmosphère à 10 % de CO₂.

SILAC (Stable Isotope Labelling by Amino Acids in Culture)

Les cellules sont cultivées en milieu dépourvu de Lysine ou Arginine puis complémenté par de la Lysine ou de l'Arginine naturelle (marquage léger) ou des isotopes lourds stables (¹³C₆ Arginine ; ²H₄ Lysine ou ¹³C₆ Lysine) pendant plusieurs passages avant de réaliser l'expérience pour assurer l'incorporation des acides aminés.

Analyse LC/MS-MS

Après traitement par la LLO, les cellules sont lavées dans du PBS puis lysées dans un tampon CHAPS (50 mM Na-Phosphate pH7.4, 100 mM NaCl, 1% CHAPS, Protease Inhibitor Cocktail, H₂O). Les lysats sont ensuite mixés en quantités égales, soniqués et centrifugés pour obtenir une fraction soluble et non soluble. Pour chaque fraction, les protéines sont réduites et alkylées puis digérées par la trypsine. Les peptides sont ensuite séparés selon leur point isoélectrique, fractionnés par HPLC puis injectés dans le spectromètre de masse.

Analyse des résultats

Les données MS/MS sont analysées grâce au logiciel Mascot permettant l'identification des peptides à partir de la base de données Swiss-Prot. Le logiciel Distiller permet ensuite de quantifier les signaux de chaque peptide identifiés dans les différentes conditions (ratio des spectres MS/MS). Les protéines prises en compte pour la suite des analyses sont celles représentées par au moins 2 peptides différents. Le logiciel Rover permet enfin la quantification des protéines entre les deux conditions (intégrations des ratios des différents peptides de chaque protéine). Les protéines considérées comme dégradées sont celles pour lesquelles le rapport des quantités dans la condition « +LLO » comparé à la condition « CTRL » est en dessous d'un seuil significatif fixé pour chaque expérience.

Souches de bactéries

Les différentes souches de *Listeria* utilisées sont cultivées dans du milieu BHI (« Brain Heart Infusion ») liquide ou sur des boîtes d'agar (BD Difco) à 37°C. Les souches utilisées ici sont EGD (BUG 600) et la souche isogénique mutante correspondante EGD Δhly (BUG 3650).

Infection *in vitro*

Les cellules HeLa sontensemencées à 5×10^5 cellules par puits de 960 mm² le jour avant l'infection. Les bactéries sont cultivées sur la nuit à 37°C puis une sous culture est réalisée le lendemain par dilution au 1/20 jusqu'à atteindre la phase de croissance exponentielle (OD_{600 nm} de 1.0), puis lavées 4 fois dans du PBS. Les cellules HeLa sont incubées en milieu sans sérum pendant 2 heures avant l'infection. Les bactéries sont ajoutées à une multiplicité d'infection (MOI) de 50, puis centrifugées sur les cellules pendant 5 min à 200xg. Après une heure d'infection, les cellules sont lavées et récoltées ou incubées pendant le temps restant dans du milieu complétement avec 10 % de sérum de veau foetal et de la gentamicine à 50 µg/mL (Euromedex) pour tuer les bactéries extra-cellulaires.

Infection *in vivo*

10^6 bactéries sont injectées par voie intra-veineuse dans des souris C57Bl/6J. Après 72 heures d'infection, le foie et la rate sont collectés, homogénéisés et puis centrifugés 30 minutes à 13.000xg à 4°C. Un volume de surnageant est ensuite mélangé avec 3 volumes de tampon Laemmli avant analyse par Western Blot. Des souris non infectées, injectées par un volume équivalent d'eau physiologique sont utilisées comme contrôle.

Traitement siRNA

Les cellules HeLa sont transfectées par Lipofectamine RNAiMAX (ThermoFisher) avec des siRNA contrôles (Dharmacon, ON-TARGET plus, non targeting control pool D-001810), inhibant Ube2N (ON-TARGET pool : J-003920-06 to -09) ou Ube2K (ON-TARGET pool : J-009431-06 to -09). Les cellules sont infectées 48h après transfection.

Test de répllication intra-cellulaire

Les cellules transfectées sont infectées pendant 1 heure, puis lavées 3 fois et incubées pendant 30 minutes ou 23 heures dans du milieu de culture complétement avec 10 % de sérum de veau foetal et de la gentamicine à 50 µg/mL (Euromedex) pour tuer les bactéries extra-cellulaires. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois puis les bactéries intra-cellulaires sont récoltées après lyse des cellules infectées dans du PBS + Triton 0,2 % pendant 10 minutes. Les lysats sont dilués et étalés sur des boîtes de BHI. Le nombre de bactéries

intra-cellulaires est alors déterminé par comptage manuel. Le taux de réplication correspond au rapport de la quantité de bactéries intra-cellulaires à 24h d'infection sur la quantité de bactéries intra-cellulaires après 1h30 d'infection. Pour chaque souche de *Listeria*, les résultats sont exprimés en pourcentage du taux de réplication dans une cellule traitée avec un siRNA contrôle.

Traitement par la toxine LLO et par des inhibiteurs chimiques

Les cellules sontensemencées à 5×10^5 cellules par puits de 960 mm^2 . Avant traitement, les cellules sont incubées pendant 2 heures en milieu sans sérum. Les cellules sont ensuite traitées par la LLO (3 nM) pendant 10 ou 30 minutes.

Le protéasome est inhibé en incubant les cellules 5 heures avec du MG132 10 μM et de la Lactacystine 10 μM avant traitement à la LLO.

Les métalloprotéases sont inhibées en incubant les cellules 16h-18h avec du GI254023X à 20 μM avant traitement à la LLO.

Les protéases à sérines sont inhibées en incubant les cellules 1h avec du TPCK 100 μM ou TLCK 100 μM avant traitement à la LLO.

La demi vie de des protéines est évaluée en inhibant la traduction grâce à un traitement par la cycloheximide (100 μM) pendant 8h.

Western Blot

Les cellules sont directement lysées en tampon Laemmli (Tris 125 mM [pH6,8] ; 4% SDS ; 100 mM dithiothreitol ; 20% glycérol). Les lysats sont incubés 5 minutes à 95°C , soniqués puis déposés sur gel de polyacrylamide. Après migration en conditions dénaturantes, les protéines sont transférées sur membrane de PVDF, détectées avec des anticorps spécifiques et révélées par le réactif ECL 2 Plus (Thermo Scientific). Les anticorps primaires suivants ont été utilisés : lapin anti-Ube2K (3847 ; cell signaling ; 1:1,000) , souris anti-Ube2N (sc-376470 ; Santa Cruz ; 1 :1,000), lapin anti-Stefin (ab53725 ; abcam ; 1:1,000 dilution), lapin anti-PCBP1 (ab74793 ; abcam ; 1:1,000), anti-PHPT1 (ab71326 ; abcam ; 1:1,000 dilution), lapin anti-Thiorédoxine (ab26320 ; abcam ; 1:1,000 dilution), souris anti-Desmogléine 2 (ab14415 ; abcam ; 1 :1,000 dilution), anti-Cyclophyline A (ab41684 ; abcam ; 1:1,000 dilution), souris anti-Ubc9 (610748 ; BD Transduction Lab ; 1:1,000 dilution), souris anti-Actine (A5441; Sigma-Aldrich ; 1:10,000 dilution), souris anti-Ubiquitine totale (FK2 ; 1,000 dilution), lapin anti-chaînes K-48 (8081 ; Cell Signalling ; 1:1,000 dilution), anti- chaînes K-63 (5621 ; Cell Signalling ; 1:1,000 dilution). Des anticorps secondaires de chèvre anti-souris et anti-lapins couplés à la HRP ont été utilisés (Abliance ; 1 :8,000 et 1:4,000 dilution, respectivement).

Discussion et perspectives

1. Altération des fonctions lysosomales par *Listeria monocytogenes*

Ces travaux ont mis en évidence l'occurrence du phénomène de perméabilisation lysosomale durant l'infection par *Listeria monocytogenes*. Nous avons montré que la sécrétion de LLO extra-cellulaire déclenche la perte d'intégrité de la membrane des lysosomes associée à la neutralisation du compartiment et à la translocation de protéases lysosomales actives vers le cytoplasme des cellules hôtes. Nous avons aussi pu observer la perte d'acidité des lysosomes en réponse à d'autres toxines de la même famille que LLO, indiquant que d'autres pathogènes induiraient la LMP (Figure 18.A).

La perméabilisation de la membrane lysosome (*Lysosomal Membrane Permeabilization* ou LMP) est un phénomène encore peu décrit chez les bactéries pathogènes. *Vibrio parahaemolyticus* sécrète un effecteur appelé VepA capable d'induire la LMP en perturbant la pompe à proton des lysosomes. Il a été montré qu'après inoculation dans le cytoplasme, VepA s'associe à la sous unité c de la V-ATPase lysosomale et induit la perte d'acidité des lysosomes et la libération de la cathepsine D dans le cytoplasme (Matsuda et al., 2012). *Pseudomonas aeruginosa* sécrète un métabolite toxique, la pyocyanine, qui induit chez les neutrophiles la production de ROS (Reactive Oxygen Species) puis la perméabilisation des lysosomes associée à la libération de cathepsine D. La cathepsine D déclenche ensuite l'apoptose des neutrophiles dépendante des caspases-3 (Prince et al., 2008). Enfin, des études récentes ont montré que *Streptococcus pneumoniae* pouvait induire la LMP des macrophages grâce à la streptolysine O (Bewley et al., 2011). Cependant, l'activité formatrice de pore de la streptolysine O n'est pas requise pour l'induction de la LMP. Elle agirait plutôt en activant les TLR2 et TLR4 qui déclencheraient ensuite une neutralisation des lysosomes et une libération de cathepsine D. Dans ce dernier cas, une mort cellulaire dépendante des caspases est observée mais n'est pas liée à la libération des cathepsines (Bewley et al., 2014).

L'événement de LMP que nous observons présente les mêmes caractéristiques à savoir la perte d'acidité des lysosomes et libération des cathepsines lysosomales comme la cathepsine D vers le cytoplasme. Nous n'observons cependant pas d'augmentation de l'activité caspase-3 due à la LMP et la libération des cathepsines actives dans le cytoplasme en réponse à la toxine ou durant l'infection, comme il a déjà été montré avec d'autres agents inducteurs de LMP (Boya and Kroemer, 2008). L'absence de mort cellulaire dépendante de la LMP est peut être liée à la quantité de cathepsine libérée qui serait trop faible ou à l'activité de la cathepsine cytoplasmique qui est transitoire. Il est fort probable que la

réparation des pores durant l'infection (rapide dans le cas des cytolysines dépendantes du cholestérol) participe au caractère transitoire de la LMP (Gonzalez et al., 2011).

Les mécanismes induisant la LMP dans le contexte de l'infection sont assez divers. Dans le cas de *Pseudomonase aeruginosa*, la pyocyanine sécrétée à un fort potentiel réducteur et catalyse la production de ROS (ions superoxydes et peroxyde d'hydrogène (Hassan and Fridovich, 1980)) qui peuvent traverser les membranes, notamment celle des lysosomes. L'accumulation de ROS dans les lysosomes induit la peroxydation des lipides de la membrane lysosomale, sa déstabilisation puis rupture. Dans notre cas, l'action de la LLO extra-cellulaire n'a pas été rapportée comme induisant la production de ROS dans les cellules épithéliales ou les macrophages. Au contraire, la LLO inhibe la production de ROS intracellulaire par la NADPH oxydase durant l'infection de macrophage par *Listeria* et même après stimulation des macrophages par le LPS (Lam et al., 2011). Ces résultats nous indiquent que la production de ROS n'est probablement pas à l'origine de la LMP comme dans le cas de *Pseudomonas aeruginosa*.

Dans le cas de la pneumolysine, les travaux de Bewley et al. ont montré que l'activité formatrice de pores n'était pas essentielle à l'induction de LMP. Selon eux, la pneumolysine (ainsi que d'autres facteurs bactériens) activeraient des voies de signalisation par l'intermédiaire d'un système de détection des toxines composé des TLR2, TLR4 et de Myd88 (car des cellules déficientes pour ces récepteurs sont résistantes à l'induction de la LMP) (Bewley et al., 2014). Bien que les signaux menant à la LMP n'aient pas été déterminés, l'étape d'induction par une toxine formant des pores reste inédite selon les données bibliographiques (Aits and Jaattela, 2013; Appelqvist et al., 2013). Nos résultats diffèrent de ceux obtenus dans le contexte de l'infection par *Streptococcus pneumoniae* principalement car le type cellulaire dans lequel le phénotype observé est différent. Dans leur cas, ils observent une LMP tardive (8h à 16h après stimulation) indépendante de l'activité formeuse de pore de la toxine dans des macrophages. Dans notre cas, nous observons une LMP précoce (30 minutes à 1h après traitement ou infection) dépendante de l'activité formeuse de pores dans des cellules épithéliales (HeLa, Caco2 et HepG2) alors que les macrophages testés (Raw et J774) restent insensibles au traitement. Ces résultats impliquent que les mécanismes d'induction sont probablement différents de ceux observés par Bewley et ses collègues.

La perméabilisation lysosomale n'est pas le premier exemple d'effet de la LLO extra-cellulaire dépendant du type cellulaire. La dégradation d'Ubc9, MRe11, Mff, hTERT ou la déphosphorylation des histones dépendent aussi du type cellulaire. Ces événements ne sont induits que dans des cellules de type épithélial (données non publiées). Des expériences complémentaires devraient être menées pour déterminer si ces différences

sont liées à une réduction de l'activité de la LLO sur les membranes plasmiques des cellules phagocytaires (expliquée par une réparation des pores plus rapide ou une fixation, oligomérisation de la LLO et formation de pores réduite dans les membranes plasmiques phagocytaires). Pour être rigoureux, les expériences réalisées devraient aussi être étendus à d'autres types cellulaires rencontrés par *Listeria* durant l'infection (lymphocytes, neutrophiles, neurones, etc.).

Plusieurs facteurs activés en réponse à la LLO ou durant l'infection pourraient induire la LMP. Les calpaïnes sont des protéases dont l'activité est dépendante du calcium et qui ont été montré comme induisant directement la LMP dans des modèles de nécroses neuronales induites par l'augmentation du calcium intra-cellulaire (Yamashima, 2012; Yap et al., 2006) ou durant l'infection de myoblaste par *Clostridium septicum* (Kennedy et al., 2009). La LLO extra-cellulaire est connue pour induire un influx de calcium dans la cellule donc elle pourrait potentiellement induire l'activation des calpaïnes qui seraient responsables de la LMP. Bien que certaines études aient montré une activation des calpaïnes suite à la libération cytoplasmique de *Listeria* dans des macrophages (Dewamitta et al., 2010; Lopez-Castejon et al., 2012), l'éventuelle activation de ces calpaïnes dans des cellules épithéliales en réponse à la LLO extra-cellulaire reste à déterminer. Des expériences préliminaires suggèrent que ces calpaïnes ne sont probablement pas impliquées dans l'induction de la LMP dans notre cas. En effet, en prétraitant les cellules avec des chélateurs de calcium extra et intra-cellulaires, et donc en bloquant les flux de calcium libres induits par la LLO, nous n'avons pas observé d'inhibition de LMP. Nous pouvons donc conclure que les calpaïnes ne sont pas impliquées dans la LMP induite par la LLO.

Enfin, les résultats de Bewley et al. soulèvent le problème du trafic des CDC dans les cellules infectées. Bien que la LLO sécrétée par des bactéries intracytosoliques ait été montrée comme dégradée dans les macrophages (Schnupf et al., 2007), peu d'études se sont intéressées au devenir de la LLO extra-cellulaire insérée dans la membrane plasmique. Dans le cas d'autres CDC, les pores formés peuvent être endocytés. Les toxines sont alors ubiquitylées et envoyées dans des corps multivésiculaires qui finissent par fusionner avec les lysosomes, aboutissant ainsi à la dégradation de la toxine (Corrotte et al., 2012). Il serait intéressant de reproduire ces résultats avec la LLO, dans le contexte de l'infection par *Listeria*, et d'observer si d'autres facteurs bactériens peuvent influencer sur la réparation des pores.

Nos résultats ont montrés l'existence d'une LMP et de la libération de protéases lysosomales actives dans le cytoplasme en réponse à la LLO. Le rôle de la déstabilisation des lysosomes durant l'infection reste encore à déterminer. Si la LMP joue un rôle durant

l'infection, il faudrait déterminer si ce rôle est lié (1) à l'altération des fonctions lysosomales ou (2) à l'activité des protéases lysosomales une fois libérées dans le cytoplasme.

Altération des fonctions lysosomales

En dehors de leurs rôles dans la dégradation des macromolécules, des organites endommagés ou du contenu de certains types de vésicules, les lysosomes servent aussi de plateforme de signalisation régulant la balance énergétique de la cellule grâce au facteur de transcription TFEB (Settembre et al., 2012). TFEB active l'expression des gènes impliqués dans la biogenèse des lysosomes et l'autophagie (Sardiello et al., 2009). Sa localisation et son activité sont régulées par mTOR (mechanistic Target Of Rapamycin), une kinase phosphorylant TFEB au niveau de la membrane lysosomale. La phosphorylation de TFEB induit sa rétention dans le cytoplasme. En cas de stress énergétique (Settembre et al., 2013), ou lors de la déstabilisation des lysosomes (Zoncu et al., 2011), les pompe v-ATPase lysosomales transmettent un signal inhibant mTOR et donc la phosphorylation de TFEB. La déphosphorylation de TFEB et l'interaction avec différentes chaperones permettent ensuite sa translocation au noyau et l'activation de ses gènes cibles ((Medina and Ballabio, 2015; Medina et al., 2015)).

Bien que la translocation de TFEB n'ait pas été étudiée dans le cadre de l'infection par *Listeria*, il a été montré que l'infection par cette bactérie induit une carence en acides aminés et l'inhibition de mTOR (Tattoli et al., 2013). Cette inhibition de mTOR durant l'infection par *Listeria* est transitoire et caractérisée par le passage d'un marquage de mTOR lysosomal à un marquage cytoplasmique. Il a été proposé que cette inhibition de mTOR soit déclenchée par la sortie de *Listeria* de la vacuole d'internalisation de façon dépendante de la LLO. Les conditions expérimentales qui ont été utilisées ne permettent cependant pas d'exclure que l'inhibition transitoire de mTOR serait en fait liée à la perméabilisation des lysosomes déclenchée par la LLO extracellulaire. En effet, certains stress lysosomal peuvent induire une inhibition de mTOR et la translocation nucléaire de TFEB (Zoncu et al., 2011). Nous pourrions dans notre cas tenter de déterminer si la LLO extra-cellulaire et la perméabilisation lysosomale que nous observons permettent une telle inhibition de mTOR. Nous pourrions ensuite étudier la phosphorylation de TFEB, sa translocation nucléaire et la réponse transcriptionnelle induite. Ce processus permettrait alors à la cellule hôte de répondre aux dommages lysosomaux et de retourner à l'homéostasie en activant la biogenèse des lysosomes et la lysophagie (le retrait des lysosomes endommagés (Hasegawa et al., 2015)).

Activité des protéases lysosomales

Il y a près d'un demi-siècle, les premiers travaux sur les lysosomes ont amené les scientifiques à les décrire comme des « sacs à suicide » à cause du potentiel lytique des enzymes qu'ils renferment (de Duve, 1983). Il fallut attendre plusieurs décennies avant les premières descriptions de perméabilisation des lysosomes et du clivage de protéines cytoplasmiques par les cathepsines lysosomales. Ces études s'intéressent à l'apoptose déclenchée par la LMP (la mort lysosomale) et elles ont décrit les cathepsines lysosomales comme des médiateurs de l'apoptose. Contrairement aux caspases dont on connaît plusieurs milliers de substrats, très peu de cibles sont décrites pour les cathepsines. La plus décrite est la protéine Bid, un régulateur de l'apoptose dépendante des mitochondries. Bid est normalement activé par clivage par des caspases mais dans le cas de la LMP et de la libération des cathepsines, celles-ci peuvent directement cliver et activer Bid (Blomgran et al., 2007; Cirman, 2003; Heinrich et al., 2004). De la même manière, les protéines Bax (Bidere et al., 2003) et la caspase 8 (Conus et al., 2008) peuvent être directement activées par les cathepsines dans différents modèles cellulaires d'apoptose. Bien que notre modèle d'étude cellulaire (pas d'activation de la caspase 3) ou d'induction de la LMP diffère, nous pourrions tenter de quantifier les protéines décrites comme substrat pour les cathepsines cytoplasmiques. Afin de déterminer le rôle des protéases libérées durant l'infection, nous pourrions aussi opter pour une stratégie alternative consistant à étudier l'effet de l'inhibition des cathepsines (grâce à des inhibiteurs chimiques ou par siRNA) sur la réplication de *Listeria*.

2. Modifications du protéome durant l'infection par *Listeria monocytogenes*

Plusieurs études ont fait état de la dégradation de protéines de l'hôte durant l'infection par *Listeria* avec des conséquences sur la physiologie de la cellule (réponse aux dommages à l'ADN, activité mitochondriale, SUMOylation) et le processus d'infection. Ces événements de dégradation sont déclenchés par l'action extra-cellulaire de la LLO et sont indépendants du protéasome. Nos résultats montrent que ces modifications du protéome sont très étendues : une analyse protéomique a permis d'identifier 92 protéines dégradées en réponse à la toxine. Nous avons validé le fait que cette dégradation a lieu *in vitro* et *in vivo* durant l'infection de cellules et de souris par la bactérie. Nous nous sommes intéressés à la dégradation de deux enzymes de l'hôte mises en jeu dans la machinerie d'ubiquitylation : Ube2K et Ube2N. Des expériences préliminaires ont montré que ces enzymes participeraient à l'inhibition de la réplication de *Listeria* et que par conséquent leur

dégradation favoriserait l'infection. L'étude de ces protéines nous a amené à nous intéresser à l'ubiquitylation des protéines de l'hôte. Nous avons observé une diminution massive du nombre de protéines ubiquitylées en réponse à la toxine, un phénomène semblable à la déSUMOylation massive des protéines de l'hôte durant l'infection par *Listeria* (Ribet et al., 2010) (Figure 18.B).

L'analyse protéomique a mis en évidence des protéines dont les quantités étaient significativement réduites en réponse au traitement à la toxine (Figure 13). A noter que cette liste de protéines dégradées (annexe 2) n'est qu'un échantillon du nombre réel de protéines dégradées car :

- nous n'avons pas retrouvé dans l'analyse les protéines précédemment identifiées comme dégradées telles qu'Ubc9, Mre11, hTERT ou Mff, preuve que l'analyse réalisée pourrait être plus exhaustive et représentative du protéome de cellules infectées.
- le nombre de protéines identifiées (annexe 1) ne représente qu'une partie protéome humain (1082 protéines identifiées dans notre analyse pour un protéome humain de 30,057 protéines selon <http://www.humanproteomemap.org/>). Le raffinement des protocoles de spectrométrie de masse ainsi que l'utilisation de machines plus performantes permettraient d'améliorer le nombre de protéines détectées.

L'analyse par Western blot a ensuite confirmé que les protéines identifiées par spectrométrie de masse sont dégradées rapidement suite au traitement à la toxine et de manière indépendante du protéasome (Figure 14). Nous avons observé une dégradation maximum des protéines Ubc9, Ube2K et Ubc9 à 5 heures d'infection (Figure 15.A) ainsi que durant l'infection de souris (Figure 15.B).

Nous avons d'abord validé le fait que les diminutions de quantités de protéines observées en réponse à la toxine n'étaient pas liées à un arrêt de la traduction. Il a déjà été montré que les pore-forming toxins tels que la LLO ou l'aérolysine, par leur formation de pores dans la membrane, sont capables d'inhiber transitoirement la traduction des protéines de l'hôte et que des protéines à demi-vie courte telles que Myc sont rapidement dégradées (Gonzalez et al., 2011). Le mécanisme d'inhibition de la traduction est complexe mais semble reposer sur la phosphorylation d'eIF2 α (Eukaryotic Initiation Factor 2 α) qui empêcherait l'initiation de la traduction (Gonzalez et al., 2011; Shrestha et al., 2012). L'inhibition de la traduction a aussi été rapportée suite à l'inactivation de mTOR durant l'infection par *Listeria* (Tsalikis et al., 2015). Dans notre cas, le traitement à la cycloheximide indique que la diminution des quantités d'Ube2N, Ube2K et Ubc9 observée est liée à leur dégradation et pas seulement à l'arrêt de la traduction (Figure 16.A).

Les études réalisées sur les protéines hTert (Samba-Louaka et al., 2012), Mre11 (Samba-Louaka et al., 2014), Mff (Stavru et al., 2013) et Ubc9 (Ribet et al., 2010) ont montré, en utilisant plusieurs inhibiteurs de protéases, que leur dégradation reposait partiellement sur l'activation de protéases à aspartate (pour Ubc9) et/ou l'influx de calcium (pour hTert, Mre11 et Mff). Nous avons émis l'hypothèse que d'autres familles de protéases pourraient être mises en jeu dans le processus de dégradation et expliquerait la dépendance partielle des protéases à aspartate. Les lysosomes renfermant plusieurs familles de protéases (dont des protéases à aspartates comme les cathepsines D et E), nous avons voulu déterminer s'ils pouvaient être mises en jeu dans la dégradation des protéines de l'hôte à travers l'induction de l'autophagie ou la LMP. La LLO, ainsi que d'autres PFT comme l'aerolysine sont capables d'activer la voie d'autophagie caractérisée par la lipidation de LC3 (Gonzalez et al., 2011; Kloft et al., 2010; Meyer-Morse et al., 2010). Le rôle de cette induction de l'autophagie sur le déroulement de l'infection est encore sujet à débat. Il pourrait faire partie d'une réponse de la cellule hôte qui entrerait dans un état quiescent lié à la chute du niveau d'ATP qui suit la formation de pores (Kloft et al., 2010). L'autophagie pourrait aussi faire partie d'une réponse générale de l'hôte à la déstabilisation des membranes (Meyer-Morse et al., 2010). L'utilisation de cellules déficientes pour l'autophagie (Mef Atg5^{-/-}) nous a permis de montrer que ce processus n'était pas en jeu dans la dégradation des protéines. L'inhibition des protéases lysosomales par un traitement chimique (HRP / DAB) n'a pas non plus eu d'effet sur la dégradation d'Ubc9. Ces expériences écartent définitivement l'implication des protéases lysosomales dans le processus de dégradation, que ce soit à travers l'autophagie ou la LMP.

L'analyse *in silico* d'enrichissement de terme (GO term) n'a pas montré d'association particulière des protéines dégradées avec un compartiment spécifique comparé à l'ensemble des protéines détectées par spectrométrie de masse. Nous pouvons cependant observer que de nombreuses protéines dégradées sont associées au noyau (40 % des GO terms sont associés au noyau) ou à des fonctions nucléaires (épissage de l'ARN ou régulation de la différenciation des cellules épithéliales). Ces résultats concordent avec les études précédentes montrant la dégradation des protéines à fonctions nucléaires comme hTERT (composant de la télomérase), Mre11 (impliqué dans la réponse aux dommages à l'ADN) ou Ubc9 (responsable de la SUMOylation de protéines nucléaires (Impens et al., 2014). Il a été proposé que des protéases à aspartates seraient mises en jeu dans la dégradation de ces protéines. Très peu de protéases étant décrites comme actives dans le noyau (à part le protéasome (Mikecz, 2006), les hypothèses suivantes permettraient d'expliquer la dégradation des protéines associées au compartiment nucléaire:

- l'activation et le transport de protéases à aspartate dans le noyau. Il a déjà été montré qu'une protéase à cystéine de type cathepsine L peut être localisée au noyau pendant différentes phases du cycle cellulaire (Puchi et al., 2010).
- une diminution de la quantité des protéines dans le noyau, suite à leur export et leur dégradation dans le cytoplasme.

L'analyse d'enrichissement de terme a mis en évidence une surreprésentation des protéines mises en jeu dans l'ubiquitylation des protéines de l'hôte. Nous avons décidé de nous intéresser aux enzymes de conjugaison E2 (conjugases) Ube2N et Ube2K qui permettent l'élongation de chaînes spécifiques d'ubiquitines. Cette étape d'élongation nécessite que l'ubiquitine acceptrice soit orientée de manière à ce qu'uniquement la lysine à modifier (K6, K11, K27, K29, K33, K48 ou K63) soit en contact avec le lien thioester entre la conjugase et l'ubiquitine donneuse. La structure des conjugases qui interagissent avec les deux ubiquitines (donneuses et receveuse) permet leur orientation de manière à favoriser l'interaction avec une lysine particulière. Certaines conjugases fonctionnent en homo- ou hétéro-dimères, une sous unité liant l'ubiquitine acceptrice et l'autre soutenant la liaison thioester avec l'ubiquitine donneuse (Ye and Rape, 2009).

Ube2K est monomérique et permet l'élongation des chaînes K-48 (Middleton and Day, 2015) qui sert de signal d'adressage au protéasome. Ube2N fonctionne en homodimère avec Ube2V1 ou Ube2V2 et est l'un des seuls complexes décrits permettant la formation des chaînes K63 (Eddins et al., 2006; Ye and Rape, 2009) or Ube2V1 et Ube2V2 ont aussi été déterminées comme étant dégradées en réponse à la LLO ([cf annexe 2 : liste des protéines dégradées](#)). Les fonctions d'Ube2N et de l'élongation des chaînes K63 sont principalement liées à la réponse immunitaire et la réponse aux dommages à l'ADN. *Shigella flexneri* inhibe les fonctions immunitaires d'Ube2N en sécrétant OspI, une déamidase (Sanada et al., 2012). Celle ci retire l'amide de la glutamine en position 100 d'Ube2N, ce qui a pour effet d'inhiber l'ubiquitylation et l'activation de TRAF6, un inducteur de la voie NFκB lors de l'infection par *Shigella*. *Listeria* interragit de plusieurs façons avec la voie NFκB. Dans les macrophages, elle active la voie NF-KB dépendante des TLRs (Witte et al., 2012) ou en sécrétant différents facteurs comme InlB (Mansell, 2001; Mansell et al., 2000) ou PlcA et PlcB (Hauf et al., 1997). Dans les cellules épithéliales et endothéliales, la LLO induit rapidement et transitoirement l'activation de NF-KB (Kayal et al., 1999; 2002). Enfin, dans les cellules phagocytaires et non phagocytaires, *Listeria* retarde l'activation de la voie NF-KB en sécrétant InlC (Gouin et al., 2010). Nous pourrions tester si la dégradation d'Ube2N inhibe l'ubiquitylation de substrats tel que NEMO (Yamamoto et al., 2006; Zhou et al., 2004), ce qui retarderait l'activation de NF-KB.

Ube2N est aussi impliquée dans la réponse aux dommages à l'ADN. Plus précisément, elle est impliquée dans la même voie de réponse que Mre11 (Kolas et al., 2007), une autre protéine dont la dégradation est induite par la LLO (Samba-Louaka et al., 2014). Ube2N agit en aval de Mre11 où elle interagit avec l'ubiquitine ligase RNF8 et permet l'ubiquitylation et le recrutement des acteurs de la réponse au niveau des ruptures d'ADN double brins. En induisant la dégradation de Mre11 et Ube2N, *Listeria* assurerait ainsi l'inhibition de la réponse aux dommages à l'ADN en deux points de la voie de signalisation.

Le phénotype de déubiquitylation massive que nous observons est semblable au phénotype de désSUMOylation massive observé suite à la dégradation d'Ubc9 (Ribet et al., 2010). La SUMOylation est une modification proche de l'ubiquitine qui repose sur le même type de voie enzymatique. Il n'existe cependant qu'une seule conjugase (enzyme E2) spécifique à la SUMOylation : Ubc9. La SUMOylation étant un processus réversible (les désSUMOylases pouvant retirer les chaînes de SUMO des protéines modifiées), les auteurs ont avancé l'hypothèse que la dégradation de la seule conjugase de la voie SUMO déséquilibrerait la réaction dans le sens de la désSUMOylation. Pour pouvoir appliquer cette hypothèse dans le cas de la dégradation d'Ube2K et du complexe Ube2N / Ube2V, nous devrions d'abord valider le fait que ces conjugases sont les seules enzymes de la voie d'ubiquitylation touchées. Il est en effet probable que l'inhibition de la voie d'ubiquitylation ne se limite pas à la dégradation de ces conjugases car nous observons une diminution globale de l'ubiquitylation qui ne pourrait pas s'expliquer uniquement par la diminution des protéines modifiées par des chaînes K48 et K63.

Bien que la déubiquitylation semble affecter toutes les protéines de la cellule hôte, il serait intéressant d'identifier ces protéines par des techniques protéomiques (analyse SILAC et enrichissement par immuno-affinité). Nous pouvons espérer identifier certaines protéines résistantes à la déubiquitylation et tenter de déterminer par quels moyens elles y échappent. Le rôle de cette déubiquitylation massive durant l'infection est assez difficile à évaluer à cause son effet pléiotropique. Nous pouvons cependant étudier l'effet de cette déubiquitylation sur certaines voies connues pour être activées durant l'infection par *Listeria* comme l'internalisation dépendante des internalines. Il semble primordial d'étudier cette voie car l'internalisation nécessite l'ubiquitylation des récepteurs d'InIA et InIB (E-cadhérine et c-met, respectivement). La déubiquitylation induirait alors l'inhibition de l'entrée des bactéries.

Enfin, l'analyse d'enrichissement de terme a aussi mis en évidence la dégradation de protéines mises en jeu dans des réactions d'oxydo-réduction, liées au cytosquelette ou avec des motifs de liaison à l'ARN. Il serait judicieux de déterminer le rôle de ces dégradations durant l'infection par *Listeria*. D'un point de vue expérimental, il faudrait sélectionner un sous groupe de protéines d'intérêt en s'appuyant sur les résultats (notamment un criblage siRNA

à haut débit réalisé par le laboratoire pour identifier des gènes nécessaires à l'infection (Kühbacher et al., 2015)). Le rôle des protéines candidates serait ensuite évalué de la même manière qu'avec Ube2N et Ube2K : en étudiant l'effet de leur inhibition par siRNA ou de leur surexpression sur différentes étapes du cycle infectieux (efficacité d'invasion, de réplication et de passage de cellule à cellule). Il suffirait ensuite de comparer l'effet des siRNA sur la réplication d'un mutant Δhly de *Listeria* déficient pour l'induction de la protéolyse et d'une bactérie sauvage exprimant la toxine.

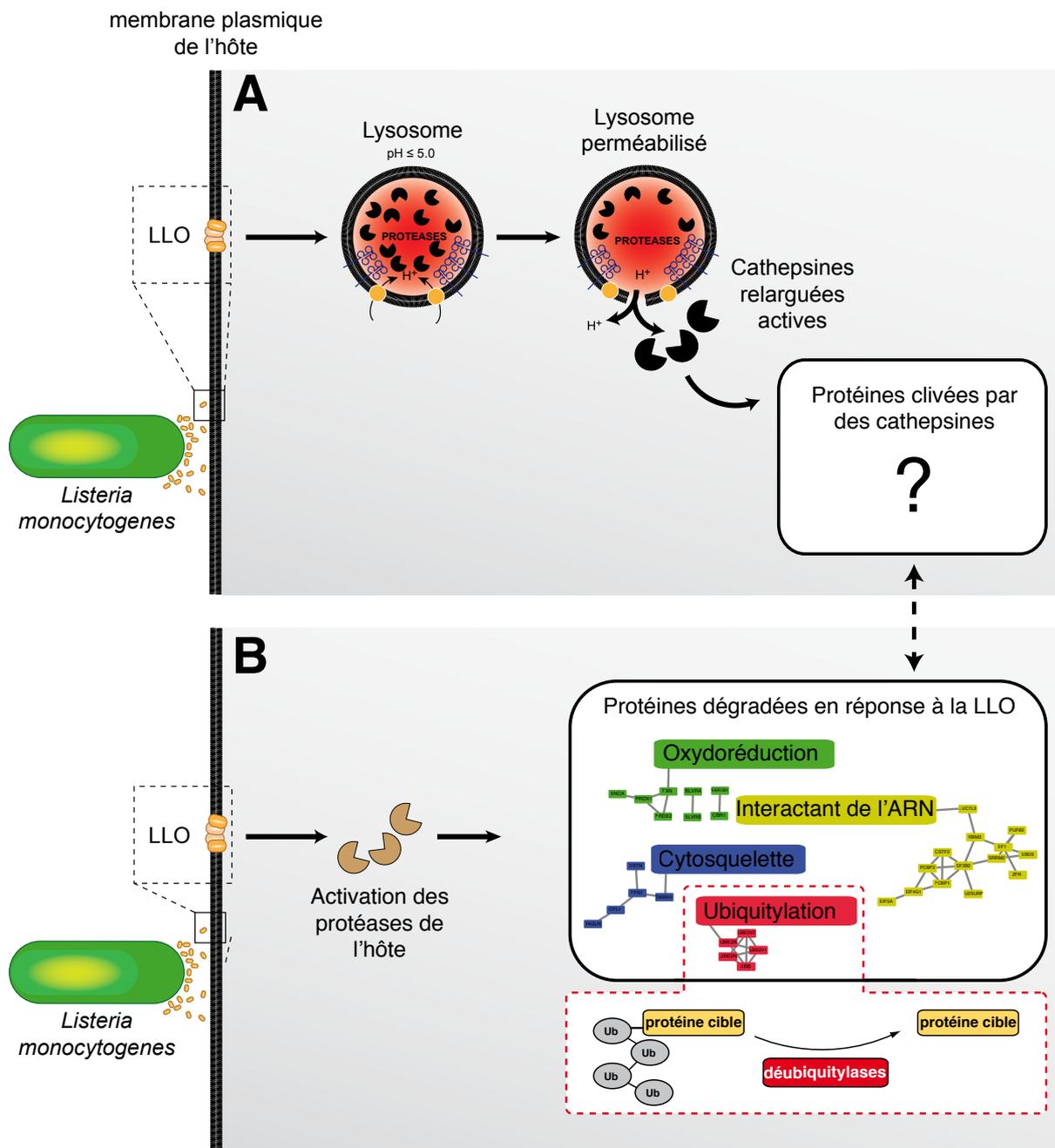


Figure 18. Modifications du protéome de la cellule hôte durant l'infection par *Listeria monocytogenes*. (A) La sécrétion de la Listeriolysine O par les bactéries extra-cellulaires et la formation de pores dans la membrane plasmique des cellules hôtes induit une perméabilisation des lysosomes. Ce processus permet la libération du contenu lysosomal, notamment certaines cathepsines, dans le cytosol de la cellule ciblée. Suite à leur libération, les cathepsines conservent leur activité pendant quelques heures et pourraient donc cliver certaines protéines cytosoliques. (B) La formation de pores dans la membrane de l'hôte induit en parallèle l'activation de protéases aboutissant à des modifications du protéome de la cellule hôte, comme la dégradation des protéines Ube2N et Ube2K impliquées dans le processus d'ubiquitylation. La dégradation de ces protéines est concomitante à la déubiquitylation massive des protéines de l'hôte.

Bibliographie

- Aits, S., and Jaattela, M. (2013). Lysosomal cell death at a glance. *Journal of Cell Science* 126, 1905–1912.
- Alvarez, D.E., and Agaisse, H. (2016). The Metalloprotease Mpl Supports *Listeria monocytogenes* Dissemination through Resolution of Membrane Protrusions into Vacuoles. *Infection and Immunity* 84, 1806–1814.
- Alvarez-Dominguez, C., Madrazo-Toca, F., Fernandez-Prieto, L., Vandekerckhove, J., Pareja, E., Tobes, R., Gomez-Lopez, M.T., Cerro-Vadillo, E.D., Fresno, M., Leyva-Cobián, F., et al. (2008). Characterization of a *Listeria monocytogenes* Protein Interfering with Rab5a. *Traffic* 9, 325–337.
- Appelqvist, H., Waster, P., Kagedal, K., and Ollinger, K. (2013). The lysosome: from waste bag to potential therapeutic target. *Journal of Molecular Cell Biology* 5, 214–226.
- Appelqvist, H., Johansson, A.-C., Linderöth, E., JOHANSSON, U., Antonsson, B., Steinfeld, R., Kågedal, K., and Öllinger, K. (2012). Lysosome-Mediated Apoptosis is Associated with Cathepsin D-Specific Processing of Bid at Phe24, Trp48, and Phe183. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 42, 231–242.
- Ashida, H., Kim, M., Schmidt-Supprian, M., Ma, A., Ogawa, M., and Sasakawa, C. (2010). A bacterial E3 ubiquitin ligase IpaH9.8 targets NEMO/IKKgamma to dampen the host NF-kappaB-mediated inflammatory response. *Nat Cell Biol* 12, 66–73–suppp1–9.
- Aubry, C., Goulard, C., Nahori, M.A., Cayet, N., Decalf, J., Sachse, M., Boneca, I.G., Cossart, P., and Dussurget, O. (2011). OatA, a Peptidoglycan O-Acetyltransferase Involved in *Listeria monocytogenes* Immune Escape, Is Critical for Virulence. *Journal of Infectious Diseases* 204, 731–740.
- Bavdek, A., Gekara, N.O., Priselac, D., Gutiérrez Aguirre, I., Darji, A., Chakraborty, T., Maček, P., Lakey, J.H., Weiss, S., and Anderluh, G. (2007). Sterol and pH Interdependence in the Binding, Oligomerization, and Pore Formation of Listeriolysin O †. *Biochemistry* 46, 4425–4437.
- Bavdek, A., Kostanjšek, R., Antonini, V., Lakey, J.H., Dalla Serra, M., Gilbert, R.J.C., and Anderluh, G. (2011). pH dependence of listeriolysin O aggregation and pore-forming ability. *FEBS Journal* 279, 126–141.
- Beck, F., Unverdorben, P., Bohn, S., Schweitzer, A., Pfeifer, G., Sakata, E., Nickell, S., Plitzko, J.M., Villa, E., Baumeister, W., et al. (2012). Near-atomic resolution structural model of the yeast 26S proteasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 14870–14875.
- Bewley, M.A., Naughton, M., Preston, J., Mitchell, A., Holmes, A., Marriott, H.M., Read, R.C., Mitchell, T.J., Whyte, M.K.B., and Dockrell, D.H. (2014). Pneumolysin Activates Macrophage Lysosomal Membrane Permeabilization and Executes Apoptosis by Distinct Mechanisms without Membrane Pore Formation. *mBio* 5, e01710–14–e01710–14.
- Bewley, M.A., Marriott, H.M., Tulone, C., Francis, S.E., Mitchell, T.J., Read, R.C., Chain, B., Kroemer, G., Whyte, M.K.B., and Dockrell, D.H. (2011). A Cardinal Role for Cathepsin D in Co-Ordinating the Host-Mediated Apoptosis of Macrophages and Killing of Pneumococci. *PLoS Pathog* 7, e1001262.

- Bidere, N., Lorenzo, H.K., Carmona, S., Laforge, M., Harper, F., Dumont, C., and Senik, A. (2003). Cathepsin D Triggers Bax Activation, Resulting in Selective Apoptosis-inducing Factor (AIF) Relocation in T Lymphocytes Entering the Early Commitment Phase to Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 278, 31401–31411.
- Bierne, H., Sabet, C., Personnic, N., and Cossart, P. (2007). Internalins: a complex family of leucine-rich repeat-containing proteins in *Listeria monocytogenes*. *Microbes and Infection* 9, 1156–1166.
- Birmingham, C.L., Canadien, V., Gouin, E., Troy, E.B., Yoshimori, T., Cossart, P., Higgins, D.E., and Brumell, J.H. (2007). *Listeria monocytogenes* Evades Killing by Autophagy During Colonization of Host Cells. *Autophagy* 3, 442–451.
- Bischof, L.J., Kao, C.-Y., Los, F.C.O., Gonzalez, M.R., Shen, Z., Briggs, S.P., van der Goot, F.G., and Aroian, R.V. (2008). Activation of the Unfolded Protein Response Is Required for Defenses against Bacterial Pore-Forming Toxin In Vivo. *PLoS Pathog* 4, e1000176.
- Bitar, A.P., Cao, M., and Marquis, H. (2008). The metalloprotease of *Listeria monocytogenes* is activated by intramolecular autocatalysis. *Journal of Bacteriology* 190, 107–111.
- Bivik, C.A., Larsson, P.K., Kågedal, K.M., Rosdahl, I.K., and Ollinger, K.M. (2006). UVA/B-induced apoptosis in human melanocytes involves translocation of cathepsins and Bcl-2 family members. *J. Invest. Dermatol.* 126, 1119–1127.
- Blériot, C., Dupuis, T., Jouvion, G., Eberl, G., Disson, O., and Lecuit, M. (2015). Liver-Resident Macrophage Necroptosis Orchestrates Type 1 Microbicidal Inflammation and Type-2-Mediated Tissue Repair during Bacterial Infection. *Immunity* 42, 145–158.
- Blomgran, R., Zheng, L., and Stendahl, O. (2007). Cathepsin-cleaved Bid promotes apoptosis in human neutrophils via oxidative stress-induced lysosomal membrane permeabilization. *Journal of Leukocyte Biology* 81, 1213–1223.
- Bonazzi, M., Vasudevan, L., Mallet, A., Sachse, M., Sartori, A., Prevost, M.C., Roberts, A., Taner, S.B., Wilbur, J.D., Brodsky, F.M., et al. (2011). Clathrin phosphorylation is required for actin recruitment at sites of bacterial adhesion and internalization. *The Journal of Cell Biology* 195, 525–536.
- Bonazzi, M., Kühbacher, A., Toledo-Arana, A., Mallet, A., Vasudevan, L., Pizarro-Cerda, J., Brodsky, F.M., and Cossart, P. (2012). A Common Clathrin-Mediated Machinery Coordinates Cell-Cell Adhesion and Bacterial Internalization. *Traffic* 13, 1653–1666.
- Bonazzi, M., Veiga, E., Pizarro-Cerda, J., and Cossart, P. (2008). Successive post-translational modifications of E-cadherin are required for InlA-mediated internalization of *Listeria monocytogenes*. *Cell Microbiol* 10, 2208–2222.
- Boneca, I.G., Dussurget, O., Cabanes, D., Nahori, M.-A., Sousa, S., Lecuit, M., Psylinakis, E., Bouriotis, V., Hugot, J.-P., Giovannini, M., et al. (2007). A critical role for peptidoglycan N-deacetylation in *Listeria* evasion from the host innate immune system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 997–1002.
- Boya, P., and Kroemer, G. (2008). Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene* 27, 6434–6451.

- Boya, P., Andreau, K., Poncet, D., Zamzami, N., Perfettini, J.L., Metivier, D., Ojcius, D.M., Jaattela, M., and Kroemer, G. (2003). Lysosomal Membrane Permeabilization Induces Cell Death in a Mitochondrion-dependent Fashion. *Journal of Experimental Medicine* 197, 1323–1334.
- Bravo, R., Parra, V., Gatica, D., Rodriguez, A.E., Torrealba, N., Paredes, F., Wang, Z.V., Zorzano, A., Hill, J.A., Jaimovich, E., et al. (2013). Endoplasmic Reticulum and the Unfolded Protein Response. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, (Elsevier), pp. 215–290.
- Burnaevskiy, N., Fox, T.G., Plymire, D.A., Ertelt, J.M., Weigele, B.A., Selyunin, A.S., Way, S.S., Patrie, S.M., and Alto, N.M. (2013). Proteolytic elimination of N-myristoyl modifications by the Shigella virulence factor IpaJ. *Nature* 496, 106–109.
- Burnaevskiy, N., Peng, T., Reddick, L.E., Hang, H.C., and Alto, N.M. (2015). Myristoylome Profiling Reveals a Concerted Mechanism of ARF GTPase Deacylation by the Bacterial Protease IpaJ. *Molecular Cell* 58, 110–122.
- Cantinelli, T., Chenal-Francisque, V., Diancourt, L., Frezal, L., Leclercq, A., Wirth, T., Lecuit, M., and Brisse, S. (2013). “Epidemic Clones” of *Listeria monocytogenes* Are Widespread and Ancient Clonal Groups. *J. Clin. Microbiol.* 51, 3770–3779.
- Cassidy, S.K.B., Hagar, J.A., Kanneganti, T.D., Franchi, L., Nuñez, G., and O’Riordan, M.X.D. (2012). Membrane Damage during *Listeria monocytogenes* Infection Triggers a Caspase-7 Dependent Cytoprotective Response. *PLoS Pathog* 8, e1002628.
- Chatterjee, S.S., Hossain, H., Otten, S., Kuenne, C., Kuchmina, K., Machata, S., Domann, E., Chakraborty, T., and Hain, T. (2006). Intracellular Gene Expression Profile of *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity* 74, 1323–1338.
- Ciechanover, A. (2005). Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, 79–87.
- Cirman, T. (2003). Selective Disruption of Lysosomes in HeLa Cells Triggers Apoptosis Mediated by Cleavage of Bid by Multiple Papain-like Lysosomal Cathepsins. *Journal of Biological Chemistry* 279, 3578–3587.
- Collins, C.A., and Brown, E.J. (2010). Cytosol as battleground: ubiquitin as a weapon for both host and pathogen. *Trends in Cell Biology* 20, 205–213.
- Conus, S., Perozzo, R., Reinheckel, T., Peters, C., Scapozza, L., Yousefi, S., and Simon, H.U. (2008). Caspase-8 is activated by cathepsin D initiating neutrophil apoptosis during the resolution of inflammation. *Journal of Experimental Medicine* 205, 685–698.
- Corr, S., Hill, C., and Gahan, C.G.M. (2006). An in vitro cell-culture model demonstrates internalin- and hemolysin-independent translocation of *Listeria monocytogenes* across M cells. *Microbial Pathogenesis* 41, 241–250.
- Corrotte, M., Fernandes, M.C., Tam, C., and Andrews, N.W. (2012). Toxin Pores Endocytosed During Plasma Membrane Repair Traffic into the Lumen of MVBs for Degradation. *Traffic* 13, 483–494.
- Cossart, H.B.A.P. (2002). InIB, a surface protein of *Listeria monocytogenes* that behaves as an invasin and a growth factor. 1–11.

- Cossart, P., Vicente, M.F., Mengaud, J., Baquero, F., Perez-Diaz, J.C., and Berche, P. (1989). Listeriolysin O is essential for virulence of *Listeria monocytogenes*: direct evidence obtained by gene complementation. *Infection and Immunity* 57, 3629–3636.
- Cossart, P. (2011). Illuminating the landscape of host-pathogen interactions with the bacterium *Listeria monocytogenes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 19484–19491.
- Cotoni, L. (1942). À PROPOS DES BACTÉRIES DÉNOMÉES LISTERELLA. *Annales De l'Institut Pasteur* 92–96.
- Czuczman, M.A., Fattouh, R., van Rijn, J.M., Canadien, V., Osborne, S., Muise, A.M., Kuchroo, V.K., Higgins, D.E., and Brumell, J.H. (2014). *Listeria monocytogenes* exploits efferocytosis to promote cell-to-cell spread. *Nature* 509, 230–234.
- de Duve, C. (1983). Lysosomes revisited. *Eur. J. Biochem.* 137, 391–397.
- Deiss, L.P., Galinka, H., Berissi, H., Cohen, O., and Kimchi, A. (1996). Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, Fas/APO-1 and TNF-alpha. *Embo J* 15, 3861–3870.
- Dewamitta, S.R., Nomura, T., Kawamura, I., Hara, H., Tsuchiya, K., Kurenuma, T., Shen, Y., Daim, S., Yamamoto, T., Qu, H., et al. (2010). Listeriolysin O-dependent bacterial entry into the cytoplasm is required for calpain activation and interleukin-1 alpha secretion in macrophages infected with *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity* 78, 1884–1894.
- Dhakal, B.K., and Mulvey, M.A. (2012). The UPEC Pore-Forming Toxin α -Hemolysin Triggers Proteolysis of Host Proteins to Disrupt Cell Adhesion, Inflammatory, and Survival Pathways. *Cell Host and Microbe* 11, 58–69.
- Disson, O., and Lecuit, M. (2012). Targeting of the central nervous system by *Listeria monocytogenes*. *Virulence* 3, 213–221.
- Disson, O., and Lecuit, M. (2013). In vitro and in vivo models to study human listeriosis: mind the gap. *Microbes Infect.* 15, 971–980.
- Disson, O., Grayo, S., Huillet, E., Nikitas, G., Langa-Vives, F., Dussurget, O., Ragon, M., Le Monnier, A., Babinet, C., Cossart, P., et al. (2008). Conjugated action of two species-specific invasion proteins for fetoplacental listeriosis. *Nature* 455, 1114–1118.
- Domann, E., Leimeister-Wächter, M., Goebel, W., and Chakraborty, T. (1991). Molecular cloning, sequencing, and identification of a metalloprotease gene from *Listeria monocytogenes* that is species specific and physically linked to the listeriolysin gene. *Infection and Immunity* 59, 65–72.
- Domann, E., Wehland, J., ROHDE, M., PISTOR, S., HARTL, M., Goebel, W., LEIMEISTERWACHTER, M., WUENSCHER, M., and Chakraborty, T. (1992). A Novel Bacterial Virulence Gene in *Listeria-Monocytogenes* Required for Host-Cell Microfilament Interaction with Homology to the Proline-Rich Region of Vinculin. *Embo J* 11, 1981–1990.
- Doran, K.S., Banerjee, A., Disson, O., and Lecuit, M. (2013). Concepts and Mechanisms: Crossing Host Barriers. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 3.

Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., and Martin, P. (2004). Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* *42*, 3819–3822.

Dramsi, S., and Cossart, P. (2003). Listeriolysin O-Mediated Calcium Influx Potentiates Entry of *Listeria monocytogenes* into the Human Hep-2 Epithelial Cell Line. *Infection and Immunity* *71*, 3614–3618.

Dramsi, S., Biswas, I., Maguin, E., Braun, L., Mastroeni, P., and Cossart, P. (1995). Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of inlB, a surface protein of the internalin multigene family. *Mol Microbiol* *16*, 251–261.

Drevets, D.A., Dillon, M.J., Schawang, J.S., van Rooijen, N., Ehrchen, J., Sunderkotter, C., and Leenen, P.J.M. (2004). The Ly-6Chigh Monocyte Subpopulation Transports *Listeria monocytogenes* into the Brain during Systemic Infection of Mice. *The Journal of Immunology* *172*, 4418–4424.

Drevets, D.A., Dillon, M.J., Schawang, J.E., Stoner, J.A., and Leenen, P.J.M. (2010). IFN- γ triggers CCR2-independent monocyte entry into the brain during systemic infection by virulent *Listeria monocytogenes*. *Brain Behav. Immun.* *24*, 919–929.

Dumont, J., and Cotoni, L. (1921). Bacille semblable à celui du rouget du porc rencontré dans le liquide céphalo-rachidien d'un méningitique. *Ann Inst Pasteur*.

Eddins, M.J., Carlile, C.M., Gomez, K.M., Pickart, C.M., and Wolberger, C. (2006). Mms2-Ubc13 covalently bound to ubiquitin reveals the structural basis of linkage-specific polyubiquitin chain formation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 915–920.

Eylert, E., Schär, J., Mertins, S., Stoll, R., Bacher, A., Goebel, W., and Eisenreich, W. (2008). Carbon metabolism of *Listeria monocytogenes* growing inside macrophages. *Mol Microbiol* *69*, 1008–1017.

Farrand, A.J., LaChapelle, S., Hotze, E.M., Johnson, A.E., and Tweten, R.K. (2010). Only two amino acids are essential for cytolytic toxin recognition of cholesterol at the membrane surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *107*, 4341–4346.

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

Fiskin, E., Bionda, T., Dikic, I., and Behrends, C. (2016). Global Analysis of Host and Bacterial Ubiquitinome in Response to *Salmonella Typhimurium* Infection. *Molecular Cell* *62*, 967–981.

Forster, B.M., Bitar, A.P., Slepko, E.R., Kota, K.J., Sonderrmann, H., and Marquis, H. (2011). The metalloprotease of *Listeria monocytogenes* is regulated by pH. *Journal of Bacteriology* *193*, 5090–5097.

Förster, F., Unverdorben, P., Śledź, P., and Baumeister, W. (2013). Unveiling the Long-Held Secrets of the 26S Proteasome. *Structure/Folding and Design* *21*, 1551–1562.

Franchi, L., Kanneganti, T.D., Dubyak, G.R., and Nuñez, G. (2007). Differential requirement of P2X7 receptor and intracellular K⁺ for caspase-1 activation induced by intracellular and extracellular bacteria. *J. Biol. Chem.* *282*, 18810–18818.

- Fujita, Y., Krause, G., Scheffner, M., Zechner, D., Leddy, H.E.M., Behrens, J., Sommer, T., and Birchmeier, W. (2002). Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nat Cell Biol* 4, 222–231.
- Gahan, C.G.M. (2014). *Listeria monocytogenes*: survival and adaptation in the gastrointestinal tract. 1–7.
- Gaillard, J.L., Berche, P., and Sansonetti, P. (1986). Transposon mutagenesis as a tool to study the role of hemolysin in the virulence of *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity* 52, 50–55.
- Gaillard, J.L., Berche, P., Mounier, J., Richard, S., and Sansonetti, P. (1987). In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infection and Immunity* 55, 2822–2829.
- Gekara, N.O., Westphal, K., Ma, B., Rohde, M., Groebe, L., and Weiss, S. (2007). The multiple mechanisms of Ca²⁺ signalling by listeriolysin O, the cholesterol-dependent cytolysin of *Listeria monocytogenes*. *Cell Microbiol* 9, 2008–2021.
- Geoffroy, C., Raveneau, J., Beretti, J.L., Lecroisey, A., Vazquez-Boland, J.A., Alouf, J.E., and Berche, P. (1991). Purification and characterization of an extracellular 29-kilodalton phospholipase C from *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity* 59, 2382–2388.
- Gessain, G., Tsai, Y.-H., Travier, L., Bonazzi, M., Grayo, S., Cossart, P., Charlier, C., Disson, O., and Lecuit, M. (2015). PI3-kinase activation is critical for host barrier permissiveness to *Listeria monocytogenes*. *Journal of Experimental Medicine* 212, 165–183.
- Gianfelice, A., Le, P.H.B., Rigano, L.A., Saila, S., Dowd, G.C., McDivitt, T., Bhattacharya, N., Hong, W., Stagg, S.M., and Ireton, K. (2015). Host endoplasmic reticulum COPII proteins control cell-to-cell spread of the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes*. *Cell Microbiol* 17, 876–892.
- Glomski, I.J., Gedde, M.M., Tsang, A.W., Swanson, J.A., and Portnoy, D.A. (2002). The *Listeria monocytogenes* hemolysin has an acidic pH optimum to compartmentalize activity and prevent damage to infected host cells. *The Journal of Cell Biology* 156, 1029–1038.
- Gonzalez, M.R., Bischofberger, M., Frêche, B., Ho, S., Parton, R.G., and van der Goot, F.G. (2011). Pore-forming toxins induce multiple cellular responses promoting survival. *Cell Microbiol* 13, 1026–1043.
- Gouin, E., Adib-Conquy, M., Balestrino, D., Nahori, M.A., Villiers, V., Colland, F., Dramsi, S., Dussurget, O., and Cossart, P. (2010). The *Listeria monocytogenes* InlC protein interferes with innate immune responses by targeting the I B kinase subunit IKK. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 17333–17338.
- Gouin, E., Gantelet, H., Egile, C., Lasa, I., Ohayon, H., Villiers, V., Gounon, P., Sansonetti, P.J., and Cossart, P. (1999). A comparative study of the actin-based motilities of the pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* and *Rickettsia conorii*. *Journal of Cell Science* 112 (Pt 11), 1697–1708.
- Gouin, E., Welch, M.D., and Cossart, P. (2005). Actin-based motility of intracellular pathogens. *Current Opinion in Microbiology* 8, 35–45.

Greiffenberg, L., Goebel, W., Kim, K.S., Weiglein, I., Bubert, A., Engelbrecht, F., Stins, M., and Kuhn, M. (1998). Interaction of *Listeria monocytogenes* with Human Brain Microvascular Endothelial Cells: InlB-Dependent Invasion, Long-Term Intracellular Growth, and Spread from Macrophages to Endothelial Cells. *Infection and Immunity*.

Gründling, A., Gonzalez, M.D., and Higgins, D.E. (2003). Requirement of the *Listeria monocytogenes* broad-range phospholipase PC-PLC during infection of human epithelial cells. *Journal of Bacteriology* *185*, 6295–6307.

Guicciardi, M.E., Deussing, J., Miyoshi, H., Bronk, S.F., Svingen, P.A., Peters, C., Kaufmann, S.H., and Gores, G.J. (2000). Cathepsin B contributes to TNF- α -mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J. Clin. Invest.* *106*, 1127–1137.

Guillet, C., Join-Lambert, O., Le Monnier, A., Leclercq, A., Mechaï, F., Mamzer-Bruneel, M.-F., Bielecka, M.K., Scotti, M., Disson, O., Berche, P., et al. (2010). Human Listeriosis Caused by *Listeria ivanovii*. *Emerg. Infect. Dis.* *16*, 136–138.

Guldimann, C., Lejeune, B., Hofer, S., Leib, S.L., Frey, J., Zurbriggen, A., Seuberlich, T., and Oevermann, A. (2012). Ruminant organotypic brain-slice cultures as a model for the investigation of CNS listeriosis. *Int J Exp Pathol* *93*, 259–268.

Gurcel, L., Abrami, L., Girardin, S., Tschopp, J., and van der Goot, F.G. (2006). Caspase-1 activation of lipid metabolic pathways in response to bacterial pore-forming toxins promotes cell survival. *Cell* *126*, 1135–1145.

Hamon, M.A., and Cossart, P. (2011). K⁺ Efflux Is Required for Histone H3 Dephosphorylation by *Listeria monocytogenes* Listeriolysin O and Other Pore-Forming Toxins. *Infection and Immunity* *79*, 2839–2846.

Hamon, M.A., Batsche, E., Régnault, B., Tham, T.N., Seveau, S., Muchardt, C., and Cossart, P. (2007). Histone modifications induced by a family of bacterial toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 13467–13472.

Hasegawa, J., Maejima, I., Iwamoto, R., and Yoshimori, T. (2015). Selective autophagy: lysophagy. *Methods* *75*, 128–132.

Hassan, H.M., and Fridovich, I. (1980). Mechanism of the antibiotic action pyocyanine. *Journal of Bacteriology* *141*, 156–163.

Hauf, N., Goebel, W., Fiedler, F., Sokolovic, Z., and Kuhn, M. (1997). *Listeria monocytogenes* infection of P388D1 macrophages results in a biphasic NF- κ B (RelA/p50) activation induced by lipoteichoic acid and bacterial phospholipases and mediated by I κ B α and I κ B β degradation. *Proceedings of the*

Heinrich, M., Neumeyer, J., Jakob, M., Hallas, C., Tchikov, V., Winoto-Morbach, S., Wickel, M., Schneider-Brachert, W., Trauzold, A., Hethke, A., et al. (2004). Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell Death Differ* *11*, 550–563.

Henry, R., Shaughnessy, L., Loessner, M.J., Alberti-Segui, C., Higgins, D.E., and Swanson, J.A. (2006). Cytolysin-dependent delay of vacuole maturation in macrophages infected with *Listeria monocytogenes*. *Cell Microbiol* *8*, 107–119.

- Hoy, B., Löwer, M., Weydig, C., Carra, G., Tegtmeyer, N., Geppert, T., Schröder, P., Sewald, N., Backert, S., Schneider, G., et al. (2010). Helicobacter pylori HtrA is a new secreted virulence factor that cleaves E-cadherin to disrupt intercellular adhesion. *EMBO Rep* 11, 798–804.
- Huang, Q., Gershenson, A., and Roberts, M.F. (2016). Recombinant broad-range phospholipase C from *Listeria monocytogenes* exhibits optimal activity at acidic pH. *Biochim. Biophys. Acta* 1864, 697–705.
- Hulphers, G. (1911). Lefvernekros hos kanin orsakad af en ej förut beskrifven bakterie. *Sven Vet Tidskr.*
- Ihrke, G., Kyttala, A., Russell, M., Rous, B.A., and Luzio, J.P. (2004). Differential use of two AP-3-mediated pathways by lysosomal membrane proteins. *Traffic* 5, 946–962.
- Impens, F., Radoshevich, L., Cossart, P., and Ribet, D. (2014). Mapping of SUMO sites and analysis of SUMOylation changes induced by external stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 12432–12437.
- Inoshima, I., Inoshima, N., Wilke, G.A., Powers, M.E., Frank, K.M., Wang, Y., and Wardenburg, J.B. (2011). *Staphylococcus aureus*. *Nature Medicine* 17, 1310–1314.
- Ireton, K., Payrastra, B., and Cossart, P. (1999). The *Listeria monocytogenes* protein InlB is an agonist of mammalian phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 274, 17025–17032.
- Ireton, K., Payrastra, B., Chap, H., Ogawa, W., Sakaue, H., Kasuga, M., and Cossart, P. (1996). A role for phosphoinositide 3-kinase in bacterial invasion. *Science* 274, 780–782.
- Jackson, B.R., Tarr, C., Strain, E., Jackson, K.A., Conrad, A., Carleton, H., Katz, L.S., Stroika, S., Gould, L.H., Mody, R.K., et al. (2016). Implementation of Nationwide Real-time Whole-genome Sequencing to Enhance Listeriosis Outbreak Detection and Investigation. *Clin. Infect. Dis.* 63, 380–386.
- Janvier, K., and Bonifacino, J.S. (2005). Role of the endocytic machinery in the sorting of lysosome-associated membrane proteins. *Molecular Biology of the Cell* 16, 4231–4242.
- Jasnin, M., and Crevenna, A.H. (2016). Quantitative Analysis of Filament Branch Orientation in *Listeria* Actin Comet Tails. *Biophys. J.* 110, 817–826.
- Jasnin, M., Asano, S., Gouin, E., Hegerl, R., Plitzko, J.M., Villa, E., Cossart, P., and Baumeister, W. (2013). Three-dimensional architecture of actin filaments in *Listeria monocytogenes* comet tails. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 20521–20526.
- Johansson, J., Mandin, P., Renzoni, A., Chiaruttini, C., Springer, M., and Cossart, P. (2002). An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell* 110, 551–561.
- Jonquieres, R., Bierne, H., Fiedler, F., Gounon, P., and Cossart, P. (1999). Interaction between the protein InlB of *Listeria monocytogenes* and lipoteichoic acid: a novel mechanism of protein association at the surface of gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 34, 902–914.
- Jonquieres, R., Pizarro-Cerda, J., and Cossart, P. (2001). Synergy between the N- and C-terminal domains of InlB for efficient invasion of non-phagocytic cells by *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* 42, 955–965.

- Joseph, B., Przybilla, K., Stuhler, C., Schauer, K., Slaghuis, J., Fuchs, T.M., and Goebel, W. (2005). Identification of *Listeria monocytogenes* Genes Contributing to Intracellular Replication by Expression Profiling and Mutant Screening. *Journal of Bacteriology* *188*, 556–568.
- Kayal, S., Lilienbaum, A., Join-Lambert, O., Li, X.X., Israel, A., and Berche, P. (2002). Listeriolysin O secreted by *Listeria monocytogenes* induces NF-kappa B signalling by activating the I kappa B kinase complex. *Mol Microbiol* *44*, 1407–1419.
- Kayal, S., Lilienbaum, A., Poyart, C., Memet, S., Israel, A., and Berche, P. (1999). Listeriolysin O-dependent activation of endothelial cells during infection with *Listeria monocytogenes*: activation of NF-kappa B and upregulation of adhesion molecules and chemokines. *Mol Microbiol* *31*, 1709–1722.
- Kennedy, C.L., Smith, D.J., Lyras, D., Chakravorty, A., and Rood, J.I. (2009). Programmed Cellular Necrosis Mediated by the Pore-Forming α -Toxin from *Clostridium septicum*. *PLoS Pathog* *5*, e1000516.
- Khelef, N., Lecuit, M., Bierne, H., and Cossart, P. (2006). Species specificity of the *Listeria monocytogenes* InlB protein. *Cell Microbiol* *8*, 457–470.
- Kim, S., Bauernfeind, F., Ablasser, A., Hartmann, G., Fitzgerald, K.A., Latz, E., and Hornung, V. (2010). *Listeria monocytogenes* is sensed by the NLRP3 and AIM2 inflammasome. *Eur. J. Immunol.* *40*, 1545–1551.
- Kloft, N., Neukirch, C., Bobkiewicz, W., Veerachato, G., Busch, T., Hoven, von, G., Boller, K., and Husmann, M. (2010). Pro-autophagic signal induction by bacterial pore-forming toxins. *Med. Microbiol. Immunol.* *199*, 299–309.
- Kocks, C., Gouin, E., TABOURET, M., Berche, P., Ohayon, H., and Cossart, P. (1992). L-Monocytogenes-Induced Actin Assembly Requires the Acta Gene-Product, a Surface Protein. *Cell* *68*, 521–531.
- Kocks, C., Hellio, R., Gounon, P., Ohayon, H., and Cossart, P. (1993). Polarized distribution of *Listeria monocytogenes* surface protein ActA at the site of directional actin assembly. *Journal of Cell Science* *105* (Pt 3), 699–710.
- Kolas, N.K., Chapman, J.R., Nakada, S., Ylanko, J., Chahwan, R., Sweeney, F.D., Panier, S., Mendez, M., Wildenhain, J., Thomson, T.M., et al. (2007). Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase. *Science* *318*, 1637–1640.
- Komander, D., Clague, M.J., and Urbe, S. (2009). Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *10*, 550–563.
- Köster, S., van Pee, K., Hudel, M., Leustik, M., Rhinow, D., Hlbrandt, W.K.U., Chakraborty, T., and Yildiz, O.Z. (2014). Crystal structure of listeriolysin O reveals molecular details of oligomerization and poreformation. *Nature Communications* *5*, 1–14.
- Krüll, M., Nöst, R., Hippenstiel, S., Domann, E., Chakraborty, T., and Suttorp, N. (1997). *Listeria monocytogenes* potently induces up-regulation of endothelial adhesion molecules and neutrophil adhesion to cultured human endothelial cells. *J. Immunol.* *159*, 1970–1976.
- Kubori, T., Shinzawa, N., Kanuka, H., and Nagai, H. (2010). *Legionella* metaeffector exploits host proteasome to temporally regulate cognate effector. *PLoS Pathog* *6*, e1001216.

- Kühbacher, A., Emmenlauer, M., Råmo, P., Kafai, N., Dehio, C., Cossart, P., and Pizarro-Cerda, J. (2015). Genome-Wide siRNA Screen Identifies Complementary Signaling Pathways Involved in Listerial Infection and Reveals Different Actin Nucleation Mechanisms during Listeria Cell Invasion and Actin Comet Tail Formation. *mBio* 6, e00598–15.
- Laarman, A.J., Ruyken, M., Malone, C.L., van Strijp, J.A.G., Horswill, A.R., and Rooijackers, S.H.M. (2011). Staphylococcus aureus Metalloprotease Aureolysin Cleaves Complement C3 To Mediate Immune Evasion. *The Journal of Immunology* 186, 6445–6453.
- Lam, G.Y., Fattouh, R., Muise, A.M., Grinstein, S., Higgins, D.E., and Brumell, J.H. (2011). Listeriolysin O suppresses phospholipase C-mediated activation of the microbicidal NADPH oxidase to promote Listeria monocytogenes infection. *Cell Host and Microbe* 10, 627–634.
- Lambrechts, A., Gevaert, K., Cossart, P., Vandekerckhove, J., and Van Troys, M. (2008). Listeria comet tails: the actin-based motility machinery at work. *Trends in Cell Biology* 18, 220–227.
- Le Negrate, G., Faustin, B., Welsh, K., Loeffler, M., Krajewska, M., Hasegawa, P., Mukherjee, S., Orth, K., Krajewski, S., Godzik, A., et al. (2008a). Salmonella secreted factor L deubiquitinase of Salmonella typhimurium inhibits NF-kappaB, suppresses I kappa B alpha ubiquitination and modulates innate immune responses. *J. Immunol.* 180, 5045–5056.
- Le Negrate, G., Krieg, A., Faustin, B., Loeffler, M., Godzik, A., Krajewski, S., and Reed, J.C. (2008b). ChlA_{Dub1} of Chlamydia trachomatis suppresses NF-kappaB activation and inhibits I kappa B alpha ubiquitination and degradation. *Cell Microbiol* 10, 1879–1892.
- Lebreton, A., Stavru, F., and Cossart, P. (2015). Organelle targeting during bacterial infection: insights from Listeria. *Trends in Cell Biology* 1–9.
- Lecuit, M. (2001). A Transgenic Model for Listeriosis: Role of Internalin in Crossing the Intestinal Barrier. *Science* 292, 1722–1725.
- Lecuit, M., Charlier, C., and Leclercq, A. (2015). Rapport annuel d'activité du Centre national de Référence des Listeria - Année 2014. 1–88.
- Lecuit, M., Hurme, R., and Pizarro-Cerda, J. (2000). A role for α - and β -catenins in bacterial uptake.
- Lecuit, M. (2007). Human listeriosis and animal models. *Microbes and Infection* 9, 1216–1225.
- Lehmann, M.J., Sherer, N.M., Marks, C.B., Pypaert, M., and Mothes, W. (2005). Actin- and myosin-driven movement of viruses along filopodia precedes their entry into cells. *The Journal of Cell Biology* 170, 317–325.
- Leimeister-Wächter, M., Domann, E., and Chakraborty, T. (1991). Detection of a gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C that is co-ordinately expressed with listeriolysin in Listeria monocytogenes. *Mol Microbiol* 5, 361–366.
- Leung, C., Dudkina, N.V., Lukyanova, N., Hodel, A.W., Farabella, I., Pandurangan, A.P., Jahan, N., Pires Damaso, M., Osmanović, D., Reboul, C.F., et al. (2014). Stepwise visualization of membrane pore formation by suliyisin, a bacterial cholesterol-dependent cytolysin. *eLife* 3, e04247.

Loh, E., Dussurget, O., Gripenland, J., Vaitkevicius, K., Tiensuu, T., Mandin, P., Repoila, F., Buchrieser, C., Cossart, P., and Johansson, J. (2009). A trans-Acting Riboswitch Controls Expression of the Virulence Regulator PrfA in *Listeria monocytogenes*. *Cell* 139, 770–779.

Lopez-Castejon, G., Corbett, D., Goldrick, M., Roberts, I.S., and Brough, D. (2012). Inhibition of Calpain Blocks the Phagosomal Escape of *Listeria monocytogenes*. *PLoS ONE* 7, e35936.

Mansell, A. (2001). Internalin B Activates Nuclear Factor-kappa B via Ras, Phosphoinositide 3-Kinase, and Akt. *Journal of Biological Chemistry* 276, 43597–43603.

Mansell, A., Braun, L., Cossart, P., and O'Neill, L. (2000). A novel function of InIB from *Listeria monocytogenes*: activation of NF-kappa B in J774 macrophages. *Cell Microbiol* 2, 127–136.

Mariathasan, S., Weiss, D.S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., Lee, W.P., Weinrauch, Y., Monack, D.M., and Dixit, V.M. (2006). Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 440, 228–232.

Marquis, H., Bouwer, H.G., Hinrichs, D.J., and Portnoy, D.A. (1993). Intracytoplasmic growth and virulence of *Listeria monocytogenes* auxotrophic mutants. *Infection and Immunity* 61, 3756–3760.

Marquis, H., Doshi, V., and Portnoy, D.A. (1995). The broad-range phospholipase C and a metalloprotease mediate listeriolysin O-independent escape of *Listeria monocytogenes* from a primary vacuole in human epithelial cells. *Infection and Immunity* 63, 4531–4534.

Matsuda, S., Okada, N., Kodama, T., Honda, T., and Iida, T. (2012). A Cytotoxic Type III Secretion Effector of *Vibrio parahaemolyticus* Targets Vacuolar H⁺-ATPase Subunit c and Ruptures Host Cell Lysosomes. *PLoS Pathog* 8, e1002803.

Maury, M.M., Tsai, Y.-H., Charlier, C., Touchon, M., Chenal-Francois, V., Leclercq, A., Criscuolo, A., Gaultier, C., Roussel, S., Brisabois, A., et al. (2016). ng.3501(1). *Nature Publishing Group* 48, 308–313.

McGourty, K., Thurston, T.L., Matthews, S.A., Pinaud, L., Mota, L.J., and Holden, D.W. (2012). *Salmonella* Inhibits Retrograde Trafficking of Mannose-6-Phosphate Receptors and Lysosome Function. *Science* 338, 963–967.

Medina, D.L., and Ballabio, A. (2015). Lysosomal calcium regulates autophagy. *Autophagy* 11, 970–971.

Medina, D.L., Di Paola, S., Peluso, I., Armani, A., De Stefani, D., Venditti, R., Montefusco, S., Scotto-Rosato, A., Prezioso, C., Forrester, A., et al. (2015). Lysosomal calcium signalling regulates autophagy through calcineurin and TFEB. *Nat Cell Biol* 17, 288–299.

Meixenberger, K., Pache, F., Eitel, J., Schmeck, B., Hippenstiel, S., Slevogt, H., N'Guessan, P., Witznath, M., Netea, M.G., Chakraborty, T., et al. (2010). *Listeria monocytogenes*-Infected Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Produce IL-1, Depending on Listeriolysin O and NLRP3. *The Journal of Immunology* 184, 922–930.

Melton-Witt, J.A., Rafelski, S.M., Portnoy, D.A., and Bakardjiev, A.I. (2012). Oral Infection with Signature-Tagged *Listeria monocytogenes* Reveals Organ-Specific Growth and Dissemination Routes in Guinea Pigs. *Infection and Immunity* 80, 720–732.

- Mengaud, J., Geoffroy, C., and Cossart, P. (1991). Identification of a new operon involved in *Listeria monocytogenes* virulence: its first gene encodes a protein homologous to bacterial metalloproteases. *Infection and Immunity* *59*, 1043–1049.
- Mesquita, F.S., Holden, D.W., and Rolhion, N. (2013). Lack of effect of the *Salmonella* deubiquitinase SseL on the NF- κ B pathway. *PLoS ONE* *8*, e53064.
- Meyer-Morse, N., Robbins, J.R., Rae, C.S., Mochegova, S.N., Swanson, M.S., Zhao, Z., Virgin, H.W., and Portnoy, D. (2010). Listeriolysin O Is Necessary and Sufficient to Induce Autophagy during *Listeria monocytogenes* Infection. *PLoS ONE* *5*, e8610.
- Middleton, A.J., and Day, C.L. (2015). The molecular basis of lysine 48ubiquitin chain synthesis by Ube2K. *Sci Rep* *1*–14.
- Mikecz, von, A. (2006). The nuclear ubiquitin-proteasome system. *Journal of Cell Science* *119*, 1977–1984.
- Misaghi, S., Balsara, Z.R., Catic, A., Spooner, E., Ploegh, H.L., and Starnbach, M.N. (2006). *Chlamydia trachomatis*-derived deubiquitinating enzymes in mammalian cells during infection. *Mol Microbiol* *61*, 142–150.
- Mohammadi, S., and Isberg, R.R. (2009). *Yersinia pseudotuberculosis* Virulence Determinants Invasin, YopE, and YopT Modulate RhoG Activity and Localization. *Infection and Immunity* *77*, 4771–4782.
- Murata-Kamiya, N., Kurashima, Y., Teishikata, Y., Yamahashi, Y., Saito, Y., Higashi, H., Aburatani, H., Akiyama, T., Peek, R.M., Azuma, T., et al. (2007). *Helicobacter pylori* CagA interacts with E-cadherin and deregulates the β -catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells. *Oncogene* *26*, 4617–4626.
- Murray, E., and Webb, R.A. (1926). A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). *J. Pathol.*
- Niemann, H.H., Jäger, V., Butler, P.J.G., van den Heuvel, J., Schmidt, S., Ferraris, D., Gherardi, E., and Heinz, D.W. (2007). Structure of the Human Receptor Tyrosine Kinase Met in Complex with the *Listeria* Invasion Protein InlB. *Cell* *130*, 235–246.
- Nikitas, G., Deschamps, C., Disson, O., Niaux, T., Cossart, P., and Lecuit, M. (2011). Transcytosis of *Listeria monocytogenes* across the intestinal barrier upon specific targeting of goblet cell accessible E-cadherin. *Journal of Experimental Medicine* *208*, 2263–2277.
- Nishibori, T., Xiong, H., Kawamura, I., Arakawa, M., and Mitsuyama, M. (1996). Induction of cytokine gene expression by listeriolysin O and roles of macrophages and NK cells. *Infection and Immunity* *64*, 3188–3195.
- Oberle, C., Huai, J., Reinheckel, T., Tacke, M., Rassner, M., Ekert, P.G., Buellbach, J., and Borner, C. (2010). Lysosomal membrane permeabilization and cathepsin release is a Bax/Bak-dependent, amplifying event of apoptosis in fibroblasts and monocytes. *Cell Death Differ* *17*, 1167–1178.
- Oh, M.-J., Akhtar, J., Desai, P., and Shukla, D. (2010). A role for heparan sulfate in viral surfing. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *391*, 176–181.

- Orsi, R.H., and Wiedmann, M. (2016). Characteristics and distribution of. *Appl Microbiol Biotechnol* 1–15.
- Orsi, R.H., Bakker, den, H.C., and Wiedmann, M. (2011). *International Journal of Medical Microbiology*. *International Journal of Medical Microbiology* 301, 79–96.
- Otani, T., Ichii, T., Aono, S., and Takeichi, M. (2006). Cdc42 GEF Tuba regulates the junctional configuration of simple epithelial cells. *The Journal of Cell Biology* 175, 135–146.
- Paterson, J.S. (1940). The antigenic structure of organisms of the genus *Listerella*. *The Journal of Pathology and Bacteriology* 51, 427–436.
- Pentecost, M., Otto, G., Theriot, J.A., and Amieva, M.R. (2006). *Listeria monocytogenes* invades the epithelial junctions at sites of cell extrusion. *PLoS Pathog* 2, 29–40.
- Pickart, C.M., and Cohen, R.E. (2004). Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5, 177–187.
- Pillich, H., Loose, M., Zimmer, K.-P., and Chakraborty, T. (2012). Activation of the unfolded protein response by *Listeria monocytogenes*. *Cell Microbiol* 14, 949–964.
- Pirie, J.H.H. (1940). *Listeria*: Change of Name for a Genus Bacteria. *Nature* 145, 264–264.
- Pirie, J. (1927). A new disease of veld rodents “tiger river disease.” *Publ S Afr Inst Med Res*.
- Pizarro-Cerda, J., Kuhbacher, A., and Cossart, P. (2012). Entry of *Listeria monocytogenes* in Mammalian Epithelial Cells: An Updated View. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2, a010009–a010009.
- Podobnik, M., Marchioretto, M., Zanetti, M., Bavdek, A., Kisovec, M., Cajnko, M.M., Lunelli, L., Dalla Serra, M., and Anderluh, G. (2015). Plasticity of listeriolysin O pores and its regulation by pH and unique histidine [corrected]. *Sci Rep* 5, 9623.
- Polle, L., Rigano, L.A., Julian, R., Ireton, K., and Schubert, W.-D. (2014). Structural details of human tuba recruitment by InIC of *Listeria monocytogenes* elucidate bacterial cell-cell spreading. *Structure* 22, 304–314.
- Pols, M.S., van Meel, E., Oorschot, V., Brink, ten, C., Fukuda, M., Swetha, M.G., Mayor, S., and Klumperman, J. (2013). hVps41 and VAMP7 function in direct TGN to late endosome transport of lysosomal membrane proteins. *Nature Communications* 4.
- Portnoy, D.A., Jacks, P.S., and Hinrichs, D.J. (1988). Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Exp. Med.* 167, 1459–1471.
- Prince, L.R., Bianchi, S.M., Vaughan, K.M., Bewley, M.A., Marriott, H.M., Walmsley, S.R., Taylor, G.W., Buttle, D.J., Sabroe, I., Dockrell, D.H., et al. (2008). Subversion of a Lysosomal Pathway Regulating Neutrophil Apoptosis by a Major Bacterial Toxin, Pyocyanin. *The Journal of Immunology* 180, 3502–3511.
- Pron, B., Boumaila, C., Jaubert, F., Sarnacki, S., Monnet, J.P., Berche, P., and Gaillard, J.L. (1998). Comprehensive study of the intestinal stage of listeriosis in a rat ligated ileal loop system. *Infection and Immunity* 66, 747–755.
- Puchi, M., García-Huidobro, J., Cordova, C., Aguilar, R., Dufey, E., Imschenetzky, M., Bustos, P., and Morin, V. (2010). A new nuclear protease with cathepsin L properties is present in HeLa and Caco-2 cells. *J. Cell. Biochem.* 111, 1099–1106.

- Ragon, M., Wirth, T., Hollandt, F., Lavenir, R., Lecuit, M., Le Monnier, A., and Brisse, S. (2008). A New Perspective on *Listeria monocytogenes* Evolution. *PLoS Pathog* 4, e1000146.
- Rajabian, T., Gavicherla, B., Heisig, M., Müller-Altrock, S., Goebel, W., Gray-Owen, S.D., and Ireton, K. (2009). The bacterial virulence factor InlC perturbs apical cell junctions and promotes cell-to-cell spread of *Listeria*. *Nat Cell Biol* 11, 1212–1218.
- Rathinam, V.A.K., Jiang, Z., Waggoner, S.N., Sharma, S., Cole, L.E., Waggoner, L., Vanaja, S.K., Monks, B.G., Ganesan, S., Latz, E., et al. (2010). The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nat Immunol* 11, 395–402.
- Raveneau, J., Geoffroy, C., Beretti, J.L., Gaillard, J.L., Alouf, J.E., and Berche, P. (1992). Reduced virulence of a *Listeria monocytogenes* phospholipase-deficient mutant obtained by transposon insertion into the zinc metalloprotease gene. *Infection and Immunity* 60, 916–921.
- Reboul, C.F., Whisstock, J.C., and Dunstone, M.A. (2014). A New Model for Pore Formation by Cholesterol-Dependent Cytolysins. *PLoS Comput Biol* 10, e1003791.
- Reniere, M.L., Whiteley, A.T., Hamilton, K.L., John, S.M., Lauer, P., Brennan, R.G., and Portnoy, D.A. (2015). Glutathione activates virulence gene expression of an intracellular pathogen. *Nature* 517, 170–U100.
- Repp, H., Pamukçi, Z., Koschinski, A., Domann, E., Darji, A., Birringer, J., Brockmeier, D., Chakraborty, T., and Dreyer, F. (2002). Listeriolysin of *Listeria monocytogenes* forms Ca²⁺-permeable pores leading to intracellular Ca²⁺ oscillations. *Cell Microbiol* 4, 483–491.
- Ribet, D., Hamon, M., Gouin, E., Nahori, M.-A., Impens, F., Neyret-Kahn, H., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Dejean, A., and Cossart, P. (2010). *Listeria monocytogenes* impairs SUMOylation for efficient infection. *Nature* 464, 1192–1195.
- Rohde, J.R., Breitschütz, A., Chenal, A., Sansonetti, P.J., and Parsot, C. (2007). Type III secretion effectors of the IpaH family are E3 ubiquitin ligases. *Cell Host and Microbe* 1, 77–83.
- Ruan, Y., Rezelj, S., Zavec, A.B., Anderluh, G., and Scheuring, S. (2016). Listeriolysin O Membrane Damaging Activity Involves Arc Formation and Lineaction - Implication for *Listeria monocytogenes* Escape from Phagocytic Vacuole. *PLoS Pathog* 12.
- Rytkönen, A., Poh, J., Garmendia, J., Boyle, C., Thompson, A., Liu, M., Freemont, P., Hinton, J.C.D., and Holden, D.W. (2007). SseL, a *Salmonella* deubiquitinase required for macrophage killing and virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 3502–3507.
- Saftig, P., and Klumperman, J. (2009). Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 623–635.
- Samba-Louaka, A., Stavru, F., and Cossart, P. (2012). Role for Telomerase in *Listeria monocytogenes* Infection. *Infection and Immunity* 80, 4257–4263.
- Samba-Louaka, A., Pereira, J.M., Nahori, M.-A., Villiers, V., Deriano, L., Hamon, M.A., and Cossart, P. (2014). *Listeria monocytogenes* Dampens the DNA Damage Response. *PLoS Pathog* 10, e1004470.

Sanada, T., Kim, M., Mimuro, H., Suzuki, M., Ogawa, M., Oyama, A., Ashida, H., Kobayashi, T., Koyama, T., Nagai, S., et al. (2012). The *Shigella flexneri* effector OspI deamidates UBC13 to dampen the inflammatory response. *Nature* *483*, 623–626.

Sardiello, M., Palmieri, M., di Ronza, A., Medina, D.L., Valenza, M., Gennarino, V.A., Di Malta, C., Donaudy, F., Embrione, V., Polishchuk, R.S., et al. (2009). A Gene Network Regulating Lysosomal Biogenesis and Function. *Science* *325*, 473–477.

Sauer, J.-D., Witte, C.E., Zemansky, J., Hanson, B., Lauer, P., and Portnoy, D.A. (2010). *Listeria monocytogenes* Triggers AIM2-Mediated Pyroptosis upon Infrequent Bacteriolysis in the Macrophage Cytosol. *Cell Host and Microbe* *7*, 412–419.

Schlech, W.F., Lavigne, P.M., Bortolussi, R.A., Allen, A.C., Haldane, E.V., Wort, A.J., Hightower, A.W., Johnson, S.E., King, S.H., Nicholls, E.S., et al. (1983). Epidemic listeriosis—evidence for transmission by food. *N. Engl. J. Med.* *308*, 203–206.

Schnupf, P., Zhou, J., Varshavsky, A., and Portnoy, D.A. (2007). Listeriolysin O Secreted by *Listeria monocytogenes* into the Host Cell Cytosol Is Degraded by the N-End Rule Pathway. *Infection and Immunity* *75*, 5135–5147.

Schnupf, P., and Portnoy, D.A. (2007). Listeriolysin O: a phagosome-specific lysin. *Microbes and Infection* *9*, 1176–1187.

Schröder, M., and Kaufman, R.J. (2005). ER stress and the unfolded protein response. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* *569*, 29–63.

Schubert, W.-D., Urbanke, C., Ziehm, T., Beier, V., Machner, M.P., Domann, E., Wehland, J., Chakraborty, T., and Heinz, D.W. (2002). Structure of internalin, a major invasion protein of *Listeria monocytogenes*, in complex with its human receptor E-cadherin. *Cell* *111*, 825–836.

Schuchat, A., and Swaminathan, B. (1991). Epidemiology of human listeriosis. *Clinical Microbiology*

Schuerch, D.W., Wilson-Kubalek, E.M., and Tweten, R.K. (2005). Molecular basis of listeriolysin O pH dependence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 12537–12542.

Scotti, M., Monzo, H.J., Lacharme-Lora, L., Lewis, D.A., and Vázquez-Boland, J.A. (2007). The PrfA virulence regulon. *Microbes Infect.* *9*, 1196–1207.

Scott, C.C., and Gruenberg, J. (2011). Ion flux and the function of endosomes and lysosomes: pH is just the start: the flux of ions across endosomal membranes influences endosome function not only through regulation of the luminal pH. *Bioessays* *33*, 103–110.

Settembre, C., Fraldi, A., Medina, D.L., and Ballabio, A. (2013). Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *14*, 283–296.

Settembre, C., Zoncu, R., Medina, D.L., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S., Huynh, T., Ferron, M., Karsenty, G., Vellard, M.C., et al. (2012). A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *Embo J* *31*, 1095–1108.

Seveau, S. (2004). Role of lipid rafts in E-cadherin- and HGF-R/Met-mediated entry of *Listeria monocytogenes* into host cells. *The Journal of Cell Biology* *166*, 743–753.

Seveau, S. (2014). Multifaceted Activity of Listeriolysin O, the Cholesterol-Dependent Cytolysin of *Listeria monocytogenes*. In *Subcellular Biochemistry*, (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 161–195.

Seveau, S., Tham, T.N., Payraastre, B., Hoppe, A.D., Swanson, J.A., and Cossart, P. (2007). A FRET analysis to unravel the role of cholesterol in Rac1 and PI 3-kinase activation in the InlB/Met signalling pathway. *Cell Microbiol* 9, 790–803.

Shao, F., Vacratsis, P.O., Bao, Z., Bowers, K.E., Fierke, C.A., and Dixon, J.E. (2003). Biochemical characterization of the *Yersinia* YopT protease: Cleavage site and recognition elements in Rho GTPases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 904–909.

Shao, F., Merritt, P.M., Bao, Z., Innes, R.W., and Dixon, J.E. (2002). A *Yersinia* effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Cell* 109, 575–588.

Shatursky, O., Heuck, A.P., Shepard, L.A., Rossjohn, J., Parker, M.W., Johnson, A.E., and Tweten, R.K. (1999). The mechanism of membrane insertion for a cholesterol-dependent cytolysin: a novel paradigm for pore-forming toxins. *Cell* 99, 293–299.

Shaughnessy, L.M., Hoppe, A.D., Christensen, K.A., and Swanson, J.A. (2006). Membrane perforations inhibit lysosome fusion by altering pH and calcium in *Listeria monocytogenes* vacuoles. *Cell Microbiol* 8, 781–792.

Shen, Y., Naujokas, M., Park, M., and Ireton, K. (2000). InlB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell*.

Shrestha, N., Bahnan, W., Wiley, D.J., Barber, G., Fields, K.A., and Schesser, K. (2012). Eukaryotic initiation factor 2 (eIF2) signaling regulates proinflammatory cytokine expression and bacterial invasion. *Journal of Biological Chemistry* 287, 28738–28744.

SIBELIUS, U., ROSE, F., Chakraborty, T., Darji, A., WEHLAND, J.R., Weiss, S., SEEGER, W., and GRIMMINGER, A.F. (1996). Listeriolysin Is a Potent Inducer of the Phosphatidylinositol Response and Lipid Mediator Generation in Human Endothelial Cells. 1–3.

Sleat, D.E., Jadot, M., and Lobel, P. (2007). Lysosomal proteomics and disease. *Proteomics Clinical Applications* 1, 1134–1146.

Smith, G.A., Marquis, H., Jones, S., Johnston, N.C., Portnoy, D.A., and Goldfine, H. (1995). The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. *Infection and Immunity* 63, 4231–4237.

Snyder, A., and Marquis, H. (2003). Restricted translocation across the cell wall regulates secretion of the broad-range phospholipase C of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology* 185, 5953–5958.

Sousa, S., Cabanes, D., Archambaud, C., Colland, F., Lemichez, E., Popoff, M., Boisson-Dupuis, S., Gouin, E., Lecuit, M., Legrain, P., et al. (2005). ARHGAP10 is necessary for α -catenin recruitment at adherens junctions and for *Listeria* invasion. *Nat Cell Biol* 7, 954–960.

Sousa, S., Cabanes, D., Bougnères, L., Lecuit, M., Sansonetti, P., Tran-Van-Nhieu, G., and Cossart, P. (2007). Src, cortactin and Arp2/3 complex are required for E-cadherin-mediated internalization of *Listeria* into cells. *Cell Microbiol* 9, 2629–2643.

- Stavru, F., Bouillaud, F., Sartori, A., Ricquier, D., and Cossart, P. (2011). *Listeria monocytogenes* transiently alters mitochondrial dynamics during infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *108*, 3612–3617.
- Stavru, F., Palmer, A.E., Wang, C., Youle, R.J., and Cossart, P. (2013). Atypical mitochondrial fission upon bacterial infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *110*, 16003–16008.
- Suárez, M., Gonzalez-Zorn, B., Vega, Y., Chico-Calero, I., and Vazquez-Boland, J.A. (2001). A role for ActA in epithelial cell invasion by *Listeria monocytogenes*. *Cell Microbiol* *3*, 853–864.
- Swaminathan, B., and Gerner-Smidt, P. (2007). The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection* *9*, 1236–1243.
- Tang, P., Rosenshine, I., Cossart, P., and Finlay, B.B. (1996). Listeriolysin O activates mitogen-activated protein kinase in eucaryotic cells. *Infection and Immunity* *64*, 2359–2361.
- Tattoli, I., Sorbara, M.T., Yang, C., Tooze, S.A., Philpott, D.J., and Girardin, S.E. (2013). *Listeria* phospholipases subvert host autophagic defenses by stalling pre-autophagosomal structures. *Embo J* *32*, 3066–3078.
- Terao, Y., Mori, Y., Yamaguchi, M., Shimizu, Y., Ooe, K., Hamada, S., and Kawabata, S. (2008). Group A streptococcal cysteine protease degrades C3 (C3b) and contributes to evasion of innate immunity. *J. Biol. Chem.* *283*, 6253–6260.
- Tilney, L.G., and Portnoy, D.A. (1989). Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *The Journal of Cell Biology* *109*, 1597–1608.
- Toledo-Arana, A., Dussurget, O., Nikitas, G., Sesto, N., Guet-Revillet, H., Balestrino, D., Loh, E., Gripenland, J., Tiensuu, T., Vaitkevicius, K., et al. (2009). The *Listeria* transcriptional landscape from saprophytism to virulence. *Nature* *459*, 950–956.
- Travier, L., Guadagnini, S., Gouin, E., Dufour, A., Chenal-Francisque, V., Cossart, P., Olivo-Marin, J.-C., Ghigo, J.-M., Disson, O., and Lecuit, M. (2013). ActA Promotes *Listeria monocytogenes* Aggregation, Intestinal Colonization and Carriage. *PLoS Pathog* *9*, e1003131.
- Tsalikis, J., Tattoli, I., Ling, A., Sorbara, M.T., Croitoru, D.O., Philpott, D.J., and Girardin, S.E. (2015). Intracellular Bacterial Pathogens Trigger the Formation of U Small Nuclear RNA Bodies (U Bodies) through Metabolic Stress Induction. *Journal of Biological Chemistry* *290*, 20904–20918.
- Vadia, S., and Seveau, S. (2014). Fluxes of Ca²⁺ and K⁺ Are Required for the Listeriolysin O-Dependent Internalization Pathway of *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity* *82*, 1084–1091.
- Vadia, S., Arnett, E., Haghghat, A.-C., Wilson-Kubalek, E.M., Tweten, R.K., and Seveau, S. (2011). The Pore-Forming Toxin Listeriolysin O Mediates a Novel Entry Pathway of *L. monocytogenes* into Human Hepatocytes. *PLoS Pathog* *7*, e1002356.
- Vazquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J., and Kreft, J. (2001). *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clinical Microbiology Reviews* *14*, 584–640.

- Veiga, E., Guttman, J.A., Bonazzi, M., Boucrot, E., Toledo-Arana, A., Lin, A.E., Enninga, J., Pizarro-Cerda, J., Finlay, B.B., Kirchhausen, T., et al. (2007). Invasive and Adherent Bacterial Pathogens Co-Opt Host Clathrin for Infection. *Cell Host and Microbe* 2, 340–351.
- Voth, D.E., and Heinzen, R.A. (2007). Lounging in a lysosome: the intracellular lifestyle of *Coxiella burnetii*. *Cell Microbiol* 9, 829–840.
- Welch, M.D., Iwamatsu, A., and Mitchison, T.J. (1997). Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature* 385, 265–269.
- Welch, M.D., Rosenblatt, J., Skoble, J., Portnoy, D.A., and Mitchison, T.J. (1998). Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science* 281, 105–108.
- Weller, D., Andrus, A., Wiedmann, M., and Bakker, den, H.C. (2015). *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65, 286–292.
- Wilson, S.L., and Drevets, D.A. (1998). *Listeria monocytogenes* infection and activation of human brain microvascular endothelial cells. *Journal of Infectious Diseases* 178, 1658–1666.
- Witte, C.E., Archer, K.A., Rae, C.S., Sauer, J.-D., Woodward, J.J., and Portnoy, D.A. (2012). Innate Immune Pathways Triggered by *Listeria monocytogenes* and Their Role in the Induction of Cell-Mediated Immunity (Elsevier Inc.).
- Wu, J., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E.S. (2010). Involvement of the AIM2, NLRC4, and NLRP3 inflammasomes in caspase-1 activation by *Listeria monocytogenes*. *J. Clin. Immunol.* 30, 693–702.
- Wu, S., Lim, K.C., Huang, J., Saidi, R.F., and Sears, C.L. (1998). *Bacteroides fragilis* enterotoxin cleaves the zonula adherens protein, E-cadherin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 14979–14984.
- Wu, S., Rhee, K.J., Zhang, M., Franco, A., and Sears, C.L. (2007). *Bacteroides fragilis* toxin stimulates intestinal epithelial cell shedding and α -secretase-dependent E-cadherin cleavage. *Journal of Cell Science* 120, 3713–3713.
- Yamamoto, M., Okamoto, T., Takeda, K., Sato, S., Sanjo, H., Uematsu, S., Saitoh, T., Yamamoto, N., Sakurai, H., Ishii, K.J., et al. (2006). Key function for the Ubc13 E2 ubiquitin-conjugating enzyme in immune receptor signaling. *Nat Immunol* 7, 962–970.
- Yamashima, T. (2012). Hsp70.1 and related lysosomal factors for necrotic neuronal death. *J. Neurochem.* 120, 477–494.
- Yap, Y.W., Whiteman, M., Bay, B.H., Li, Y., Sheu, F.-S., Qi, R.Z., Tan, C.H., and Cheung, N.S. (2006). Hypochlorous acid induces apoptosis of cultured cortical neurons through activation of calpains and rupture of lysosomes. *J. Neurochem.* 98, 1597–1609.
- Ye, Y., and Rape, M. (2009). Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 755–764.
- Yeung, P.S.M., Zagorski, N., and Marquis, H. (2005). The metalloprotease of *Listeria monocytogenes* controls cell wall translocation of the broad-range phospholipase C. *Journal of Bacteriology* 187, 2601–2608.

Yoshikawa, Y., Ogawa, M., Hain, T., Yoshida, M., Fukumatsu, M., Kim, M., Mimuro, H., Nakagawa, I., Yanagawa, T., Ishii, T., et al. (2009). *Listeria monocytogenes* ActA-mediated escape from autophagic recognition. *Nat Cell Biol* 11, 1233–1240.

Zhou, H., Wertz, I., O'Rourke, K., Ultsch, M., Seshagiri, S., Eby, M., Xiao, W., and Dixit, V.M. (2004). Bcl10 activates the NF-kappaB pathway through ubiquitination of NEMO. *Nature Publishing Group* 427, 167–171.

Zoncu, R., Bar-Peled, L., Efeyan, A., Wang, S., Sancak, Y., and Sabatini, D.M. (2011). mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase. *Science* 334, 678–683.

Annexes

Annexe 1. Variation des quantités des protéines de l'hôte en réponse à la LLO.

Quantification des 1018 protéines de l'hôte identifiées par spectrométrie de masse au cours de 2 expériences indépendantes (certaines protéines n'ont été identifiées que dans une des deux expériences). Les protéines sont classées par leur identifiant uniprot (<http://www.uniprot.org/>) et leur nom complet. Les valeurs indiquées correspondent au rapport des quantités de chaque protéine dans la condition contrôle comparée à la condition traitée par la LLO (3 nM pendant 20 min). Chaque expérience a été réalisée en présence ou en absence de MG132, un inhibiteur du protéasome.

| accession | protein name | (ctr/LLO) exp 1 | (ctr/LLO) exp 2 |
|-----------|--|-----------------|-----------------|
| Q04446 | 1,4-alpha-glucan-branching enzyme | 1,01 | |
| P61604 | 10 kDa heat shock protein, mitochondrial | 0,71 | |
| Q15029 | 116 kDa US small nuclear ribonucleoprotein component | 0,83 | 1,10 |
| Q9NRX4 | 14 kDa phosphohistidine phosphatase | 18,86 | |
| P31946 | 14-3-3 protein beta/alpha | 1,02 | 0,90 |
| P62258 | 14-3-3 protein epsilon | 0,98 | 0,90 |
| Q04917 | 14-3-3 protein eta | | 0,91 |
| P61981 | 14-3-3 protein gamma | 1,03 | 0,90 |
| P27348 | 14-3-3 protein theta | 1,03 | 0,90 |
| P63104 | 14-3-3 protein zeta/delta | 1,01 | 0,90 |
| P62333 | 26S protease regulatory subunit 10B | 0,86 | |
| P17980 | 26S protease regulatory subunit 6A | 0,92 | 0,99 |
| P35998 | 26S protease regulatory subunit 7 | 0,92 | 0,98 |
| P62195 | 26S protease regulatory subunit 8 | 0,78 | 0,98 |
| Q99460 | 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1 | 0,95 | |
| O00231 | 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11 | 0,87 | 1,03 |
| O00232 | 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12 | 0,88 | |
| Q13200 | 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 | 0,85 | 0,98 |
| O43242 | 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3 | 1,09 | 0,93 |
| Q16401 | 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 5 | 1,14 | 1,01 |
| Q15008 | 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6 | | 0,89 |
| P51665 | 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7 | 1,02 | 0,96 |
| P48556 | 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8 | 0,83 | |
| Q13442 | 28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein | 6,16 | |
| Q02218 | 2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial | | 0,96 |
| P52815 | 39S ribosomal protein L12, mitochondrial | 0,74 | |
| Q9BYD3 | 39S ribosomal protein L4, mitochondrial | 0,85 | |
| Q99714 | 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2 | 0,92 | 0,92 |
| P31937 | 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial | 1,23 | 0,87 |
| Q6NVY1 | 3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial | | 0,99 |
| P42765 | 3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial | 0,75 | |
| P46783 | 40S ribosomal protein S10 | 0,88 | 0,93 |
| P62280 | 40S ribosomal protein S11 | 1,01 | 1,01 |
| P25398 | 40S ribosomal protein S12 | 0,87 | |
| P62277 | 40S ribosomal protein S13 | 1,02 | 0,92 |
| P62263 | 40S ribosomal protein S14 | 1,32 | 0,81 |
| P62841 | 40S ribosomal protein S15 | 0,95 | |
| P62244 | 40S ribosomal protein S15a | 0,92 | 1,09 |
| P62249 | 40S ribosomal protein S16 | 0,94 | 0,86 |
| P08708 | 40S ribosomal protein S17 | 0,85 | |
| P62269 | 40S ribosomal protein S18 | 1,10 | 0,92 |
| P39019 | 40S ribosomal protein S19 | 0,87 | 1,01 |
| P15880 | 40S ribosomal protein S2 | 0,81 | |
| P60866 | 40S ribosomal protein S20 | 1,02 | |
| P63220 | 40S ribosomal protein S21 | 1,18 | 1,03 |
| P62266 | 40S ribosomal protein S23 | 0,83 | |
| P62847 | 40S ribosomal protein S24 | 0,77 | 0,91 |
| P62851 | 40S ribosomal protein S25 | 0,79 | |
| P62854 | 40S ribosomal protein S26 | 0,89 | |
| P62857 | 40S ribosomal protein S28 | 1,17 | 0,98 |
| P23396 | 40S ribosomal protein S3 | 0,84 | 1,02 |
| P61247 | 40S ribosomal protein S3a | 1,09 | 0,91 |
| P62701 | 40S ribosomal protein S4, X isoform | 0,94 | 0,97 |
| P62753 | 40S ribosomal protein S6 | 1,08 | 0,93 |
| P62081 | 40S ribosomal protein S7 | 0,86 | |
| P62241 | 40S ribosomal protein S8 | 1,05 | 0,96 |
| P46781 | 40S ribosomal protein S9 | 0,99 | 0,97 |
| P08865 | 40S ribosomal protein SA | 1,11 | 0,99 |
| P08195 | 4F2 cell-surface antigen heavy chain | 0,84 | 1,08 |
| P10809 | 60 kDa heat shock protein, mitochondrial | 0,72 | 0,90 |
| P10155 | 60 kDa SS-A/Ro ribonucleoprotein | | 0,93 |
| P05388 | 60S acidic ribosomal protein P0 | 0,81 | |
| P05386 | 60S acidic ribosomal protein P1 | 0,80 | |
| P05387 | 60S acidic ribosomal protein P2 | 0,85 | |
| P27635 | 60S ribosomal protein L10 | | 0,99 |
| P62906 | 60S ribosomal protein L10a | 0,95 | |
| P62913 | 60S ribosomal protein L11 | 0,79 | |
| P30050 | 60S ribosomal protein L12 | 0,86 | |
| P26373 | 60S ribosomal protein L13 | 0,72 | 0,95 |
| P40429 | 60S ribosomal protein L13a | 0,97 | |
| P50914 | 60S ribosomal protein L14 | 0,97 | |
| P61313 | 60S ribosomal protein L15 | 0,98 | 1,01 |
| P18621 | 60S ribosomal protein L17 | 0,79 | |
| Q07020 | 60S ribosomal protein L18 | 0,88 | 0,93 |
| Q02543 | 60S ribosomal protein L18a | 0,86 | 0,94 |
| P84098 | 60S ribosomal protein L19 | | 0,98 |
| P35268 | 60S ribosomal protein L22 | 0,99 | |
| P62829 | 60S ribosomal protein L23 | 0,93 | |
| P62750 | 60S ribosomal protein L23a | 0,79 | |
| P83731 | 60S ribosomal protein L24 | 0,75 | |
| P61254 | 60S ribosomal protein L26 | 0,94 | |
| Q9UNX3 | 60S ribosomal protein L26-like 1 | | 1,00 |
| P61353 | 60S ribosomal protein L27 | 1,04 | 0,97 |
| P46776 | 60S ribosomal protein L27a | 0,90 | 0,96 |
| P39023 | 60S ribosomal protein L3 | 0,85 | 1,08 |
| P62899 | 60S ribosomal protein L31 | 0,96 | |
| P42766 | 60S ribosomal protein L35 | 0,81 | |
| P63173 | 60S ribosomal protein L38 | 1,10 | |
| P36578 | 60S ribosomal protein L4 | 0,92 | 0,97 |
| P46777 | 60S ribosomal protein L5 | 0,92 | 0,91 |
| Q02878 | 60S ribosomal protein L6 | 1,04 | 0,93 |
| P18124 | 60S ribosomal protein L7 | 0,97 | 0,97 |
| P62424 | 60S ribosomal protein L7a | 0,87 | 0,98 |
| P62917 | 60S ribosomal protein L8 | 0,90 | 1,01 |
| P32969 | 60S ribosomal protein L9 | 0,89 | 0,88 |
| Q01813 | 6-phosphofructokinase type C | 1,06 | 0,88 |
| P17858 | 6-phosphofructokinase, liver type | | 0,95 |
| P52209 | 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating | 1,19 | 0,95 |
| P11021 | 78 kDa glucose-regulated protein | 0,78 | 0,94 |

| (ctr/LLO) exp 1 MG132 | (ctr/LLO) exp 2 MG132 |
|--------------------------|--------------------------|
| 1,39 | 1,09 |
| 0,64 | 0,91 |
| 0,83 | 0,95 |
| | |
| 1,18 | 0,98 |
| 1,16 | 0,98 |
| 1,18 | |
| 1,17 | 0,98 |
| 1,17 | 0,98 |
| 1,16 | 0,98 |
| | |
| 0,95 | |
| 0,93 | |
| | 1,01 |
| 0,73 | |
| 0,94 | 1,06 |
| | |
| 0,90 | 1,04 |
| 1,06 | 1,01 |
| 1,57 | 0,98 |
| | 0,98 |
| 0,94 | 0,96 |
| 0,81 | |
| 5,02 | |
| | 0,89 |
| 0,68 | |
| | |
| 0,87 | 0,85 |
| 1,07 | 0,97 |
| 1,03 | |
| 0,77 | |
| 0,88 | 0,97 |
| 0,89 | |
| 0,78 | |
| 0,95 | 0,97 |
| 1,09 | |
| | |
| 0,94 | 1,04 |
| 0,92 | 0,95 |
| 0,91 | |
| 1,01 | 1,00 |
| 0,93 | |
| 0,76 | |
| 0,98 | |
| 1,21 | 1,05 |
| | |
| 0,78 | |
| 0,78 | |
| 0,88 | |
| 1,41 | 1,19 |
| 0,78 | 0,97 |
| 1,15 | 0,98 |
| 0,88 | 1,10 |
| 0,99 | 0,93 |
| 0,90 | |
| 0,82 | 0,97 |
| 1,04 | 0,99 |
| 1,14 | 1,03 |
| 0,83 | 0,98 |
| 0,65 | 0,84 |
| | 0,89 |
| 0,78 | |
| 0,76 | |
| 0,77 | |
| 1,04 | |
| 0,84 | |
| 0,82 | |
| 0,83 | |
| 1,08 | 0,95 |
| 0,90 | |
| 0,90 | |
| 0,90 | 1,13 |
| 0,75 | |
| 1,05 | |
| | 0,99 |
| | 1,03 |
| | |
| 1,01 | |
| 0,83 | |
| 0,78 | |
| | |
| 1,01 | 0,97 |
| | |
| 0,90 | 0,96 |
| 0,91 | |
| 0,86 | |
| 1,01 | |
| 0,79 | |
| 1,31 | |
| 0,91 | 0,91 |
| 0,87 | 1,03 |
| 1,06 | 0,93 |
| 1,01 | 0,93 |
| 0,91 | |
| 0,96 | |
| 0,96 | |
| 1,09 | |
| | |
| 1,41 | 0,97 |
| 0,72 | 0,87 |

| | | | | | |
|--------|--|------|------|-------|------|
| Q9BWD1 | Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic | 1,06 | 1,01 | 1,14 | 0,87 |
| P24752 | Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial | 0,72 | | 0,60 | |
| Q13085 | Acetyl-CoA carboxylase 1 | 1,25 | 0,77 | 1,14 | 0,83 |
| P39687 | Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A | 1,03 | | | 1,09 |
| Q92688 | Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B | 0,94 | | 1,14 | |
| P63261 | Actin, cytoplasmic 2 | 1,04 | 1,01 | 0,97 | |
| P61160 | Actin-related protein 2 | 1,13 | 0,92 | 0,95 | 0,98 |
| O15143 | Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B | 0,82 | | | |
| O15144 | Actin-related protein 2/3 complex subunit 2 | 0,90 | | | 1,00 |
| O15145 | Actin-related protein 2/3 complex subunit 3 | 1,23 | | 1,17 | |
| P59998 | Actin-related protein 2/3 complex subunit 4 | 1,34 | 1,03 | 1,34 | 0,93 |
| O15511 | Actin-related protein 2/3 complex subunit 5 | 1,15 | | 1,29 | |
| P61158 | Actin-related protein 3 | 1,20 | 0,91 | 1,22 | 1,09 |
| P53999 | Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15 | 1,28 | 1,29 | 2,26 | 1,27 |
| P13798 | Acylamino-acid-releasing enzyme | 1,19 | 1,04 | 1,33 | |
| P07741 | Adenine phosphoribosyltransferase | 2,40 | 1,49 | 3,20 | 1,71 |
| P23526 | Adenosylhomocysteinase | 0,91 | 0,98 | 1,06 | 1,00 |
| P54819 | Adenylate kinase 2, mitochondrial | 0,86 | 0,88 | 0,79 | 0,95 |
| P00568 | Adenylate kinase isoenzyme 1 | 6,43 | 1,95 | 10,21 | 2,64 |
| P30566 | Adenylosuccinate lyase | 1,11 | 0,93 | 0,94 | |
| Q01518 | Adenylyl cyclase-associated protein 1 | 0,90 | 0,97 | 1,04 | 0,96 |
| Q9HDC9 | Adipocyte plasma membrane-associated protein | 0,86 | | | |
| P05141 | ADP/ATP translocase 2 | 0,80 | | 0,63 | 0,92 |
| P12236 | ADP/ATP translocase 3 | 0,84 | 0,95 | 0,78 | 0,89 |
| P84077 | ADP-ribosylation factor 1 | 0,84 | 2,43 | 11,45 | 2,50 |
| P61204 | ADP-ribosylation factor 3 | 0,97 | | 10,71 | |
| P18085 | ADP-ribosylation factor 4 | 6,48 | 2,32 | 10,60 | 2,52 |
| Q96BM9 | ADP-ribosylation factor-like protein 8A | 1,23 | | | |
| Q9UKK9 | ADP-sugar pyrophosphatase | 1,39 | | | |
| Q02952 | A-kinase anchor protein 12 | | 1,35 | | 1,20 |
| P49588 | Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic | 1,05 | 0,86 | 1,15 | 0,79 |
| P30837 | Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial | 0,93 | 1,07 | 0,69 | |
| Q04828 | Aldo-keto reductase family 1 member C1 | 2,80 | 1,67 | 4,46 | 2,02 |
| P52895 | Aldo-keto reductase family 1 member C2 | 2,68 | 1,67 | 4,72 | 2,03 |
| P42330 | Aldo-keto reductase family 1 member C3 | 2,95 | 1,66 | 4,51 | 1,99 |
| P15121 | Aldose reductase | 2,47 | | 2,93 | |
| O00116 | Alkyl(dihydroxyacetone)phosphate synthase, peroxisomal | 0,91 | 0,95 | 0,81 | 0,85 |
| P30533 | Alpha-2-macroglobulin receptor-associated protein | | 0,90 | | 0,84 |
| P12814 | Alpha-actinin-1 | 0,87 | 0,93 | 0,72 | 1,02 |
| O43707 | Alpha-actinin-4 | 0,90 | 0,92 | 0,76 | 1,01 |
| P49419 | Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase | 1,01 | | 0,92 | |
| P61163 | Alpha-centractin | 0,83 | | | |
| P06733 | Alpha-enolase | 0,92 | 1,00 | 1,64 | 1,06 |
| P54920 | Alpha-soluble NSF attachment protein | 0,99 | 1,01 | | |
| P37840 | Alpha-synuclein | 1,90 | | | |
| P40222 | Alpha-taxilin | | 1,30 | | 1,25 |
| Q06203 | Amidophosphoribosyltransferase | 1,03 | | | |
| Q13155 | Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 2 | 0,91 | 0,86 | 1,03 | 0,77 |
| P04083 | Annexin A1 | 1,15 | 1,01 | 1,45 | 1,15 |
| P07355 | Annexin A2 | 0,97 | 0,96 | 1,01 | 0,96 |
| P12429 | Annexin A3 | 1,20 | 1,01 | 1,39 | 1,19 |
| P08758 | Annexin A5 | 1,10 | 1,01 | 1,20 | 1,07 |
| P08133 | Annexin A6 | 1,09 | 0,91 | 0,99 | 0,92 |
| P20073 | Annexin A7 | | 1,00 | | |
| P63010 | AP-2 complex subunit beta | 0,95 | 0,93 | | |
| Q9BZ25 | Apoptosis inhibitor 5 | 1,59 | 1,04 | | |
| O95831 | Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial | 0,92 | | 0,83 | |
| P54136 | Arginine--tRNA ligase, cytoplasmic | 1,01 | 0,91 | 1,16 | 0,94 |
| P08243 | Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing] | 1,08 | | | |
| O43776 | Asparagine--tRNA ligase, cytoplasmic | 1,05 | 0,99 | 1,17 | 0,95 |
| P17174 | Aspartate aminotransferase, cytoplasmic | 1,14 | 0,95 | 1,20 | 1,12 |
| P00505 | Aspartate aminotransferase, mitochondrial | 0,95 | 0,87 | 0,87 | 0,80 |
| P14868 | Aspartate--tRNA ligase, cytoplasmic | 0,98 | 0,93 | 1,05 | 0,99 |
| Q9UBB4 | Ataxin-10 | | 1,11 | | 1,16 |
| Q6DD88 | Atlastin-3 | 0,93 | | 0,78 | |
| P25705 | ATP synthase subunit alpha, mitochondrial | 0,94 | 0,89 | 0,88 | 0,87 |
| P24539 | ATP synthase subunit b, mitochondrial | 0,76 | | 0,60 | |
| P06576 | ATP synthase subunit beta, mitochondrial | 0,85 | 0,91 | 0,84 | 0,87 |
| P56385 | ATP synthase subunit e, mitochondrial | 0,81 | | 0,84 | |
| P56134 | ATP synthase subunit f, mitochondrial | 1,02 | 0,92 | 0,92 | 0,84 |
| P36542 | ATP synthase subunit gamma, mitochondrial | 0,79 | | 0,79 | |
| P48047 | ATP synthase subunit O, mitochondrial | 0,91 | 0,94 | 0,82 | 0,93 |
| O43681 | ATPase ASNA1 | 4,20 | 0,90 | 12,12 | 0,95 |
| Q9NV17 | ATPase family AAA domain-containing protein 3A | 1,01 | 1,09 | | 1,07 |
| Q5T9A4 | ATPase family AAA domain-containing protein 3B | | 1,23 | | |
| P61221 | ATP-binding cassette sub-family E member 1 | 1,22 | | | |
| Q8NE71 | ATP-binding cassette sub-family F member 1 | 1,08 | 1,06 | | 1,05 |
| P53396 | ATP-citrate synthase | 0,94 | 0,87 | 0,99 | 0,87 |
| P46063 | ATP-dependent DNA helicase Q1 | 1,00 | | 1,17 | |
| Q08211 | ATP-dependent RNA helicase A | 0,76 | 1,07 | 0,74 | 0,95 |
| Q92499 | ATP-dependent RNA helicase DDX1 | 0,93 | 0,95 | 1,01 | 1,00 |
| Q9NVP1 | ATP-dependent RNA helicase DDX18 | 0,96 | 1,01 | | 1,13 |
| O00148 | ATP-dependent RNA helicase DDX39A | 1,62 | 1,25 | 1,58 | |
| O00571 | ATP-dependent RNA helicase DDX3X | 1,07 | 1,06 | 1,22 | 1,15 |
| Q9BQ39 | ATP-dependent RNA helicase DDX50 | | 0,91 | | |
| O95817 | BAG family molecular chaperone regulator 3 | | 1,47 | 1,26 | 1,39 |
| Q7L1Q6 | Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1 | 1,73 | | 2,07 | 1,39 |
| Q9Y6E2 | Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 2 | 1,82 | | | |
| P35613 | Basigin | 0,84 | 1,00 | 0,76 | 0,85 |
| Q9NYF8 | Bcl-2-associated transcription factor 1 | 1,12 | | 1,02 | |
| P15291 | Beta-1,4-galactosyltransferase 1 | 0,78 | 1,04 | | |
| P13929 | Beta-enolase | 1,36 | | 1,49 | |
| O43252 | Bifunctional 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 1 | | 1,00 | 1,04 | 0,91 |
| O95340 | Bifunctional 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2 | | 1,15 | | |
| Q3LXA3 | Bifunctional ATP-dependent dihydroxyacetone kinase/FAD-AMP lyase (cyclizing) | 1,00 | | | |
| Q13057 | Bifunctional coenzyme A synthase | | 1,29 | | |
| P07814 | Bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase | 0,90 | 0,89 | 0,96 | 0,88 |
| P31939 | Bifunctional purine biosynthesis protein PURH | 0,98 | 1,00 | 1,04 | 0,99 |
| P53004 | Biliverdin reductase A | | 1,57 | | |
| Q9H3K6 | Bola-like protein 2 | | 4,41 | | 4,65 |

| | | | |
|--------|---|-------|------|
| P78527 | DNA-dependent protein kinase catalytic subunit | 0,93 | 0,93 |
| Q9H9Y6 | DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA2 | | 1,09 |
| P24928 | DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1 | | 1,18 |
| P31689 | DnaJ homolog subfamily A member 1 | 0,69 | 0,91 |
| P25685 | DnaJ homolog subfamily B member 1 | 1,65 | |
| Q9UDY4 | DnaJ homolog subfamily B member 4 | 1,22 | |
| P39656 | Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit | 1,18 | 1,19 |
| P04843 | Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1 | 1,09 | 1,19 |
| P04844 | Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2 | 0,99 | |
| Q8TCJ2 | Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3B | | 1,16 |
| Q14919 | Dr1-associated corepressor | 1,46 | 1,21 |
| Q16643 | Drebrin | | 1,13 |
| P51452 | Dual specificity protein phosphatase 3 | | 2,55 |
| Q13561 | Dynactin subunit 2 | | 1,67 |
| O00429 | Dynamin-1-like protein | 1,06 | 1,00 |
| P63167 | Dynein light chain 1, cytoplasmic | 1,32 | |
| Q9NP97 | Dynein light chain roadblock-type 1 | 1,15 | |
| P49792 | E3 SUMO-protein ligase RanBP2 | 1,18 | |
| Q72627 | E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1 | 0,85 | 0,92 |
| Q9NZN4 | EH domain-containing protein 2 | | 0,98 |
| Q15717 | ELAV-like protein 1 | 0,88 | 1,10 |
| P13804 | Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial | 0,68 | |
| P38117 | Electron transfer flavoprotein subunit beta | | 0,86 |
| P68104 | Elongation factor 1-alpha 1 | 1,31 | 1,17 |
| Q05639 | Elongation factor 1-alpha 2 | | 1,20 |
| P29692 | Elongation factor 1-delta | 0,72 | 0,93 |
| P26641 | Elongation factor 1-gamma | 0,99 | 0,94 |
| P13639 | Elongation factor 2 | 1,54 | 1,09 |
| Q96RP9 | Elongation factor G, mitochondrial | 0,68 | |
| P49411 | Elongation factor Tu, mitochondrial | 1,05 | 1,32 |
| Q95163 | Elongator complex protein 1 | | 1,11 |
| P30040 | Endoplasmic reticulum resident protein 29 | 0,78 | 0,85 |
| Q969X5 | Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein 1 | 1,01 | |
| P14625 | Endoplasmic | 0,85 | 0,87 |
| P42892 | Endothelin-converting enzyme 1 | 0,91 | 1,01 |
| P84090 | Enhancer of rudimentary homolog | 0,91 | |
| P30084 | Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial | | 0,89 |
| P00533 | Epidermal growth factor receptor | 0,90 | |
| P58107 | Epiplakin | 1,88 | 1,38 |
| P07099 | Epoxide hydrolase 1 | | 0,91 |
| P60842 | Eukaryotic initiation factor 4A-I | 1,65 | 1,25 |
| P38919 | Eukaryotic initiation factor 4A-III | 1,34 | 1,38 |
| P15170 | Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit ERF3A | 0,98 | |
| Q8IYD1 | Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit ERF3B | 1,11 | 1,00 |
| P62495 | Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1 | 1,38 | 1,07 |
| O43324 | Eukaryotic translation elongation factor 1 epsilon-1 | 0,79 | |
| P05198 | Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1 | 1,21 | 1,04 |
| P41091 | Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3 | 1,10 | 0,98 |
| Q9BY44 | Eukaryotic translation initiation factor 2A | | 1,20 |
| Q14152 | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A | 0,91 | 0,91 |
| P55884 | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B | 1,00 | 0,97 |
| Q99613 | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C | 0,99 | 0,94 |
| Q15371 | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D | 0,88 | 0,78 |
| P60228 | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E | 0,85 | 0,95 |
| O00303 | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F | 0,90 | 0,99 |
| O75821 | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G | | 1,06 |
| Q13347 | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I | 0,86 | 1,02 |
| O75822 | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J | 0,98 | |
| Q9Y262 | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L | 0,91 | 0,93 |
| Q7L2H7 | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M | 0,92 | |
| Q04637 | Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1 | 1,15 | 1,50 |
| P78344 | Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2 | 1,14 | |
| P23588 | Eukaryotic translation initiation factor 4B | 1,41 | 1,15 |
| Q15056 | Eukaryotic translation initiation factor 4H | 3,27 | 1,71 |
| P55010 | Eukaryotic translation initiation factor 5 | 1,27 | |
| P63241 | Eukaryotic translation initiation factor 5A-1 | 6,04 | 2,24 |
| Q60841 | Eukaryotic translation initiation factor 5B | 1,19 | |
| P56537 | Eukaryotic translation initiation factor 6 | 1,33 | 1,10 |
| Q9NPD3 | Exosome complex component RRP41 | 1,20 | 0,99 |
| O14980 | Exportin-1 | 0,81 | 0,88 |
| P55060 | Exportin-2 | 0,89 | 1,03 |
| Q9HAV4 | Exportin-5 | 0,90 | |
| Q9BSJ8 | Extended synaptotagmin-1 | 1,07 | 1,02 |
| P15311 | Ezrin | 1,03 | 1,02 |
| Q9Y589 | FACT complex subunit SPT16 | | 0,88 |
| Q08945 | FACT complex subunit SSRP1 | 0,94 | 0,79 |
| P52907 | F-actin-capping protein subunit alpha-1 | 1,13 | 0,92 |
| P47755 | F-actin-capping protein subunit alpha-2 | 1,17 | 1,06 |
| P47756 | F-actin-capping protein subunit beta | 1,03 | 0,96 |
| Q96AE4 | Far upstream element-binding protein 1 | 1,20 | 1,13 |
| Q92945 | Far upstream element-binding protein 2 | 1,20 | 1,29 |
| Q96124 | Far upstream element-binding protein 3 | 1,49 | 1,21 |
| P14324 | Farnesyl pyrophosphate synthase | 1,16 | 0,82 |
| Q9UNN5 | FAS-associated factor 1 | 0,77 | |
| Q16658 | Fascin | 1,99 | 1,23 |
| P49327 | Fatty acid synthase | 0,93 | 0,69 |
| Q01469 | Fatty acid-binding protein, epidermal | 13,44 | 3,36 |
| Q96AC1 | Fermitin family homolog 2 | | 1,06 |
| P21333 | Filamin-A | 0,99 | 0,93 |
| O75369 | Filamin-B | 0,89 | 0,94 |
| P39748 | Flap endonuclease 1 | 2,04 | 1,32 |
| P30043 | Flavin reductase (NADPH) | | 2,10 |
| P04075 | Fructose-bisphosphate aldolase A | 1,46 | 0,96 |
| P07954 | Fumarate hydratase, mitochondrial | 0,80 | 0,79 |
| P09382 | Galectin-1 | 2,64 | |
| P09104 | Gamma-enolase | 1,31 | 0,99 |
| P06396 | Gelsolin | | 0,85 |
| P57678 | Gem-associated protein 4 | | 0,96 |
| P78347 | General transcription factor II-I | 1,03 | 1,08 |
| O60763 | General vesicular transport factor p115 | 1,03 | 1,08 |

| | | |
|--|-------|------|
| | 0,83 | 0,96 |
| | | |
| | 0,74 | 0,87 |
| | 1,05 | 1,08 |
| | 1,22 | |
| | 1,12 | 1,23 |
| | 1,10 | 1,12 |
| | 0,96 | 1,16 |
| | | |
| | | 0,95 |
| | | |
| | | 0,98 |
| | | |
| | 1,18 | |
| | 1,27 | |
| | 1,34 | |
| | 1,45 | |
| | 0,90 | 0,90 |
| | | 0,87 |
| | 0,86 | 1,11 |
| | 0,61 | |
| | 0,91 | 0,84 |
| | 1,36 | 1,22 |
| | | 1,29 |
| | 0,95 | 0,93 |
| | 0,96 | 0,96 |
| | 1,41 | 1,08 |
| | | |
| | 1,04 | 1,40 |
| | | |
| | 0,72 | 0,77 |
| | 1,04 | |
| | 0,80 | 0,84 |
| | 0,92 | 0,89 |
| | 0,75 | |
| | | 0,79 |
| | 0,75 | |
| | 1,44 | 1,52 |
| | 0,67 | |
| | 2,05 | 1,32 |
| | 1,47 | 1,16 |
| | | |
| | 1,19 | 1,07 |
| | 1,71 | 1,12 |
| | 0,82 | |
| | 1,17 | 1,02 |
| | 1,10 | 0,96 |
| | 6,01 | |
| | 1,00 | 0,96 |
| | 1,07 | 0,99 |
| | 1,01 | 0,98 |
| | 0,90 | 0,91 |
| | 0,87 | |
| | 0,94 | 0,99 |
| | | 0,97 |
| | 0,94 | 1,02 |
| | 0,85 | |
| | 0,97 | 0,92 |
| | 0,84 | |
| | 1,25 | |
| | 1,12 | |
| | 1,47 | 1,07 |
| | 5,83 | 1,88 |
| | 1,57 | |
| | 8,90 | 2,40 |
| | 0,86 | |
| | 1,32 | 1,16 |
| | 1,22 | 1,05 |
| | 0,85 | 0,99 |
| | 0,87 | 0,89 |
| | 0,95 | |
| | 1,06 | |
| | 1,29 | 1,05 |
| | | 0,75 |
| | 0,76 | 0,84 |
| | 1,19 | 1,05 |
| | 1,33 | 1,05 |
| | 1,26 | |
| | 1,29 | |
| | 1,27 | 1,32 |
| | 1,53 | 1,16 |
| | 1,28 | 0,82 |
| | | |
| | 2,53 | 1,22 |
| | 1,09 | 0,68 |
| | 13,94 | |
| | 1,55 | 1,06 |
| | 0,93 | 0,95 |
| | 0,89 | 0,87 |
| | | |
| | 1,20 | 0,95 |
| | 0,83 | |
| | 5,92 | |
| | | 1,04 |
| | | |
| | | |
| | 0,81 | 0,93 |
| | 1,17 | 1,00 |

| | | | | | |
|--------|---|------|------|------|------|
| P11413 | Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase | 1,22 | 0,99 | 1,78 | 0,96 |
| P06744 | Glucose-6-phosphate isomerase | 1,13 | 0,98 | 1,38 | 1,07 |
| P14314 | Glucosidase 2 subunit beta | 0,86 | 0,92 | 0,85 | 0,98 |
| P00367 | Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial | 1,02 | 0,90 | | 0,93 |
| O94925 | Glutaminase kidney isoform, mitochondrial | 0,67 | 0,87 | 0,69 | 0,91 |
| P15104 | Glutamine synthetase | 1,13 | | | |
| P47897 | Glutamine-tRNA ligase | 0,84 | 0,89 | 1,03 | 0,98 |
| P00390 | Glutathione reductase, mitochondrial | 1,08 | 0,96 | | |
| P21266 | Glutathione S-transferase Mu 3 | 1,34 | | 2,01 | |
| P78417 | Glutathione S-transferase omega-1 | 1,47 | | 3,65 | |
| P09211 | Glutathione S-transferase P | 1,76 | 1,16 | 2,31 | 1,31 |
| P04406 | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | 1,11 | 0,96 | 1,26 | 0,98 |
| P43304 | Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial | 1,08 | 1,12 | 0,96 | 1,06 |
| P41250 | Glycine-tRNA ligase | 0,92 | 0,86 | 0,99 | 0,82 |
| P06737 | Glycogen phosphorylase, liver form | 0,97 | | 1,11 | |
| P30419 | Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1 | 1,18 | | | |
| P49915 | GMP synthase [glutamine-hydrolyzing] | 1,03 | | | |
| P62826 | GTP-binding nuclear protein Ran | 3,76 | | 4,82 | |
| P63096 | Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-1 | 0,83 | | 0,89 | |
| P04899 | Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2 | 0,82 | | 0,86 | |
| Q14344 | Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13 | 0,79 | | 0,83 | |
| P63244 | Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 | 1,01 | 0,77 | 1,11 | 1,08 |
| Q16774 | Guanylate kinase | | 1,39 | | |
| O60832 | H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4 | 1,08 | | 0,89 | |
| Q9H583 | HEAT repeat-containing protein 1 | 0,96 | 1,20 | | |
| P08107 | Heat shock 70 kDa protein 1A/1B | 1,04 | 0,96 | 0,72 | 0,90 |
| P34932 | Heat shock 70 kDa protein 4 | 1,05 | 1,00 | 1,13 | 0,96 |
| O95757 | Heat shock 70 kDa protein 4L | 1,07 | 0,97 | 1,36 | 0,94 |
| P11142 | Heat shock cognate 71 kDa protein | 0,99 | 0,96 | 0,85 | 0,93 |
| Q92598 | Heat shock protein 105 kDa | 0,77 | 0,98 | 0,85 | 0,93 |
| Q12931 | Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial | 1,33 | 0,88 | 0,79 | 0,89 |
| P04792 | Heat shock protein beta-1 | 1,09 | 0,93 | 1,01 | 0,88 |
| P07900 | Heat shock protein HSP 90-alpha | 0,85 | 0,96 | 0,88 | 0,91 |
| P08238 | Heat shock protein HSP 90-beta | 0,86 | 0,97 | 0,91 | 0,92 |
| P09601 | Heme oxygenase 1 | 0,85 | 1,02 | 0,80 | 1,09 |
| P30519 | Heme oxygenase 2 | 0,85 | | | |
| P51858 | Hepatoma-derived growth factor | 1,11 | | | |
| Q99729 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B | 1,09 | | 1,09 | |
| P09651 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 | 1,32 | 1,07 | 1,20 | 1,18 |
| P51991 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 | 1,23 | 1,01 | 1,07 | 1,09 |
| Q14103 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 | 1,05 | | 0,98 | |
| O14979 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like | 1,08 | | | |
| P52597 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F | 1,22 | 1,11 | 1,13 | 1,31 |
| P31943 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H | 1,22 | 1,16 | 1,12 | 1,29 |
| P55795 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2 | | 1,14 | | |
| P31942 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 | | 1,06 | 1,19 | 1,07 |
| P61978 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K | 1,22 | 1,27 | 1,19 | 1,23 |
| P14866 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L | 1,02 | | | |
| P52272 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M | 0,99 | 1,06 | 0,79 | 1,12 |
| O60506 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q | 1,04 | 1,13 | 0,91 | 1,13 |
| O43390 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R | 1,10 | 1,12 | 0,97 | 1,11 |
| Q00839 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U | 1,10 | 1,28 | 1,09 | 1,37 |
| Q9BUJ2 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1 | | 1,31 | | |
| Q1KMD3 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2 | 1,13 | 1,09 | 0,87 | |
| P22626 | Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 | 1,19 | 1,01 | 1,11 | 1,02 |
| P07910 | Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 | 0,92 | 0,97 | 0,73 | 1,05 |
| P19367 | Hexokinase-1 | 1,23 | 1,23 | 1,04 | |
| P30825 | High affinity cationic amino acid transporter 1 | | 1,11 | | |
| P09429 | High mobility group protein B1 | 1,96 | 1,38 | 2,94 | |
| P26583 | High mobility group protein B2 | 1,85 | 1,38 | 2,44 | |
| P37235 | Hippocalcin-like protein 1 | | 1,09 | | 1,07 |
| P49773 | Histidine triad nucleotide-binding protein 1 | 3,06 | 1,65 | 6,19 | 1,85 |
| Q9BX68 | Histidine triad nucleotide-binding protein 2, mitochondrial | 0,94 | | 0,82 | |
| O14929 | Histone acetyltransferase type B catalytic subunit | | 0,95 | | 1,01 |
| Q92769 | Histone deacetylase 2 | 1,11 | 1,07 | 1,12 | 1,18 |
| P16403 | Histone H1.2 | 0,96 | | 0,65 | |
| P16401 | Histone H1.5 | 0,82 | | 0,74 | |
| Q6F113 | Histone H2A type 2-A | | 0,94 | | 0,92 |
| Q16777 | Histone H2A type 2-C | 1,16 | | 0,96 | |
| P16104 | Histone H2A.x | 1,21 | | 1,01 | |
| P0C055 | Histone H2A.z | 1,18 | | 1,01 | |
| O60814 | Histone H2B type 1-K | 0,86 | | 0,66 | |
| P62805 | Histone H4 | 1,11 | 1,08 | 0,91 | 1,01 |
| Q09028 | Histone-binding protein RBBP4 | 1,16 | | 1,02 | |
| Q16576 | Histone-binding protein RBBP7 | 1,12 | 1,05 | | 0,91 |
| O43719 | HIV Tat-specific factor 1 | | 0,87 | | |
| P04439 | HLA class I histocompatibility antigen, A-3 alpha chain | 1,01 | | | |
| P01891 | HLA class I histocompatibility antigen, A-68 alpha chain | | 1,01 | | |
| P30493 | HLA class I histocompatibility antigen, B-55 alpha chain | | 1,06 | | |
| P10319 | HLA class I histocompatibility antigen, B-58 alpha chain | 1,09 | | | |
| P50502 | Hsc70-interacting protein | 0,81 | | | 0,88 |
| Q16836 | Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial | | 0,84 | 0,91 | 0,80 |
| Q01581 | Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic | 0,68 | | 0,89 | |
| Q6YN16 | Hydroxysteroid dehydrogenase-like protein 2 | 0,80 | | | |
| P00492 | Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase | 1,23 | 0,99 | 1,30 | |
| Q9Y4L1 | Hypoxia up-regulated protein 1 | 0,85 | 0,95 | 0,69 | 0,90 |
| P52292 | Importin subunit alpha-2 | 0,92 | 1,02 | 0,98 | 1,02 |
| Q14974 | Importin subunit beta-1 | 1,00 | 0,97 | 0,87 | 0,95 |
| Q8TEX9 | Importin-4 | 1,20 | 0,94 | 1,32 | 1,04 |
| O00410 | Importin-5 | 0,99 | 1,01 | 1,07 | 1,07 |
| O95373 | Importin-7 | 0,90 | 0,95 | 0,92 | 0,98 |
| Q96P70 | Importin-9 | 0,99 | 0,91 | 0,95 | 0,88 |
| Q15181 | Inorganic pyrophosphatase | | 1,16 | | |
| P12268 | Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2 | 1,10 | 1,02 | 1,20 | 1,07 |
| P14735 | Insulin-degrading enzyme | 0,83 | | | |
| Q9NZI8 | Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1 | 0,92 | | 0,75 | |
| Q68E01 | Integrator complex subunit 3 | | 1,06 | | |
| P26006 | Integrin alpha-3 | 0,90 | 1,04 | | |
| P08648 | Integrin alpha-5 | | 1,18 | | 0,89 |
| P05556 | Integrin beta-1 | 0,85 | | 0,77 | |

| | | | |
|--------|---|-------|------|
| Q12769 | Nuclear pore complex protein Nup160 | 0,89 | 1,09 |
| P35658 | Nuclear pore complex protein Nup214 | 1,20 | |
| Q8N1F7 | Nuclear pore complex protein Nup93 | 0,98 | 1,10 |
| P52948 | Nuclear pore complex protein Nup98-Nup96 | | 1,36 |
| Q8TEM1 | Nuclear pore membrane glycoprotein 210 | 1,40 | |
| P67809 | Nuclease-sensitive element-binding protein 1 | 0,85 | |
| Q02818 | Nucleobindin-1 | 0,82 | 0,98 |
| Q14978 | Nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1 | 1,10 | 1,17 |
| Q9BSC4 | Nucleolar protein 10 | | 1,13 |
| O00567 | Nucleolar protein 56 | | 0,93 |
| Q9Y2X3 | Nucleolar protein 58 | 0,89 | |
| Q9H6R4 | Nucleolar protein 6 | | 1,02 |
| Q9NR30 | Nucleolar RNA helicase 2 | 0,96 | 0,91 |
| P19338 | Nucleolin | 0,85 | 0,94 |
| P06748 | Nucleophosmin | 0,99 | 1,11 |
| P12270 | Nucleoprotein TPR | 1,22 | 1,54 |
| P15531 | Nucleoside diphosphate kinase A | 1,22 | |
| P22392 | Nucleoside diphosphate kinase B | 1,30 | |
| P55209 | Nucleosome assembly protein 1-like 1 | 1,07 | 1,02 |
| Q99733 | Nucleosome assembly protein 1-like 4 | 1,02 | 0,96 |
| Q9NTK5 | Obg-like ATPase 1 | 1,12 | |
| Q15645 | Pachytene checkpoint protein 2 homolog | 1,28 | 1,26 |
| Q8WX93 | Palladin | 1,36 | 1,29 |
| P50897 | Palmitoyl-protein thioesterase 1 | 0,92 | |
| Q6P1J9 | Parafibromin | 0,88 | |
| Q96HC4 | PDZ and LIM domain protein 5 | 1,27 | |
| P62937 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A | 11,32 | 2,97 |
| P23284 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B | 0,82 | 0,83 |
| Q96AY3 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP10 | | 0,88 |
| P62942 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A | | 5,21 |
| Q02790 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4 | 1,03 | 0,92 |
| Q13526 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1 | 7,49 | |
| Q9Y3E5 | Peptidyl-tRNA hydrolase 2, mitochondrial | 0,81 | |
| O60664 | Perilipin-3 | 0,93 | 1,20 |
| Q06830 | Peroxisome assembly factor 1 | 1,92 | 1,28 |
| P32119 | Peroxisome assembly factor 2 | 2,20 | 1,26 |
| Q13162 | Peroxisome assembly factor 4 | 1,26 | 0,81 |
| P30044 | Peroxisome assembly factor 5, mitochondrial | 1,62 | 1,15 |
| P30041 | Peroxisome assembly factor 6 | 1,83 | 1,22 |
| P51659 | Peroxisomal multifunctional enzyme type 2 | 1,02 | 0,97 |
| Q6Y7W6 | PERQ amino acid-rich with GYF domain-containing protein 2 | | 1,15 |
| Q9Y285 | Phenylalanine--tRNA ligase alpha subunit | | 0,88 |
| Q9NSD9 | Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit | 0,94 | |
| Q9H2J4 | Phosducin-like protein 3 | | 1,11 |
| Q00325 | Phosphate carrier protein, mitochondrial | 0,96 | 1,04 |
| P30086 | Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 | 30,17 | |
| Q9NTJ5 | Phosphatidylinositol 3-phosphatase SAC1 | 0,84 | 0,93 |
| P48651 | Phosphatidylserine synthase 1 | | 1,29 |
| P00558 | Phosphoglycerate kinase 1 | 2,39 | |
| P18669 | Phosphoglycerate mutase 1 | 1,36 | 1,11 |
| O15067 | Phosphoribosylformylglycinamide synthase | 0,87 | 0,98 |
| Q9Y617 | Phosphoserine aminotransferase | 1,16 | 1,05 |
| P78330 | Phosphoserine phosphatase | | 1,09 |
| Q8NC51 | Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein | 1,05 | 1,07 |
| P13797 | Plastin-3 | 1,25 | 0,99 |
| P43034 | Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit alpha | | 0,94 |
| P68402 | Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta | 1,79 | |
| Q15149 | Plectin | 1,57 | 1,36 |
| P09874 | Poly [ADP-ribose] polymerase 1 | 1,24 | |
| Q15365 | Poly(rC)-binding protein 1 | 1,54 | 1,42 |
| Q15366 | Poly(rC)-binding protein 2 | 1,52 | 1,40 |
| Q9UHX1 | Poly(U)-binding-splicing factor PUF60 | 1,07 | 1,47 |
| P11940 | Polyadenylate-binding protein 1 | 1,06 | 0,76 |
| Q13310 | Polyadenylate-binding protein 4 | 0,96 | 1,21 |
| O60828 | Polyglutamine-binding protein 1 | 1,08 | |
| Q9Y257 | Polymerase delta-interacting protein 2 | | 0,98 |
| Q6NZI2 | Polymerase I and transcript release factor | 1,15 | 1,08 |
| Q10471 | Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2 | 1,01 | 0,95 |
| P26599 | Polypyrimidine tract-binding protein 1 | 1,11 | 1,06 |
| P0CG47 | Polyubiquitin-B | 2,47 | |
| O75915 | PRA1 family protein 3 | | 0,91 |
| Q9UHV9 | Prefoldin subunit 2 | 0,90 | |
| P02545 | Prelamin-A/C | 1,14 | 0,97 |
| Q6P2Q9 | Pre-mRNA-processing-splicing factor 8 | 1,12 | 1,18 |
| Q9UHG3 | Prenylcysteine oxidase 1 | 0,78 | |
| Q2NL82 | Pre-rRNA-processing protein TSR1 homolog | 1,09 | 1,14 |
| Q92841 | Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17 | 1,21 | 1,12 |
| Q7L014 | Probable ATP-dependent RNA helicase DDX46 | 1,31 | |
| P17844 | Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5 | 1,15 | 1,09 |
| P26196 | Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6 | 1,22 | |
| Q9H2U1 | Probable ATP-dependent RNA helicase DHX36 | | 1,00 |
| Q96GX9 | Probable methylthioribulose-1-phosphate dehydratase | 1,06 | |
| Q99848 | Probable rRNA-processing protein EBP2 | 1,00 | |
| Q8NBJ5 | Procollagen galactosyltransferase 1 | 0,95 | 1,07 |
| Q02809 | Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1 | 0,74 | 0,90 |
| O00469 | Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2 | 0,90 | 0,85 |
| O60568 | Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3 | 0,82 | 0,90 |
| P07737 | Profilin-1 | 2,66 | |
| Q8WUM4 | Programmed cell death 6-interacting protein | 1,00 | 1,09 |
| Q53EL6 | Programmed cell death protein 4 | 1,20 | 1,01 |
| O14737 | Programmed cell death protein 5 | | 1,69 |
| O75340 | Programmed cell death protein 6 | 0,97 | 0,88 |
| P35232 | Prohibitin | 1,06 | 1,18 |
| Q99623 | Prohibitin-2 | 1,17 | 1,28 |
| P12004 | Proliferating cell nuclear antigen | 0,96 | |
| Q9UQ80 | Proliferation-associated protein 2G4 | 1,07 | 1,06 |
| Q8IZL8 | Proline-, glutamic acid- and leucine-rich protein 1 | 1,33 | 0,97 |
| Q32P28 | Prolyl 3-hydroxylase 1 | 1,01 | 0,90 |
| P48147 | Prolyl endopeptidase | 0,94 | |
| Q8NBP7 | Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 | | 0,76 |

| | |
|-------|------|
| 0,86 | |
| 1,25 | |
| 0,92 | 1,23 |
| | 1,37 |
| | |
| 0,84 | 0,92 |
| | |
| | |
| 0,85 | |
| 0,75 | |
| | |
| 0,83 | 1,00 |
| 0,90 | 0,99 |
| 0,91 | 1,18 |
| 1,10 | 1,56 |
| 1,19 | |
| 1,39 | |
| 1,09 | 1,06 |
| 1,02 | 1,01 |
| 1,35 | |
| 1,70 | 1,19 |
| | |
| 0,74 | 1,09 |
| 0,69 | |
| 1,32 | |
| 14,30 | 3,49 |
| 0,74 | 0,95 |
| | 0,85 |
| | |
| 1,12 | 0,95 |
| 8,67 | |
| | |
| | |
| | 1,13 |
| 2,38 | 1,47 |
| 2,72 | 1,43 |
| 1,68 | 1,18 |
| 1,36 | |
| 2,89 | 1,39 |
| 0,93 | 0,87 |
| | |
| | |
| 4,35 | 1,57 |
| 1,65 | 1,29 |
| 0,95 | 0,90 |
| 1,28 | 1,07 |
| | 1,06 |
| 1,19 | 1,20 |
| 1,71 | 1,19 |
| | |
| 2,20 | 1,26 |
| 1,32 | 1,24 |
| | |
| 1,77 | 1,41 |
| 1,57 | |
| 1,11 | 1,11 |
| 1,07 | 1,23 |
| 0,94 | |
| | |
| | |
| 1,10 | 0,91 |
| | 0,90 |
| 1,07 | 1,05 |
| 1,62 | |
| | |
| 0,95 | |
| 1,01 | 0,92 |
| 0,96 | 1,18 |
| 0,80 | |
| 0,86 | 1,19 |
| 1,39 | 1,22 |
| | |
| 1,28 | 1,19 |
| | |
| | |
| 1,22 | |
| 0,74 | 0,99 |
| 0,79 | |
| 0,63 | 0,86 |
| 0,78 | 0,94 |
| 0,70 | |
| 5,55 | 1,24 |
| 1,20 | 1,16 |
| | 1,03 |
| 6,76 | |
| | 0,92 |
| | 1,13 |
| 1,18 | 1,27 |
| 1,05 | |
| 1,22 | 1,15 |
| | 1,10 |
| 0,88 | 0,87 |
| 1,41 | |

| | | | | | |
|--------|--|------|------|------|------|
| Q14914 | Prostaglandin reductase 1 | 1,47 | | 1,45 | 1,20 |
| Q06323 | Proteasome activator complex subunit 1 | 0,87 | | 0,77 | 0,90 |
| Q9UL46 | Proteasome activator complex subunit 2 | 0,95 | 0,88 | 0,98 | |
| P61289 | Proteasome activator complex subunit 3 | 0,85 | | 0,96 | |
| P25786 | Proteasome subunit alpha type-1 | 0,93 | | 0,71 | |
| P25787 | Proteasome subunit alpha type-2 | 0,87 | 0,86 | 0,91 | 0,89 |
| P25788 | Proteasome subunit alpha type-3 | 0,97 | 0,86 | 1,00 | |
| P25789 | Proteasome subunit alpha type-4 | 0,85 | | 0,85 | |
| P28066 | Proteasome subunit alpha type-5 | 0,95 | 0,90 | 1,17 | |
| P60900 | Proteasome subunit alpha type-6 | 0,92 | 0,96 | 1,00 | 1,02 |
| O14818 | Proteasome subunit alpha type-7 | 0,91 | | 1,05 | 1,09 |
| P20618 | Proteasome subunit beta type-1 | 0,99 | 0,92 | 1,00 | 0,90 |
| P49721 | Proteasome subunit beta type-2 | | 0,87 | 1,13 | |
| P49720 | Proteasome subunit beta type-3 | 0,99 | | 0,88 | 0,92 |
| P28074 | Proteasome subunit beta type-5 | 0,98 | 0,86 | | 0,74 |
| Q5VYK3 | Proteasome-associated protein ECM29 homolog | | 1,10 | | |
| Q8IVF2 | Protein AHNAK2 | 1,20 | | 0,93 | |
| Q99873 | Protein arginine N-methyltransferase 1 | 0,81 | | | |
| O14744 | Protein arginine N-methyltransferase 5 | | 0,91 | 0,75 | |
| O60888 | Protein CutA | | 0,97 | | 1,04 |
| P35659 | Protein DEK | 0,83 | | 0,80 | |
| O60610 | Protein diaphanous homolog 1 | | 0,94 | | |
| P07237 | Protein disulfide-isomerase | 0,76 | 0,80 | 0,67 | 0,81 |
| P30101 | Protein disulfide-isomerase A3 | 0,83 | 0,92 | 0,80 | 0,86 |
| P13667 | Protein disulfide-isomerase A4 | 0,94 | | 0,87 | 0,84 |
| Q15084 | Protein disulfide-isomerase A6 | 0,97 | 0,82 | 0,85 | 0,81 |
| Q99497 | Protein DJ-1 | 1,91 | 1,52 | 2,60 | 1,60 |
| Q8N857 | Protein enabled homolog | | 1,34 | | |
| P49257 | Protein ERGIC-53 | 1,10 | 1,07 | 1,07 | 1,15 |
| Q96A26 | Protein FAM162A | 0,68 | | 0,64 | |
| Q9NUQ9 | Protein FAM49B | | 1,19 | | |
| Q13045 | Protein flightless-1 homolog | | 0,95 | | |
| Q9UNF0 | Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 2 | 0,99 | | | |
| Q92597 | Protein NDRG1 | 1,13 | 1,02 | | |
| Q9UGV2 | Protein NDRG3 | | 0,98 | | 0,99 |
| Q96C90 | Protein phosphatase 1 regulatory subunit 14B | | 2,02 | | |
| O15355 | Protein phosphatase 1G | | 0,89 | | |
| Q9P258 | Protein RCC2 | 1,85 | 1,36 | 3,38 | 1,60 |
| P31949 | Protein S100-A11 | 0,77 | | 0,72 | |
| Q96FQ6 | Protein S100-A16 | 1,44 | | 1,47 | |
| P26447 | Protein S100-A4 | 0,90 | | 0,86 | |
| P06703 | Protein S100-A6 | | 1,00 | | |
| P55735 | Protein SEC13 homolog | | 1,22 | | 1,12 |
| Q9UBV2 | Protein sel-1 homolog 1 | | 1,30 | | |
| Q01105 | Protein SET | 0,80 | | 0,85 | |
| O15027 | Protein transport protein Sec16A | 3,67 | | | |
| Q15436 | Protein transport protein Sec23A | 1,04 | | 1,01 | |
| P53992 | Protein transport protein Sec24C | 0,82 | | 0,85 | |
| O94979 | Protein transport protein Sec31A | 1,17 | 1,07 | 1,28 | 1,13 |
| P21980 | Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2 | | 1,51 | | |
| Q96P20 | Pseudouridylylase synthase 7 homolog | 0,91 | 1,04 | 1,00 | 1,10 |
| Q14671 | Pumilio homolog 1 | | 1,54 | | |
| P00491 | Purine nucleoside phosphorylase | 1,00 | 1,06 | 1,16 | 1,02 |
| P55786 | Puromycin-sensitive aminopeptidase | 1,07 | 0,94 | 1,09 | 0,89 |
| Q7L2E3 | Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30 | 0,96 | 0,98 | | |
| Q9HCE1 | Putative helicase MOV-10 | | 1,15 | | |
| O43143 | Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15 | 1,05 | 1,07 | 0,99 | 1,12 |
| P46087 | Putative ribosomal RNA methyltransferase NOP2 | | 1,12 | | |
| Q96T37 | Putative RNA-binding protein 15 | 4,14 | | | |
| P98179 | Putative RNA-binding protein 3 | 2,03 | 1,60 | | 1,75 |
| Q9Y383 | Putative RNA-binding protein Luc7-like 2 | 1,37 | 1,21 | | 1,23 |
| A6NL28 | Putative tropomyosin alpha-3 chain-like protein | | 0,99 | | 0,89 |
| O00764 | Pyridoxal kinase | | 1,08 | | |
| Q9NV59 | Pyridoxine-5'-phosphate oxidase | | 1,19 | | |
| P11498 | Pyruvate carboxylase, mitochondrial | 0,89 | 0,78 | 0,78 | |
| P08559 | Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial | | 0,91 | 0,98 | 0,80 |
| P14618 | Pyruvate kinase isozymes M1/M2 | 0,94 | 0,87 | 0,91 | 0,88 |
| P50395 | Rab GDP dissociation inhibitor beta | 1,39 | 1,09 | 1,77 | 1,20 |
| P35241 | Radixin | 1,22 | 1,01 | | 1,04 |
| P46060 | Ran GTPase-activating protein 1 | 0,93 | 1,12 | 1,03 | 1,10 |
| P52306 | Rap1 GTPase-GDP dissociation stimulator 1 | | 1,07 | | |
| Q13283 | Ras GTPase-activating protein-binding protein 1 | 0,98 | 0,98 | 0,91 | 1,06 |
| Q9UN86 | Ras GTPase-activating protein-binding protein 2 | 1,01 | | | |
| P46940 | Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1 | 0,89 | 0,94 | 0,83 | 1,02 |
| Q15907 | Ras-related protein Rab-11B | | 0,99 | 0,90 | |
| P61106 | Ras-related protein Rab-14 | 1,10 | | 0,93 | |
| P51148 | Ras-related protein Rab-5C | 0,93 | 0,98 | 0,97 | 1,07 |
| P51149 | Ras-related protein Rab-7a | | 1,05 | 1,01 | |
| P62834 | Ras-related protein Rap-1A | | 1,03 | | 0,95 |
| P61224 | Ras-related protein Rap-1b | 1,02 | | 0,85 | |
| P18754 | Regulator of chromosome condensation | 0,94 | 1,09 | 1,14 | |
| Q92900 | Regulator of nonsense transcripts 1 | 0,93 | 1,15 | | |
| Q8WU55 | RelA-associated inhibitor | 0,98 | 1,15 | | 1,06 |
| P40937 | Replication factor C subunit 5 | 1,04 | 1,09 | | |
| P15927 | Replication protein A 32 kDa subunit | | 1,06 | | |
| Q15293 | Reticulocalbin-1 | 0,70 | 0,84 | 0,88 | 0,86 |
| Q9NQ33 | Reticulon-4 | 0,95 | | 0,96 | 0,80 |
| P52565 | Rho GDP-dissociation inhibitor 1 | 1,75 | | 6,78 | |
| Q68EM7 | Rho GTPase-activating protein 17 | | 0,93 | | |
| O75116 | Rho-associated protein kinase 2 | 1,20 | 0,89 | 1,26 | 0,80 |
| Q99575 | Ribonucleases P/MRP protein subunit POP1 | 1,04 | | 1,04 | |
| P23921 | Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit | 1,31 | 1,09 | 1,65 | 1,08 |
| P60891 | Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1 | 1,09 | 0,98 | 1,40 | |
| P11908 | Ribose-phosphate pyrophosphokinase 2 | | 0,99 | 1,57 | 0,95 |
| O76021 | Ribosomal L1 domain-containing protein 1 | 0,93 | 1,07 | 0,74 | |
| Q92979 | Ribosomal RNA small subunit methyltransferase NEP1 | 0,95 | 1,20 | 1,03 | |
| Q8TDN6 | Ribosome biogenesis protein BRX1 homolog | 0,90 | | 0,75 | |
| Q9GZL7 | Ribosome biogenesis protein WDR12 | 0,82 | | 0,76 | |
| Q9Y3A5 | Ribosome maturation protein SBDS | 5,07 | | 8,01 | |
| Q9H7B2 | Ribosome production factor 2 homolog | | 0,96 | | 1,15 |

| | | | | | |
|--------|---|-------|------|------|-------|
| Q9P2E9 | Ribosome-binding protein 1 | 0,97 | | 0,81 | 0,98 |
| P38159 | RNA-binding motif protein, X chromosome | 0,94 | | 0,78 | |
| Q96PK6 | RNA-binding protein 14 | 1,41 | 1,28 | 1,09 | 1,46 |
| Q14498 | RNA-binding protein 39 | 0,89 | 0,92 | | |
| Q9BWF3 | RNA-binding protein 4 | 1,16 | 1,18 | | 1,36 |
| P35637 | RNA-binding protein FUS | 1,38 | | | 1,63 |
| Q5JTH9 | RRP12-like protein | 0,82 | | | 0,92 |
| Q9Y265 | RuvB-like 1 | 0,98 | 0,93 | | 0,86 |
| Q9Y230 | RuvB-like 2 | 0,84 | 0,92 | | 0,82 |
| P31153 | S-adenosylmethionine synthase isoform type-2 | 1,36 | 0,99 | | 1,56 |
| P16615 | Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 | 0,99 | | | 1,11 |
| Q14828 | Secretory carrier-associated membrane protein 3 | | 1,16 | | 0,85 |
| Q13228 | Selenium-binding protein 1 | | 1,11 | | |
| Q9NVA2 | Septin-11 | 0,93 | | | |
| Q15019 | Septin-2 | 1,00 | 1,03 | | 1,25 |
| Q16181 | Septin-7 | 1,21 | 0,99 | | 1,08 |
| Q9UHD8 | Septin-9 | 0,92 | | | 0,86 |
| Q13501 | Sequestosome-1 | | 1,04 | | |
| P34897 | Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial | 0,83 | 0,88 | | 0,72 |
| Q9UQ35 | Serine/arginine repetitive matrix protein 2 | 1,32 | 2,08 | | 1,33 |
| Q07955 | Serine/arginine-rich splicing factor 1 | 1,26 | 1,08 | | 1,24 |
| Q05519 | Serine/arginine-rich splicing factor 11 | | 1,25 | | 1,01 |
| Q01130 | Serine/arginine-rich splicing factor 2 | 1,35 | 1,15 | | 1,33 |
| P84103 | Serine/arginine-rich splicing factor 3 | | 1,18 | | 1,13 |
| Q13243 | Serine/arginine-rich splicing factor 5 | 1,02 | | | |
| Q13247 | Serine/arginine-rich splicing factor 6 | 1,10 | 1,02 | | 0,92 |
| Q16629 | Serine/arginine-rich splicing factor 7 | 1,18 | 1,25 | | 1,09 |
| P63151 | Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B alpha isoform | | 1,07 | | 1,16 |
| P30153 | Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform | 0,92 | 0,97 | | 1,02 |
| P67775 | Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform | | 0,90 | | 0,86 |
| P62714 | Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform | 1,03 | | | 0,96 |
| Q08209 | Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha isoform | 0,93 | | | 1,04 |
| P62136 | Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit | 1,05 | | | 1,01 |
| P62140 | Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit | 1,09 | | | 1,00 |
| Q9Y3F4 | Serine-threonine kinase receptor-associated protein | 1,01 | | | |
| P49591 | Serine-tRNA ligase, cytoplasmic | 1,15 | | | 1,11 |
| P36952 | Serpin B5 | 0,91 | | | 1,08 |
| P35237 | Serpin B6 | 1,75 | 1,42 | | 2,96 |
| P50452 | Serpin B8 | 1,96 | | | 1,20 |
| P50454 | Serpin H1 | 0,79 | 0,90 | | 0,69 |
| Q9BXP5 | Serrate RNA effector molecule homolog | | 1,28 | | 0,82 |
| P10768 | S-formylglutathione hydrolase | 1,33 | 1,04 | | |
| Q75368 | SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein | 14,28 | | | 1,15 |
| Q9H9B4 | Sideroflexin-1 | | 0,99 | | 18,89 |
| Q9BWM7 | Sideroflexin-3 | | 1,00 | | |
| P37108 | Signal recognition particle 14 kDa protein | 1,04 | 0,97 | | |
| P51692 | Signal transducer and activator of transcription 5B | | 1,07 | | 0,91 |
| P62304 | Small nuclear ribonucleoprotein E | 1,22 | 1,15 | | 1,00 |
| P62314 | Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1 | 1,36 | | | 1,27 |
| P62316 | Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2 | 1,28 | 1,21 | | 1,07 |
| P62318 | Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3 | 1,17 | 1,11 | | 1,19 |
| Q13126 | S-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase | | 1,01 | | |
| P05023 | Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 | 0,92 | 1,02 | | 0,99 |
| P05026 | Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1 | 0,77 | | | 0,88 |
| P11166 | Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1 | 0,86 | 0,97 | | 0,83 |
| Q00796 | Sorbitol dehydrogenase | 1,06 | 0,95 | | 0,77 |
| Q13596 | Sorting nexin-1 | | 1,10 | | 0,89 |
| Q60749 | Sorting nexin-2 | 0,80 | | | |
| Q13813 | Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1 | 0,95 | 0,96 | | |
| Q01082 | Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1 | 1,04 | 1,05 | | 0,80 |
| P19623 | Spermidine synthase | 1,94 | 1,19 | | 1,10 |
| P63208 | S-phase kinase-associated protein 1 | 1,02 | | | 1,01 |
| Q13838 | Spliceosome RNA helicase DDX39B | 1,61 | 1,24 | | 1,07 |
| Q15637 | Splicing factor 1 | 1,43 | 1,42 | | 1,19 |
| Q15459 | Splicing factor 3A subunit 1 | 0,85 | | | 1,35 |
| Q12874 | Splicing factor 3A subunit 3 | 1,42 | | | 0,90 |
| Q13435 | Splicing factor 3B subunit 2 | 1,33 | 1,44 | | 1,52 |
| Q15393 | Splicing factor 3B subunit 3 | 1,06 | 1,03 | | 0,96 |
| P26368 | Splicing factor U2AF 65 kDa subunit | 1,14 | 1,21 | | 1,16 |
| P23246 | Splicing factor, proline- and glutamine-rich | 1,21 | 1,25 | | 1,16 |
| Q9GZT3 | SRA stem-loop-interacting RNA-binding protein, mitochondrial | 0,85 | | | 0,90 |
| Q14247 | Src substrate contactin | 1,30 | 1,14 | | 0,90 |
| Q7KZF4 | Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1 | 1,12 | 1,05 | | 1,04 |
| P16949 | Stathmin | 1,17 | | | 1,04 |
| Q15738 | Sterol-4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase, decarboxylating | | 0,91 | | 1,61 |
| Q9UJZ1 | Stomatin-like protein 2 | | 1,01 | | |
| P38646 | Stress-70 protein, mitochondrial | 0,85 | 0,93 | | 0,75 |
| P31948 | Stress-induced-phosphoprotein 1 | 0,94 | 0,92 | | 0,93 |
| A6NHR9 | Structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain-containing protein 1 | | 0,97 | | 0,76 |
| O95347 | Structural maintenance of chromosomes protein 2 | 0,84 | | | 0,87 |
| Q9NTJ3 | Structural maintenance of chromosomes protein 4 | | 0,82 | | 0,89 |
| P31040 | Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial | 0,81 | 1,01 | | 0,91 |
| P21912 | Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial | 0,83 | | | 0,91 |
| P55809 | Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 1, mitochondrial | 0,98 | 0,87 | | 0,84 |
| Q9UBE0 | SUMO-activating enzyme subunit 1 | 0,97 | 0,87 | | 1,00 |
| P42285 | Superkiller viralicidal activity 2-like 2 | 0,92 | 1,08 | | 1,02 |
| P04179 | Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial | 0,73 | | | 0,68 |
| Q15260 | Surfeit locus protein 4 | | 1,08 | | |
| Q92922 | SWI/SNF complex subunit SMARCC1 | 1,10 | 1,32 | | |
| Q9NPQ8 | Synembryn-A | 1,27 | | | 1,45 |
| O00186 | Syntaxin-binding protein 3 | 0,93 | | | |
| O00560 | Syntenin-1 | | 1,72 | | |
| Q9Y490 | Talin-1 | 1,17 | 0,97 | | 1,68 |
| Q13148 | TAR DNA-binding protein 43 | 1,04 | | | 1,29 |
| P17987 | T-complex protein 1 subunit alpha | 0,96 | 0,98 | | 0,96 |
| P78371 | T-complex protein 1 subunit beta | 0,90 | 1,00 | | 1,01 |
| P50991 | T-complex protein 1 subunit delta | 1,29 | 0,94 | | 0,94 |
| P48643 | T-complex protein 1 subunit epsilon | 0,83 | 0,96 | | 1,38 |
| Q99832 | T-complex protein 1 subunit eta | 0,85 | 0,94 | | 0,92 |
| P49368 | T-complex protein 1 subunit gamma | 0,95 | 1,04 | | 1,02 |
| | | | | | 0,87 |
| | | | | | 1,11 |
| | | | | | 1,04 |

| | | | | | |
|--------|--|-------|------|--------|------|
| P50990 | T-complex protein 1 subunit theta | 0,94 | 0,98 | 0,93 | 0,96 |
| P40227 | T-complex protein 1 subunit zeta | 0,82 | 1,08 | 0,86 | 0,95 |
| P10599 | Thioredoxin | 13,36 | | 14,36 | |
| O95881 | Thioredoxin domain-containing protein 12 | 0,78 | | 0,74 | |
| Q9BRA2 | Thioredoxin domain-containing protein 17 | 8,54 | | 13,66 | |
| Q8NB59 | Thioredoxin domain-containing protein 5 | 0,80 | 0,95 | 0,74 | |
| Q16881 | Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic | 1,08 | 0,94 | 1,22 | 1,02 |
| P30048 | Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial | 0,81 | 0,93 | 0,77 | 0,84 |
| O43396 | Thioredoxin-like protein 1 | 1,16 | 1,05 | | |
| Q9Y320 | Thioredoxin-related transmembrane protein 2 | 0,93 | | 0,89 | |
| Q86V81 | THO complex subunit 4 | 1,00 | 1,03 | 1,10 | |
| P26639 | Threonine-tRNA ligase, cytoplasmic | 1,12 | 0,94 | 1,12 | 0,95 |
| P23919 | Thymidylate kinase | 1,29 | | | |
| P04818 | Thymidylate synthase | | 1,38 | | 1,32 |
| P63313 | Thymosin beta-10 | 4,07 | | 3,22 | |
| A8MW06 | Thymosin beta-4-like protein 3 | 14,32 | | 104,73 | |
| Q07157 | Tight junction protein ZO-1 | 1,33 | 1,32 | 1,42 | |
| Q9NZ01 | Trans-2,3-enoyl-CoA reductase | 1,22 | | 1,29 | |
| P37837 | Transaldolase | 0,89 | | | |
| P20290 | Transcription factor BTF3 | 0,90 | 1,05 | 1,05 | |
| Q13263 | Transcription intermediary factor 1-beta | 0,91 | 0,90 | | 0,96 |
| Q12788 | Transducin beta-like protein 3 | | 0,94 | | |
| P02786 | Transferrin receptor protein 1 | 0,84 | 1,12 | 0,75 | 1,14 |
| Q01995 | Transgelin | 10,50 | | 5,83 | |
| P37802 | Transgelin-2 | 6,26 | 2,31 | 11,04 | 2,68 |
| P55072 | Transitional endoplasmic reticulum ATPase | 0,85 | 0,94 | 0,83 | 0,89 |
| P29401 | Transketolase | 1,13 | 0,91 | 1,37 | 0,96 |
| Q92616 | Translational activator GCN1 | 1,00 | 0,98 | 0,79 | 0,92 |
| P43307 | Translocon-associated protein subunit alpha | 1,10 | | | |
| P49755 | Transmembrane emp24 domain-containing protein 10 | 0,97 | | 0,82 | |
| Q9P059 | Transmembrane protein 14C | 1,09 | 1,23 | 0,86 | |
| Q98TV4 | Transmembrane protein 43 | 0,91 | | 1,05 | |
| Q92973 | Transportin-1 | 1,00 | 0,99 | 1,02 | 1,06 |
| Q13428 | Treacle protein | 1,15 | | | |
| P40939 | Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial | 0,85 | 0,95 | 0,81 | 0,87 |
| P22102 | Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3 | 1,06 | 0,90 | 1,15 | 1,02 |
| P60174 | Triosephosphate isomerase | 1,55 | 1,18 | 1,95 | 1,22 |
| Q14773 | Tripeptidyl-peptidase 1 | | 1,01 | | |
| Q9UJA5 | tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase non-catalytic subunit TRM6 | | 0,95 | | 1,04 |
| Q08J23 | tRNA (cytosine(34)-C(5))-methyltransferase | 0,98 | 0,98 | 1,29 | 1,02 |
| Q9Y310 | tRNA-splicing ligase RtcB homolog | 1,09 | | | |
| Q9NYL9 | Tropomodulin-3 | 1,02 | 1,10 | 1,22 | 1,13 |
| P09493 | Tropomyosin alpha-1 chain | 0,96 | | 0,91 | 0,93 |
| P06753 | Tropomyosin alpha-3 chain | 0,96 | 0,98 | 0,92 | 0,94 |
| P67936 | Tropomyosin alpha-4 chain | 0,96 | 0,98 | 0,89 | 0,93 |
| P07951 | Tropomyosin beta chain | 0,95 | | 0,89 | 0,93 |
| P23381 | Tryptophan-tRNA ligase, cytoplasmic | 1,67 | 0,88 | 1,28 | 0,93 |
| Q71U36 | Tubulin alpha-1A chain | | 0,92 | 1,05 | |
| P68363 | Tubulin alpha-1B chain | 0,91 | 0,92 | 1,08 | 0,95 |
| Q9BQE3 | Tubulin alpha-1C chain | | 0,91 | | |
| P68366 | Tubulin alpha-4A chain | 0,89 | 0,92 | 1,03 | 0,94 |
| P07437 | Tubulin beta chain | 1,03 | 0,92 | 1,08 | 0,93 |
| Q13885 | Tubulin beta-2A chain | 1,04 | | 1,09 | |
| Q13509 | Tubulin beta-3 chain | 1,06 | 0,91 | 1,11 | 0,94 |
| P04350 | Tubulin beta-4A chain | 1,07 | | | |
| P68371 | Tubulin beta-4B chain | 1,03 | 0,92 | 1,08 | 0,93 |
| Q9BUF5 | Tubulin beta-6 chain | 1,12 | 0,92 | 1,13 | 0,90 |
| P23258 | Tubulin gamma-1 chain | | 0,92 | | |
| O75347 | Tubulin-specific chaperone A | | 2,52 | | |
| Q98TW9 | Tubulin-specific chaperone D | | 0,85 | | |
| Q15813 | Tubulin-specific chaperone E | 1,08 | | | |
| Q14166 | Tubulin-tyrosine ligase-like protein 12 | 1,01 | 0,99 | 1,15 | 1,02 |
| Q03169 | Tumor necrosis factor alpha-induced protein 2 | | 1,07 | | |
| P55327 | Tumor protein D52 | 0,96 | | 0,96 | |
| O43399 | Tumor protein D54 | 1,06 | | 1,21 | 0,97 |
| Q12792 | Twinfilin-1 | 1,09 | 0,84 | 0,91 | |
| Q6IB50 | Twinfilin-2 | 0,78 | | | |
| P54577 | Tyrosine-tRNA ligase, cytoplasmic | 1,18 | 1,02 | 1,40 | 0,92 |
| P09661 | U2 small nuclear ribonucleoprotein A' | 1,12 | 1,22 | 1,03 | 1,19 |
| O15042 | U2 snRNP-associated SURP motif-containing protein | | 1,45 | | |
| O75643 | U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase | 0,85 | 0,92 | 0,90 | 0,94 |
| Q9UMX0 | Ubiquitin-1 | 1,07 | 0,96 | 0,95 | 0,99 |
| Q9UHD9 | Ubiquitin-2 | 0,97 | 0,93 | | |
| Q9NRR5 | Ubiquitin-4 | | 1,01 | | |
| Q14694 | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 10 | 1,12 | | 1,20 | |
| P54578 | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14 | 1,34 | 0,95 | 1,53 | 1,16 |
| P45974 | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5 | 0,98 | 0,94 | 0,94 | 0,95 |
| Q93009 | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7 | 0,89 | | | 1,18 |
| Q96FW1 | Ubiquitin thioesterase OTUB1 | 1,47 | | 2,10 | |
| Q5T6F2 | Ubiquitin-associated protein 2 | | 1,46 | 2,54 | |
| Q14157 | Ubiquitin-associated protein 2-like | 1,57 | 1,67 | 1,28 | |
| P61086 | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 K | 5,66 | | | |
| P61088 | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N | 5,14 | | 7,80 | |
| Q13404 | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1 | | 2,07 | | |
| Q15819 | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2 | 1,21 | 2,09 | | 2,23 |
| P22314 | Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1 | 0,96 | 0,93 | 1,08 | 0,95 |
| O60701 | UDP-glucose 6-dehydrogenase | 0,87 | 1,01 | 1,02 | 1,06 |
| Q16222 | UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase | | 1,11 | | |
| P30085 | UMP-CMP kinase | 4,64 | 1,86 | 7,36 | 2,22 |
| O00159 | Unconventional myosin-1c | 0,78 | | 0,77 | 0,92 |
| Q9HB07 | UPF0160 protein MGY1, mitochondrial | | 1,05 | | |
| Q9Y224 | UPF0568 protein C14orf166 | 1,02 | 1,04 | | 1,12 |
| P11172 | Uridine 5'-monophosphate synthase | 0,96 | | | |
| Q16851 | UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase | 3,78 | | | |
| P54727 | UV excision repair protein RAD23 homolog B | 1,17 | | 1,35 | |
| Q9UBQ0 | Vacuolar protein sorting-associated protein 29 | | 1,09 | | |
| Q96QK1 | Vacuolar protein sorting-associated protein 35 | 1,04 | 1,00 | 0,97 | |
| P26640 | Valine-tRNA ligase | 1,12 | 0,92 | 1,26 | 0,90 |
| P50552 | Vasodilator-stimulated phosphoprotein | | 1,30 | | |
| P49748 | Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial | 0,98 | 0,89 | 1,04 | 0,87 |

| | | | |
|--------|--|------|------|
| Q9P0L0 | Vesicle-associated membrane protein-associated protein A | 0,84 | |
| O95292 | Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C | 0,91 | |
| O75396 | Vesicle-trafficking protein SEC22b | 1,15 | 1,12 |
| Q12907 | Vesicular integral-membrane protein VIP36 | 1,14 | 1,06 |
| Q00341 | Vigilin | | 1,07 |
| P08670 | Vimentin | 0,94 | 0,95 |
| P18206 | Vinculin | 1,11 | 0,95 |
| P21796 | Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 | 0,91 | |
| P45880 | Voltage-dependent anion-selective channel protein 2 | 1,07 | |
| Q9Y277 | Voltage-dependent anion-selective channel protein 3 | 0,96 | |
| P38606 | V-type proton ATPase catalytic subunit A | 1,20 | 1,03 |
| O43516 | WAS/WASL-interacting protein family member 1 | | 1,17 |
| O75083 | WD repeat-containing protein 1 | 1,50 | |
| Q8NI36 | WD repeat-containing protein 36 | 1,05 | |
| P13010 | X-ray repair cross-complementing protein 5 | 0,86 | 0,99 |
| P12956 | X-ray repair cross-complementing protein 6 | 0,88 | 0,93 |
| Q96KR1 | Zinc finger RNA-binding protein | 1,31 | 1,40 |
| Q9BQ52 | Zinc phosphodiesterase ELAC protein 2 | | 0,98 |
| Q15942 | Zyxin | 1,40 | 1,97 |

| | | | |
|--|--|------|------|
| | | | |
| | | | |
| | | 1,06 | |
| | | | 1,05 |
| | | | 1,00 |
| | | 0,79 | 1,02 |
| | | 1,13 | 0,96 |
| | | 0,76 | |
| | | 0,88 | |
| | | 0,76 | |
| | | 1,36 | 1,13 |
| | | | |
| | | 1,84 | |
| | | 0,89 | |
| | | 0,82 | 1,02 |
| | | 0,84 | 0,96 |
| | | 0,99 | 1,44 |
| | | | 1,02 |
| | | 1,34 | 2,08 |

Annexe 2. Liste des protéines dégradées en réponse à la LLO. Liste extraite de l'Annexe 1 détaillant les 92 protéines identifiées comme dégradées en réponse à la LLO. Pour chaque expérience, les protéines dont la quantité en présence de LLO varie de façon significative par rapport à la condition contrôle sont indiquées en vert (rapport CTRL/LLO>seuil significatif fixé pour chaque expérience).

| accession | protein name | (ctr/LLO) exp 1 | (ctr/LLO) exp 2 |
|-----------|--|-----------------|-----------------|
| Q9NRX4 | 14 kDa phosphohistidine phosphatase | 18,86 | |
| Q13442 | 28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein | 6,16 | |
| P07741 | Adenine phosphoribosyltransferase | 2,40 | 1,49 |
| P00568 | Adenylate kinase isoenzyme 1 | 6,43 | 1,95 |
| P84077 | ADP-ribosylation factor 1 | 0,84 | 2,43 |
| P18085 | ADP-ribosylation factor 4 | 6,48 | 2,32 |
| Q04828 | Aldo-keto reductase family 1 member C1 | 2,80 | 1,67 |
| P52895 | Aldo-keto reductase family 1 member C2 | 2,68 | 1,67 |
| P42330 | Aldo-keto reductase family 1 member C3 | 2,95 | 1,66 |
| P15121 | Aldose reductase | 2,47 | |
| P37840 | Alpha-synuclein | 1,90 | |
| O43681 | ATPase ASNA1 | 4,20 | 0,90 |
| O95817 | BAG family molecular chaperone regulator 3 | | 1,47 |
| P53004 | Biliverdin reductase A | | 1,57 |
| Q9H3K6 | BolA-like protein 2 | | 4,41 |
| P16152 | Carbonyl reductase [NADPH] 1 | 3,81 | 1,85 |
| O00299 | Chloride intracellular channel protein 1 | 3,26 | |
| Q9Y696 | Chloride intracellular channel protein 4 | 2,94 | |
| P33240 | Cleavage stimulation factor subunit 2 | 1,33 | 1,70 |
| P23528 | Cofilin-1 | 2,16 | |
| P42771 | Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, isoforms 1/2/3 | 2,73 | 2,16 |
| P04080 | Cystatin-B | 20,72 | |
| P30046 | D-dopachrome decarboxylase | 2,95 | |
| Q14126 | Desmoglein-2 | 7,79 | |
| P60981 | Dextrin | 2,63 | |
| P51452 | Dual specificity protein phosphatase 3 | | 2,55 |
| Q13561 | Dynactin subunit 2 | | 1,67 |
| Q04637 | Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1 | 1,15 | 1,50 |
| Q15056 | Eukaryotic translation initiation factor 4H | 3,27 | 1,71 |
| P63241 | Eukaryotic translation initiation factor 5A-1 | 6,04 | 2,24 |
| Q16658 | Fascin | 1,99 | 1,23 |
| Q01469 | Fatty acid-binding protein, epidermal | 13,44 | 3,36 |
| P39748 | Flap endonuclease 1 | 2,04 | 1,32 |
| P30043 | Flavin reductase (NADPH) | | 2,10 |
| P09382 | Galectin-1 | 2,64 | |
| P62826 | GTP-binding nuclear protein Ran | 3,76 | |
| Q16774 | Guanylate kinase | | 1,39 |
| P09429 | High mobility group protein B1 | 1,96 | 1,38 |
| P49773 | Histidine triad nucleotide-binding protein 1 | 3,06 | 1,65 |
| P13645 | Keratin, type I cytoskeletal 10 | 5,01 | |
| O95232 | Luc7-like protein 3 | | 1,46 |
| P14174 | Macrophage migration inhibitory factor | | 2,29 |
| P15559 | NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1 | 1,77 | 1,44 |
| Q15233 | Non-POU domain-containing octamer-binding protein | 1,25 | 1,45 |
| P12270 | Nucleoprotein TPR | 1,22 | 1,54 |
| P62937 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A | 11,32 | 2,97 |
| P62942 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A | | 5,21 |
| Q13526 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1 | 7,49 | |
| Q06830 | Peroxiredoxin-1 | 1,92 | 1,28 |

| (ctr/LLO) MG132 exp 1 | (ctr/LLO) MG132 exp 2 |
|-----------------------|-----------------------|
| | |
| 5,02 | |
| 3,20 | 1,71 |
| 10,21 | 2,64 |
| 11,45 | 2,50 |
| 10,60 | 2,52 |
| 4,46 | 2,02 |
| 4,72 | 2,03 |
| 4,51 | 1,99 |
| 2,93 | |
| | |
| 12,12 | 0,95 |
| 1,26 | 1,39 |
| | |
| | 4,65 |
| 6,21 | 2,14 |
| 5,13 | 1,77 |
| | |
| 1,24 | 1,48 |
| 3,65 | |
| 4,05 | 2,18 |
| 36,01 | |
| | |
| | 1,41 |
| 10,25 | |
| | |
| | 0,98 |
| 1,25 | |
| 5,83 | 1,88 |
| 8,90 | 2,40 |
| 2,53 | 1,22 |
| 13,94 | |
| | |
| 5,92 | |
| 4,82 | |
| | |
| 2,94 | |
| 6,19 | 1,85 |
| 1,30 | |
| | 1,44 |
| | |
| 2,90 | 1,41 |
| 1,12 | 1,34 |
| 1,10 | 1,56 |
| 14,30 | 3,49 |
| | |
| 8,67 | |
| 2,38 | 1,47 |

| | | | |
|--------|--|-------|------|
| P32119 | Peroxiredoxin-2 | 2,20 | 1,26 |
| P30086 | Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 | 30,17 | |
| P00558 | Phosphoglycerate kinase 1 | 2,39 | |
| Q15365 | Poly(rC)-binding protein 1 | 1,54 | 1,42 |
| Q15366 | Poly(rC)-binding protein 2 | 1,52 | 1,40 |
| Q9UHX1 | Poly(U)-binding-splicing factor PUF60 | 1,07 | 1,47 |
| P0CG47 | Polyubiquitin-B | 2,47 | |
| P07737 | Profilin-1 | 2,66 | |
| O14737 | Programmed cell death protein 5 | | 1,69 |
| Q99497 | Protein DJ-1 | 1,91 | 1,52 |
| Q96C90 | Protein phosphatase 1 regulatory subunit 14B | | 2,02 |
| O15027 | Protein transport protein Sec16A | 3,67 | |
| P21980 | Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2 | | 1,51 |
| Q14671 | Pumilio homolog 1 | | 1,54 |
| Q96T37 | Putative RNA-binding protein 15 | 4,14 | |
| P98179 | Putative RNA-binding protein 3 | 2,03 | 1,60 |
| Q9Y3A5 | Ribosome maturation protein SBDS | 5,07 | |
| Q9UQ35 | Serine/arginine repetitive matrix protein 2 | 1,32 | 2,08 |
| P35237 | Serpin B6 | 1,75 | 1,42 |
| P50452 | Serpin B8 | 1,96 | |
| O75368 | SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein | 14,28 | |
| P19623 | Spermidine synthase | 1,94 | 1,19 |
| Q15637 | Splicing factor 1 | 1,43 | 1,42 |
| Q13435 | Splicing factor 3B subunit 2 | 1,33 | 1,44 |
| O00560 | Syntenin-1 | | 1,72 |
| P10599 | Thioredoxin | 13,36 | |
| Q9BRA2 | Thioredoxin domain-containing protein 17 | 8,54 | |
| P63313 | Thymosin beta-10 | 4,07 | |
| A8MW06 | Thymosin beta-4-like protein 3 | 14,32 | |
| Q01995 | Transgelin | 10,50 | |
| P37802 | Transgelin-2 | 6,26 | 2,31 |
| O75347 | Tubulin-specific chaperone A | | 2,52 |
| O15042 | U2 snRNP-associated SURP motif-containing protein | | 1,45 |
| Q5T6F2 | Ubiquitin-associated protein 2 | | 1,46 |
| Q14157 | Ubiquitin-associated protein 2-like | 1,57 | 1,67 |
| P61086 | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 K | 5,66 | |
| P61088 | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N | 5,14 | |
| Q13404 | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1 | | 2,07 |
| Q15819 | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2 | 1,21 | 2,09 |
| P30085 | UMP-CMP kinase | 4,64 | 1,86 |
| Q16851 | UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase | 3,78 | |
| Q96KR1 | Zinc finger RNA-binding protein | 1,31 | 1,40 |
| Q15942 | Zyxin | 1,40 | 1,97 |

| | | |
|--|--------|------|
| | 2,72 | 1,43 |
| | | |
| | 4,35 | 1,57 |
| | 1,77 | 1,41 |
| | 1,57 | |
| | 1,11 | 1,11 |
| | 1,62 | |
| | 5,55 | 1,24 |
| | 6,76 | |
| | 2,60 | 1,60 |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | 1,75 |
| | 8,01 | |
| | 1,33 | 3,25 |
| | | 1,20 |
| | | |
| | 18,89 | |
| | 1,94 | 1,33 |
| | | 1,35 |
| | 1,16 | 1,41 |
| | | 1,68 |
| | 14,36 | |
| | 13,66 | |
| | 3,22 | |
| | 104,73 | |
| | 5,83 | |
| | 11,04 | 2,68 |
| | | |
| | | |
| | 2,54 | |
| | 1,28 | |
| | | |
| | 7,80 | |
| | | |
| | | 2,23 |
| | 7,36 | 2,22 |
| | | |
| | 0,99 | 1,44 |
| | 1,34 | 2,08 |

Résumé

Listeria monocytogenes est une bactérie pathogène responsable de la listériose chez l'homme. Cette bactérie est capable d'envahir et de se répliquer dans des cellules phagocytaires et non-phagocytaires de l'hôte. De fait, *Listeria* interagit et interfère avec de nombreux composants cellulaires au cours de sa réplication. Mon projet de thèse s'est focalisé sur les altérations du protéome des cellules infectées par *Listeria*. Je me suis en particulier intéressé à l'activation de protéases de l'hôte et aux dégradations de certains facteurs cellulaires en réponse à l'infection.

Une analyse protéomique de cellules humaines traitées avec la Listeriolysine O (LLO), une toxine sécrétée par *Listeria* formant des pores dans les membranes cellulaires, nous a permis d'identifier plusieurs dizaines de facteurs cellulaires dégradés en réponse à l'exposition à cette toxine. Nous avons pu confirmer la dégradation de ces protéines dans le contexte d'une infection par *Listeria in vitro* (dans un modèle de cellules en culture) et *in vivo* (dans un modèle animal). Nous anticipons que la dégradation de ces protéines, impliquées dans différentes fonctions cellulaires, joue un rôle au cours de l'infection par *Listeria* en modifiant la physiologie des cellules hôte.

Nous avons en parallèle mis en évidence que *Listeria* interfère avec le fonctionnement des lysosomes. Nous avons montré que la LLO déstabilise les lysosomes des cellules hôtes et induit leur perméabilisation. Ceci permet la libération de certaines protéases lysosomales, telles que les cathepsines, dans le cytosol des cellules hôte. Ces cathepsines, une fois libérées, pourraient alors cliver différentes protéines cytosoliques et ainsi modifier la physiologie des cellules infectées.

L'ensemble de mes travaux a permis de montrer que *Listeria* interfère avec le fonctionnement de nombreuses protéases de l'hôte et induit la dégradation de plusieurs facteurs cellulaires. Ces cibles dégradées constituent une nouvelle classe de protéines dont nous pouvons maintenant tester le rôle potentiel dans l'infection. Mes travaux ont d'autre part permis de montrer que d'autres toxines bactériennes, similaires à la LLO, induisent également des altérations du protéome des cellules hôtes. Ceci suggère que les mécanismes identifiés avec *Listeria* sont conservés entre différentes classes de pathogènes bactériens.

Summary

Listeria monocytogenes is a foodborne pathogen responsible for human listeriosis. At the cell level, *Listeria* has the ability to invade and replicate in both phagocytic and non-phagocytic cells. *Listeria* intracellular life cycle involves interference with various host cell components. My PhD project aims to characterize host cell proteome modifications in cells infected by *Listeria*. I have in particular focused my research on the activation of host proteases and the degradation of host cell proteins in response to infection.

A proteomic analysis performed on cells treated with purified Listeriolysin O (LLO), a pore forming toxin secreted by *Listeria*, identified more than 90 proteins degraded in response to the toxin. We have validated the degradation of these proteins using both *in vitro* and *in vivo* models of *Listeria* infection. We anticipate that the degradation of these proteins, involved in different host pathways, can significantly impact the infection process through the modification of host cell physiology.

In parallel, we identified that *Listeria* impairs lysosomal functions during infection. We demonstrate that extracellular *Listeria*, via the secretion of LLO, alter lysosomal integrity in epithelial cells. LLO induces lysosomal membrane permeabilization and the release of lysosomal content, such as cathepsins proteases, in the host cytosol. The release of such proteases, which remain transiently active, may alter cellular physiology by degrading different cytosolic factors.

Altogether, my results highlight how *Listeria* reshapes the host proteome by altering the activation or localization of host proteases and by inducing protein degradations. My data furthermore establish that other bacterial pore-forming toxins, such as Perfringolysin O and Pneumolysin, also induce proteome modifications, thus unveiling that these mechanisms are shared among different class of bacterial pathogens.