



HAL
open science

Effets des toxines de *Bacillus anthracis* sur le cytosquelette des cellules immunitaires : implication sur la phagocytose et les fonctions immunitaires

Yannick Trescos

► **To cite this version:**

Yannick Trescos. Effets des toxines de *Bacillus anthracis* sur le cytosquelette des cellules immunitaires : implication sur la phagocytose et les fonctions immunitaires. Immunologie. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. NNT : 2015GREAV026 . tel-01413595

HAL Id: tel-01413595

<https://theses.hal.science/tel-01413595>

Submitted on 10 Dec 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Virologie, Microbiologie et Immunologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Yannick TRECOS

Thèse dirigée par le **Pr. Jean-Nicolas TOURNIER**

préparée au sein de l'**Institut de Recherche Biomédicale des Armées –
Unité Interaction Hôte – Agents pathogènes**
dans l'**École Doctorale Chimie Science du Vivant**

**Effets des toxines de *Bacillus anthracis* sur le
cytosquelette des cellules immunitaires : implication sur
la phagocytose et les fonctions immunitaires.**

Thèse soutenue publiquement le **9 décembre 2015**,
devant le jury composé de :

M. Christian DROUET

Professeur à l'université Joseph Fourier, Grenoble (Président)

M. Daniel LADANT

Directeur de recherche à l'Institut Pasteur de Paris (Rapporteur)

M. Michel-Robert POPOFF

Directeur de recherche à l'Institut Pasteur de Paris (Rapporteur)

M. Pierre GOOSSENS

Directeur de recherche à l'Institut Pasteur de Paris (Examineur)

M. Manuel THERY

Directeur de recherche à l'Hôpital Saint Louis de Paris (Examineur)

M. Jean-Nicolas TOURNIER

Professeur de l'École du Val de Grâce de Paris (Directeur de thèse)



REMERCIEMENTS

Aux membres de ce jury qui ont accepté de mettre leurs connaissances au profit de l'évaluation de mes travaux de thèse. Que chacun trouve ici l'expression de mes remerciements les plus sincères.

Messieurs les Docteurs Daniel Ladant et Michel-Robert Popoff, pour l'honneur qu'ils me font d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur,

Monsieur le Professeur Christian Drouet pour l'honneur qu'il m'a fait d'être dans mon comité de suivi de thèse et dans ce jury. Je le remercie sincèrement pour ses conseils, son soutien et ses encouragements au cours de ces années. Son optimisme lors des comités de suivi et sa disponibilité pour m'accueillir dans son laboratoire si je devais rester sur Grenoble m'ont beaucoup touché.

Monsieur le Docteur Manuel Théry, pour avoir accepté d'être membre de mon comité de suivi de thèse et de ce jury. Je le remercie tout particulièrement pour avoir toujours été intéressé et enthousiasmé par mes travaux de recherche, pour ses conseils précieux lors des comités de suivi et ses prédictions et hypothèses, qui ont permis d'aboutir à ce travail.

Monsieur le Docteur Pierre Goossens, pour avoir accueilli notre unité au sein de l'Institut Pasteur à la fermeture du CRSSA, pour m'avoir permis de poursuivre mes travaux de thèse dans cette phase de restructuration et me faire l'honneur de juger ce travail.

Monsieur le Professeur Jean-Nicolas Tournier, bien plus qu'un simple directeur de thèse. Je le remercie amicalement de m'avoir toujours fait confiance, de m'avoir soutenu dans les moments difficiles et de m'avoir appris tant de chose sur le plan scientifique. J'aimerais qu'il trouve en ces quelques mots toute ma gratitude pour son aide inestimable, sa disponibilité sans faille (même le soir et le week-end !), son investissement dans mon travail de thèse et pour avoir su me communiquer sa passion pour la Science. Que ce manuscrit soit le début d'une très grande aventure ensemble dans une unité totalement reconstruite et opérationnelle pour les nombreux projets de recherche en cours et à venir.

A toutes personnes qui m'ont soutenu et aidé, de près ou de loin dans la réalisation de ce travail. Que chacun trouve ici le témoignage de ma reconnaissance.

Emilie, mon ingénieur sans faille pour son investissement complet dans la galère des expériences longues, pour son aide technique, pour la relecture de ce manuscrit et pour sa bonne humeur en tout temps. Sans elle, ce travail de thèse ne serait ce qu'il est aujourd'hui. Que cet investissement nous permette d'envisager de très bonnes choses pour la suite. Et comme elle dirait, « scout toujours » !

Clémence, ma coloc de bureau pour son aide, ses conseils, son soutien moral et logistique sur l'Institut Pasteur, sa joie de vivre et sa bonne humeur au quotidien. Un grand merci pour son aide et pour la relecture du manuscrit. Et je m'impatiente déjà de son retour à plein temps sur l'IRBA dans le groupe !

Bélanda et Clarisse, les petites dernières du groupe pour leur implication dès leur arrivée dans l'unité et la relecture du manuscrit. Merci de votre patience lors de l'écriture de ce manuscrit,

Daniel, de retour parmi nous à Brétigny, pour sa gentillesse, ses conseils, son soutien et son aide précieuse au CRSSA. Sans oublier, Arnaud, Alexandre et Marie, pour leur aide et leur bonne humeur,

Jacques Mathieu, notre ancien chef de département pour son soutien et son aide durant ces années de thèse,

L'unité de bactériologie, nos voisins de couloir ponctuels : Eric Valade, pour son soutien et son aide, Fabienne pour son humour sans faille, son expérience et son soutien dans les moments de stress, sans oublié les autres membres de l'unité,

Florent, pour son amitié, son aide et son travail indispensable dans les expériences de cytométrie en flux,

Jean-Charles, pour m'avoir permis de continuer les expériences dans le biomodule lors de notre déménagement sur Brétigny sur Orge,

Jean-François, mon mentor en cytométrie à Grenoble, qui a su m'inculquer la démarche expérimentale indispensable en cytométrie. Merci pour son aide dans l'analyse des données à Grenoble,

Nicole, pour m'avoir permis d'accéder à la plateforme d'imagerie en flux à l'institut Jacques Monod et pour ses conseils, ses analyses de compensation et sa disponibilité,

Audrey et Julie, les virologistes qui, comme elles le diraient, m'ont adopté sur Grenoble, pour leur bonne humeur, leur soutien et leurs conseils,

David et Isa, pour leur amitié de tous les jours et les super moments passés sur Grenoble en votre compagnie. Vivement votre arrivée en Ile de France,

A mes amis du Service de Santé des Armées, Isabelle, Medhi, Marie-Lucie, Aurore, Adeline, Maëlle, Olivier et j'en oublie certainement pour leur amitié et leur soutien de près ou de loin,

A ma famille, mes parents Alain et Catherine, mes frères Pascal et Florent, mes nièces et belles-sœurs pour leur soutien, leur conseil et leur présence au quotidien à mes côtés, qui m'ont permis d'aller toujours plus loin dans les études et dans les choix que j'ai pris,

Et toutes les autres personnes que j'aurai oubliées dans la dernière ligne droite de la thèse, qui ont de près ou de loin contribué à la réussite de ces travaux,

Enfin et le plus important pour moi, mes derniers remerciements vont à mon épouse Annaïg pour son amour, son soutien inconditionnel durant ces années de formation entre Grenoble et Brétigny. Sans ta patience, ta confiance, tes encouragements et ton dévouement quotidien malgré nos métiers respectifs prenant, ce travail n'aurait été possible. Merci d'avoir accepté et encouragé mes choix et d'avoir fait en sorte qu'ils soient réalisables.

Ainsi, je dédie cette thèse aux 3 femmes de ma vie, mes 2 filles Elouane et Maëlane, et mon épouse Annaïg, qui m'entourent et qui me comblent de bonheur au quotidien.

RESUME

Bacillus anthracis, agent de la maladie du charbon, est aussi un agent majeur de la menace biologique. Sa virulence est liée à deux principaux facteurs : une capsule et deux toxines, la toxine oedémateuse (ET = EF + PA) et la toxine létale (LT = LF + PA). EF est une adénylate cyclase, calcium et calmoduline dépendante, produisant une élévation de la concentration en AMPc intracellulaire tandis que LF est une métalloprotéase à zinc clivant la majorité des Mitogen Activated Protein Kinase Kinases. Les toxines jouent un rôle central dans la pathogénie de la maladie du charbon et dans la dérégulation des fonctions des cellules du système immunitaire. Le cytosquelette d'actine participe activement aux fonctions de phagocytose et de migration des macrophages et des cellules dendritiques.

Cependant, peu d'études analysent l'implication du cytosquelette d'actine des cellules immunitaires dans la physiopathologie des toxines. ET induit une rétraction temps-dépendant des cellules dendritiques et des macrophages normalisés sur des *micropatterns* de fibronectine, s'accompagnant d'une dépolymérisation de l'actine et d'une perte des points d'ancrage des cellules dendritiques. Précocement, ET active la cofiline par l'activation de la voie de signalisation AMPc – PKA – Protéines phosphatases. Malgré ces altérations du cytosquelette d'actine, ET n'induit pas de modification des capacités phagocytaires des cellules dendritiques, à l'exception d'une dérégulation de la maturation des phagosomes. ET conduit également à une augmentation de la migration des cellules dendritiques *in vitro* par activation et expression de CCR7 et CXCR4 à la surface des cellules dendritiques.

A l'inverse, LT conduit à un étalement temps-dépendant des cellules dendritiques normalisées, accompagné d'une dérégulation de la dynamique de l'actine provoquant des regroupements anormaux d'actine filament. LT active les myosines phosphatases via la voie RhoA-ROCK pour déphosphoryler les myosines II. A la différence de ET, LT inhibe les capacités phagocytaires des cellules dendritiques mais ne conduit pas à une modification de la migration des cellules dendritiques *in vitro*.

ABSTRACT

Bacillus anthracis, the agent of anthrax, is also a major agent of biological warfare threat. Its virulence is caused by two main factors : the capsule and two toxins, edema toxin (ET = PA + EF) and lethal toxin (LT = LF + PA). EF is a calcium and calmodulin-dependent adenylate cyclase, producing a rise in intracellular cAMP concentration, while LF is a zinc metalloprotease cleaving the majority of Mitogen Activated Protein Kinase Kinases. The toxins play a central role in the pathogenesis of the disease and the deregulation of the functions of immune cells. The actin cytoskeleton is actively participating in the phagocytosis and the migration of macrophages and dendritic cells.

However, few studies analyze the involvement of the actin cytoskeleton of immune cells in the pathogenesis of toxins. ET induces a time-dependent retraction of dendritic cells and macrophages on fibronectin *micropatterns*, accompanied by actin depolymerization and a loss of the anchor points of dendritic cells. ET early activates cofilin by activating the cAMP - PKA - Protein phosphatases signaling pathway. Despite these alterations of the actin cytoskeleton, ET does not induce any change in the phagocytic capacity of dendritic cells, except for a deregulation of the phagosomes maturation. ET also leads to an increase in the migration of dendritic cells *in vitro* by activation and expression of CCR7 and CXCR4 on the surface of dendritic cells.

In contrast, LT results in a time-dependent spreading of micropatterned dendritic cells, accompanied by a dysregulation of actin dynamics causing abnormal combinations of actin filament. LT activates myosin phosphatase via the RhoA-ROCK pathway to dephosphorylate myosin II. Unlike ET, LT inhibits the dendritic cells phagocytosis but does not lead to a change in dendritic cells migration *in vitro*.

MOTS-CLES

Bacillus anthracis

Toxine létale

Toxine oedémateuse

Cytosquelette

Cellules immunitaires

KEYWORDS

Anthrax

Bacillus anthracis

Lethal toxin

Edema toxin

Cytoskeleton

Immune cells

LISTE DES ABREVIATIONS

ABP	<i>Actin Binding Proteins</i> (protéines de liaison à l'actine)
Actine F	actine filament
Actine G	actine glomérulaire
ADF	facteurs de dépolymérisation de l'actine
ADP	Adénosine DiPhosphate
AMPc	Adénosine Monophosphate cyclique
ANTXR1	<i>Anthrax Receptor 1</i>
ANTXR2	<i>Anthrax Receptor 2</i>
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
AR	<i>Aspect Ratio</i>
Arp2/3	<i>Actin-Related Proteins 2/3</i>
ATP	Adénosine TriPhosphate
BMDCs	<i>Bone-Marrow Dendritic Cell</i> (cellules dendritiques issues de moelle osseuse)
BMDMs	<i>Bone-Marrow Derived Macrophages</i> (macrophages dérivés de moelle osseuse)
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CB	<i>Cytoskeleton Buffer</i>
Cdc42	<i>Cell Division Control protein 42 homolog</i>
CIN	Chronophine
CMG-2	<i>Capillary Morphogenesis Protein 2</i>
CMPC	Cytidine MonoPhosphate cyclique
CCR7	<i>C-C chemokine Receptor type 7</i>
CR3	<i>Complement Receptor 3</i>
CREB	<i>cAMP Response Element Binding protein</i>
CTRL	Contrôle
CXCL8	C-X-C motif Ligand 8
CXCR4	<i>C-X-C motif Receptor 4</i>
DNase I	Déoxyribonucléase I
DRM	<i>Detergent Resistant Membrane</i>
ECL	<i>Enhanced chemiluminescent</i>
ECM	Matrice extra-cellulaire
EF	<i>Edema Factor</i> (facteur oedémateux)
ELC	<i>Essential Light Chain</i>

Epac	<i>Exchange protein activated by cAMP</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
ERM	<i>Ezrin Radixin Moesin</i>
ET	<i>Edema Toxin (toxine oedémateuse)</i>
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
FcR	<i>Fc Receptor</i>
FSC	<i>Forward-Scattered</i>
GAP	<i>GTPase activating proteins</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage-colony Stimulating Factor</i>
GSK	<i>Glycogen Synthase kinase</i>
GDI	<i>Guanosine nucleotide Dissociation Inhibitors</i>
GDP	Guanosine DiPhosphate
GEF	<i>Guanine nucleotide Exchange Factor</i>
GTP	Guanosine TriPhosphate
ICAM	<i>InterCellular Adhesion Molecule</i>
IFN-γ	Interferon γ
JNK	<i>c-Jun N-terminal</i>
IMPc	Inosine MonoPhosphate cyclique
LF	<i>Lethal Factor (facteur létal)</i>
LIMK	<i>LIM domaine Kinase</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LRP6	<i>Low-density lipoprotein Receptor-related protein 6</i>
LT	<i>Lethal Toxin (toxine létale)</i>
LTA	Acide lipotéichoïque
MAP	<i>Microtubule-Associated Protein</i>
MAPKs	<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
MAPKKs	<i>Mitogen Activated Protein Kinase Kinases</i>
MCC	Milieu de culture complet
MEKs	<i>Mitogen Activated Protein Kinase Kinases</i>
MFI	Médiane d'intensité de fluorescence
MHC	<i>Myosin Heavy Chain</i>
MLC	<i>Myosin Light Chain</i>
MLCK	<i>Myosin Light Chain Kinase</i>
MLCP	<i>Myosin Light Chain Phosphatase</i>

MIP	<i>Macrophage Inflammatory Protein</i>
MVB	<i>Multivesicular Bodies</i> (corps multivésiculaires)
MYPT1	<i>Myosin Phosphatase target subunit 1</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NLRP1	<i>NACHT, LRR and PYD domain-containing protein 1</i>
NOD	<i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain</i>
PA	<i>Protective Antigen</i> (antigène protecteur)
PAK	<i>p21 protein-activated kinase 1</i>
PBMCs	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PDE	Phosphodiesterase
PDMS	Polydiméthylsiloxane
PEG	Poly-éthylène glycol
PFA	<i>Para-formaldéhyde</i>
Pi	Phosphate inorganique
PI3K	Phosphoinositide-3-kinase
PKA	<i>Protein Kinase A</i>
PMNs	<i>Polymorphonuclear leukocytes</i>
PP1	<i>Protein Phosphatase 1</i>
PP2A	<i>Protein Phosphatase 2A</i>
PSG	Pénicilline Streptomycine Glutamine
PTEN	<i>Phosphatase and TENsin homolog</i>
PVDF	<i>Fluorure de polyvinylidène</i>
Rab11	<i>Ras-related protein 11</i>
Rac	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
Rap1	<i>Ras-proximate-2</i>
Rap2	<i>Ras-proximate-1</i>
RhoA	<i>Ras Homolog gene family member A</i>
ROCK	<i>Rho-associated, Coiled-coil containing protein Kinase</i>
SDF-1	<i>Stromal cell-derived Factor 1</i> (CXCL12)
SDS	<i>Laurylsulfate de sodium</i>
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
SSH	<i>Slingshot</i>
SVF	Sérum de Veau Foetal

TBS	<i>Tris Buffer Saline</i>
TEM-8	<i>Tumor Endothelial Marker-8</i>
UMPc	Uridine MonoPhosphate cyclique
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i>
WASp	<i>Wiskott-Aldrich Syndrome protein</i>

LISTE DES FIGURES

<u>Figure 1</u> : Surface cellulaire de <i>Bacillus anthracis</i> sous sa forme végétative. _____	22
<u>Figure 2</u> : Spore de <i>Bacillus anthracis</i> . _____	23
<u>Figure 3</u> : Structure cristallographique du complexe PA - CMG-2. _____	27
<u>Figure 4</u> : Structure cristallographique du facteur létal LF. _____	28
<u>Figure 5</u> : Structure cristallographique du facteur oedémateux EF. _____	29
<u>Figure 6</u> : Mécanisme de pénétration cellulaire des toxines de <i>Bacillus anthracis</i> . _____	31
<u>Figure 7</u> : Structure cristallographique des prépores de PA. _____	32
<u>Figure 8</u> : Rôles des toxines dans les phases précoces et tardives de l'infection. _____	37
<u>Figure 9</u> : Synthèse du détournement du système immunitaire par les toxines de <i>Bacillus anthracis</i> . _____	39
<u>Figure 10</u> : Composants constitutifs du cytosquelette. _____	41
<u>Figure 11</u> : Formation d'un filament d'actine. _____	43
<u>Figure 12</u> : Cycle d'activité de la cofiline. _____	46
<u>Figure 13</u> : Contrôle de la dynamique des filaments d'actine par la cofiline. _____	47
<u>Figure 14</u> : Structure des myosines II. _____	49
<u>Figure 15</u> : Régulation de l'activité des myosines. _____	50
<u>Figure 16</u> : Régulation de la polymérisation et de la dépolymérisation des filaments d'actine par les Rho GTPases. _____	51
<u>Figure 17</u> : Composition et dynamique des podosomes. _____	53
<u>Figure 18</u> : Voies de signalisation impliquées dans la formation des coupes phagocytaires lors des phagocytoses FcR et CR3. _____	54
<u>Figure 19</u> : Implication des filaments d'actine dans les étapes du processus phagocytaire. _____	55
<u>Figure 20</u> : Effets des toxines sur le cytosquelette de cellules dendritiques immatures non normalisées _____	77
<u>Figure 21</u> : Différentes méthodes de fabrication des <i>micropatterns</i> . _____	80

<u>Figure 22</u> : Impact de la forme du <i>micropattern</i> sur l'organisation interne de la cellule normalisée. _____	81
<u>Figure 23</u> : Effets de ET et LT sur les BMDCs <i>micropatternées</i> sur des disques médium (Cytoo®). _____	102
<u>Figure 24</u> : ET induit une réorganisation globale du cytosquelette d'actine des BMDCs normalisées sur des <i>micropatterns</i> en forme de goutte. _____	106
<u>Figure 25</u> : L'intoxination des BMDCs par ET démontre une modification de la proportion d'actine F et d'actine G pour les temps tardifs. _____	107
<u>Figure 26</u> : ET induit une dépolymérisation progressive de l'actine F en actine G. _____	109
<u>Figure 27</u> : ET conduit à une modification de la morphologie des BMDCs en suspension sans altération de l'aire. _____	111
<u>Figure 28</u> : La rétraction des BMDCs normalisées intoxiquées par ET résulte d'une perte des points d'ancrage des BMDCs sur les <i>micropatterns</i> coatés à la fibronectine. _____	112
<u>Figure 29</u> : ET active rapidement la cofiline des BMDCs via des protéines phosphatases des classes 1A et 2. _____	114
<u>Figure 30</u> : Effets de ET sur la sécrétion d'AMPc dans les BMDCs. _____	116
<u>Figure 31</u> : ET conduit à l'activation de la cofiline par l'intermédiaire de l'AMPc via la voie PKA. _____	117
<u>Figure 32</u> : Les BMDCs intoxiquées par ET gardent leur capacité de phagocytose. _____	120
<u>Figure 33</u> : ET maintient les capacités de phagocytose des BMDCs mais perturbe la maturation phagosomale. _____	122
<u>Figure 34</u> : ET induit une augmentation de la trans-migration des BMDCs par l'expression de CCR7 / CXCR4 et l'activation cellulaire. _____	124
<u>Figure 35</u> : LT conduit à une perturbation de la dynamique de l'actine des BMDCs normalisées sur un <i>micropattern</i> en forme de goutte. _____	127
<u>Figure 36</u> : LT conduit à une perte d'actine F uniquement pour les temps tardifs. _____	128
<u>Figure 37</u> : LT perturbe la dynamique de polymérisation / dépolymérisation de l'actine des BMDCs. _____	130
<u>Figure 38</u> : Effets de LT sur l'aire des BMDCs en suspension. _____	132
<u>Figure 39</u> : LT conduit à une déphosphorylation de la MLC2 par l'activation de la MLCP via la voie RhoA-ROCK. _____	134
<u>Figure 40</u> : LT inhibe la phagocytose des BMDCs. _____	136

<u>Figure 41</u> : LT inhibe la phagocytose des BMDCs en empêchant l'internalisation et en perturbant la maturation phagosomale. _____	138
<u>Figure 42</u> : LT n'induit pas de modification de la trans-migration des BMDCs. _____	140
<u>Figure 43</u> : Plan expérimental de l'essai de phagocytose des BMDCs en cytométrie en flux et en imagerie en flux. _____	144
<u>Figure 44</u> : Exemple de stratégie d'analyse des capacités de phagocytose des BMDCs par cytométrie en flux. _____	145
<u>Figure 45</u> : Exemple de stratégie d'analyse des BMDCs par imagerie en flux. _____	146
<u>Figure 46</u> : Plan expérimental des essais de trans-migration des BMDCs. _____	147
<u>Figure 47</u> : PA ne modifie pas l'organisation du cytosquelette d'actine des BMDCs. _____	148
<u>Figure 48</u> : PA n'apporte pas de modifications de l'actine G et de l'actine F des BMDCs. _	149
<u>Figure 49</u> : PA ne modifie pas la morphologie des BMDCs en suspension. _____	150
<u>Figure 50</u> : Effets de PA et de la Forskoline sur la sécrétion d'AMPc dans les BMDCs. _	151
<u>Figure 51</u> : LTA induit l'expression des récepteurs CXCR4 et CCR7. _____	152
<u>Figure 52</u> : PA n'a aucun effet sur la trans-migration des BMDCs, ni sur l'expression des récepteurs aux chimiokines et des marqueurs d'activation. _____	153
<u>Figure 53</u> : Synthèse des effets de ET sur le cytosquelette d'actine et les fonctions de phagocytose et de trans-migration des BMDCs. _____	164
<u>Figure 54</u> : Synthèse des effets de LT sur le cytosquelette d'actine et les fonctions de phagocytose et de trans-migration des BMDCs. _____	165

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	3
RESUME.....	6
ABSTRACT.....	7
MOTS-CLES.....	8
KEYWORDS.....	9
LISTE DES ABREVIATIONS.....	10
LISTE DES FIGURES.....	14
PREMIERE PARTIE : INTRODUCTION GENERALE.....	20
<u>CHAPITRE I.1 : <i>Bacillus anthracis</i> et ses toxines.....</u>	21
1. <i>Bacillus anthracis</i> et la maladie du charbon.....	21
1.1 Morphologie et facteurs de virulences.....	22
1.2 Formes cliniques de la maladie du charbon.....	24
1.2.1 La forme cutanée.....	24
1.2.2 Les formes gastro-intestinales et oro-pharyngées.....	24
1.2.3 La forme pulmonaire.....	25
1.2.4 La forme injectionnelle.....	25
2. Effets physiopathologiques et cellulaires des toxines de <i>Bacillus anthracis</i>.....	26
2.1 Constituants des toxines et récepteurs cellulaires aux toxines.....	26
2.1.1 L'antigène protecteur PA.....	26
2.1.2 Le facteur létal LF.....	27
2.1.3 Le facteur oedémateux EF.....	28
2.1.4 Récepteurs des toxines de <i>Bacillus anthracis</i>	30
2.2 Mécanisme de pénétration des toxines.....	30
2.3 Effets cytotoxiques de la toxine létale.....	33
2.3.1 Létalité induite par LT.....	33
2.3.2 Effets immunologiques de LT.....	34
2.4 Effets cytotoxiques de la toxine oedémateuse.....	35
2.4.1 AMPc et ATP, comme cible de ET.....	35
2.4.2 Effets immunologiques de ET.....	36
2.5 Rôles des toxines dans les phases précoces et tardives de la maladie du charbon.....	37
2.5.1 La phase précoce et le détournement du système immunitaire.....	38
2.5.2 La phase tardive et l'atteinte systémique de l'infection.....	40
<u>CHAPITRE I.2 : Cytosquelette des cellules immunitaires et toxines de <i>Bacillus anthracis</i>.....</u>	41
1. Organisation du cytosquelette.....	41
1.1 Les microtubules.....	42
1.2 Les filaments intermédiaires.....	42
1.3 Les septines.....	42
1.4 Les filaments d'actine.....	43

2. Protéines impliquées dans l'architecture des filaments d'actine et régulation	44
2.1 Protéines de l'assemblage et le désassemblage des filaments d'actine	44
2.1.1 Les protéines de nucléation	44
2.1.2 Les protéines de régulation de croissance, de stabilité et de désassemblage	45
2.1.3 Les protéines de liaison aux monomères	47
2.2 Protéines d'organisation des filaments d'actine	48
2.3 Protéines de contractilité des filaments d'actine	48
2.4 Régulation du cytosquelette d'actine	51
3. Rôle du cytosquelette d'actine dans les fonctions immunitaires	52
3.1 L'actine dans la structure des podosomes des cellules dendritiques	52
3.2 L'actine dans la phagocytose des cellules dendritiques et des macrophages	54
3.3 L'actine dans le processus de migration des cellules dendritiques	56
4. Le cytosquelette d'actine, comme cible émergente des toxines : exemple de <i>Bacillus anthracis</i>	57
DEUXIEME PARTIE : TRAVAUX DE THESE	75
CHAPITRE II.1 : Problématique et objectifs de la thèse	76
CHAPITRE II.2 : Effets de ET sur le cytosquelette d'actine des macrophages	79
1. Introduction	79
1.1 Contexte scientifique	79
1.2 Problématique	82
1.3 Résultats	82
2. Article	83
3. Discussion et perspectives	98
CHAPITRE II.3 : Effets de ET et LT sur le cytosquelette d'actine des cellules dendritiques et conséquences sur la phagocytose et la migration des cellules dendritiques.	100
1. ET et LT induisent des effets opposés sur la morphologie des BMDCs normalisées	100
2. ET réorganise le cytosquelette d'actine tout en maintenant ou accentuant les fonctions phagocytaire et migratoire des BMDCs	104
2.1 ET conduit progressivement à une dépolymérisation de l'actine F au niveau des points d'ancrage des BMDCs	104
2.2 La rétraction des BMDCs normalisées sur les <i>micropatterns</i> est liée à une perte des points d'ancrage des BMDCs	110

2.3 ET cible la cofiline via une protéine phosphatase pour réorganiser le cytosquelette d'actine des BMDCs dans les phases précoces.....	113
2.4 L'AMPC induit par ET conduit à l'activation de la cofiline via PKA dans les temps précoces	115
2.5 ET maintient la capacité phagocytaire des BMDCs mais perturbe la maturation phagosomale.....	119
2.6 ET stimule la migration des BMDCs par une sur-expression des récepteurs CCR7 et CXCR4, corrélée à une activation des BMDCs	123
3. LT induit des perturbations du cytosquelette d'actine et de la phagocytose mais sans modification de la trans-migration.....	126
3.1 LT conduit à une réorganisation anarchique de l'actine sous forme d'amas sphérique dans les temps tardifs sans dépolymérisation de l'actine F	126
3.2 LT cible la myosine II par l'intermédiaire de la myosine phosphatase via RhoA-ROCK pour désorganiser le cytosquelette d'actine	133
3.3 LT induit une perte des capacités de phagocytose des BMDCs et une altération complète de la maturation phagosomale	135
3.4 LT ne modifie pas la trans-migration des BMDCs	139
4. Matériels et méthodes	141
4.1 Génération des BMDCs	141
4.2 Normalisation des BMDCs	141
4.3 Intoxication des BMDCs.....	142
4.4 Immunofluorescence et microscopie.....	142
4.5 Préparation des extraits protéiques, Western-Blot et Pull-Down.....	143
4.6 Mesure de la concentration en AMPC et dosage de EF.....	143
4.7 Test de phagocytose	144
4.8 Cytométrie en flux et Imagerie en flux	144
4.9 Test de trans-migration des BMDCs.....	146
4.10 Analyse statistique.....	147
5. Données complémentaires	148
TROISIEME PARTIE : DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	154
1. Effets spatiaux opposés de ET et LT sur l'organisation du cytosquelette d'actine des BMDMs et des BMDCs	155
2. Effets temporels opposés de ET et LT sur l'activation des protéines de liaison à l'actine et sur la dynamique de l'actine.....	157
3. Effets de ET et LT sur la phagocytose et la migration des BMDCs	160
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	166

PREMIERE PARTIE : INTRODUCTION GENERALE

CHAPITRE I.1 : *Bacillus anthracis* et ses toxines

Dans ce premier chapitre, nous allons nous focaliser sur *Bacillus anthracis*, l'agent pathogène à l'origine de la maladie du charbon. Après un bref rappel des propriétés morphologiques de *Bacillus anthracis* et des effets cliniques de l'infection, nous développerons plus en détail les toxines de *Bacillus anthracis* comme facteur de virulence et leurs effets physiopathologiques et cellulaires sur l'hôte.

1. *Bacillus anthracis* et la maladie du charbon

Bacillus anthracis, agent responsable de la maladie du charbon est une bactérie à Gram positif associé au groupe *Bacillus cereus*. Zoonose affectant principalement les animaux herbivores ruminants, elle n'est transmise à l'Homme que par contact direct avec un animal infecté ou par ingestion de viande contaminée. Connue depuis l'antiquité pour son aspect dévastateur sur les animaux, la maladie du charbon ne fut réellement décrite qu'en 1870 par Robert Koch qui identifiait *Bacillus anthracis* comme l'agent causal de cette maladie et développait ainsi ses postulats et les bases de la théorie microbienne de l'infection. A partir de cette époque, les travaux de Louis Pasteur portant sur l'inoculation de souches atténuées à des moutons pour le développement d'un premier vaccin en 1881 à Pouilly-le-Fort, les études d'Elie Metchnikoff sur les leucocytes et la phagocytose dans les années 1900, puis le développement d'un vaccin vivant acapsulé avirulent par Max Sterne dans les années 1930 ont conduit à atténuer son effet dévastateur sur le bétail domestique [1].

D'importants travaux de recherche dans les années suivantes ont permis l'identification des facteurs de virulence et de résistance de *Bacillus anthracis*. Au cours du XXème siècle, *Bacillus anthracis* est étudié comme agent de guerre biologique du fait de la grande stabilité des spores. Les Etats-Unis et l'URSS développèrent un arsenal de production d'armes biologiques dont le premier accident est survenu en 1979 à Sverdlovsk en Union Soviétique à la suite d'une dissémination accidentelle de spores, causant 96 cas de charbon d'inhalation [2]. Il faut attendre la première utilisation intentionnelle de spores de *Bacillus anthracis* dans les lettres aux Etats-Unis en 2001 [3] comme arme du bio-terrorisme pour voir s'accroître considérablement les programmes de recherche et les progrès en thérapeutiques.

1.1 Morphologie et facteurs de virulences

Au cours de son cycle biologique, *Bacillus anthracis*, bactérie tellurique, peut se présenter sous 2 formes bien distinctes : une forme résistante et infectante, la spore, et une forme végétative, le bacille [4]. La forme végétative se présente sous forme de bacille isolé ou en courte chaînette, immobile et capsulé, d'aspect en « canne de bambou » en culture. Elle sécrète des toxines et se multiplie facilement en milieu favorable.

Cette forme végétative se compose de l'extérieur vers l'intérieur (cf. Figure 1) [5] :

- d'une capsule d'acide γ -D-glutamique, dont le rôle est crucial dans la pathogénicité de la bactérie et la résistance aux défenses de l'hôte comme la phagocytose,
- d'un réseau cristallin appelé « couche S », essentiel dans la protection et dans l'adhésion cellulaire,
- d'une couche de peptidoglycane assurant l'intégrité cellulaire de la bactérie,
- d'une membrane cytoplasmique, dont les fonctions seraient de réguler la synthèse des toxines.

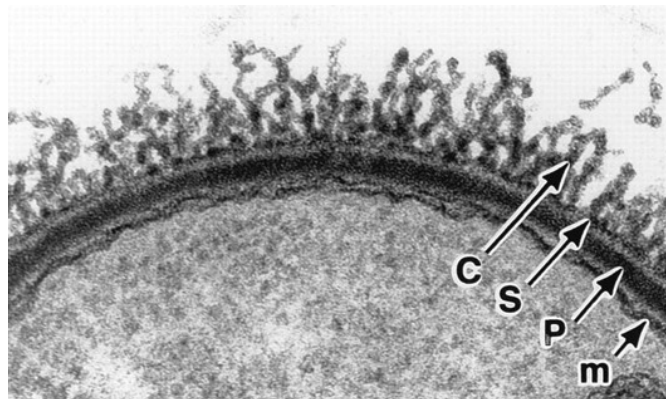


Figure 1 : Surface cellulaire de *Bacillus anthracis* sous sa forme végétative.

Observée en microscopie électronique. C : capsule, S : réseau cristallin, P : peptidoglycane, m : membrane. Adaptée de la référence [6].

Des conditions bien spécifiques, comme la carence nutritive et la présence d'oxygène libre peuvent déclencher la sporulation de la bactérie conduisant à la formation de spores ovoïdes, résistantes à la chaleur, aux rayonnements et à un panel de produits chimiques.

Formes infectieuses de la maladie, les spores peuvent rester en dormance pendant de nombreuses années dans le sol et entrer en germination après avoir infecté un hôte [7].

Cette forme sporulante se compose de l'extérieur vers l'intérieur (cf. Figure 2) [8, 9] :

- d'un exosporium, composé de plusieurs dizaines de protéines de surface, qui pourraient avoir un rôle important dans les interactions avec l'environnement et les cellules hôtes,
- d'un manteau ou *coat*, barrière protéique protégeant la spore des agents chimiques et enzymatiques,
- d'un cortex constitué de peptidoglycane,
- d'un noyau ou *core*, contenant l'unique chromosome et les deux plasmides de virulence de la bactérie.

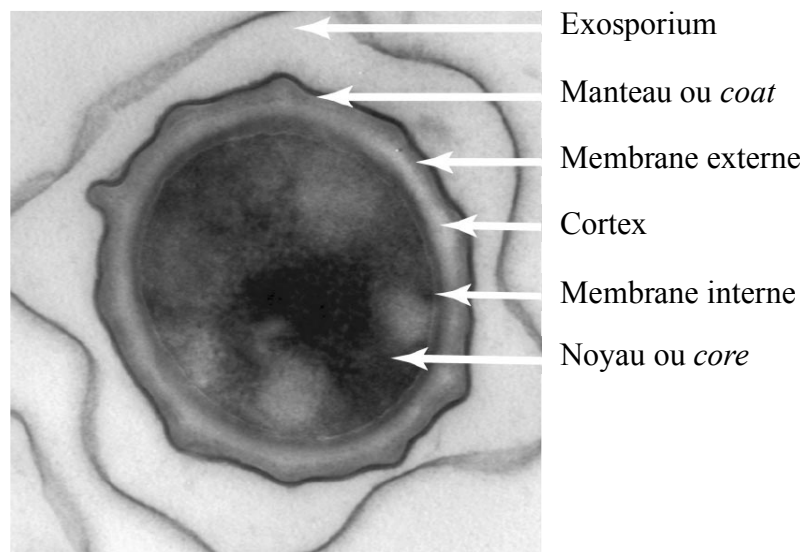


Figure 2 : Spore de *Bacillus anthracis*.

Observée en microscopie électronique à transmission (grossissement X 92 000).
Adaptée de la référence [10].

La virulence de *Bacillus anthracis* repose sur la présence de ces 2 grands plasmides extra-chromosomiques de virulence pXO1 et pXO2. Les gènes codant la toxine létale (LT, *lethal toxin*) et la toxine oedémateuse (ET, *edema toxin*) sont portés par le plasmide pXO1 ; ceux codant la capsule composée d'acide γ -D-glutamique par pXO2 [4, 11]. Les toxines sont de type A/B, formées de 2 composés. Le composant A (*activity*) est porteur de l'activité

enzymatique, à savoir le facteur oedémateux (EF, 89 kDa) pour ET, et le facteur létal (LF, 90 kDa) pour LT. Le composant B (*binding*), impliqué dans la liaison au récepteur cellulaire et permettant le transport des composants catalytiques, est commun aux deux toxines : il est dénommé antigène protecteur (PA, 83 kDa). Les toxines feront l'objet d'une discussion plus poussée dans le paragraphe 2.

1.2 Formes cliniques de la maladie du charbon

La maladie du charbon s'exprime sous 3 formes cliniques naturelles chez l'homme, conditionnées par le mode de contamination : la forme cutanée, la forme gastro-intestinale et la forme pulmonaire [12]. Une nouvelle forme dite injectionnelle a récemment été décrite chez les toxicomanes, résultant de l'injection intraveineuse d'héroïne contaminée par les spores de *Bacillus anthracis* [13].

1.2.1 La forme cutanée [14]

Affectant principalement les personnes en contact direct avec les carcasses des animaux et les produits d'animaux contaminés, la forme cutanée représente 90 à 95% des cas de charbon. Après une période d'incubation de 1 à 5 jours, cette forme conduit à l'apparition de lésions principalement au niveau des membres supérieurs, du cou et du visage, d'abord sous la forme d'un érythème prurigineux indolore évoluant en quelques jours en une escarre noire caractéristique du charbon cutané. Les lésions évoluent progressivement en un assèchement de la croûte formée. En absence de traitement antibiotique et avec l'apparition de septicémie ou de méningite, la mortalité peut atteindre 20% des cas.

1.2.2 Les formes gastro-intestinales et oro-pharyngées [15]

Résultant de l'ingestion de viande peu cuite contaminée par des spores de *Bacillus anthracis* principalement, la forme gastro-intestinale est la forme la plus rare et la moins connue. Elle débute par l'apparition de syndromes pseudo-grippaux, accompagnés quelques jours plus tard de syndromes digestifs, aboutissant à une distension de l'abdomen et l'apparition d'escarres au niveau de la paroi intestinale. Le décès de l'hôte résulte de la perforation des intestins et d'une hémorragie. Fatale dans 50% des cas sous traitement chez l'homme, cette forme est fatale dans 95% des cas chez les ruminants.

Une variante complémentaire de cette forme gastro-intestinale est la forme oro-pharyngée qui se développe au niveau des voies aériennes supérieures. Les premiers symptômes d'œdème cervical et d'adénopathie locale débouchent généralement sur une dyspnée et une dysphagie.

1.2.3 La forme pulmonaire [16-18]

Considérée comme une forme rare et historiquement réservée à certaines classes de travailleurs (trieur de laine et tanneurs) jusqu'aux évènements successifs de 1976 à Sverdlovsk et de 2001 aux Etats-Unis, la forme pulmonaire, la plus fatale et la plus fulgurante est au cœur de nombreux travaux de recherche et représente une menace majeure bio-terroriste. Faisant suite à une inhalation de spores de *Bacillus anthracis*, la période d'incubation de quelques jours en moyenne se concrétise par un syndrome pseudo-grippal avec des signes cliniques peu spécifiques, ne permettant pas un diagnostic rapide.

Seuls des signes radiologiques peuvent alerter le clinicien comme un élargissement du médiastin, accompagné d'un infiltrat péri-hilaire sur une image de pneumopathie et un épanchement pleural. Il s'ensuit une phase fulminante caractérisée par une septicémie et une toxémie. Les signes cliniques associés combinent une dyspnée aiguë, un épanchement pulmonaire, un état de choc puis un décès très rapide. La létalité est très élevée.

1.2.4 La forme injectionnelle [19]

Cette forme résulte de l'injection intraveineuse d'héroïne contaminée par des spores de *Bacillus anthracis*. Depuis 2009, plus d'une centaine de cas ont été déclarés dans les pays de l'Europe de l'ouest, dont un cas à Chambéry en France en juillet 2012. Plusieurs dizaines de patients sont décédés des suites de l'infection marquée par un abcès, une nécrose au site d'injection et surtout un œdème majeur des tissus sous-cutanés nécessitant un débridement chirurgical et une compensation massive des pertes hydro-électrolytiques.

La maladie du charbon restera toujours une menace, à la fois naturelle ou accidentelle pour les troupeaux et les hommes, et volontaire dans le cadre d'utilisation des spores lors d'attaque bioterroriste.

2. Effets physiopathologiques et cellulaires des toxines de *Bacillus anthracis*

Lorsque les spores pénètrent dans l'hôte par les voies décrites précédemment, elles vont rapidement germer pour donner naissance à la forme végétative. Les vitesses de germination peuvent varier selon les voies de pénétration et les espèces. Les premières études suggéraient que les spores étaient phagocytées par les cellules de l'immunité innée (macrophages et plus récemment cellules dendritiques) servant alors de « cheval de Troie » pour disséminer les spores des sites périphériques aux ganglions lymphatiques [20-23]. Des études récentes ont montré que la germination n'a pas forcément lieu à l'intérieur des cellules et il est maintenant considéré que *Bacillus anthracis* est une bactérie extracellulaire, capable de germer rapidement sans contact cellulaire [24, 25]. Les bactéries vont alors se multiplier et se disséminer dans l'organisme pour sécréter les facteurs de virulence dont les toxines, éléments majeurs dans la pathogénicité de la maladie, ce qui a donné naissance à l'hypothèse du « Jailbreak » [26]. Les toxines de *Bacillus anthracis*, responsables de la létalité jouent ainsi des rôles essentiels depuis les étapes précoces de la maladie du charbon.

Cette partie a pour objet de présenter les constituants des deux toxines, avant de développer leur internalisation et leurs cibles biologiques chez l'hôte. Nous aborderons dans une dernière partie le rôle des toxines dans les deux phases de la maladie.

2.1 Constituants des toxines et récepteurs cellulaires aux toxines

Les trois composants peptidiques des toxines de *Bacillus anthracis*, PA, EF et LF sont individuellement non toxiques, mais s'associent pour former les deux principaux facteurs de virulence : la toxine létale LT, composée de LF + PA et la toxine oedémateuse ET, composée de EF + PA.

2.1.1 L'antigène protecteur PA

Le PA natif, dénommé PA₈₃ est une protéine composée de 4 domaines (cf. Figure 3) [27]. Le domaine I, localisé en N-terminal contient la séquence RKKR qui est reconnu et clivé par des protéases de type furine après fixation du PA sur les récepteurs cellulaires. Ce clivage conduit à la formation d'une sous-unité de 63 kDa, appelé PA₆₃, indispensable à l'oligomérisation en heptamères ou octamères [28-30]. Ce domaine I contient également deux

sites de stabilisation de la structure par fixation d'ions Ca^{2+} . Les domaines II à IV permettent respectivement l'insertion dans la membrane plasmique par l'intermédiaire de feuillettes β , l'oligomérisation des PA par interaction protéine-protéine et la liaison aux récepteurs cellulaires [27, 31].

Le PA est une entité non toxique en absence de EF et LF, ne permettant que l'internalisation des facteurs à l'intérieur des cellules.

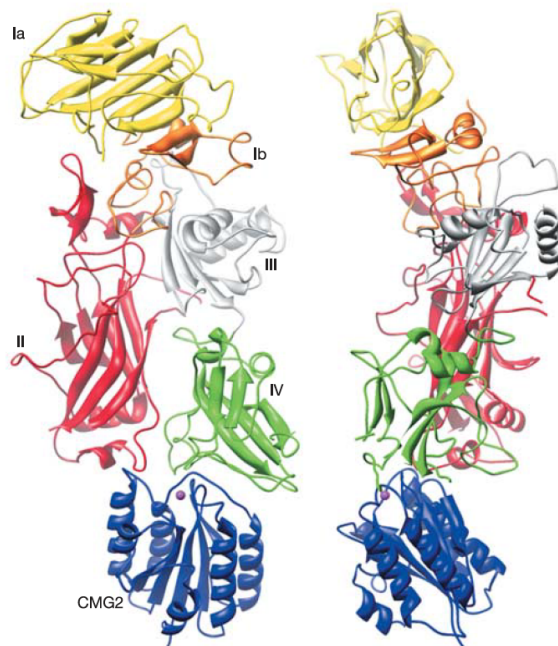


Figure 3 : Structure cristallographique du complexe PA - CMG-2.

PA se fixe sur le récepteur CMG-2 (bleu). Les 4 domaines du PA sont représentés de différentes couleurs. Le domaine I est clivé par des protéases, ce qui libère la sous-unité Ia (20 kDa, jaune). La sous-unité restante, associée aux trois autres domaines forme le PA_{63} [32].

2.1.2 Le facteur léthal LF

Le facteur léthal LF est une protéine composée de 4 domaines, lui permettant de s'associer avec le PA pour former la toxine létale LT (cf. Figure 4) [33, 34]. Le domaine I situé en N-terminal, qui possède une forte homologie de séquence avec un domaine de EF est responsable de la liaison de LF sur l'oligomère de PA. Les domaines II et III ont une fonction moins précise mais assureraient une conformation spatiale indispensable à l'activité enzymatique de LF et à la fixation des substrats [35]. Le domaine IV est le domaine portant

l'activité enzymatique de LF en permettant la liaison du zinc, cofacteur de l'activité catalytique [36].

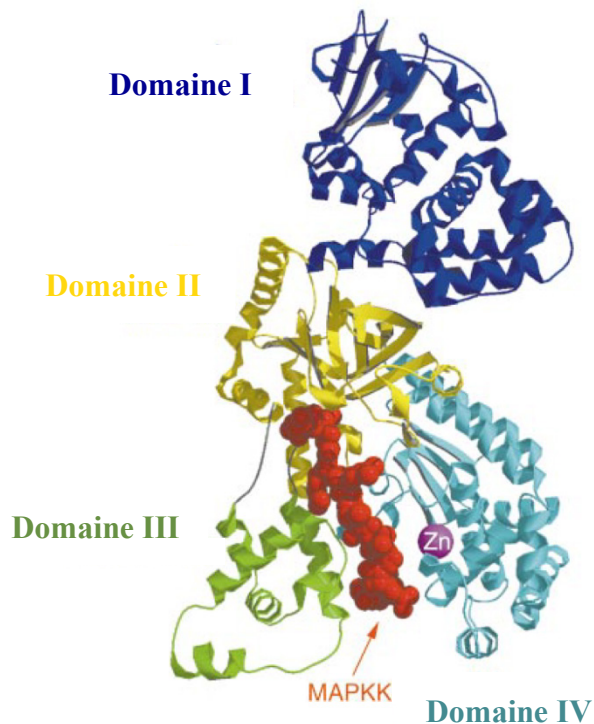


Figure 4 : Structure cristallographique du facteur létal LF.

Le domaine I (bleu foncé) est responsable de la fixation de LF sur PA, les domaines II (jaune) et III (vert) sont responsables de la conformation spatiale et la fixation des substrats, le domaine IV (bleu ciel) porte l'activité enzymatique. Adaptée de la référence [34].

De part son activité de métalloprotéase à zinc, LF clive et inactive la partie N-terminale de certains membres de la famille des *Mitogen-Activated Protein Kinase-Kinase* (MAPKKs ou MEKs) et ainsi inhibe les cascades de phosphorylation intracellulaires. Ces voies de signalisation sont impliquées dans des processus majeurs et fondamentaux de la cellule, telle que la survie, la différenciation cellulaire ou la mort par apoptose [37-40]. Il a été montré très récemment que LF est capable de cliver directement la protéine 1 des *NOD-like receptor* (Nlrp1) et d'activer l'inflammasome. Il s'ensuit une activation des caspases 1 et de l'IL-1 β puis une mort cellulaire par pyroptose chez certaines espèces de rongeurs [41, 42] mais pas chez l'homme.

2.1.3 Le facteur oedémateux EF

Le facteur oedémateux EF est une protéine structurée en 3 domaines qui s'associe au PA pour former la toxine oedémateuse (cf. Figure 5). Sa structure comporte une partie N-

terminale indispensable à la fixation au PA, une région catalytique portant l'activité enzymatique de EF et un domaine en hélice permettant de masquer la région catalytique en absence des co-facteurs [43].

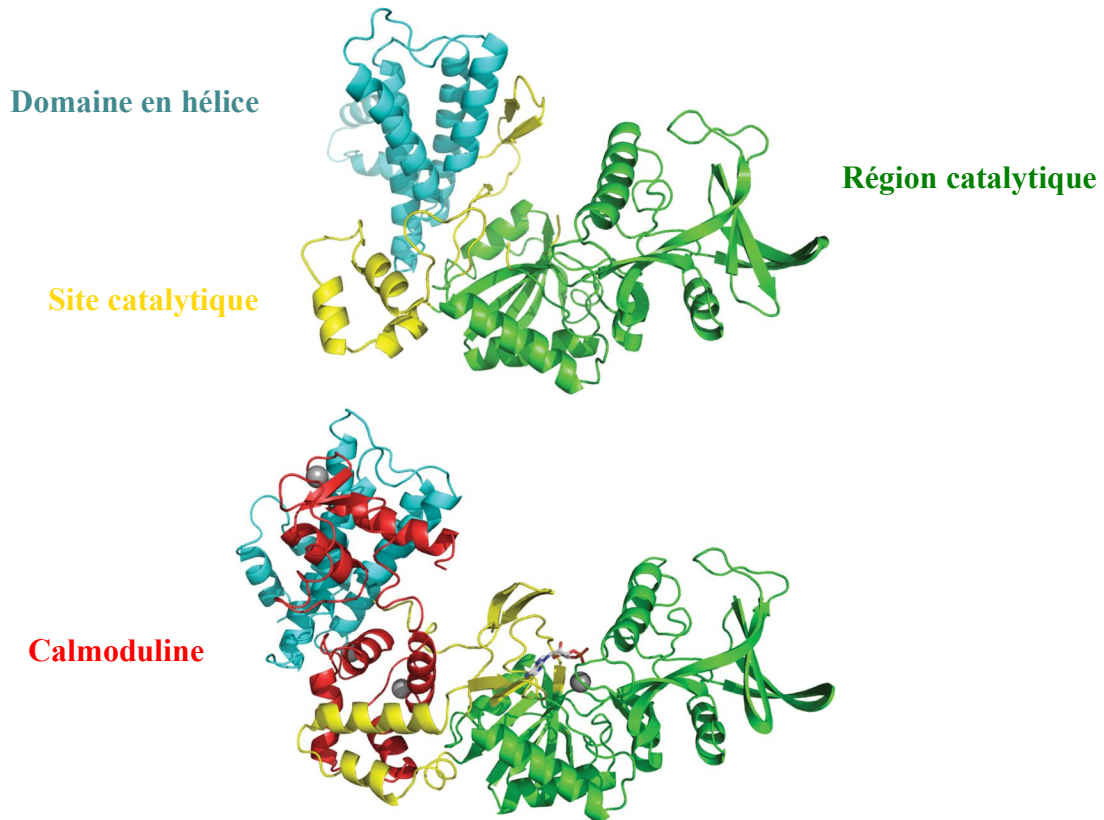


Figure 5 : Structure cristallographique du facteur oedémateux EF.

Structure libre de EF en haut et associée à la calmoduline (en rouge) en bas. La calmoduline s'insère à la fois dans le domaine en hélice (en bleu) et dans la région catalytique (en vert), permettant au site catalytique (en jaune) de lier le substrat. Adaptée de la référence [44].

La fixation des cofacteurs permet une ouverture de la structure de EF, une libération du site catalytique et ainsi la fixation des substrats. EF est une adénylate cyclase dépendante de la calmoduline et du calcium, capable de convertir très rapidement l'ATP en AMPc, second messager indispensable dans de nombreux processus cellulaires. Son activité est 1000 fois supérieure à l'activité des adénylates cyclases intracellulaires et peut convertir pas moins de 2000 molécules d'ATP par seconde [45, 46]. Plusieurs études récentes ont montré que EF possède les capacités de générer d'autres messagers intracellulaires, tels que du CMPc, du UMPc et du IMPc en plus de l'AMPc ([47], cf. référence [48] pour une revue et discussion de cette activité de EF).

2.1.4 Récepteurs des toxines de *Bacillus anthracis*

PA₈₃ peut se fixer à un des deux récepteurs membranaires pour permettre l'entrée des toxines dans la cellule hôte : ANTXR1 ou TEM-8 (*Tumor Endothelial Marker-8*) et ANTXR2 ou CMG-2 (*Capillary Morphogenesis Protein 2*). Exprimés de façon ubiquitaire à la surface des tissus et des cellules, ils possèdent tous les deux un domaine extracellulaire Von Willebrand Factor A, responsable de la liaison au PA et de la fixation à des composants de la matrice extracellulaire. TEM-8 est capable de lier le collagène de type I et VI et la gélatine tandis que CMG-2 peut interagir avec le collagène de type IV, la laminine et la fibronectine [49-52]. Ces deux récepteurs contiennent un domaine intracellulaire important qui permet d'interagir avec le cytosquelette d'actine des cellules [53-55].

Bien que très similaires, ces 2 récepteurs n'ont pas la même implication dans la physiopathologie de la maladie du charbon. CMG-2 présente une affinité 10 fois supérieure pour PA que TEM-8. Des études utilisant des souris dont les régions transmembranaires des récepteurs ont été inactivées montrent que CMG-2 est le principal médiateur de la létalité induite par les toxines [56, 57]. Les souris dont CMG-2 a été inactivé sont résistantes à la fois aux toxines ET et LT mais également à une infection de *Bacillus anthracis in vivo* alors que les souris dont TEM-8 a été tronqué restent sensibles aux toxines et à l'infection [56, 57]. Une troisième protéine, l'intégrine $\beta 1$, possédant également un domaine Von Willebrand a été récemment identifiée *in vitro* comme étant un potentiel récepteur du PA [58]. Le récepteur LRP6 (*Lipoprotein Receptor Related 6*), dont le rôle reste controversé, pourrait être impliqué comme co-récepteur dans la genèse de la létalité induite par les toxines mais les études actuelles contradictoires ne permettent pas de conclure à un rôle essentiel de LRP6 [59-62].

2.2 Mécanisme de pénétration des toxines

Les mécanismes de pénétration cellulaire des toxines ont été largement décryptés au cours des vingt dernières années et peuvent être séparés en trois principales étapes : la liaison aux récepteurs, l'internalisation et la translocation membranaire (cf. Figure 6).

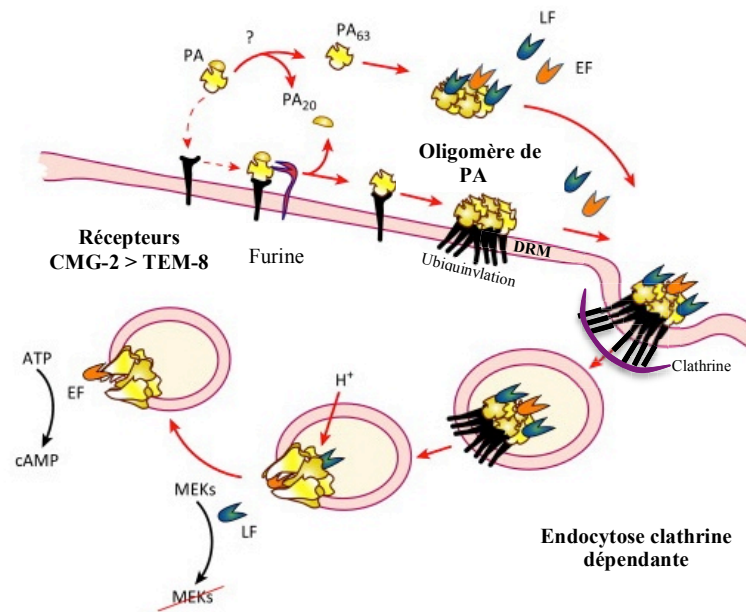


Figure 6 : Mécanisme de pénétration cellulaire des toxines de *Bacillus anthracis*.

Après liaison aux récepteurs cellulaires CMG-2 et TEM-8, le PA₈₃ est clivé en PA₆₃, capable de s'oligomériser pour former un pré-pore. Ce pré-pore se déplace sur des DRM (*Detergent Resistant Membrane*) où la queue cytoplasmique du PA est ubiquitinylée, permettant le recrutement de clathrine et une endocytose clathrine-dépendante. Après leur passage dans les MVB (*multivesicular bodies*), la baisse du pH entraîne la libération des facteurs EF et LF dans le cytosol. Adaptée de la référence [63].

Que ce soit en solution ou après fixation aux récepteurs cellulaires CMG-2 et TEM-8, le PA₈₃ est clivé en deux sous-unités de 63 et 20 kDa, cette dernière étant relarguée. Les sous-unités PA₆₃ s'associent en heptamères mais aussi en octamères, structures plus stables en solution que les formes heptamériques mais leur proportion ne représente que 20 à 30% des oligomères formés [29]. Une fois formé, l'oligomère peut fixer les composants EF et LF dans une proportion stoechiométrique de 1 à 4 EF/LF pour 7 à 8 PA aboutissant à la formation d'un cluster à la surface cellulaire [64].

Ce complexe, à l'origine d'un pré-pore (cf. Figure 7) est redistribué à la surface cellulaire vers des micro-domaines membranaires riches en cholestérol et en shingolipides, nommés les *Detergent Resistant Membrane* (DRM) [65, 66].

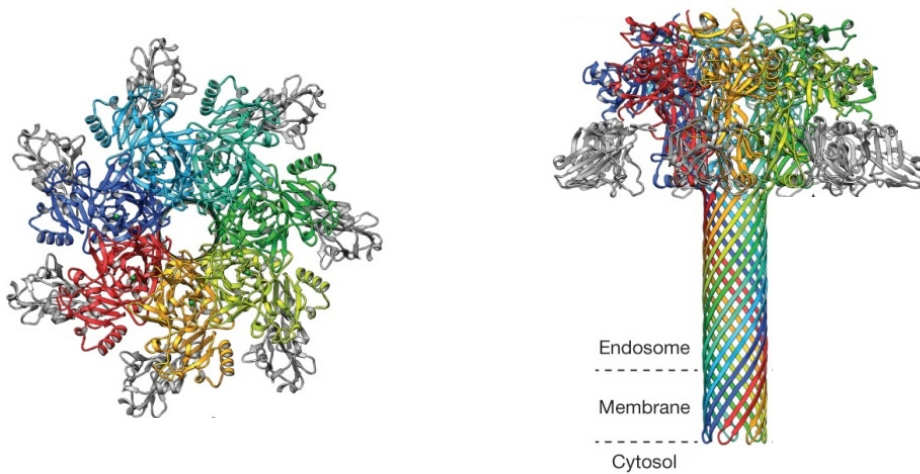


Figure 7 : Structure cristallographique des prépores de PA.

Chaque monomère de PA est d'une couleur différente et les récepteurs sont colorés en gris. A gauche, vue de dessus permettant de visualiser l'ouverture du prépore. A droite, vue de profil où l'association des boucles β des domaines II du PA forment un prépore traversant la membrane plasmique. Adaptée de la référence [67].

Après recrutement de la β -arrestine, protéine de régulation des récepteurs couplés aux protéines G, à la membrane plasmique, les régions cytoplasmiques des récepteurs cellulaires sont ubiquitinylées, permettant la formation de puits recouverts de clathrine [68, 69]. L'internalisation du complexe se fait par endocytose clathrine-dépendante. Les complexes se localisent d'abord dans les endosomes précoces puis le bourgeonnement de la membrane va provoquer la formation de vésicules intraluminales à l'origine de corps multivésiculaires (MVB, *multivesicular bodies*) intracellulaires. Ces MVB vont alors migrer le long des microtubules pour fusionner avec la membrane des endosomes tardifs [70]. La diminution du pH dans les MVB entraîne la conversion du prépore de PA en pore et permet ainsi le passage des facteurs EF et LF à travers le pore par un mécanisme de transport actif. Avant d'être réellement libre, ces facteurs devront passer à travers la membrane des MVB : cette étape appelée « *Back-Fusion* » est encore mal connue. Alors que LF diffuse dans le cytosol des cellules, EF reste associé aux endosomes tardifs proche du noyau. Cette localisation de EF est à l'origine d'un gradient intracellulaire d'AMPC, la concentration d'AMPC au site de relargage de EF étant plus importante en région périnucléaire [71, 72].

2.3 Effets cytotoxiques de la toxine létale

De part son activité de métalloprotéase à zinc, LF clive et inactive les MEKs 1 à 4, 6 et 7, induisant une inactivation de 3 voies majeures de signalisation des MAPKs : la voie ERK (*extracellular-signal regulated kinase*) par l'intermédiaire de MEK 1/2, la voie p38 par l'intermédiaire de MEK 3/6 et la voie JNK (*Jun N terminus kinase*) par l'intermédiaire de MEK 4/7 [37, 38, 40]. Cette action principale sur les voies des MAPKs conduit à un effet inhibiteur global sur le système immunitaire, le système vasculaire dans sa globalité et le système endocrinien (cf. référence [63, 73-80] pour des revues complètes).

Les effets de LF sur ces systèmes sont étudiés depuis de nombreuses années mais l'ensemble des études ne permet pas toujours de conclure sur les effets. Ainsi, il apparaît trop ambitieux de vouloir décrire tous les effets et les cibles biologiques de LF. Nous nous focaliserons sur le système immunitaire et les cellules de l'immunité innée ou à l'interface avec l'immunité adaptative. Nous tenterons de détailler deux aspects majeurs dans la compréhension des dérégulations induites par LF pouvant s'inscrire dans la thématique de la thèse : la létalité induite par LF et les effets immunologiques de ce dernier.

2.3.1 Létalité induite par LT

Les premières études ont montré que LT est capable d'entraîner la mort de certaines lignées de macrophages, les Raw264.7 et les J774. La suite des résultats a permis d'établir une distinction entre des souches ou espèces sensibles à LT, comme les souris BALB/C et les rats Fischer, et des souches ou espèces résistantes à la mort induite par LT, tels que les souris C57BL/6 et les rats Lewis. Cette sensibilité n'est pas liée au clivage des MEKs, mais résulte du polymorphisme existant sur un gène particulier, *Nlrp1* chez le rat et *Nlrp1b* chez la souris. Ces gènes codent une protéine NLRP1, indispensable dans l'établissement de l'inflammasome et l'activation de la caspase-1 [41, 81]. LT clive directement la protéine *Nlrp1* du rat et la protéine *Nlrp1b* de la souris pour les espèces sensibles à LT, aboutissant à l'activation de l'inflammasome, la mort rapide par pyroptose des macrophages par l'action de la caspase-1 et relargage de cytokines pro-inflammatoires, l'IL-1 β et l'IL-18 [42, 82]. L'ensemble de cette réponse immune pro-inflammatoire apporte un effet protecteur à l'infection. En revanche, LT ne semble pas cliver les protéines *Nlrp1* et *Nlrp1b* dans les souches résistantes à LT, conduisant à une sensibilité plus importante de ces espèces à l'infection.

D'autre part, les expériences *in vivo* chez la souris démontrent que leur mort est indépendante de la sensibilité des macrophages à LT [83], laissant supposer l'implication d'autres types cellulaires dans la létalité induite par LT ou la présence d'autres voies de mort cellulaire. Une étude récente démontre que l'induction d'une apoptose serait à l'origine de la mort des macrophages. Cette apoptose résulterait du blocage des voies p38 et Akt par LT, d'une libération d'ATP extracellulaire qui viendrait activer les récepteurs P2X7 puis l'inflammasome [84]. Enfin, la susceptibilité des cellules dendritiques à LT serait dépendante de leur état de maturation : LT induirait la mort cellulaire uniquement des cellules dendritiques immatures [85, 86].

2.3.2 Effets immunologiques de LT

Le profil cytokinique induit par LT a été largement étudié chez les cellules dendritiques et les macrophages [87, 88]. LT est capable de réduire la sécrétion d'IL8, d'IL12p70, d'IL10 et de TNF α [80, 89]. Une étude récente de notre groupe a montré que LT perturbe la production de chimiokines pro-inflammatoires, notamment la production de CXCL8, perturbation corrélée à un affaiblissement du recrutement des polynucléaires neutrophiles *in vitro* [90]. LT agit également sur la sécrétion des cytokines et notamment de l'IFN- γ par les cellules NK [91].

LT est capable d'inhiber la chémotaxie des polynucléaires neutrophiles par réduction de la formation de filament d'actine F [92-94]. Il en ressort le même constat chez les macrophages dans des expériences de chémotaxie en présence de chémoattractant SDF-1 α et MIP-1 α [95] et chez des PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*). Il est important de noter ici que l'ajout de ET en plus de LT conduit à une augmentation de la chémotaxie des PBMCs [96, 97]. Les résultats laissent supposer que cette altération serait directement liée à la voie des MAPKs.

D'autre part, LT semble altérer la réponse oxydative des polynucléaires neutrophiles humains mais les 2 études sur le sujet sont divergentes, ne permettant pas de conclure de l'effet de LT sur cette activité bactéricide des cellules [98, 99].

La phagocytose ne sera pas abordée dans ce paragraphe puisqu'elle fait l'objet d'une synthèse déjà effectuée dans l'article de revue présenté dans le chapitre 3 de cette partie. La figure 8 en fin de chapitre synthétise les effets majeurs de LT sur le système immunitaire.

2.4 Effets cytotoxiques de la toxine oedémateuse

Grâce à son activité d'adénylate cyclase dépendante de la calmoduline, EF génère une élévation du taux d'AMPc par conversion de l'ATP en AMPc. L'injection sous-cutanée de ET chez la souris conduit à des oedèmes importants alors que l'administration systémique entraîne un influx de liquide dans le lumen intestinal, des oedèmes hépatiques, des atteintes tissulaires et la mort des souris [100, 101]. L'importance de ET par rapport à LT dans la physiopathologie de la maladie du charbon laisse des zones d'ombre. Selon le modèle animal d'étude *in vivo*, ET est ou n'est pas indispensable dans l'infection et la mort des animaux [102-104]. Il semble apparaître que la concentration en EF est 5 fois plus basse que la concentration plasmatique de LF chez le lapin *in vivo*, suggérant un ratio de 5 LF pour 1 EF au stade tardif de la maladie [105, 106].

Certaines équipes suggèrent que ET est non cytotoxique sur les cellules dendritiques, endothéliales ou les macrophages [78]. De la même manière que pour LT précédemment, nous focaliserons notre paragraphe sur des points clés des effets de ET, en abordant d'abord les effets induits par l'excès d'AMPc mais aussi par la perte d'ATP dans la cellule, pour enfin faire une synthèse des effets immunologiques de ET.

2.4.1 AMPc et ATP, comme cible de ET

Les effets induits par ET peuvent être vus sous 2 angles : soit ceux provoqués par une augmentation de l'AMPc, soit ceux provoqués par la perte de l'ATP intracellulaire induit par l'activité adénylate cyclase accrue de ET.

Les mécanismes reliant l'élévation de l'AMPc et les lésions induites par ET sont très mal connus. L'AMPc, de manière générale, agit sur 2 cibles majeures dans la cellule : PKA (*Protein Kinase A*) et Epac (*Exchange Protein Activated by cAMP*) qui est un facteur couplé aux protéines GTPases Rap1 et Rap2. La liaison de l'AMPc sur les sous-unités régulatrices de PKA conduit à la dissociation de leurs 2 sous-unités catalytiques. Ces dernières pourront phosphoryler les résidus thréonine et sérine de nombreuses protéines intracellulaires. Comme le mentionne très bien l'une des revues de l'équipe de Leppla, l'absence de réelles données sur ce lien et les mécanismes de pathogénicité de ET pourraient être comblés par l'utilisation de souris viables *knockout* pour les protéines PKA et Epac [63, 107, 108]. La concentration en AMPc intracellulaire est finement régulée, notamment par des phosphodiésterases (PDE)

capable de convertir l'AMPc en un composé incapable de fixer les cibles protéiques de l'AMPc.

D'autre part, ET conduit à une diminution de la concentration en ATP, pouvant affecter des processus biologiques comme le trafic vésiculaire. Une étude réalisée sur *Drosophila melanogaster* a montré que ET (tout comme LT) peut agir directement sur la voie de recyclage des endosomes et plus particulièrement sur les protéines Rab11/Sec15 des exocystes. Le blocage de la formation des vésicules serait en partie dû à la baisse de l'ATP dans la cellule [109]. Ces études mériteraient d'être complétées par des études plus poussées sur le trafic vésiculaire des toxines et le recyclage des récepteurs et des facteurs, même s'il a été montré que ET est capable d'induire une sur-expression PKA-dépendante des récepteurs TEM-8 et CMG-2 [110].

2.4.2 Effets immunologiques de ET

Tout comme LT, plusieurs études montrent que ET induit une diminution de la chémotaxie des polynucléaires neutrophiles [92-94]. Cependant, une étude de Kim *et al.* indique que ET augmente la vitesse de migration des macrophages dérivés de moelle osseuse (BMDM) par activation de la voie PKA-CREB [111]. De leur côté, les cellules dendritiques traitées par ET ont une capacité accrue à envahir un réseau de matrigel [97], probablement par activation de la voie GSK (*Glycogen Synthase kinase*) – CREB [111, 112] ou par maturation des cellules dendritiques induites par ET [97]. ET induit également une inhibition de l'activité bactéricide des polynucléaires neutrophiles en inhibant la sécrétion de superoxyde [98] ou la production de phospholipase A2 [113].

ET modifie le profil de sécrétion des cytokines avec un effet dominateur par rapport à LT sur la baisse de sécrétion de l'IL-12p70, un effet cumulatif sur le TNF- α et une augmentation de l'IL-10. Enfin, ET réduit l'expression du complexe CD11b/CD18, composant des intégrines β 2 ayant un rôle fondamental dans l'adhésion et l'extravasation des polynucléaires neutrophiles [94]. Ces études restent cependant en contradiction avec les études de Wade *et al.* et de Tessier *et al.* montrant que ET augmente la chémotaxie des PMNs et le recrutement des polynucléaires neutrophiles en grande quantité au niveau du site d'injection de ET [114, 115]. La figure 8 en fin de chapitre synthétise les effets majeurs de ET sur le système immunitaire.

2.5 Rôles des toxines dans les phases précoces et tardives de la maladie du charbon

Les toxines de *Bacillus anthracis* jouent un rôle déterminant dans les 2 phases de la maladie du charbon que nous avons abordées au début de chapitre, comme l'ont montré les études *in vivo* de souris dépourvues des récepteurs TEM-8 et CMG-2 [116]. Pendant la phase précoce de l'infection, les toxines ciblent prioritairement le système immunitaire pour faciliter la survie et la dissémination du pathogène alors que lors de la phase plus tardive, leur action est systémique et affecte différents tissus conduisant à la létalité de la maladie. La figure 8 résume les cibles de ces toxines durant les 2 phases.

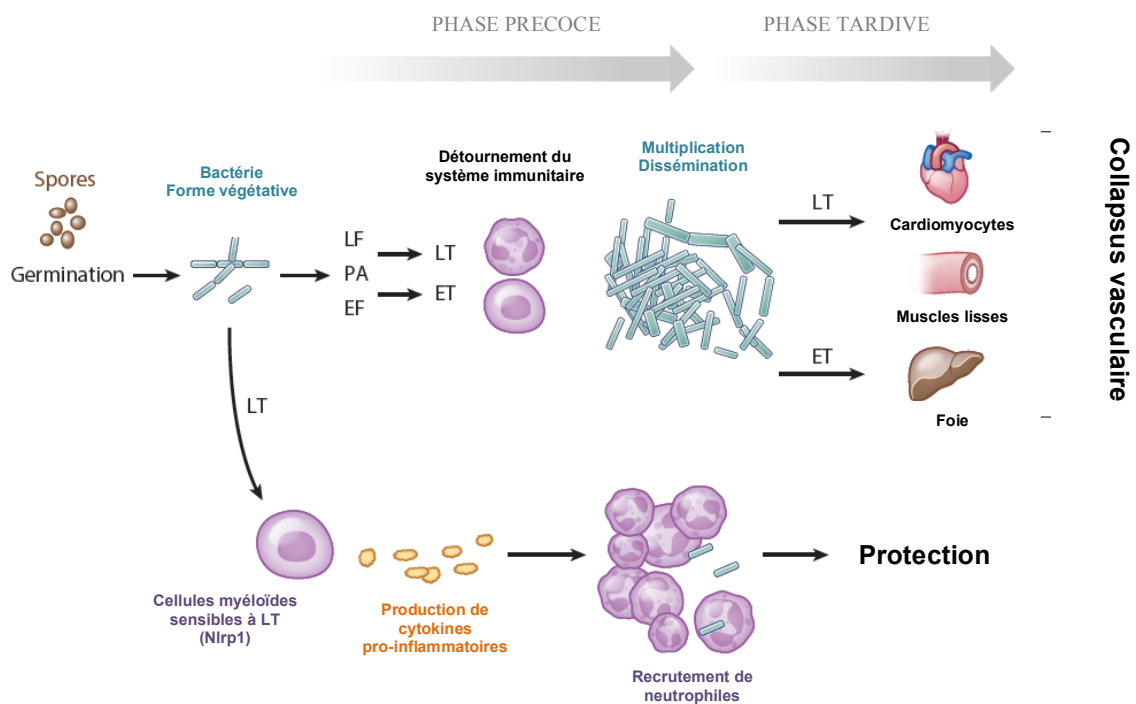


Figure 8 : Rôles des toxines dans les phases précoces et tardives de l'infection.

Après germination des spores, les toxines ET et LT détournent le système immunitaire lors de la phase précoce pour se multiplier et se propager dans l'organisme. Dans la phase tardive, LT cible prioritairement les cardiomyocytes et les cellules des muscles lisses alors que ET altère les hépatocytes, le tout conduisant à un collapsus vasculaire. En parallèle, chez certaines souris sensibles à LT, LT active la voie de la caspase-1 pour induire une réponse pro-inflammatoire à l'origine du recrutement des polynucléaires neutrophiles. Cette action aura un rôle protecteur sur l'infection. Adaptée de la référence [76].

2.5.1 La phase précoce et le détournement du système immunitaire

Etant donnés les effets de ET et LT sur les cellules immunitaires abordés précédemment et synthétisés dans la figure 9, il n'est pas étonnant de conclure que les toxines ciblent prioritairement les cellules immunes et particulièrement les cellules myéloïdes. Si les récepteurs CMG-2 et TEM-8 sont absents des cellules myéloïdes, les souris deviennent résistantes à l'infection, prouvant que les cellules de l'immunité innée forment une plaque tournante dans le contrôle de la dissémination de l'agent pathogène [116].

Les polynucléaires neutrophiles semblent être le premier type cellulaire impliqué, suivis des macrophages, des cellules dendritiques en particulier. ET et LT affectent les fonctions normales des cellules immunitaires, allant de la production de chimiokines, cytokines ou de superoxydes jusqu'aux fonctions de phagocytose et de migration (cf. paragraphe 2.3 et 2.4 de ce chapitre). LT semble jouer un rôle plus important dans la mise en place de l'infection [116] alors que ET la prolongerait par sur-expression des récepteurs de PA et la demi-vie des toxines dans le plasma. Cependant, une étude très récente apporte la preuve d'un rôle déterminant de ET dans la propagation du pathogène dans l'organisme [104]. Ainsi, ce détournement du système immunitaire favorise la survie, la multiplication et la propagation des bactéries dans le sang et les ganglions lymphatiques. De très grandes quantités de toxines sont alors sécrétées dans le sang conduisant aux effets tardifs et létaux de la maladie du charbon.

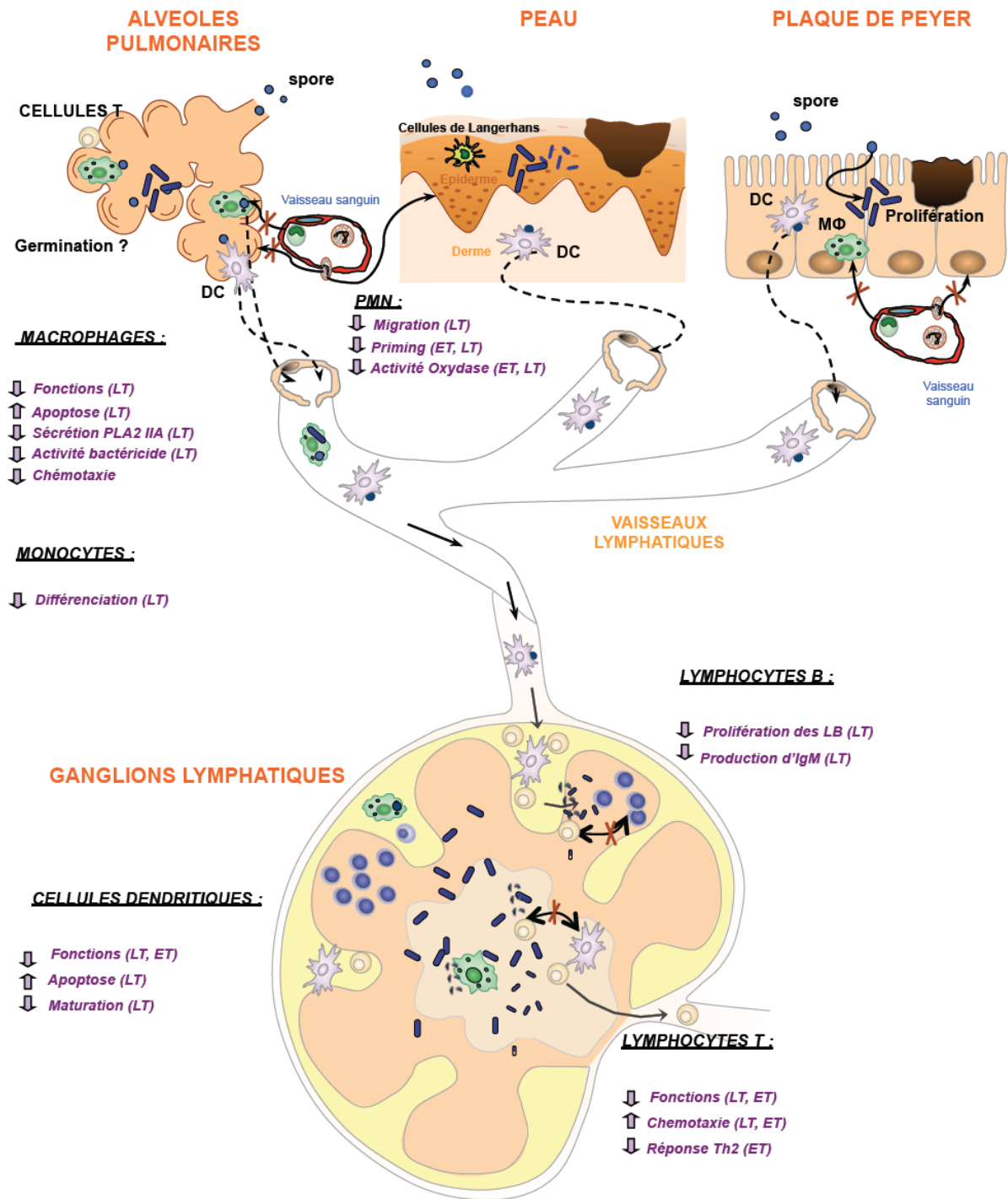


Figure 9 : Synthèse du détournement du système immunitaire par les toxines de *Bacillus anthracis*. Modifiée et actualisée à partir de la référence [80].

2.5.2 La phase tardive et l'atteinte systémique de l'infection

Les toxines de *Bacillus anthracis* ne jouent pas seulement un rôle dans la phase précoce de la maladie mais sont aussi à l'origine de la létalité dans la phase tardive de la maladie.

Alors que la bactérie en elle-même peut être éliminée par un traitement antibiotique approprié, les toxines sécrétées restent prépondérantes et toxiques pour l'hôte. Les études sur souris *in vivo* dépourvues des récepteurs de PA démontrent que LT cible prioritairement les cardiomyocytes et leurs fonctions contractiles et les cellules des muscles lisses [101, 117]. LT induit un collapsus vasculaire non hémorragique et indépendant des cytokines, le tout accompagné d'une nécrose hypoxique des cellules et organes cibles [100, 118, 119]. Les hépatocytes et les cellules endothéliales ne sont pas forcément des cibles majeures de LT [101] malgré de nombreuses études *in vitro* montrant des modifications du cytosquelette, des jonctions cellulaires et des voies endosomales de recyclage impliquées [120-122]. Contrairement à ce qu'on pouvait attendre, les cellules endothéliales, sensibles aux modifications du taux d'AMPc ne sont pas la cible majeure de ET. ET induit aussi des oedèmes hépatiques en ciblant les hépatocytes et non les cellules endothéliales adjacentes et les cellules des muscles lisses. Le foie est donc la cible majeure de ET [101]. Les oedèmes causés seraient essentiellement dus à l'augmentation de fluide dans les compartiments interstitiels.

Ainsi, *Bacillus anthracis* utilise ses 2 toxines en ciblant les dommages sur 2 systèmes vitaux : le système cardiovasculaire et le foie. La létalité induite ne serait pas uniquement liée aux toxines mais plutôt par le sepsis qui résulterait de la forte prolifération des bactéries [123].

CHAPITRE I.2 : Cytosquelette des cellules immunitaires et toxines de *Bacillus anthracis*

Dans ce deuxième chapitre, nous allons nous focaliser sur le cytosquelette des cellules immunitaires, et principalement sur le réseau des filaments d'actine afin de montrer l'importance de cette architecture dans les fonctions immunes et dans les interactions hôtes-agents pathogènes. Après un aperçu de l'organisation du cytosquelette dans les cellules immunitaires, nous présenterons les protéines majeures de régulation des filaments d'actine et le rôle des filaments d'actine dans certaines fonctions des cellules immunitaires d'intérêt dans notre travail. Nous terminerons sur un tour d'horizon de l'implication du cytosquelette dans la pathogénicité des toxines et prendrons comme exemple les toxines de *Bacillus anthracis*.

1. Organisation du cytosquelette

Depuis longtemps, il était considéré que le cytosquelette était constitué de trois composants : les filaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires. Des études très récentes révèlent la présence d'un quatrième constituant, les septines dont le rôle est bien connu dans les fonctions de division cellulaire [124] (Figure 10).

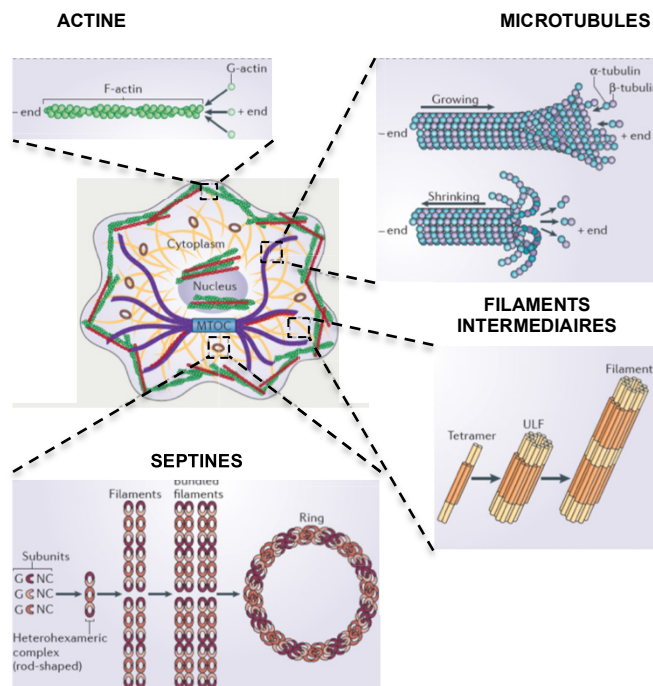


Figure 10 : Composants constitutifs du cytosquelette.

Le cytosquelette des cellules comprend 4 éléments : les filaments d'actine, les microtubules, les filaments intermédiaires et les septines. Adapté de la référence [124].

1.1 Les microtubules [125-127]

Constitués de dimères d' α - et β -tubulines, les microtubules se présentent comme des polymères cylindriques, rigides et creux en forme de tubes. Ces molécules de tubuline sont capables de lier le GTP soit de manière irréversible pour l' α -tubuline, soit de manière réversible et échangeable pour la β -tubuline. De structures polaires, les microtubules peuvent se polymériser et se dépolymériser très rapidement à partir d'une extrémité + alors que l'autre extrémité est englobée au niveau du centrosome, près du noyau et regroupant une majorité des extrémités - des microtubules. A partir de ce centrosome, les dimères de tubuline couplés au GTP sont ajoutés progressivement pour former des feuilletts qui se replient sur eux mêmes pour former le microtubule.

Les microtubules sont en continuelle phase de dépolymérisation et repolymérisation, leur conférant une instabilité qui peut être contrôlée par des protéines de stabilisation MAP (*microtubule-associated-proteins*). La dynamique d'interaction avec les microtubules s'effectue au moyen de 2 protéines motrices, les kinésines et les dynéines qui vont entre autre permettre le mouvement des organites le long des microtubules.

1.2 Les filaments intermédiaires [128-130]

Polymères protéiques très résistants, les filaments intermédiaires forment un réseau extensible autour du noyau et jusqu'à la membrane cellulaire. Les molécules qui composent les filaments intermédiaires sont des molécules fibreuses allongées, regroupées en une famille d'une cinquantaine de membres, telles que la kératine, la vimentine ou la lamine. La formation des filaments intermédiaires consiste en l'assemblage de dimères superenroulés de manière antiparallèle pour former une unité tétramérique. Le processus d'assemblage et de dissociation est un processus lent et il est très rare de retrouver des formes libres.

Les filaments intermédiaires participent principalement au maintien de l'intégrité cellulaire et au soutien de l'enveloppe du noyau.

1.3 Les septines [131, 132]

Récemment, les septines ont été considérées comme un constituant à part entière du cytosquelette. Les septines peuvent s'associer aux filaments d'actine et aux microtubules et peuvent également former un réseau orthogonal de filaments au niveau de la membrane

cytoplasmique interne. Les septines sont des protéines de liaison au GTP, qui forment des complexes hétéro-oligomériques grâce à leur domaine de liaison au GTP et leur région amino et carboxy-terminale. Le complexe ainsi formé de 4 sous-unités constitutives s'organisent en bâtonnets octamériques symétriques. Leur assemblage aboutit à des filaments non polaires, des réseaux de filaments ou des anneaux.

Les septines participent activement à la division cellulaire, à la compartimentalisation des cellules et aux interactions hôtes – agents pathogènes.

1.4 Les filaments d'actine

Les filaments d'actine se forment par polymérisation de monomères d'actine globulaire (actine G) en présence d'ATP constituant un filament flexible et polaire (actine filament ou actine F) [133]. La première étape débute par la nucléation de trois monomères d'actine G grâce à l'action des protéines de la famille des formines et du complexe Arp2/3 servant d'amorce à la polymérisation. La polymérisation rapide de l'actine en filament, dépendante de l'activité ATPasique de l'actine s'effectue à partir de l'extrémité +, dite « barbue » par incorporation d'actine-ATP [133, 134]. L'extrémité -, dite « pointue » contient des monomères liés à l'ADP qui peuvent être dissociés par dépolymérisation. Les monomères d'actine-ADP sont alors convertis en monomères d'actine-ATP pour être utilisés dans un autre cycle de polymérisation (Figure 11).

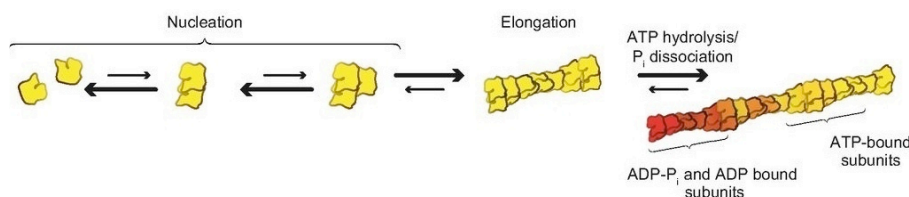


Figure 11 : Formation d'un filament d'actine.

La polymérisation d'un filament d'actine à partir de monomères d'actine G se déroule en 2 phases : une phase de nucléation aboutissant à la formation d'un trimère puis une phase d'élongation à l'extrémité barbue du filament d'actine F. Adaptée de la référence [135].

Structures dynamiques, les filaments d'actine peuvent s'assembler en des réseaux réticulés, notamment dans les lamellipodes, en des réseaux fasciculés non contractiles dans les filopodes ou protrusions et en réseau fasciculés contractiles dans les fibres de stress [134].

La dynamique d'assemblage et de désassemblage des filaments d'actine est régulée par de nombreux facteurs permettant de maintenir une balance de régulation et conférant aux cellules leurs formes et leurs capacités fonctionnelles.

2. Protéines impliquées dans l'architecture des filaments d'actine et régulation

Le cytosquelette d'actine permet la génération et le maintien de la morphologie cellulaire et sa polarisation dans les fonctions d'endocytose, de trafic intracellulaire, de contractilité, de migration et de division cellulaire.

Au sein de la cellule, l'assemblage, le désassemblage et la stabilisation des filaments d'actine sont régulés par une quantité importante de protéines se liant à l'actine (ABP, *actin-binding proteins*) [134, 135]. Les activités de ces ABP sont sous le contrôle de voies de régulation complexes et imbriquées les unes dans les autres. Cette partie résumera les grandes catégories d'ABP. Nous ne développerons en détail que les protéines d'intérêt pour notre travail de thèse.

2.1 Protéines de l'assemblage et le désassemblage des filaments d'actine

Cette catégorie d'ABP contient 3 grandes familles de protéines : les protéines de nucléation, les protéines de régulation de croissance, de stabilité et de désassemblage des filaments d'actine et les protéines de liaison aux monomères [134, 135].

2.1.1 Les protéines de nucléation

La première étape dans la formation de nouveaux filaments d'actine est la nucléation. Les nouveaux filaments peuvent se former à partir de l'extrémité barbue ou en sectionnant un filament existant. Différentes protéines peuvent effectuer cette nucléation, dont le complexe Arp2/3 et les formines [135].

La nucléation à l'extrémité de filaments s'effectue par le complexe Arp2/3, important dans les ramifications à l'extrémité des cellules mobiles. La fixation de ce complexe avec les monomères d'actine G génère un trimère stable, base de départ de la polymérisation du filament [134]. Ainsi, Arp2/3 agit comme une protéine de coiffe qui favorise une croissance rapide des filaments. Son activité est étroitement liée à la protéine WASp (*Wiskott-Aldrich*

Syndrome protein), dont le rôle est probablement de fournir les monomères d'actine à l'extrémité barbue des filaments [135, 136].

D'autre part, la nucléation de l'actine en phase de polymérisation se fait également par les formines. Les formines assemblent des filaments d'actine en faisceaux parallèles. Ces protéines sont normalement recrutées lorsqu'un filopode se développe à l'extrémité d'une cellule en mouvement. Ainsi, elles sont capables de stimuler l'allongement d'un filament d'actine tout en restant accrochées à la membrane plasmique [134].

2.1.2 Les protéines de régulation de croissance, de stabilité et de désassemblage

Une fois nucléés, les filaments d'actine sont capables de s'étendre rapidement par ajout de monomères à l'extrémité barbue. La longueur des filaments est contrôlée par des protéines de coiffe comme la gelsoline qui bloque l'addition de nouveaux monomères. La gelsoline peut aussi sectionner les filaments d'actine, augmentant la dynamique de l'actine [135].

De plus, les protéines les mieux caractérisées dans la dépolymérisation de l'actine sont les facteurs de dépolymérisation de l'actine (ADF) et les protéines de la famille des cofilines. Protéines hautement conservées et ubiquitaires, elles jouent un rôle central dans le « turnover » de l'actine. Elles se fixent à l'actine F-ADP et provoquent la dissociation de l'actine-ADP des extrémités pointues des filaments d'actine [135, 137]. L'effet stabilisateur des filaments contre la dépolymérisation des filaments est favorisé par les tropomyosines, qui se fixent le long des filaments empêchant l'effet de coupure par la gelsoline et de dépolymérisation par la cofiline [134]. Les tropomyosines régulent également les interactions entre les myosines et les filaments d'actine.

D'autre part, la cofiline s'est révélée être une protéine d'intérêt dans notre travail de thèse, nécessitant plus de détails pour la compréhension des résultats obtenus.

Protéine centrale dans le contrôle de la dynamique de l'actine en catalysant la polymérisation et la dépolymérisation de l'actine, la cofiline peut décomposer des filaments d'actine, contrôler le renouvellement des filaments, le flux et le pool de monomères d'actine pour les phases de polymérisation [138]. Elle est distribuée dans la totalité de la cellule mais sa proportion est augmentée dans la partie corticale de la cellule, à proximité de la membrane

plasmique et en avant dans les cellules migratoires. Un modèle de son cycle d'activité est présenté dans la figure 11.

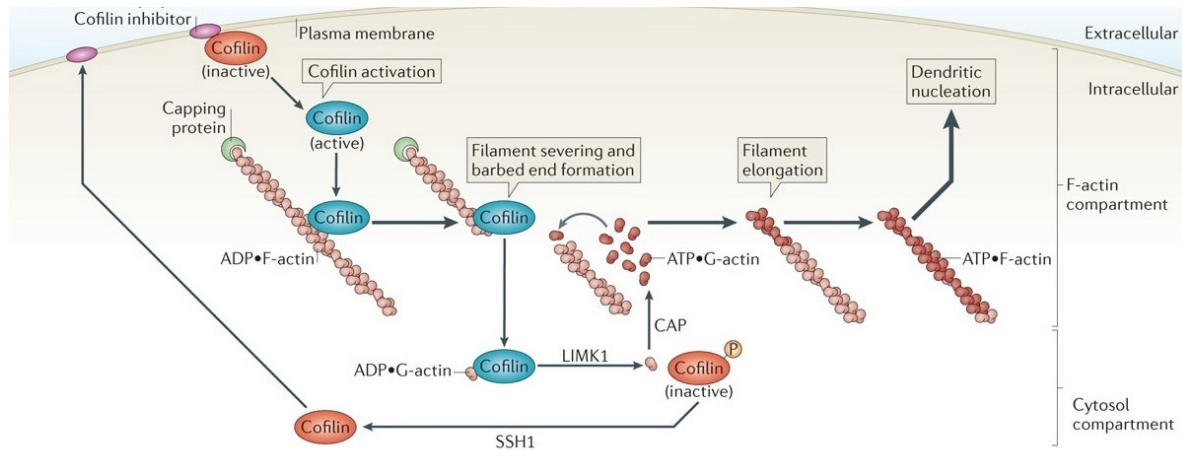


Figure 12 : Cycle d'activité de la cofiline.

Après déphosphorylation ou détachement de son partenaire inhibiteur, la cofiline située sous la membrane plasmique s'active et coupe les filaments d'actine, générant des extrémités barbues libres. La cofiline est alors liée à des monomères d'actine G-ADP. La LIM kinase (LIMK1) dissocie le complexe cofiline – actine G-ADP par phosphorylation de la cofiline. Les monomères d'actine G-ATP sont disponibles pour les processus d'élongation des filaments d'actine. Enfin, la cofiline est ensuite recyclée à son compartiment initial [139].

La cofiline possède 2 sites de liaison à l'actine : le site G/F requis pour la liaison à l'actine F et l'actine G et impliqué dans les activités de dépolymérisation, et le site F, responsable de la liaison à l'actine F et de l'activité de coupe [140]. Comme mentionné précédemment, sa liaison à l'actine F-ADP au niveau des extrémités pointues permet de couper de vieux filaments ou des filaments pré-existants pour former des extrémités libres barbues. Grâce aux activités de coupe et de dépolymérisation générant une augmentation de la concentration en actine G, la cofiline participe à l'assemblage des filaments d'actine en accentuant la quantité d'actine G et le renouvellement des filaments d'actines.

Plusieurs mécanismes ont été reportés pour contrôler l'activité de la cofiline et ainsi inhiber son activité (Figure 13) : phosphorylation sur la sérine 3 de la cofiline en réponse à des signaux extracellulaires, liaison à des phospho-inositols, oxydations ou baisse du pH intracellulaire [141, 142]. La protéine majeure de phosphorylation de la cofiline est la LIM kinase, sous la dépendance des voies de signalisation de Rho-ROCK et Cdc42/Rac. Cette

phosphorylation conduit à inhiber ses activités de liaison à l'actine F, de coupure des filaments et de dépolymérisation [137].

A l'inverse, la cofiline peut redevenir active par déphosphorylation sous l'action de différentes phosphatases : la chronophrin (CIN), la famille des *slingshot* phosphatases (SSH) ou des protéines phosphatases de type 1 et 2A (PP1 et PP2A). Ainsi, la balance d'activités entre les kinases et les phosphatases est cruciale dans la détermination du niveau de phosphorylation et de l'activité de la cofiline [142-145]. Elle est régulée par de nombreuses voies de régulation incluant des tyrosines kinases ou les membres de la famille des GTPases.

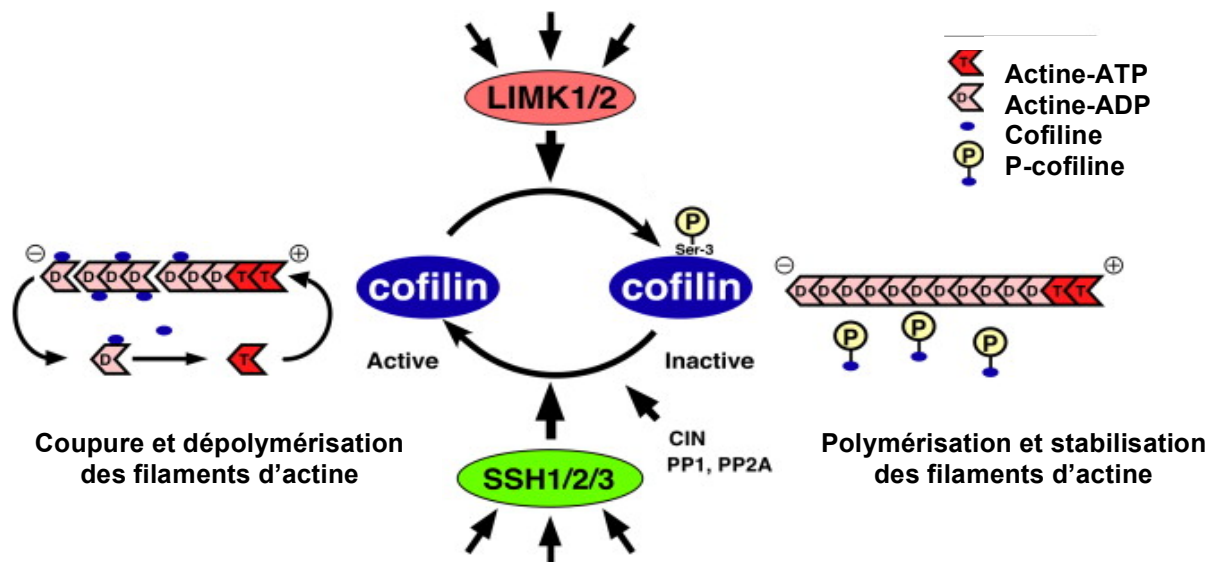


Figure 13 : Contrôle de la dynamique des filaments d'actine par la cofiline.

La cofiline se lie prioritairement à l'actine F-ADP, stimule la coupure et la dépolymérisation des filaments d'actine. La cofiline est inactivée par phosphorylation de la sérine 3 par les LIMKs et est réactivée par les phosphatases CIN, SSH, PP1 et PP2A. Adaptée de la référence [142].

2.1.3 Les protéines de liaison aux monomères

La croissance rapide des filaments d'actine dans les cellules en migration et suite aux réponses intracellulaires et extracellulaires nécessite une régulation fine de la disponibilité des monomères d'actine. La famille des ADF/cofiline participe à cette action, tout comme la profiline qui facilite l'échange de l'ADP par de l'ATP [134].

2.2 Protéines d'organisation des filaments d'actine

L'organisation des filaments d'actine en réseau et en structure est cruciale pour la morphologie et les fonctions cellulaires. A l'exception des ramifications formées par les complexes Arp2/3, toutes les autres structures des filaments d'actine sont formées par 2 types d'ABP : les protéines de fasciculation, telle que la fimbrine, et les protéines de réticulation, comme la filamine [134, 135].

A titre d'exemple, la formation de réseau d'actine fasciculé résulte de l'alignement de filaments d'actine parallèles ou anti-parallèles, en ligne droite, maintenus par des protéines disposant le plus souvent de 2 sites de fixation de l'actine, telle que la fimbrine. Ce réseau se retrouve dans les filopodes, fins prolongements de membranes contenant des filaments d'actine parallèles associés.

2.3 Protéines de contractilité des filaments d'actine

Une tension interne peut être exercée sur les cellules dans les mécanismes d'adhésion, de polarité cellulaire ou encore de migration. La principale famille de protéines impliquées dans cette tension ou contractilité est la famille des myosines. La myosine et notamment la myosine II forme avec l'actine un réseau contractile intra-cytoplasmique ayant pour principales fonctions de réguler les tensions de la cellule et d'éviter son étalement anarchique [134].

Impliquées dans de nombreux processus cellulaires dynamiques, les myosines II sont des moteurs moléculaires dépendant de l'actine qui produisent un mouvement par l'hydrolyse de l'ATP. Les myosines II sont des protéines hexamériques composées de trois paires d'éléments : les 2 chaînes lourdes (MHC), les 2 chaînes légères essentielles (ELC) et les 2 chaînes légères régulatrices (MLC). Les chaînes MHC sont composées de 3 éléments : la tête, le cou et la queue [146].

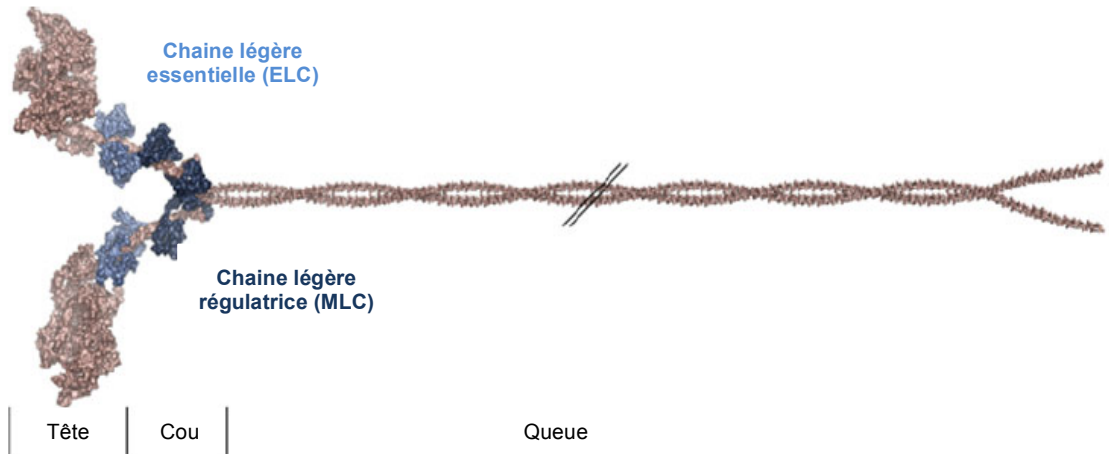


Figure 14 : Structure des myosines II.

Composés hexamériques, les myosines se composent de 2 chaînes lourdes divisées en 3 parties : la tête, le cou et la queue de longueur variable. Les chaînes légères, essentielles et régulatrices se fixent sur le cou des chaînes lourdes. Adaptée de la référence [146].

La tête de la MHC contient le site de fixation à l'actine, dépendant de l'activité ATPasique. Alors que le cou permet la fixation des autres chaînes pour stabiliser les MHC, la queue reste la région la plus variable en terme de longueur et de fonctions [147-149]. La tête de la myosine II peut fixer l'ATP entraînant son détachement des molécules d'actine. Cet ATP est alors hydrolysé en ADP + Pi. La libération du Pi induit un changement de conformation conduisant au déplacement de la tête de la myosine qui finit par se re-fixer sur une autre molécule d'actine. Cet enchaînement dans le cycle de l'ATP permet une avancée des filaments d'actine [146].

Les myosines II s'assemblent de manière antiparallèle par l'intermédiaire de leurs queues pour former un homodimère liant deux filaments d'actine. Grâce à cette association, les myosines peuvent « se déplacer » le long des filaments d'actine et exercer des forces sur l'actine-F [150].

D'autre part, les MLC portent l'activité régulatrice des myosines II. L'activité ATPasique des myosines est hautement dépendante de la phosphorylation des chaînes MLC (Figure 15). Dans l'état inactif de la myosine, les MLC, déphosphorylées, sont en structure compacte ne permettant pas la liaison à l'actine. La phosphorylation des MLC en thréonine 18 et sérine 19 conduit au dépliement de la myosine et à son activation. Les principales kinases responsables de l'activation des myosines par phosphorylation sont la MLCK (*myosin light-*

chain kinase) et la Rho Kinase ROCK (*Rho-associated, coiled coil-containing kinase*) [148, 149]. A l'inverse, les MLC peuvent être déphosphorylées par des myosines phosphatases, comme la protéine phosphatase 1 (PP1) ou par la MLCP (*myosin light chain phosphatase*). La MLCP possède une sous-unité active, la MYPT1 (*myosin phosphatase-targeting sub unit 1*), rendue inactive par phosphorylation par ROCK. Dans son état actif, la MYPT1 est déphosphorylée, conduisant à une déphosphorylation de la MLC et à une inactivation de la myosine II [150]. Il semblerait que la chaîne lourde des myosines peut également être phosphorylée.

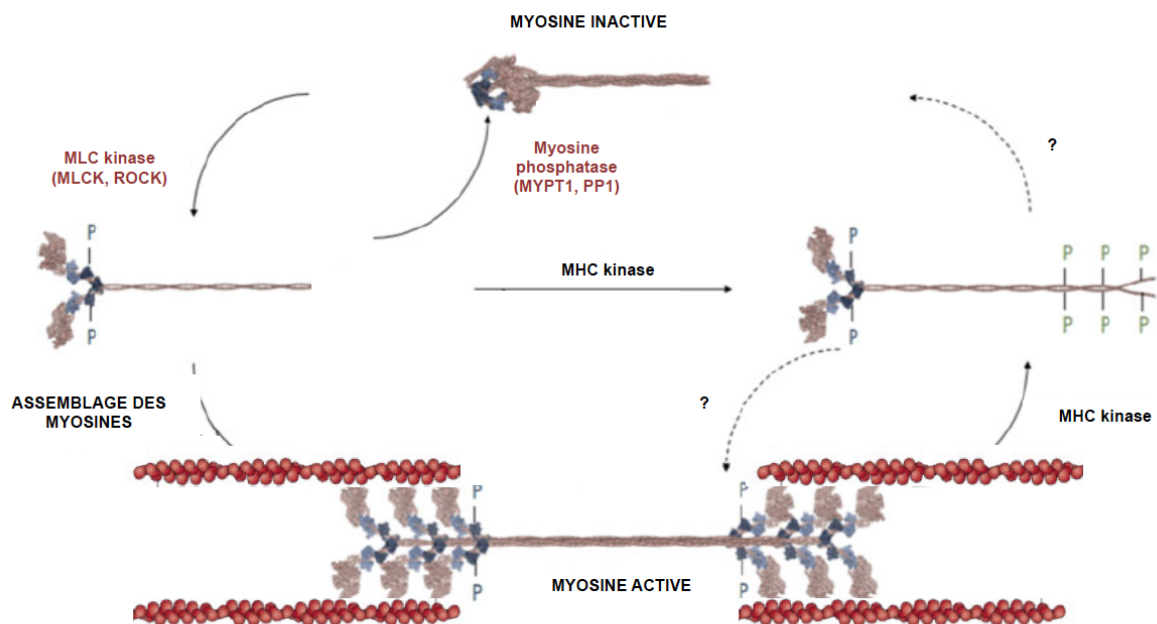


Figure 15 : Régulation de l'activité des myosines.

Les myosines II déphosphorylées sont dans un état replié et inactif. La phosphorylation de la chaîne légère régulatrice par des kinases conduit à son activation et permet l'assemblage entre myosines II et sur les filaments d'actine, autorisant une contractilité du cytosquelette d'actine. La déphosphorylation par des myosines phosphatases de type MYPT1 permet le retour à l'état inactif. Adaptée de la référence [146].

Enfin, il existe d'autres ABP fondamentales dans l'organisation des réseaux de filaments d'actine, telles que les protéines de liaison entre la membrane plasmique et les filaments d'actine (ERM pour *Ezrin Radixin Moesin* [151]), ou encore les protéines permettant une connexion entre les filaments d'actine et les récepteurs d'adhésion cellulaire ou intégrines (taline, vinculine).

2.4 Régulation du cytosquelette d'actine

Les paragraphes précédents ont montré que l'architecture du cytosquelette d'actine est dépendante de nombreuses protéines impliquées dans les processus de nucléation, de polymérisation, de dépolymérisation et de contractilité. Pour se faire, une régulation fine et complexe est indispensable. Devant la complexité de ces régulations, nous ne présenterons que la régulation des protéines d'intérêt par la famille des Rho-GTPases, sans pour autant négliger l'implication d'autres voies de régulation dans nos travaux de recherche.

Les composants centraux dans la régulation de l'architecture des filaments d'actine sont les petites GTPases de la famille de Rho, et notamment Rho, Rac et Cdc42. Elles peuvent se trouver dans 2 états inter-convertibles d'activité en fonction de la liaison au GTP ou au GDP : un état inactif cytosolique lorsqu'elles sont liées au GDP, et un état actif localisé à la membrane plasmique et dans certains compartiments cellulaires lorsqu'elles sont liées au GTP. Le cycle d'échange du GDP et du GTP est régulé par des facteurs d'échange (Figure 16), tels que GEF (*Guanine nucleotide Exchange Factors*) qui catalyse la formation de GTP et l'activation des GTPases, GAP (*GTPase-Activating Proteins*) qui hydrolyse le GTP rendant la GTPase inactif et GDI (*guanine nucleotide dissociation inhibitors*) qui séquestre les GTPases dans leur état inactif [152].

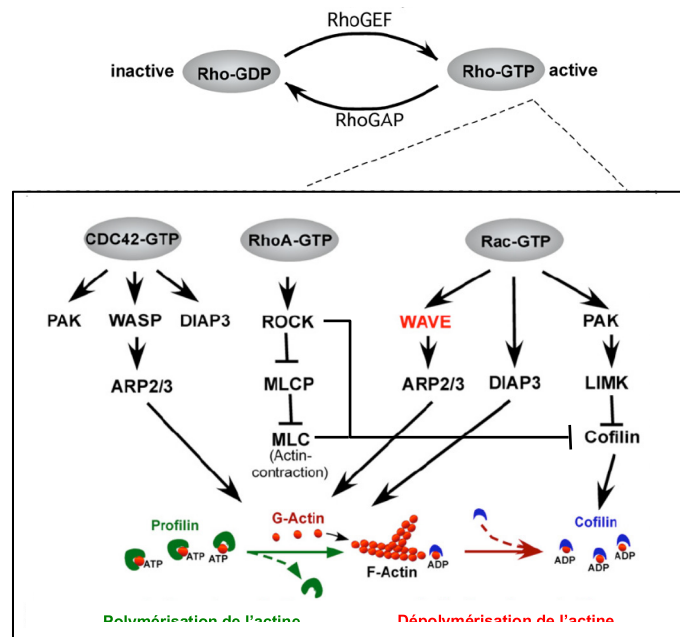


Figure 16 : Régulation de la polymérisation et de la dépolymérisation des filaments d'actine par les Rho GTPases. Adaptée de la référence [136].

La figure 16 illustre de manière simplifiée les protéines impliquées dans chaque voie de signalisation des GTPases. La GTPase RhoA conduit à la phosphorylation des myosines et de la cofiline par l'intermédiaire de ROCK. Pour la myosine, ROCK phosphoryle à la fois la MLC des myosines directement, mais aussi la sous-unité régulatrice de la MLCP, la rendant inactive et renforçant la phosphorylation des myosines [153]. Impliquée dans la polymérisation de l'actine dans les lamellipodes, la GTPase Rac intervient sur le complexe Arp2/3, sur les formines pour la nucléation mais aussi sur la cofiline par l'intermédiaire de PAK (p21-activated kinase) [153]. La GTPase Cdc42 de son côté semble plus importante dans la formation des filopodes par activation des complexes Arp2/3.

Toutes ces voies de signalisation sont interconnectées entre elles et dépendantes d'autres facteurs extérieurs. L'activation ou l'inhibition d'une voie de signalisation influe sur l'activité des autres GTPases.

3. Rôle du cytosquelette d'actine dans les fonctions immunitaires

Le cytosquelette d'actine est finement régulé par de nombreuses protéines et voies de régulation. Comme mentionné précédemment, ce réseau complexe est impliqué dans de nombreux processus cellulaires. Il n'est pas étonnant de comprendre qu'il est la base des fonctions cellulaires des cellules immunitaires, et notamment des cellules dendritiques et des macrophages. Nous allons développer quelques fonctions des macrophages et des cellules dendritiques et montrer le rôle du cytosquelette d'actine et des protéines de régulation dans la formation des podosomes des cellules dendritiques, dans la phagocytose des macrophages et des cellules dendritiques et dans la migration des cellules dendritiques.

3.1 L'actine dans la structure des podosomes des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques communiquent avec leur environnement et notamment la matrice extracellulaire. Cette communication bidirectionnelle entre l'environnement et le cytosquelette d'actine s'effectue par l'intermédiaire d'intégrines, localisées le plus souvent dans des structures d'adhérence. Les cellules dendritiques, principalement les cellules dendritiques immatures possèdent de telles structures appelées podosomes. Ces podosomes leur permettent de franchir les barrières anatomiques grâce à la présence de métalloprotéases

dans le cœur d'actine des podosomes. Les podosomes remodelent la matrice extracellulaire, la dégradent pour faciliter la formation de protrusions [154, 155].

Micro-domaines d'adhérence localisés au niveau de la membrane plasmique, les podosomes sont constitués d'un cœur d'actine relié aux filaments d'actine et de protéines responsables de la polymérisation et de la dépolymérisation de l'actine comme le complexe Arp2/3 ou la gelsoline [156]. L'ensemble est entouré de protéines structurales et de signalisation, impliquées dans la contractilité des podosomes comme la myosine II ; ou dans la liaison et l'activation des intégrines, telles que FAK, la vinculine, la taline ou la paxilline [157, 158] (Figure 17). Les podosomes sont des structures dynamiques qui fusionnent et se dissolvent rapidement pour se reformer ensuite. La croissance du cœur d'actine par polymérisation génère des tensions à l'intérieur des réseaux d'actine et ces tensions, à l'origine du recrutement d'autres protéines et à l'intégrité des podosomes, impliquent fortement la fonction contractile des myosines II [159]. L'assemblage des podosomes est sous la dépendance de voies de régulation communes avec l'organisation du réseau d'actine, dont les GTPases de la famille Rho, la voie Src ou PI3K [160, 161].

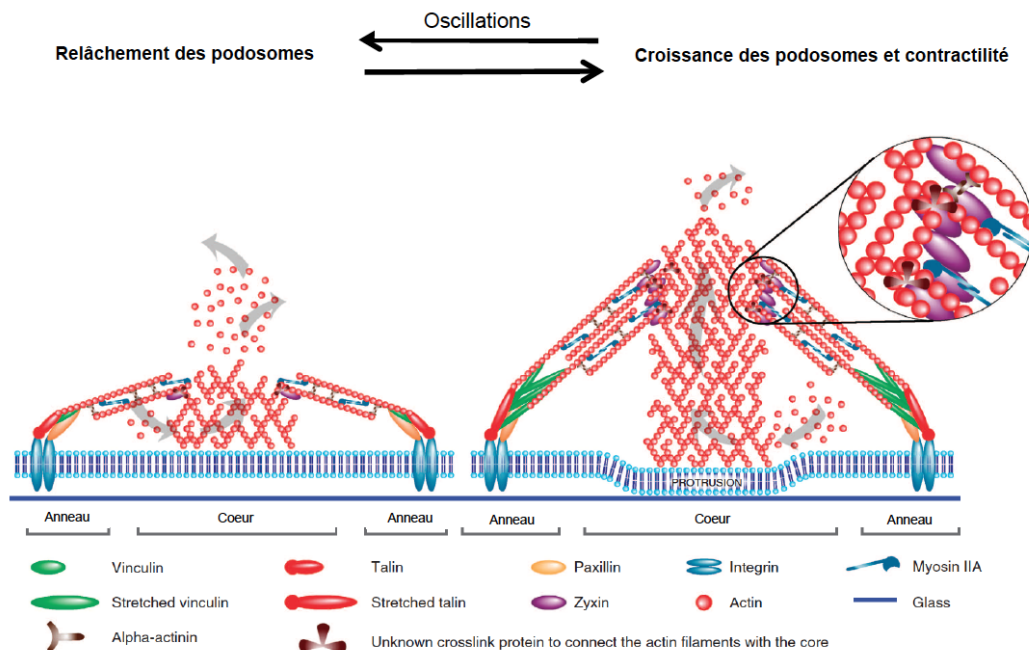


Figure 17 : Composition et dynamique des podosomes.

Les podosomes sont composés d'un cœur d'actine relié au cytosquelette d'actine et entouré d'un anneau constitué de protéines de liaison à l'actine et d'intégrines. La croissance des podosomes s'accompagne d'une contractilité des filaments d'actine induite par les myosines IIa. Adaptée de la référence [159].

3.2 L'actine dans la phagocytose des cellules dendritiques et des macrophages

La phagocytose est un processus d'internalisation employé par les cellules spécialisées du système immunitaire comme les macrophages, les cellules dendritiques et les polynucléaires neutrophiles. Elle permet d'internaliser des micro-organismes, des particules ou des débris cellulaires à partir de récepteurs cellulaires comme les récepteurs pour la partie Fc des immunoglobulines (FcR) ou les récepteurs du complément (CR3). Les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigène, qui après internalisation et dégradation des composés, vont apprêter les antigènes protéiques issus de la dégradation à leur surface cellulaire. Ce processus fondamental a pour fonction d'activer des lymphocytes lors de l'immunité adaptative. Ces cellules, notamment dans leur état immature, sont de puissants phagocytes [162].

La phagocytose demande une déformation importante de la morphologie des cellules et de la membrane plasmique qui repose sur des modifications transitoires du réseau d'actine. Ainsi, la polymérisation intense de l'actine, associée à une activité contractile génère une force permettant la déformation de la membrane et la fermeture du phagosome avant d'être complètement internalisés [163-165]. Tout comme dans la formation des podosomes, de nombreuses protéines de liaison et de régulation de l'actine sont impliquées dans toutes les étapes de phagocytose (Figure 18).

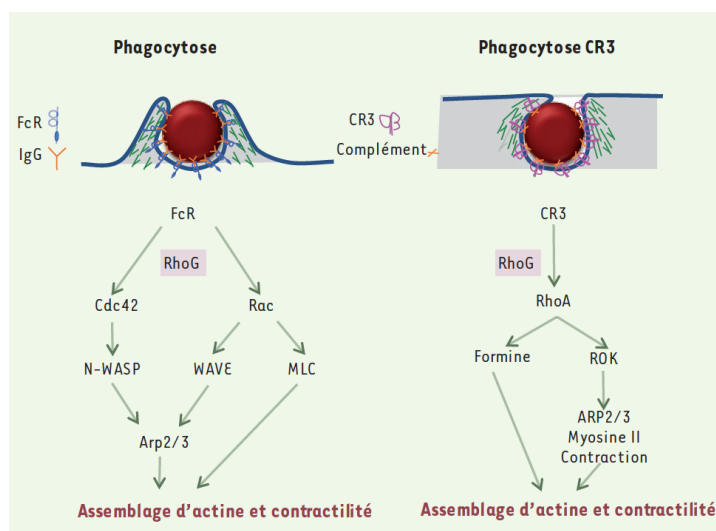


Figure 18 : Voies de signalisation impliquées dans la formation des coupes phagocytaires lors des phagocytoses FcR et CR3.

Selon le type de phagocytose, les GTPases de la famille Rho sont les éléments centraux dans la formation de la coupe phagocytaire conduisant à la polymérisation de l'actine et la contractilité de ce réseau [163].

Selon le type de phagocytose, les voies de régulation sont différentes mais font intervenir les GTPases de la famille Rho. La phagocytose FcR requiert les voies Cdc42 et Rac, et principalement le complexe Arp2/3 comme nucléateur alors que la phagocytose CR3 implique seulement la voie RhoA-ROCK avec un rôle pour les formines. Il n'est pas étonnant de constater que les myosines jouent un rôle fondamental dans ces 2 types de phagocytose, comme l'ont montré des expériences d'inhibition des myosines II ou de la MLCK [166].

D'autre part, il a été montré que la cofiline est recrutée au niveau des coupes phagocytaires se formant lors de l'initiation de la phagocytose et qu'elle semblerait avoir un rôle majeur dans les étapes de la phagocytose [167-170].

Ainsi, la dynamique de l'actine est la pièce maîtresse dans les étapes de phagocytose (Figure 19). Les perturbations des voies de régulation et des protéines associées à l'actine engendreraient une modification des capacités phagocytaires des cellules.

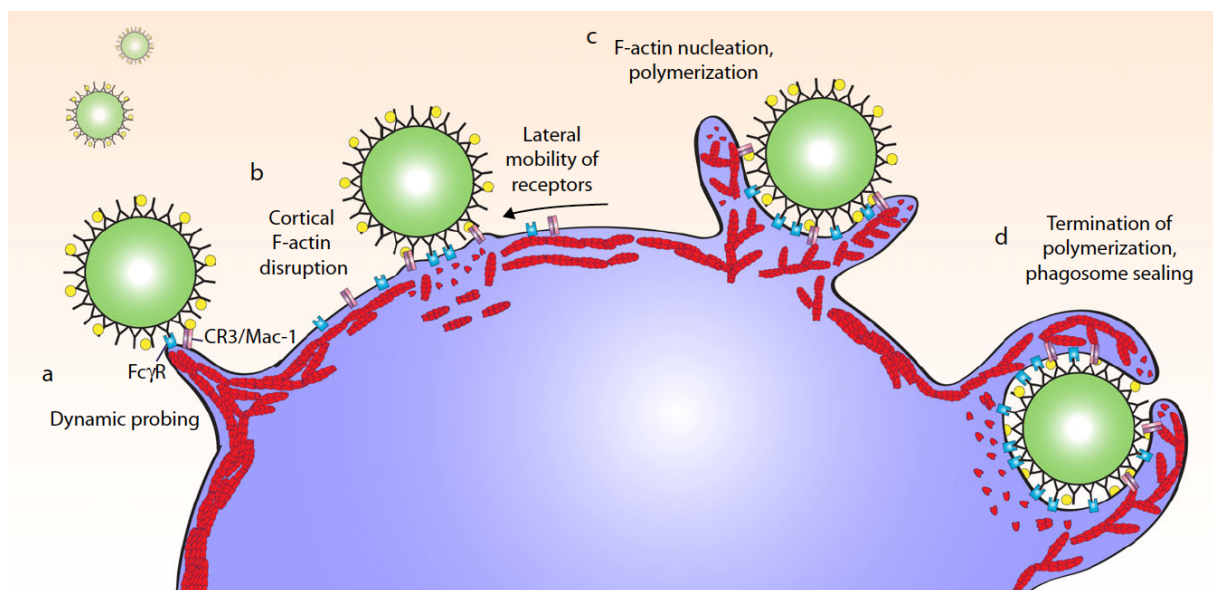


Figure 19 : Implication des filaments d'actine dans les étapes du processus phagocytaire.

La formation de filopodes et de « membrane ruffling » permet de lier des particules ou agents pathogènes à internaliser. La liaison de ces éléments sur les récepteurs FcR ou CR3 conduit à une destruction locale des filaments d'actine couplée à un recrutement d'autres récepteurs cellulaires. Afin de former la coupe phagocytaire, les filaments d'actine sont nucléés pour débiter la polymérisation et l'englobement complet de l'élément à phagocyter. L'intervention des myosines dans la phase tardive permet la contraction des filaments d'actine autour de la particule [164].

3.3 L'actine dans le processus de migration des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont des sentinelles du système immunitaire et forment un intermédiaire indispensable entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Particulièrement importantes dans les tissus, comme la peau, le tissu intestinal et le tissu respiratoire, les cellules dendritiques rentrent rapidement en contact avec les agents pathogènes grâce à de nombreux récepteurs cellulaires. Après phagocytose des agents pathogènes, elles initient des changements phénotypiques à l'origine de leur maturation. Cette maturation s'accompagne entre autres d'une sur-expression des récepteurs aux chimiokines CCR7 et CXCR4. Pour activer les réponses immunes, les cellules dendritiques doivent migrer dans les ganglions lymphatiques drainants (revue référence [171]). Bien que les mécanismes régulant la migration des cellules dendritiques ne soient pas pleinement compris, nous allons aborder quelques points importants pour la compréhension de notre travail.

Première étape dans la migration des cellules dendritiques, la transmigration consiste au passage des cellules dendritiques à travers l'endothélium des vaisseaux lymphatiques. Les cellules dendritiques tissulaires doivent migrer à travers la matrice extracellulaire et les cellules endothéliales pour rejoindre le réseau lymphatique [172] et les ganglions drainants. Ce processus, moins bien décrit pour les cellules dendritiques semble impliquer les intégrines de surface qui se lient aux récepteurs cellulaires de l'endothélium VCAM et ICAM, ainsi que le cytosquelette d'actine et les protéines de régulation (revue référence [173]). Les myosines II, après activation par la semaphorine 3A, induisent une contraction cellulaire indispensable à la transmigration des cellules dendritiques à travers l'endothélium lymphatique [171, 174].

D'autre part, une étude récente a montré que les cellules dendritiques peuvent migrer indépendamment des intégrines et des molécules d'adhésion, en périphérie et dans les tissus lymphoïdes, c'est à dire dans un environnement confiné [175], ce qui n'est pas applicable sur une surface plane. Cette migration, dite amiboïde, résulte du flux rétrograde généré par les complexes d'actomyosine pour compenser l'absence d'adhésion : le réseau d'actine est propulsé à l'avant de la cellule par des contractions d'actomyosine à l'arrière de la cellule. Ces contractions sont provoquées par les myosines II. La polymérisation de l'actine à l'avant des cellules dendritiques et l'activation des myosines II à l'arrière de la cellule sont 2 paramètres fondamentaux, qui après altération pourraient influencer sur la vitesse et la migration en elle-même [176]. D'autres études ont suivi pour démontrer que la myosine II est essentielle

à une migration rapide des cellules dendritiques [177, 178]. L'activité motrice de la myosine II semble requise pour la migration des cellules dendritiques *ex vivo* et *in vivo* [175, 179]. D'autre part, l'équipe de Lennon-Duménil a montré très récemment que la fonction de capture des antigènes et la fonction de migration des cellules dendritiques sont coordonnées dans l'espace et dans le temps et seraient antagonistes [178]. L'enrichissement transitoire de la myosine IIA à l'avant des cellules provoque un ralentissement de la vitesse de migration mais favorise la capture des antigènes par macropinocytose.

La myosine II étant cruciale dans tous ces processus de migration des cellules dendritiques, il n'est pas étonnant de constater que l'inhibition combinée de ROCK et MLCK atténue la migration de ces cellules [177]. La voie des Cdc42 semble aussi importante pour la migration des cellules de Langerhans dans les vaisseaux lymphatiques [180-182]. D'autres protéines de l'actine comme les formines [183] ou les protéines de coiffe [184] sembleraient impliquées dans la migration.

Certaines études impliqueraient les podosomes des cellules dendritiques dans les processus de migration mais certainement lors des phases d'immobilisation [185].

Comme nous venons de le voir, le processus de migration des cellules dendritiques est très complexe et dépendant de l'environnement des cellules dendritiques. Il devient clair que le cytosquelette d'actine, la myosine II et les protéines de liaison et de régulation jouent une part importante dans cette fonction.

4. Le cytosquelette d'actine, comme cible émergente des toxines : exemple de *Bacillus anthracis*

A la vue des éléments décrits précédemment, il n'est pas étonnant de comprendre que le cytosquelette d'actine est une cible principale des agents pathogènes bactériens ou viraux, et des toxines des bactéries. Les études d'interaction entre les agents pathogènes, leurs facteurs de virulence et le cytosquelette d'actine se sont considérablement multipliées ces dernières années et de nombreuses revues permettent régulièrement de faire une synthèse des dernières avancées dans ce vaste domaine qu'est l'interaction hôte-agents pathogènes. Cette partie n'a pas pour vocation de reprendre ces éléments. Certains aspects généraux sont donnés ci-dessous pour introduire l'intérêt de l'étude du cytosquelette d'actine dans les interactions entre les toxines de *Bacillus anthracis* et les cellules immunitaires. Nous terminerons cette

partie par la revue que nous avons écrite pour mettre en évidence le cytosquelette comme cible émergente des toxines de *Bacillus anthracis*.

Le cytosquelette d'actine est hautement concerné dans les infections microbiennes : ainsi, le réseau d'actine cortical représente une barrière physique à l'invasion des pathogènes et peut être détourné par les pathogènes pour pénétrer les cellules ; certains pathogènes utilisent le cytosquelette d'actine pour se déplacer, croître et se diviser à l'intérieur de la cellule ou encore pour contourner les réponses immunes déclenchées par les cellules hôtes [141, 186]. D'autres pathogènes sécrètent des facteurs de virulence ou ont développé des mécanismes permettant d'utiliser la machinerie de polymérisation/dépolymérisation de l'actine pour créer un environnement propice à leur développement. Certaines toxines bactériennes modifient directement les molécules d'actine et sont réparties en 3 groupes : les toxines conduisant à une ADP-ribosylation des molécules d'actine sur l'arginine 177, provoquant une dépolymérisation des filaments d'actine ou une absence de polymérisation, les toxines induisant une polymérisation de l'actine ou encore les toxines favorisant la réticulation des filaments d'actine (revue référence [187]).

Les ABP sont aussi des cibles privilégiées des pathogènes. Les virus et les bactéries peuvent interagir et moduler l'activité de la cofiline pour faciliter leur entrée, leur réplication, leur mobilité à l'intérieur de la cellule et l'évasion du système immunitaire (revue référence [141]). Les facteurs de virulence sécrétés par les bactéries et les toxines peuvent également exploiter les GTPases de la famille Rho pour faciliter l'invasion cellulaire et la prolifération à l'intérieur de la cellule hôte (revue référence [188-190]). Ces toxines peuvent modifier l'activité des GTPases par des séries de glucosylation, d'adénylation ou de protéolyse par exemple, ou par des modulations des effecteurs GAP et GEF des GTPases.

Le cytosquelette comme une cible émergente des toxines de *Bacillus anthracis*

Yannick Trescos, Jean-Nicolas Tournier.

Toxins, 2012

Toxins 2012, 4, 83-97; doi:10.3390/toxins4020083

OPEN ACCESS

toxins

ISSN 2072-6651

www.mdpi.com/journal/toxins

Review

Cytoskeleton as an Emerging Target of Anthrax Toxins

Yannick Trescos^{1,2} and Jean-Nicolas Tournier^{1,2,*}

¹ Unité Interactions Hôte-Agents pathogènes, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Centre de Recherche du Service de Santé des Armées, BP 87, 24 avenue des Maquis du Grésivaudan 38702 La Tronche Cedex, France; E-Mail: yannick.trescos@yahoo.fr

² Ecole du Val-de-Grâce, 1 place Alphonse Lavéran, 75005 Paris, France

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: jntournier@gmail.com; Tel.: +33-4-76636850; Fax: +33-4-76636917.

Received: 10 January 2012; in revised form: 21 January 2012 / Accepted: 26 January 2012 /

Published: 6 February 2012

Abstract: *Bacillus anthracis*, the agent of anthrax, has gained virulence through its exotoxins produced by vegetative bacilli and is composed of three components forming lethal toxin (LT) and edema toxin (ET). So far, little is known about the effects of these toxins on the eukaryotic cytoskeleton. Here, we provide an overview on the general effects of toxin upon the cytoskeleton architecture. Thus, we shall discuss how anthrax toxins interact with their receptors and may disrupt the interface between extracellular matrix and the cytoskeleton. We then analyze what toxin molecular effects on cytoskeleton have been described, before discussing how the cytoskeleton may help the pathogen to corrupt general cell processes such as phagocytosis or vascular integrity.

Keywords: anthrax toxins; cytoskeleton; actin; phagocytosis; vascular integrity

1. Introduction

Bacillus anthracis, the agent of anthrax, is a common veterinary disease and major agent of biological warfare important for biodefense [1]. The attacks in 2001, consisting of letters contaminated with anthrax spores in the United States, have confirmed its potential use as a weapon of bioterrorism and justify the growing need to understand the pathophysiology of this dreadful pathogen [2]. *B. anthracis* is a gram-positive, aerobic bacterium that can form very resistant spores in poor environments. Its virulence is linked to two main factors: the capsule formed by poly γ -D-glutamic

acid, whose operon is encoded by the plasmid pXO2, and the two toxins (edema toxin (ET) and lethal toxin (LT)) encoded on the other virulence plasmid named pXO1 [3,4]. By pulmonary route of infection, *B. anthracis* induces a toxemia associated with sepsis and respiratory distress within a few days, rapidly progressing to death without treatment [5,6]. Anthrax toxins play a central role in pathogenesis and deregulation of the immune system (review in [7,8]). At the cellular level, many toxin effects have been described (review in [4,9]). Some studies have suggested that the toxins also target the cytoskeleton [10–15]. We attempt here to review how the anthrax toxins may interact with the cytoskeleton, a crucial component of eukaryote cells crucially involved in homeostasis.

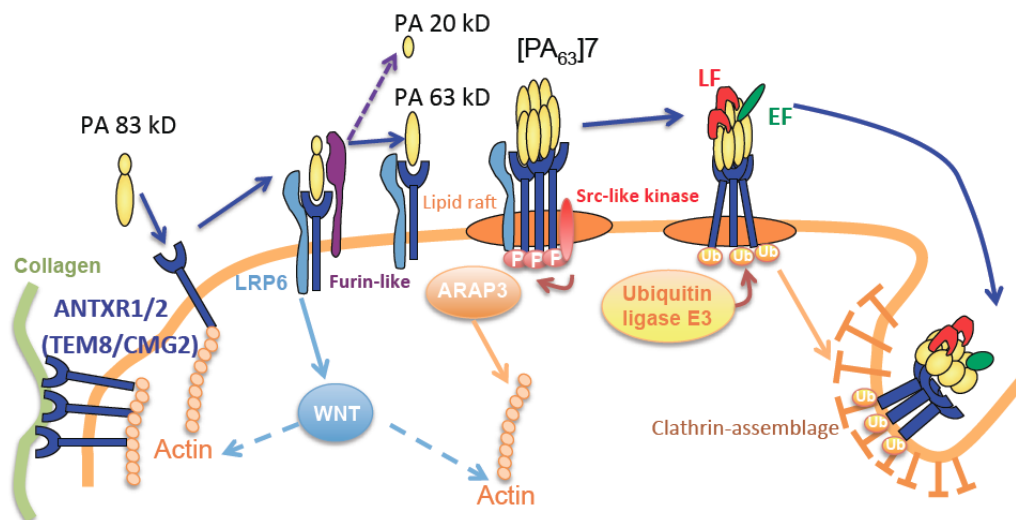
2. General Overview on *Bacillus anthracis* Toxins and the Cytoskeleton

2.1. *Bacillus anthracis* Toxins

The toxins are A/B type, formed by the association of three components. Components A bear the enzymatic activity. Edema factor (EF, 89 kDa) for ET is a calmodulin-dependent adenylate cyclase, that increases intracellular cAMP concentrations [4,16], while lethal factor (LF, 90 kDa) for LT is a zinc-dependent metalloprotease cleaving specifically the *N*-terminus of most mitogen-activated protein kinase kinases (MAPKK or MEK) [4,17]. This MEK cleavage disrupts signaling cascades essential in cell proliferation, cell cycle regulation and immune function, such as ERK 1/2, JNK/SAPK and p38, signaling pathways (review in [4,7]). The B component, involved in binding cell receptor, is common for both toxins: it is named protective antigen (PA, 83 kDa), after its immunogenic properties (review in [9,18]). The mechanisms of cell penetration by toxins have been thoroughly deciphered over the past twenty years and can be separated into three major steps: receptor binding, internalization, membrane translocation (reviewed in [9,18]). PA₈₃ binding to specific cell receptors (ANTXR1 or TEM-8 for Tumor Endothelial Marker-8 and ANTXR2 or CMG-2 for Capillary Morphogenesis Protein-2) [19] allows its cleavage by a furin-like protein into two subunits of 63 and 20 kDa, the latter being released (Figure 1). A third co-receptor named LDL receptor protein (LRP)-6 has been proposed [20], while its effective role has been discussed and may be cell-type specific [21,22]. Interestingly, a group has demonstrated that anthrax toxin receptors interact with LRP6 to control Wnt signaling [23].

PA₆₃ subunits associate in heptamers to form a pre-pore, redistributed to the cell surface in lipid rafts. This allows the binding of EF or LF components in a stoichiometric ratio of 3 LF/EF to 7 PA. The toxin-receptor complex is then internalized by clathrin-dependent endocytosis [9,24,25]. A pH decrease within early endosomes results in the translocation of these factors in multivesicular bodies (MVB), finally merging with the intracellular membrane of late endosomes. This last step facilitates the translocation of LF into the cytoplasm, while EF stays associated to the membrane of the late endosome [26]. Its perinuclear localization generates intracellular cAMP gradients from the cell nucleus to the periphery. Interestingly, mouse mutants for each toxin receptor have been produced, showing that CMG-2 plays a unique role as a major receptor of anthrax toxin *in vivo* [27].

Figure 1. Interactions between anthrax toxin receptors and cytoskeleton. This figure highlights the links between cytoskeleton, anthrax toxin receptor (ANTXR) and the extracellular matrix. The physiological roles of ANTXR are not well known so far, unless they interact with extracellular matrix fibers. Their intracellular tail interacts with actin, and there is an inverse correlation between the binding of TEM8 to actin and the amount of protective antigen (PA) bound to receptors. After PA-ANTXR interaction, at least several signals can be sent to trigger PA endocytosis: (i) PA-ANTXR interactions trigger *src*-like kinase which in turn phosphorylates CMG-2 and TEM-8 intracellular tail favoring the toxin intracellular entry; (ii) a second target for anthrax receptor signaling may be ARAP3 (Arf GAP and Rho GAP with ankyrin repeat and pleckstrin homology domains); (iii) LRP6 coreceptor control Wnt signaling.



2.2. The Cytoskeleton

The cytoskeleton is a cellular scaffolding system whose functions include broad fundamental cell processes such as morphology and plasticity maintenance, movement, signal transduction, membrane and organelle trafficking. The cytoskeleton consists of three filament systems integrated into a complex network regulated by associated proteins: (i) actin microfilaments; (ii) microtubules; and (iii) intermediate filaments. As anthrax toxin effects have been described only on actin filaments and microtubules, we will restrict our description on these two systems.

Microfilaments are formed by a globular protein called actin, which exists in unpolymerized (G-actin) and polymerized (F-actin) forms. F-actin is composed of two parallel strands of actin monomers. The dynamic and spatial organization of the actin cytoskeleton is regulated at multiple levels by a variety of proteins that control numerous processes such as nucleation, polymerization, stabilization, branching and cross-linking of actin filaments [28–30]. Moreover, these regulatory and structural proteins enable cells to form and remodel functional structures like stress fibers, lamellipodia, filopodia, phagosomes and endocytic vesicles [30–32]. These macromolecular scaffolding structures are regulated by a complex interplay of Rho GTPases, kinases and phosphatases, which are again affected by bacterial pathogens or toxins [33,34]. The Rho GTPases are master regulators of

cytoskeletal dynamics and cell shape [35], immune responses [36,37] and phagocytosis [38]. The three best-known members of the Rho GTPases family include RhoA, Cdc42 (Cell division Cycle 42) and Rac1, all of which can act as actin regulator switches by cycling between an inactive GDP- and active GTP-bound states [28,34]. In their active GTP-bound state, Rho GTPases interact with downstream effectors involved in the dynamic rearrangement of actin and microtubule filaments. Activation of RhoA induces the formation of stress fibers that are contractile bundles of polymerized actin containing myosin motor proteins. Rac1 regulates the formation of membrane ruffles or lamellipodia and Cdc42 controls the formation of filopodia or finger-like cell protrusions at the cell periphery [31,34,35].

Microtubules form well-organized hollow tubes composed of covalent association of alpha/beta tubulin heterodimers. These protofilaments radiate from the microtubule-organizing center (MTOC) located at the centrosome in the cytoplasm, in order to allow directional flow of proteins and organelles to a specific location [39,40]. The complex organization of microtubules is responsible for cell polarity, leading to MTOC's movement toward the site of phagocytosis [41]. The Rho GTPases and many microtubule-associated proteins (MAPs), motor proteins like dyneins, and kinesins also interact with microtubules [37,40].

As the cytoskeleton intervenes in many dynamic cell processes, it has to be controlled by many regulatory proteins and is the target of multiple signaling pathways. As a result, the cytoskeleton network is a prime target for pathogens and their virulence factors.

3. Association between Anthrax Receptor, Extra-Cellular Matrix and the Cytoskeleton

It is interesting to note that the precise physiologic role of TEM-8 and CMG-2 is currently unknown, although mutations of TEM-8 and CMG-2 in humans strongly suggest their role is very different from toxin endocytosis (review in [42]). Mutation in the *cmg-2* gene is linked to juvenile hyaline fibromatosis (JHF) and infantile systemic hyalinosis (ISH) [43,44]. Clinically, the patients suffer from generalized fibromatosis resulting by deposition of hyaline in the dermis. Mutation in the extracellular domain of *tem-8* has been described in a patient with infantile hemangioma, characterized by a rapidly growing area of angiogenesis [45]. Intriguingly, TEM-8 mutation disrupted the expression of VEGFR1 and VEGFR2 signaling. Taken together these data strongly suggests that TEM-8 and CMG-2 have very specialized functions hijacked by anthrax toxins. Along those lines the anthrax toxin triggers *src*-like kinase which in turn phosphorylates CMG-2 and TEM-8 intracellular domain favoring toxin entry [46]. A second target for anthrax receptor signaling may be ARAP3 (Arf GAP and Rho GAP with ankyrin repeat and pleckstrin homology domains) [47].

Extracellular domain of CMG-2 is known to interact with collagen IV and laminin [48]. Extracellular domain of TEM-8 interacts with collagen I and VI, and gelatin [15,49,50]. The cytosolic tail of TEM8 directly docks the actin cytoskeleton, helping cell spread by coupling matrix ligand to intracellular cytoskeleton [15]. TEM-8 seems to organize actin filaments into bundles [51], suggesting that potential actin reorganization drives cell shape changes and spreading after PA attachment. In addition, TEM8-1, but not TEM8-2 interacts with the actin network which modulates affinity for PA and promotes its heptamerization [25,51,52]. An inverse correlation exists between TEM8 binding to actin and the amount of PA bound to receptors [51]. Cortical actin cytoskeleton seems to be required for heptamerization of PA when bound to TEM8-1 that is organized in an actin dependent manner, but

4.1.1. Actin Network

One major issue when considering the effects of LT on various cells is its diverse effects. On one hand, after exposure to LT, human endothelium and lung epithelial cells progressively show mechanical stiffness [11], blebbing, and elongation [53,54]. These morphological changes correlate with re-organization of the actin cytoskeleton characterized by thick actin cables or actin stress fibers [53–56] parallel to each other, with loss of cortical F-actin [53,54] but increased central F-actin content [11,54] or increased actin filament assembly [11]. For many authors, unconventional formation and stabilization of stress fibers occurred in the presence of LT over a course of 6–24 h, *i.e.* (i) in the absence of direct activation of RhoA/ROCK pathway or Rac1 by LT [11,53]; (ii) with equivalent phosphorylation of both cofilin [11,53] and myosin light chain (MLC) [53]; (iii) requires host gene transcription modifications by LT to participate in the thick actin cable formation [11,53]. For Cdc42 activity, results are more divergent: Lehmann *et al.* observe an increase in active GTP-bound Cdc42 in LT-treated epithelial cells [11] while Rolando *et al.* show equivalent activity of Cdc42 in LT-intoxicated human endothelial cells [53].

In contrast to the previous studies, a recent study of Warfel *et al.* on lung microvascular endothelial cells shows actin stress fibers accompanied by increased MLC phosphorylation and cleavage of ROCK-1, leading to the activation of ROCK-1 after 72 h of LT exposure. ROCK-inhibitors seem to block LT-induced stress fiber formation and phosphorylation of MLC, suggesting an involvement of ROCK pathways in maintaining LT-induced stress fibers [56]. Consequently, RhoA/ROCK pathway is most likely not directly modulated by LT but may control the stability of these actin cables.

On the other hand, after 2 h, LT reduces the ability of neutrophils to spread and actin filament assembly at the leading edge [13,57]. Actin-based motility of the intracellular pathogen *Listeria monocytogenes* in HeLa cells is also affected by LT [14]. In proteomics studies on mouse macrophage, the beta isoform of actin is upregulated [58], but gamma actin is decreased [59]. The study by Nour *et al.* also describes LT-treated murine macrophages lacking actin cytoskeleton after 90 min [60].

All these studies may also implicate one or all of the three major MAPK pathways altered in LT intoxication [61]. The effect of LT on neutrophil actin assembly is independent of MEK1 inhibition [14], while inhibition of the p38-MAPK pathway by LT blocks the Hsp27 phosphorylation cycle, impairing actin assembly and chemotaxis [13].

Taken together, these opposite results suggest that p38 MAPK signaling and other pathways like Cdc42 or actin regulators, such as MLC or ROCK, may mediate LT effects on actin dynamics. Yet, the mechanism by which LT leads to this reorganization of the actin cytoskeleton remains unclear.

4.1.2. Microtubule Network

While LT induces stress fiber formation in lung epithelial cells, it stabilizes microtubules, with multiple, highly active protrusions without formation of a leading edge and MTOC polarization [11]. However, proteome and DNA array analysis of mouse macrophages treated with LT induce a notable decrease of cellular tubulin [59,62], while LF alone does not appear to directly cleave tubulin [62]. DNA array analysis also indicates that microtubule-associating proteins expression (*i.e.*, kinesin

motor-protein) is altered in LT-treated macrophages [62], suggesting an altered stability of the microtubule network in macrophages.

4.2. ET Effects

ET induces significant morphological and cytoskeletal changes in different mammalian cells [63], including macrophages [10,64,65], primary human microvascular endothelial cells (HMVEC) [12] and neutrophils [57] (Figure 2). Some morphological differences have been observed between cells after ET treatment: (i) formation of filopodial protrusions in mammalian cells [63,64] *versus* reduction in macrophage [10]; (ii) rounded morphology in macrophages and mammalian cells [10,63,64] *versus* flattened morphology in human microvascular endothelial cells (HMVEC) [12]. In any case, every cell type had reduced spread morphology, a lowered F-actin content and actin redistribution to the cell margin in a time-dependent manner [10,57,63,64].

Some results support a role for the cAMP-dependent Protein Kinase A (PKA) pathway in the reorganization of actin network [10,57,63,64]. PKA is a serine-threonine kinase that phosphorylates many cytoskeletal proteins, including actin, microtubules and intermediate filaments. The role of Exchange Protein Activated by cAMP (Epac) is less clear, as one study on mammalian cells suggest a lack of Epac activation [63], while another suggests an activation of Epac and Ras-proximate-1 (Rap1) pathway alone [12], or associated with PKA signaling [10]. The disruption in the balance of Epac/PKA activity seems to be responsible for these cytoskeleton's effects. As for LT effects, it clearly appears that ET-related cytoskeleton disruption and intracellular signaling are cell type-dependent. So far, no studies have explored the potential effect of ET on microtubules.

Because of its biochemical adenylate cyclase activity, ET may be compared to toxins with identical functions: ExoY of *Pseudomonas aeruginosa* [66] or adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* [67]. *B. pertussis*, the causative agent of whooping cough, produces toxins including an adenylate cyclase (CyaA) which also possesses hemolytic activity. It appears clearly that CyaA causes morphological changes [68–70], including membrane blebbing in erythrocytes [70]. Recent work by Kamanova *et al.* demonstrated that the adenylate cyclase activity of CyaA causes transient and selective inactivation of the GTPase RhoA in mouse macrophages and activation of cofilin, leading to massive actin rearrangements. These latter effects wane faster at high toxin concentration and are accompanied by a formation of membrane extensions referred as lamellipodia or membrane ruffling [71]. Consequently, cAMP signaling of CyaA toxin rapidly halts complement-mediated phagocytosis of macrophages [71] and human neutrophils [69,72,73].

Soluble adenylate cyclase ExoY of *P. aeruginosa*, injected by a type III secretion system in a host also generates a cAMP pool in the cytosol and mimicked using a forskolin activated soluble adenylyl cyclase I/II (sACI/II) by several authors ([74] and reviewed in [75]). Activation of sACI/II or directly ExoY generates a large cAMP increase that induces endothelial cell retraction [74,75], with an intact cortical F-actin network and a decrease of MLC phosphorylation [74] and probably a role in bleb-niche formation in epithelial cells [76].

5. From the Cytoskeleton up to Cellular and Organ Disruption

Anthrax toxins have many effects on the cytoskeleton. We will examine here the consequences of cytoskeleton disruption on some key cell functions and at the organ level. We focus our analysis here on two paradigms of cell function and organ disruption: cell phagocytosis and vascular integrity.

5.1. *B. anthracis* Toxins, Cytoskeleton and Phagocytosis Disruption

Phagocytosis is one of the first innate defense mechanisms involved for pathogen scavenging. Moreover, phagocytosis activates the adaptive immune system by antigen presentation. As *B. anthracis* escapes so efficiently from the innate and adaptive immune response, phagocytosis disruption by anthrax toxins does not come as a surprise.

In vivo, LT inhibits primary peritoneal macrophages fluorescent microspheres phagocytosis after LT-intraperitoneal injection [77], even though cultured nonhuman primate alveolar macrophages are still capable of spore phagocytosis after LT treatment [78]. Recently, Kau *et al.* demonstrate that LT suppresses the phagocytosis of J774 macrophage cells at low doses without influencing the MAPK pathways during early infection [79], implicating another pathway. Nevertheless, these effects are unclear and do not affirm that phagocytosis is inhibited by LT.

The effect of ET on human neutrophils [80] or human macrophages [10] shows a reduction, even an inhibition, of the phagocytic capacity of these cells. This is largely due to an inability to undergo actin remodeling, required for phagocytic activities. However, it clearly appears that aspects of ET-related actin cytoskeleton on phagocytic capacities of *B. anthracis* Ames spores depend on the cell type [10].

The cytoskeleton disruption by anthrax toxins and potential consequences on phagocytosis is likely important during later stages of infection and would benefit pathogen survival. The ability of these toxins to reduce or inhibit phagocyte functions represents a dangerous immuno-evasive mechanism where the extracellular vegetative cells can rapidly multiply and be eliminated with difficulty.

5.2. *Anthrax* Toxins and Vascular Disruption

Corruption of vascular integrity by ET has been known since its discovery in the mid 1960s, as it was named after its effects observed following subcutaneous injection [81]. These observations could be related to clinical records in oro-pharyngeal anthrax, an uncommon form of the disease characterized by impressive neck swelling [82]. Interestingly, subcutaneous *versus* intravascular injection of ET are not symmetrical, as they do not lead to the same outcome. On one hand a local reversible edema is only observed, while on the other hand the toxin is lethal [83]. This observation has one corollary: toxins act differentially when in the blood lumen or out of the vessel. When both anthrax toxins enter the bloodstream, they corrupt vascular homeostasis leading to a cardio-vascular collapse (review in [8,84]). From a pathogen's standpoint both toxins facilitate pathogen spread, as they breach the vascular barrier between the blood and tissues leading to bacilli proliferation in multiple organs (review in [84]). These results suggest that ET may have been selected throughout evolution for its effects at the last stage of the disease when it is released into the bloodstream. Recent studies have confirmed that LT opens the blood-brain barrier favoring meningitis, one of the most frequent complications of systemic anthrax [85,86].

Surprisingly, anthrax toxins target the vascular endothelial system but are still poorly described mechanistically (let alone the cardiac effects). LT disrupts *in vitro* vascular endothelial cells by increasing actin stress fibers and disorganizing VE-cadherin at the adherents junctions (AJ) gasket [87] and protein zona occludens-1 at tight junctions (TJ) [85]. *In vivo* LT increases vascular permeability in zebrafish [88]. ET has also significant disrupting effects on cadherin in AJ [89]. Strikingly, mechanistic insights have been brought by a group using *Drosophila* as a model to deconstruct host-pathogen interactions [90,91]. They have very elegantly shown that ET and LT vascular effects are caused through a coordinate disruption of Rab11/sec15 exocyst [89]. The exocyst complex regulates docking of specific cargo vesicles to AJ. By deregulating AJ, both toxins corrupt cytoskeleton organization and vascular permeability. Another effect of toxin on vascular permeability is the formation of transendothelial macro-aperture (TEM) [92]. Very recently ET has been shown to induce TEMs, thus increasing peripheral vascular permeability [93]. More interestingly, the cytoskeleton senses the formation of TEM through a protein called Missing in Metastasis (MIM) that senses *de novo* membrane curvature, ultimately driving Arp2/3-dependent actin polymerization [93]. These very well designed studies clearly demonstrate the role of cytoskeleton in maintaining vascular integrity that is challenged by ET.

6. Conclusions-Perspectives

As we have shown here, the cytoskeleton emerges as the central target of anthrax toxin effects. As the cytoskeleton plays a crucial role in eukaryote cell biology, it is not surprising that toxins act on the central coordinator of cell life. New tools are emerging as the cytoskeleton is studied for its central role in cancer and development biology. Moreover, whereas ET and LT synergize their action against host innate immunity [94], the simultaneous effects of these two toxins on the cytoskeleton have only been examined by Szarowicz *et al.* [57]. This latter study suggests that the combination of ET and LT results in additive reduction in F-actin content, suggesting that these toxins impair actin assembly by different signaling pathways. So, it appears necessary to better understand the simultaneous effects of the two toxins on the cytoskeleton and the functional consequences for phagocytes. Thus, these elements would address the issue of whether ET and LT act in synergy or opposition to the cytoskeleton of phagocytes. A better understanding of *B. anthracis* toxin effects may allow the discovery of new inhibitors and better ways to treat anthrax. Outlined here are new avenues for researchers covering central questions that remain to be answered, such as the description of toxin effects as well as their potential synergistic effects upon the actin cytoskeleton.

Acknowledgments

This review was made possible by Direction Générale de l'Armement funding, under n° 09co301-1, and ANR ANABIO. The authors thank Bradley Stiles for its critical reading and editing of this manuscript.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest. Opinions are solely those of the authors and do not reflect official government views.

References

1. Mock, M.; Fouet, A. Anthrax. *Annu. Rev. Microbiol.* **2001**, *55*, 647–671.
2. Inglesby, T.V.; O’Toole, T.; Henderson, D.A.; Bartlett, J.G.; Ascher, M.S.; Eitzen, E.; Friedlander, A.M.; Gerberding, J.; Hauer, J.; Hughes, J.; *et al.* Anthrax as a biological weapon, 2002: Updated recommendations for management. *J. Am. Med. Assoc.* **2002**, *287*, 2236–2252.
3. Moayeri, M.; Leppla, S.H. The roles of anthrax toxin in pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* **2004**, *7*, 19–24.
4. Moayeri, M.; Leppla, S.H. Cellular and systemic effects of anthrax lethal toxin and edema toxin. *Mol. Aspects Med.* **2009**, *30*, 439–455.
5. Jernigan, D.B.; Raghunathan, P.L.; Bell, B.P.; Brechner, R.; Bresnitz, E.A.; Butler, J.C.; Cetron, M.; Cohen, M.; Doyle, T.; Fischer, M.; *et al.* Investigation of bioterrorism-related anthrax, United States, 2001: Epidemiologic findings. *Emerg. Infect. Dis.* **2002**, *8*, 1019–1028.
6. Guarner, J.; Jernigan, J.A.; Shieh, W.J.; Tatti, K.; Flannagan, L.M.; Stephens, D.S.; Popovic, T.; Ashford, D.A.; Perkins, B.A.; Zaki, S.R. Pathology and pathogenesis of bioterrorism-related inhalational anthrax. *Am. J. Pathol.* **2003**, *163*, 701–709.
7. Tournier, J.N.; Rossi Paccani, S.; Quesnel-Hellmann, A.; Baldari, C.T. Anthrax toxins: A weapon to systematically dismantle the host immune defenses. *Mol. Aspects Med.* **2009**, *30*, 456–466.
8. Tournier, J.N.; Quesnel-Hellmann, A.; Cleret, A.; Vidal, D.R. Contribution of toxins to the pathogenesis of inhalational anthrax. *Cell Microbiol.* **2007**, *9*, 555–565.
9. Van der Goot, G.; Young, J.A. Receptors of anthrax toxin and cell entry. *Mol. Aspects Med.* **2009**, *30*, 406–412.
10. Yeager, L.A.; Chopra, A.K.; Peterson, J.W. *Bacillus anthracis* edema toxin suppresses human macrophage phagocytosis and cytoskeletal remodeling via the protein kinase A and exchange protein activated by cyclic AMP pathways. *Infect. Immun.* **2009**, *77*, 2530–2543.
11. Lehmann, M.; Noack, D.; Wood, M.; Perego, M.; Knaus, U.G. Lung epithelial injury by *B. anthracis* lethal toxin is caused by MKK-dependent loss of cytoskeletal integrity. *PLoS One* **2009**, *4*, doi:10.1371/journal.pone.0004755.
12. Hong, J.; Doebele, R.C.; Lingen, M.W.; Quilliam, L.A.; Tang, W.J.; Rosner, M.R. Anthrax edema toxin inhibits endothelial cell chemotaxis via Epac and Rap1. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 19781–19787.
13. During, R.L.; Gibson, B.G.; Li, W.; Bishai, E.A.; Sidhu, G.S.; Landry, J.; Southwick, F.S. Anthrax lethal toxin paralyzes actin-based motility by blocking Hsp27 phosphorylation. *EMBO J.* **2007**, *26*, 2240–2250.
14. During, R.L.; Li, W.; Hao, B.; Koenig, J.M.; Stephens, D.S.; Quinn, C.P.; Southwick, F.S. Anthrax lethal toxin paralyzes neutrophil actin-based motility. *J. Infect. Dis.* **2005**, *192*, 837–845.

15. Werner, E.; Kowalczyk, A.P.; Faundez, V. Anthrax toxin receptor 1/tumor endothelium marker 8 mediates cell spreading by coupling extracellular ligands to the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 23227–23236.
16. Tang, W.J.; Guo, Q. The adenylyl cyclase activity of anthrax edema factor. *Mol. Aspects Med.* **2009**, *30*, 423–430.
17. Tonello, F.; Montecucco, C. The anthrax lethal factor and its MAPK kinase-specific metalloprotease activity. *Mol. Aspects Med.* **2009**, *30*, 431–438.
18. Young, J.A.; Collier, R.J. Anthrax toxin: Receptor binding, internalization, pore formation, and translocation. *Annu. Rev. Biochem.* **2007**, *76*, 243–265.
19. Bradley, K.A.; Mogridge, J.; Mourez, M.; Collier, R.J.; Young, J.A. Identification of the cellular receptor for anthrax toxin. *Nature* **2001**, *414*, 225–229.
20. Wei, W.; Lu, Q.; Chaudry, G.J.; Leppla, S.H.; Cohen, S.N. The LDL receptor-related protein LRP6 mediates internalization and lethality of anthrax toxin. *Cell* **2006**, *124*, 1141–1154.
21. Young, J.J.; Bromberg-White, J.L.; Zylstra, C.; Church, J.T.; Boguslawski, E.; Resau, J.H.; Williams, B.O.; Duesbery, N.S. LRP5 and LRP6 are not required for protective antigen-mediated internalization or lethality of anthrax lethal toxin. *PLoS Pathog* **2007**, *3*, doi:10.1371/journal.ppat.0030027.
22. Ryan, P.L.; Young, J.A. Evidence against a human cell-specific role for LRP6 in anthrax toxin entry. *PLoS One* **2008**, *3*, doi:10.1371/journal.pone.0001817.
23. Abrami, L.; Kunz, B.; Deuquet, J.; Bafico, A.; Davidson, G.; van der Goot, F.G. Functional interactions between anthrax toxin receptors and the WNT signalling protein LRP6. *Cell Microbiol.* **2008**, *10*, 2509–2519.
24. Abrami, L.; Liu, S.; Cosson, P.; Leppla, S.H.; van der Goot, F.G. Anthrax toxin triggers endocytosis of its receptor via a lipid raft-mediated clathrin-dependent process. *J. Cell Biol.* **2003**, *160*, 321–328.
25. Abrami, L.; Bischofberger, M.; Kunz, B.; Groux, R.; van der Goot, F.G. Endocytosis of the anthrax toxin is mediated by clathrin, actin and unconventional adaptors. *PLoS Pathog.* **2010**, *6*, doi:10.1371/journal.ppat.1000792.
26. Dal Molin, F.; Tonello, F.; Ladant, D.; Zornetta, I.; Zamparo, I.; di Benedetto, G.; Zaccolo, M.; Montecucco, C. Cell entry and cAMP imaging of anthrax edema toxin. *EMBO J.* **2006**, *25*, 5405–5413.
27. Liu, S.; Crown, D.; Miller-Randolph, S.; Moayeri, M.; Wang, H.; Hu, H.; Morley, T.; Leppla, S.H. Capillary morphogenesis protein-2 is the major receptor mediating lethality of anthrax toxin *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 12424–12429.
28. Taylor, M.P.; Koyuncu, O.O.; Enquist, L.W. Subversion of the actin cytoskeleton during viral infection. *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, *9*, 427–439.
29. Aktories, K.; Lang, A.E.; Schwan, C.; Mannherz, H.G. Actin as target for modification by bacterial protein toxins. *FEBS J.* **2011**, doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08113.x.
30. Le Clainche, C.; Carrier, M.F. Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol. Rev.* **2008**, *88*, 489–513.
31. Ridley, A.J. Life at the leading edge. *Cell* **2011**, *145*, 1012–1022.

32. Swanson, J.A. Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 639–649.
33. Aktories, K. Bacterial protein toxins that modify host regulatory GTPases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, *9*, 487–498.
34. Etienne-Manneville, S.; Hall, A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* **2002**, *420*, 629–635.
35. Spiering, D.; Hodgson, L. Dynamics of the Rho-family small GTPases in actin regulation and motility. *Cell Adh. Migr.* **2011**, *5*, 170–180.
36. Bokoch, G.M. Regulation of innate immunity by Rho GTPases. *Trends Cell Biol.* **2005**, *15*, 163–171.
37. Vicente-Manzanares, M.; Sanchez-Madrid, F. Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nat. Rev. Immunol.* **2004**, *4*, 110–122.
38. Niedergang, F.; Chavrier, P. Regulation of phagocytosis by Rho GTPases. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2005**, *291*, 43–60.
39. Luders, J.; Stearns, T. Microtubule-organizing centres: A re-evaluation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 161–167.
40. Leopold, P.L.; Pfister, K.K. Viral strategies for intracellular trafficking: Motors and microtubules. *Traffic* **2006**, *7*, 516–523.
41. Eng, E.W.; Bettio, A.; Ibrahim, J.; Harrison, R.E. MTOC reorientation occurs during FcgammaR-mediated phagocytosis in macrophages. *Mol. Biol. Cell* **2007**, *18*, 2389–2399.
42. Cryan, L.M.; Rogers, M.S. Targeting the anthrax receptors, TEM-8 and CMG-2, for anti-angiogenic therapy. *Front. Biosci.* **2011**, *16*, 1574–1588.
43. Dowling, O.; Difeo, A.; Ramirez, M.C.; Tukul, T.; Narla, G.; Bonafe, L.; Kayserili, H.; Yuksel-Apak, M.; Paller, A.S.; Norton, K.; *et al.* Mutations in capillary morphogenesis gene-2 result in the allelic disorders juvenile hyaline fibromatosis and infantile systemic hyalinosis. *Am. J. Hum. Genet.* **2003**, *73*, 957–966.
44. Hanks, S.; Adams, S.; Douglas, J.; Arbour, L.; Atherton, D.J.; Balci, S.; Bode, H.; Campbell, M.E.; Feingold, M.; Keser, G.; *et al.* Mutations in the gene encoding capillary morphogenesis protein 2 cause juvenile hyaline fibromatosis and infantile systemic hyalinosis. *Am. J. Hum. Genet.* **2003**, *73*, 791–800.
45. Jinnin, M.; Medici, D.; Park, L.; Limaye, N.; Liu, Y.; Boscolo, E.; Bischoff, J.; Vikkula, M.; Boye, E.; Olsen, B.R. Suppressed NFAT-dependent VEGFR1 expression and constitutive VEGFR2 signaling in infantile hemangioma. *Nat. Med.* **2008**, *14*, 1236–1246.
46. Abrami, L.; Kunz, B.; van der Goot, F.G. Anthrax toxin triggers the activation of src-like kinases to mediate its own uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 1420–1424.
47. Lu, Q.; Wei, W.; Kowalski, P.E.; Chang, A.C.; Cohen, S.N. EST-based genome-wide gene inactivation identifies ARAP3 as a host protein affecting cellular susceptibility to anthrax toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 17246–17251.
48. Bell, S.E.; Mavila, A.; Salazar, R.; Bayless, K.J.; Kanagala, S.; Maxwell, S.A.; Davis, G.E. Differential gene expression during capillary morphogenesis in 3D collagen matrices: Regulated expression of genes involved in basement membrane matrix assembly, cell cycle progression, cellular differentiation and G-protein signaling. *J. Cell Sci.* **2001**, *114*, 2755–2773.

49. Nanda, A.; Carson-Walter, E.B.; Seaman, S.; Barber, T.D.; Stampfl, J.; Singh, S.; Vogelstein, B.; Kinzler, K.W.; St Croix, B. TEM8 interacts with the cleaved C5 domain of collagen alpha 3(VI). *Cancer Res.* **2004**, *64*, 817–820.
50. Hotchkiss, K.A.; Basile, C.M.; Spring, S.C.; Bonuccelli, G.; Lisanti, M.P.; Terman, B.I. TEM8 expression stimulates endothelial cell adhesion and migration by regulating cell-matrix interactions on collagen. *Exp. Cell Res.* **2005**, *305*, 133–144.
51. Garlick, K.M.; Mogridge, J. Direct interaction between anthrax toxin receptor 1 and the actin cytoskeleton. *Biochemistry* **2009**, *48*, 10577–10581.
52. Go, M.Y.; Chow, E.M.; Mogridge, J. The cytoplasmic domain of anthrax toxin receptor 1 affects binding of the protective antigen. *Infect. Immun.* **2009**, *77*, 52–59.
53. Rolando, M.; Stefani, C.; Flatau, G.; Auberger, P.; Mettouchi, A.; Mhlanga, M.; Rapp, U.; Galmiche, A.; Lemichez, E. Transcriptome dysregulation by anthrax lethal toxin plays a key role in induction of human endothelial cell cytotoxicity. *Cell Microbiol.* **2010**, *12*, 891–905.
54. Warfel, J.M.; Steele, A.D.; D’Agnillo, F. Anthrax lethal toxin induces endothelial barrier dysfunction. *Am. J. Pathol.* **2005**, *166*, 1871–1881.
55. Rolando, M.; Munro, P.; Stefani, C.; Auberger, P.; Flatau, G.; Lemichez, E. Injection of *Staphylococcus aureus* EDIN by the *Bacillus anthracis* protective antigen machinery induces vascular permeability. *Infect. Immun.* **2009**, *77*, 3596–3601.
56. Warfel, J.M.; D’Agnillo, F. Anthrax lethal toxin-mediated disruption of endothelial VE-cadherin is attenuated by inhibition of the Rho-associated kinase pathway. *Toxins* **2011**, *3*, 1278–1293.
57. Szarowicz, S.E.; During, R.L.; Li, W.; Quinn, C.P.; Tang, W.J.; Southwick, F.S. *Bacillus anthracis* edema toxin impairs neutrophil actin-based motility. *Infect. Immun.* **2009**, *77*, 2455–2464.
58. Sapra, R.; Gaucher, S.P.; Lachmann, J.S.; Buffleben, G.M.; Chirica, G.S.; Comer, J.E.; Peterson, J.W.; Chopra, A.K.; Singh, A.K. Proteomic analyses of murine macrophages treated with *Bacillus anthracis* lethal toxin. *Microb. Pathog.* **2006**, *41*, 157–167.
59. Chandra, H.; Gupta, P.K.; Sharma, K.; Mattoo, A.R.; Garg, S.K.; Gade, W.N.; Sirdeshmukh, R.; Maithal, K.; Singh, Y. Proteome analysis of mouse macrophages treated with anthrax lethal toxin. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1747*, 151–159.
60. Nour, A.M.; Yeung, Y.G.; Santambrogio, L.; Boyden, E.D.; Stanley, E.R.; Brojatsch, J. Anthrax lethal toxin triggers the formation of a membrane-associated inflammasome complex in murine macrophages. *Infect. Immun.* **2009**, *77*, 1262–1271.
61. Vitale, G.; Pellizzari, R.; Recchi, C.; Napolitani, G.; Mock, M.; Montecucco, C. Anthrax lethal factor cleaves the N-terminus of MAPKKs and induces tyrosine/threonine phosphorylation of MAPKs in cultured macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *248*, 706–711.
62. Tucker, A.E.; Salles, I.I.; Voth, D.E.; Ortiz-Leduc, W.; Wang, H.; Dozmorov, I.; Centola, M.; Ballard, J.D. Decreased glycogen synthase kinase 3-beta levels and related physiological changes in *Bacillus anthracis* lethal toxin-treated macrophages. *Cell Microbiol.* **2003**, *5*, 523–532.
63. Hong, J.; Beeler, J.; Zhukovskaya, N.L.; He, W.; Tang, W.J.; Rosner, M.R. Anthrax edema factor potency depends on mode of cell entry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *335*, 850–857.
64. Kim, C.; Wilcox-Adelman, S.; Sano, Y.; Tang, W.J.; Collier, R.J.; Park, J.M. Antiinflammatory cAMP signaling and cell migration genes co-opted by the anthrax bacillus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 6150–6155.

65. Gnade, B.T.; Moen, S.T.; Chopra, A.K.; Peterson, J.W.; Yeager, L.A. Emergence of anthrax edema toxin as a master manipulator of macrophage and B cell functions. *Toxins* **2010**, *2*, 1881–1897.
66. Yahr, T.L.; Vallis, A.J.; Hancock, M.K.; Barbieri, J.T.; Frank, D.W. ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 13899–13904.
67. Hewlett, E.L.; Urban, M.A.; Manclark, C.R.; Wolff, J. Extracytoplasmic adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, *73*, 1926–1930.
68. Ohnishi, H.; Miyake, M.; Kamitani, S.; Horiguchi, Y. The morphological changes in cultured cells caused by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *FEMS Microbiol. Lett.* **2008**, *279*, 174–179.
69. Carbonetti, N.H. Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin: Key virulence factors of *Bordetella pertussis* and cell biology tools. *Future Microbiol.* **2010**, *5*, 455–469.
70. Vojtova, J.; Kofronova, O.; Sebo, P.; Benada, O. *Bordetella* adenylate cyclase toxin induces a cascade of morphological changes of sheep erythrocytes and localizes into clusters in erythrocyte membranes. *Microsc. Res. Tech.* **2006**, *69*, 119–129.
71. Kamanova, J.; Kofronova, O.; Masin, J.; Genth, H.; Vojtova, J.; Linhartova, I.; Benada, O.; Just, I.; Sebo, P. Adenylate cyclase toxin subverts phagocyte function by RhoA inhibition and unproductive ruffling. *J. Immunol.* **2008**, *181*, 5587–5597.
72. Weingart, C.L.; Weiss, A.A. *Bordetella pertussis* virulence factors affect phagocytosis by human neutrophils. *Infect. Immun.* **2000**, *68*, 1735–1739.
73. Weingart, C.L.; Mobberley-Schuman, P.S.; Hewlett, E.L.; Gray, M.C.; Weiss, A.A. Neutralizing antibodies to adenylate cyclase toxin promote phagocytosis of *Bordetella pertussis* by human neutrophils. *Infect. Immun.* **2000**, *68*, 7152–7155.
74. Prasain, N.; Alexeyev, M.; Balczon, R.; Stevens, T. Soluble adenylyl cyclase-dependent microtubule disassembly reveals a novel mechanism of endothelial cell retraction. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2009**, *297*, L73–L83.
75. Sayner, S.L. Emerging themes of cAMP regulation of the pulmonary endothelial barrier. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2011**, *300*, L667–L678.
76. Hritonenko, V.; Mun, J.J.; Tam, C.; Simon, N.C.; Barbieri, J.T.; Evans, D.J.; Fleiszig, S.M. Adenylate cyclase activity of *Pseudomonas aeruginosa* ExoY can mediate bleb-niche formation in epithelial cells and contributes to virulence. *Microb. Pathog.* **2011**, *51*, 305–312.
77. Buck, M.; Chojkier, M. C/EBPbeta phosphorylation rescues macrophage dysfunction and apoptosis induced by anthrax lethal toxin. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2007**, *293*, C1788–C1796.
78. Ribot, W.J.; Panchal, R.G.; Brittingham, K.C.; Ruthel, G.; Kenny, T.A.; Lane, D.; Curry, B.; Hoover, T.A.; Friedlander, A.M.; Bavari, S. Anthrax lethal toxin impairs innate immune functions of alveolar macrophages and facilitates *Bacillus anthracis* survival. *Infect. Immun.* **2006**, *74*, 5029–5034.
79. Kau, J.H.; Sun, D.S.; Huang, H.S.; Lien, T.S.; Huang, H.H.; Lin, H.C.; Chang, H.H. Sublethal doses of anthrax lethal toxin on the suppression of macrophage phagocytosis. *PLoS One* **2010**, *5*, doi:10.1371/journal.pone.0014289.

80. O'Brien, J.; Friedlander, A.; Dreier, T.; Ezzell, J.; Leppla, S. Effects of anthrax toxin components on human neutrophils. *Infect. Immun.* **1985**, *47*, 306–310.
81. Stanley, J.L.; Smith, H. Purification of factor I and recognition of a third factor of the anthrax toxin. *J. Gen. Microbiol.* **1961**, *26*, 49–63.
82. Sirisanthana, T.; Brown, A.E. Anthrax of the gastrointestinal tract. *Emerg. Infect. Dis.* **2002**, *8*, 649–651.
83. Firoved, A.M.; Miller, G.F.; Moayeri, M.; Kakkar, R.; Shen, Y.; Wiggins, J.F.; McNally, E.M.; Tang, W.J.; Leppla, S.H. *Bacillus anthracis* edema toxin causes extensive tissue lesions and rapid lethality in mice. *Am. J. Pathol.* **2005**, *167*, 1309–1320.
84. Guichard, A.; Nizet, V.; Bier, E. New insights into the biological effects of anthrax toxins: Linking cellular to organismal responses. *Microbes Infect.* **2012**, *14*, 97–118.
85. Ebrahimi, C.M.; Sheen, T.R.; Renken, C.W.; Gottlieb, R.A.; Doran, K.S. Contribution of lethal toxin and edema toxin to the pathogenesis of anthrax meningitis. *Infect. Immun.* **2011**, *79*, 2510–2518.
86. Van Sorge, N.M.; Ebrahimi, C.M.; McGillivray, S.M.; Quach, D.; Sabet, M.; Guiney, D.G.; Doran, K.S. Anthrax toxins inhibit neutrophil signaling pathways in brain endothelium and contribute to the pathogenesis of meningitis. *PLoS One* **2008**, *3*, doi:10.1371/journal.pone.0002964.
87. Warfel, J.M.; Steele, A.D.; D'Agnillo, F. Anthrax lethal toxin induces endothelial barrier dysfunction. *Am. J. Pathol.* **2005**, *166*, 1871–1881.
88. Bolcome, R.E., III; Sullivan, S.E.; Zeller, R.; Barker, A.P.; Collier, R.J.; Chan, J. Anthrax lethal toxin induces cell death-independent permeability in zebrafish vasculature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 2439–2444.
89. Guichard, A.; McGillivray, S.M.; Cruz-Moreno, B.; van Sorge, N.M.; Nizet, V.; Bier, E. Anthrax toxins cooperatively inhibit endocytic recycling by the Rab11/Sec15 exocyst. *Nature* **2010**, *467*, 854–858.
90. Guichard, A.; Park, J.M.; Cruz-Moreno, B.; Karin, M.; Bier, E. Anthrax lethal factor and edema factor act on conserved targets in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 3244–3249.
91. Bier, E.; Guichard, A. Deconstructing host-pathogen interactions in *Drosophila*. *Dis. Model. Mech.* **2012**, *5*, 48–61.
92. Lemichez, E.; Lecuit, M.; Nassif, X.; Bourdoulous, S. Breaking the wall: Targeting of the endothelium by pathogenic bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 93–104.
93. Maddugoda, M.P.; Stefani, C.; Gonzalez-Rodriguez, D.; Saarikangas, J.; Torino, S.; Janel, S.; Munro, P.; Doye, A.; Prodon, F.; Aurrand-Lions, M.; et al. cAMP signaling by anthrax edema toxin induces transendothelial cell tunnels, which are resealed by MIM via Arp2/3-driven actin polymerization. *Cell Host Microbe* **2011**, *10*, 464–474.
94. Tournier, J.N.; Quesnel-Hellmann, A.; Mathieu, J.; Montecucco, C.; Tang, W.J.; Mock, M.; Vidal, D.R.; Goossens, P.L. Anthrax edema toxin cooperates with lethal toxin to impair cytokine secretion during infection of dendritic cells. *J. Immunol.* **2005**, *174*, 4934–4941.

DEUXIEME PARTIE : TRAVAUX DE THESE

CHAPITRE II.1 : Problématique et objectifs de la thèse

Les toxines jouent un rôle central dans la pathogénie de la maladie et dans la dérégulation du système immunitaire, comme l'ont montré les travaux de notre équipe sur les effets dérégulateurs de ces deux toxines sur les fonctions des cellules dendritiques myéloïdes murines [89]. Ces dernières semblent jouer un rôle prépondérant dans la physiopathologie du charbon. D'autres équipes internationales ont pu montrer une désorganisation-type cellulaire dépendant du cytosquelette d'actine (cellules endothéliales, macrophages, polynucléaires neutrophiles), accompagnée d'une potentielle réduction de la phagocytose des cellules phagocytaires. Cependant, à ce jour, peu d'études analysent en profondeur la dérégulation du cytosquelette d'actine. La compréhension de ces altérations permettra de mieux comprendre les résultats divergents sur la phagocytose et la migration des cellules immunitaires, en utilisant comme modèle les macrophages et les cellules dendritiques murines. L'ensemble de ces analyses a permis d'émettre l'hypothèse d'une altération du cytosquelette des cellules dendritiques et macrophages par les toxines de *Bacillus anthracis*.

Ainsi, mon travail de thèse a fait suite au stage de master 2 recherche, effectué dans l'unité Interaction hôte – agents de pathogènes de l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées. Ce stage consistait à mettre en évidence les effets potentiels des toxines de *Bacillus anthracis* sur le cytosquelette d'actine des cellules dendritiques.

Lors de mon stage de master, afin de visualiser les effets des toxines sur le cytosquelette, des cellules dendritiques immatures générées à partir de moelle osseuse de souris ont été intoxiquées pendant 16 heures sur des lames *coatées* à la fibronectine (Figure 20). Les cellules dendritiques immatures du groupe contrôle (Figure 20 panel A) ou intoxiquées avec PA (Figure 20 panel B) ont un aspect plus ou moins sphérique et allongé avec une répartition homogène de l'intensité de fluorescence du marquage de l'actine. En revanche, l'ajout d'ET modifie clairement l'architecture des cellules avec une déformation du réseau d'actine et des protrusions tout autour des cellules (Figure 20 panel C). A l'opposé, la présence de LT induit un étalement circulaire des cellules avec une concentration d'actine plus importante autour du noyau en forme de cercle très concentré en actine F (Figure 20 panel D).

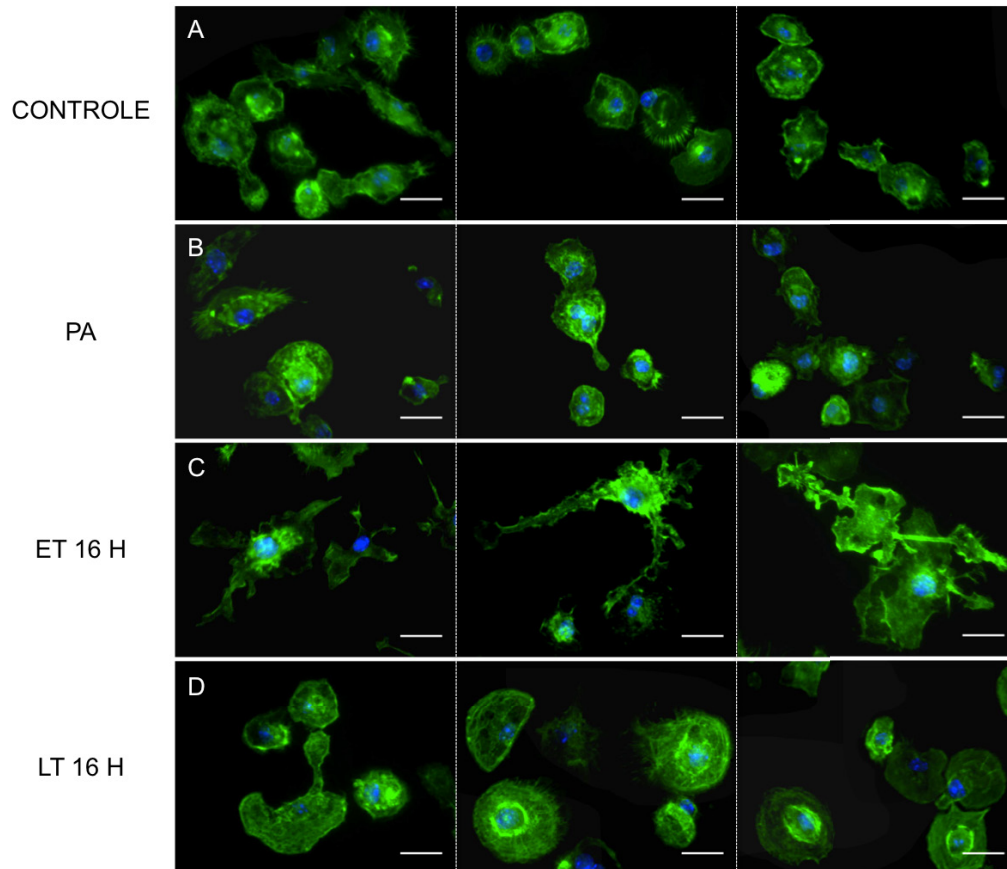


Figure 20 : Effets des toxines sur le cytosquelette de cellules dendritiques immatures non normalisées

Les cellules dendritiques immatures en culture dans des puits *coatés* à la fibronectine ont été intoxiquées par ET et LT pendant 16 heures avant une fixation et un marquage de l'actine F par la Phalloïdine AlexaFluor 488 (vert) et le noyau au DAPI (bleu). Grossissement X63 huile. La barre représente 20 μm .

Cependant, la forme et la taille aléatoire des cellules dendritiques ne permettent pas d'analyser et quantifier ces effets sur le cytosquelette d'actine. Un modèle d'adhérence normalisée de cellules doit être recherché afin de quantifier les effets observés. Plusieurs méthodes ont été utilisées pour résoudre cette problématique avant de se tourner vers les *micropatterns* commercialisés par la société Cytoo® et conçus initialement pour des cellules transformées très adhérentes (cf. l'introduction du deuxième article). Devant la difficulté de transposition de ces systèmes pour nos cellules d'intérêt peu adhérentes, mon stage de master ne m'a permis que de valider le modèle d'étude par le choix de la forme, la taille et le coating adaptés aux macrophages et aux cellules dendritiques murines. Une seule expérience preuve de concept a été effectuée et analysée pour la validation du stage. Ces résultats très préliminaires montraient qu'ET semblerait entraîner une rétraction temps-dépendant du

cytosquelette d'actine avec la naissance de protrusions membranaires alors que LT semblerait conduire à un étalement cellulaire sur les *micropatterns*.

Ces effets obtenus avec les toxines m'ont encouragé à persévérer sur cette thématique et il a été décidé de mettre tout en œuvre pour répondre à notre problématique d'altération du cytosquelette d'actine des cellules immunes par les toxines de *Bacillus anthracis*, en les complétant par les études de grandes fonctions immunes impliquant le cytosquelette, comme la phagocytose et la migration.

Ainsi, il a été décidé d'intituler mon travail de thèse : effets des toxines de *Bacillus anthracis* sur le cytosquelette des cellules immunitaires : implication sur la phagocytose et les fonctions immunitaires. Les grands axes et objectifs du travail de thèse sont de :

1/ qualifier et quantifier les effets des 2 toxines sur le cytosquelette d'actine des macrophages et des cellules dendritiques à partir du modèle d'étude des cellules dendritiques et des macrophages sur des lames *micropatternées*.

2/ identifier les protéines du cytosquelette impliquées dans ces altérations tout en essayant d'établir le lien avec les fonctions enzymatiques des toxines de *Bacillus anthracis*.

3/ montrer l'éventuelle altération de la phagocytose par les toxines (effet indirect sur le cytosquelette ?) et visualiser les conséquences sur la maturation des phagosomes.

3/ explorer les capacités migratoires des cellules dendritiques intoxiquées par ET et LT.

CHAPITRE II.2 : Effets de ET sur le cytosquelette d'actine des macrophages

L'analyse de macrophage « micropatterné » démontre des contraintes globales sur le cytosquelette induites par la toxine oedémateuse de *Bacillus anthracis*

Yannick Trescos, Emilie Tessier, Clémence Rougeaux, Pierre-Louis Goossens and Jean-Nicolas Tournier.

Infection and Immunity, 2015.

1. Introduction

1.1 Contexte scientifique

Des études préliminaires relatées dans la revue bibliographique [79] avaient montré que les toxines de *Bacillus anthracis* modifiaient l'organisation du cytosquelette. Ces travaux étaient principalement basés sur l'étude des cellules endothéliales sur lesquelles étaient administrées ET [191, 192] ou LT [109, 121, 122, 193, 194]. Par ailleurs, deux articles notaient que LT pouvait aussi avoir des effets dérégulateurs sur le cytosquelette d'actine avec des répercussions sur la motilité des polynucléaires neutrophiles [92, 93] et un article centré sur ET montrait que cette toxine dérégulait le cytosquelette des macrophages [195].

L'ensemble de ces résultats suggérait que les toxines de *B. anthracis* dérégulaient finement le cytosquelette, mais que ces effets étaient difficilement quantifiables sur des cellules en culture dans des boîtes de Pétri.

A la même période, des applications issues des nanotechnologies se sont propagées à la biologie cellulaire avec la technique de *micropatterning* [196, 197]. Ces techniques étaient héritières de travaux pionniers initiés il y a plus de quarante ans, à la fois sur l'adhérence des cellules [198, 199], sur la relation entre la forme des cellules et les grandes fonctions cellulaires [200]. Elles commencèrent grâce à des techniques physico-chimiques de *finger-printing* de formes, grâce à un « tampon encreur » en élastomère de polydiméthylsiloxane (PDMS) permettant de dessiner des carrés de laminine [201] (Figure 21). Ces méthodes restèrent confidentielles mais permettaient d'apporter la preuve de concept de l'intérêt du *micropatterning* en biologie cellulaire. Ces développements furent portés par le groupe de

Donald Ingber and Georges Whitesides à l'université d'Harvard [202, 203]. Ces méthodes basées sur la construction d'un « tampon » en PDMS avaient de nombreux inconvénients au nombre desquels les difficultés de l'étape de gravure et la faible reproductibilité des transferts de protéine de la matrice.

Le réel essor de cette technologie survint plus tard avec le développement de la soft-lithographie [204]. Son principe réside dans l'utilisation de photo-sensibilisateurs qui produisent des radicaux libres et permettent la greffe de protéines de la matrice extracellulaire (ECM) sur des surfaces de poly-éthylène glycol (PEG). L'utilisation des rayons UV à travers un photomasque permet une bonne reproductibilité des formes, un contrôle de la concentration en substrat protéique et de l'exposition aux rayons UV. Une alternative consiste en l'utilisation de laser (revue référence [205]).

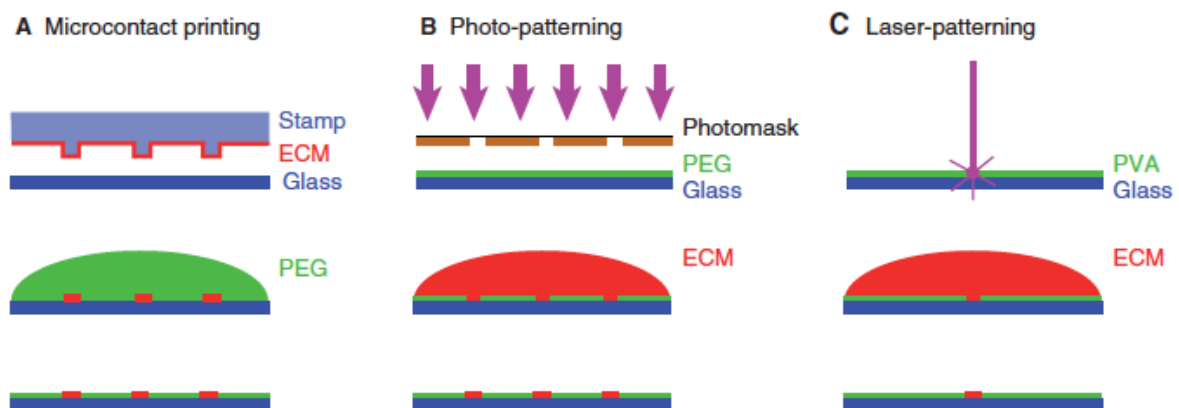


Figure 21 : Différentes méthodes de fabrication des *micropatterns*.

Trois grandes techniques permettent de confectionner des *micropatterns* : l'impression par microcontact (panel A), consistant en l'impression de protéines de la matrice extracellulaire de forme désirée sur un substrat à partir d'un tampon ; le photo-patterning par passage de rayons d'une source lumineuse, comme les UV à travers un masque (panel B) et le laser patterning agissant en direct sur le substrat pour créer les formes désirées. Adaptée de la référence [205].

Ses applications en biologie cellulaire seront popularisées par le groupe de Michel Bornens à l'Institut Curie [206, 207]. Ils démontreront que l'anisotropie de la forme donne à la cellule des informations et une contrainte spatiale. Cette dernière impose une organisation

propre de la cellule et ouvre la voie à des études statistiques et quantitatives de l'organisation du cytosquelette.

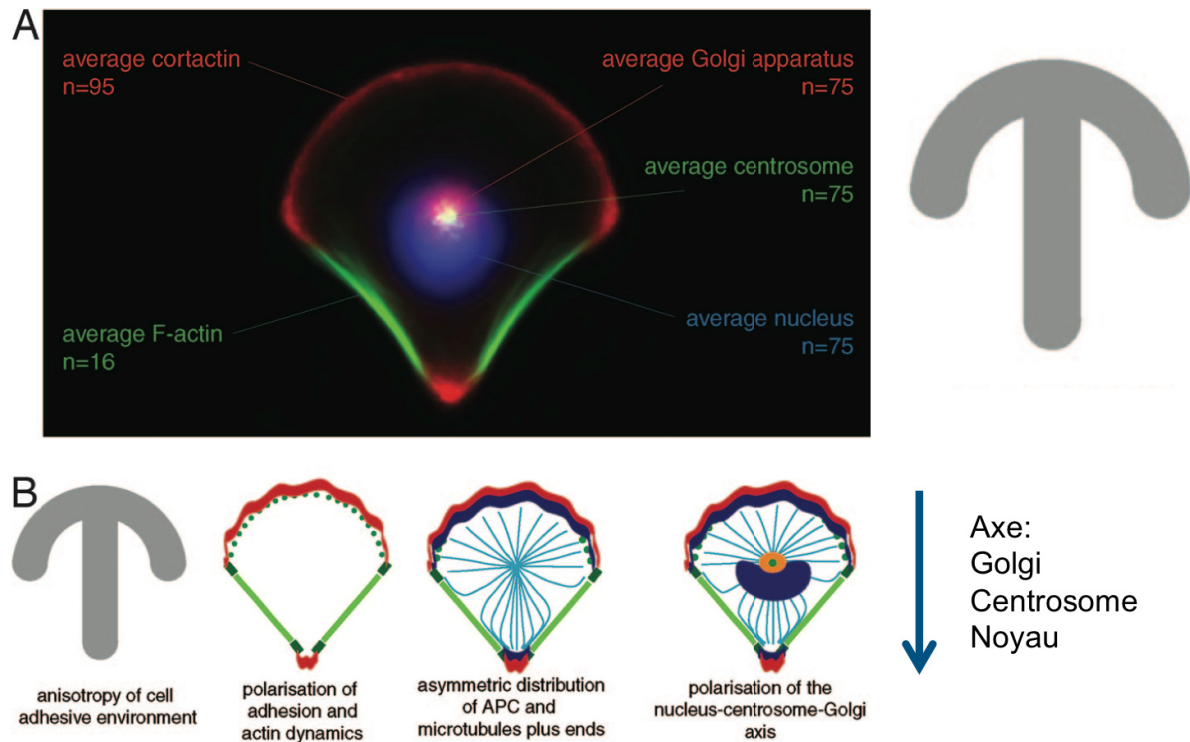


Figure 22 : Impact de la forme du *micropattern* sur l'organisation interne de la cellule normalisée.

Le panel A montre l'organisation interne de la cellule sur un *micropattern* en forme d'arbalète. La cellule de référence, obtenue après moyenne des distributions des organelles démontre un organisation reproductible selon un axe golgi – centrosome – noyau. Le panel B illustre la polarisation interne de la cellule en réponse à l'anisotropie de la forme *coâtée* à la fibronectine (gris) toujours sur un axe golgi-centrosome-noyau (réseau d'actine en rouge, fibres de stress en vert clair, adhésions focales en vert foncé, microtubules en bleu clair et connecteurs actine-microtubules (APC) en bleu foncé). Adaptée de la référence [207].

Les *micropatterns* utilisables en culture cellulaire ont ensuite bénéficié du développement et de la diffusion commerciale par la société Cytoo®.

Un intérêt notable de cette technique est de maintenir la cellule dans un état orienté : par exemple, les *micropatterns* de type arbalète engendrent la polarisation de la cellules selon un axe passant par l'appareil de Golgi, le centrosome et le noyau (Figure 22). *In vivo*, dans la plupart des tissus organisés des eucaryotes pluricellulaires, les cellules sont polarisées et orientées par les informations architecturales données par la matrice extracellulaire et les cellules adjacentes. Des cellules placées en culture cellulaire en boîte de Pétri perdent toutes ces informations.

Enfin, l'analyse du cytosquelette de cellules polarisées a bénéficié de l'application de nouveaux outils mathématiques pour analyser plus finement les modifications du cytosquelette pour les cellules *micropatternées* avec notamment des cartes de densité probabilistes [208-210].

1.2 Problématique

Lors de mon arrivée au laboratoire, l'une des premières problématiques était de caractériser les effets des toxines de *Bacillus anthracis* sur le cytosquelette d'actine de cellules immunitaires telles que les cellules dendritiques murines dont il avait été montré dans le groupe qu'elles étaient sensibles aux effets des toxines [89]. En parallèle, la commercialisation récente de la technologie de *micropatterning*, qui n'avait jamais été utilisée pour explorer les effets des toxines sur des cellules immunitaires pouvait être un outil idéal pour visualiser les potentiels effets des toxines sur le cytosquelette.

La première approche a été de mettre au point la normalisation de cellules immunitaires (BMDMs *Bone-Marrow Derived Macrophages* dans un premier temps puis les BMDCs *Bone-Marrow Dendritic Cells*) sur des puces commerciales de la société Cytoo®. Ce qui pouvait paraître simple sur le papier ne le fut pas à l'usage. Les *micropatterns* ont été développés avec des cellules transformées très adhérentes comme les cellules HeLa, capable de s'étirer sur les *micropatterns* et de réorganiser les filaments d'actine sous forme de fibre de stress. L'adhérence des cellules immunes primaires ou générées à partir de moelle osseuse fut un problème et un obstacle important dans la mise au point du modèle initial : ces dernières ne semblent pas capable de réorganiser leur filament d'actine en fibre de stress.

1.3 Résultats

L'article présente à la fois un modèle possible de *micropatterns* par l'utilisation de 2 formes (L et arbalète) et les conséquences de l'intoxication par ET sur l'organisation du cytosquelette d'actine des BMDMs et de macrophages péritonéaux.

Ainsi, ET induit une modification de la morphologie des BMDMs et des macrophages péritonéaux normalisés sur les *micropatterns*. Cette modification se déroule en 2 phases : une phase de concentration de l'actine F au centre de la cellule sans perte de taille puis une phase de rétraction cellulaire, par perte de l'adhérence au niveau des adhésions périphériques. Cette altération de la forme s'accompagne d'une réorganisation du cytosquelette d'actine qui a pour

conséquence un déplacement et une déformation transitoire du noyau. Ces résultats ont permis de développer toute la méthodologie et les outils d'analyse pour les macrophages normalisés mais aussi pour les cellules dendritiques qui seront plus longuement développées dans le chapitre 3.

2. Article

Contient l'article et les figures supplémentaires S1 et S2.



Micropatterned Macrophage Analysis Reveals Global Cytoskeleton Constraints Induced by *Bacillus anthracis* Edema Toxin

Yannick Trescos,^{a,b,c} Emilie Tessier,^a Clémence Rougeaux,^{a,b} Pierre L. Goossens,^b Jean-Nicolas Tournier^{a,b,c}

Unité Interactions Hôte-Agents pathogènes, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Brétigny-sur-Orge, France^a; Laboratoire Pathogénie des Toxi-Infections Bactériennes, Institut Pasteur, Paris, France^b; Ecole du Val-de-Grâce, Paris, France^c

Bacillus anthracis secretes the edema toxin (ET) that disrupts the cellular physiology of endothelial and immune cells, ultimately affecting the adherens junction integrity of blood vessels that in turn leads to edema. The effects of ET on the cytoskeleton, which is critical in cell physiology, have not been described thus far on macrophages. In this study, we have developed different adhesive micropatterned surfaces (L and crossbow) to control the shape of bone marrow-derived macrophages (BMDMs) and primary peritoneal macrophages. We found that macrophage F-actin cytoskeleton adopts a specific polar organization slightly different from classical human HeLa cells on the micropatterns. Moreover, ET induced a major quantitative reorganization of F-actin within 16 h with a collapse at the nonadhesive side of BMDMs along the nucleus. There was an increase in size and deformation into a kidney-like shape, followed by a decrease in size that correlates with a global cellular collapse. The collapse of F-actin was correlated with a release of focal adhesion on the patterns and decreased cell size. Finally, the cell nucleus was affected by actin reorganization. By using this technology, we could describe many previously unknown macrophage cellular dysfunctions induced by ET. This novel tool could be used to analyze more broadly the effects of toxins and other virulence factors that target the cytoskeleton.

Anthrax is a disease caused by *Bacillus anthracis*, a Gram-positive, rod-shaped, spore-forming bacterium whose spores are considered a serious bioterrorism agent (1). The major known virulence factors of *B. anthracis* include edema toxin (ET), formed by the association of the protective antigen (PA) component with edema factor (EF). Once in the cytosol, EF acts as a calmodulin (CaM)-dependent adenylate cyclase that increases intracellular cyclic AMP (cAMP) concentrations (2, 3).

At the cellular level, ET effects have been more precisely described over the last decade. PA binds to at least two independent receptors (ANTXR1 or TEM-8 [tumor endothelial marker 8] and ANTXR2 or CMG-2 [capillary morphogenesis protein 2]) on target cells (4). ANTXR2 plays the major role *in vivo* for toxin entry. A third coreceptor, named low-density lipoprotein (LDL) receptor protein 6 (LRP-6), has also been proposed (5–7). PA subunits associate into heptamers to form a prepore throughout the cell surface via lipid rafts. This PA heptamer enables the binding of EF components to the cell surface in a stoichiometric ratio of 7/3. The toxin-receptor complex is then internalized by clathrin-dependent endocytosis (8, 9). The pH decrease of early endosomes results in the translocation of these factors in multivesicular bodies (MVB), finally merging with the intracellular membrane of late endosomes. This last step is responsible for translocating EF into the cytoplasm, where it stays associated with the membrane of the late endosome (10). Its perinuclear localization generates intracellular cAMP gradients from the cell nucleus to the periphery. In turn, cAMP activates at least the transcription factor CREB in macrophages (11) and EPAC plus Rap-1 in endothelial cells (12).

At the organ level, ET disrupts endothelial homeostasis by playing upon multiple factors, although its role in edema is still being discussed (3, 13). First, ET affects directly the cytoskeleton of endothelial cells by inducing transendothelial macroaperture tunnels (14). Interestingly, the cytoskeleton can sense curvature induced by transendothelial macroaperture through an I-BAR domain protein, missing in metastasis (MIM). A delicate balance

exists between the ET-induced macroaperture and resealing by the cytoskeleton through recruitment of Arp2/3 actin polymerization, which induces actin waves that close the macroaperture (14). Second, ET also disrupts Rab11/Sec15 traffic at the exocyst, inducing reduced cadherin expression at the tight junctions (15). Third, ET induces cytoskeletal changes and inhibits chemotaxis through the action of downstream cAMP effectors EPAC and EPAC-related activators Rap-1, Epac, and MR-GEF/rapGEF5 (12).

ET has major disruptive effects on most immune cells (16), including macrophages (11, 17), which represent the first target of the pathogen following inhalation of spores. ET has also profound anti-inflammatory effects on dendritic cells (18) and lymphocytes (19). Finally, the most critical immune effects are mediated through polymorphonuclear cells (PMNs) (20). PMNs were one of the first cellular targets described during anthrax (21) and then abandoned before being put into the limelight again by using myeloid-specific, CMG-2-deficient mice (20).

Taken together, these studies are consistent with what is observed at the animal level, showing in infection models that ET is a critical virulence factor through intranasal infection that facili-

Received 17 April 2015 Accepted 16 May 2015

Accepted manuscript posted online 26 May 2015

Citation Trescos Y, Tessier E, Rougeaux C, Goossens PL, Tournier J-N. 2015. Micropatterned macrophage analysis reveals global cytoskeleton constraints induced by *Bacillus anthracis* edema toxin. *Infect Immun* 83:3114–3125. doi:10.1128/IAI.00479-15.

Editor: S. R. Blanke

Address correspondence to Jean-Nicolas Tournier, jntournier.irba@gmail.com.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00479-15>.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/IAI.00479-15

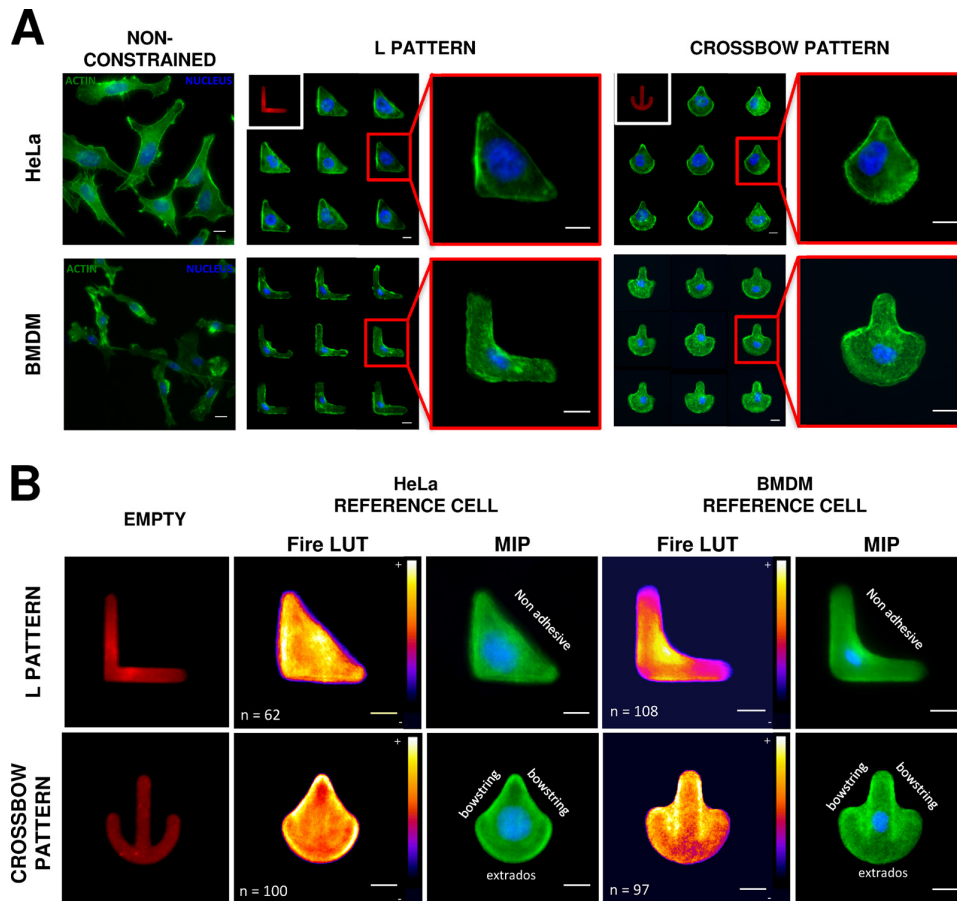


FIG 1 Micropatterned BMDMs as a model for studying host-pathogen interactions. HeLa cells and BMDMs were grown on classical fibronectin-coated coverslips or on micropatterned coverslips. Alexa Fluor 488-phalloidin-stained F-actin is depicted in green, Hoechst 33248-stained nucleus is shown in blue, and Alexa Fluor 650-stained fibronectin is shown in red. (A) Nonconstrained HeLa cells and BMDMs are shown in the left panels, while HeLa cells and BMDMs patterned on the L are shown in the middle panels and those patterned on the crossbow are shown in the right panels. For L- and crossbow-patterned cells, the design of the pattern is depicted in the white square, while one significant cell (red square) is enlarged in the large red square on the right. (B) Empty patterns are shown in the left panels. Reference cells (the median intensity of fluorescence of n cells) of HeLa cells (middle panels) and BMDMs (right panels) are depicted with the median intensity projection (MIP) representation or fire lookup table (LUT) representation. The number of cells used is shown at the bottom of each panel. On L patterns, the hypotenuse of the triangle is referred to as the “nonadhesive” side, and on the crossbow pattern, the adhesive side is the “extrados,” while the nonadhesive sides are called the “bowstrings.” Bars, 10 μ m.

tates pathogen penetration (22). At the animal level, it has also been elegantly shown in an intoxication model that ET-induced lethality occurs mainly through hepatocytes (13).

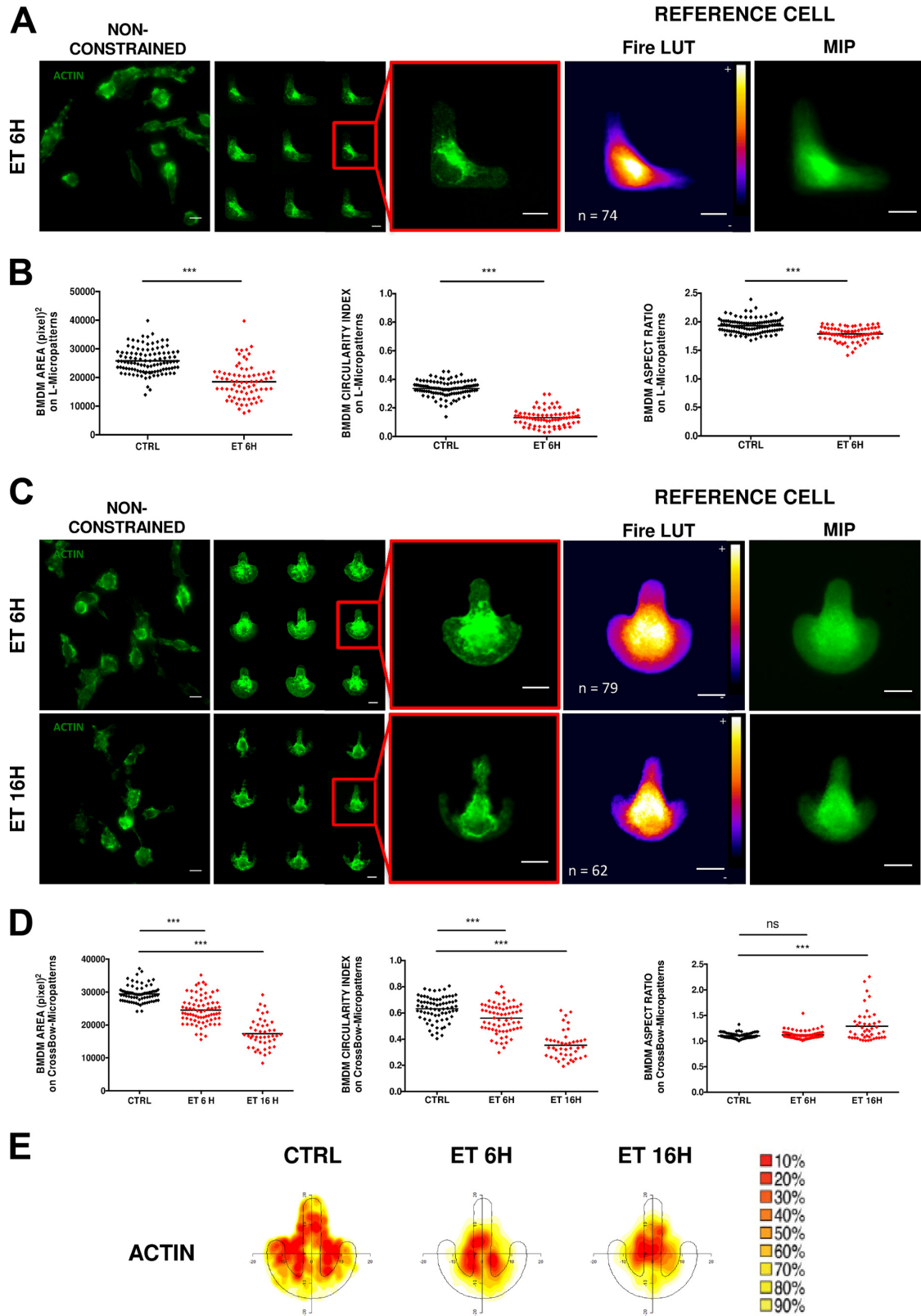
As ET effects are critical on myeloid cells such as macrophages during an infection and as ET also impairs cytoskeleton organization (23), we wanted to dissect cellular effects of anthrax ET upon the macrophage cytoskeleton. Indeed, previous reports already describe some effects of ET on macrophage functions such as chemotaxis (12) or phagocytosis (24), through cytoskeleton disruption (11).

Classical cell cultures grown on a flat adhesive microenvironment already provide some clues to ET's disruptive effects upon the cytoskeleton (11). However, this loose-constraint environment is far from reproducing *in vivo* the highly structured microenvironment and induces a high variability in size, shape, and morphology that impairs any quantitative analysis of the actin cytoskeleton, leaving many questions unanswered. Cell micropat-

terning methods have been recently developed, based on the use of a culture substrate with microscopic features that imposes a defined cell adhesion pattern (25). Cell micropatterning imposes a stable cellular form, which induces through geometrical constraint a reproducible internal organization of the actin and microtubule cytoskeleton. Cell micropatterning has recently proven to be useful in analyzing subtle changes in cell morphology triggered by drug treatment or *Salmonella* infection (26). Cell micropatterning has been developed using a highly adhesive transformed cell line, such as HeLa cells.

Here, we report the adaptation of cell micropatterning to both loosely adhesive bone marrow-derived macrophages (BMDMs) and primary peritoneal macrophages. We show that ET induces a dynamic disruption of the actin cytoskeleton and subsequent concentration around the nucleus, which then cause shrinking of the cell. Finally, the cell architecture is completely disrupted, as the cell nucleus is displaced and modified in shape. Cell micropat-

Trescos et al.



ing reveals a potent model for studying the multiple implications of cytoskeletal disruption on immune cell functions.

MATERIALS AND METHODS

Mice and ethics statement. Female C57BL/6 mice, aged 6 to 12 weeks, were obtained from Charles River and were used for the isolation of peritoneal macrophages and the generation of bone marrow-derived macrophages (BMDMs). Mouse handling and the experimental procedures were performed in accordance with the French Government guidelines for the care and use of laboratory animals and were approved by the Institut de Recherche Biomédicale des Armées ethics committee (approval number 2012/34.0).

Recombinant proteins and reagents. Protective antigen (PA) and edema factor (EF) were purchased from List Biological. A selective inhibitor of phosphodiesterase-4, Rolipram, was obtained from Enzo Life Sciences. Forskolin (catalog no. F6886) was purchased from Sigma-Aldrich.

Cell culture of HeLa cells and peritoneal macrophages and generation of BMDMs. A human cervical adenocarcinoma line (HeLa) was cultured in RPMI 1640 (Pan Biotech GmbH) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (Gibco Life Technologies)–100 U/ml penicillin–0.1 mg/ml streptomycin–2 mM L-glutamine (Gibco Life Technologies) and maintained at 37°C under a humidified atmosphere with 5% CO₂.

Primary peritoneal macrophages were collected by peritoneal washing with 5 ml RPMI 1640. The cells were pelleted by centrifugation (1,500 rpm, 5 min, 4°C) and then suspended at 2.5×10^6 cells/ml in RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum–100 U/ml penicillin–0.1 mg/ml streptomycin–2 mM L-glutamine in 6-well plates. After 2 h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere, cells were washed 3 times with RPMI 1640 to remove nonadherent cells and adherent cells (peritoneal macrophages) were subsequently cultured in RPMI 1640–10% heat-inactivated fetal calf serum for 1 day. At day 2, peritoneal macrophages were collected, washed, and resuspended in fresh medium at 5×10^5 cells/ml for further use.

BMDMs were generated from proliferating mouse bone marrow progenitors. Briefly, bone marrow cells were isolated by flushing the bone marrow shafts of femurs and tibias from mice. Red blood cells were lysed with ACK lysis buffer (Gibco Life Technologies). After washing, bone marrow cells were seeded in 6-well flat-bottom plates (Costar-Corning) at 10^6 cells/ml in RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum–100 U/ml penicillin–0.1 mg/ml streptomycin–2 mM L-glutamine (Gibco Life Technologies), henceforth referred to as complete medium (CM). Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF; Peprotech) was added to each well at 20 ng/ml. Cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. On days 3 and 5, 70% of the medium was replaced by fresh CM containing M-CSF at 10 ng/ml. At day 7, the nonadherent cells were purged and the macrophages (adherent cells) were collected, washed, and resuspended in fresh medium at 5×10^5 cells/ml for further use.

Cell seeding and incubation with toxins. For cell patterning, HeLa cells, peritoneal macrophages, and BMDMs were deposited on adhesive micropatterned coverslips coated with fibronectin FN650 (CytosChips; Cytos Inc.), according to the manufacturer's instructions, with few modifications for peritoneal macrophages and BMDMs. Briefly, peritoneal

TABLE 1 Statistical significance of the density map of F-actin analysis

Sample 1	Sample 2	P value	Significance
ET 6 h	Control	$>3.4E-38$	***
ET 16 h	Control	$>3.4E-38$	***
ET 16 h	ET 6 h	$6.46880757627423E-33$	***

macrophages and BMDMs were plated at a density of 50,000 cells/ml. After 60 min, nonadherent cells were removed by gentle flushing with fresh medium and were incubated for full spreading for an additional 4 to 6 h at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ prior to treatment. For nonpatterned cells, HeLa cells and BMDMs were seeded on 8-well BD BioCoat Fibronectin Cellware plates (BD Biosciences) 1 day before treatment in the same way as micropatterned BMDMs.

For toxin treatment, patterned and nonpatterned peritoneal macrophages and BMDMs were incubated with PA at 1 µg/ml and EF at 100 ng/ml for 6 or 16 h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. For some experiments, cells were incubated with PA alone at 1 µg/ml.

Immunostaining and image acquisition. After treatment, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS), fixed with 4% formaldehyde (Sigma-Aldrich) in cytoskeletal buffer (CB) [10 mM 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid sodium salt (MES), 3 mM MgCl₂, 138 mM KCl, 2 mM EGTA, and 0.32 M sucrose] for 30 min, and permeabilized in 0.25% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) for 5 min. Cells were blocked with 2% bovine serum albumin (BSA) in CB for 30 min. For actin staining, cells were incubated with Alexa Fluor 488-phalloidin (Life Technologies) in staining solution for 30 min. Cells were incubated in 0.2 µg/ml Hoechst 33248 (Sigma-Aldrich) for 5 min in PBS for nucleus staining before mounting in Prolong Gold antifade reagent (Life Technologies).

Microscopic image acquisitions were performed with an Olympus IX-81 inverted microscope equipped with an MT20 illumination system (Olympus). Images were captured using an Orca-ER charge-coupled device (CCD) camera (Hamamatsu Photonics), controlled by Cell software (Olympus) using a 40× objective (UPlan FLN; numerical aperture [NA], 0.75).

Image processing. All images were processed using ImageJ (National Institutes of Health). For analysis, all images from single cells per condition were assembled into one stack and aligned using the stained fibronectin micropattern and a strategy developed earlier (25). The median spatial distribution of actin or nuclei was measured by calculating the median intensity of each pixel over the stack. The median of F-actin and nuclei intensity distribution was named the “reference cell,” as coined by Théry et al. (25), with a difference being that the calculation was based not on the mean intensity but on the median intensity of each pixel. The reference cells were represented with an intensity gradient of a fire lookup table (LUT) to facilitate the interpretation of actin distribution and with a median intensity projection (MIP). The reference cells resulted from the assembly of Z-projected images of actin (green) and nuclei (blue).

Plot profile intensity and morphological parameters of shaped cells were measured by ImageJ on the stack of aligned cells. For morphological analysis, 3 parameters were calculated for each cell: the area; the circularity index ($4\pi \times \text{area}/\text{perimeter}^2$), which assumes values between 1 for circu-

FIG 2 *B. anthracis* ET induces a global actin cytoskeleton rearrangement. BMDMs were treated with 100 ng/ml of ET (e.g., PA at 1 µg/ml and EF at 100 ng/ml) for 6 or 16 h. F-actin is stained in green with Alexa Fluor 488-phalloidin. (A) The effects of ET on BMDM actin are shown on nonconstrained cells versus L-patterned cells 6 h after intoxication. Individual patterned cells are shown in the middle panel (enlarged for one representative in the red square), and the reference cells are shown in the right panels. Bars, 10 µm. (B) The effects of ET on L-patterned cells are shown for cell areas in the left panel, for circularity in the middle panel, and for aspect ratio in the right panel. Each dot represents one cell. (C) The effects of ET on BMDM actin are shown on nonconstrained cells versus crossbow-patterned cells 6 and 16 h after intoxication. Individual patterned cells are shown in the middle panel (enlarged for one representative in the red square), and the reference cells are shown in the right panels. Bars, 10 µm. (D) The effects of ET on crossbow-patterned cells are shown for cell area in the left panel, for circularity in the middle panel, and for aspect ratio in the right panel. Each dot represents one cell. (E) The density maps of F-actin are shown for control cells and after 6 and 16 h of intoxication. The colors represent the smallest regions that contain the percentages of analyzed structures from 10% (red) to 90% (yellow). ***, $P < 0.001$; ns, nonsignificant.

Trescos et al.

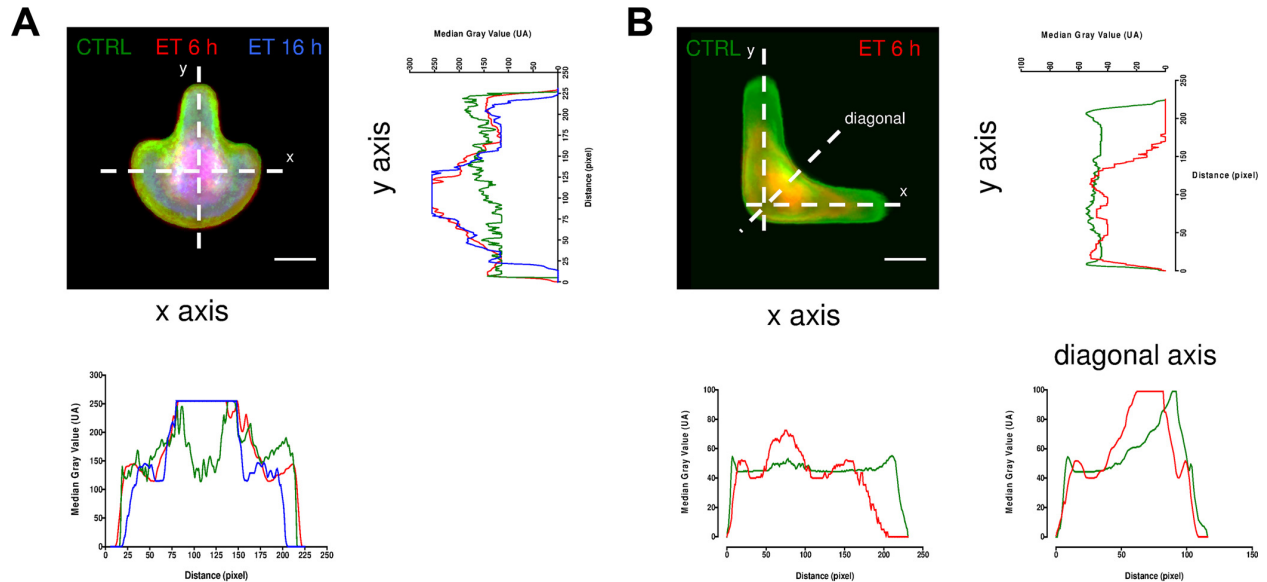


FIG 3 Analysis of actin distribution along different axes on patterned cells. (A) The reference cells (MIP) for F-actin on crossbow patterns have been overlaid for control cells (green) and for ET at 6 h (red) and 16 h (blue). The MIPs for pixels on each axis (x axis and y axis) are represented in the histograms with an overlay of control cell (green line), ET at 6 h (red line), and ET at 16 h (blue line). Bars, 10 μ m. (B) The reference cells (MIP) for F-actin on L patterns have been overlaid for control cells (green) and ET at 6 h (red). The MIPs for pixels on each axis (x axis, y axis, and diagonal axis) are represented in the histograms with an overlay of control cell (green line) and ET at 6 h (red line). Bars, 10 μ m.

lar shape and 0 for elongated morphology; and the aspect ratio (length of major axis/length of minor axis).

Density map analysis of F-actin structures and *P* value calculations were performed by Cytoo Cell Architects (Cytoo Inc.), according to the protocol developed by Schauer et al. (27).

cAMP and EF measurement. BMDMs were seeded on 96-well plates at 200,000 cells per well and cultivated for 24 h before intoxication. After subjecting cells to experimental conditions (PA, ET, forskolin, Rolipram, and ET plus Rolipram), total proteins were extracted by removing BMDM culture medium (as supernatant) and then adding lysis buffer chilled to

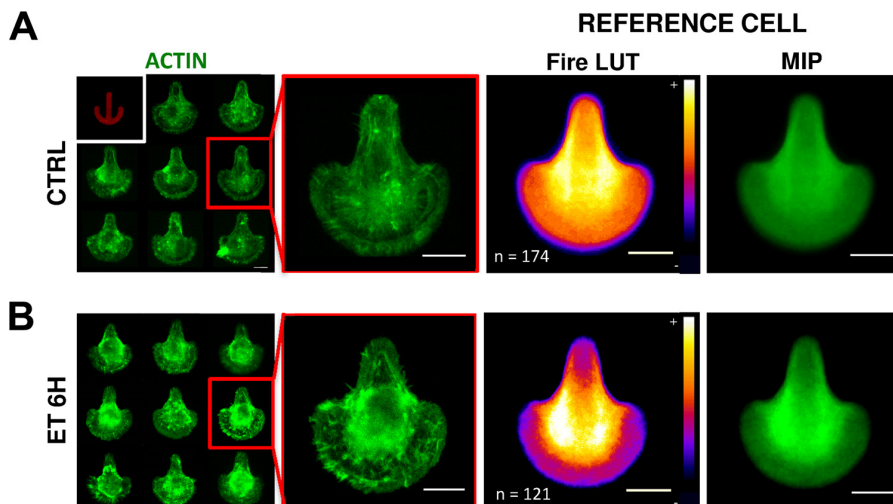


FIG 4 B. *anthracis* ET induces an actin cytoskeleton rearrangement on micropatterned peritoneal macrophages. Peritoneal macrophages were grown on crossbow-micropatterned coverslips. Alexa Fluor 488-phalloidin-stained F-actin is depicted in green, and Alexa Fluor 650-stained fibronectin is shown in red. (A) Peritoneal macrophages patterned on a crossbow shape are shown in the left panels. The design of the pattern is depicted in the white square, while one significant cell (red square) is enlarged in the large red square on the right. Reference cells of peritoneal macrophages (right panels) are depicted with the median intensity projection (MIP) representation or fire lookup table (LUT) representation. The number of cells used is shown at the bottom of each panel. Bars, 10 μ m. (B) Peritoneal macrophages were treated with 100 ng/ml of ET (e.g., 1 μ g/ml PA and 100 ng/ml EF) for 6 h. F-actin is stained in green with Alexa Fluor 488-phalloidin. Individual patterned cells are shown in the left panel (enlarged for one representative in the red square), and the reference cells are shown in the right panels. The number of cells used is shown at the bottom of each panel. Bars, 10 μ m.

4°C (radioimmunoprecipitation assay [RIPA] buffer; Cell Signaling Technology), supplemented with a protease-phosphatase inhibitor cocktail (Cell Signaling Technology). The cells were incubated in lysis buffer on ice for 10 min and centrifuged at 13,000 rpm for 10 min, and cell lysates were collected for protein dosage (Bradford assay) and cAMP/EF measurement.

The adenylyl cyclase EF activity measured by assessing the production of cAMP used a competitive enzyme immunoassay (EIA) as described previously (28). Briefly, the assay consisted of three steps. (i) The enzymatic reaction assay for EF was carried out as follows: each sample was diluted in 20 mM HEPES buffer (pH 7.2) with 0.5 mg/ml bovine serum albumin, 10 mM MgCl₂, 10 μM CaCl₂, 1 mM ATP, and 10 μM CaM. The standard curve of EF was performed with serial dilutions of EF in untreated cell lysates. The adenylyl cyclase activities were then assayed for 30 min at 30°C. (ii) The second step was elimination of ATP interference and increase of cAMP sensitivity by chemical transformations (production of acetylated cAMP). (iii) The third step was the EIA: acetylated cAMP was placed in competition with a cAMP enzymatic tracer, cAMP coupled to acetylcholinesterase (AChE), for binding to anti-cAMP polyclonal antibodies, for 90 min at room temperature. The amount of tracer bound to the anti-cAMP antibody site was then measured by incubation with AChE substrate (Ellman's reagent) at room temperature overnight. The absorbance was recorded at 405 nm using a spectrophotometer microplate reader (Multiskan Ascent; Labsystems). EF activity was expressed as picograms per milligram of protein for cell lysate and as picograms per milliliter for supernatant.

To detect cAMP, samples were treated without dilution or with dilution in EIA buffer (0.1 M phosphate buffer [pH 7.4], 0.15 M NaCl, 0.1% BSA, 10 μM CaCl₂, 1 mM EDTA, 0.01% sodium azide). A standard curve of cAMP was performed with serial dilutions of 7,500 pmol/ml of cAMP in untreated cell lysates, diluted in agreement with the dilution of the sample. To increase the sensitivity of the detection, the assay consisted of steps 2 and 3 described above. cAMP content was expressed as picomoles per milligram of protein.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software (GraphPad Software, Inc.). Comparisons between groups were performed using a Mann-Whitney test to determine statistical significance ($P < 0.001$).

RESULTS

Micropatterning model for BMDMs. In a structured tissue, cells integrate constant information from their microenvironment as previously shown by micropatterned cell strategy (29). Micropatterning has been developed by using mainly highly adherent cells, such as transformed human HeLa cells. However, those cells are transformed and do not reproduce the phenotype of differentiated immune cells such as macrophages. We have thus established an adaptation of the general micropatterning protocol using commercial crossbow and L micropatterns to culture BMDMs, as these shapes induce "polar" organization of the cell in contrast to nonconstrained cells (Fig. 1A). The nucleus-centrosome-Golgi axis that forms the global orientation of cell polarity is oriented from regions that lack extracellular matrix toward those that are abundant (25). In accordance with previous reports, we have observed a polar organization in BMDMs similar to what has been previously described with HeLa cells, compared to nonconstrained cells (Fig. 1A). Interestingly, the global aspects of the cells on the pattern and organization of actin fibers were very different in highly adherent HeLa cells versus loosely adherent BMDMs. Such results suggest that cell adhesion is due to cytoskeletal organization, cellular tension, and contraction that may provide spatial cues for the establishment of cell shape and actin cytoskeleton organization. With the tightly adherent HeLa cells, the cytoskele-

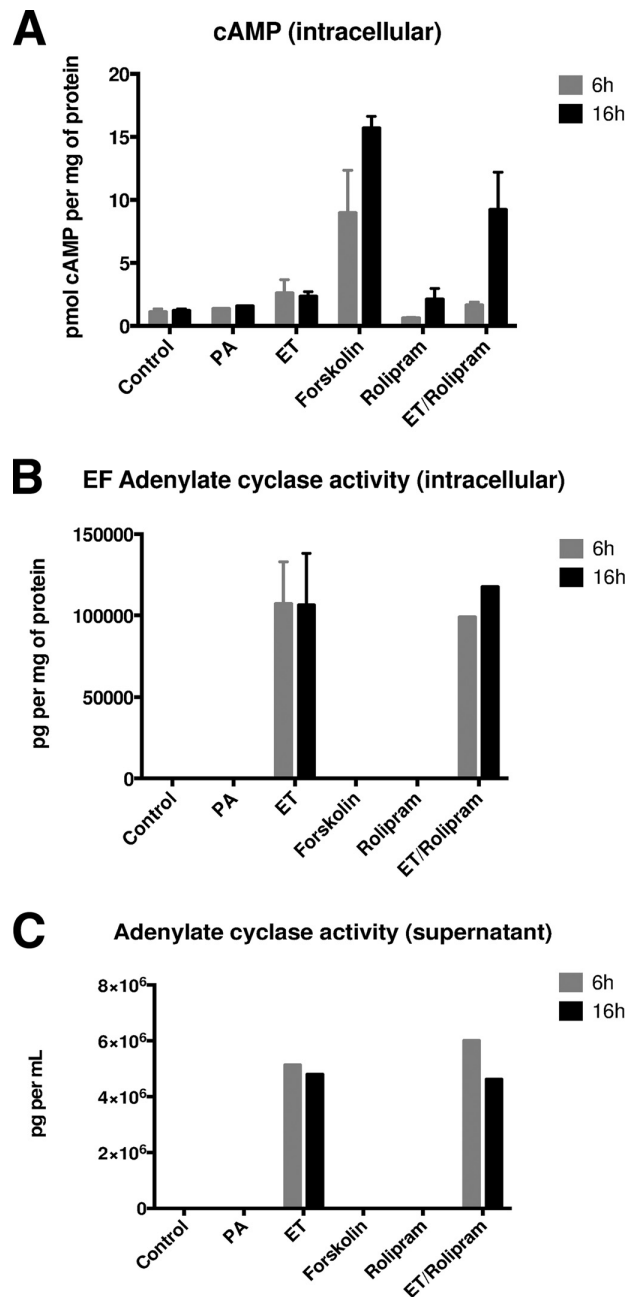
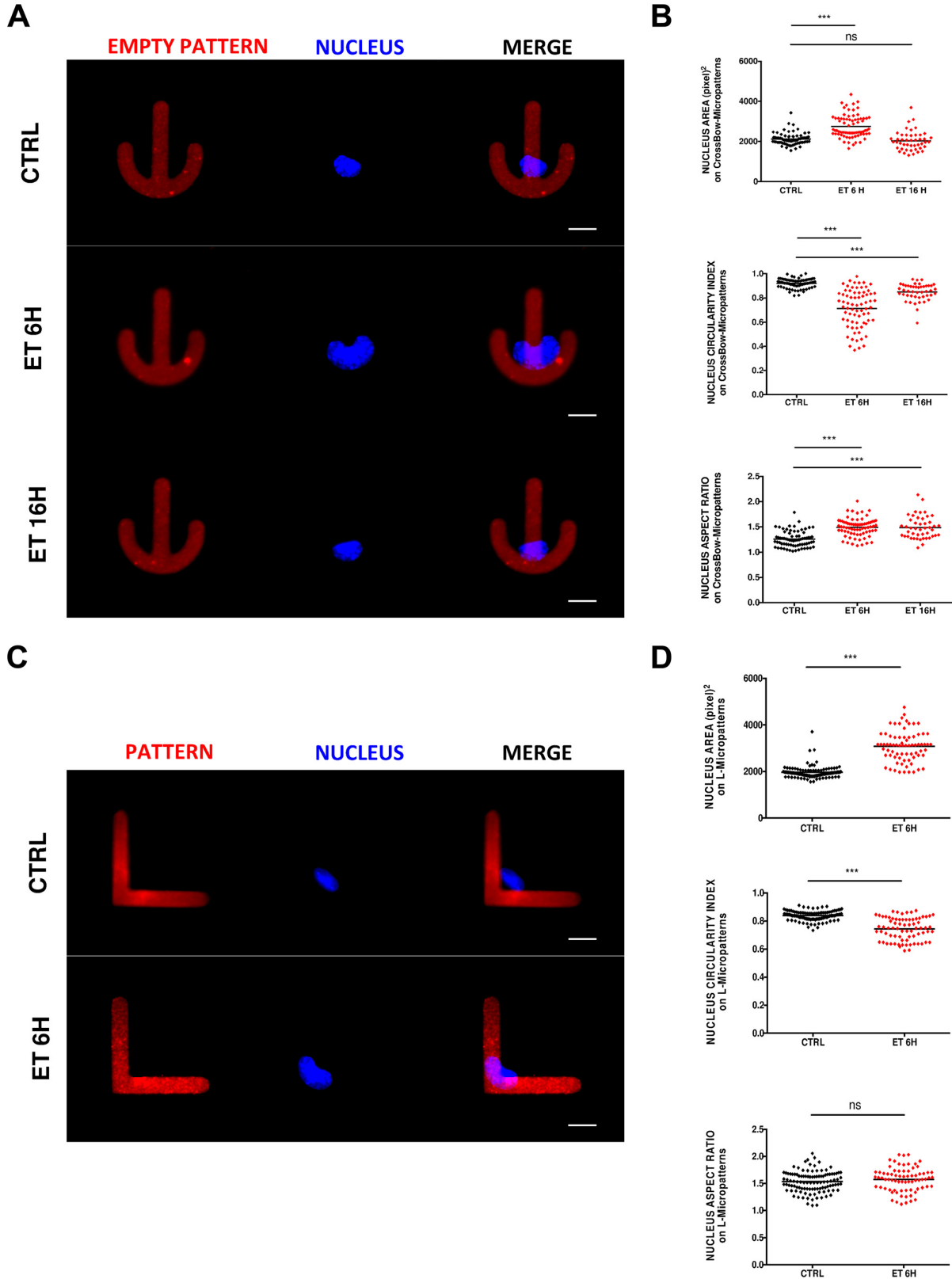


FIG 5 Effects of ET on intracellular cAMP. BMDMs were treated with PA (1 μg/ml), ET (1 μg/ml PA plus 100 ng/ml EF), forskolin (100 μM), Rolipram (10 μM), and ET plus Rolipram. After 6 or 16 h of incubation, supernatant and cell lysates were collected to measure cAMP concentration in cell lysate and EF adenylate cyclase activity in cell lysate and supernatant. Data are presented as picomoles of cAMP per milligram of protein lysate. (A) Quantification of intracellular cAMP under indicated conditions and periods of time following intoxication. Data are presented as picograms of EF per milligram of protein lysate. (B) Quantification of the EF adenylate cyclase activity in supernatant under indicated conditions and periods of time following intoxication. Data are presented as picograms of EF per milliliter of supernatant.

Trescos et al.



ton was more spread out, filling up the concavity of the patterns (Fig. 1B). On the L patterns, HeLa cells formed triangles filling up the nonadhesive side, and on the crossbow, the bowstrings were tensed by stress fibers. In sharp contrast, we did not see any significant bundles of actin stress fibers on the bowstrings or cortical actin along the “extrados” (26), suggesting a specific cytoskeleton architecture in these highly adherent cells (Fig. 1B). The median intensity of F-actin staining from >60 cells, by projecting the median intensity projection (MIP) of each aligned cell into a median intensity map for the reference cell, allowed quantitative measurements of actin rearrangements induced in micropatterned cells (Fig. 1B). The F-actin distribution is represented with a heat map for the “median cell.” BMDM global shapes on crossbow and L micropatterns were significantly different from what was previously described with HeLa cells. For the rest of the experiments, we focused on BMDMs, which represent a better cellular model for anthrax infection.

ET triggers a global actin cytoskeleton rearrangement in BMDMs. Micropatterned BMDMs were intoxicated with 100 ng/ml of ET and further analyzed at different time points. We observed a progressive actin rearrangement with time after ET exposure. ET induced a persistent actin meshwork collapse into a dense F-actin centroid starting at 6 h for L patterns (Fig. 2A). BMDMs incubated with PA only did not show any modification of actin organization versus control BMDMs (see Fig. S1A in the supplemental material). Quantitative analysis of the cell area, circularity index ($4\pi \times \text{area}/\text{perimeter}^2$), and aspect ratio (length of major axis/length of minor axis) showed a significant decrease of each parameter (Fig. 2B). On crossbow patterns, we also observed a progressive actin cytoskeleton concentration around the nucleus at 6 and 16 h (Fig. 2C). At 16 h, cells were shrunk with numerous holes in the actin staining on the fibronectin patterns (Fig. 2C). In accordance with the L pattern, quantitative measurements of cell shape were significantly affected. Cell area decreased very significantly along time, as well as the circularity index, while the aspect ratio increased after 16 h (Fig. 2D). The aspect ratio is a ratio between the longest and largest dimension of the cell, and focal adhesion loss seems to affect the bow more than the stalk in the pattern.

Next, we tried to statistically compare the actin cytoskeleton rearrangements induced by ET. The average intensity maps were transformed into density maps by using software developed by K. Schauer’s laboratory at the Institut Curie and licensed by Cyto Cell Architects (27, 30). Fluorescence signal is transformed into a cloud of coordinate points by segmentation. Coordinates were replaced by Gaussian functions (kernels) that were summed, revealing the underlying density of F-actin throughout the cell. Red colors represent areas with highest probabilities of F-actin, while yellow colors represent areas with less F-actin (Fig. 2E). Density maps allowed statistical comparisons between actin organizations (Table 1). These data clearly confirmed the high statistical signifi-

cance ($P < 0.001$) of the actin organization by comparing the control BMDMs with those cells treated with ET for 6 h and 16 h, or the 6-h representations were compared with the 16-h-treatment group.

We also illustrated how ET induced different contractions of actin depending on the cell axis and pattern shape. On the crossbow, contraction of the actin cytoskeleton was more pronounced on the x than on the y axis, with a concentration of intense pixels in the center (Fig. 3A). On the L pattern, we saw mainly a loss of adhesion at the cell edge (on x and y axis) and contraction on the diagonal at the nonadhesive side (Fig. 3B).

ET also alters actin organization of primary peritoneal macrophages. Our first results, although interesting, were limited to BMDMs that may harbor specific features. To demonstrate that the actin global cytoskeleton rearrangement induced by ET could also affect primary macrophages, we performed experiments on primary peritoneal macrophages (Fig. 4). We observed a similar pattern of actin retraction on crossbow with ET at 6 h. Peritoneal macrophages incubated with PA only did not show any modification of actin organization versus control peritoneal macrophages (see Fig. S1B in the supplemental material).

ET enters the cells and modulates intracellular cAMP levels. Next, we correlated the effects of ET incubation with intracellular cAMP levels, as ET is known to be a calcium and calmodulin-dependent adenylate cyclase. We did not observe a significant increase of cAMP in the BMDMs at 6 and 16 h after incubation with ET, in contrast to the high increase induced by forskolin (Fig. 5A). This could be due to the kinetics of cAMP production that decreases over time as previously shown on alveolar macrophages and a very high phosphodiesterase activity in macrophages, as suggested by the fact that the addition of Rolipram, a specific phosphodiesterase-4 inhibitor (31), very significantly increased the cAMP levels. Another option would be that a very low threshold of cAMP would trigger actin remodeling. To rule out a potential biochemical inhibition of EF activity after its entry in the cell, or a blockage of its entry, we also measured adenylate cyclase activity of EF in the supernatant and in the cell (Fig. 5B and C). We observed a significant calcium-calmodulin-dependent adenylate cyclase activity in the cells, demonstrating that EF had entered the cells after 6 and 16 h at a very significant level and was biochemically active.

ET induces a nuclear shape deformation and a nucleus displacement. We also analyzed the shape of the BMDM nucleus, as the nuclear shape can be affected by cytosolic constraints, and its shape and size are associated with differentiation and several diseases (32). On the crossbow, the nucleus increased in size with a loss of circularity and a kidney-like shape at 6 h, before returning to a normal size that was still deformed and elongated at 16 h (Fig. 6A and B). We saw the same for BMDM nucleus on the L pattern at 6 h (Fig. 6C and D).

We further calculated whether the nucleus was also displaced

FIG 6 Analysis of nuclear shape deformation. BMDMs were treated with 100 ng/ml of ET (e.g., 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PA and 100 ng/ml EF) for 6 or 16 h. The nuclei are stained in blue with Hoechst 33248, and the fibronectin patterns are shown in red with Alexa Fluor 650. (A) The effects of ET on BMDM median intensity projection (MIP) of nucleus are shown on crossbow-patterned cells 6 and 16 h after intoxication. Empty patterns are on the left, MIPs of nuclei are in the middle panels, and the merged images are in the right panels. Bars, 10 μm . (B) The effects of ET on nuclei of crossbow-patterned cells are plotted for nucleus area (top panel), circularity (middle panel), and aspect ratio (bottom panel) for control cells and at 6 and 16 h. Each dot represents one cell. (C) The effects of ET on BMDM MIP of nucleus are shown on L-patterned cells 6 h after intoxication. Empty patterns are on the left, MIPs of nuclei are in the middle panels, and merged images are in the right panels. Bars, 10 μm . (D) The effects of ET on nuclei of L-patterned cells are plotted for nucleus area (top panel), circularity (middle panel) and aspect ratio (bottom panel) for control cells and at 6 h. Each dot represents one cell. ***, $P < 0.001$; ns, nonsignificant.

Trescos et al.

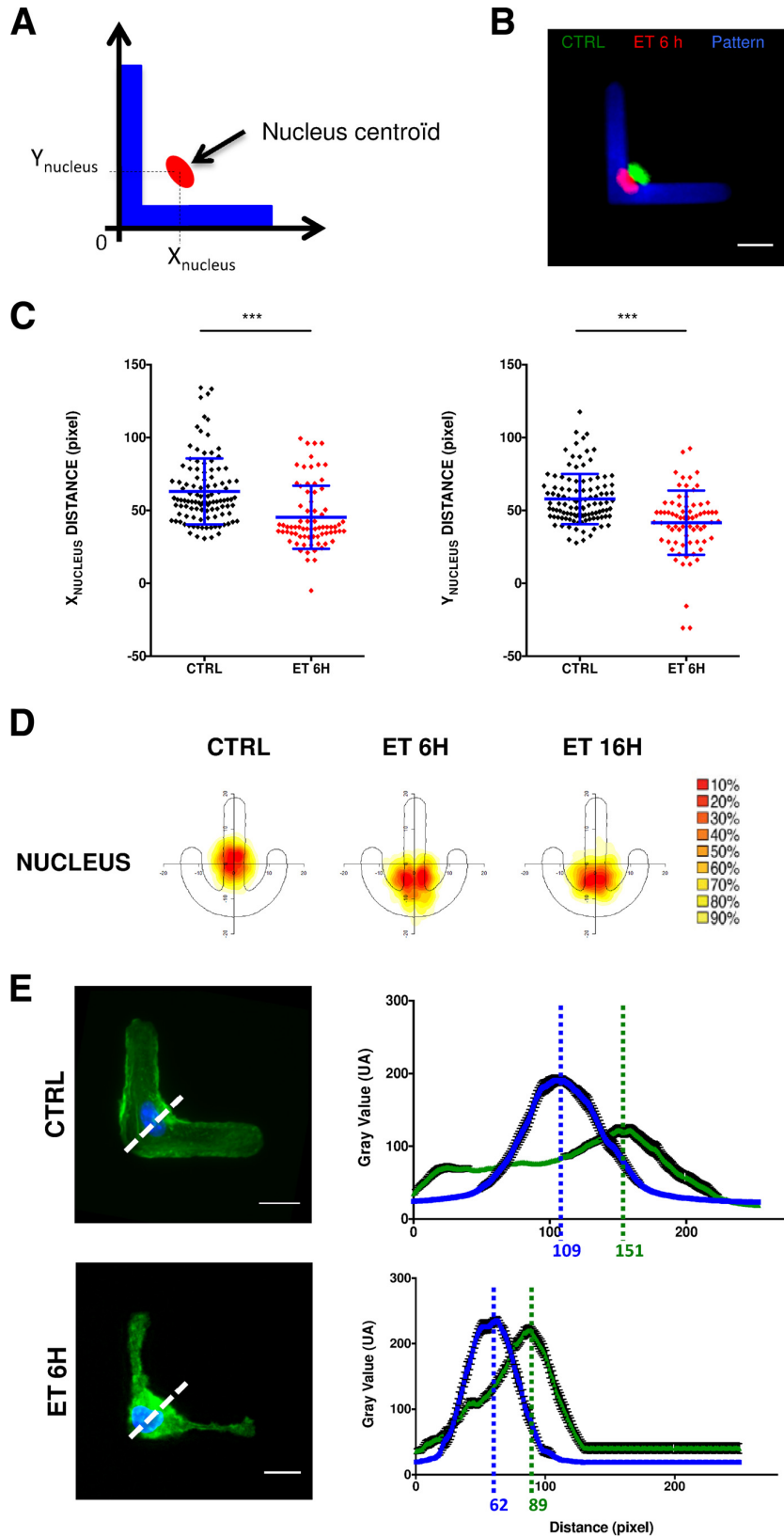


TABLE 2 Statistical significance of the density map of Hoechst 33248 staining analysis

Sample 1	Sample 2	P value	Significance
ET 6 h	Control	$>3.4E-38$	***
ET 16 h	Control	$>3.4E-38$	***
ET 16 h	ET 6 h	$2.62398991424106E-11$	***

in the cell. We calculated the centroid of the nucleus coordinate on the x and y axes, as shown in Fig. 7A. We observed that the nucleus was significantly displaced, as the distance between the axis origin and the centroid was significantly shorter in the x and y axis on the L pattern (Fig. 7B and C). In accordance with our observation on the L pattern, we also used the density map to analyze nuclear displacement on the crossbow (Fig. 7D). We effectively observed a displacement of the nucleus that is significantly going toward the extrados of the crossbow (Fig. 7E and Table 2). In both models (L and crossbow), the nucleus tended to be displaced toward the more adhesive edge of the cell.

To correlate the nuclear displacement with reorganization of the actin cytoskeleton, we compared the median intensity value of each pixel on an axis starting from the bottom left corner of the L micropattern and extending to the external edge of the cell on the concavity side (Fig. 7E). The maximum of the median intensity of each pixel for the nucleus was at 109 pixels on the diagonal from the edge of the cell in controls, whereas it moved to 62 pixels after 6 h of ET incubation. In the meantime, for actin the maximum of the median intensity moved from 151 pixels to 89 pixels from the edge of the pattern. This clearly shows that the nucleus displacement is correlated with a displacement of actin at the center of the cell. Interestingly, the value of maximum of the median intensity increased for the nucleus staining (190.70 ± 6.3 [arbitrary units {AU}] for control versus 235.0 ± 6.4 for ET treatment for 6 h) and for the actin staining (122.2 ± 7.4 [AU] for control versus 220.2 ± 8.9 for ET treatment for 6 h), indicating that both structures were squeezed. This observation indicates that the nucleus was progressively displaced toward the adhesive edge in a close correlation with a concentration of actin on its nonadhesive edge.

DISCUSSION

For the first time, we have set up a protocol for patterning loosely adherent immune cells and used it to analyze the effect of a bacterial toxin on the actin cytoskeleton. We have quantified unexpected disruptive effects of *B. anthracis* ET on the actin cytoskeleton of BMDMs.

The host cytoskeleton is a common target of many bacterial pathogens through exotoxin secretion. C2 toxin of *Clostridium botulinum* was the first to be described to ADP-ribosylate actin (33). ADP-ribosylating activity has been extended to the iota family, which includes *Clostridium perfringens* iota toxin, *Clostridium spiroforme* CST, and *Clostridium difficile* CDT, and for *Bacil-*

lus cereus vegetative insecticidal protein (VIP) (review in references 34 and 35). C3 of *C. botulinum* was the first toxin to be shown to act as a Rho GTPase ADP-ribosylating toxin (36), but numerous other protein toxins produced by bacteria have been since shown to deregulate Rho family GTPases through either mimicking or covalently affecting GTPases, mainly by ADP-ribosylation (37, 38). Those alterations of the Rho GTPases induce a massive disruption of actin that is used by enteric pathogens to cross the epithelial barrier. Interestingly, Rho GTPase alterations are so common that they constitute a danger signal sensed by NOD1 activation (39). EF has never been shown to have ADP-ribosylating activity (for a review, see reference 23), and has never been suggested to have any direct effect on actin, although a close evolutionary path between *Clostridium* and *Bacillus* toxin families is suggested by sequence analysis (34). At the amino acid sequence level, *Clostridium* and *Bacillus* toxins share 80 to 85% identity within the iota family (which includes iota toxin, CST, and CDT), 31 to 40% identity between C2 and iota family toxins, and 26 to 30% identity between PA and clostridial binding components (34). Furthermore, these bacteria are Gram-positive, spore-forming bacilli commonly found in soil.

ET induces significant morphological and cytoskeletal changes in macrophages (11, 24), primary human microvascular endothelial cells (HMVEC) (12), and neutrophils (40). Some morphological differences have been observed between cells after ET treatment, such as formation of filopodial protrusions in mammalian cells (41) versus reduction in macrophages (24), or cell rounding (24, 41). Flattened cell morphology was observed in HMVEC after incubation with ET (12). In any case, every cell type had reduced spread morphology, a lowered F-actin content, and actin redistribution to the cell margin in a time-dependent manner (11, 24, 40, 41).

It is also interesting that EF also affects RAB11, another GTPase that controls intracellular vesicular trafficking, and disrupts Notch/DLL4 signaling at the adherens junctions (15). EF acts on RAB11 through the increase of cAMP and protein kinase A (PKA) and EPAC-RAP-1 activation. It is also interesting that the cholera toxin ADP-ribosylates the stimulatory G protein ($G_{s\alpha}$), which causes a pathological intracellular increase of cAMP, and RAB11 disruption through PKA and EPAC-RAP-1 (42). How cAMP increase affects RAB11 regulation is still unknown, but this may explain some effects observed on the cytoskeleton organization (43).

So far, the slight but consistent effects of ET on various cytoskeleton cell types could not be quantified, because no technology was developed to address this question. We have used the cell micropatterning technique developed in the field of cell biology to quantify the effects of ET. The idea of exploring cytoskeleton-pathogen interactions by micropatterning is not completely new, as it has been previously used to address host cell-*Salmonella* interactions (26). However, these studies were performed on HeLa

FIG 7 Nucleus displacement is correlated with actin reorganization. (A) The diagram shows how the coordinates of the nucleus centroid (in red) are calculated along the axes (x and y) drawn along the pattern (in blue). (B) The picture highlights displacement of the nucleus induced by ET by the overlay of the nucleus of a control (green) and cells treated with ET for 6 h (red). Bar, 10 μ m. (C) Coordinates of the nucleus centroid on the x (left panel) and y (right panel) axes are plotted for control and cells treated with ET for 6 h. Each dot represents one cell. ***, $P < 0.001$. (D) The density maps of the nucleus are shown for control cells and after 6 and 16 h of treatment with ET. Colors represent the smallest regions that contain the percentages of analyzed structures from 10% (red) to 90% (yellow). (E) The median intensity value (\pm standard error of the mean) of each pixel (blue, nucleus; green, actin) is calculated on a diagonal starting at the bottom left corner of the L micropattern and going up to the nonadhesive edge of the cell. Bars, 10 μ m.

Trescos et al.

cells, which are human transformed cells. Even if HeLa cells are easy to pattern and have some value in the field of cell biology, they are far from being relevant for studying host-pathogen interactions in anthrax. Moreover, transformed cell lines behave differently from BMDMs for amoeboid migration, suggesting that HeLa and BMDM cytoskeletons bear significant differences in terms of organization (44). We have then extended the technique of patterns on BMDMs by adapting a protocol on commercial micropatterns.

Here, we show that ET induces a collapse of F-actin, packed in the center of the BMDMs. This actin disruption induces a loss of adherence, decrease of cell surface, and blebs in the cell center (see Fig. S2 in the supplemental material).

It is not clear if the changes of nuclear shape are due only to cytosolic actin reorganization and the disruption of F-actin cables, followed by the pressure of actin in the cell center, or if they also involve the nucleoskeleton. It has already been shown that cytosolic constraints affect nuclear shape and finally chromatin organization and cell cycle (45). More interestingly, cell geometry and nuclear shape can modulate gene expression (46). The effects of ET on BMDM nuclear shape may also participate in the broad transcription alterations induced by ET (11).

A close look at the effects that we show here may explain numerous alterations previously described in phagocytosis (24) or cytokine production after intoxication by ET (18). Actin disorganization may also affect other general cellular functions, such as protein synthesis and sorting, compartment organization, and cell cycling. Macrophages play a crucial role in the immune system of scavenging pathogens and pollutants, presenting antigen to lymphocytes, and regulating the immune system by producing cytokines.

From a therapeutic perspective, it would also be of great interest to decipher how ET alters cytoskeleton organization.

Eventually, our technique can prove powerfully effective to analyze and quantify slight cytoskeleton alterations induced by bacterial toxins or other virulence factors. As micropatterned BMDMs can be affected by many different virulence factors, they represent a valuable new tool for quantitative analysis of host-pathogen interactions.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Direction Générale de l'Armement (DGA) (PDH-2-NRBC-2-B2-403).

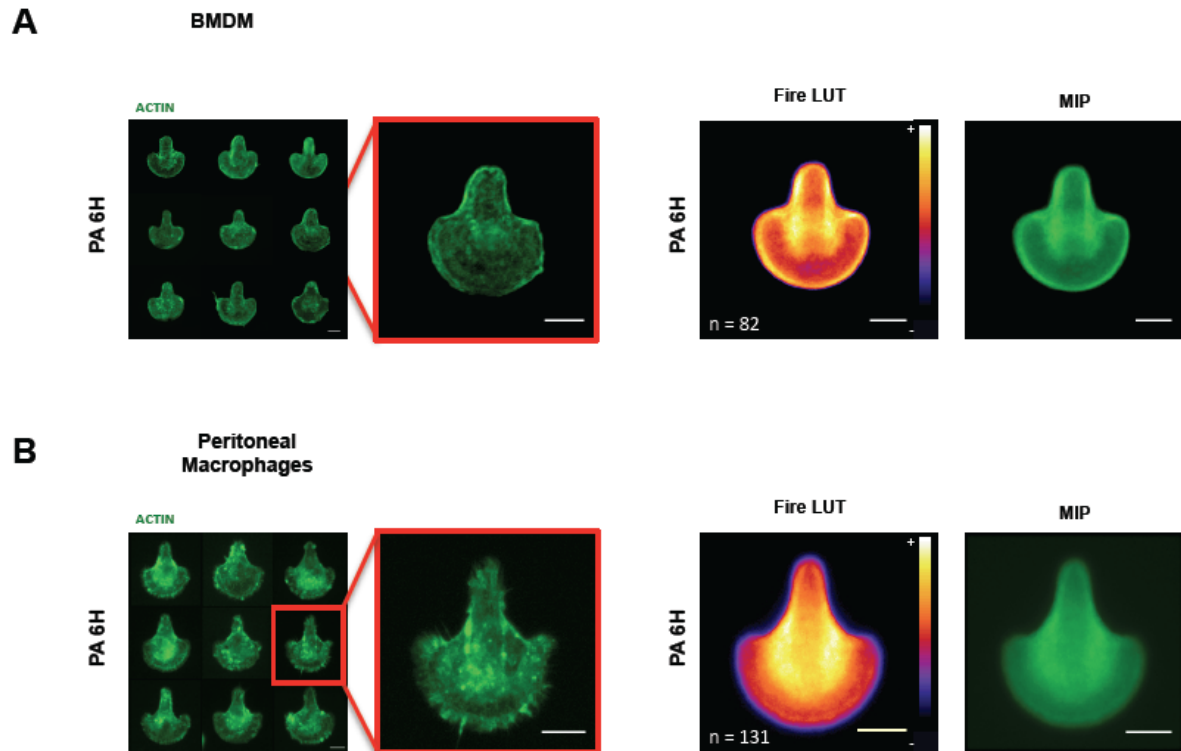
We thank Bradley G. Stiles for reading and editing the manuscript.

REFERENCES

- Mock M, Fouet A. 2001 Anthrax. *Annu Rev Microbiol* 55:647–671. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.647>.
- Moayeri M, Leppla SH. 2009. Cellular and systemic effects of anthrax lethal toxin and edema toxin. *Mol Aspects Med* 30:439–455. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2009.07.003>.
- Guichard A, Nizet V, Bier E. 2012. New insights into the biological effects of anthrax toxins: linking cellular to organismal responses. *Microbes Infect* 14:97–118. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2011.08.016>.
- van der Goot G, Young JA. 2009. Receptors of anthrax toxin and cell entry. *Mol Aspects Med* 30:406–412. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2009.08.007>.
- Wei W, Lu Q, Chaudry GJ, Leppla SH, Cohen SN. 2006. The LDL receptor-related protein LRP6 mediates internalization and lethality of anthrax toxin. *Cell* 124:1141–1154. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2005.12.045>.
- Young JJ, Bromberg-White JL, Zylstra C, Church JT, Boguslawski E, Resau JH, Williams BO, Duesbery NS. 2007. LRP5 and LRP6 are not required for protective antigen-mediated internalization or lethality of anthrax lethal toxin. *PLoS Pathog* 3:e27. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.0030027>.
- Ryan PL, Young JA. 2008. Evidence against a human cell-specific role for LRP6 in anthrax toxin entry. *PLoS One* 3:e1817. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0001817>.
- Abrami L, Liu S, Cosson P, Leppla SH, van der Goot FG. 2003. Anthrax toxin triggers endocytosis of its receptor via a lipid raft-mediated clathrin-dependent process. *J Cell Biol* 160:321–328. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200211018>.
- Abrami L, Bischofberger M, Kunz B, Groux R, van der Goot FG. 2010. Endocytosis of the anthrax toxin is mediated by clathrin, actin and unconventional adaptors. *PLoS Pathog* 6:e1000792. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000792>.
- Dal Molin F, Tonello F, Ladant D, Zornetta I, Zamparo I, Di Benedetto G, Zaccolo M, Montecucco C. 2006. Cell entry and cAMP imaging of anthrax edema toxin. *EMBO J* 25:5405–5413. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7601408>.
- Kim C, Wilcox-Adelman S, Sano Y, Tang WJ, Collier RJ, Park JM. 2008. Antiinflammatory cAMP signaling and cell migration genes co-opted by the anthrax bacillus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:6150–6155. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0800105105>.
- Hong J, Doebele RC, Lingen MW, Quilliam LA, Tang WJ, Rosner MR. 2007. Anthrax edema toxin inhibits endothelial cell chemotaxis via Epac and Rap1. *J Biol Chem* 282:19781–19787. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M700128200>.
- Liu S, Zhang Y, Moayeri M, Liu J, Crown D, Fattah RJ, Wein AN, Yu ZX, Finkel T, Leppla SH. 2013. Key tissue targets responsible for anthrax-toxin-induced lethality. *Nature* 501:63–68. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12510>.
- Maddugoda MP, Stefani C, Gonzalez-Rodriguez D, Saarikangas J, Torrinio S, Janel S, Munro P, Doye A, Prodon F, Aurrand-Lions M, Goossens PL, Lafont F, Bassereau P, Lappalainen P, Brochard F, Lemichem E. 2011. cAMP signaling by anthrax edema toxin induces transendothelial cell tunnels, which are resealed by MIM via Arp2/3-driven actin polymerization. *Cell Host Microbe* 10:464–474. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2011.09.014>.
- Guichard A, McGillivray SM, Cruz-Moreno B, van Sorge NM, Nizet V, Bier E. 2010. Anthrax toxins cooperatively inhibit endocytic recycling by the Rab11/Sec15 exocyst. *Nature* 467:854–858. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09446>.
- Tournier JN, Rossi Paccani S, Quesnel-Hellmann A, Baldari CT. 2009. Anthrax toxins: a weapon to systematically dismantle the host immune defenses. *Mol Aspects Med* 30:456–466. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2009.06.002>.
- Park JM, Greten FR, Wong A, Westrick RJ, Arthur JS, Otsu K, Hoffmann A, Montminy M, Karin M. 2005. Signaling pathways and genes that inhibit pathogen-induced macrophage apoptosis—CREB and NF-kappaB as key regulators. *Immunity* 23:319–329. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2005.08.010>.
- Tournier JN, Quesnel-Hellmann A, Mathieu J, Montecucco C, Tang WJ, Mock M, Vidal DR, Goossens PL. 2005. Anthrax edema toxin cooperates with lethal toxin to impair cytokine secretion during infection of dendritic cells. *J Immunol* 174:4934–4941. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.174.8.4934>.
- Paccani SR, Tonello F, Ghittoni R, Natale M, Muraro L, D'Elis MM, Tang WJ, Montecucco C, Baldari CT. 2005. Anthrax toxins suppress T lymphocyte activation by disrupting antigen receptor signaling. *J Exp Med* 201:325–331. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20041557>.
- Liu S, Miller-Randolph S, Crown D, Moayeri M, Sastalla I, Okugawa S, Leppla SH. 2010. Anthrax toxin targeting of myeloid cells through the CMG2 receptor is essential for establishment of *Bacillus anthracis* infections in mice. *Cell Host Microbe* 8:455–462. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2010.10.004>.
- Wright GG, Mandell GL. 1986. Anthrax toxin blocks priming of neutrophils by lipopolysaccharide and by muramyl dipeptide. *J Exp Med* 164:1700–1709. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.164.5.1700>.
- Dumetz F, Jouvion G, Khun H, Glomski JJ, Corre JP, Rougeaux C, Tang WJ, Mock M, Huerre M, Goossens PL. 2011. Noninvasive imaging technologies reveal edema toxin as a key virulence factor in anthrax. *Am J Pathol* 178:2523–2535. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.02.027>.
- Trescos Y, Tournier JN. 2012. Cytoskeleton as an emerging target of anthrax toxins. *Toxins (Basel)* 4:83–97. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins4020083>.
- Yeager LA, Chopra AK, Peterson JW. 2009. *Bacillus anthracis* edema toxin suppresses human macrophage phagocytosis and cytoskeletal re-

- modeling via the protein kinase A and exchange protein activated by cyclic AMP pathways. *Infect Immun* 77:2530–2543. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00905-08>.
25. Thery M, Racine V, Piel M, Pepin A, Dimitrov A, Chen Y, Sibarita JB, Bornens M. 2006. Anisotropy of cell adhesive microenvironment governs cell internal organization and orientation of polarity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:19771–19776. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0609267103>.
 26. Vonaesch P, Cardini S, Sellin ME, Goud B, Hardt WD, Schauer K. 2013. Quantitative insights into actin rearrangements and bacterial target site selection from *Salmonella* Typhimurium infection of micropatterned cells. *Cell Microbiol* 15:1851–1865. <http://dx.doi.org/10.1111/cmi.12154>.
 27. Schauer K, Duong T, Bleakley K, Bardin S, Bornens M, Goud B. 2010. Probabilistic density maps to study global endomembrane organization. *Nat Methods* 7:560–566. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1462>.
 28. Duriez E, Goossens PL, Becher F, Ezan E. 2009. Femtomolar detection of the anthrax edema factor in human and animal plasma. *Anal Chem* 81:5935–5941. <http://dx.doi.org/10.1021/ac900827s>.
 29. Thery M. 2010. Micropatterning as a tool to decipher cell morphogenesis and functions. *J Cell Sci* 123:4201–4213. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.075150>.
 30. Duong T, Goud B, Schauer K. 2012. Closed-form density-based framework for automatic detection of cellular morphology changes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:8382–8387. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1117796109>.
 31. Souness JE, Rao S. 1997. Proposal for pharmacologically distinct conformers of PDE4 cyclic AMP phosphodiesterases. *Cell Signal* 9:227–236. [http://dx.doi.org/10.1016/S0898-6568\(96\)00173-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0898-6568(96)00173-8).
 32. Jevtic P, Edens LJ, Vukovic LD, Levy DL. 2014. Sizing and shaping the nucleus: mechanisms and significance. *Curr Opin Cell Biol* 28:16–27. <http://dx.doi.org/10.1016/jceb.2014.01.003>.
 33. Aktories K, Barmann M, Ohishi I, Tsuyama S, Jakobs KH, Habermann E. 1986. Botulinum C2 toxin ADP-ribosylates actin. *Nature* 322:390–392. <http://dx.doi.org/10.1038/322390a0>.
 34. Barth H, Aktories K, Popoff MR, Stiles BG. 2004. Binary bacterial toxins: biochemistry, biology, and applications of common *Clostridium* and *Bacillus* proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 68:373–402. <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.68.3.373-402.2004>.
 35. Stiles BG, Pradhan K, Fleming JM, Samy RP, Barth H, Popoff MR. 2014. *Clostridium* and *Bacillus* binary enterotoxins: bad for the bowels, and eukaryotic being. *Toxins (Basel)* 6:2626–2656. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins6092626>.
 36. Rubin EJ, Gill DM, Boquet P, Popoff MR. 1988. Functional modification of a 21-kilodalton G protein when ADP-ribosylated by exoenzyme C3 of *Clostridium botulinum*. *Mol Cell Biol* 8:418–426.
 37. Lemichez E, Aktories K. 2013. Hijacking of Rho GTPases during bacterial infection. *Exp Cell Res* 319:2329–2336. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.04.021>.
 38. Aktories K. 2011. Bacterial protein toxins that modify host regulatory GTPases. *Nat Rev Microbiol* 9:487–498. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2592>.
 39. Keestra AM, Baumler AJ. 2014. Detection of enteric pathogens by the nodosome. *Trends Immunol* 35:123–130. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2013.10.009>.
 40. Szarowicz SE, During RL, Li W, Quinn CP, Tang WJ, Southwick FS. 2009. *Bacillus anthracis* edema toxin impairs neutrophil actin-based motility. *Infect Immun* 77:2455–2464. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00839-08>.
 41. Hong J, Beeler J, Zhukovskaya NL, He W, Tang WJ, Rosner MR. 2005. Anthrax edema factor potency depends on mode of cell entry. *Biochem Biophys Res Commun* 335:850–857. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.07.132>.
 42. Guichard A, Cruz-Moreno B, Aguilar B, van Sorge NM, Kuang J, Kurkciyan AA, Wang Z, Hang S, Pineton de Chambrun GP, McCole DF, Watnick P, Nizet V, Bier E. 2013. Cholera toxin disrupts barrier function by inhibiting exocyst-mediated trafficking of host proteins to intestinal cell junctions. *Cell Host Microbe* 14:294–305. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2013.08.001>.
 43. Guichard A, Nizet V, Bier E. 2014. RAB11-mediated trafficking in host-pathogen interactions. *Nat Rev Microbiol* 12:624–634. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3325>.
 44. Liu YJ, Le Berre M, Lautenschlaeger F, Maiuri P, Callan-Jones A, Heuze M, Takaki T, Voituriez R, Piel M. 2015. Confinement and low adhesion induce fast amoeboid migration of slow mesenchymal cells. *Cell* 160:659–672. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.007>.
 45. Versaevl M, Grevesse T, Gabriele S. 2012. Spatial coordination between cell and nuclear shape within micropatterned endothelial cells. *Nat Commun* 3:671. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms1668>.
 46. Jain N, Iyer KV, Kumar A, Shivashankar GV. 2013. Cell geometric constraints induce modular gene-expression patterns via redistribution of HDAC3 regulated by actomyosin contractility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:11349–11354. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1300801110>.

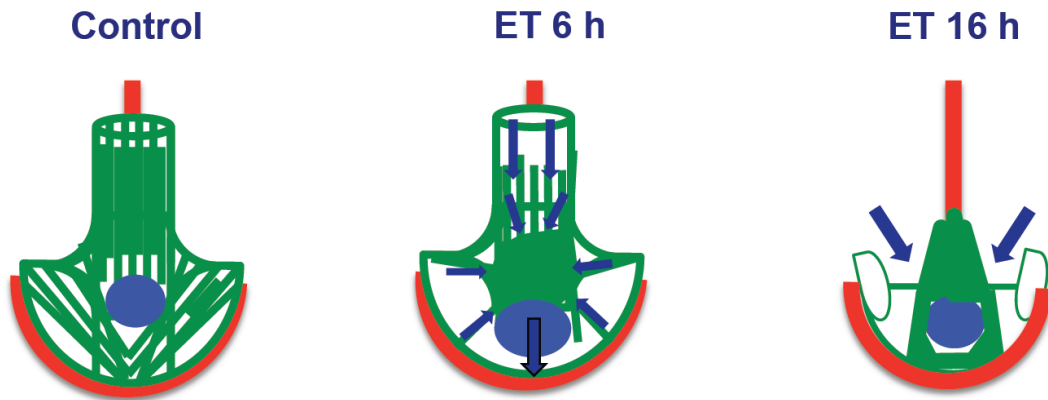
Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 1: PA alone does not affect BMDM and peritoneal macrophages actin cytoskeleton.

BMDMs and peritoneal macrophages were grown on micropatterned coverslips and incubated with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of PA. Alexa Fluor 488 Phalloidin stained F-actin is depicted in green. (A) Representative BMDMs are shown on the left panels. Reference cells (the median intensity of fluorescence of n cells) are depicted with the Median Intensity Projection (MIP) representation or fire Look Up Table (LUT) representation on the right panels. (B) Representative peritoneal macrophages are shown on the left panels. Reference cells (the median intensity of fluorescence of n cells) are depicted with the Median Intensity Projection (MIP) representation or fire Look Up Table (LUT) representation on the right panels. Bars, 10 μm .

Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 2: Diagram of global ET effects on actin cytoskeleton and nucleus.

The effects of ET on the cytoskeleton and the nucleus are summarized. The actin fibers are depicted in green, the nucleus in blue and the pattern in red.

After 6 h the F-actin collapses at the center of the cell, mainly by the release of podosomes. The nucleus increases in size, probably by an indirect release of tension on the nucleoskeleton. At 16 h, the cell collapses as well as the nucleus by the release of the cell from its adhesion on the pattern.

3. Discussion et perspectives

Ces résultats ont permis de discuter des effets de ET sur les cellules immunitaires, tout d'abord comparativement aux toxines relativement proches sur le plan phylogénétique, et comme élément majeur de pathogénicité de *Bacillus anthracis*.

Le ciblage du cytosquelette d'actine est relativement commun dans le monde des toxines, mais pour les toxines de *B. anthracis*, les choses étaient moins bien connues. La toxine C2 de *Clostridium botulinum* a été la première pour laquelle il fut montré qu'elle interagit directement avec le cytosquelette d'actine pour l'altérer biochimiquement par ADP-ribosylation [211]. Cette activité de type ADP-ribosylation a été étendue à toutes les toxines de la famille iota qui inclut la toxine iota de *Clostridium perfringens*, la toxine CST de *Clostridium spiroforme*, la toxine CDT de *Clostridium difficile* et la *vegetative insecticidal protein* (VIP) de *Bacillus cereus* (revue référence [212, 213]). D'autres toxines ont depuis été identifiées comme altérant biochimiquement les protéines régulatrices de l'actine comme C3 de *Clostridium botulinum* qui ADP-ribosylate les protéines Rho-GTPases [214]. Depuis, de nombreuses autres toxines ont été identifiées comme dérégulant les protéines de la familles des Rho-GTPases soit en les mimant, soit en les affectant par ADP-ribosylation direct [189, 190]. Ces altérations sont utilisées par les bactéries pour déréguler massivement le cytosquelette de cellules épithéliales du tractus digestif et faciliter leur entrée. Le mode d'action de ET est une adénylate-cyclase et aucune activité de ADP-ribosylation n'a été décrite pour celle-ci [215]. De manière assez intéressante, les toxines de *Clostridium* et de *Bacillus* sont relativement proches sur le plan phylogénique d'après les analyses de séquence [215]. Ainsi, au niveau de la séquence en acide-aminé, les toxines de *Clostridium* et *Bacillus* partagent 80 à 85 % d'identité à l'intérieur de la famille iota (qui inclut iota, CST et CDT), 31 à 40 % d'identité entre C2 et la famille iota de toxines, 26 à 30 % entre PA et les composants *binding* des toxines clostridiales. De plus, toutes ces bactéries sont de types Gram positif et alternent une étape de leur cycle dans le sol et dans l'hôte.

D'autre part, par son action sur le cytosquelette, ET démontre être un élément majeur de la pathogénicité de *Bacillus anthracis*. En effet, le cytosquelette d'actine est un élément fondamental dans l'organisation cellulaire et dans la régulation de nombreuses fonctions tels que les flux d'endo-exocytose, la phagocytose, la migration et le mouvement cellulaire. Les résultats démontrés ici nécessitent d'être complétés et notamment sur les cellules

dendritiques, pour lesquelles peu de données sont disponibles. Des analyses mécanistiques permettront de mieux cerner les mécanismes mis en place par ET pour déréguler le cytosquelette d'actine et de comprendre comment ET peut entraîner une concentration de l'actine F, une perte des adhésions périphériques et une rétraction des cellules normalisées sur leur substrat. Comment ET peut-elle induire des modifications sur les filaments d'actine ? La toxine oedémateuse a-t-elle la capacité de cibler certaines ABP pour déréguler son architecture ?

Devant ces modifications importantes du cytosquelette et face à une revue de la bibliographie montrant en partie une altération globale des fonctions immunes, il serait approprié de penser que les fonctions des cellules dendritiques, telles que la phagocytose et la migration seraient altérées par ET. L'altération et la réorganisation du cytosquelette d'actine par ET conduisent-elles à une modification des fonctions de phagocytose et de migration des cellules dendritiques ? Nous avons montré les effets de ET sur les filaments d'actine mais qu'en est-il pour LT ?

Ces différentes interrogations permettent d'émettre des hypothèses et d'amorcer le travail sur les cellules dendritiques présentées dans le chapitre suivant.

CHAPITRE II.3 : Effets de ET et LT sur le cytosquelette d'actine des cellules dendritiques et conséquences sur la phagocytose et la migration des cellules dendritiques.

Les résultats de mon master ont permis d'émettre les hypothèses selon lesquelles ET entraînerait une déformation du réseau d'actine des cellules dendritiques et la production de protrusions alors que LT conduirait à un étalement cellulaire accompagné d'une accumulation d'actine autour du noyau. Cette hypothèse a été confirmée précédemment seulement pour ET et pour les BMDMs. Afin de démontrer ces effets, leurs mécanismes d'obtention ainsi que les conséquences potentielles sur la phagocytose et la migration, nous prendrons les BMDCs (*Bone-Marrow Dendritic Cells* ou cellules dendritiques issues de moelle osseuse) comme modèle d'étude de nos travaux.

Après une première partie synthétique exposant les effets de ET et LT sur la morphologie des BMDCs normalisées, nous étudierons dans une 2^{ème} partie les mécanismes utilisés par ET pour altérer le cytosquelette d'actine et les conséquences éventuelles sur certaines fonctions des BMDCs. La dernière partie traitera des effets de LT sur le cytosquelette d'actine des BMDCs, les mécanismes conduisant à ces effets et ses conséquences fonctionnelles.

1. ET et LT induisent des effets opposés sur la morphologie des BMDCs normalisées

Les étapes de choix et de validation des modèles d'études pour les BMDCs (non présentées dans ce manuscrit) m'ont conduit à retenir un premier motif : les disques *coatés* à la fibronectine d'une surface de 1100 μm^2 parmi les cinq morphologies de *micropatterns* testés. Sur les disques (Figure 23 panel A), les BMDCs recouvrent la moitié de la surface du pattern. Leurs bords externes présentent une concentration plus importante d'actine punctiforme et leur noyau est situé au centre du disque. Les BMDCs adhèrent par le bord externe du disque avant de s'étendre partiellement. Il apparaît que ces cellules sont incapables de former des ponts entre deux zones non adhésives par l'intermédiaire de fibres de stress pour se contracter et se déplacer. La plasticité importante de ces cellules n'est pas propice à la formation de fibres de stress, à l'exception peut-être de la courbure interne des cellules.

Pour évaluer les effets des toxines sur les BMDCs patternées, les cellules ont été incubées pendant 6 ou 16 heures en présence soit de PA seul (1 µg/mL), soit de ET (1 µg/mL de PA et 100 ng/mL de EF), soit de LT (1 µg/mL de PA et 100 ng/mL de LF). De manière similaire aux expériences précédentes, les BMDCs du groupe contrôle et celles incubées en présence de PA adoptent la forme de demi-lune avec un noyau repoussé vers le centre du disque (Figure 23 panel A). L'incubation des BMDCs en présence de ET induit une modification temps-dépendante de la morphologie des cellules, à l'identique de ce que nous avons montré sur les BMDMs. A 6 heures, les BMDCs se rétractent le long des points d'ancrage de la cellule, positionnés sur la partie externe du *micropattern* en disque. Le noyau se déplace vers l'extérieur, tiré par le réseau d'actine (Figure 23, panel B). L'actine F est fortement concentrée tout autour du noyau, en aspect de « cheveux bouclés ». L'aspect en cheveux bouclés des filaments d'actine pourrait suggérer un décrochage de leur adhérence au niveau de la membrane plasmique. Cet aspect est moins présent à 16 heures : les cellules sont complètement rétractées sur le noyau (Figure 23 panel C). Le noyau est lui aussi comprimé au niveau des points d'ancrage de la cellule et les filaments d'actine se concentrent fortement tout autour du noyau.

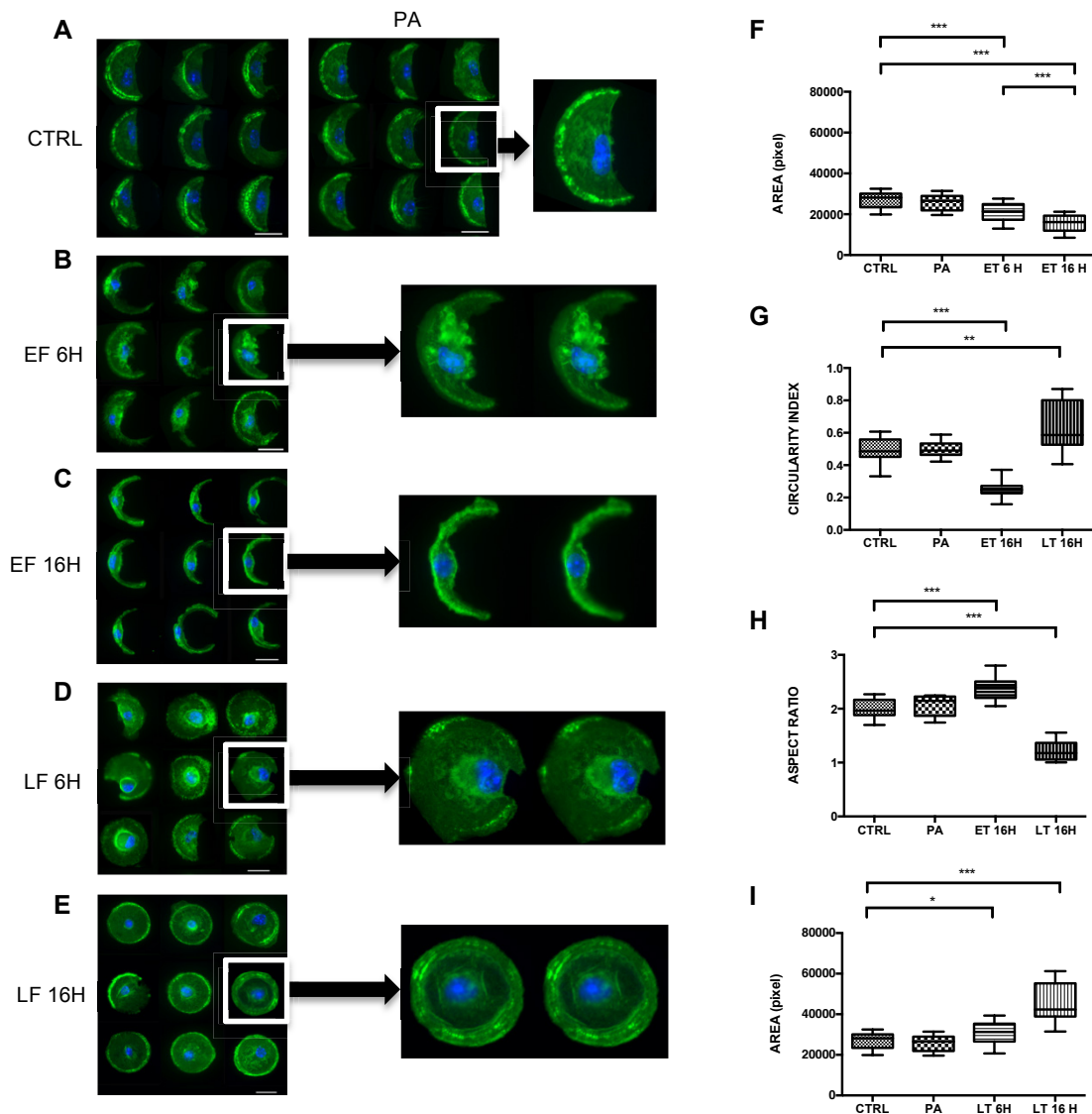


Figure 23 : Effets de ET et LT sur les BMDCs *micropatternées* sur des disques médium (Cytoo®).

A à E : les BMDCs ont été déposées sur des lames CYTOO Disk Medium *coatées* à la fibronectine. Elles ont été soit incubées seules (A, contrôle), soit en présence de PA à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (A), de ET (PA à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + EF à 100 ng/mL) (C et D) ou de LT (PA à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + LF à 100 ng/mL) (E et F) pour des temps de 6 heures et 16 heures. Chaque condition est représentée par une planche de 9 images pour laquelle une cellule (flèche noire) est détaillée avec 2 coupes dans l'axe Z espacées de successivement 500 nm. L'actine F est marquée par la phalloïdine AlexaFluor 488 (vert) et le noyau au DAPI (bleu). Observation au X40. La barre représente 20 μm . **F à I :** trois paramètres morphologiques ont pu être analysés par traitement des images sous ImageJ. Les images, après traitement, recentrage et assemblage, ont subi un seuil permettant de mesurer l'aire (F et I), l'index de circularité (G) et l'*aspect ratio* (H). *, $p < 0,05$ / **, $p < 0,01$ / ***, $p < 0,001$.

Que ce soit à 6 heures ou à 16 heures, les BMDCs en présence de LT épousent en totalité la surface du pattern (Figure 23 panels D et E). Les points d'ancrage se distribuent également tout autour du disque et le noyau a tendance à se centrer, comme si les BMDCs avaient étiré son réseau d'actine pour s'étaler complètement. A 6 heures notamment mais aussi à 16 heures, l'actine se concentre plus fortement autour du noyau, en formant un anneau dense d'actine F autour du noyau. Cette concentration d'actine en anneau, déjà visible sur les BMDCs non normalisées, laisse supposer une réorganisation particulière de l'actine F induit par LT.

Pour quantifier les effets montrés précédemment et confirmer l'impression visuelle, 3 paramètres fondamentaux de morphologie cellulaire ont été calculés sur les panels de BMDCs : (i) l'aire, (ii) l'*aspect ratio* ($AR = \text{axe majeur} / \text{axe mineur}$), et (iii) la circularité ($(4 \cdot \pi \cdot \text{aire}) / (\sqrt{\text{périmètre}})$) (Figure 23). Le calcul des paramètres morphologiques entre les BMDCs du groupe contrôle et les BMDCs traitées par ET révèle des différences statistiquement significatives que ce soit à 6 heures ou à 16 heures post-intoxination pour l'aire des cellules (Figure 23 panel F) et l'index de circularité (Figure 23 panel G). De manière logique, l'AR est fortement augmenté, du fait de la rétraction des cellules au niveau de l'axe mineur (Figure 23 panel H). Au contraire, en présence de LT, à 6 heures et à 16 heures, l'analyse des caractéristiques morphologiques des BMDCs montre un accroissement statistiquement significatif et temps-dépendant de la surface des BMDCs sur les *micropatterns* en disque (Figure 23 panel I). L'indice de circularité (Figure 23 panel G) est statistiquement augmenté par rapport à ceux des cellules du groupe contrôle. De manière logique, l'AR est pratiquement divisé par 2 entre les BMDCs en présence de LT, et les BMDCs du groupe contrôle, signifiant que l'axe majeur dispose de la même distance que l'axe mineur (Figure 23 panel H).

Ces résultats montrent des effets opposés des 2 toxines sur le cytosquelette des BMDCs. Alors qu'ET induit une rétraction temps-dépendant des BMDCs normalisées et une concentration unilatérale et périnucléaire de l'actine F (probablement responsable du déplacement du noyau comme pour les BMDMs). LT de son côté conduit à un étalement des BMDCs sur les *micropatterns* avec une concentration et une réorganisation d'actine F en anneau tout autour du noyau. Devant cette opposition d'effets entre ET et LT et pour plus de clarté, nous allons aborder de manière séparée les mécanismes mis en jeu par ces toxines pour expliquer ces altérations et essayer de comprendre les conséquence fonctionnelles potentielles.

2. ET réorganise le cytosquelette d'actine tout en maintenant ou accentuant les fonctions phagocytaire et migratoire des BMDCs

Notre article publié dans *Infection and Immunity* en 2015 a démontré qu'ET induit une modification de la morphologie des BMDMs et des macrophages péritonéaux normalisés sur les *micropatterns* et que cette modification se déroulait en 2 phases : une phase de concentration de l'actine F au centre de la cellule sans perte de taille puis une phase de rétraction cellulaire par perte de l'adhérence au niveau des adhésions périphériques.

Dans la première partie de ce chapitre, nous avons pu montrer que le même phénomène est reproductible sur les BMDCs avec une localisation d'actine F fortement concentrée d'un côté du noyau, en aspect de « cheveux bouclés ». Cet aspect pourrait suggérer un décrochage de leur adhérence au niveau de la membrane plasmique. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que ET agirait sur l'actine via une potentielle dépolymérisation et sur les adhésions périphériques pour rétracter les BMDMs et les BMDCs normalisés sur leur substrat.

2.1 ET conduit progressivement à une dépolymérisation de l'actine F au niveau des points d'ancrage des BMDCs

Afin de comprendre le phénomène de rétraction des BMDCs observé sur les *micropatterns* en disques, nous avons décidé de réaliser à façon des formes de *micropatterns* permettant un étalement le plus complet possible des BMDCs sur leurs *micropatterns* *coatés* à la fibronectine. Pour entraîner une meilleure polarisation des BMDCs, nous avons défini une forme de goutte de taille adaptée afin que les BMDCs puissent établir des points d'ancrage à la fibronectine de part et d'autre de la forme. De plus, au préalable, nous avons observé que les BMDCs issus de nos cultures cellulaires présentaient une hétérogénéité de taille parmi les cellules exprimant le CD11c, marqueur de différenciation des BMDCs.

Avant le dépôt sur les *micropatterns* en goutte, les BMDCs sont sélectionnées par un tri cellulaire en fonction de leur taille parmi la population CD11c+. Les BMDCs les mieux adaptées à ces *micropatterns* sont les BMDCs CD11c+ de taille importante.

Pour démontrer une altération de la dynamique de l'actine par ET, les BMDCs sélectionnées sont déposées sur les *micropatterns* en goutte, remis en incubation le temps nécessaire à leur étalement complet puis intoxiquées par ET pendant 6 ou 16 heures. Après fixation, les BMDCs sont marquées par l'AlexaFluoro 647 Phalloïdine pour visualiser l'actine F et par l'AlexaFluor 488 DNase I pour visualiser l'actine G. La méthodologie pour le traitement des images et l'obtention des cellules de référence est identique à celle employée pour les BMDMs [216]. Les BMDCs du groupe contrôle épousent la totalité de la forme en goutte avec des points d'ancrage, riches en actine F, beaucoup plus abondants sur la partie triangulaire de la forme en goutte (Figure 24, panel CTRL). L'actine G se répartit de manière homogène à l'intérieur de la cellule avec un pool plus intense au centre de la cellule. Les BMDCs traitées avec PA ne montrent pas de divergence vis à vis des BMDCs contrôle (Figure supplémentaire S1). Comme pour les BMDMs, ET conduit à une rétraction des BMDCs temps dépendant, plus marquée à 16 heures.

Après 6 heures d'intoxication par ET, l'actine F se condense fortement au centre de la cellule avec une augmentation de la fluorescence de l'actine G, laissant supposer une dépolymérisation légère de l'actine F. A la différence des cellules du groupe contrôle, l'actine G est fortement présente au niveau des points d'ancrage des BMDCs sur les *micropatterns*, comme s'il y avait également une légère dépolymérisation au niveau des points d'ancrage des BMDCs (Figure 24, panel ET 6H). A 16 heures, les BMDCs se sont rétractées sur les points d'ancrage les plus solides, sur un des bords de la cellule. Ces résultats démontrent que la rétraction induite par ET semble s'accompagner d'une dépolymérisation de l'actine, certainement périnucléaire comme pour les BMDMs et périphérique au niveau des points d'ancrage des BMDCs normalisées.

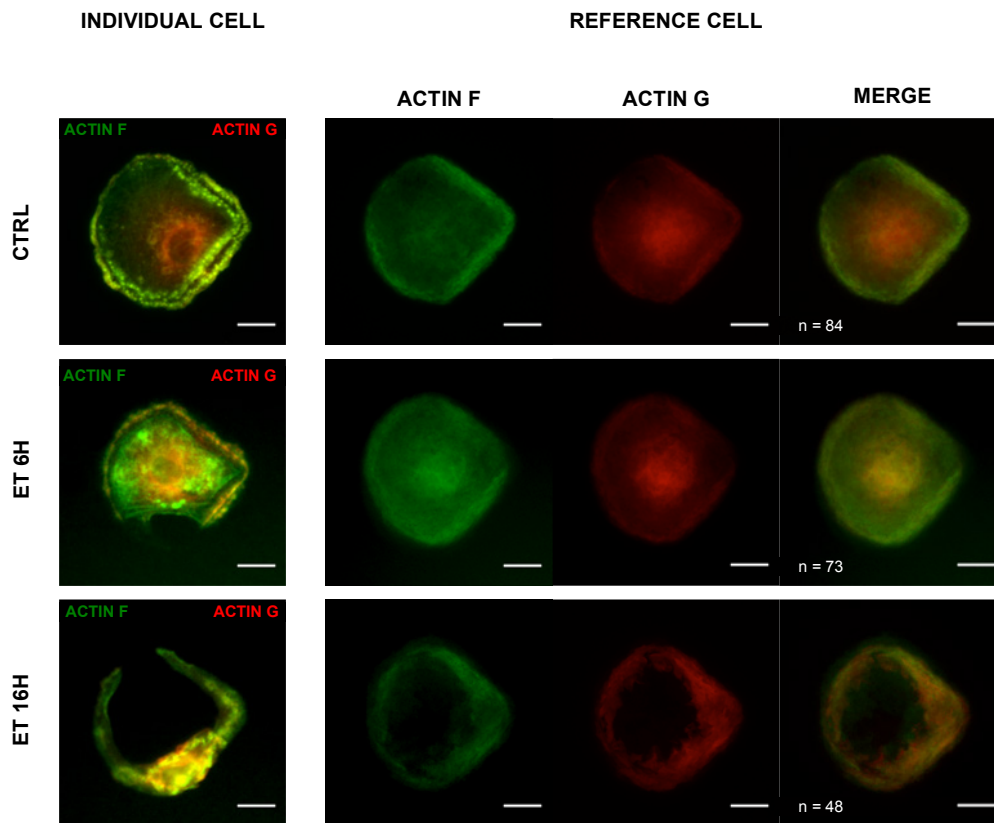


Figure 24 : ET induit une réorganisation globale du cytosquelette d'actine des BMDCs normalisées sur des *micropatterns* en forme de goutte.

Les BMDCs CD11c⁺ ont été sélectionnées par tri cellulaire, déposées sur les *micropatterns* pour se normaliser. Les BMDCs ont ensuite été intoxiquées par ET (PA à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + EF à 100 ng/mL) pendant 6 et 16 heures avant d'être fixées et marquées en même temps que les BMDCs du groupe contrôle : l'actine F (en vert) par l'AlexaFluor 647 Phalloïdine et l'actine G (en rouge) par l'AlexaFluor 488 DNase I. La colonne de gauche illustre une cellule la plus représentative des effets observés pour les conditions contrôles, ET 6H et ET 16H. La colonne de droite résulte du retraitement des images obtenues, selon la méthode décrite dans la référence [216]. La 2^{ème} colonne illustre les cellules de référence pour l'actine F, la 3^{ème} colonne pour l'actine G et la dernière colonne est une superposition des 2 cellules de référence. Le nombre de BMDCs utilisées pour chaque condition est mentionné sous la fusion (colonne *merge*) des cellules de référence.

A la vue de l'hypothèse précédente émise sur la dépolymérisation de l'actine, et afin de mieux comprendre la cinétique de dépolymérisation de l'actine, nous avons décidé de quantifier l'actine G et l'actine F par des techniques de cytométrie en flux en utilisant les mêmes marqueurs que la microscopie et dans les mêmes concentrations. Les BMDCs ont été intoxiquées par ET pendant 24 heures, à différents intervalles de temps. Elles ont été ensuite récupérées, fixées et marquées au même moment.

La figure 25 montre les résultats d'une expérience la plus significative pour le panel A et la moyenne de 4 cinétiques d'intoxication pour le panel B. Ces études montrent que la

médiane d'intensité de fluorescence (MFI) de l'actine G augmente progressivement au cours du temps mais la différence n'est significative qu'à 24 heures (Figure 25 panels A et B). La MFI de l'actine F, de son côté, montre une tendance à la diminution au cours du temps. La différence par rapport aux cellules du groupe contrôle devient significative qu'à partir de 20 heures d'intoxication par ET (Figure 25 panels A et B). Ainsi, tout laisse encore supposer que ET induit une dépolymérisation de l'actine F et une augmentation du pool d'actine G.

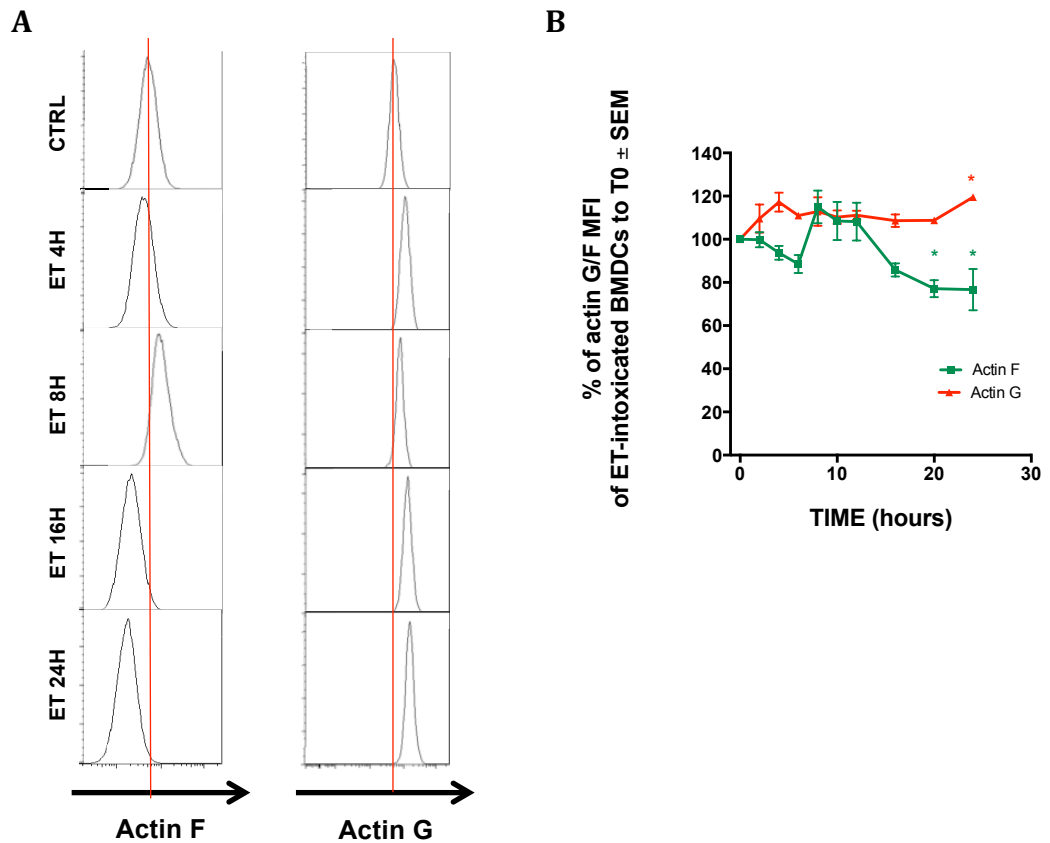


Figure 25 : L'intoxication des BMDCs par ET démontre une modification de la proportion d'actine F et d'actine G pour les temps tardifs.

Après intoxication par ET (PA à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + EF à 100 ng/mL) à différents intervalle de temps, les BMDCs ont été récupérées, marquées avec un anticorps anti-CD11c puis fixées. L'actine F est marquée par l'AlexaFluor 647 Phalloïdine et l'actine G par l'AlexaFluor 488 DNase I. Les BMDCs fixées sont analysées en cytométrie en flux. Le panel A, sous forme d'histogramme de la MFI de l'actine F à gauche et de l'actine G à droite, représente une expérience la plus significative parmi 4 expériences (10 000 évènements collectés par condition et par expérience). Le panel B représente, pour chaque temps d'intoxication, la moyenne \pm SEM de la MFI des 4 expériences rapportées aux BMDCs du groupe contrôle (100 %). *, $p < 0,05$.

Les techniques d'imagerie sur *micropatterns* et de cytométrie en flux ont montré une dépolymérisation progressive de l'actine F en actine G. Pour permettre de quantifier la

cinétique de dépolymérisation et les conséquences morphologiques de ce phénomène, nous avons décidé d'avoir recours à une technique émergente couplant à la fois l'imagerie et la cytométrie en flux. Cette technique d'imagerie en flux permet de corrélérer les médianes de fluorescence des marqueurs utilisés avec des paramètres quantifiables utilisées en microscopie, mais en prenant en compte un nombre important d'évènements comme en cytométrie. Chaque paramètre recherché est calculé sur chaque cellule ou événement, conférant une analyse rigoureuse des cellules. La stratégie d'analyse est mentionnée dans le matériel et méthodes.

Les BMDCs ont subi le même traitement que pour les expériences de cytométrie en flux. Les BMDCs du groupe contrôle présentent une répartition homogène de l'actine G avec un pool plus intense au centre de la cellule. L'actine F est présent au niveau cytoplasmique et de manière plus intense sur les bords de la cellule (Figure 26 panel A). A l'identique des expériences précédentes, ET conduit à une augmentation de la fluorescence de l'actine G et une diminution de la fluorescence de l'actine F au cours du temps après intoxication (Figure 26 panel A). La MFI (médiane d'intensité de fluorescence) globale de l'actine G augmente pour devenir significative à 24 heures, alors que la MFI globale de l'actine F diminue significativement à partir de 16 heures (Figure 26 panel B). Pour quantifier de manière plus précise ces 2 marqueurs et démontrer d'éventuelles modifications de localisation, nous avons considéré que chaque marqueur, de part son expression dans la cellule, pouvait être assimilé à des spots de taille et d'intensité variables. Un spot est défini par une intensité de fluorescence 6 fois supérieur au bruit de fond. Ainsi, ET n'entraîne pas d'augmentation du nombre de spots d'actine G et de spots d'actine F (Figure 26, panel C). En revanche, la moyenne de l'aire de chaque spot augmente significativement pour l'actine F pour les temps 16 heures et 24 heures (Figure 26, panel D), avec une légère diminution de l'intensité maximale de chaque spot à 24 heures pour l'actine F (Figure 26, panel E).

Pour l'actine G, la moyenne des aires des spots reste constante par rapport aux BMDCs du groupe contrôle (Figure 26, panel D) mais une légère augmentation significative de l'intensité maximale des spots est à noter à 24 heures (Figure 26, panel E). Les distances entre chaque spot d'actine G d'un côté et d'actine F de l'autre ne varient pas au cours du temps (Figure 26, panel F). Enfin, pour l'ensemble des paramètres analysés, le PA n'entraîne aucune différence significative par rapport aux BMDCs du groupe contrôle (Figure supplémentaire S2).

Par conséquent, l'ensemble de ces résultats démontre qu'ET induit une dépolymérisation progressive de l'actine F en actine G accompagnée de regroupement d'actine F plus diffus.

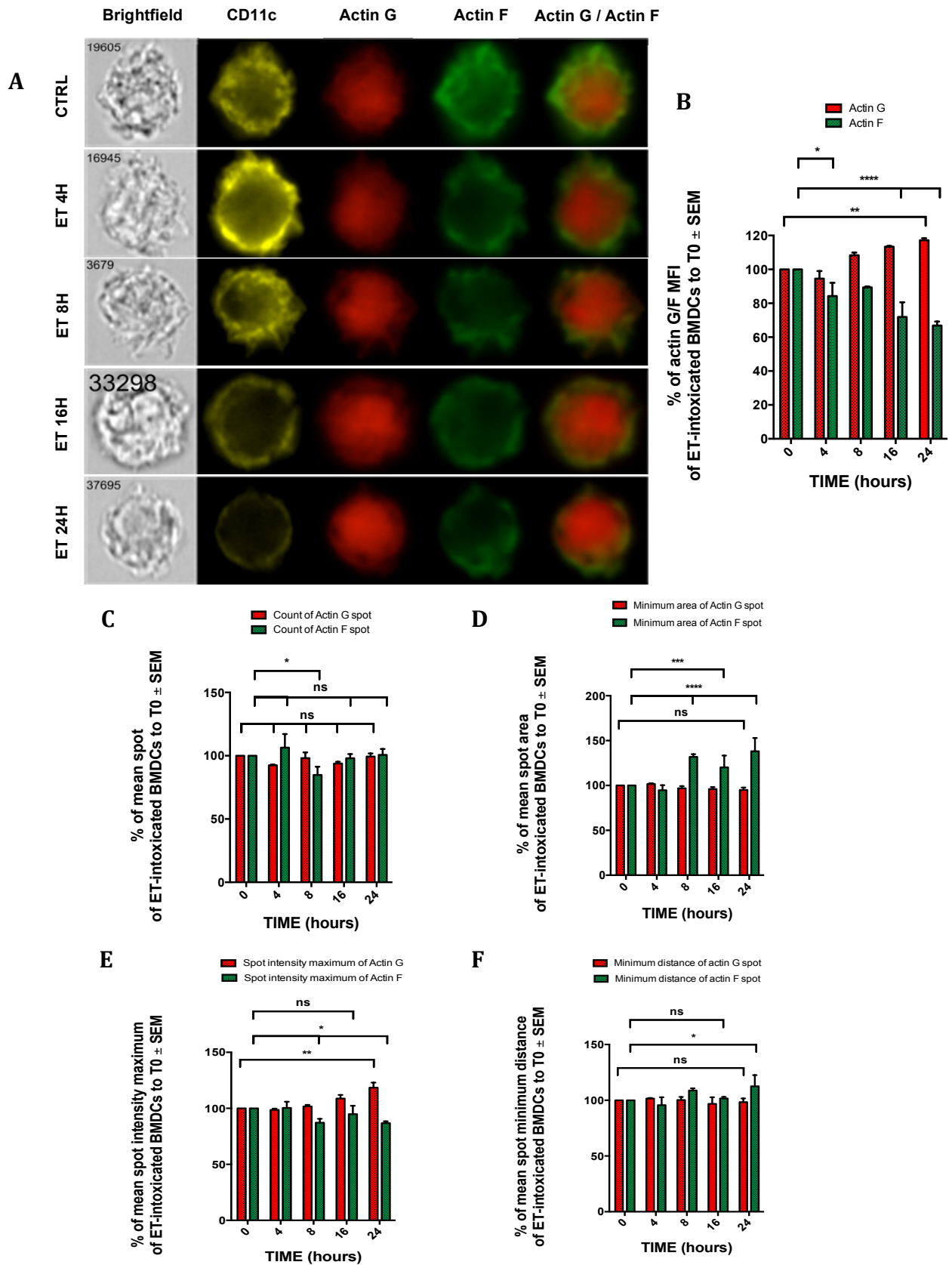


Figure 26 : ET induit une dépolymérisation progressive de l'actine F en actine G.

Après intoxication par ET (PA à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + EF à 100 ng/mL) à différents intervalle de temps, les BMDCs ont été récupérées, marquées avec un anticorps anti-CD11c (en jaune) puis fixées. L'actine F est marquée par l'AlexaFluor 647 Phalloïdine (en vert) et l'actine G par

l'AlexaFluor 488 DNase I (en rouge). Les BMDCs fixées sont analysées en imagerie en flux. Le panel A illustre les effets de ET sur le cytosquelette d'actine des BMDCs pour les temps contrôles, ET 4 heures, ET 8 heures, ET 16 heures et ET 24 heures. Pour chaque condition, la cellule la plus représentative des résultats de 3 expériences est présentée sous forme d'image en fond clair, d'une image pour le CD11c, d'une image pour l'actine G, d'une image pour l'actine F et d'une image de combinaison entre l'actine G et l'actine F. Le retraitement et l'analyse des données ont permis de définir plusieurs paramètres à la fois pour l'actine G et l'actine F, illustrés dans les panels B à F (entre 5000 et 10000 BMDCs comptabilisées pour chaque condition et pour chaque expérience) : la MFI (panel B), la moyenne du nombre de spots (panel C), la moyenne de l'aire minimale des spots (panel D), la moyenne de l'intensité maximale des spots (panel E) et la moyenne de la distance minimale entre les spots d'un même marqueur (panel F). Toutes les données représentent, pour chaque condition, la moyenne \pm SEM du paramètre des 3 expériences rapportées aux BMDCs du groupe contrôle (100 %) pour l'actine F (vert) et l'actine G (rouge). ns, non significatif / *, $p < 0,05$ / **, $p < 0,01$ / *** et ****, $p < 0,001$.

2.2 La rétraction des BMDCs normalisées sur les micropatterns est liée à une perte des points d'ancrage des BMDCs

Nous avons démontré qu'ET entraîne une rétraction cellulaire des BMDCs normalisées sur de la fibronectine de manière temps dépendant avec une présence d'actine F et d'actine G au niveau des points d'ancrage des BMDCs normalisées (Figure 24). D'autre part, cette rétraction s'accompagne d'une dépolymérisation progressive de l'actine F en actine G. Afin de déterminer si cette rétraction cellulaire est due uniquement à la dépolymérisation d'actine F ou fait suite à un phénomène combiné de dépolymérisation d'actine et de perte des points d'ancrage, nous avons envisagé cette problématique sous 2 angles différents. Le premier consiste à décrire la morphologie de BMDCs en suspension par des techniques de cytométrie en flux et d'imagerie en flux. Dans les mêmes conditions expérimentales mais sans marquage fluorescent, le calcul du paramètre FSC (*Forward-Scattered*) en cytométrie en flux ne montre pas de modification de taille des BMDCs traitées par ET au cours du temps (Figure 27, panel A). Les analyses d'imagerie en flux démontrent visuellement (Figure 27, panel B) et quantitativement que l'aire des BMDCs intoxiquées ne varie pas au cours du temps (Figure 27, panel C) mais que les BMDCs présentent une morphologie altérée par ET. La circularité et l'*aspect ratio* des BMDCs diminuent de manière significative à partir de 16 et 24 heures (Figure 27, panel D). Il est à noter que PA ne modifie pas la morphologie des BMDCs en suspension (Figure supplémentaire S3).

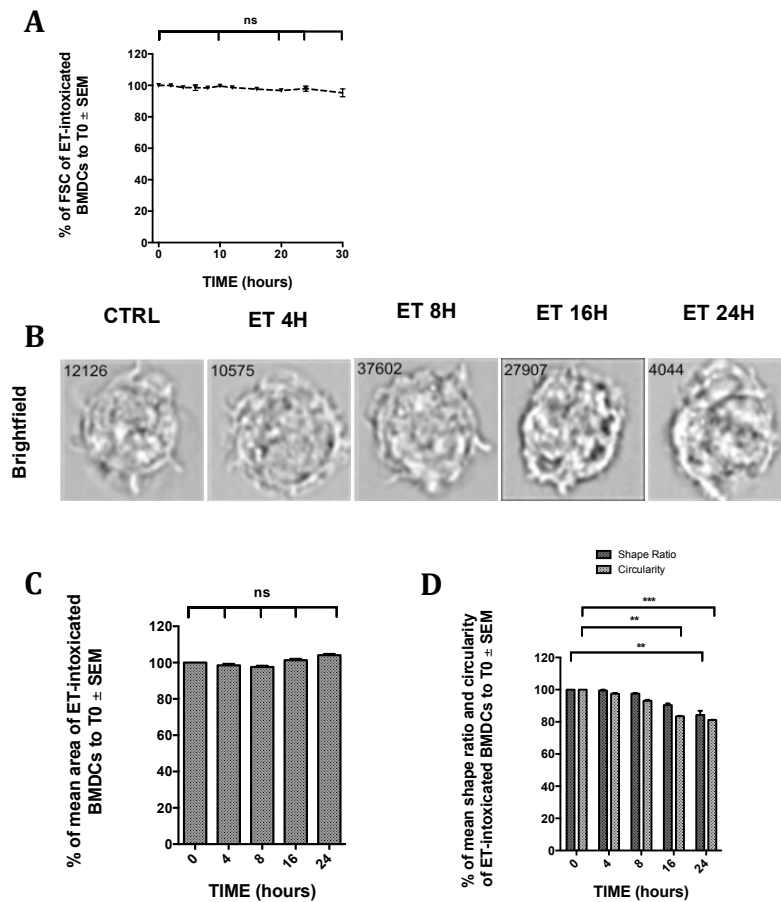


Figure 27 : ET conduit à une modification de la morphologie des BMDCs en suspension sans altération de l'aire.

Après intoxication par ET (PA à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + EF à 100 ng/mL) à différents intervalle de temps, les BMDCs sont récupérées puis fixées. Les BMDCs sont analysées par cytométrie en flux par mesure du paramètre de taille (FSC) (panel A) et en imagerie en flux pour leur morphologie en suspension (panel B) et pour les paramètres d'aire (panel C), de circularité et de *shape ratio* (panel D). Toutes les données représentent, pour chaque condition, la moyenne \pm SEM de 4 expériences de cytométrie et de 3 expériences d'imagerie en flux, rapportées aux BMDCs du groupe contrôle (100 %). ns, non significatif / **, $p < 0,01$ / ***, $p < 0,001$.

Puisqu'ET entraîne uniquement une modification de la morphologie des BMDCs sans modification de l'aire pour les BMDCs en suspension (cytométrie et imagerie en flux), nous avons émis l'hypothèse qu'ET entrainerait une perte des points d'ancrage de la cellule. En reprenant notre modèle d'étude de BMDCs normalisées, nous avons dessiné une forme en adéquation avec les formes précédemment utilisées mais en forçant la cellule à concentrer ses points d'ancrage à un endroit précis du *micropattern*. Ce nouveau motif reprend la forme du disque percé en son centre d'un trou hydrophobe sans fibronectine. Ceci impose aux BMDCs d'établir des points d'ancrage forts au niveau du centre (Figure 26, panel du haut). Comme

pour les autres formes de *micropatterns*, ET induit cette rétraction cellulaire avec une augmentation de l'actine G et une perte de l'actine F. Cependant, cette forme apporte clairement la preuve que les BMDCs traitées par ET perdent leurs points d'ancrage localisés au centre du *micropattern*. Ce résultat est d'autant plus marqué à 16 heures où le centre du *micropattern* a une intensité de fluorescence de l'actine F très nettement diminuée par rapport aux cellules du groupe contrôle (Figure 28). Ainsi, nos résultats démontrent que la rétraction des BMDCs sur les *micropatterns* passe par une dépolymérisation de l'actine F et une perte des points d'ancrage des BMDCs.

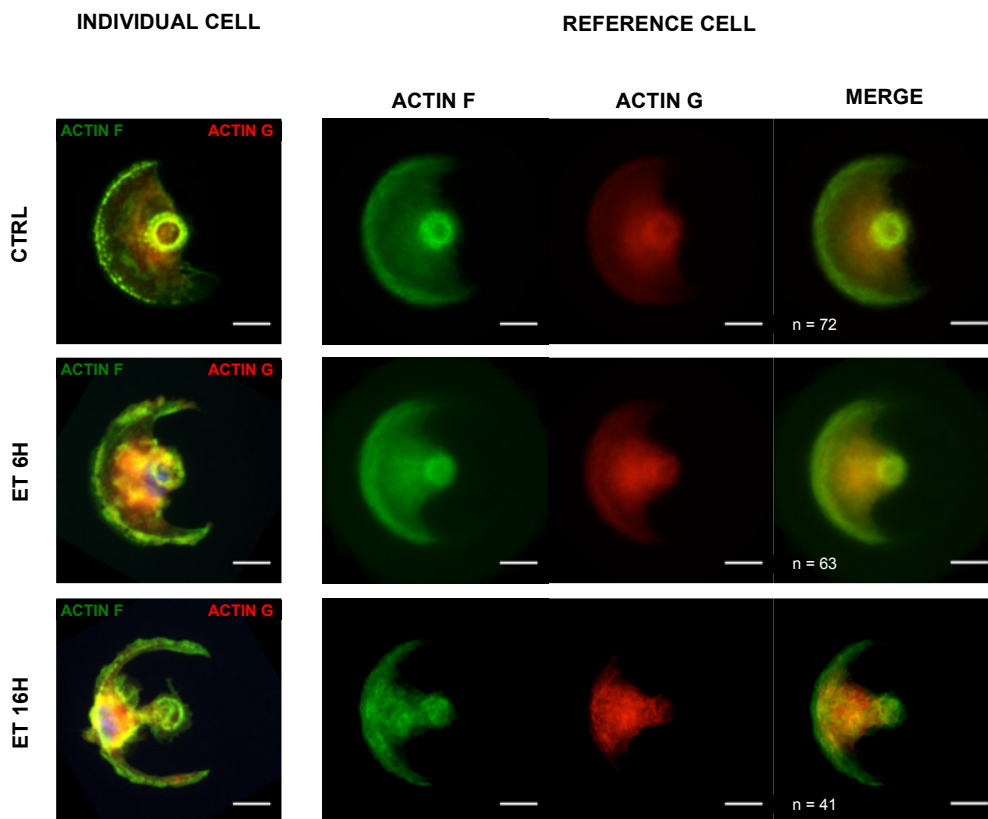


Figure 28 : La rétraction des BMDCs normalisées intoxiquées par ET résulte d'une perte des points d'ancrage des BMDCs sur les *micropatterns* coatés à la fibronectine.

Les BMDCs CD11c⁺ ont été sélectionnées par tri cellulaire, déposées sur les *micropatterns* pour se normaliser. Les BMDCs ont ensuite été intoxiquées par ET (PA à 1 µg/mL + EF à 100 ng/mL) pendant 6 et 16 heures avant d'être fixées et marquées en même temps que les BMDCs du groupe contrôle : l'actine F (en vert) par l'AlexaFluor 647 Phalloïdine et l'actine G (en rouge) par l'AlexaFluor 488 DNase I. La colonne de gauche illustre une cellule la plus représentative des effets observés pour les conditions contrôle, ET 6H et ET 16H. Le groupement de colonnes de droite résulte du retraitement des images obtenues, selon la méthode décrite dans la référence [216]. La 2^{ème} colonne illustre les cellules de référence pour l'actine F, la 3^{ème} colonne pour l'actine G et la dernière colonne est une superposition des 2 cellules de référence. Le nombre de BMDCs utilisées pour chaque condition est mentionné sous la fusion (colonne *merge*) des cellules de référence.

2.3 ET cible la cofiline via une protéine phosphatase pour réorganiser le cytosquelette d'actine des BMDCs dans les phases précoces

Nous avons vu dans la partie bibliographique qu'un grand nombre de protéines sont impliquées dans l'architecture du cytosquelette d'actine et notamment des protéines qui peuvent induire la coupure et la dépolymérisation des filaments d'actine. D'autre part, les expériences sur les *micropatterns* ont montré que les BMDCs intoxiquées par ET présentent des filaments d'actine en forme de « cheveux bouclés » se localisant au centre de la cellule. Ces résultats nous ont suggéré que les filaments d'actine ont pu être coupés par une protéine de coupure comme la cofiline présente chez les BMDCs à la membrane cellulaire dans son état inactif.

Afin de démontrer son implication, les BMDCs ont été incubées en présence de ET pendant 30 heures et différents lysats protéiques ont été préparés à différents intervalles de temps, ce qui a permis de suivre la cinétique d'expression ou d'activation des protéines d'intérêt.

Dans les temps précoces d'intoxication jusqu'à 6 à 8 heures, ET cible la cofiline en induisant sa dépolymérisation et la rendant active à partir de 2 heures et jusqu'à 8 heures environ (Figure 29, panel A) [137, 138]. Cette activation transitoire de la cofiline s'accompagne également d'une déphosphorylation de FAK (*Focal Adhesion Kinase*) et une surphosphorylation des ERM (*Ezrin Radixin Moesin*), protéines impliquées dans le remodelage membranaire comme lien entre le cytosquelette d'actine et la membrane cellulaire (Figure 29, panel A) [151, 157]. Dans les phases plus tardives la cofiline redevient inactive par phosphorylation, qui est plus importante que les cellules du groupe contrôle (Figure 29, panel A). Dans la bibliographie, l'activation de la cofiline peut résulter de l'action de la chronophine, de PTEN ou des *Slingshot* [142, 144]. Ces 3 protéines ne semblent pas intervenir dans l'activation de la cofiline induite par ET (Figure 29, panel B). Une autre famille de protéines peut induire rapidement cette déphosphorylation de la cofiline : les protéines phosphatases [142, 143].

Afin de démontrer l'implication de ces protéines phosphatases dans l'activation de la cofiline, nous avons incubé les BMDCs intoxiquées par ET en présence d'inhibiteur des protéines phosphatases : l'acide okadaïque pour sa capacité à inhiber préférentiellement les PP2A, la tautomycine pour son inhibition spécifique des PP1, et la calyculine A pour son

activité inhibitrice puissante sur les PP1 et les PP2A [143]. A 4 ou 8 heures, ET entraîne une déphosphorylation de la cofiline comme initialement décrit. L'ajout d'acide okadaïque ou de tautomycine à ET ne reverse pas l'effet de déphosphorylation de la cofiline. En revanche, l'ajout de calyculine A aux BMDCs intoxiquées par ET conduit à une suppression de l'activation de la cofiline. Ainsi, l'activation de la cofiline induite par ET semble dépendante d'une protéine phosphatase de type PP1 et PP2A, sans que nous n'ayons pu réellement effectuer une identification précise.

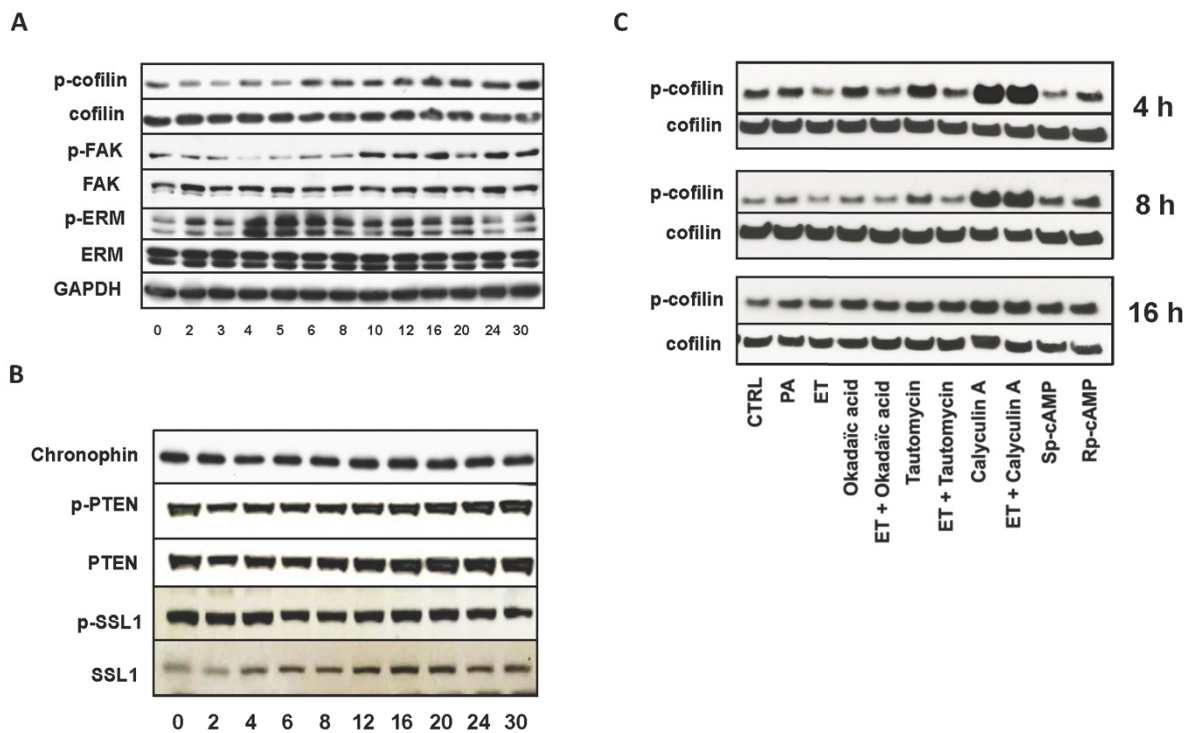


Figure 29 : ET active rapidement la cofiline des BMDCs via des protéines phosphatases des classes 1A et 2.

Après intoxication par ET (PA à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + EF à 100 ng/mL), associée ou non à un traitement par des molécules chimiques, les BMDCs sont lysées. Le lysat cellulaire est analysé en Western-Blot. Les panels A et B présentent, sous forme de cinétique d'intoxication, l'expression sous forme phosphorylée ou totale des protéines d'intérêt. Le contrôle de charge est représenté par la GAPDH. En fonction des temps d'intérêt, les BMDCs ont été incubées en présence d'activateurs ou d'inhibiteurs : l'acide okadaïque (inhibiteur PP2A, 10 nM), la tautomycine (inhibiteur PP1, 100 nM), la calyculine A (inhibiteur PP1/PP2A, 3 nM), Sp-cAMP (activateur PKA, 50 μM) et Rp-cAMP (inhibiteur PKA, 50 μM).

D'autre part, ET possède une activité adénylate cyclase dépendante du calcium et de la calmoduline, capable de générer une concentration importante d'AMPC intracellulaire. Une des grandes interrogations suite à ces résultats était de savoir si l'activation de la cofiline par déphosphorylation pouvait être reliée à l'activité de ET.

Afin de mimer les effets de l'AMPC sur l'état de phosphorylation de la cofiline, les BMDCs ont été incubées en présence d'un puissant activateur des protéines kinases dépendante de l'AMPC le Sp-cAMP, et d'un inhibiteur de l'activation de protéines kinases par l'AMPC le Rp-cAMP. L'incubation des BMDCs avec le Sp-cAMP montre un profil de déphosphorylation quasi identique que les BMDCs en présence de ET, laissant supposer que l'AMPC intracellulaire induit une activation de la cofiline.

2.4 L'AMPC induit par ET conduit à l'activation de la cofiline via PKA dans les temps précoces

Devant l'hypothèse d'une activation de la cofiline par l'AMPC, nous avons voulu vérifier si ET est capable d'induire une augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPC dans les BMDCs. En fonction des résultats obtenus sur les BMDMs, les BMDCs ont été incubées en présence de ET avec ou sans Rolipram, un inhibiteur spécifique des phosphodiésterases, et des prélèvements ont été effectués à 1.5, 4, 8, 16 et 24 heures. Le taux d'AMPC ainsi que la quantité de EF ont été dosés à la fois dans le lysat cellulaire et dans le surnageant. ET induit une augmentation de l'AMPC intracellulaire et cette concentration est d'autant plus importante en présence de Rolipram (Figure 30, panel A). L'ajout de Rolipram démontre également que les BMDCs disposent d'une activité phosphodiésterase importante, permettant de dégrader en partie l'AMPC généré par ET. Alors que le taux d'AMPC présent dans le surnageant n'est augmenté qu'à partir de 16 heures en présence de ET, il demeure élevé dès les premières heures lorsque le Rolipram est incubé en même temps que ET (Figure 30, panel B). Dans les 2 cas, l'AMPC généré par ET ne se concentre pas uniquement dans la cellule et est relargué, le phénomène étant considérablement augmenté en présence de Rolipram.

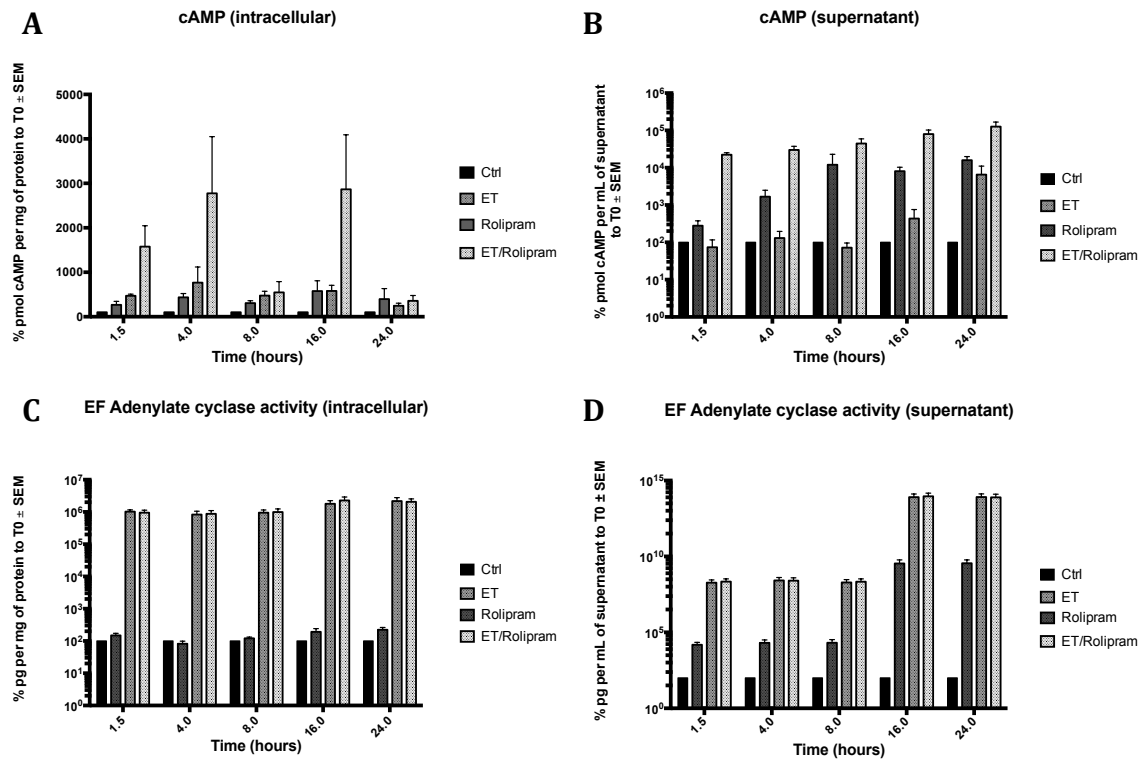


Figure 30 : Effets de ET sur la sécrétion d'AMPC dans les BMDCs.

Les BMDCs ont été traitées par ET (PA à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + EF à 100 ng/mL), du Rolipram (inhibiteur des PDE, 10 μM) ou ET + Rolipram. Après plusieurs temps d'incubation et lyse des BMDCs, le lysat et le surnageant de culture ont été récupérés pour mesurer la concentration en AMPc et l'activité adénylate cyclase de EF selon la même méthode que la référence [216]. Les données exprimées en % par rapport aux BMDCs du groupe contrôle sont les plus représentatives de 4 expériences. Le panel A représente la concentration en AMPc intracellulaire en pmol/mg de protéine de lysat rapportée à la concentration contrôle alors que le panel B montre la concentration en AMPc dans le surnageant en pmol/mL de surnageant. Les panels C et D illustrent l'activité adénylate cyclase de EF dans les lysats cellulaires en pg/mg de protéines (panel C) et dans le surnageant en pg/mL (panel D).

D'autre part, la mesure de l'activité adénylate cyclase de EF démontre que ET est bien présent dans les BMDCs dès 1.5 heures après l'intoxination (Figure 30, panel C), ainsi que dans le surnageant (Figure 30, panel D). Afin de s'assurer des résultats précédents, la concentration en AMPc intracellulaire et dans les surnageants, ainsi que l'activité de EF ont été dosées pour les BMDCs traitées avec PA. PA présente le même profil d'expression que les BMDCs du groupe contrôle (Figure supplémentaire S4, panels A, C, E et F). Un contrôle positif par le traitement à la Forskoline montre bien une élévation de la concentration en AMPc intracellulaire et dans le surnageant de culture (Figure supplémentaire S4, panels B et D)

Compte tenu de l'activité importante de dégradation de l'AMPc par les phosphodiésterases des BMDCs, ces dernières ont été incubées en présence de ET seules ou en association avec le Rolipram pour déterminer le taux de phosphorylation de la cofiline. La forskoline a été ajoutée comme contrôle positif de génération d'AMPc. Comme nous pouvions nous y attendre, l'ajout de Rolipram entraîne une activation de la cofiline plus prononcée que pour les BMDCs intoxiquées avec ET uniquement (Figure 31, panel A). La forskoline démontre également que l'AMPc généré provoque une activation de la cofiline (Figure 31, panel A).

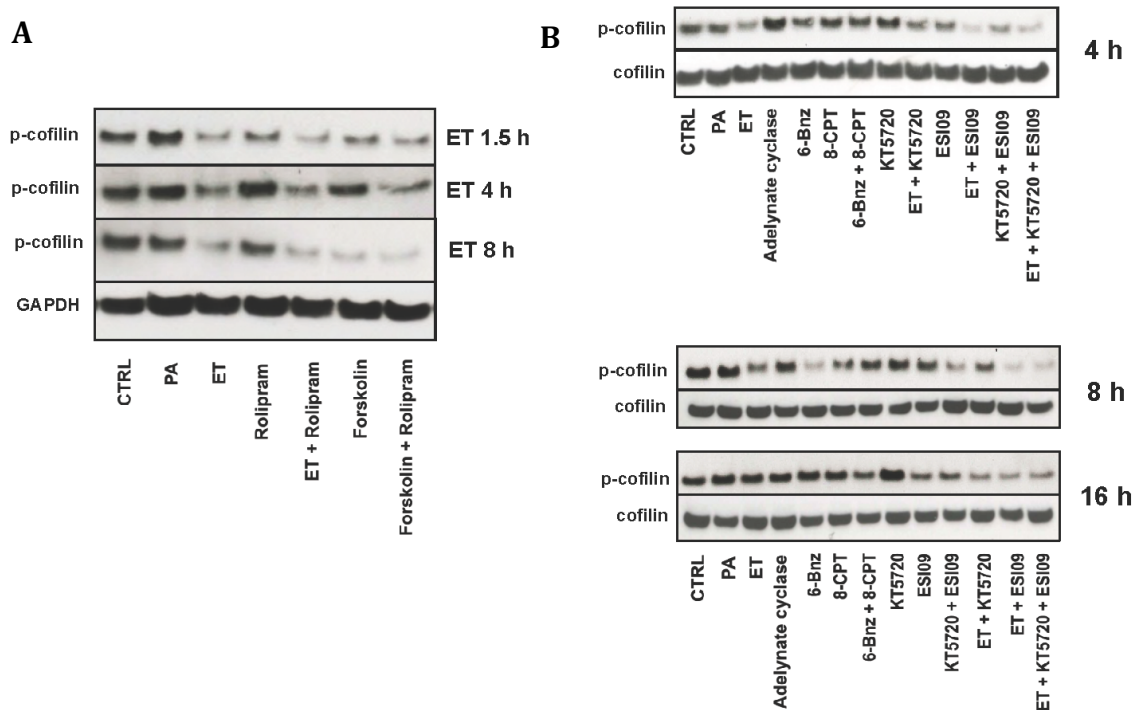


Figure 31 : ET conduit à l'activation de la cofiline par l'intermédiaire de l'AMPc via la voie PKA.

Panel A : les BMDCs ont été traitées par PA (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ET (PA à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + EF à 100 ng/mL), Rolipram (inhibiteur des PDE, 10 μM), ET + Rolipram, Forskoline (100 μM) et Forskolin + Rolipram. Après plusieurs temps d'incubation (1,5 heures, 4 heures et 8 heures) et lyse des BMDCs, le lysat a été récupéré et analysé en Western-Blot pour qualifier le degré de phosphorylation de la cofiline. Le contrôle de charge est représenté par la GAPDH. Le panel B présente l'expression sous forme phosphorylée ou totale de la cofiline. En fonction des temps d'intérêt, les BMDCs ont été incubées en présence d'activateurs ou d'inhibiteurs : l'adénylate cyclase de *Bordetella pertussis* (100 ng/mL), 6-Bnz (activateur PKA, 100 μM), 8-CPT (activateur sélectif d'Epac, 100 μM), KT5720 (inhibiteur de PKA, 10 μM), ESI09 (inhibiteur d'Epac, 5 μM).

L'AMPc cyclique généré peut conduire à l'activation de 2 voies de signalisation distincte ; l'une portée par la voie PKA et l'autre par la voie Epac. Pour déterminer quelle voie de signalisation serait responsable de l'activation de la cofiline par l'AMPc, les BMDCs ont été incubées en présence d'activateurs et d'inhibiteurs spécifiques de ces voies ou d'une toxine bactérienne connue pour son activité adénylate cyclase, à savoir l'adénylate cyclase de *Bordetella pertussis*. La molécule 6-Bnz est un puissant activateur de la voie PKA alors que la molécule 8-CPT est un activateur sélectif de la voie Epac. Du côté inhibiteur, KT5720 est un inhibiteur sélectif de PKA alors que ESI09 est un inhibiteur récent de la voie Epac.

Que ce soit à 4 ou 8 heures, la cofiline est déphosphorylée en présence de ET par rapport aux cellules du groupe contrôle et reprend son niveau de phosphorylation contrôle à 16 heures (Figure 31, panel B). L'adénylate cyclase de *Bordetella pertussis* ne semble pas entraîner d'activation de la cofiline, pour les mêmes concentrations que ET. L'incubation des BMDCs en présence de 6-Bnz conduit à une activation de la cofiline visible dès 4 heures, et une cofiline fortement active à 8 heures, bien plus que pour les BMDCs incubées avec ET (Figure 31, panel B). L'activation de la voie Epac par l'intermédiaire du 8-CPT ne semble pas induire une déphosphorylation de la cofiline, tout comme l'incubation des BMDCs avec les 2 activateurs (Figure 31, panel B). Ces résultats laissent supposer que la stimulation de la voie PKA conduit à une déphosphorylation de la cofiline, qui devient très active à 8 heures. A l'inverse, l'activation de la voie Epac ne semble pas être à l'origine de la déphosphorylation de la cofiline.

D'autre part, à 4 et 8 heures, l'ajout de KT5720 en présence de ET restaure partiellement le taux de phosphorylation de la cofiline, cette dernière étant légèrement plus phosphorylée que pour les BMDCs en présence de ET seul.

L'incubation des BMDCs en présence de ET et de ESI09 conduit, dès 4 heures à une déphosphorylation très importante de la cofiline, beaucoup plus prononcée que pour les BMDCs avec ET seul, laissant supposer un effet cumulatif entre ET et l'inhibition d'Epac. Cet effet est confirmé par les BMDCs incubées seulement avec ESI09, qui présente le même niveau de déphosphorylation que les BMDCs incubées en présence de ET. Epac aurait plutôt un rôle protecteur sur la déphosphorylation de la cofiline.

La présence des 2 inhibiteurs simultanément sans ET conduit à une déphosphorylation très nette de la cofiline, phénomène encore plus prononcé lors de l'ajout de ET.

Ainsi, ces résultats indiquent que PKA et Epac induisent des effets opposés sur la phosphorylation de la cofiline : PKA induit une déphosphorylation très nette de la cofiline alors qu'Epac semblerait maintenir un taux de phosphorylation constant. L'activation de la cofiline par ET semblerait être liée à la voie PKA directement, ce qui induit une déphosphorylation de la cofiline. Le fait que ESI09 génère la même déphosphorylation de la cofiline que ET seul, suggère que ET activerait la voie PKA pour activer la cofiline, et contrôlerait négativement la voie Epac dans les temps précoces de l'intoxication.

2.5 ET maintient la capacité phagocytaire des BMDCs mais perturbe la maturation phagosomale

Le cytosquelette d'actine joue un rôle essentiel dans le processus de phagocytose des BMDCs. Son remodelage au cours des différentes étapes de la phagocytose permet une internalisation optimale des corps à phagocyter et leur dégradation. Nous avons vu précédemment que ET est capable d'induire une dépolymérisation de l'actine F par activation de la cofiline via la voie de l'AMPC-PKA-Protéine phosphatase et une rétraction cellulaire par perte des points d'ancrage des BMDCs. A la vue de ces événements majeurs et en fonction de la bibliographie disponible sur les effets de ET pour la phagocytose des macrophages notamment, il était judicieux de penser qu'ET entraînerait une perte des capacités de phagocytose des BMDCs.

Afin d'étudier les capacités de phagocytose, les BMDCs ont été intoxiquées avec ET sur un intervalle de temps allant jusqu'à 30 heures. A l'instant T, correspondant au temps d'intoxication, les BMDCs ont été incubées avec des particules d'*E. coli* disposant d'un groupement pH-rodo couplé à un fluorochrome (*AlexaFluor 488 pHrodo E. coli*).

Outre son intérêt pour visualiser la capacité des cellules à phagocyter les particules de *E. coli*, ces particules contiennent un groupement couplé à un fluorochrome dont l'intensité de fluorescence est dépendante du pH. A pH neutre ou légèrement basique, l'intensité de fluorescence des particules est relativement faible, à l'échelle du bruit de fond. Plus le pH devient acide, plus l'intensité de fluorescence est forte. Cette variation de l'intensité de fluorescence permet aisément de suivre la maturation phagosomale des particules ingérées par les cellules jusqu'à la fusion des phagosomes avec les lysosomes où le pH devient très acide.

De manière surprenante, l'analyse en cytométrie en flux des BMDCs, intoxiquées par ET et incubées pendant 2 heures avec les particules de *pHrodo E. coli*, montre une très légère

baisse de la capacité phagocytaire des BMDCs (Figure 32, panel A). Le nombre de phagocytes est légèrement diminué sans pour autant être significatif à 30 heures après intoxication par ET (Figure 32, panel B). La MFI des *pHrodo E. coli* reste relativement stable au cours du temps et diminue légèrement après 30 heures d'intoxication (Figure 32, panel C).

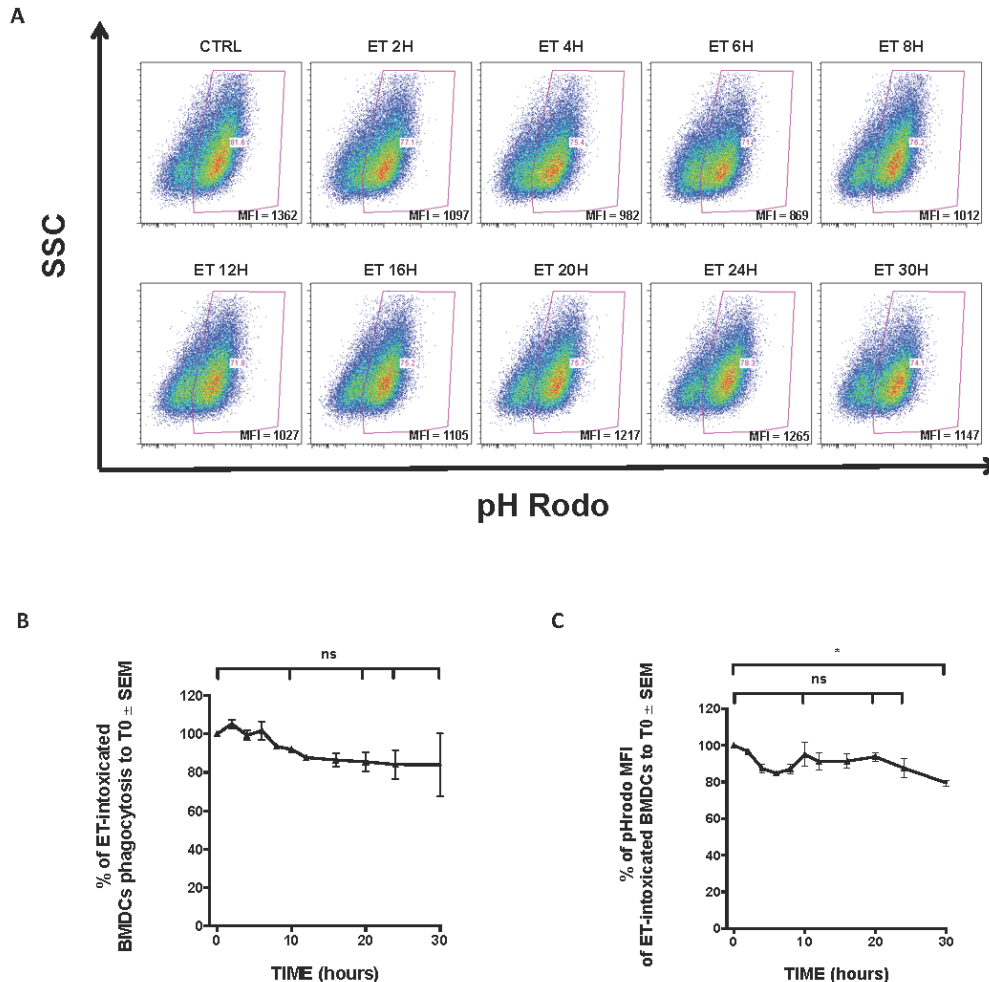


Figure 32 : Les BMDCs intoxiquées par ET gardent leur capacité de phagocytose.

Après intoxication par ET (PA à 1 $\mu\text{g/mL}$ + EF à 100 ng/mL) à différent intervalle de temps, les BMDCs ont été récupérées puis incubées pendant 2 heures en présence de particules d'*AlexaFluor 488 pHrodo E. coli*. Après marquage avec un anticorps anti-CD11c, les cellules sont analysées en cytométrie en flux. Le panel A présente l'évolution, au cours de l'intoxication, du nombre de BMDCs ayant phagocytées les particules. La MFI des particules est mentionnée en gras sur chaque graphe. L'expérience la plus significative parmi 5 expériences est présentée ici (10 000 évènements collectés par condition et par expérience). Le panel B représente, pour chaque temps d'intoxication, la moyenne \pm SEM du nombre de BMDCs phagocytaires rapportée aux BMDCs du groupe contrôle alors que le panel C illustre la moyenne \pm SEM de la MFI des *pHrodo E. coli*. 5 expériences au total. ns, non significatif / *, $p < 0,05$.

Ces données de cytométrie permettent seulement de quantifier les BMDCs phagocytaires et la MFI globale de toutes les particules phagocytées sans pour autant pouvoir décortiquer la maturation phagosomale. Afin de répondre à cette question, les BMDCs intoxiquées par ET et incubées avec les *pHrodo E. coli* sont analysées en imagerie en flux. Cette technologie nous a permis de quantifier les paramètres de phagocytose et d'internalisation à l'échelle de la particule mise dans l'environnement globale de la cellule. Comme nous pouvions nous y attendre, le nombre de BMDCs phagocytaires diminue légèrement pour devenir faiblement significatif pour le temps 24 heures (Figure 33, panel A et B). En revanche, la MFI des *pHrodo E. coli* décroît progressivement pour devenir significative à partir de 8 heures, laissant supposer que les particules dans leur globalité sont moins fluorescentes, et se trouvent dans un compartiment intracellulaire moins acide que pour les BMDCs du groupe contrôle (Figure 33, panel C).

Si nous nous plaçons à l'échelle de la particule, considérée comme un spot, l'analyse des résultats d'imagerie en flux démontre que les particules sont internalisées de la même manière pour les BMDCs du groupe contrôle et les BMDCs intoxiquées par ET, quelque soit le temps d'intoxication (Figure 33, panel D). En revanche, la distance minimale entre les particules est augmentée, démontrant que les particules sont plus éloignées les une des autres (Figure 33, panel E). Grâce à l'algorithme de quantification du nombre de particules, nous avons pu établir que l'intoxication par ET conduit à une diminution significative à partir de 16 heures du nombre de particules internalisées (Figure 33, panel F) mais que l'aire minimale est significativement augmentée (Figure 33, panel F). Leur nombre et l'aire minimale des particules sont donc inversement proportionnels.

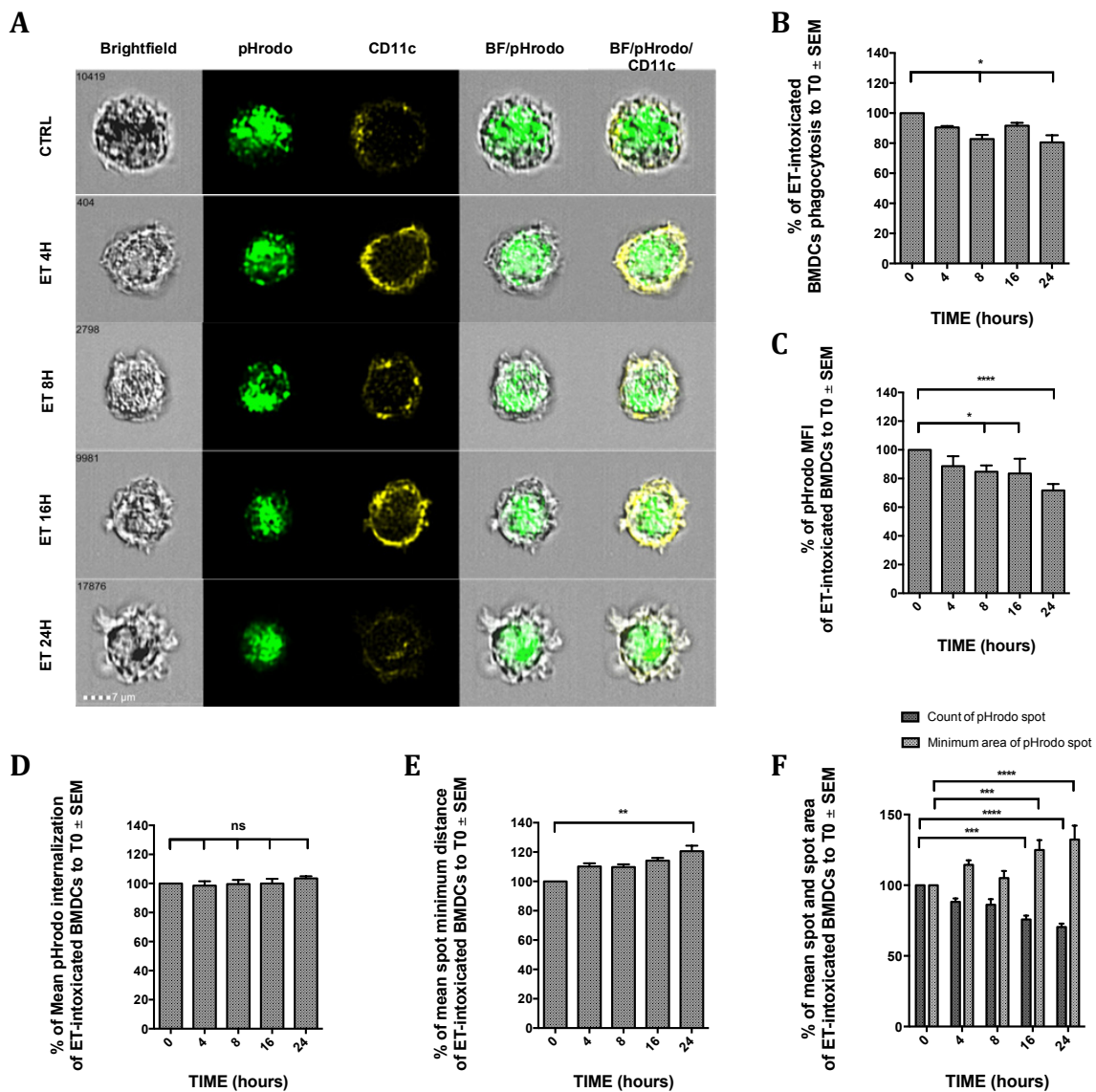


Figure 33 : ET maintient les capacités de phagocytose des BMDCs mais perturbe la maturation phagosomale.

Après intoxication par ET (PA à 1 µg/mL + EF à 100 ng/mL), les BMDCs ont été récupérées puis incubées pendant 2 heures en présence de particules d'*AlexaFluor 488 pHrodo E. coli*. Après marquage avec un anticorps anti-CD11c, les cellules sont fixées puis analysées en imagerie en flux. Le panel A illustre les effets de ET sur la phagocytose des BMDCs pour les temps contrôle, 4 heures, 8 heures, 16 heures et 24 heures. Pour chaque condition, la cellule la plus représentative des résultats de 3 expériences est présentée sous forme d'image en fond clair, d'une image pour les particules de pHrodo, d'une image pour le CD11c, d'une image de combinaison entre le fond clair + particules et d'une image pour le fond clair + CD11c + particules. Entre 5000 et 10000 BMDCs ont été comptabilisées pour chaque condition et pour chaque expérience pour l'analyse des résultats. Toutes les données représentent, pour chaque condition, la moyenne ± SEM du paramètre choisi des 3 expériences rapportée aux BMDCs du groupe contrôle (100 %). B. nombre de BMDCs phagocytaires, C. MFI des pHrodo, D. moyenne d'internalisation des particules de pHrodo, E. moyenne de la distance minimale entre les spots d'un même marqueur, et F. moyenne du nombre de spots et moyenne de l'aire minimale des spots. ns, non significatif / *, p<0,05 / **, p<0,01 / *** et ****, p<0,001.

Toutes ces données semblent démontrer que les BMDCs intoxiquées par ET gardent leur capacité de phagocytose mais ET entraînerait une perturbation de la maturation phagosomale, probablement au niveau de la fusion des phagosomes avec les lysosomes, moment où le pH devient très acide.

2.6 ET stimule la migration des BMDCs par une sur-expression des récepteurs CCR7 et CXCR4, corrélée à une activation des BMDCs

Les données de la littérature sur les effets de ET sur la migration des cellules sont très divergentes et sont fonction du type cellulaire et des conditions d'expérimentations. Précédemment, nous avons pu montrer qu'ET conduit à une déformation de l'architecture des BMDCs en suspension de manière plus allongée (Figure 27) ainsi qu'une perte probable des points d'ancrage, laissant supposer que les BMDCs intoxiquées par ET serait peut-être plus adapte à la déformation pour migrer dans leur environnement.

Afin de vérifier les capacités migratoires des BMDCs, nous avons réalisé des expériences de trans-migration, qui consistent à placer des BMDCs intoxiquées par ET dans le compartiment supérieur d'un tamis cellulaire disposant de pores de 3 μm . Après 4 heures de transmigration, les BMDCs ayant traversées le tamis sont récupérées puis comptées en cytométrie en flux. 3 conditions ont été réalisées en parallèle pour explorer en détail la transmigration des BMDCs : des BMDCs sans chimio-attractant, des BMDCs en présence d'un mélange de CCL19/CCL21 ou des BMDCS en présence de CXCL12 (SDF-1 α). D'autre part, il est établi que pour induire la migration des BMDCs, il est nécessaire de les activer par du lipopolysaccharide (LPS). Cependant, afin de se rapprocher de la nature de *Bacillus anthracis*, les BMDCs ont été incubées en présence d'acide lipotéichoïque (LTA), constituant de la membrane des bactéries à Gram positif. Au préalable, nous avons vérifié que le LTA permet une expression des récepteurs aux chimiokines CXCR4 et CCR7 (Figure supplémentaire S5). Pour chaque condition, les BMDCs ont été intoxiquées au total pendant 20 heures, seul le temps d'activation au LTA varie.

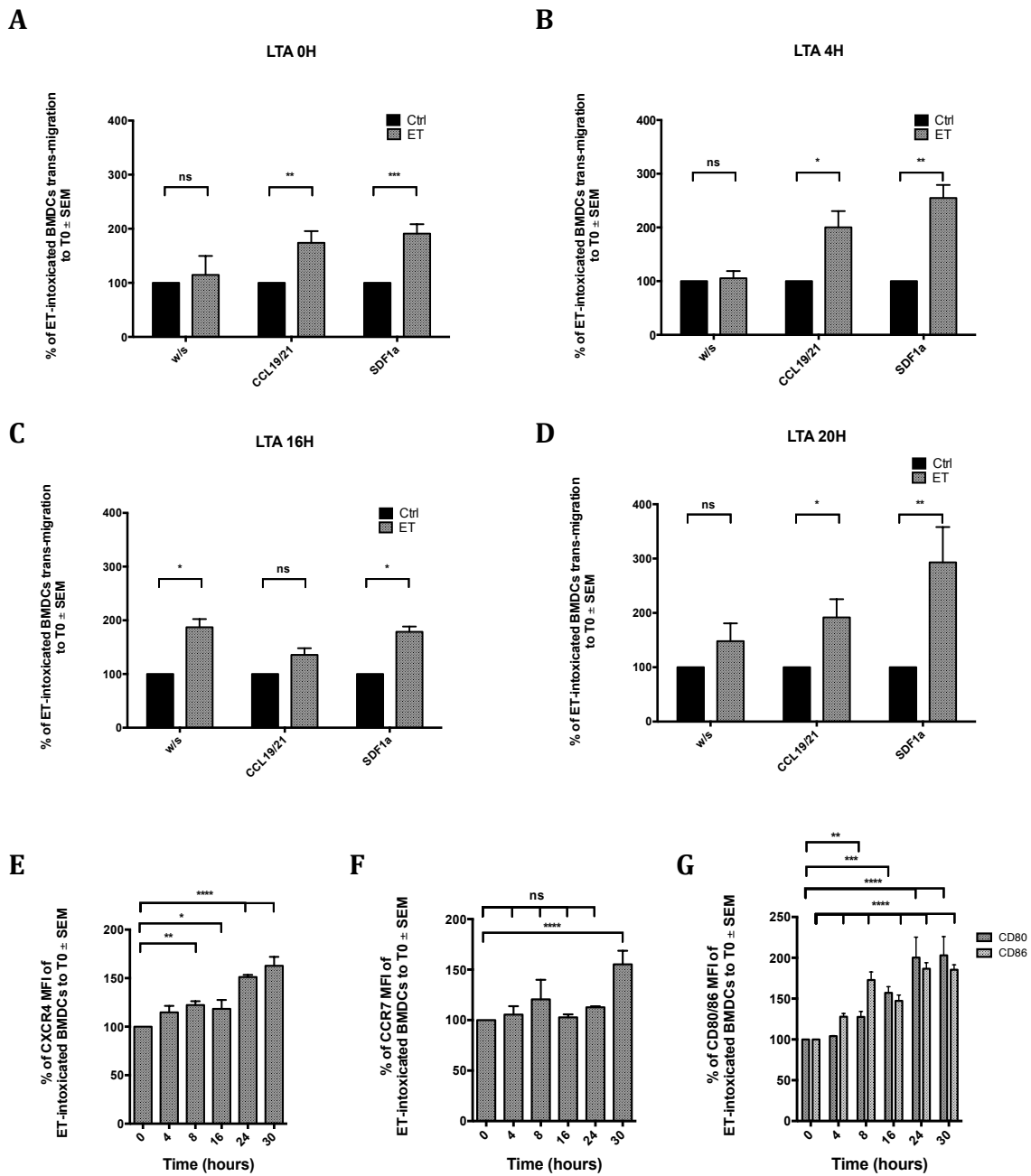


Figure 34 : ET induit une augmentation de la trans-migration des BMDCs par l'expression de CCR7 / CXCR4 et l'activation cellulaire.

Pour les panels A à D, les BMDCs intoxiquées par ET ± LTA sont placées dans le compartiment supérieur d'un tamis cellulaire disposant de pores de 3 µm. Après 4 heures de transmigration, les BMDCs ayant traversées le tamis cellulaire sont récupérées puis comptées en cytométrie en flux. Toutes les données représentent la moyenne ± SEM du nombre de BMDCs ayant traversé les pores, rapportée aux BMDCs du groupe contrôle (100 %), de 3 expériences différentes. Toutes les BMDCs ont été en contact avec ET pendant 20 heures et un temps variable pour l'incubation en présence de LTA : pas de LTA pour LTA 0 heure (panel A), 4 heures de LTA pour LTA 4H (panel B), 16 heures pour LTA 16H (panel C) et 20 heures pour LTA 20H (panel D). Pour chaque condition d'activation des BMDCs par le LTA, le compartiment receveur des BMDCs contient ou pas des chimio-attractants : une condition sans chimiokines, une condition avec le mélange CCL19/CCL21 et une condition avec SDF-

1α. Pour les panels E à F représentant la MFI des marqueurs par rapport aux BMDCs du groupe contrôle, les BMDCs intoxiquées par ET ont été marquées pour le CXCR4 (panel E), le CCR7 (panel F) et les marqueurs d'activation CD80/CD86 (panel G). ns, non significatif / *, $p < 0,05$ / **, $p < 0,01$ / *** et ****, $p < 0,001$.

En l'absence de chimio-attractant, les BMDCs intoxiquées par ET ont une tendance à migrer en plus grande quantité sans pour autant être significative sauf dans le cas d'une activation de 16 heures par le LTA (Figure 34, panel A, B, C, D). En revanche, en présence de chimio-attractants, les BMDCs intoxiquées par ET mais non activées par le LTA migrent significativement en plus grand nombre, laissant supposer que ET serait capable d'induire l'expression de récepteurs de ces chimiokines (Figure 34, panel A, B, C, D). Les résultats sont similaires pour les conditions d'activation au LTA pendant 4, 16 et 20 heures. En outre, les BMDCs traitées par PA présentent le même profil de trans-migration que les BMDCs du groupe contrôle (Figure supplémentaire S6).

Nous avons émis l'hypothèse que ET sera peut être capable d'induire l'expression des récepteurs de ces chimiokines à la surface cellulaire des BMDCs, à savoir ; CCR7 pour les chimiokines CCL19 et CCL21, et CXCR4 pour la chimiokine CXCL12 (SDF-1 α). Pour déterminer le taux d'expression de ces récepteurs, les BMDCs intoxiquées par ET à différents intervalles de temps, ont été marquées puis analysées en cytométrie en flux pour déterminer la MFI de CCR7 et de CXCR4. Ainsi, ET induit progressivement l'expression de CXCR4 par les BMDCs, avec une différence significative dès 8 heures d'intoxication alors que l'expression de CCR7 n'est statistiquement significatif qu'à 30 heures. En parallèle de l'expression des ces récepteurs, ET seul est capable d'induire l'activation des BMDCs dès 4 à 8 heures par l'expression des marqueurs d'activation CD80 et CD86.

L'ensemble de ces résultats démontrent clairement qu'ET conduit à une trans-migration plus prononcée des BMDCs en induisant l'activation des BMDCs et l'expression des récepteurs aux chimiokines CCR7 et CXCR4.

3. LT induit des perturbations du cytosquelette d'actine et de la phagocytose mais sans modification de la trans-migration

Nous avons précédemment démontré dans la première partie de ce chapitre, que LT conduit à un étalement des BMDCs sur les *micropatterns* en disque *coaté* à la fibronectine avec une augmentation de l'aire et de l'indice de circularité par rapport aux cellules du groupe contrôle et un *aspect ratio* proche de 1, démontrant une morphologie en disque presque complet. L'analyse visuelle des BMDCs normalisées montrait une concentration et une réorganisation d'actine F en anneau tout autour du noyau, non visible sur les cellules du groupe contrôle ou traitées uniquement avec le PA.

Cette concentration d'actine en anneau, déjà visible sur les BMDCs non normalisées, laisse supposer une réorganisation particulière de l'actine F induit par LT.

3.1 LT conduit à une réorganisation anarchique de l'actine sous forme d'amas sphérique dans les temps tardifs sans dépolymérisation de l'actine F

Afin d'explorer et de comprendre cette réorganisation particulière de l'actine induite par LT, des *micropatterns* spécifiques ont été confectionnés dans le but d'induire, dès la normalisation, un étalement complet des BMDCs. Le fait de provoquer une normalisation complète sur le *micropattern* conduit les BMDCs à établir des points d'ancrage tout autour de la forme en goutte et d'être étirées le plus possible sur les *micropatterns* (Figure 35, panel du haut). Ainsi, les éventuels défauts de la dynamique de l'actine devraient être visualisés.

Les BMDCs ont été normalisées de la même manière que pour les expériences développées précédemment pour ET. Les BMDCs intoxiquées par LT pendant 16 heures montrent une réorganisation particulière de l'actine F et de l'actine G par rapport aux BMDCs du groupe contrôle. Alors que l'actine F se retrouve toujours au niveau des points d'ancrage des BMDCs tout autour du *micropattern*, LT semble induire une réorganisation particulière de l'actine F en forme d'anneau avec une densification très importante de l'actine F, comme si les filaments d'actine F s'étaient regroupés entre eux. De manière plus surprenante, alors que l'actine G est présente dans la totalité du cytoplasme des BMDCs du groupe contrôle avec un pool plus central, les BMDCs intoxiquées par LT présentent uniquement de l'actine G à l'intérieur de l'anneau d'actine F, emprisonnant au passage le noyau (Figure 35, panel du

bas). Cet aspect en « oeuf au plat » était déjà visible pour les BMDCs non normalisées et celles normalisées sur les disques (Figures 20 et 23). Il est à noter également que certaines BMDCs intoxiquées par LT présentent des groupements de filaments d'actine plus denses s'étirant des points d'ancrage vers ces anneaux d'actine F (Figure 35, panel du bas, flèche blanche). Les BMDCs traitées avec PA ne montrent pas de divergence vis à vis des BMDCs du groupe contrôle (Figure supplémentaire S1).

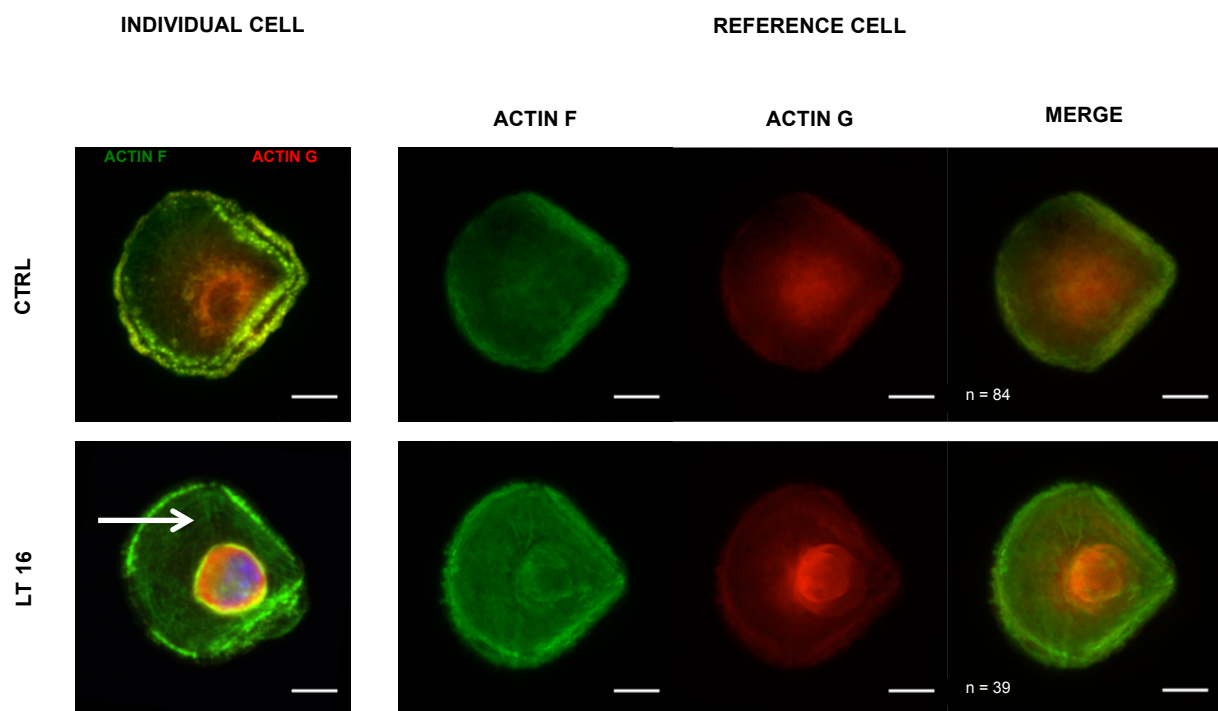


Figure 35 : LT conduit à une perturbation de la dynamique de l'actine des BMDCs normalisées sur un *micropattern* en forme de goutte.

Les BMDCs CD11c⁺ ont été sélectionnées par tri cellulaire, déposées sur les *micropatterns* pour se normaliser. Les BMDCs ont ensuite été intoxiquées par LT (PA à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + LF à 100 ng/mL) pendant 16 heures avant d'être fixées et marquées en même temps que les BMDCs du groupe contrôle : l'actine F (en vert) par l'AlexaFluor 647 Phalloïdine et l'actine G (en rouge) par l'AlexaFluor 488 DNase I. La colonne de gauche illustre une cellule la plus représentative des effets observés pour les conditions contrôles et LT 16H. Le groupement de colonnes de droite résulte du retraitement des images obtenues, selon la méthode décrite dans la référence [216]. La 2^{ème} colonne illustre les cellules de référence pour l'actine F, la 3^{ème} colonne pour l'actine G et la dernière colonne est une superposition des 2 cellules de référence. Le nombre de BMDCs utilisées pour chaque condition est mentionné sous la fusion (colonne *merge*) des cellules de référence.

Ces observations laissent supposer que LT pourrait conduire à un défaut dans la dynamique de l'actine, entre les phases de polymérisation et de dépolymérisation des filaments d'actine. Afin de vérifier l'absence de phénomène de dépolymérisation de l'actine, les BMDCs intoxiquées par LT ont été traitées dans les mêmes conditions que les BMDCs intoxiquées par ET. Les BMDCs sont ensuite analysées par cytométrie en flux pour quantifier le ratio d'actine G / actine F (Figure 36, panel A).

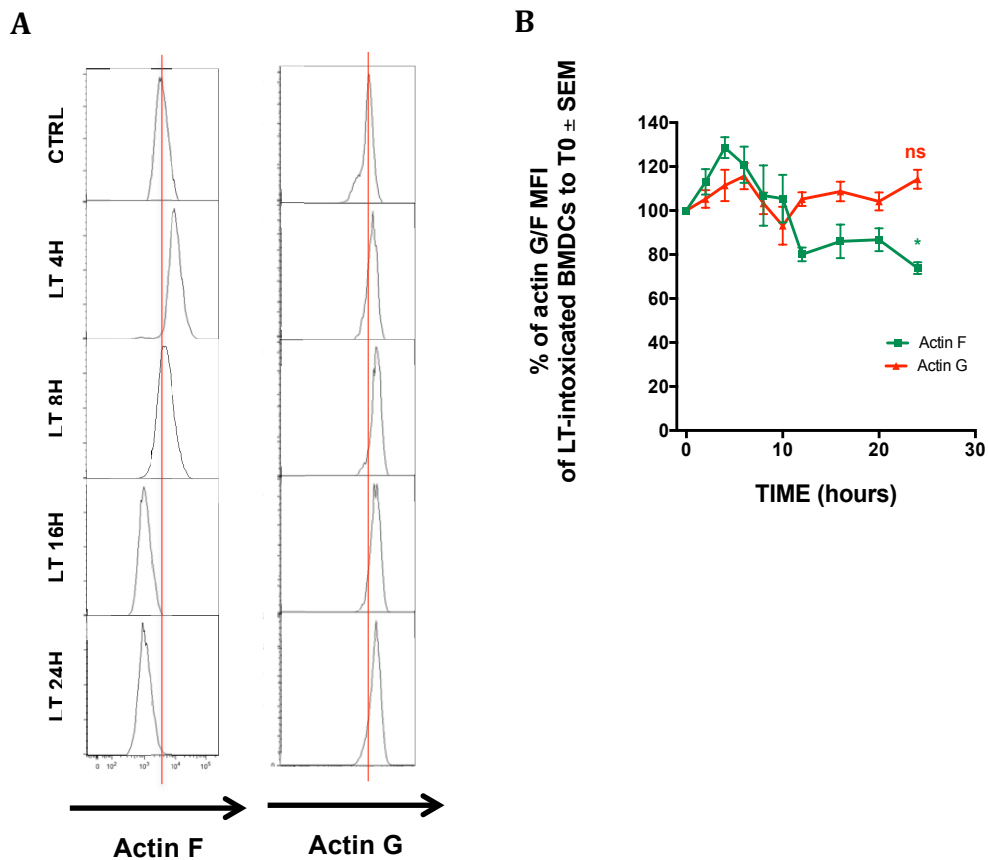


Figure 36 : LT conduit à une perte d'actine F uniquement pour les temps tardifs.

Après intoxication par LT (PA à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + LF à 100 ng/mL) à différents intervalle de temps, les BMDCs sont récupérées, marquées avec un anticorps anti-CD11c puis fixées. L'actine F est marquée par l'AlexaFluor 647 Phalloïdine et l'actine G par l'AlexaFluor 488 DNase I. Les BMDCs fixées sont analysées en cytométrie en flux. Le panel A, sous forme d'histogramme de la MFI de l'actine F à gauche et de l'actine G à droite représente une expérience la plus significative parmi 3 expériences (10 000 évènements collectés par condition et par expérience). Le panel B représente, pour chaque temps d'intoxication, la moyenne \pm SEM de la MFI des 3 expériences rapportées aux BMDCs du groupe contrôle (100 %). *, $p < 0,05$.

LT ne semble pas induire une augmentation de la quantité d'actine G même 24 heures après l'intoxication (Figure 36, panel B). En revanche, LT aurait une tendance à augmenter la MFI de l'actine F dans les temps précoces de l'intoxication avant de chuter brutalement à partir de 10 heures. A 24 heures, la MFI de l'actine F est significativement diminuée, laissant supposer que LT conduirait à une perte tardive d'actine F dans les BMDCs.

Pour essayer de corrélérer ces données de cytométrie en flux et les observations sur les *micropatterns*, plusieurs séries d'expériences ont été entreprises sur l'imageur en flux. Les BMDCs du groupe contrôle montrent une répartition homogène de l'actine G avec un pool central et une actine F plutôt corticale avec des protrusions autour de la cellule. Les BMDCs intoxiquées par LT montrent une répartition identique aux cellules du groupe contrôle pour l'actine G. En revanche, l'actine F n'est plus corticale et semble se recentrer sur l'intérieur de la cellule (Figure 37, panel A).

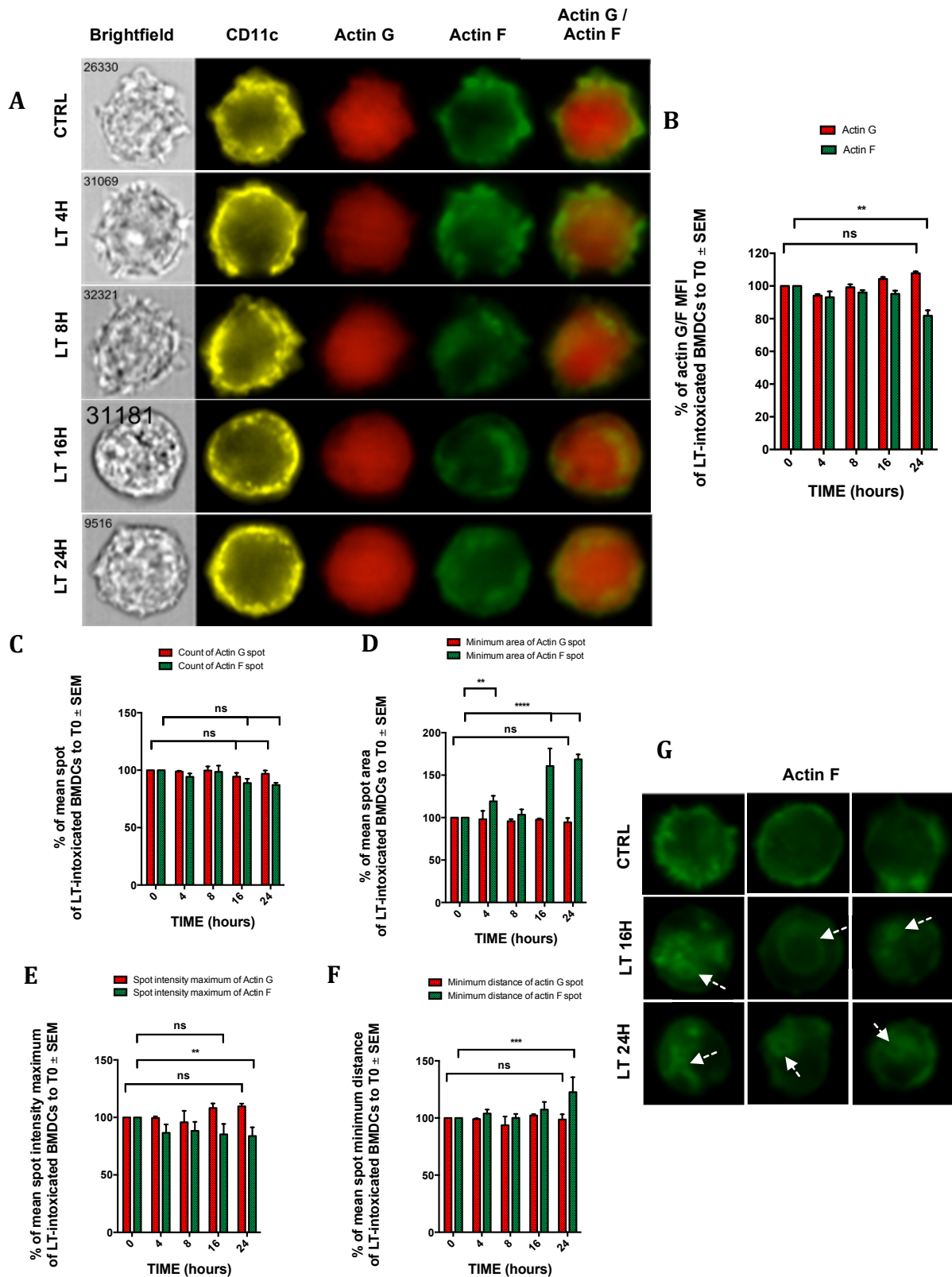


Figure 37 : LT perturbe la dynamique de polymérisation / dépolymérisation de l'actine des BMDCs.

Après intoxication par LT (PA à 1 $\mu\text{g/mL}$ + LF à 100 ng/mL) à différents intervalle de temps, les BMDCs sont récupérées, marquées avec un anticorps anti-CD11c (en jaune) puis fixées. L'actine F est marquée par l'AlexaFluor 647 Phalloïdine (en vert) et l'actine G par

l'AlexaFluor 488 DNase I (en rouge). Les BMDCs fixées sont analysées en imagerie en flux. Le panel A illustre les effets de LT sur le cytosquelette d'actine des BMDCs pour les temps contrôle, 4 heures, 8 heures, 16 heures et 24 heures. Pour chaque condition, la cellule la plus représentative des résultats de 3 expériences est présentée sous forme d'image en fond clair, d'une image pour le CD11c, d'une image pour l'actine G, d'une image pour l'actine F et d'une image de combinaison entre l'actine G et l'actine F. Le retraitement et l'analyse des données ont permis de définir plusieurs paramètres à la fois pour l'actine G et l'actine F, illustrés dans les panels B à F (entre 5000 et 10000 BMDCs comptabilisées pour chaque condition et pour chaque expérience) : la MFI (panel B), la moyenne du nombre de spots (panel C), la moyenne de l'aire minimale des spots (panel D), la moyenne de l'intensité maximale des spots (panel E) et la moyenne de la distance minimale entre les spots d'un même marqueur (panel F). Le panel G fournit un exemple d'images pour l'actine F illustrant par une flèche blanche les zones d'intérêt. Toutes les données représentent, pour chaque condition, la moyenne \pm SEM du paramètre des 3 expériences rapportées aux BMDCs du groupe contrôle (100 %) pour l'actine F (vert) et l'actine G (rouge). ns, non significatif / *, $p < 0,05$ / **, $p < 0,01$ / *** et ****, $p < 0,001$.

Alors que la MFI de l'actine G ne montre pas de différence significative même après 24 heures d'intoxication, la MFI de l'actine F est significativement diminuée à 24 heures confirmant les données de cytométrie en flux (Figure 37, panel B). En considérant les différentes formes d'actine comme des spots, les analyses démontrent qu'il n'y a pas plus de spots d'actine G et d'actine F que pour les BMDCs du groupe contrôle (Figure 37, panel C). La seule différence statistiquement significative se retrouve dans la moyenne de l'aire minimale des spots d'actine F qui est très nettement augmentée pour les temps 16 et 24 heures (Figure 37, panel D). Cette augmentation de taille aux temps donnés est accompagnée d'une moyenne d'intensité maximale des spots plus faible que pour les BMDCs du groupe contrôle (Figure 37, panel E) et une distance entre les spots d'actine F plus grande (Figure 37, panel F). Pour l'ensemble des paramètres analysés, le PA n'entraîne aucune différence significative par rapport aux BMDCs du groupe contrôle (Figure supplémentaire S2).

L'analyse visuelle rigoureuse des BMDCs intoxiquées par LT en comparaison des BMDCs du groupe contrôle montre que l'aire des spots d'actine F augmentée peut être expliquée par des regroupements d'actine F. Ces regroupements sont visibles sur les images d'imagerie en flux, sous forme d'anneau ou de regroupement de filaments d'actine, de manière assez similaire à ce qui a pu être observé pour les BMDCs normalisées sur les *micropatterns* (Figure 37, panel G). Ainsi, l'ensemble des résultats démontre que LT intervient sur le cytosquelette d'actine des BMDCs probablement en perturbant la dynamique de polymérisation/dépolymérisation de l'actine.

Dans l'hypothèse où LT agirait sur cette dynamique, les BMDCs ne seraient plus capables de réorganiser leur cytosquelette, ce qui pourrait avoir des conséquences sur leur morphologie générale. D'autre part, nous avons noté que LT conduisait à un étalement des BMDCs sur les *micropatterns* en disque. Nous pourrions ainsi s'attendre à une augmentation de la taille et de la structure des BMDCs intoxiquées par LT. Afin de vérifier cette hypothèse, les BMDCs intoxiquées ont été analysées en cytométrie en flux et en imagerie en flux par des paramètres de morphologie (Figure 38).

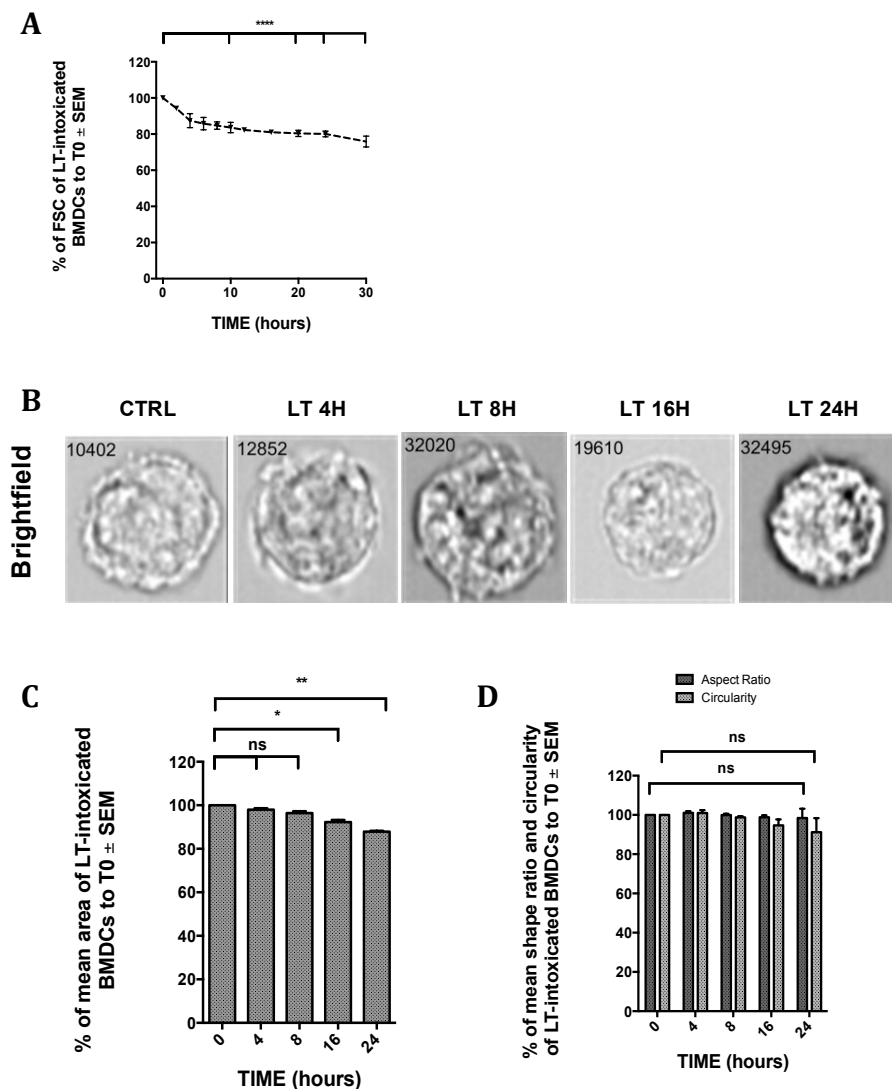


Figure 38 : Effets de LT sur l'aire des BMDCs en suspension.

Après intoxication par LT (PA à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + LF à 100 ng/mL), les BMDCs sont récupérées puis fixées. Les BMDCs sont analysées par cytométrie en flux pour mesure du paramètre de taille (FSC) (panel A) et en imagerie en flux pour leur morphologie en suspension (panel B) et pour les paramètres d'aire (panel C), de circularité et de *shape ratio* (panel D). Toutes les données représentent, pour chaque condition, la moyenne \pm SEM de 5 expériences de cytométrie et de 3 expériences d'imagerie en flux, rapportées aux BMDCs du groupe contrôle (100 %). ns, non significatif / *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$ / ****, $p < 0,001$.

De manière surprenante, la taille et l'aire des BMDCs intoxiquées par LT diminuent au fur et à mesure de l'intoxication. Cette diminution est statistiquement significative à partir de 10 à 16 heures que ce soit en cytométrie ou en imagerie en flux (Figure 38, panel A, B, C). Les paramètres de circularité et d'*aspect ratio* ne sont pas modifiés par LT (Figure 38, panel D). De son côté, PA ne modifie pas la morphologie et l'aire des BMDCs en suspension (Figure supplémentaire S3).

L'ensemble des résultats démontrent que LT agresse le cytosquelette d'actine des BMDCs en modifiant la dynamique de polymérisation / dépolymérisation de l'actine F. Ce désordre conduit à une perte d'actine F, un regroupement prononcé des filaments d'actine aboutissant à des BMDCs plus petites en aire.

3.2 LT cible la myosine II par l'intermédiaire de la myosine phosphatase via RhoA-ROCK pour désorganiser le cytosquelette d'actine

Les résultats précédents ont montré que LT conduit à un regroupement anarchique des filaments d'actine sans dépolymérisation sur les temps tardifs d'intoxication, comme si les filaments d'actine se regroupaient les uns avec les autres sans maintien de la structure de la cellule. La contractilité de la cellule et le maintien de son organisation impliquent les myosines, et notamment la myosine II, comme moteur dynamique de contractilité cellulaire. Les myosines dans leur état phosphorylé (mono et bi-phosphorylée) permettent une contractilité des filaments d'actine et un maintien de la structure cellulaire. Afin de vérifier l'implication des myosines II dans l'altération de la dynamique de l'actine, les BMDCs ont été intoxiquées en présence de LT à différents intervalles de temps pour suivre la cinétique d'intoxication. Les protéines issues du lysat cellulaire ont été analysées par Western-Blot.

Ainsi, LT conduit dans les temps tardifs à une déphosphorylation progressive de la chaîne légère des myosines II (MLC2). Cette déphosphorylation est à la fois présente pour les MLC2 en position serine 19 et en position thréonine 18 (Figure 39, panel A). Nous avons vu précédemment que la déphosphorylation des MLC2 peut provenir de l'activation de MLCP, se traduisant par une déphosphorylation de la partie catalytique de la MLCP, la MYPT1 [146, 150]. Cette dernière est progressivement déphosphorylée par LT de manière parallèle à la déphosphorylation des MLC2, la rendant ainsi active. Elle peut alors déphosphoryler

progressivement les myosines II des BMDCs (Figure 39, panel A). D'autre part, cette déphosphorylation tardive des MLC2 et l'activation de la MLCP semble débuter une fois que MEK1/2 est clivé par LT (Figure 39, panel A).

Nous avons vu dans l'analyse de la bibliographie que la régulation des myosines est en partie dépendante des GTPases de la famille des Rho, et notamment la voie de signalisation RhoA – ROCK. Les GTPases RhoA, actives lorsqu'elles sont liées au GTP, sont capables d'activer ROCK, qui va phosphoryler à la fois la MLCP pour la rendre inactive et les MLC2 [148, 152]. Afin de vérifier l'implication de cette voie, nous avons d'abord réalisé un essai de pull-down sur les lysats cellulaires de BMDCs intoxiquées par LT. Cet essai permet de quantifier les GTPases actives, c'est à dire liées au GTP.

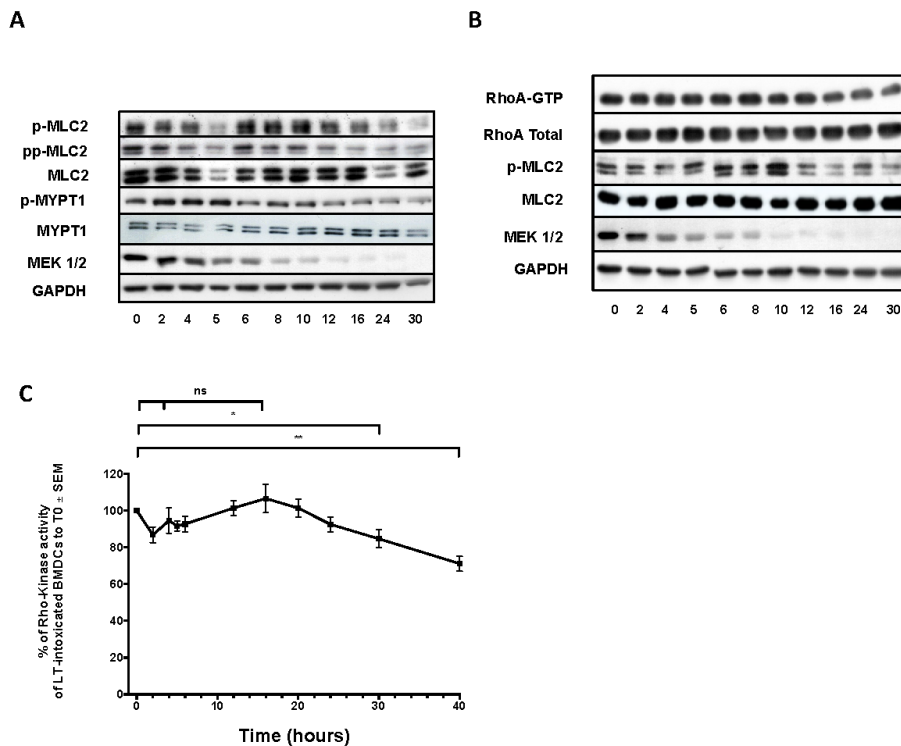


Figure 39 : LT conduit à une déphosphorylation de la MLC2 par l'activation de la MLCP via la voie RhoA-ROCK.

Après intoxication par LT (PA à 1 µg/mL + LF à 100 ng/mL), les BMDCs sont lysées et le lysat cellulaire est analysé en Western-Blot. Le panel A présente, sous forme de cinétique d'intoxication, l'expression sous forme phosphorylée ou totale des protéines d'intérêt. Le contrôle de charge est représenté par la GAPDH. Le panel B complète les résultats par l'expression de RhoA sous forme active, liée au GTP après une expérience de pull-down permettant d'isoler les molécules de RhoA-GTP uniquement. Le panel C illustre l'activité de ROCK, déterminée par ELISA sur les lysats cellulaires.

ns, non significatif / *, p<0,05 / **, p<0,01

A partir de 16 heures, LT semble agir sur la voie RhoA comme peut le montrer le panel B de la figure 39. Le profil d'expression de la phosphorylation de la MLC2, réalisé sur les mêmes lysats cellulaires, démontre que LT conduit à la déphosphorylation des myosines II (Figure 39, panel B).

Afin de confirmer le ciblage de RhoA par LT, des mesures de l'activité de ROCK ont été effectuées sur le lysat cellulaire. Comme nous pouvions nous y attendre, l'activité de ROCK diminue progressivement à partir de 16 heures et la différence devient significative dans les temps tardifs. L'ensemble de ces résultats permet de conclure que LT, dans les temps tardifs, inhibe la voie RhoA-ROCK, conduisant à une activation de la myosine phosphatase et une déphosphorylation tardive des MLC2. Ainsi, il pourrait être émis comme hypothèse que les myosines II ne pourraient plus exercer leur rôle de contractilité et de dynamique des filaments d'actine. Cette altération des myosines II expliquerait peut être les perturbations de la dynamique de l'actine.

3.3 LT induit une perte des capacités de phagocytose des BMDCs et une altération complète de la maturation phagosomale

De part son activité de métalloprotéase à zinc, LT clive une grande partie des MEKs et comme nous avons pu le voir dans l'analyse de la bibliographie, ces voies sont fondamentales pour les fonctions cellulaires. Précédemment, nous avons démontré que LT conduit à une perturbation importante de la dynamique de l'actine au cours du temps. Afin de démontrer les conséquences de ces effets sur la phagocytose, les BMDCs intoxiquées par LT ont été incubées au temps T désiré avec des particules de *pHrodo E. coli* et les échantillons ont été analysés en cytométrie en flux. Très rapidement, LT conduit à une diminution significative du nombre de cellules phagocytaires (Figure 40, panel A et B), qui semble suivre le profil de clivage de MEK1/2 obtenus dans la figure 39, panel A.

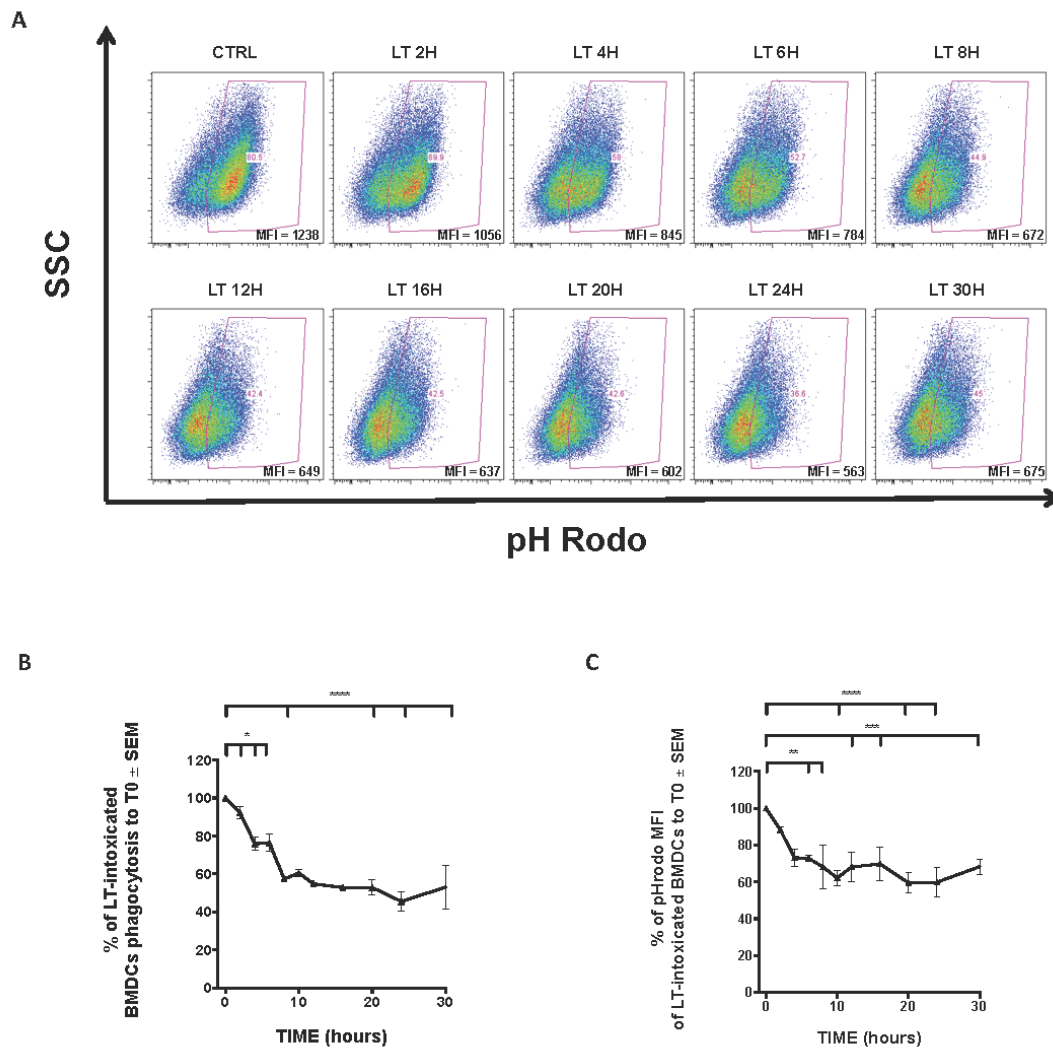


Figure 40 : LT inhibe la phagocytose des BMDCs.

Après intoxication par LT (PA à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + LF à 100 ng/mL) à différent intervalle de temps, les BMDCs ont été récupérées puis incubées pendant 2 heures en présence de particules d'AlexaFluor 488 pHrodo *E. coli*. Après marquage avec un anticorps anti-CD11c, les cellules sont analysées en cytométrie en flux. Le panel A présente l'évolution, au cours de l'intoxication, du nombre de BMDCs ayant phagocytées les particules. La MFI des particules est mentionnée en gras sur chaque graphe. L'expérience la plus significative parmi 3 expériences est présentée ici (10 000 évènements collectés par condition et par expérience). Le panel B représente, pour chaque temps d'intoxication, la moyenne \pm SEM du nombre de BMDCs phagocytaires rapportées aux BMDCs du groupe contrôle alors que le panel C illustre la moyenne \pm SEM de la MFI des pHrodo *E. coli*. 3 expériences au total.

*, $p < 0,05$ / **, $p < 0,01$ et ***/****, $p < 0,001$.

De manière non surprenante, la MFI des particules de pHrodo suit la courbe de diminution du nombre de BMDCs ayant phagocytées les particules (Figure 40, panel C), nous permettant de conclure que LT inhibe la phagocytose des BMDCs.

Nous avons décidé de confirmer ces résultats par des techniques d'imagerie en flux, à l'instar de ce qui a été réalisé pour ET (Figure 41, panel A). L'inhibition de la phagocytose par LT a été confirmée avec les mêmes profils, pour la diminution du nombre de BMDCs ayant phagocytées les particules (Figure 41, panel B) et la diminution significative de la MFI des particules de *pHrodo E. coli* (Figure 41, panel C). L'imagerie en flux a permis d'apporter des éléments complémentaires. LT entraîne une diminution de l'internalisation des particules, significative sur les temps tardifs (Figure 41, panel D), ces dernières étant plus éloignées les unes des autres (Figure 41, panel E). D'autre part, la moyenne du nombre de particules phagocytées est significativement diminuée dès 4 heures d'intoxination. Ces particules présentent une moyenne d'aire minimale augmentée et une moyenne d'intensité de fluorescence maximale diminuée également dès 4 heures.

Par conséquent, LT inhibe la phagocytose des BMDCs, en diminuant par 2 au minimum le nombre de cellules phagocytaires. Le peu de BMDCs, encore capables de phagocytose, présentent une altération générale de la voie phagosomale. Les particules phagocytées semblent incapables de suivre la voie de maturation des phagosomes et restent en périphérie des BMDCs.

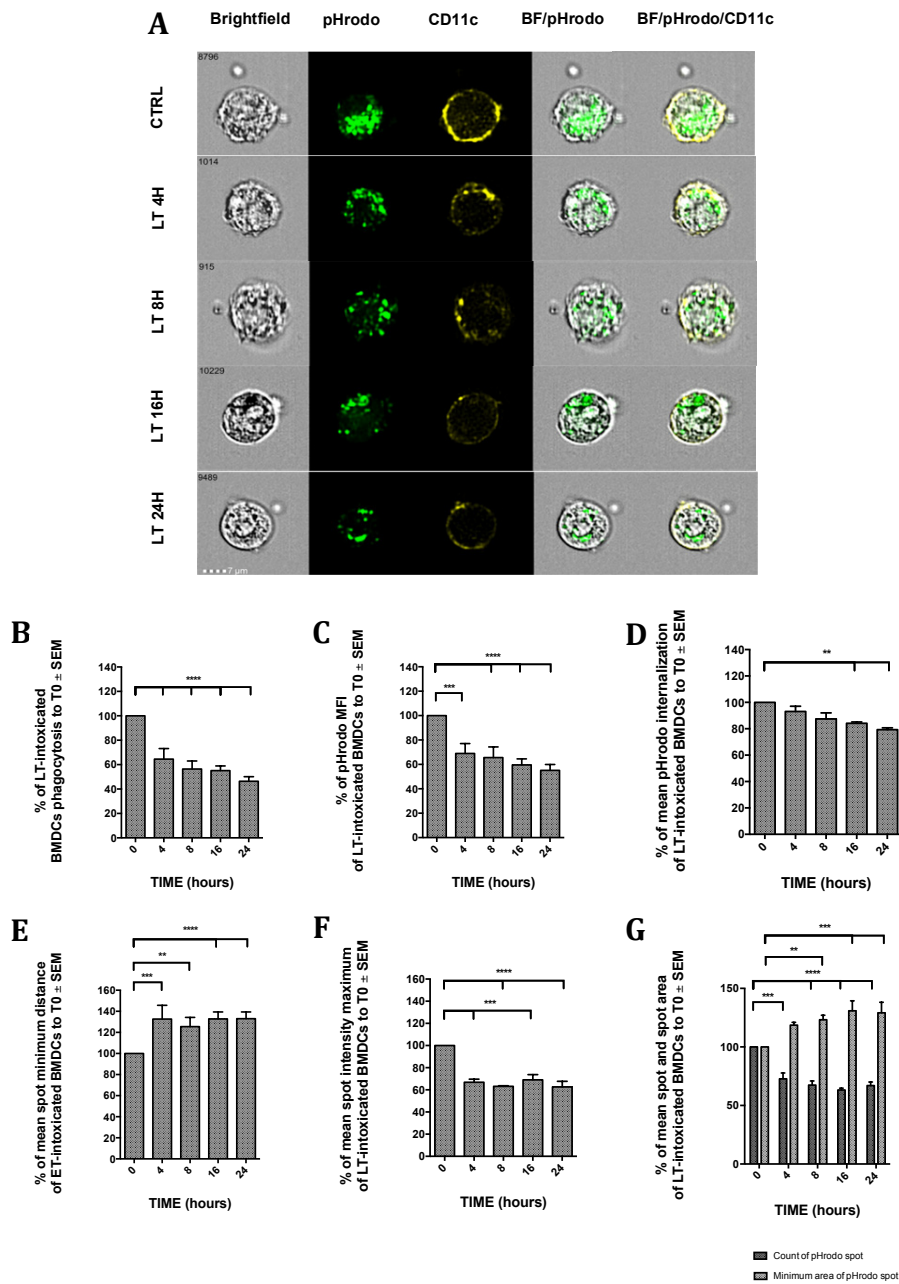


Figure 41 : LT inhibe la phagocytose des BMDCs en empêchant l'internalisation et en perturbant la maturation phagosomale.

Après intoxication par LT (PA à 1 µg/mL + LF à 100 ng/mL), les BMDCs ont été récupérées puis incubées pendant 2 heures en présence de particules d'AlexaFluor 488 pHrodo *E. coli*. Après marquage avec un anticorps anti-CD11c, les cellules sont fixées puis analysées en imagerie en flux. Le panel A illustre les effets de LT sur phagocytose des BMDCs pour les temps contrôle, 4 heures, 8 heures, 16 heures et 24 heures. Pour chaque condition, la cellule la plus représentative des résultats de 3 expériences est présentée sous forme d'image en fond clair, d'une image pour les particules de pHrodo, d'une image pour le CD11c, d'une image de combinaison entre le fond clair + particules et d'une image pour le fond clair + CD11c + particules. Entre 5000 et 10000 BMDCs ont été comptabilisées pour chaque condition et pour chaque expérience pour l'analyse des résultats. Toutes les données représentent la moyenne ± SEM du paramètre choisi des 3 expériences rapportées aux BMDCs du groupe contrôle (100 %). B. nombre de BMDCs phagocytaires, C. MFI des pHrodo, D. moyenne d'internalisation

des particules de pHrodo, E. moyenne de la distance minimale entre les spots d'un même marqueur, F. moyenne de l'intensité maximale des spots et G. moyenne du nombre de spots et moyenne de l'aire minimale des spots. **, $p < 0,01$ / *** et ****, $p < 0,001$.

3.4 LT ne modifie pas la trans-migration des BMDCs

Devant l'inhibition flagrante de la phagocytose des BMDCs par LT, nous avons émis l'hypothèse que le phénomène de trans-migration des BMDCs serait également inhibé par LT. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons réalisé des expériences de trans-migration comme décrites pour ET. Les BMDCs intoxiquées par LT sont placées dans le compartiment supérieur d'un tamis cellulaire disposant de pores de 3 μm . Les BMDCs ayant traversé le tamis sont récupérées pour un comptage en cytométrie en flux. Trois conditions ont été réalisées en parallèle pour explorer en détail la trans-migration des BMDCs : des BMDCs sans chimio-attractant, des BMDCs en présence d'un mélange de CCL19/CCL21 ou des BMDCs en présence de SDF-1 α . Pour induire la migration des BMDCs, ces dernières ont été incubées en présence de LTA, ce dernier induisant l'expression de CXCR4 et CCR7 (Figure supplémentaire S5). Pour chaque condition, les BMDCs ont été intoxiquées au total pendant 20 heures, seul le temps d'activation au LTA varie.

Que ce soit sans ou avec chimio-attractant, et quel que soit le temps d'activation par le LTA, le nombre de BMDCs intoxiquées par LT ayant traversé les pores n'est pas significativement différent du nombre de BMDCs du groupe contrôle ayant traversé les pores de migration (Figure 42, panel A à D). D'autre part, LT n'induit pas l'expression de CCR7 et CXCR4 à la surface des BMDCs (Figure 42, panel E et F), et au contraire diminue l'expression des marqueurs d'activation des BMDCs, à savoir CD80 et CD86 sur les temps tardifs d'intoxication. Le PA de son côté n'apporte aucune modification par rapport aux BMDCs du groupe contrôle (Figure supplémentaire S6).

L'ensemble de ces résultats semble démontrer que LT n'a aucun effet sur la trans-migration des BMDCs mais d'autres expériences seraient nécessaires pour affirmer ce résultat. En effet, il pourrait être supposé que comme LT diminue la taille des BMDCs, les BMDCs plus petites pourraient traverser les pores de migration et masquer l'inhibition de la trans-migration par LT.

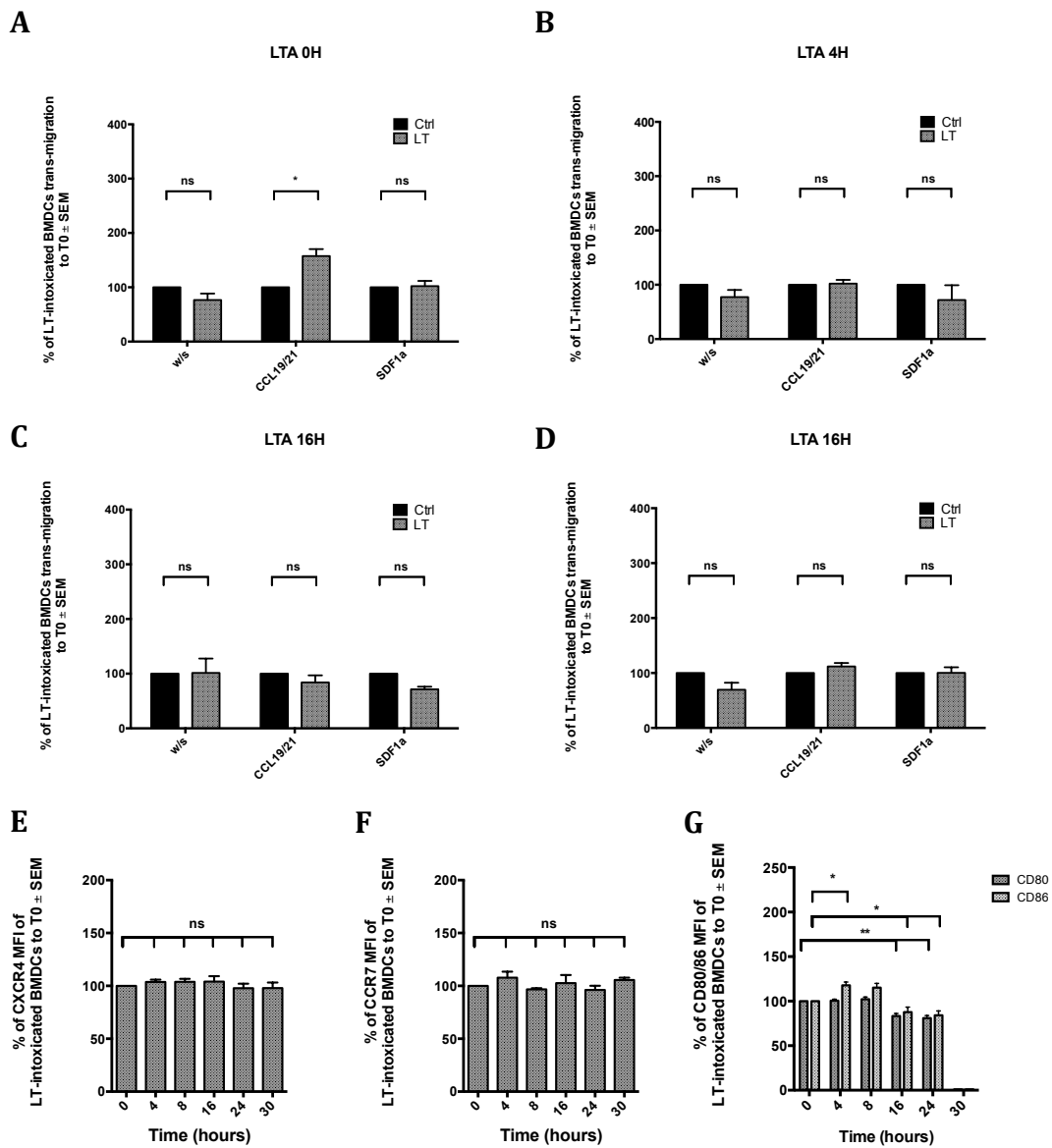


Figure 42 : LT n'induit pas de modification de la trans-migration des BMDCs.

Pour les panels A à D, les BMDCs intoxiquées par LT \pm LTA sont placées dans le compartiment supérieur d'un tamis cellulaire disposant de pores de 3 μ m. Après 4 heures de transmigration, les BMDCs ayant traversées le tamis cellulaire sont récupérées puis comptées en cytométrie en flux. Toutes les données représentent la moyenne \pm SEM du nombre de BMDCs ayant traversé les pores, rapportée aux BMDCs du groupe contrôle (100 %), de 3 expériences différentes. Toutes les BMDCs ont été en contact avec LT pendant 20 heures et un temps variable pour l'incubation en présence de LTA : pas de LTA pour LTA 0H (panel A), 4 heures de LTA pour LTA 4H (panel B), 16 heures pour LTA 16H (panel C) et 20 heures pour LTA 20H (panel D). Pour chaque condition d'activation des BMDCs par le LTA, le compartiment receveur des BMDCs contient ou pas des chimio-attractants : une condition sans chimiokines, une condition avec le mélange CCL19/CCL21 et une condition avec SDF-1 α . Pour les panels E à F représentant la MFI des marqueurs par rapport aux BMDCs du groupe contrôle, les BMDCs intoxiquées par LT ont été marquées pour le CXCR4 (panel E), le CCR7 (panel F) et les marqueurs d'activation CD80/CD86 (panel G). ns, non significatif / *, $p < 0,05$ / **, $p < 0,01$.

4. Matériels et méthodes

4.1 Génération des BMDCs

Les cellules dendritiques issues de la moelle osseuse de souris (BMDCs) sont produites après différenciation et maturation de progéniteurs hématopoïétiques de souris C57BL/6 en présence de facteurs de croissance pendant 8 jours. La moelle osseuse contenant les progéniteurs est extraite des fémurs et tibia des pattes postérieures de souris C57BL/6. Après une lyse des hématies par un tampon au NH_4Cl (tampon 4X : 0,15 M de NH_4Cl , 1 mM de KHCO_3), les lymphocytes B et T sont déplétés à l'aide de billes magnétiques anti-pan-B et anti-pan-T (Dynal). Les cellules obtenues à une concentration de 6×10^5 cellules/mL sont mises en culture en plaque 6 puits, contenant 4 mL de milieu de culture complet (MCC) contenant du RPMI 1640 (Sigma Chemical Co.), complété avec 5% de sérum de veau foetal (Gibco™ Invitrogen), 100 U/mL de pénicilline, 0.1 mg/mL de streptomycine et 2 mM de L-Glutamine (Sigma Chemical Co.). Afin de différencier les progéniteurs, 20 ng/mL de GM-CSF (Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor) et 10 ng/mL d'IL-13 sont ajoutés à chaque puit de culture. A J3, J5 et J7, 70% du milieu de culture est renouvelé par du MCC frais, enrichi par 20 ng/mL de GM-CSF. A J8, les BMDCs immature sont prélevées par une aspiration vigoureuse du milieu de culture sur le fond des puits et remises en suspension dans un MCC frais contenant 20 ng/mL de GM-CSF avant toute utilisation.

4.2 Normalisation des BMDCs

En fonction des objectifs, les BMDCs immatures obtenues précédemment à J8 sont déposées sur des lamelles sur lesquelles des *micropatterns* ont été incorporés et *précoatés*, permettant une adhésion normalisée des cellules. Les BMDCs sont déposées sur des supports de culture, commercialisés par CYTOO Cell Architects (Grenoble), qui repose sur un contrôle géométrique du micro-environnement des cellules, entraînant une morphologie et une organisation interne standardisée. Ces CYTOOchip, d'une taille de 20 mm x 20 mm sont composées à la fois de *micropatterns*, *coatés*, de forme et de taille définies sur lesquelles les cellules viennent adhérer, et d'espace non adhérent. Les lamelles CYTOO *coatées* à la fibronectine sont déposées au fond d'une plaque de culture 6 puits. Environ 10^5 BMDCs/mL issues du prélèvement à J8 sont déposées sur les lamelles. Après plusieurs cycles d'incubation sans mouvement, de légères agitations et d'observation au microscope inversé, l'excès de

cellules non adhérentes est éliminé par des remplacements successifs de 70 % du milieu de culture, tout en s'assurant du non décollement des cellules adhérentes et de l'élimination de toutes BMDCs en suspension. Les lamelles sont placées en étuve à température et teneur en CO₂ contrôlées pendant 24 heures avant toute expérience.

4.3 Intoxination des BMDCs

Avant les étapes d'intoxination, les BMDCs sont distribuées dans des plaques 12 ou 24 puits à une concentration de 10⁶ BMDCs/mL. Vingt-quatre heures après, 70 % du milieu de culture est remplacé par un MCC frais enrichi par 20 ng/mL de GM-CSF, dans lequel ont été incorporés les facteurs PA, EF et LF, en tampon H₂O-BSA 1 mg/mL (List Biological Laboratories, Inc). Selon les conditions explorées, ce mélange comprend soit du PA seul à une concentration de 1 µg/mL, soit un mélange de PA (1 µg/mL) et EF à une concentration de 100 ng/mL, soit un mélange de PA (1 µg/mL) et LF à une concentration de 100 ng/mL.

4.4 Immunofluorescence et microscopie

Le milieu de culture est éliminé par aspiration lente afin de ne pas décrocher les BMDCs adhérentes puis ces dernières sont lavées en tampon cytosquelette (CB) 1x (Cytoskeleton Buffer 4x : 40mM MES pH 6.1, 552 mM KCl, 12 mM MgCl₂, 8 mM EGTA). La fixation des cellules est réalisée par l'ajout d'une solution de formaldéhyde à 4% m/v (Formalin®, Sigma) diluée au 1/5^{ème} dans un tampon CB 1x, enrichi en sucrose pendant une heure à température ambiante (RT). L'inclusion du sucrose aide à la préservation des structures cellulaires internes. Après élimination de la solution de fixation, les cellules sont lavées par du PBS 1x, puis l'ajout d'une solution de NH₄Cl à 100 mM permet de quencher l'activité de crosslinking du formaldéhyde. La perméabilisation est réalisée par l'ajout d'une solution de Triton X-100 0.5% pendant 5 minutes et complétée par une incubation de 20 minutes en PBS 1x / BSA 2%. L'actine F est ensuite marquée par Alexa Fluor 647 Phalloïdine (Invitrogen, dilution 1/200), l'actine G par Alexa Fluor 488 DNaseI (Invitrogen) et le noyau par Prolong Gold Antifade reagent with DAPI (Invitrogen) servant aussi de milieu de montage de la lamelle CYTOO sur lame. Les lames ainsi confectionnées sont observées au microscope à fluorescence (OLYMPUS IX-81) à l'objectif X40 et X63 huile. L'acquisition

des images fluorescentes est réalisée grâce à une camera Tri-CCD Hamamatsu et pilotée par le logiciel Cell^R (OLYMPUS). Toutes les images ont été traitées et analysées sous ImageJ.

4.5 Préparation des extraits protéiques, Western-Blot et Pull-Down

Les BMDCs sont collectées et transférées sur glace puis culotées pendant 10min à 3300rpm. Après lavage au PBS et nouvelle centrifugation, le culot obtenu est dissocié dans le tampon de lyse (TBS 50mM pH7,5, NaCl 150mM, EGTA 1mM, EDTA 1mM, NP40 1%, NaF 50mM, et inhibiteur de phosphatases et protéases). Après 10 minutes d'incubation dans la glace, les extraits sont centrifugés pendant 10min à 12000rpm et le surnageant est conservé puis stocké à -80°C. Les extraits protéiques sont dosés par la méthode de Bradford afin de déposer 15µg de protéines dans chaque puits. Les migrations sont réalisées en système Bolt mini gel tank (Invitrogen) en tampon MES SDS, gels bis-tris à gradient 4-12%. Après transfert sur membrane PVDF par le système iBlot Dry Blotting (Invitrogen), les membranes sont saturées en TBS/BSA 5% pour les phospho-protéines et TBS/lait 5% pour les protéines totales. L'anticorps primaire est incubé sur la nuit à 4°C. Les membranes sont ensuite lavées et incubées avec l'anticorps secondaire à RT pendant 1h30 puis lavées à nouveau. La révélation est effectuée à l'aide d'ECL Novex ou d'ECL Prime selon la protéine d'intérêt.

Après révélation de la phospho-protéine, les anticorps sont décrochés en tampon de stripping (Tris HCl 62,5mM pH6,8, SDS 2%, et β-mercaptoéthanol 100mM) pendant 30min au bain-marie à 52,5°C. Les membranes sont ensuite lavées 4 fois en TBS/Tween 0,1% puis saturées avant une nouvelle incubation avec l'anticorps primaire ciblant la protéine totale associée.

Pour la quantification de la forme active de RhoA, les BMDCs sont lysés en tampon (TBS 50mM pH7,5, NaCl 150mM, EGTA 1mM, EDTA 1mM, NP40 1%, NaF 50mM, et inhibiteur de phosphatases et protéases) pendant 10 minutes dans la glace. Les lysats cellulaires sont ensuite précipités avec 50 µg de billes couplées à la Rhotekine pendant 1 heure sous agitation à 4°C. Les billes sont ensuite lavées pour récupérer uniquement les formes actives de RhoA liée au GTP. Après dénaturation, les échantillons suivent le protocole standard d'électrophorèse et de western-blot.

4.6 Mesure de la concentration en AMPc et dosage de EF

Le dosage de la concentration en AMPc cyclique intracellulaire et dans le surnageant de culture ainsi que la mesure de l'activité adénylate cyclase de EF sont expliqués dans notre

article publié dans *Infection and Immunity* en 2015. La méthode utilisée pour les BMDCs est identique à celle employée pour les BMDMs [216].

4.7 Test de phagocytose

Après les périodes d'intoxication, les BMDCs sont prélevées, lavées en PBS et sont reprises dans 800 μ L de milieu de culture complet préalablement chauffé à 37°C. Deux cent μ L d'une solution d'*AlexaFluor 488 pHrodo E. coli* est ajouté aux BMDCs et l'ensemble est remis pendant 2 heures en étuve à 37°C, 5% de CO₂. Les BMDCs sont ensuite lavées à plusieurs reprises pour éliminer les particules de pHrodo résiduelles et un marquage anti-CD11c accompagné du marqueur de viabilité Live-Dead est réalisé. La figure 43 résume la stratégie du test de phagocytose.

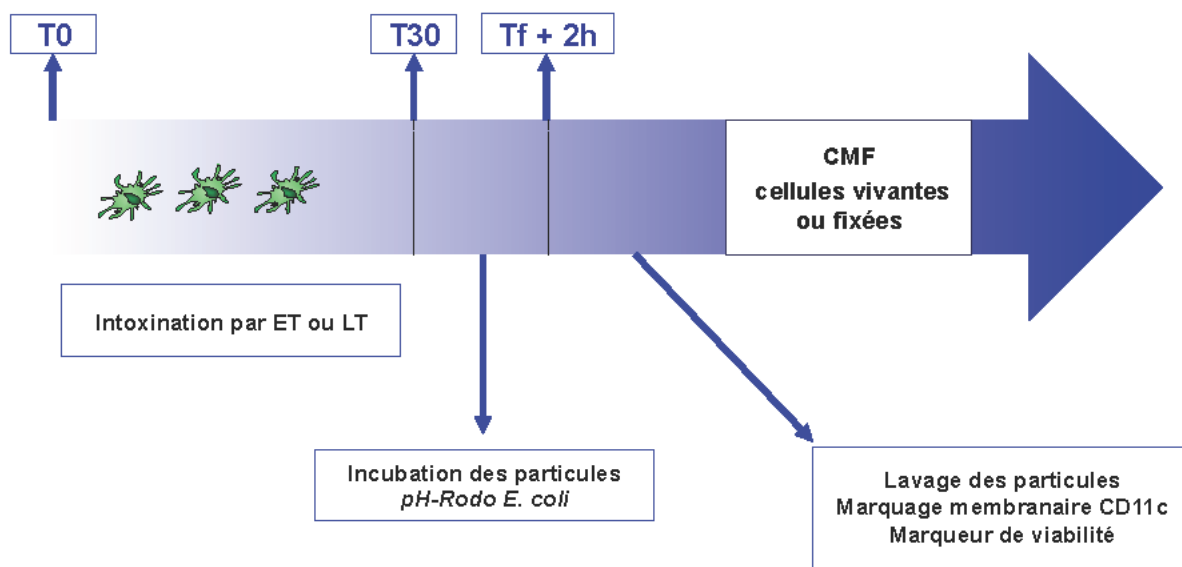


Figure 43 : Plan expérimental de l'essai de phagocytose des BMDCs en cytométrie en flux et en imagerie en flux.

4.8 Cytométrie en flux et Imagerie en flux

Les BMDCs sont collectées, lavées plusieurs fois au PBS, puis les sites aspécifiques sont bloqués par incubation 10min à 4°C en Fc Block (CD16/CD32). Après lavages, on procède au marquage par incubation des anticorps couplés aux fluorochromes choisis accompagnés d'un marqueur de viabilité de type LiveDead (Invitrogen) pendant 20 min à 4°C à l'obscurité. L'excès d'anticorps est éliminé par plusieurs lavages au PBS puis les cellules

sont fixées par ajout de PFA 4%. Si les expériences requièrent un marquage intracellulaire comme pour l'actine G/F, les BMDCs sont perméabilisées en tampon Perm/Wash (Biolegend) pendant 10 minutes puis les BMDCs sont incubées pendant 20 minutes à +4°C avec l'Alexa Fluor 488 DNaseI (Invitrogen) pour l'actine G et l'Alexa Fluor 647 Phalloïdine (Invitrogen, dilution 1/200) pour l'actine F. Les BMDCs sont ensuite lavées puis conservées en PFA 2% jusqu'au passage des échantillons. En fonction des objectifs, les échantillons sont soit analysés sur un cytomètre BD LSRII et les données retraitées grâce au logiciel FlowJo, soit analysés sur un imageur en flux ImageStream X de chez Amnis et les données retraitées grâce au logiciel IDEAS. Les stratégies d'analyse des données sont présentées comme exemple dans les figures 44 et 45.

Pour la cytométrie en flux et le test de phagocytose, après élimination des doublets, la population cellulaire est sélectionnée. L'utilisation du Hoechst 33 258 permet d'exclure les BMDCs mortes. Parmi les BMDCs viables, la population d'intérêt exprimant le CD11c est sélectionnée puis les paramètres de phagocytose sont alors sélectionnés. Pour les expériences de cytométrie en flux pour l'actine G et F, la démarche expérimentale est la même (Figure 44).

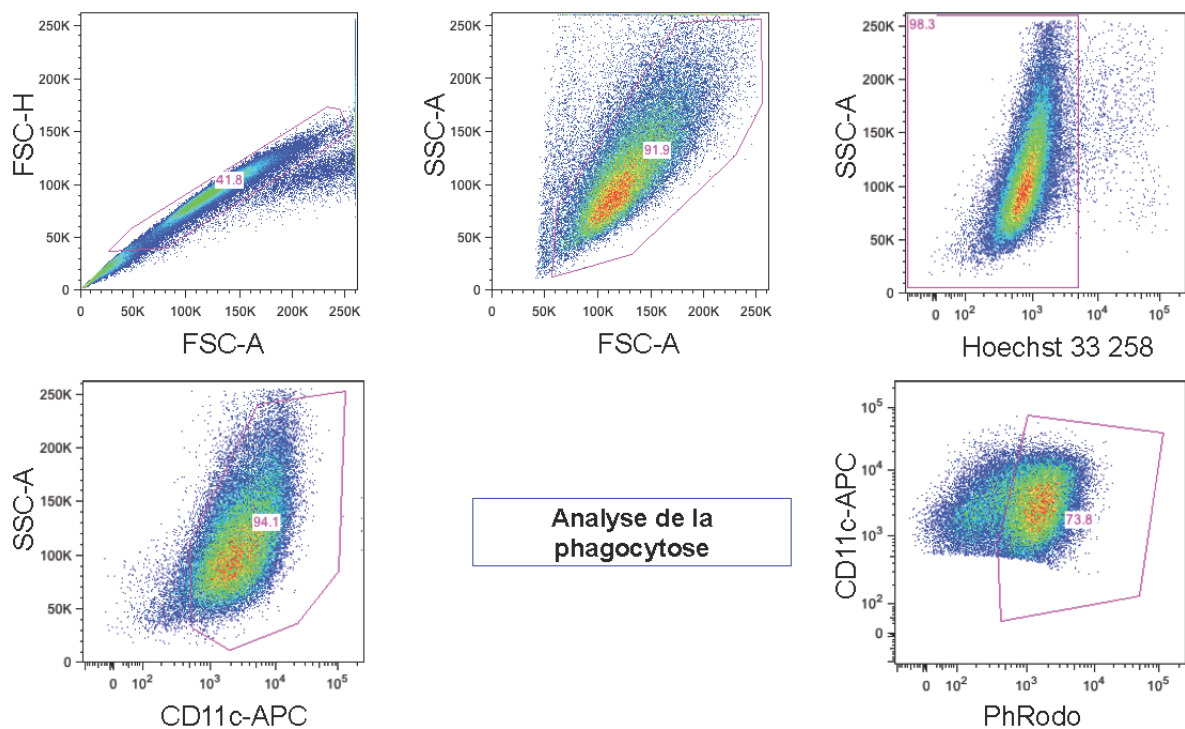


Figure 44 : Exemple de stratégie d'analyse des capacités de phagocytose des BMDCs par cytométrie en flux.

Pour l'imageur en flux qui combine l'imagerie de chaque événement avec des données de cytométrie, la première étape consiste à sélectionner les BMDCs dont les images des BMDCs sont dans le focus. Après sélection de la population cellulaire sans les agrégats, le marqueur de viabilité LiveDead (Invitrogen) permet de sélectionner les BMDCs viables. La dernière étape de pré-traitement consiste à paramétrer le logiciel pour qu'il calcule les paramètres recherchés en fonction de nos problématiques. La reproductibilité des résultats, sur un grand nombre de cellules est obtenue en appliquant le masque réalisé sur un échantillon, sur toutes les conditions à analyser (Figure 45).

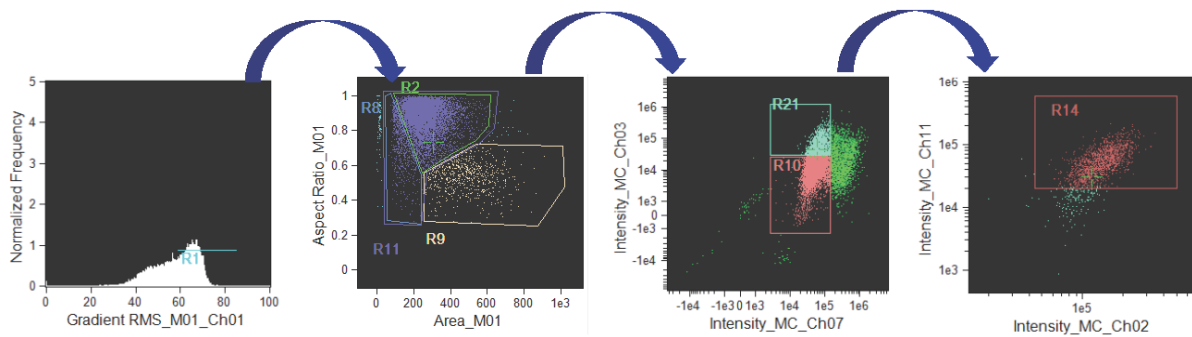


Figure 45 : Exemple de stratégie d'analyse des BMDCs par imagerie en flux.

4.9 Test de trans-migration des BMDCs

Les tests de trans-migration sont réalisés en plaques Transwell COSTAR 24 puits à inserts de $3\mu\text{m}$, en milieu RPMI 1640 / PSG / 2,5%SVF. Afin d'humidifier les inserts, ces derniers sont incubés sur la partie supérieure avec du PBS pendant 1 heure à température ambiante. Dans la partie supérieure de l'insert, sont déposées $6 \cdot 10^5$ BMDCs préalablement intoxiquées (au total, 20h en contact avec les toxines) et activées au LTA à $30\mu\text{g/ml}$ (pendant 0h, 4h, 16h ou 20h à 37°C selon les conditions expérimentales) (Figure 46). Selon les conditions, les puits de culture de l'insert contiennent 500ng/ml de chimioattractants (CCL19/CCL21, SDF1 α). La migration est réalisée pendant 4h à 37°C , puis les cellules ayant migré dans le puits sont récupérées, lavées et fixées en PFA 4%.

La numération des BMDCs s'effectue par ajout de $30\mu\text{l}$ de billes Count Bright (Invitrogen) afin de normaliser le comptage en cytométrie en flux (2000 billes sont

comptabilisées pour chaque échantillon). Les échantillons sont analysés sur un cytomètre BD LSRII et les données sont retraitées sous FlowJo.

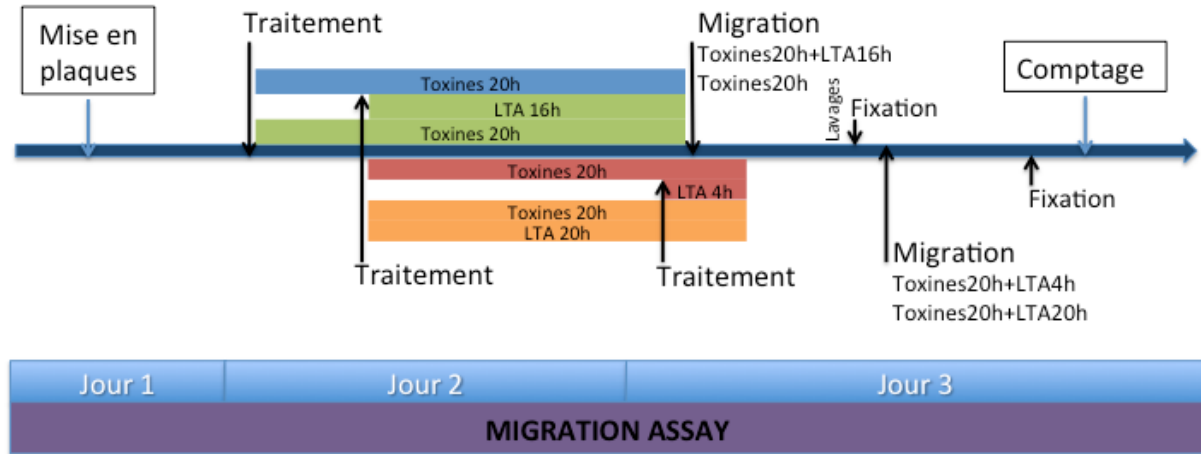


Figure 46 : Plan expérimental des essais de trans-migration des BMDCs.

4.10 Analyse statistique

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM de plusieurs expériences indépendantes. Une analyse de variance ANOVA avec un test de Bonferroni *post hoc* a été utilisée pour démontrer la significativité des résultats. ns pour non significatif, * pour $p < 0,05$, ** pour $p < 0,01$ et ***/**** pour $p < 0,001$.

5. Données complémentaires

Figure supplémentaire S1 :

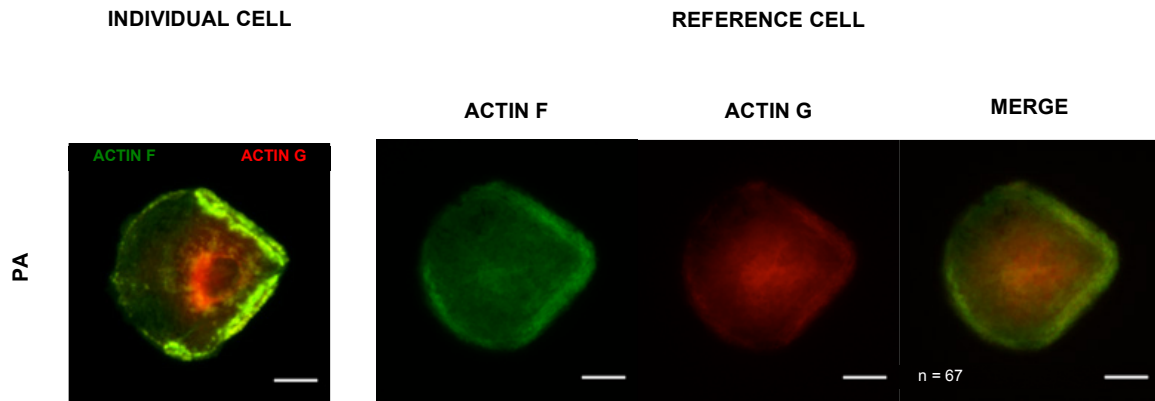
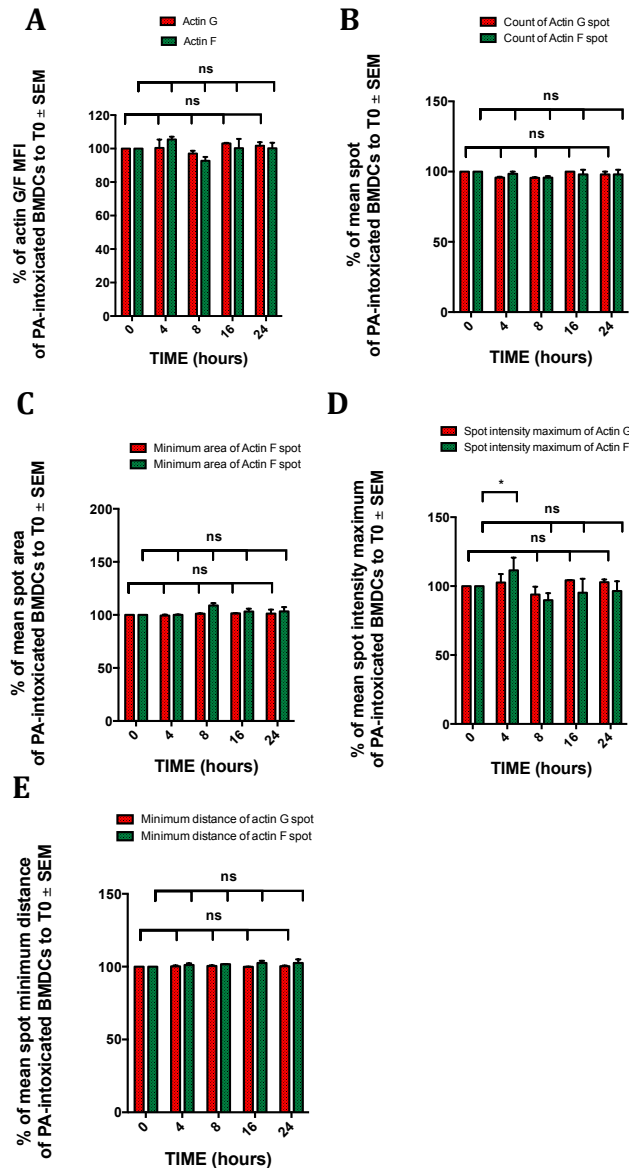


Figure 47 : PA ne modifie pas l'organisation du cytosquelette d'actine des BMDCs.

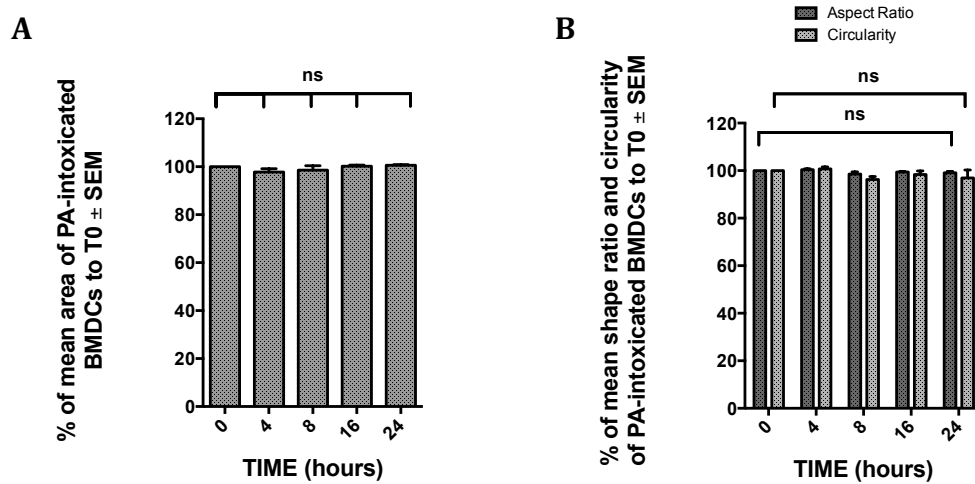
Les BMDCs CD11c⁺ ont été sélectionnées par tri cellulaire, déposées sur les *micropatterns* pour se normaliser. Les BMDCs ont ensuite été traitées par PA à 1 µg/mL pendant 16 heures avant d'être fixées et marquées : l'actine F (en vert) par l'AlexaFluor 647 Phalloïdine et l'actine G (en rouge) par l'AlexaFluor 488 DNase I. La colonne de gauche illustre une cellule la plus représentative des effets observés. Le groupement de colonnes de droite résulte du retraitement des images obtenues, selon la méthode décrite dans la référence [216]. La 2^{ème} colonne illustre les cellules de référence pour l'actine F, la 3^{ème} colonne pour l'actine G et la dernière colonne est une superposition des 2 cellules de référence. Le nombre de BMDCs utilisées pour chaque condition est mentionné sous le merge des cellules de référence.

Figure supplémentaire S2 :

**Figure 48 : PA n'apporte pas de modifications de l'actine G et de l'actine F des BMDCs.**

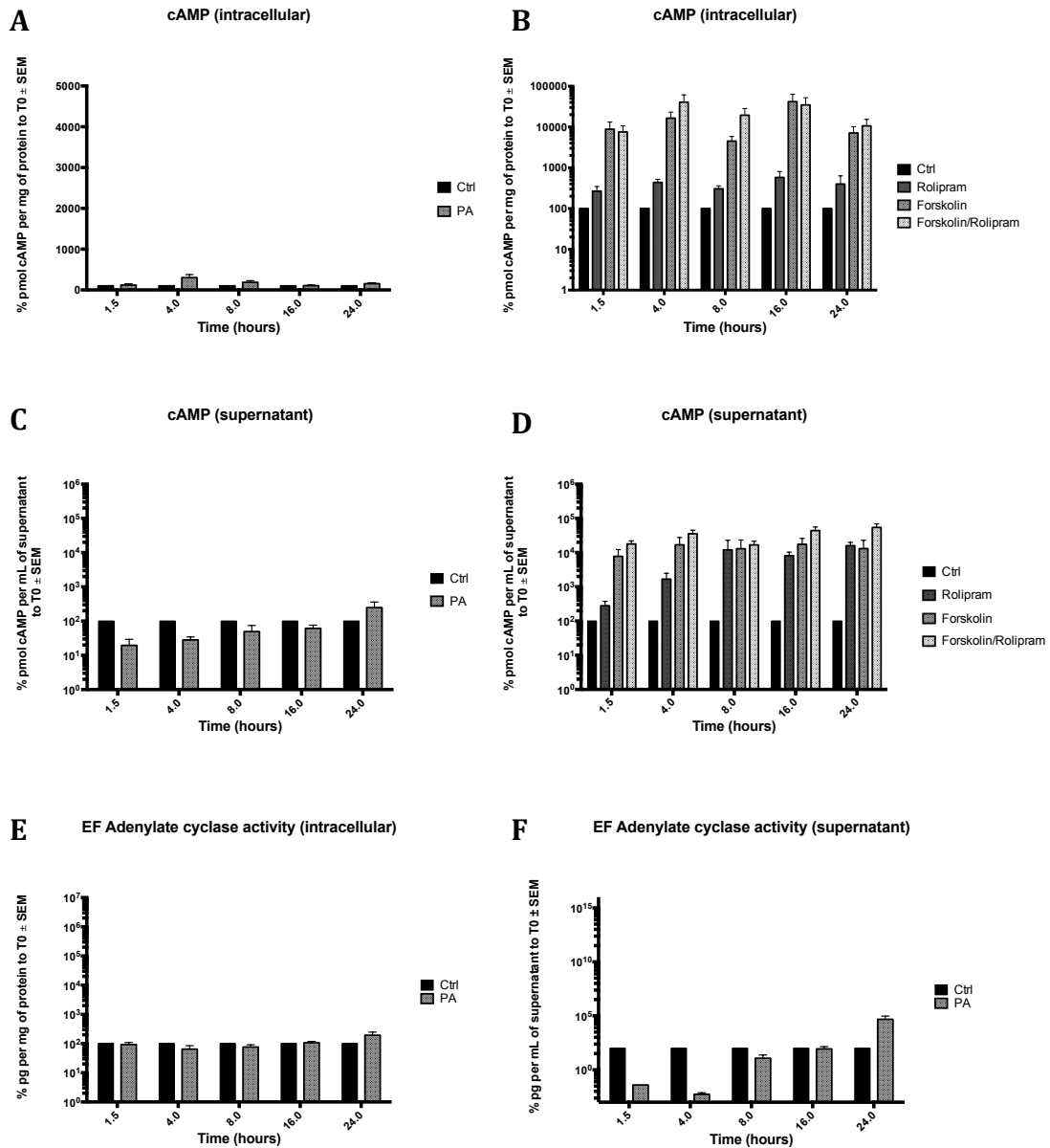
Après intoxication par PA à 1 $\mu\text{g/mL}$ à différents intervalle de temps, les BMDCs sont récupérées, marquées avec un anticorps anti-CD11c puis fixées. L'actine F est marquée par l'AlexaFluor 647 Phalloïdine (en vert) et l'actine G par l'AlexaFluor 488 DNase I (en rouge). Les BMDCs fixées sont analysées en imagerie en flux. Le retraitement et l'analyse des données ont permis de définir plusieurs paramètres à la fois pour l'actine G et l'actine F, illustrés dans les panels A à E (entre 5000 et 10000 BMDCs comptabilisées pour chaque condition et pour chaque expérience). La MFI (panel A), la moyenne du nombre de spots (panel B), la moyenne de l'aire minimale des spots (panel C), la moyenne de l'intensité maximale des spots (panel D) et la moyenne de la distance minimale entre les spots d'un même marqueur (panel E). Toutes les données représentent, pour chaque condition, la moyenne \pm SEM du paramètre des 3 expériences rapportées aux BMDCs du groupe contrôle (100 %) pour l'actine F (vert) et l'actine G (rouge). ns, non significatif et *, $p < 0,05$.

Figure supplémentaire S3 :

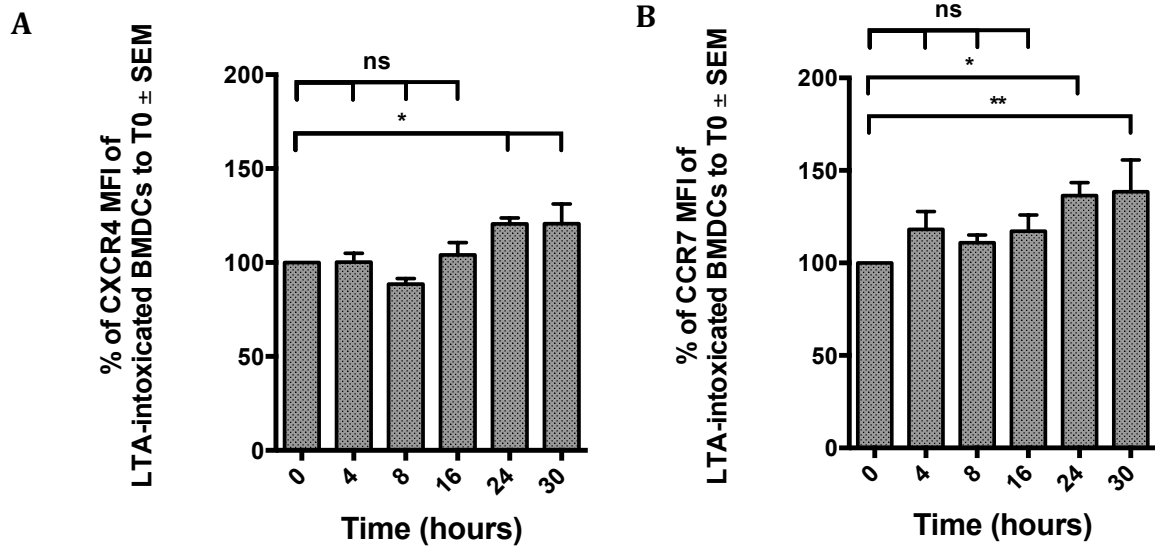
**Figure 49 : PA ne modifie pas la morphologie des BMDCs en suspension.**

Après intoxication par PA à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, les BMDCs sont récupérées puis fixées. Les BMDCs sont analysées par imagerie en flux pour les paramètres d'aire (panel A), de circularité et de *shape ratio* (panel B). Toutes les données représentent, pour chaque condition, la moyenne \pm SEM de 3 expériences d'imagerie en flux, rapportées aux BMDCs du groupe contrôle (100 %).

ns, non significatif.

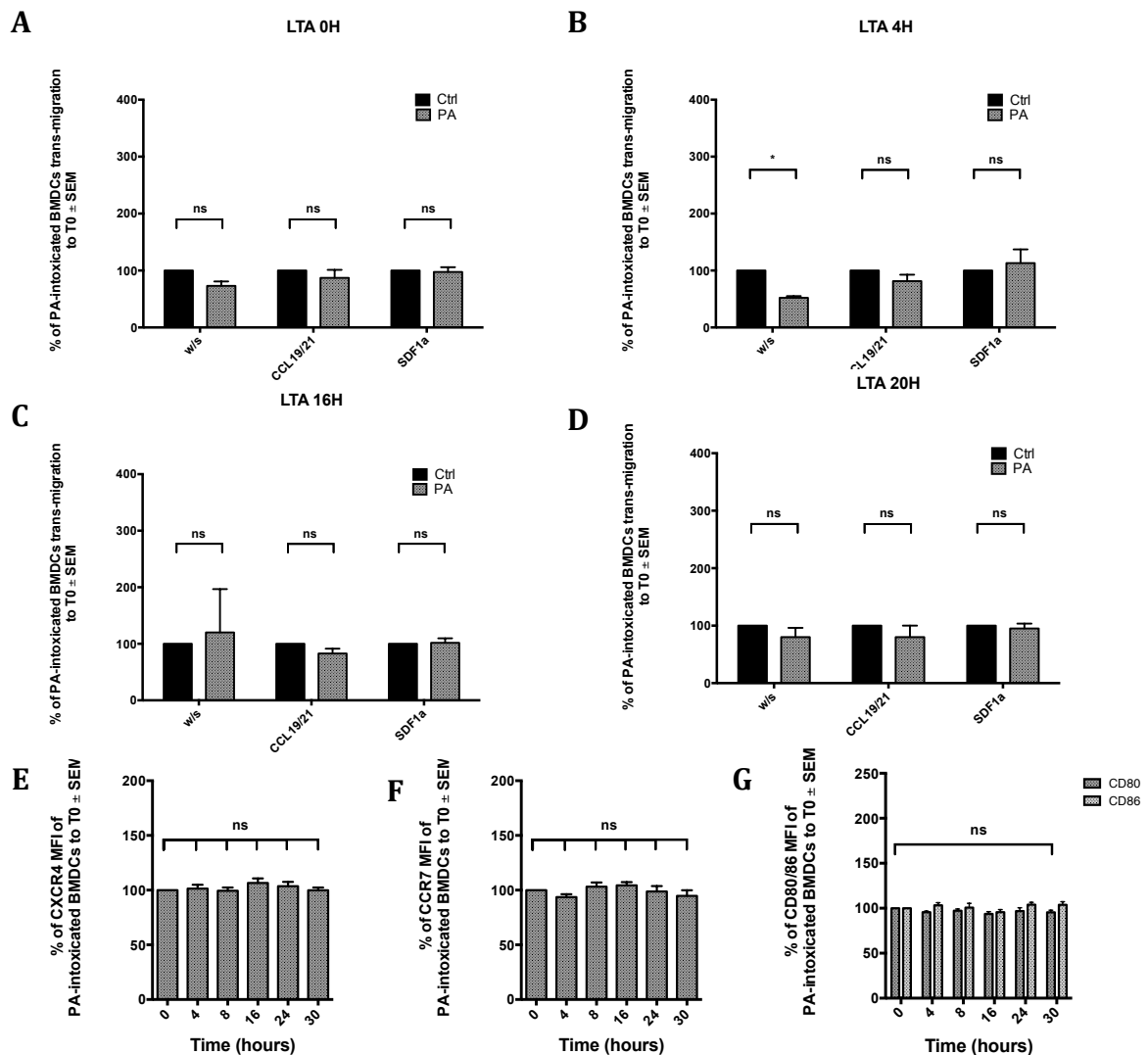
Figure supplémentaire S4 :**Figure 50 : Effets de PA et de la Forskoline sur la sécrétion d'AMPc dans les BMDCs.**

Les BMDCs ont été traitées par PA à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, du Rolipram (10 μM), de la Forskoline (contrôle positif stimulant l'AMPc, 10 μM) ou Forskoline + Rolipram. Après plusieurs temps d'incubation et lyse des BMDCs, le lysat et le surnageant de culture ont été récupérés pour mesurer la concentration en AMPc et l'activité adénylate cyclase selon la même méthode que la référence [216]. Les données exprimées en % par rapport aux BMDCs du groupe contrôle sont les plus représentatives de 4 expériences. Les panels A et B représentent la concentration en AMPc intracellulaire en pmol/mg de protéine du lysat rapportée à la concentration contrôle, alors que les panels C et D montrent la concentration en AMPc dans le surnageant en pmol/mL de surnageant. Les panels E et F illustrent l'activité adénylate cyclase dans les lysats cellulaires en pg/mg de protéines (panel E) et dans le surnageant en pg/mL (panel F).

Figure supplémentaire S5 :**Figure 51 : LTA induit l'expression des récepteurs CXCR4 et CCR7.**

Les BMDCs ont été traitées par du LTA pendant 0 à 30 heures. Les BMDCs sont alors prélevées, lavées et marquées. Pour les panels A et B représentant la MFI des marqueurs par rapport aux BMDCs du groupe contrôle, les BMDCs traitées par LTA ont été marquées pour le CXCR4 (panel A) et le CCR7 (panel B). ns, non significatif, *, $p < 0.05$ et **, $p < 0.01$.

Figure supplémentaire S6 :

**Figure 52 : PA n'a aucun effet sur la trans-migration des BMDCs, ni sur l'expression des récepteurs aux chimiokines et des marqueurs d'activation.**

Pour les panels A à D, les BMDCs intoxiquées par PA \pm LTA sont placées dans le compartiment supérieur d'un tamis cellulaire disposant de pores de 3 μ m. Après 4 heures de transmigration, les BMDCs ayant traversé le tamis cellulaire sont récupérées puis comptées en cytométrie en flux. Toutes les données représentent la moyenne \pm SEM du nombre de BMDCs ayant traversé les pores, rapportée aux BMDCs du groupe contrôle (100 %), de 3 expériences différentes. Toutes les BMDCs ont été en contact avec PA pendant 20 heures et un temps variable pour l'incubation en présence de LTA : pas de LTA pour LTA 0H (panel A), 4 heures de LTA pour LTA 4H (panel B), 16 heures pour LTA 16H (panel C) et 20 heures pour LTA 20H (panel D). Pour chaque condition d'activation des BMDCs par le LTA, le compartiment receveur des BMDCs contient ou pas des chemo-attractants : une condition sans chimiokines, une condition avec le mélange CCL19/CCL21 et une condition avec SDF-1 α . Pour les panels E à F représentant la MFI des marqueurs par rapport aux BMDCs du groupe contrôle, les BMDCs traitées par PA ont été marquées pour le CXCR4 (panel E), le CCR7 (panel F) et les marqueurs d'activation CD80/CD86 (panel G). ns, non significatif et *, $p < 0.0$

TROISIEME PARTIE : DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'une des cibles majeures des toxines de *Bacillus anthracis* sont les cellules immunitaires de premières lignes comme les macrophages, les polynucléaires neutrophiles, et les cellules dendritiques exerçant l'interface dans la mise en place de l'immunité adaptative. De son côté, le cytosquelette d'actine est un réseau de filaments, complexe et indispensable à la morphologie et aux fonctions des cellules. Néanmoins, peu d'études explorent les effets de ET et LT sur le cytosquelette des cellules dendritiques et des macrophages.

Au cours de mon travail de thèse, nous avons analysé en détail les effets des toxines de *Bacillus anthracis* sur le cytosquelette d'actine de cellules immunitaires, les BMDMs et de manière plus approfondie les BMDCs afin de mieux cerner les mécanismes mis en jeu et les conséquences de ces effets sur deux grandes fonctions immunes, la phagocytose et la migration cellulaire. Cette partie reprend les résultats majeurs de mon travail de thèse qui sont discutés aux regards des données bibliographiques. Deux figures de synthèse sont exposées à la fin de cette partie.

1. Effets spatiaux opposés de ET et LT sur l'organisation du cytosquelette d'actine des BMDMs et des BMDCs

La normalisation de cellules par *micropatterning* a permis une avancée considérable dans la compréhension des mécanismes mis en jeu par les cellules en environnement contraint et s'est amplifiée ces dernières années [197, 205-207]. A notre connaissance, peu de résultats ont été publiés sur la normalisation des BMDMs ou des BMDCs sur des formes autre que des lignes ou des rectangles. Les lignes *coatées* par des protéines de la matrice extracellulaire permettent de contrôler directement la morphologie cellulaire des macrophages et d'induire une polarisation phénotypique des macrophages dépendante de la forme et des protéines de la matrice extracellulaire [217]. Des rectangles *coatés* à la fibronectine ont également été employés pour normaliser des BMDCs afin d'obtenir une organisation interne et spatiale identique aux BMDCs migratoires dans des canaux de confinement [218]. La normalisation des BMDMs sur des motifs en forme d'arbalète [216] et des BMDCs sur des motifs en forme de goutte ou de disque creusé en son centre est une méthode innovante pour des cellules immunitaires primaires, décrites comme incapable de s'étirer sur les *micropatterns* à l'identique des cellules cancéreuses ou de lignées cellulaires.

Par la mise en place de cette méthode de normalisation des cellules immunitaires sur *micropattern* entre autre, nous avons pu déterminer que les 2 toxines de *Bacillus anthracis*,

ET et LT, agissent de manière opposée sur le réseau d'actine des BMDCs. ET conduit à une rétraction temps-dépendant des BMDCs et des BMDMs normalisés sur les *micropatterns*, par la perte des points d'ancrages alors que LT induit un étalement des BMDCs sur les *micropatterns* accompagné d'une perte d'actine F et d'une perturbation majeure de la dynamique des filaments d'actine. D'une manière surprenante, ET et LT induisent des effets différents sur des BMDCs en suspension. Alors que LT conduit dans ce cas, à une rétraction de la cellule dont le mécanisme n'a pu être mis en évidence, ET ne modifie que la morphologie des BMDCs en suspension sans altération de la taille. L'emploi de 3 techniques complémentaires, à savoir la normalisation des BMDCs en microscopie, la cytométrie en flux et l'imagerie en flux permettant de compléter les résultats des 2 premières techniques confirme l'implication des points d'ancrage des BMDCs dans le processus de rétraction cellulaire induit par ET.

ET induit des altérations du cytosquelette d'actine qui apparaissent cellules-dépendantes mais qui restent contradictoires [79]. Les macrophages intoxiqués par ET présentent une morphologie arrondie, moins étalée et accompagnée d'un contenu en actine F diminué et redistribué à la périphérie de la cellule [79, 111, 195]. Nos résultats adressent un discours cohérent avec ces données de la littérature et apportent des précisions sur les mécanismes mis en jeu par ET : la perte du contenu en actine F résulterait d'une dépolymérisation de l'actine des cellules, au moins pour les BMDCs et l'aspect arrondi et moins étalé des macrophages serait provoqué par la perte des points d'ancrage des cellules, qui seraient alors incapable d'adhérer sur les substrats ou les protéines de la matrice extracellulaire. Des études complémentaires seraient nécessaires pour caractériser la perte des points d'ancrage des BMDCs et définir l'implication éventuelle d'intégrines de surface des BMDCs.

LT, de son côté, induit des effets sur la morphologie des cellules, variables selon le type cellulaire, rendant difficile la comparaison de nos résultats avec le modèle plus étudié des cellules endothéliales. Cependant, l'étude de la littérature a montré en règle générale que les changements morphologiques et du réseau d'actine passent par la formation de fibre de stress [121, 122, 193, 219, 220], une perte de l'actine F corticale [221] et une augmentation de l'actine F au centre de la cellule uniquement sur les cellules capables d'organiser leur cytosquelette d'actine sous forme de fibre de stress. Les BMDCs ne semblent pas capables de former naturellement des fibres de stress mais nos résultats semblent coïncider en partie avec

les données de la littérature. Nous avons démontré que LT conduit à une perturbation de la dynamique de l'actine, conduisant à la formation de regroupements de filaments denses d'actine sous forme d'anneau. La formation de ces regroupements d'actine F demeure pour l'instant inexplicée mais nécessiterait d'être approfondi.

2. Effets temporels opposés de ET et LT sur l'activation des protéines de liaison à l'actine et sur la dynamique de l'actine

Nous avons démontré que LT et ET opposent leurs effets sur la morphologie et le cytosquelette d'actine des BMDCs. Mais cette opposition d'effets se retrouve également dans l'activation temporelle des protéines de liaison à l'actine. Alors qu'ET induit rapidement l'activation de la cofiline, protéine de coupure des filaments d'actine, dans les temps précoces, LT active plus tardivement la myosine phosphatase à l'origine de la déphosphorylation des myosines II, les rendant incapables d'exercer leur fonction de contractilité du cytosquelette.

Nous avons montré que l'activation de la cofiline passerait par la génération de l'AMPc intracellulaire par ET, ce qui activerait spécifiquement la voie PKA et les protéines phosphatases, responsable de l'activation de la cofiline. La voie Epac ne semblerait pas impliquée dans les mécanismes de remodelage cellulaire des BMDCs, et serait même négativement régulée par l'activation de PKA par ET. L'identification de la cofiline permet d'apporter une réponse à la divergence qu'il existe sur la voie d'activation impliquée dans les changements de morphologie cellulaire induits par ET. Plusieurs études suggèrent soit l'implication de PKA seule dans la réorganisation du réseau d'actine [94, 195, 222] avec une baisse de l'activation d'Epac [222], soit l'association de PKA et d'Epac [195]. Nos résultats vont dans la direction d'une simple activation de PKA dans les temps précoces, qui activerait la cofiline identifiée comme la protéine majeure dans ce remodelage et permettent d'établir la liaison des effets : ET - AMPc - PKA - Protéines Phosphatases - Cofiline. D'autre part, nos résultats semblent démontrer que l'activation de PKA dans les temps précoces de l'intoxication conduirait à un contrôle négatif d'Epac. Cette hypothèse ne semble pas déniée de sens puisque PKA et Epac, activés par le même second messenger, peuvent exercer des effets opposés sur la régulation de la voie PKB/Akt [223] et plusieurs études ont démontrées que PKA et Epac agissent de manière antagoniste dans les processus cellulaires (revue référence [224]).

Dans les phénomènes d'adhésion des leukocytes, l'activation de PKA inhibe l'expression en surface des intégrines et inhibe la voie RhoA responsable de l'adhésion cellulaire [225]. En outre, l'AMPc peut activer Epac qui est un facteur d'échange des GTPases (GEF) pour la petite GTPase Rap1 [224]. Cette dernière a émergé comme un régulateur majeur dans les processus d'adhésion cellules-cellules et cellules-matrice extracellulaire. L'activité biologique de Rap1 a été énormément étudiée et la surexpression de Rap1 par la voie AMPc/Epac conduit à stimuler la fonction des intégrines et à accroître l'adhésion des cellules endothéliales [224, 226, 227]. D'autre part, RapL, un effecteur de Rap1 stabilise les adhésions médiées par les intégrines et favorise les interactions entre les complexes d'intégrines et les filaments d'actine [228]. D'autre part, une étude récente a montré que l'activation d'Epac permet d'avoir un effet protecteur sur les phénomènes de rétraction cellulaire [229]. La perte d'activité d'Epac lors de l'activation de PKA pour ET pourrait conduire à une baisse de l'activité de Rap1. Cette dernière ne pourrait plus assurer ses fonctions dans les adhésions des cellules. Ainsi, tout nous laisse penser que la perte d'adhésion et des points d'ancrage des BMDCs pourraient être liés à l'inhibition transitoire de la voie Epac/Rap1 par PKA, voire la dégradation d'intégrines de surface.

De plus, nous avons démontré que ET conduit à une dépolymérisation de l'actine F, conduisant à l'augmentation tardive de la concentration de l'actine G. A la différence d'autre toxine bactérienne, ET n'est pas connue pour disposer d'une activité d'ADP-ribosylation même si les séquences en acide-aminé entre les toxines de *Clostridium* par exemple et ET sont relativement proches. Il est à noter que la souche G9241 de *Bacillus cereus* contient 2 mega-plasmides analogues des 2 plasmides de *Bacillus anthracis*. Un de ces plasmides produit une toxine, dénommée Certhrax disposant d'une activité d'ADP-ribosylation [230]. Cette partie de discussion a été abordée dans notre article publié en 2015 dans *Infection and Immunity* et ne sera pas reprise dans ce chapitre [216]. Une étude très récente a démontré que l'activation de PKA réduit la polymérisation de l'actine F [231]. Finalement, la dépolymérisation de l'actine F dans les phases tardives serait probablement une conséquence de l'activation de la voie AMPc-PKA-cofiline et du remodelage du cytosquelette d'actine et des intégrines de surface, plutôt que d'une action directe de ET sur les filaments d'actine par une activité d'ADP-ribosylation.

Parmi les toxines disposant d'une activité adénylate cyclase, ExoY de *Pseudomonas aeruginosa* n'entraîne pas d'effet sur la rétraction cellulaire et conduit même à un étalement

de la cellule [232]. Au contraire, une étude de Kamanova *et al.* a démontré que l'adénylate cyclase de *Bordetella pertussis* conduisait à une inactivation transitoire de la GTPase RhoA et de l'activation transitoire de la cofiline pour induire des réarrangements importants de l'actine, le tout étant plus prononcé à forte concentration d'adénylate cyclase [233]. Cependant, l'adénylate cyclase de *Bordetella pertussis* (CyaA) a été utilisée comme contrôle positif de génération de l'AMPc dans les BMDCs mais n'a pas montré d'activation de la cofiline sur notre modèle d'étude. La concentration semblerait jouer sur l'activation de la cofiline mais il est à noter que le profil de génération de l'AMPc par ET ou CyaA est différent. ET conduit à une sécrétion d'AMPc périnucléaire avec un gradient de concentration décroissant du noyau vers la périphérie de la cellule alors que CyaA conduit à une élévation de la concentration en AMPc plutôt membranaire, sans gradient de concentration d'AMPc [72]. Cette différence de localisation de l'AMPc générée par les 2 toxines pourrait en partie expliquer la divergence entre les 2 toxines sur l'activation de la cofiline.

Enfin, nos résultats ont démontré que LT active dans les temps tardifs la myosine phosphatase à l'origine de la déphosphorylation des myosines II. Cette activation progressive de la myosine phosphatase résulte de l'inactivation progressive de la voie RhoA-ROCK, qui serait alors incapable de phosphoryler la myosine phosphatase pour la rendre inactive. Nous avons émis l'hypothèse que la perte de l'activité contractile des myosines pourrait être responsable de l'assemblage anarchique des filaments d'actine sous forme d'anneau.

L'analyse de la littérature démontre que la voie de signalisation à l'origine de la formation des fibres de stress observées sur les cellules endothéliales et le lien avec LT ne sont pas clairement identifiés : pour certains, la formation des fibres de stress passerait par une activation de la voie RhoA-ROCK qui maintiendrait en l'état les fibres de stress formées [121], pour d'autres, sans intervention de RhoA, de ROCK ou des protéines de liaison de l'actine, comme la cofiline ou la myosine qui conserveraient le même état de phosphorylation [122, 219]. Une étude très récente de Rolando *et al.* démontre que la formation des câbles contractiles d'actine provoquée par LT dépendrait de la machinerie de l'acétylation des histones et que le rythme d'acétylation des histones permettrait de contrôler l'organisation du cytosquelette d'actine [234]. Ainsi, les modulations de l'expression des gènes par LT conduiraient directement à des réorganisations du cytosquelette d'actine des cellules endothéliales. Nos résultats ne sont pas en adéquation avec les nombreuses hypothèses formulées pour les effets de LT sur le cytosquelette d'actine mais pourraient s'expliquer par la

nature des cellules, qui comme nous avons pu le voir à plusieurs reprises ne se comportent pas de manière identiques dans la physiopathologie des toxines.

3. Effets de ET et LT sur la phagocytose et la migration des BMDCs

De manière similaire aux discussions précédentes, ET et LT conduisent à des effets opposés sur la phagocytose des BMDCs. Alors que LT inhibe clairement la phagocytose des BMDCs et altère d'autant plus la voie de maturation des phagosomes, ET semble maintenir la capacité phagocytaire des BMDCs mais perturberait la voie de maturation des phagosomes, notamment au niveau de la fusion entre les phagosomes et les lysosomes.

La phagocytose est un des mécanismes mis en jeu par les cellules de l'immunité pour éliminer les agents pathogènes mais demeure un mécanisme fondamental des BMDCs pour la dégradation et l'apprêtement des antigènes afin d'induire une réponse immunitaire spécifique. A notre connaissance, aucune donnée n'était présente pour la phagocytose après intoxication par ET et LT dans le modèle spécifique des BMDCs. Les résultats divergent quant aux effets de LT sur la phagocytose : LT inhibe la phagocytose des macrophages péritonéaux *in vivo* après une injection sous-cutanée de LT [235], sans implication de la voie MAPK chez les macrophages J774 [236] alors qu'il semblerait que les macrophages alvéolaires des primates non humains garderaient une capacité de phagocytose des spores de *Bacillus anthracis* après une intoxication par LT [237]. Cependant, il apparait clairement que LT inhibe la phagocytose des BMDCs en suivant le profil de clivage des MEKs.

Peu de données sont disponibles pour les effets de ET sur la phagocytose des cellules immunitaires et les 2 études retrouvées à notre connaissance semblent indiquer une réduction, voire une inhibition de la phagocytose chez les polynucléaire neutrophiles humains [238] et les macrophages humains [195]. Les auteurs suggèrent que l'altération du cytosquelette d'actine induite par ET ne permet pas aux cellules de remodeler l'actine de manière adéquate pour la phagocytose. Cependant, nos résultats sur ET n'aboutissent pas aux mêmes conclusions et peuvent s'expliquer par le type cellulaire. ET induit des effets majeurs sur le cytosquelette d'actine, mais ce n'est pas pour cette raison que les BMDCs perdent leur capacité de phagocytose. Ainsi, les BMDCs restent capables de phagocyter. Nos études sur ET n'ont pour l'instant pas établi le lien entre ET et le maintien de la capacité de phagocytose des BMDCs. Cependant, il semblerait que l'AMPc ait un effet inhibiteur sur la phagocytose via la voie PKA chez les monocytes [239] et les macrophages [231] mais les études sont

divergentes, peu exhaustives pour les cellules dendritiques. Les voies de signalisation utilisées dans l'inhibition de la phagocytose par l'AMPC ne sont pas clairement définies [240], même si quelques papiers démontrent que la réduction de la phagocytose FcR-dépendante passerait par l'activation de la voie Epac et non PKA [240, 241].

D'autre part, nos résultats semblent montrer que la voie de maturation des phagosomes serait perturbée par l'absence d'une acidification dans les phases terminales de ce processus. La maturation des phagosomes est un processus complexe consistant à une acidification progressive et faisant intervenir de nombreuses protéines de la famille des RAB GTPases, comme RAB5 et RAB7 [242]. Diverses protéines peuvent être délivrées à l'intérieur du phagosomes, comme les ATPases vacuolaires de type V qui acidifie le phagosome ou des protéases acides comme la cathépsine [243]. Le phagosomes peut dans son ultime étape de maturation fusionner avec les lysosomes. Il est intéressant de noter que ET affecte RAB11, une petite GTPase qui contrôle le trafic vésiculaire via l'activation de PKA et Epac/Rap1 par l'AMPC [109, 244, 245]. A notre connaissance, aucune étude n'a exploré les voies de phagocytose après une intoxication par ET. Des expériences complémentaires seraient absolument nécessaires pour mettre en évidence cette altération tardive dans le processus de maturation des phagosomes, ce qui pourrait avoir des conséquences néfastes dans le processus d'apprêtement et de présentation des antigènes par les BMDCs.

Enfin, nos résultats ont démontré que ET conduit à une trans-migration plus prononcée et induit à la fois l'expression des marqueurs d'activation CD80 et CD86 et des récepteurs aux chimiokines CXCR4 et CCR7 à la surface des BMDCs. Ces aspects ne sont présents pour LT, qui ne semblent pas modifier la trans-migration et l'expression de CCR7 et CXCR4, à l'exception d'une baisse de CD80 et CD86.

Les données de la littérature sur les effets des toxines sur la migration des cellules sont très divergents et sont fonction du type cellulaire et des conditions expérimentales. LT est capable d'inhiber la chémotaxie des polynucléaires neutrophiles par réduction de la formation de filament d'actine F [92-94]. Il en ressort le même constat chez les macrophages dans des expériences de chémotaxie en présence de chémoattractant CXCL12 et CCL19 [95] et chez des PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) [95]. ET induit une diminution de la chémotaxie des polynucléaires neutrophiles [92-94] mais augmente la vitesse de migration des macrophages dérivés de moelle osseuse (BMDMs) par activation de la voie PKA-CREB [111]. De leur côté, les cellules dendritiques traitées par ET ont une capacité accrue à envahir

un réseau de matrigel [97], probablement par activation de la voie GSK (*Glycogen Synthase kinase*) – CREB [111, 112] ou par maturation des cellules dendritiques induites par ET [97]. Nos résultats semblent en adéquation avec les quelques données de la littérature. Ainsi, il serait probable que ET augmente la migration des BMDCs de façon qualitative et quantitative par une activation des marqueurs d'activation et des récepteurs aux chimiokines. L'activation de la voie PKA et non d'Epac, discutées précédemment pour les processus de remodelage d'actine et de phagocytose laisse supposer une implication forte de PKA dans la maturation et la migration des BMDCs. En effet, l'activation de la voie PKA conduit à la maturation des cellules dendritiques humaines s'exprimant sous la forme d'une surexpression des molécules de CMH II, des molécules de co-stimulation et du marqueur de maturation CD83 [246]. Le constat semble le même pour l'expression de CCR7 et CXCR4 [239, 246] et l'augmentation de la chimotaxie des cellules dendritiques dans un gradient de chimiokines CXCL12 et CCL21 [246]. De manière surprenante, Epac n'induit aucun de ces effets et au contraire, supprimerait les effets de PKA quand les 2 voies de signalisation seraient activées en même temps. Il semble exister un *crosstalk* important entre PKA et Epac dans les cellules dendritiques. Cependant, les circonstances d'activation de l'une ou l'autre des voies ou les 2 ensemble restent floues alors que ces 2 voies sont activées par un messager commun, l'AMPc.

Ainsi, nos résultats sur les BMDCs intoxiquées par ET pourraient s'expliquer par une activation encore une fois de la voie PKA, sans activation de la voie Epac. De nombreuses expériences complémentaires permettraient de mieux caractériser les effets de ET sur la migration des BMDCs, que ce soit *in vivo* chez la souris ou *in vitro* dans des canaux de confinement 3D permettant de caractériser les paramètres de migration des BMDCs [178, 179, 218, 247].

Pour conclure, nous avons donc identifié de nouveaux mécanismes fins d'action de ET et LT sur les protéines de régulation du cytosquelette des BMDCs. Ces effets ont des répercussions importantes sur les fonctions des cellules dendritiques. Nous souhaitons inscrire les perspectives de recherche futures autour de deux effets importants qui sont des conséquences de l'atteinte de l'intégrité du cytosquelette : les mécanismes de maturation des phagosomes ainsi que la migration des BMDCs.

Il est intéressant de noter que les effets que nous décrivons permettent de mieux comprendre la physiopathologie de ET dans la maladie du charbon. En effet, la maintien de la phagocytose par ET couplé à une augmentation de la migration pourrait conduire à une dissémination importante de l'agent pathogène, notamment dans les ganglions et par conséquent dans la totalité de l'hôte. Des travaux de l'équipe de Pierre Goossens ont montré que ET est un facteur de virulence important dans la diffusion du pathogène *in vivo* [104]. Les effets observés au niveau du cytosquelette pourraient expliquer en partie les observations obtenues à l'échelle de l'animal par cette équipe et nos résultats rentrent dans une certaine cohérence de la physiopathologie de l'infection.

Ils relanceraient ainsi le modèle du rôle de la cellule dendritique comme « cheval de Troie » de l'infection qui avait été proposé [22] mais qui avait été discuté avec le modèle concurrent du *Jailbreak* [26]. Si le modèle de la cellule dendritique « cheval de Troie » se confirme, le moteur de ce « cheval » serait le cytosquelette qui serait détourné par ET.

D'autre part, aucune donnée n'est disponible sur les effets de ET sur l'apprêtement des antigènes par les BMDCs, mais cet aspect gagnerait à être étudié plus en profondeur, car l'activation de la maturation associé à une dérégulation de la présentation pourrait être un mécanisme d'évasion immunitaire supplémentaire par induction d'une anergie des lymphocytes T.

Enfin, notre groupe avait montré que les toxines agissent en synergie pour contrer les défenses immunitaires de l'hôte [89]. Nos résultats ont montrés que LT et ET, individuellement, induisent des effets opposés sur le cytosquelette d'actine et les grandes fonctions immunes, une des questions qui se pose désormais est de savoir ce qui se passe quand les deux toxines sont présentes. La perspective d'explorer le comportement de ces 2 toxines simultanément apporterait une avancée majeure dans la compréhension des conséquences physiopathologiques des toxines de *Bacillus anthracis*. Cette question est complexe, car nous venons de montrer que les deux toxines ciblent deux familles de protéines régulatrices différentes. Une question connexe est de savoir à quelle quantité de ET et LT sont physiologiquement exposées les cellules dendritiques au cours d'une infection. Des travaux en cours de publication de l'équipe de Pierre Goossens en utilisant des techniques ultrasensibles montrent que le ratio LT/ET varie considérablement au cours d'une infection avec des variations en fonction des tissus infectés (Rougeaux et *al.* Manuscrit soumis).

Ces travaux devront éclairer les futures analyses qui devront être menées en prenant en compte l'ensemble de ces critères.

Les conséquences d'une altération de la régulation du cytosquelette ont donc des conséquences très nombreuses sur la physiologie des cellules immunitaires. La compréhension de ces mécanismes est importante pour appréhender le rôle des toxines dans le modèle d'infection par *Bacillus anthracis*.

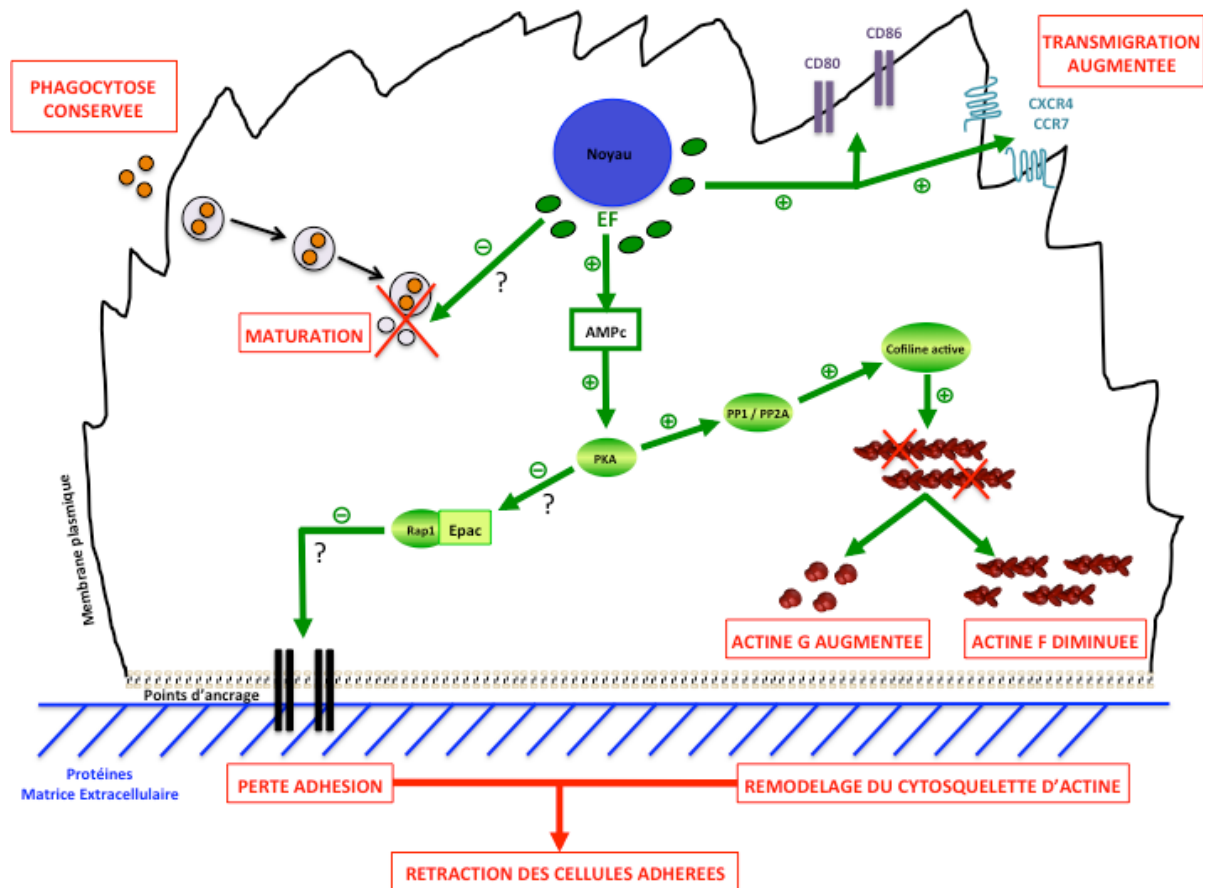


Figure 53 : Synthèse des effets de ET sur le cytosquelette d'actine et les fonctions de phagocytose et de trans-migration des BMDCs.

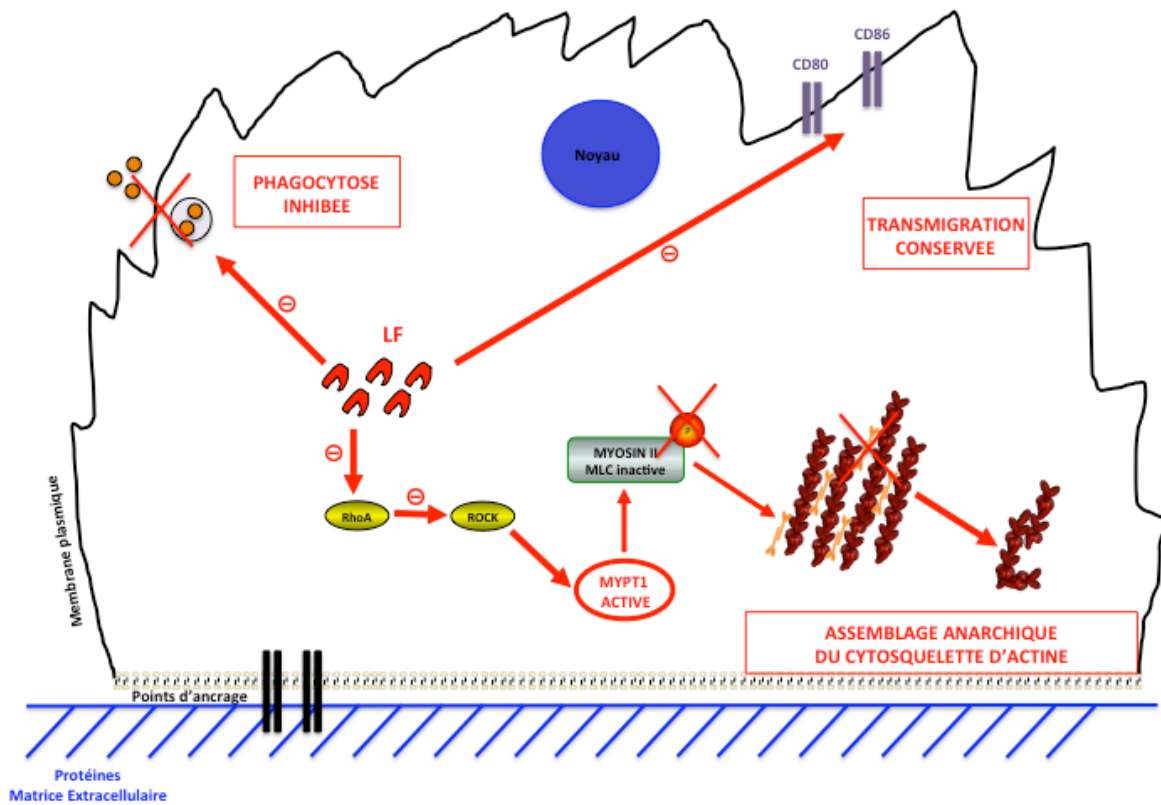


Figure 54 : Synthèse des effets de LT sur le cytosquelette d'actine et les fonctions de phagocytose et de trans-migration des BMDCs.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Schwartz, M., *Dr. Jekyll and Mr. Hyde: a short history of anthrax*. Mol Aspects Med, 2009. **30**(6): p. 347-55.
2. Wilkening, D.A., *Sverdlovsk revisited: modeling human inhalation anthrax*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(20): p. 7589-94.
3. Jernigan, D.B., et al., *Investigation of bioterrorism-related anthrax, United States, 2001: epidemiologic findings*. Emerg Infect Dis, 2002. **8**(10): p. 1019-28.
4. Pilo, P. and J. Frey, *Bacillus anthracis: molecular taxonomy, population genetics, phylogeny and patho-evolution*. Infect Genet Evol, 2011. **11**(6): p. 1218-24.
5. Fouet, A., *The surface of Bacillus anthracis*. Mol Aspects Med, 2009. **30**(6): p. 374-85.
6. Mesnage, S., et al., *The capsule and S-layer: two independent and yet compatible macromolecular structures in Bacillus anthracis*. J Bacteriol, 1998. **180**(1): p. 52-8.
7. Hugh-Jones, M. and J. Blackburn, *The ecology of Bacillus anthracis*. Mol Aspects Med, 2009. **30**(6): p. 356-67.
8. Driks, A., *The Bacillus anthracis spore*. Mol Aspects Med, 2009. **30**(6): p. 368-73.
9. Giorno, R., et al., *Morphogenesis of the Bacillus anthracis spore*. J Bacteriol, 2007. **189**(3): p. 691-705.
10. Liu, H., et al., *Formation and composition of the Bacillus anthracis endospore*. J Bacteriol, 2004. **186**(1): p. 164-78.
11. Fouet, A. and M. Mock, *Differential influence of the two Bacillus anthracis plasmids on regulation of virulence gene expression*. Infect Immun, 1996. **64**(12): p. 4928-32.
12. Goossens, P.L., *Animal models of human anthrax: the Quest for the Holy Grail*. Mol Aspects Med, 2009. **30**(6): p. 467-80.
13. Hicks, C.W., et al., *An overview of anthrax infection including the recently identified form of disease in injection drug users*. Intensive Care Med, 2012. **38**(7): p. 1092-104.
14. Friedlander, A.M., *Diagnosis and treatment of cutaneous anthrax*. JAMA, 2002. **288**(1): p. 43-4; author reply 44.
15. Owen, J.L., T. Yang, and M. Mohamadzadeh, *New insights into gastrointestinal anthrax infection*. Trends Mol Med, 2015. **21**(3): p. 154-63.
16. Lyons, C.R., et al., *Murine model of pulmonary anthrax: kinetics of dissemination, histopathology, and mouse strain susceptibility*. Infect Immun, 2004. **72**(8): p. 4801-9.
17. Daya, M. and Y. Nakamura, *Pulmonary disease from biological agents: anthrax, plague, Q fever, and tularemia*. Crit Care Clin, 2005. **21**(4): p. 747-63, vii.
18. Cote, C.K., S.L. Welkos, and J. Bozue, *Key aspects of the molecular and cellular basis of inhalational anthrax*. Microbes Infect, 2011. **13**(14-15): p. 1146-55.
19. Berger, T., M. Kassirer, and A.A. Aran, *Injectational anthrax - new presentation of an old disease*. Euro Surveill, 2014. **19**(32).
20. Guidi-Rontani, C., et al., *Germination of Bacillus anthracis spores within alveolar macrophages*. Mol Microbiol, 1999. **31**(1): p. 9-17.
21. Guidi-Rontani, C., *The alveolar macrophage: the Trojan horse of Bacillus anthracis*. Trends Microbiol, 2002. **10**(9): p. 405-9.
22. Cleret, A., et al., *Lung dendritic cells rapidly mediate anthrax spore entry through the pulmonary route*. J Immunol, 2007. **178**(12): p. 7994-8001.
23. Cleret, A., et al., *Resident CD11c+ lung cells are impaired by anthrax toxins after spore infection*. J Infect Dis, 2006. **194**(1): p. 86-94.
24. Corre, J.P., et al., *In vivo germination of Bacillus anthracis spores during murine cutaneous infection*. J Infect Dis, 2013. **207**(3): p. 450-7.

25. Okugawa, S., et al., *Lipoprotein biosynthesis by prolipoprotein diacylglyceryl transferase is required for efficient spore germination and full virulence of Bacillus anthracis*. Mol Microbiol, 2012. **83**(1): p. 96-109.
26. Weiner, Z.P. and I.J. Glomski, *Updating perspectives on the initiation of Bacillus anthracis growth and dissemination through its host*. Infect Immun, 2012. **80**(5): p. 1626-33.
27. Petosa, C., et al., *Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen*. Nature, 1997. **385**(6619): p. 833-8.
28. Milne, J.C., et al., *Anthrax protective antigen forms oligomers during intoxication of mammalian cells*. J Biol Chem, 1994. **269**(32): p. 20607-12.
29. Kintzer, A.F., et al., *The protective antigen component of anthrax toxin forms functional octameric complexes*. J Mol Biol, 2009. **392**(3): p. 614-29.
30. Kintzer, A.F., et al., *Anthrax toxin receptor drives protective antigen oligomerization and stabilizes the heptameric and octameric oligomer by a similar mechanism*. PLoS One, 2010. **5**(11): p. e13888.
31. Mogridge, J., M. Mourez, and R.J. Collier, *Involvement of domain 3 in oligomerization by the protective antigen moiety of anthrax toxin*. J Bacteriol, 2001. **183**(6): p. 2111-6.
32. Santelli, E., et al., *Crystal structure of a complex between anthrax toxin and its host cell receptor*. Nature, 2004. **430**(7002): p. 905-8.
33. Liddington, R., et al., *Crystallographic studies of the anthrax lethal toxin*. J Appl Microbiol, 1999. **87**(2): p. 282.
34. Pannifer, A.D., et al., *Crystal structure of the anthrax lethal factor*. Nature, 2001. **414**(6860): p. 229-33.
35. Liang, X., et al., *Involvement of domain II in toxicity of anthrax lethal factor*. J Biol Chem, 2004. **279**(50): p. 52473-8.
36. Klimpel, K.R., N. Arora, and S.H. Leppla, *Anthrax toxin lethal factor contains a zinc metalloprotease consensus sequence which is required for lethal toxin activity*. Mol Microbiol, 1994. **13**(6): p. 1093-100.
37. Duesbery, N.S., et al., *Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor*. Science, 1998. **280**(5364): p. 734-7.
38. Duesbery, N.S. and G.F. Vande Woude, *Anthrax lethal factor causes proteolytic inactivation of mitogen-activated protein kinase kinase*. J Appl Microbiol, 1999. **87**(2): p. 289-93.
39. Chopra, A.P., et al., *Anthrax lethal factor proteolysis and inactivation of MAPK kinase*. J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 9402-6.
40. Vitale, G., et al., *Anthrax lethal factor cleaves the N-terminus of MAPKKS and induces tyrosine/threonine phosphorylation of MAPKS in cultured macrophages*. J Appl Microbiol, 1999. **87**(2): p. 288.
41. Levinsohn, J.L., et al., *Anthrax lethal factor cleavage of Nlrp1 is required for activation of the inflammasome*. PLoS Pathog, 2012. **8**(3): p. e1002638.
42. Hellmich, K.A., et al., *Anthrax lethal factor cleaves mouse nlrp1b in both toxin-sensitive and toxin-resistant macrophages*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e49741.
43. Drum, C.L., et al., *Structural basis for the activation of anthrax adenyl cyclase exotoxin by calmodulin*. Nature, 2002. **415**(6870): p. 396-402.
44. Turk, B.E., *Manipulation of host signalling pathways by anthrax toxins*. Biochem J, 2007. **402**(3): p. 405-17.
45. Leppla, S.H., *Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentrations of eukaryotic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(10): p. 3162-6.

46. Leppla, S.H., *Bacillus anthracis calmodulin-dependent adenylate cyclase: chemical and enzymatic properties and interactions with eucaryotic cells*. Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res, 1984. **17**: p. 189-98.
47. Gottle, M., et al., *Cytidylyl and uridylyl cyclase activity of bacillus anthracis edema factor and Bordetella pertussis CyaA*. Biochemistry, 2010. **49**(26): p. 5494-503.
48. Gottle, M., S. Dove, and R. Seifert, *Bacillus anthracis edema factor substrate specificity: evidence for new modes of action*. Toxins (Basel), 2012. **4**(7): p. 505-35.
49. Bradley, K.A., et al., *Identification of the cellular receptor for anthrax toxin*. Nature, 2001. **414**(6860): p. 225-9.
50. Bradley, K.A. and J.A. Young, *Anthrax toxin receptor proteins*. Biochem Pharmacol, 2003. **65**(3): p. 309-14.
51. Scobie, H.M., et al., *Human capillary morphogenesis protein 2 functions as an anthrax toxin receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(9): p. 5170-4.
52. Cryan, L.M. and M.S. Rogers, *Targeting the anthrax receptors, TEM-8 and CMG-2, for anti-angiogenic therapy*. Front Biosci (Landmark Ed), 2011. **16**: p. 1574-88.
53. Garlick, K.M. and J. Mogridge, *Direct interaction between anthrax toxin receptor 1 and the actin cytoskeleton*. Biochemistry, 2009. **48**(44): p. 10577-81.
54. Go, M.Y., E.M. Chow, and J. Mogridge, *The cytoplasmic domain of anthrax toxin receptor 1 affects binding of the protective antigen*. Infect Immun, 2009. **77**(1): p. 52-9.
55. Collier, R.J., *Membrane translocation by anthrax toxin*. Mol Aspects Med, 2009. **30**(6): p. 413-22.
56. Liu, S., et al., *Capillary morphogenesis protein-2 is the major receptor mediating lethality of anthrax toxin in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(30): p. 12424-9.
57. Liu, S., et al., *The receptors that mediate the direct lethality of anthrax toxin*. Toxins (Basel), 2013. **5**(1): p. 1-8.
58. Martchenko, M., S.Y. Jeong, and S.N. Cohen, *Heterodimeric integrin complexes containing beta1-integrin promote internalization and lethality of anthrax toxin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(35): p. 15583-8.
59. Wei, W., et al., *The LDL receptor-related protein LRP6 mediates internalization and lethality of anthrax toxin*. Cell, 2006. **124**(6): p. 1141-54.
60. Young, J.J., et al., *LRP5 and LRP6 are not required for protective antigen-mediated internalization or lethality of anthrax lethal toxin*. PLoS Pathog, 2007. **3**(3): p. e27.
61. Ryan, P.L. and J.A. Young, *Evidence against a human cell-specific role for LRP6 in anthrax toxin entry*. PLoS One, 2008. **3**(3): p. e1817.
62. Abrami, L., et al., *Functional interactions between anthrax toxin receptors and the WNT signalling protein LRP6*. Cell Microbiol, 2008. **10**(12): p. 2509-19.
63. Liu, S., M. Moayeri, and S.H. Leppla, *Anthrax lethal and edema toxins in anthrax pathogenesis*. Trends Microbiol, 2014. **22**(6): p. 317-25.
64. Lacy, D.B., et al., *Structure of heptameric protective antigen bound to an anthrax toxin receptor: a role for receptor in pH-dependent pore formation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(36): p. 13147-51.
65. Abrami, L., et al., *Anthrax toxin triggers endocytosis of its receptor via a lipid raft-mediated clathrin-dependent process*. J Cell Biol, 2003. **160**(3): p. 321-8.
66. Deuquet, J., et al., *The dark sides of capillary morphogenesis gene 2*. EMBO J, 2012. **31**(1): p. 3-13.
67. Jiang, J., et al., *Atomic structure of anthrax protective antigen pore elucidates toxin translocation*. Nature, 2015. **521**(7553): p. 545-9.

68. Abrami, L., S.H. Leppla, and F.G. van der Goot, *Receptor palmitoylation and ubiquitination regulate anthrax toxin endocytosis*. J Cell Biol, 2006. **172**(2): p. 309-20.
69. Abrami, L., et al., *Endocytosis of the anthrax toxin is mediated by clathrin, actin and unconventional adaptors*. PLoS Pathog, 2010. **6**(3): p. e1000792.
70. Abrami, L., et al., *Membrane insertion of anthrax protective antigen and cytoplasmic delivery of lethal factor occur at different stages of the endocytic pathway*. J Cell Biol, 2004. **166**(5): p. 645-51.
71. Dal Molin, F., et al., *Cell entry and cAMP imaging of anthrax edema toxin*. EMBO J, 2006. **25**(22): p. 5405-13.
72. Dal Molin, F., et al., *cAMP imaging of cells treated with pertussis toxin, cholera toxin, and anthrax edema toxin*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **376**(2): p. 429-33.
73. Lowe, D.E. and I.J. Glomski, *Cellular and physiological effects of anthrax exotoxin and its relevance to disease*. Front Cell Infect Microbiol, 2012. **2**: p. 76.
74. Brojatsch, J., A. Casadevall, and D.L. Goldman, *Molecular determinants for a cardiovascular collapse in anthrax*. Front Biosci (Elite Ed), 2014. **6**: p. 139-47.
75. Guichard, A., V. Nizet, and E. Bier, *New insights into the biological effects of anthrax toxins: linking cellular to organismal responses*. Microbes Infect, 2012. **14**(2): p. 97-118.
76. Moayeri, M., et al., *Anthrax Pathogenesis*. Annu Rev Microbiol, 2015.
77. Moayeri, M., I. Sastalla, and S.H. Leppla, *Anthrax and the inflammasome*. Microbes Infect, 2012. **14**(5): p. 392-400.
78. Moayeri, M. and S.H. Leppla, *Cellular and systemic effects of anthrax lethal toxin and edema toxin*. Mol Aspects Med, 2009. **30**(6): p. 439-55.
79. Trescos, Y. and J.N. Tournier, *Cytoskeleton as an emerging target of anthrax toxins*. Toxins (Basel), 2012. **4**(2): p. 83-97.
80. Tournier, J.N., et al., *Anthrax toxins: a weapon to systematically dismantle the host immune defenses*. Mol Aspects Med, 2009. **30**(6): p. 456-66.
81. Newman, Z.L., et al., *Anthrax lethal toxin activates the inflammasome in sensitive rat macrophages*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **398**(4): p. 785-9.
82. Moayeri, M., et al., *Inflammasome sensor Nlrp1b-dependent resistance to anthrax is mediated by caspase-1, IL-1 signaling and neutrophil recruitment*. PLoS Pathog, 2010. **6**(12): p. e1001222.
83. Moayeri, M., et al., *Mouse susceptibility to anthrax lethal toxin is influenced by genetic factors in addition to those controlling macrophage sensitivity*. Infect Immun, 2004. **72**(8): p. 4439-47.
84. Ali, S.R., et al., *Anthrax toxin induces macrophage death by p38 MAPK inhibition but leads to inflammasome activation via ATP leakage*. Immunity, 2011. **35**(1): p. 34-44.
85. Alileche, A., et al., *Anthrax lethal toxin-mediated killing of human and murine dendritic cells impairs the adaptive immune response*. PLoS Pathog, 2005. **1**(2): p. e19.
86. Reig, N., et al., *Maturation modulates caspase-1-independent responses of dendritic cells to Anthrax lethal toxin*. Cell Microbiol, 2008. **10**(5): p. 1190-207.
87. Agrawal, A., et al., *Impairment of dendritic cells and adaptive immunity by anthrax lethal toxin*. Nature, 2003. **424**(6946): p. 329-34.
88. Brittingham, K.C., et al., *Dendritic cells endocytose Bacillus anthracis spores: implications for anthrax pathogenesis*. J Immunol, 2005. **174**(9): p. 5545-52.
89. Tournier, J.N., et al., *Anthrax edema toxin cooperates with lethal toxin to impair cytokine secretion during infection of dendritic cells*. J Immunol, 2005. **174**(8): p. 4934-41.

90. Cleret-Buhot, A., et al., *Both lethal and edema toxins of Bacillus anthracis disrupt the human dendritic cell chemokine network*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e43266.
91. Klezovich-Benard, M., et al., *Mechanisms of NK cell-macrophage Bacillus anthracis crosstalk: a balance between stimulation by spores and differential disruption by toxins*. PLoS Pathog, 2012. **8**(1): p. e1002481.
92. During, R.L., et al., *Anthrax lethal toxin paralyzes neutrophil actin-based motility*. J Infect Dis, 2005. **192**(5): p. 837-45.
93. During, R.L., et al., *Anthrax lethal toxin paralyzes actin-based motility by blocking Hsp27 phosphorylation*. EMBO J, 2007. **26**(9): p. 2240-50.
94. Szarowicz, S.E., et al., *Bacillus anthracis edema toxin impairs neutrophil actin-based motility*. Infect Immun, 2009. **77**(6): p. 2455-64.
95. Rossi Paccani, S., et al., *The adenylate cyclase toxins of Bacillus anthracis and Bordetella pertussis promote Th2 cell development by shaping T cell antigen receptor signaling*. PLoS Pathog, 2009. **5**(3): p. e1000325.
96. Rossi Paccani, S., et al., *Anthrax toxins inhibit immune cell chemotaxis by perturbing chemokine receptor signalling*. Cell Microbiol, 2007. **9**(4): p. 924-9.
97. Maldonado-Arocho, F.J. and K.A. Bradley, *Anthrax edema toxin induces maturation of dendritic cells and enhances chemotaxis towards macrophage inflammatory protein 3beta*. Infect Immun, 2009. **77**(5): p. 2036-42.
98. Crawford, M.A., et al., *Bacillus anthracis toxins inhibit human neutrophil NADPH oxidase activity*. J Immunol, 2006. **176**(12): p. 7557-65.
99. Xu, L., H. Fang, and D.M. Frucht, *Anthrax lethal toxin increases superoxide production in murine neutrophils via differential effects on MAPK signaling pathways*. J Immunol, 2008. **180**(6): p. 4139-47.
100. Firoved, A.M., et al., *Bacillus anthracis edema toxin causes extensive tissue lesions and rapid lethality in mice*. Am J Pathol, 2005. **167**(5): p. 1309-20.
101. Liu, S., et al., *Key tissue targets responsible for anthrax-toxin-induced lethality*. Nature, 2013. **501**(7465): p. 63-8.
102. Hutt, J.A., et al., *Lethal factor, but not edema factor, is required to cause fatal anthrax in cynomolgus macaques after pulmonary spore challenge*. Am J Pathol, 2014. **184**(12): p. 3205-16.
103. Lovchik, J.A., et al., *Expression of either lethal toxin or edema toxin by Bacillus anthracis is sufficient for virulence in a rabbit model of inhalational anthrax*. Infect Immun, 2012. **80**(7): p. 2414-25.
104. Dumetz, F., et al., *Noninvasive imaging technologies reveal edema toxin as a key virulence factor in anthrax*. Am J Pathol, 2011. **178**(6): p. 2523-35.
105. Molin, F.D., et al., *Ratio of lethal and edema factors in rabbit systemic anthrax*. Toxicon, 2008. **52**(7): p. 824-8.
106. Mabry, R., et al., *Detection of anthrax toxin in the serum of animals infected with Bacillus anthracis by using engineered immunoassays*. Clin Vaccine Immunol, 2006. **13**(6): p. 671-7.
107. Kirschner, L.S., et al., *Mouse models of altered protein kinase A signaling*. Endocr Relat Cancer, 2009. **16**(3): p. 773-93.
108. Yan, J., et al., *Enhanced leptin sensitivity, reduced adiposity, and improved glucose homeostasis in mice lacking exchange protein directly activated by cyclic AMP isoform 1*. Mol Cell Biol, 2013. **33**(5): p. 918-26.
109. Guichard, A., et al., *Anthrax toxins cooperatively inhibit endocytic recycling by the Rab11/Sec15 exocyst*. Nature, 2010. **467**(7317): p. 854-8.
110. Maldonado-Arocho, F.J., et al., *Anthrax oedema toxin induces anthrax toxin receptor expression in monocyte-derived cells*. Mol Microbiol, 2006. **61**(2): p. 324-37.

111. Kim, C., et al., *Antiinflammatory cAMP signaling and cell migration genes co-opted by the anthrax bacillus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(16): p. 6150-5.
112. Larabee, J.L., et al., *Glycogen synthase kinase 3 activation is important for anthrax edema toxin-induced dendritic cell maturation and anthrax toxin receptor 2 expression in macrophages*. Infect Immun, 2011. **79**(8): p. 3302-8.
113. Raymond, B., et al., *Edema toxin impairs anthracidal phospholipase A2 expression by alveolar macrophages*. PLoS Pathog, 2007. **3**(12): p. e187.
114. Wade, B.H., et al., *Anthrax toxin components stimulate chemotaxis of human polymorphonuclear neutrophils*. Proc Soc Exp Biol Med, 1985. **179**(2): p. 159-62.
115. Tessier, J., et al., *Contributions of histamine, prostanoids, and neurokinins to edema elicited by edema toxin from Bacillus anthracis*. Infect Immun, 2007. **75**(4): p. 1895-903.
116. Liu, S., et al., *Anthrax toxin targeting of myeloid cells through the CMG2 receptor is essential for establishment of Bacillus anthracis infections in mice*. Cell Host Microbe, 2010. **8**(5): p. 455-62.
117. Kandadi, M.R., et al., *Anthrax lethal toxin suppresses murine cardiomyocyte contractile function and intracellular Ca²⁺ handling via a NADPH oxidase-dependent mechanism*. PLoS One, 2010. **5**(10): p. e13335.
118. Moayeri, M., et al., *The heart is an early target of anthrax lethal toxin in mice: a protective role for neuronal nitric oxide synthase (nNOS)*. PLoS Pathog, 2009. **5**(5): p. e1000456.
119. Moayeri, M., et al., *Bacillus anthracis lethal toxin induces TNF-alpha-independent hypoxia-mediated toxicity in mice*. J Clin Invest, 2003. **112**(5): p. 670-82.
120. D'Agnillo, F., et al., *Anthrax lethal toxin downregulates claudin-5 expression in human endothelial tight junctions*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e62576.
121. Warfel, J.M. and F. D'Agnillo, *Anthrax lethal toxin-mediated disruption of endothelial VE-cadherin is attenuated by inhibition of the Rho-associated kinase pathway*. Toxins (Basel), 2011. **3**(10): p. 1278-93.
122. Rolando, M., et al., *Transcriptome dysregulation by anthrax lethal toxin plays a key role in induction of human endothelial cell cytotoxicity*. Cell Microbiol, 2010. **12**(7): p. 891-905.
123. Coggeshall, K.M., et al., *The sepsis model: an emerging hypothesis for the lethality of inhalation anthrax*. J Cell Mol Med, 2013. **17**(7): p. 914-20.
124. Mostowy, S. and A.R. Shenoy, *The cytoskeleton in cell-autonomous immunity: structural determinants of host defence*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(9): p. 559-73.
125. Etienne-Manneville, S., *Microtubules in cell migration*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2013. **29**: p. 471-99.
126. Etienne-Manneville, S., *Actin and microtubules in cell motility: which one is in control?* Traffic, 2004. **5**(7): p. 470-7.
127. Desai, A. and T.J. Mitchison, *Microtubule polymerization dynamics*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1997. **13**: p. 83-117.
128. Leduc, C. and S. Etienne-Manneville, *Intermediate filaments in cell migration and invasion: the unusual suspects*. Curr Opin Cell Biol, 2015. **32**: p. 102-12.
129. Hol, E.M. and S. Etienne-Manneville, *Editorial overview: cell architecture: intermediate filaments - from molecules to patients*. Curr Opin Cell Biol, 2015. **32**: p. v-vi.
130. Herrmann, H., et al., *Intermediate filaments: primary determinants of cell architecture and plasticity*. J Clin Invest, 2009. **119**(7): p. 1772-83.
131. Bezanilla, M., et al., *Cytoskeletal dynamics: a view from the membrane*. J Cell Biol, 2015. **209**(3): p. 329-37.

132. Mostowy, S. and P. Cossart, *Septins: the fourth component of the cytoskeleton*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(3): p. 183-94.
133. Pollard, T.D. and J.A. Cooper, *Actin, a central player in cell shape and movement*. Science, 2009. **326**(5957): p. 1208-12.
134. Winder, S.J. and K.R. Ayscough, *Actin-binding proteins*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 4): p. 651-4.
135. Blanchoin, L., et al., *Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility*. Physiol Rev, 2014. **94**(1): p. 235-63.
136. Park, H., M.M. Chan, and B.M. Iritani, *Hem-1: putting the "WAVE" into actin polymerization during an immune response*. FEBS Lett, 2010. **584**(24): p. 4923-32.
137. Bernstein, B.W. and J.R. Bamburg, *ADF/cofilin: a functional node in cell biology*. Trends Cell Biol, 2010. **20**(4): p. 187-95.
138. Vitriol, E.A., et al., *Instantaneous inactivation of cofilin reveals its function of F-actin disassembly in lamellipodia*. Mol Biol Cell, 2013. **24**(14): p. 2238-47.
139. Bravo-Cordero, J.J., et al., *Functions of cofilin in cell locomotion and invasion*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(7): p. 405-15.
140. Ono, S., *Regulation of actin filament dynamics by actin depolymerizing factor/cofilin and actin-interacting protein 1: new blades for twisted filaments*. Biochemistry, 2003. **42**(46): p. 13363-70.
141. Zheng, K., et al., *Pathogenic microbes manipulate cofilin activity to subvert actin cytoskeleton*. Crit Rev Microbiol, 2015: p. 1-19.
142. Mizuno, K., *Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation*. Cell Signal, 2013. **25**(2): p. 457-69.
143. Oleinik, N.V., N.I. Krupenko, and S.A. Krupenko, *ALDH1L1 inhibits cell motility via dephosphorylation of cofilin by PP1 and PP2A*. Oncogene, 2010. **29**(47): p. 6233-44.
144. Huang, T.Y., C. DerMardirossian, and G.M. Bokoch, *Cofilin phosphatases and regulation of actin dynamics*. Curr Opin Cell Biol, 2006. **18**(1): p. 26-31.
145. Huang, T.Y., et al., *Chronophin mediates an ATP-sensing mechanism for cofilin dephosphorylation and neuronal cofilin-actin rod formation*. Dev Cell, 2008. **15**(5): p. 691-703.
146. Heissler, S.M. and D.J. Manstein, *Nonmuscle myosin-2: mix and match*. Cell Mol Life Sci, 2013. **70**(1): p. 1-21.
147. Maravillas-Montero, J.L. and L. Santos-Argumedo, *The myosin family: unconventional roles of actin-dependent molecular motors in immune cells*. J Leukoc Biol, 2012. **91**(1): p. 35-46.
148. Parsons, J.T., A.R. Horwitz, and M.A. Schwartz, *Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(9): p. 633-43.
149. Aguilar-Cuenca, R., A. Juanes-Garcia, and M. Vicente-Manzanares, *Myosin II in mechanotransduction: master and commander of cell migration, morphogenesis, and cancer*. Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(3): p. 479-92.
150. Vicente-Manzanares, M., et al., *Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(11): p. 778-90.
151. Neisch, A.L. and R.G. Fehon, *Ezrin, Radixin and Moesin: key regulators of membrane-cortex interactions and signaling*. Curr Opin Cell Biol, 2011. **23**(4): p. 377-82.
152. Spiering, D. and L. Hodgson, *Dynamics of the Rho-family small GTPases in actin regulation and motility*. Cell Adh Migr, 2011. **5**(2): p. 170-80.
153. Le Clainche, C. and M.F. Carrier, *Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration*. Physiol Rev, 2008. **88**(2): p. 489-513.

154. Gawden-Bone, C., et al., *Dendritic cell podosomes are protrusive and invade the extracellular matrix using metalloproteinase MMP-14*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 9): p. 1427-37.
155. Linder, S. and C. Wiesner, *Tools of the trade: podosomes as multipurpose organelles of monocytic cells*. Cell Mol Life Sci, 2015. **72**(1): p. 121-35.
156. Genot, E., *[The endothelial podosome]*. Med Sci (Paris), 2009. **25**(2): p. 168-74.
157. Block, M.R., et al., *Podosome-type adhesions and focal adhesions, so alike yet so different*. Eur J Cell Biol, 2008. **87**(8-9): p. 491-506.
158. van Helden, S.F., et al., *PGE2-mediated podosome loss in dendritic cells is dependent on actomyosin contraction downstream of the RhoA-Rho-kinase axis*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 7): p. 1096-106.
159. van den Dries, K., et al., *Interplay between myosin IIA-mediated contractility and actin network integrity orchestrates podosome composition and oscillations*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 1412.
160. van Helden, S.F. and P.L. Hordijk, *Podosome regulation by Rho GTPases in myeloid cells*. Eur J Cell Biol, 2011. **90**(2-3): p. 189-97.
161. Dovas, A. and D. Cox, *Signaling networks regulating leukocyte podosome dynamics and function*. Cell Signal, 2011. **23**(8): p. 1225-34.
162. Savina, A. and S. Amigorena, *Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells*. Immunol Rev, 2007. **219**: p. 143-56.
163. Deschamps, C., A. Echard, and F. Niedergang, *[Phagocytosis and cytokinesis: highlights on common themes and differences]*. Med Sci (Paris), 2013. **29**(11): p. 1004-9.
164. Freeman, S.A. and S. Grinstein, *Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton*. Immunol Rev, 2014. **262**(1): p. 193-215.
165. Rougerie, P., V. Miskolci, and D. Cox, *Generation of membrane structures during phagocytosis and chemotaxis of macrophages: role and regulation of the actin cytoskeleton*. Immunol Rev, 2013. **256**(1): p. 222-39.
166. Olazabal, I.M., et al., *Rho-kinase and myosin-II control phagocytic cup formation during CR, but not FcγR, phagocytosis*. Curr Biol, 2002. **12**(16): p. 1413-18.
167. Matsui, S., et al., *LIM kinase 1 modulates opsonized zymosan-triggered activation of macrophage-like U937 cells. Possible involvement of phosphorylation of cofilin and reorganization of actin cytoskeleton*. J Biol Chem, 2002. **277**(1): p. 544-9.
168. Bierne, H., et al., *A role for cofilin and LIM kinase in Listeria-induced phagocytosis*. J Cell Biol, 2001. **155**(1): p. 101-12.
169. Morato-Marques, M., et al., *Leukotrienes target F-actin/cofilin-1 to enhance alveolar macrophage anti-fungal activity*. J Biol Chem, 2011. **286**(33): p. 28902-13.
170. Gitik, M., et al., *Phagocytic receptors activate and immune inhibitory receptor SIRPα inhibits phagocytosis through paxillin and cofilin*. Front Cell Neurosci, 2014. **8**: p. 104.
171. Teijeira, A., E. Russo, and C. Halin, *Taking the lymphatic route: dendritic cell migration to draining lymph nodes*. Semin Immunopathol, 2014. **36**(2): p. 261-74.
172. Thiemann, S., J.H. Man, and L.G. Baum, *Assessing the roles of galectins in regulating dendritic cell migration through extracellular matrix and across lymphatic endothelial cells*. Methods Mol Biol, 2015. **1207**: p. 215-29.
173. Schnoor, M., *Endothelial actin-binding proteins and actin dynamics in leukocyte transendothelial migration*. J Immunol, 2015. **194**(8): p. 3535-41.
174. Takamatsu, H., et al., *Semaphorins guide the entry of dendritic cells into the lymphatics by activating myosin II*. Nat Immunol, 2010. **11**(7): p. 594-600.

175. Lammermann, T., et al., *Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing*. Nature, 2008. **453**(7191): p. 51-5.
176. Heuze, M.L., et al., *Migration of dendritic cells: physical principles, molecular mechanisms, and functional implications*. Immunol Rev, 2013. **256**(1): p. 240-54.
177. Fernandez, M.I., et al., *The human cytokine TSLP triggers a cell-autonomous dendritic cell migration in confined environments*. Blood, 2011. **118**(14): p. 3862-9.
178. Chabaud, M., et al., *Cell migration and antigen capture are antagonistic processes coupled by myosin II in dendritic cells*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 7526.
179. Solanes, P., et al., *Space exploration by dendritic cells requires maintenance of myosin II activity by IP3 receptor 1*. EMBO J, 2015. **34**(6): p. 798-810.
180. Luckashenak, N., et al., *Rho-family GTPase Cdc42 controls migration of Langerhans cells in vivo*. J Immunol, 2013. **190**(1): p. 27-35.
181. Harada, Y., et al., *DOCK8 is a Cdc42 activator critical for interstitial dendritic cell migration during immune responses*. Blood, 2012. **119**(19): p. 4451-61.
182. Lammermann, T., et al., *Cdc42-dependent leading edge coordination is essential for interstitial dendritic cell migration*. Blood, 2009. **113**(23): p. 5703-10.
183. Tanizaki, H., et al., *Rho-mDia1 pathway is required for adhesion, migration, and T-cell stimulation in dendritic cells*. Blood, 2010. **116**(26): p. 5875-84.
184. Frittoli, E., et al., *The signaling adaptor Eps8 is an essential actin capping protein for dendritic cell migration*. Immunity, 2011. **35**(3): p. 388-99.
185. van Helden, S.F., et al., *A critical role for prostaglandin E2 in podosome dissolution and induction of high-speed migration during dendritic cell maturation*. J Immunol, 2006. **177**(3): p. 1567-74.
186. Haglund, C.M. and M.D. Welch, *Pathogens and polymers: microbe-host interactions illuminate the cytoskeleton*. J Cell Biol, 2011. **195**(1): p. 7-17.
187. Aktories, K., et al., *Actin as target for modification by bacterial protein toxins*. FEBS J, 2011. **278**(23): p. 4526-43.
188. Popoff, M.R., *Bacterial factors exploit eukaryotic Rho GTPase signaling cascades to promote invasion and proliferation within their host*. Small GTPases, 2014. **5**.
189. Lemichez, E. and K. Aktories, *Hijacking of Rho GTPases during bacterial infection*. Exp Cell Res, 2013. **319**(15): p. 2329-36.
190. Aktories, K., *Bacterial protein toxins that modify host regulatory GTPases*. Nat Rev Microbiol, 2011. **9**(7): p. 487-98.
191. Hong, J., et al., *Anthrax edema toxin inhibits endothelial cell chemotaxis via Epac and Rap1*. J Biol Chem, 2007. **282**(27): p. 19781-7.
192. Maddugoda, M.P., et al., *cAMP signaling by anthrax edema toxin induces transendothelial cell tunnels, which are resealed by MIM via Arp2/3-driven actin polymerization*. Cell Host Microbe, 2011. **10**(5): p. 464-74.
193. Warfel, J.M., A.D. Steele, and F. D'Agnillo, *Anthrax lethal toxin induces endothelial barrier dysfunction*. Am J Pathol, 2005. **166**(6): p. 1871-81.
194. Steele, A.D., J.M. Warfel, and F. D'Agnillo, *Anthrax lethal toxin enhances cytokine-induced VCAM-1 expression on human endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **337**(4): p. 1249-56.
195. Yeager, L.A., A.K. Chopra, and J.W. Peterson, *Bacillus anthracis edema toxin suppresses human macrophage phagocytosis and cytoskeletal remodeling via the protein kinase A and exchange protein activated by cyclic AMP pathways*. Infect Immun, 2009. **77**(6): p. 2530-43.
196. Azioune, A., et al., *Simple and rapid process for single cell micropatterning*. Lab Chip, 2009. **9**(11): p. 1640-2.

197. They, M. and M. Piel, *Adhesive micropatterns for cells: a microcontact printing protocol*. Cold Spring Harb Protoc, 2009. **2009**(7): p. pdb prot5255.
198. Carter, S.B., *Haptotactic islands: a method of confining single cells to study individual cell reactions and clone formation*. Exp Cell Res, 1967. **48**(1): p. 189-93.
199. Harris, A., *Behavior of cultured cells on substrata of variable adhesiveness*. Exp Cell Res, 1973. **77**(1): p. 285-97.
200. Folkman, J. and A. Moscona, *Role of cell shape in growth control*. Nature, 1978. **273**(5661): p. 345-9.
201. Singhvi, R., et al., *Engineering cell shape and function*. Science, 1994. **264**(5159): p. 696-8.
202. Chen, C.S., et al., *Geometric control of cell life and death*. Science, 1997. **276**(5317): p. 1425-8.
203. Mrksich, M., et al., *Using microcontact printing to pattern the attachment of mammalian cells to self-assembled monolayers of alkanethiolates on transparent films of gold and silver*. Exp Cell Res, 1997. **235**(2): p. 305-13.
204. Whitesides, G.M., et al., *Soft lithography in biology and biochemistry*. Annu Rev Biomed Eng, 2001. **3**: p. 335-73.
205. They, M., *Micropatterning as a tool to decipher cell morphogenesis and functions*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 24): p. 4201-13.
206. They, M., et al., *The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(10): p. 947-53.
207. They, M., et al., *Anisotropy of cell adhesive microenvironment governs cell internal organization and orientation of polarity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(52): p. 19771-6.
208. Schauer, K., et al., *Probabilistic density maps to study global endomembrane organization*. Nat Methods, 2010. **7**(7): p. 560-6.
209. Schauer, K., et al., *A novel organelle map framework for high-content cell morphology analysis in high throughput*. J Biomol Screen, 2014. **19**(2): p. 317-24.
210. Duong, T., B. Goud, and K. Schauer, *Closed-form density-based framework for automatic detection of cellular morphology changes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(22): p. 8382-7.
211. Aktories, K., et al., *Botulinum C2 toxin ADP-ribosylates actin*. Nature, 1986. **322**(6077): p. 390-2.
212. Barth, H., et al., *Binary bacterial toxins: biochemistry, biology, and applications of common Clostridium and Bacillus proteins*. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR, 2004. **68**(3): p. 373-402, table of contents.
213. Stiles, B.G., et al., *Clostridium and bacillus binary enterotoxins: bad for the bowels, and eukaryotic being*. Toxins, 2014. **6**(9): p. 2626-56.
214. Rubin, E.J., et al., *Functional modification of a 21-kilodalton G protein when ADP-ribosylated by exoenzyme C3 of Clostridium botulinum*. Molecular and cellular biology, 1988. **8**(1): p. 418-26.
215. Trescos, Y. and J.N. Tournier, *Cytoskeleton as an emerging target of anthrax toxins*. Toxins, 2012. **4**(2): p. 83-97.
216. Trescos, Y., et al., *Micropatterned macrophage analysis reveals global cytoskeleton constraints induced by Bacillus anthracis edema toxin*. Infect Immun, 2015. **83**(8): p. 3114-25.
217. McWhorter, F.Y., et al., *Modulation of macrophage phenotype by cell shape*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(43): p. 17253-8.
218. Faure-Andre, G., et al., *Regulation of dendritic cell migration by CD74, the MHC class II-associated invariant chain*. Science, 2008. **322**(5908): p. 1705-10.

219. Lehmann, M., et al., *Lung epithelial injury by B. anthracis lethal toxin is caused by MKK-dependent loss of cytoskeletal integrity*. PLoS One, 2009. **4**(3): p. e4755.
220. Rolando, M., et al., *Injection of Staphylococcus aureus EDIN by the Bacillus anthracis protective antigen machinery induces vascular permeability*. Infect Immun, 2009. **77**(9): p. 3596-601.
221. Nour, A.M., et al., *Anthrax lethal toxin triggers the formation of a membrane-associated inflammasome complex in murine macrophages*. Infect Immun, 2009. **77**(3): p. 1262-71.
222. Hong, J., et al., *Anthrax edema factor potency depends on mode of cell entry*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **335**(3): p. 850-7.
223. Mei, F.C., et al., *Differential signaling of cyclic AMP: opposing effects of exchange protein directly activated by cyclic AMP and cAMP-dependent protein kinase on protein kinase B activation*. J Biol Chem, 2002. **277**(13): p. 11497-504.
224. Cheng, X., et al., *Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2008. **40**(7): p. 651-62.
225. Grandoch, M., S.S. Roscioni, and M. Schmidt, *The role of Epac proteins, novel cAMP mediators, in the regulation of immune, lung and neuronal function*. Br J Pharmacol, 2010. **159**(2): p. 265-84.
226. Lorenowicz, M.J., et al., *PKA and Epac1 regulate endothelial integrity and migration through parallel and independent pathways*. Eur J Cell Biol, 2008. **87**(10): p. 779-92.
227. Retta, S.F., F. Balzac, and M. Avolio, *Rap1: a turnabout for the crosstalk between cadherins and integrins*. Eur J Cell Biol, 2006. **85**(3-4): p. 283-93.
228. Frische, E.W. and F.J. Zwartkruis, *Rap1, a mercenary among the Ras-like GTPases*. Dev Biol, 2010. **340**(1): p. 1-9.
229. Bouillot, S., I. Attree, and P. Huber, *Pharmacological activation of Rap1 antagonizes the endothelial barrier disruption induced by exotoxins ExoS and ExoT of Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun, 2015. **83**(5): p. 1820-9.
230. Simon, N.C. and J.T. Barbieri, *Bacillus cereus Certhrax ADP-ribosylates vinculin to disrupt focal adhesion complexes and cell adhesion*. J Biol Chem, 2014. **289**(15): p. 10650-9.
231. Serezani, C.H., et al., *PTEN directly activates the actin depolymerization factor cofilin-1 during PGE2-mediated inhibition of phagocytosis of fungi*. Sci Signal, 2012. **5**(210): p. ra12.
232. Huber, P., et al., *Sequential inactivation of Rho GTPases and Lim kinase by Pseudomonas aeruginosa toxins ExoS and ExoT leads to endothelial monolayer breakdown*. Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(10): p. 1927-41.
233. Kamanova, J., et al., *Adenylate cyclase toxin subverts phagocyte function by RhoA inhibition and unproductive ruffling*. J Immunol, 2008. **181**(8): p. 5587-97.
234. Rolando, M., et al., *Contractile actin cables induced by Bacillus anthracis lethal toxin depend on the histone acetylation machinery*. Cytoskeleton (Hoboken), 2015.
235. Buck, M. and M. Chojkier, *C/EBPbeta phosphorylation rescues macrophage dysfunction and apoptosis induced by anthrax lethal toxin*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **293**(6): p. C1788-96.
236. Kau, J.H., et al., *Sublethal doses of anthrax lethal toxin on the suppression of macrophage phagocytosis*. PLoS One, 2010. **5**(12): p. e14289.
237. Ribot, W.J., et al., *Anthrax lethal toxin impairs innate immune functions of alveolar macrophages and facilitates Bacillus anthracis survival*. Infect Immun, 2006. **74**(9): p. 5029-34.
238. O'Brien, J., et al., *Effects of anthrax toxin components on human neutrophils*. Infect Immun, 1985. **47**(1): p. 306-10.

239. Bryn, T., et al., *The cyclic AMP-Epac1-Rap1 pathway is dissociated from regulation of effector functions in monocytes but acquires immunoregulatory function in mature macrophages*. J Immunol, 2006. **176**(12): p. 7361-70.
240. Serezani, C.H., et al., *Cyclic AMP: master regulator of innate immune cell function*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2008. **39**(2): p. 127-32.
241. Aronoff, D.M., et al., *Cutting edge: macrophage inhibition by cyclic AMP (cAMP): differential roles of protein kinase A and exchange protein directly activated by cAMP-1*. J Immunol, 2005. **174**(2): p. 595-9.
242. Kinchen, J.M. and K.S. Ravichandran, *Phagosome maturation: going through the acid test*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(10): p. 781-95.
243. Flannagan, R.S., G. Cosio, and S. Grinstein, *Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies*. Nat Rev Microbiol, 2009. **7**(5): p. 355-66.
244. Guichard, A., et al., *Cholera toxin disrupts barrier function by inhibiting exocyst-mediated trafficking of host proteins to intestinal cell junctions*. Cell Host Microbe, 2013. **14**(3): p. 294-305.
245. Guichard, A., V. Nizet, and E. Bier, *RAB11-mediated trafficking in host-pathogen interactions*. Nat Rev Microbiol, 2014. **12**(9): p. 624-34.
246. Garay, J., et al., *Crosstalk between PKA and Epac regulates the phenotypic maturation and function of human dendritic cells*. J Immunol, 2010. **185**(6): p. 3227-38.
247. Vargas, P., et al., *Study of cell migration in microfabricated channels*. J Vis Exp, 2014(84): p. e51099.

RESUME

Bacillus anthracis, agent de la maladie du charbon, est aussi un agent majeur de la menace biologique. Sa virulence est liée à deux principaux facteurs : une capsule et deux toxines, la toxine oedémateuse (ET = EF + PA) et la toxine létale (LT = LF + PA). EF est une adénylate cyclase, calcium et calmoduline dépendante, produisant une élévation de la concentration en AMPc intracellulaire tandis que LF est une métalloprotéase à zinc clivant la majorité des Mitogen Activated Protein Kinase Kinases. Les toxines jouent un rôle central dans la pathogénie de la maladie du charbon et dans la dérégulation des fonctions des cellules du système immunitaire. Le cytosquelette d'actine participe activement aux fonctions de phagocytose et de migration des macrophages et des cellules dendritiques.

Cependant, peu d'études analysent l'implication du cytosquelette d'actine des cellules immunitaires dans la physiopathologie des toxines. ET induit une rétraction temps-dépendant des cellules dendritiques et des macrophages normalisés sur des *micropatterns* de fibronectine, s'accompagnant d'une dépolymérisation de l'actine et d'une perte des points d'ancrage des cellules dendritiques. Précocement, ET active la cofiline par l'activation de la voie de signalisation AMPc – PKA – Protéines phosphatases. Malgré ces altérations du cytosquelette d'actine, ET n'induit pas de modification des capacités phagocytaires des cellules dendritiques, à l'exception d'une dérégulation de la maturation des phagosomes. ET conduit également à une augmentation de la migration des cellules dendritiques *in vitro* par activation et expression de CCR7 et CXCR4 à la surface des cellules dendritiques.

A l'inverse, LT conduit à un étalement temps-dépendant des cellules dendritiques normalisées, accompagné d'une dérégulation de la dynamique de l'actine provoquant des regroupements anormaux d'actine filament. LT active les myosines phosphatases via la voie RhoA-ROCK pour déphosphoryler les myosines II. A la différence de ET, LT inhibe les capacités phagocytaires des cellules dendritiques mais ne conduit pas à une modification de la migration des cellules dendritiques *in vitro*.

ABSTRACT

Bacillus anthracis, the agent of anthrax, is also a major agent of biological warfare threat. Its virulence is caused by two main factors : the capsule and two toxins, edema toxin (ET = PA + EF) and lethal toxin (LT = LF + PA). EF is a calcium and calmodulin-dependent adenylate cyclase, producing a rise in intracellular cAMP concentration, while LF is a zinc metalloprotease cleaving the majority of Mitogen Activated Protein Kinase Kinases. The toxins play a central role in the pathogenesis of the disease and the deregulation of the functions of immune cells. The actin cytoskeleton is actively participating in the phagocytosis and the migration of macrophages and dendritic cells.

However, few studies analyze the involvement of the actin cytoskeleton of immune cells in the pathogenesis of toxins. ET induces a time-dependent retraction of dendritic cells and macrophages on fibronectin *micropatterns*, accompanied by actin depolymerization and a loss of the anchor points of dendritic cells. ET early activates cofilin by activating the cAMP - PKA - Protein phosphatases signaling pathway. Despite these alterations of the actin cytoskeleton, ET does not induce any change in the phagocytic capacity of dendritic cells, except for a deregulation of the phagosomes maturation. ET also leads to an increase in the migration of dendritic cells *in vitro* by activation and expression of CCR7 and CXCR4 on the surface of dendritic cells.

In contrast, LT results in a time-dependent spreading of micropatterned dendritic cells, accompanied by a dysregulation of actin dynamics causing abnormal combinations of actin filament. LT activates myosin phosphatase via the RhoA-ROCK pathway to dephosphorylate myosin II. Unlike ET, LT inhibits the dendritic cells phagocytosis but does not lead to a change in dendritic cells migration *in vitro*.