



HAL
open science

Internalisation des leucotoxines de *S. aureus* dans les cellules cibles et conséquences cellulaires associées

Gaëlle Zimmermann-Meisse

► **To cite this version:**

Gaëlle Zimmermann-Meisse. Internalisation des leucotoxines de *S. aureus* dans les cellules cibles et conséquences cellulaires associées. Bactériologie. Université de Strasbourg, 2016. Français. NNT : 2016STRAJ113 . tel-01591032

HAL Id: tel-01591032

<https://theses.hal.science/tel-01591032>

Submitted on 20 Sep 2017

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.



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG



ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
EA-7290 Virulence bactérienne précoce

THÈSE présentée par :
Gaëlle ZIMMERMANN-MEISSE

soutenue le : **25 novembre 2016**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Vie et Santé / Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

**Internalisation des leucotoxines de *S. aureus*
dans les cellules cibles et conséquences
cellulaires associées**

THÈSE dirigée par :

Dr. PRÉVOST Gilles

MCU-PH, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr. BARBIER Julien

Chargé de recherche, CEA, Gif-sur-Yvette

Pr. POPOFF Michel

PR PUPH, Institut Pasteur, Paris

AUTRE MEMBRE DU JURY :

Pr. SOULAS-SPRAUEL Pauline

PR PUPH, IBMC, Strasbourg

ZIMMERMANN-MEISSE Gaëlle

zimmermann.gaelle@gmail.com

Université de Strasbourg – EA-7290 Virulence bactérienne précoce

Institut de Bactériologie de la Faculté de Médecine – 3, rue Koeberlé 67000 Strasbourg, FRANCE

« Même un voyage de mille lieues commence par un pas. »

Proverbe japonais

« La perplexité est le début de la connaissance. »

Khalil Gibran

À mes parents,

À ma sœur,

À ma grand-mère,

Remerciements

Cette thèse a été financée par une bourse du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Je tiens à remercier Julien Barbier et Michel Popoff pour avoir accepté de juger mon travail. Merci également à Pauline Soulas-Sprauel qui a accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Un immense merci à Gilles Prévost, qui m'a permis de faire plusieurs stages dans le laboratoire avant que je ne commence ma thèse. Merci de la confiance qu'il m'a accordée en dirigeant cette thèse et de la liberté qu'il m'a donnée dans mon travail, j'espère avoir été à la hauteur. Je ne serais pas là sans lui, sans son aide. Merci de m'avoir donné la possibilité de voir de nouvelles choses en m'emmenant en congrès, en me permettant d'y présenter mon travail.

Je remercie Emmanuel Jover. Pour toute cette aventure « microscopie confocale » sans qui j'y serais encore à mettre au point mon protocole. Pour les longues discussions qui m'ont apporté beaucoup, sa disponibilité face à mes incessantes questions, ses précieux conseils...

Merci à l'équipe du dessous (Inserm U110 de l'Institut de Virologie) : Sylvie, Camille, Thomas, Bin, Géraldine... pour les buffy coat qu'on a partagé, les discussions rapides et l'aide pour mes macrophages.

Merci aussi à l'équipe du dessus (Borrelia) : Quentin, Valérie, Éloïdy, Martine... pour les petits moments de détente ensemble, pendant les repas ou ailleurs.

Mes remerciements à Daniel Keller pour toutes ces années où il a été là pour répondre à mes innombrables questions, pour ses conseils techniques, sa disponibilité, son aide, pour les commandes et leurs galères, pour ses histoires improbables et ses blagues.

Je remercie les stagiaires que j'ai eu plaisir à former et avec qui j'ai souvent passé de très bons moments, en particulier Amandine.

Merci à tous les thésards du laboratoire, ceux d'avant et ceux de maintenant. Viola, qui va reprendre le flambeau. Xavier, sans qui le labo serait beaucoup moins animé et qui apporte sa bonne humeur lorsqu'il n'est pas de l'autre côté de la rue. Mira, pour ces années à travailler ensemble, son aide, les manips de K_d énormes, les nombreuses pauses café, les moments de rigolades, les séances de cinéma et tout le reste. Élodie, pour son amitié, les pauses de midi, les discussions, tous les moments qu'on a passés au labo ou à l'extérieur.

Aux amis, merci de m'avoir soutenu/supporté pendant ces années. À Fanny, pour ces (très) longues discussions sur la biologie et sur nos études, pour tous les matchs de basket qu'on a « regardé » ensemble et toutes les pauses déjeuner. À Maxime, pour son amitié entrecoupée de discussions philosophiques ou zoologiques, et le reste. À Manu, pour me supporter depuis le DUT, pour son aide pour mes manips de cytométrie, tous ces films qu'on a vus, ces crêpes qu'on a mangées, pour m'avoir emmené aux apéros Ingress où les gens sont super, pour s'être occupé du lapin pendant les congrès. À Marjorie, qui était là au début de ma thèse et qui était là ensuite, pour ces discussions sur la psychologie, sur tout et n'importe quoi, surtout sur les histoires « vraies » ; merci d'avoir été là pour moi et de l'être encore.

Merci à Clément de m'avoir soutenu pour cette fin de thèse et de ne pas me laisser partir toute seule en Angleterre. Pour tout le reste que je ne pourrais jamais exprimer, merci.

À ma sœur, qui était là, tout simplement.

Je ne pourrais jamais assez remercier mes parents pour m'avoir laissé la chance de faire ce que je voulais, pour m'avoir soutenu, autant moralement que financièrement, pour m'avoir aidé dans mes examens ou mes préparations d'oraux – même s'ils n'y comprenaient pas grand-chose –, pour m'avoir aidé à relativiser. Merci d'avoir fait de moi celle que je suis.

Mémé, j'aurais aimé que tu voies ça.

Table des matières

Chapitre I • Introduction	1
1 <i>Staphylococcus aureus</i>	2
1.1 Généralités.....	2
1.1.1 Les pathologies associées.....	4
1.1.2 Traitements et vaccination.....	4
1.1.3 Biofilms et cycle de vie de la bactérie.....	5
1.1.4 Vers l'évasion du système immunitaire.....	7
1.2 Les toxines de <i>S. aureus</i>	10
1.2.1 Les épidermolysines.....	10
1.2.2 Les superantigènes.....	11
1.2.3 L'Hémolysine β	12
1.2.4 Les toxines formant des pores.....	12
2 Les Leucotoxines.....	14
2.1 Généralités.....	14
2.1.1 L'Hémolysine γ (AB et CB).....	15
2.1.2 La Leucocidine de Panton et Valentine.....	15
2.1.3 LukA/LukB (nommée également LukG/LukH).....	16
2.1.4 LukE/LukD.....	16
2.1.5 LukM/LukF'-PV.....	17
2.2 Les cellules cibles.....	17
2.3 Hypothèses d'action.....	19
2.3.1 La formation de pores, un mode d'action historique.....	19
2.3.2 Activation cellulaire : contradiction avec l'hypothèse d'un pore membranaire.....	21
3 La fixation des toxines de <i>S. aureus</i>	23
3.1 Les récepteurs.....	23
3.2 Les GPCR.....	24
3.2.1 Généralités.....	24
3.2.2 Le récepteur au C5a, le C5aR.....	26
3.3 Voies de signalisation associées aux GPCR.....	27
3.3.1 La signalisation des protéines G.....	27
3.3.2 La signalisation calcique.....	28

3.3.3	La signalisation du C5aR.....	29
4	L'internalisation de composés dans les cellules humaines.....	31
4.1	Voies d'endocytose chez les mammifères.....	31
4.1.1	Voie de la clathrine (1).....	31
4.1.2	Voie dépendante de ARF6 (3).....	32
4.1.3	Autres voies d'endocytose.....	33
4.2	Tri cellulaire.....	34
4.2.1	Tri et endosome précoce.....	35
4.2.2	La voie de recyclage.....	36
4.2.3	La voie de dégradation.....	36
4.3	Transport rétrograde et toxines bactériennes.....	37
4.3.1	Toxine diphtérique (AB).....	39
4.3.2	Toxine cholérique (AB5).....	39
4.3.3	Toxine de Shiga (AB5).....	40
5	Le stress cellulaire induit chez les neutrophiles humains.....	42
5.1	Formation de DRO.....	42
5.2	Autophagie.....	42
5.3	Apoptose.....	44
5.4	NETose.....	46
6	Objectifs de la thèse.....	49
	Chapitre II • Matériels et Méthodes	50
1	Matériels.....	52
1.1	Solutions & Tampons.....	52
1.2	Anticorps.....	52
1.2.1	Anticorps primaires.....	52
1.2.2	Anticorps secondaires.....	53
1.3	Drogues.....	53
2	Cellules humaines.....	54
2.1	Purification des neutrophiles et des monocytes.....	54
2.1.1	Séparation sur gradient de Ficoll.....	54
2.1.2	Purification des neutrophiles.....	55
2.1.3	Purification des monocytes.....	55
2.2	Différenciation des monocytes en macrophages.....	55
2.3	Lignées cellulaires U937 et U937-C5aR.....	56
2.4	Congélation des cellules.....	56
3	Tests de l'activité des leucotoxines.....	56

3.1	Expression et purification des leucotoxines	56
3.2	Couplage à un fluorochrome	57
3.3	Détermination de la constante de dissociation, K_d	57
3.3.1	Cytométrie en flux.....	57
3.3.2	K_d des leucotoxines	58
3.4	Détermination du calcium intracellulaire	59
3.4.1	Spectrofluorimétrie.....	59
3.4.2	Sonde Fura-2	59
3.5	Détermination de l'apoptose et de la nécrose.....	59
3.5.1	Perméabilisation au BEt	59
3.5.2	Sonde de potentiel mitochondrial JC-1	60
3.5.3	Annexine V et Iodure de Propidium.....	61
3.5.4	Méthode TUNEL.....	62
3.6	Détermination de l'activation des protéines de signalisation par Western Blot.....	62
3.6.1	Principe.....	62
3.6.2	Protéines d'intérêt pour notre étude	62
3.6.3	Protocole.....	63
4	Imagerie cellulaire	64
4.1	Microscopes.....	64
4.2	Immunofluorescence	64
4.2.1	Sur lames	64
4.2.2	En microtube	65
4.2.3	Sur boîte	66
4.3	Traitement des images.....	66
4.3.1	Détermination du Coefficient de Pearson.....	66
4.3.2	Détermination du ratio de superposition des deux signaux	67
4.3.3	Détermination du ratio de NETose.....	68
4.3.4	Quantification de l'autophagie	69
5	Statistiques.....	69

RÉSULTATS

Chapitre III • Cibles cellulaires de la LPV et de HlgC/HlgB.....	72
1 Introduction	74
2 Neutrophiles humains	75
3 U937-C5aR.....	77
4 Macrophages dérivés de monocytes	79

5	Discussion.....	81
5.1	Conclusion.....	81
5.2	Perspectives.....	82
Chapitre IV • Internalisation et transport intracellulaire.....		84
1	Introduction	86
2	Activation du récepteur.....	86
3	Internalisation	87
4	Transport intracellulaire.....	111
5	Discussion.....	144
5.1	Conclusion.....	144
5.2	Perspectives.....	145
Chapitre V • Stress cellulaire		146
1	Introduction	148
2	Perméabilisation cellulaire.....	149
3	Apoptose.....	149
4	NETose	153
5	Signalisation intracellulaire	157
6	Discussion.....	158
6.1	Conclusion.....	158
6.2	Perspectives.....	159
Chapitre VI • Conclusion.....		160
L'odyssée des leucotoxines dans le neutrophile humain.....		162
Des leucotoxines dans la cellule ? Un évènement non sans conséquences		164
Une affaire à suivre... ..		166
Chapitre VII • Bibliographie		170
Liste des communications		185
Publications.....		185
Communications orales.....		185
Posters		186

Index des figures

Figure I.1 – Observation au microscope électronique de <i>S. aureus</i>	2
Figure I.2 – Étapes de formation d'un biofilm	7
Figure I.3 – Système du complément	8
Figure I.4 – Structure tridimensionnelle des sous-unités de la LPV et de HlgB	15
Figure I.5 – Mode d'action historique de la formation d'un pore	19
Figure I.6 – Structure tridimensionnelle du pore formé par HlgA/HlgB	21
Figure I.7 – Voie de signalisation des GPCR.....	25
Figure I.8 – Signalisation liée aux protéines G	28
Figure I.9 – Mécanisme de libération du calcium réticulaire	29
Figure I.10 – Signalisation du C5aR après une activation par le peptide du complément C5a.....	30
Figure I.11 – Voies d'endocytose.....	31
Figure I.12 – Tri cellulaire : recyclage et dégradation de protéines après l'endocytose dans la cellule	35
Figure I.13 – Transport rétrograde et trafic cellulaire des toxines diphtérique, cholérique et de Shiga	38
Figure I.14 – Mécanisme de formation des vésicules d'autophagie.....	43
Figure I.15 – Voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.....	45
Figure I.16 – Mécanisme de la NETose	47
Figure II.1 – Purification des cellules leuco-plaquettaires sanguines.	54
Figure II.2 – Distribution de la sonde JC-1 dans la cellule.	60
Figure II.3 – Distribution des cellules avec Annexine V / Iodure de Propidium.	61
Figure III.1 – Observation au microscope à contraste de phase des neutrophiles en contact avec 2 nM de LPV	75
Figure III.2 – Observation au microscope confocal du marquage de la LPV sur neutrophiles humains	76
Figure III.3 – Détermination du K_d de la LPV et de HlgC/HlgB sur neutrophiles humains	76
Figure III.4 – Quantification de l'IL-8 sur les neutrophiles humains en contact avec la LPV et HlgC/HlgB	77
Figure III.5 – Observation au microscope à contraste de phase des cellules U937-C5aR en contact avec 2 nM de LPV.....	78
Figure III.6 – Observation au microscope confocal du marquage de la LPV sur U937-C5aR	78
Figure III.7 – Détermination du K_d de la LPV et de HlgC/HlgB sur U937-C5aR	79
Figure III.8 – Observation au microscope à contraste de phase des macrophages en contact avec 2 nM de LPV	80
Figure III.9 – Observation au microscope confocal du marquage de la LPV sur macrophages humains	80
Figure III.10 – Détermination du K_d de la LPV et de HlgC/HlgB sur macrophages humains	81
Figure IV.1 – Comparaison de la présence du C5aR phosphorylé et non phosphorylé avec la LPV et HlgC/HlgB	87
Figure IV.2 – Étude de la fixation de LukS-PV marqué à la fluorescéine sur les neutrophiles humains	88
Figure V.1 – Perméabilisation au BEt des neutrophiles en contact avec la LPV et HlgC/HlgB avec ou sans calcium.....	149
Figure V.2 – Détermination du pourcentage de neutrophiles aux membranes mitochondriales dépolariées à 6h d'incubation avec la LPV et HlgC/HlgB.....	150
Figure V.3 – Courbe dose réponse de la LPV et HlgC/HlgB sur l'apoptose et la nécrose	151

Figure V.4 – Détermination de l’apoptose par méthode TUNEL sur neutrophiles en contact avec la LPV et HlgC/HlgB	152
Figure V.5 – Étude au Western Blot de la présence de la caspase 9 après un contact avec la LPV ou HlgC/HlgB	152
Figure V.6 – Positivité des neutrophiles à l’élastase de neutrophile (EN) après un contact avec la LPV et HlgC/HlgB	153
Figure V.7 – Visualisation de la formation de NET par l’EN sur les neutrophiles en contact avec la LPV	155
Figure V.8 – Inhibition de la NADPH oxydase par le DPI et effet sur la formation des NET	156
Figure V.9 – Étude de la variation d’intensité de fluorescence de l’image du marquage LC3B avec la LPV ou HlgC/HlgB.....	157
Figure V.10 – Visualisation de la phosphorylation de la sous-unité p85 α de la PI3K après contact avec les toxines	157
Figure VI.11 – Chronologie des événements liés à la LPV ou à HlgC/HlgB sur les neutrophiles humains	168

Index des tables

Tableau II.1 – Anticorps primaires utilisés	53
Tableau II.2 – Anticorps secondaires utilisés.....	53
Tableau II.3 – Composés chimiques utilisés comme contrôle positif.....	54
Tableau II.4 – Concentration des leucotoxines utilisées	58
Tableau III.1 – Récapitulatif des paramètres étudiés par type cellulaire pour la LPV et HlgC/HlgB...	81

Abréviations

AB : HlgA/HlgB

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

APAF-1 : apoptotic peptidase activating factor-1

ARF6 : ADP-ribosylation factor 6

ARNO : ARF nucleotide-binding site opener

ATG : autophagy-related genes

BET : bromure d'éthidium

CB : gamma hémolysine HlgC/HlgB

CCCP : carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone

CCR : C-C chemokine receptor

CCL : C-C chemokine ligand

CHIPS : chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*

CMH II : complexe majeur d'histocompatibilité de classe II

CWA : cell wall-anchored

CXCL : (C-X-C motif) ligand

CXCR : (C-X-C motif) receptor

DAF : decay accelerating factor

DAG : diacylglycérol

DARC : duffy antigen/chemokine receptor

DIAPH1 : diaphanous homologue 1

DISC : death-inducing signaling complex

DPI : diphénylène iodonium

DMSO : diméthylsulfoxyde

DRO : dérivés réactifs de l'oxygène

EET : eosinophil extracellular traps

EF-2 : elongation factor-2

Efb : extracellular fibrinogen binding protein

EGFR : epidermal growth factor

EN : élastase de neutrophile

ERK : extracellular signal-regulated kinase

ETA/B : exfoliative toxin A/B

F5M : fluorescéine-5-maléimide

FADD : Fas associated death domain

FMLP : N-formyl-Met-Leu-Phe

FPR : formyl peptide receptor

FRET: fluorescence resonance energy transfer
GAP : GTPase-activating protein
GDP : guanosine diphosphate
GEF : guanine exchange factor
GM-CSF : granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GPCR : G-protein couple receptor
GPI : glycosylphosphatidylinositol
GRK : GPCR kinase
GST : glutathion S-transférase
GTP : guanosine triphosphate
HB-EGF : heparin-binding epidermal growth factor
IP : iodure de propidium
IP3 : inositol trisphosphate
Isd : iron-regulated surface determinant
LAMP1 : lysosome-associated membrane protein 1
LPV : leucocidine de Panton et Valentine
L_T : lymphocyte T
M6PR : mannose-6-phosphate receptor
MAC-1 : macrophage-1-antigen
MAPK : mitogen-activated protein kinase
MBL : mannan binding lectin
MSCRAMM : microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules
mTOR : mammalian target of rapamycin
MTSS : menstrual-related toxic shock syndrome
MVB : multivesicular body
NET : neutrophil extracellular trap
NK : natural killer
ORF : open reading frame
PAI : peptide auto-inducteur
PAM : peptide antimicrobien
PAMP : pathogen-associated molecular pattern
PDI : protéine disulfure isomérase
PI3K : phosphoinositide 3-kinase
PIA : polysaccharide intercellular adhesin
PIP2 : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PIP3 : phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate
PIP5K : phosphatidylinositol-4-phosphate 5- kinase

PKA : protéine kinase A
PKC : protéine kinase C
PLC : phospholipase C
PLD : phospholipase D
PMA : phorbol myristate acétate
PNN : polynucléaire neutrophile
PRR : pattern recognition receptors
PS : phosphatidylsérine
PSM : phenol-soluble modulins
PTEN : phosphatase and tensin homolog
ROCK1 : Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1
SAK : staphylokinase
SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline
SCIN : Staphylococcal complement inhibitor
SE : staphylococcal enterotoxin
SEI : staphylococcal enterotoxin-like
SNX : dimere sorting nexin
SOD : superoxyde dismutase
SSL : staphylococcal superantigen-like
SSSS : Staphylococcal scalded skin syndrome
STEC : Shiga toxin-producing *E. coli*
SVF : sérum de veau foetal
TA : température ambiante
TCR : T cell receptor
TFP : toxine formant des pores
TLR : toll-like receptor
TNFR1 : tumour necrosis factor receptor 1
TSS : toxic shock syndrome
TSST-1 : toxic shock syndrome toxin-1
VIH : virus de l'immunodéficience humaine

Chapitre I

Introduction

1 STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Résistance aux antibiotiques, infections hospitalières, conséquences post-opératoires, implantation de prothèses... La réputation du « Staphylocoque doré » n'est plus à faire car fortement relayée par les médias. Alors, largement sensibilisé par les journaux télévisés et les émissions de vulgarisation scientifique, le public, au même titre que le personnel soignant, redoute cette bactérie inquiétante. Car *Staphylococcus aureus*, de son nom scientifique, n'est pas seulement responsable d'infections nosocomiales (contractées à l'hôpital), mais il est très souvent résistant à de nombreux antibiotiques, ce qui entraîne nombre de difficultés de traitements.

1.1 GENERALITES

Staphylococcus aureus est une bactérie à Gram positif de la famille des *Micrococcaceae*, observé dès 1880 par Alexander Ogston. C'est lui-même qui désigna cette bactérie sous le nom de *Staphylococcus* à partir de la racine grecque « *Staphyl* » qui signifie « grappe de raisin ». En effet, à l'observation microscopique, *S. aureus* apparaît sous forme de coques, isolées ou en amas (Figure I.1). La désignation « *aureus* », elle, vient de la coloration particulière des colonies qui sont dorées lorsqu'elles croissent sur milieu solide. La bactérie se distingue également par sa coagulase, sa capacité à fermenter le mannitol et sa positivité au test désoxyribonucléase (Lowy, 1998).



Figure I.1 – Observation au microscope électronique de *S. aureus*
Source <http://www.micronaut.ch/shop/staphylococcus-aureus/>.

Il s'agit d'une bactérie anaérobie facultative, mésophile (croissance optimale à 37°C), neutrophile (pH optimal de 7) et halophile (> 5 % de NaCl). La paroi cellulaire se compose pour moitié de peptidoglycane qui s'associe à l'acide téichoïque, un autre constituant majeur, et à l'acide lipotéichoïque qui se lie par son ancre glycolipidique (Lowy, 1998).

Afin de croître et de coloniser son hôte, *S. aureus* dispose de nombreuses protéines régulatrices qui lui permettent d'assurer la transcription de ses gènes. C'est le cas du quorum sensing.

LE QUORUM SENSING : C'est un mécanisme de régulation des gènes à deux composés, basé sur la densité cellulaire et l'environnement extracellulaire. En résumé, il s'agit d'un système de communication entre les bactéries. Son principe repose sur la sécrétion d'un peptide auto-inducteur (PAI) dans le milieu externe qui, en s'accumulant pour atteindre une concentration seuil, va permettre l'expression de certains gènes de manière simultanée chez toute la population de bactéries.

Le système Agr (Accessory gene regulator) est le quorum-sensing majoritaire chez *S. aureus* et se compose des transcrits ARNII (opéron *agrBDCA*) et ARNIII (régulation des gènes de virulence) (Le and Otto, 2015; Otto, 2013). L'opéron *agrBDCA* code quatre protéines : AgrB, AgrD, AgrC et AgrA. Le précurseur du peptide auto-inducteur est ArgD qui va être maturé par l'endopeptidase membranaire AgrB ; celle-ci est responsable de l'ajout d'une thiolactone, du clivage de la région C-terminale et de l'export vers le milieu extérieur. Le PAI va s'accumuler dans le milieu extérieur de la bactérie jusqu'à atteindre une concentration seuil. Lorsque cela se produit, le PAI va se fixer sur AgrC, une histidine kinase membranaire, ce qui va entraîner une cascade de phosphorylations, résultant en l'activation de AgrA. Enfin, la protéine AgrA se lie aux promoteurs de ARNII et ARNIII pour induire leur transcription.

LE GÉNOME ET LES ÉLÉMENTS GÉNÉTIQUES MOBILES : Le génome de *S. aureus* est un chromosome circulaire d'environ 2 800 kb (Lowy, 1998). Il contient tous les gènes nécessaires à la survie (métabolisme, réplication...). De nombreux éléments génétiques mobiles complètent l'ADN, et participent à l'adaptation de la bactérie à son environnement (résistance, virulence...). On retrouve des séquences de prophages, des transposons, des îlots de pathogénicité, des plasmides et des cassettes chromosomiques staphylococciques. Ils peuvent être transmis horizontalement ou verticalement (Alibayov et al., 2014; Malachowa and DeLeo, 2010) :

- **Les plasmides :** Ce sont des molécules d'ADN auto-répliquantes de petite taille (5 kb à 60 kb), *S. aureus* peut en posséder plusieurs différents par cellule. Ils confèrent la résistance à la pénicilline (*blaZ*, *blaI*, *blaR1* pour la bêta-lactamase), à la vancomycine (*vanA*) ou encore à certains métaux comme le cadmium (*CadA,B* et *CadD,X*) et le mercure (opéron *mer*), et ils peuvent également coder des toxines comme ETB (*pETB*, *pRW001*).
- **Les bactériophages :** Il s'agit de prophages qui s'insèrent dans le chromosome de l'hôte ou dans un plasmide, de taille variée allant de 10 à 45 kb. Ils codent des facteurs de virulence : entérotoxines, Leucocidine de Panton et Valentine (ϕ Sa2mw, ϕ PVL108, ϕ Sa2, ϕ Sa2USA300, ϕ SLT, ϕ PVL, ϕ SLT-USA300_TCH1516, ϕ tp310-1, ϕ 2958PVL), toxine exfoliative A (ϕ ETA, ϕ ETA2, ϕ ETA3), inhibiteur du système du complément comme SAK (15 ϕ), SCIN (13 ϕ) ou CHIPS (12 ϕ)...

- **Les îlots génomiques et de pathogénicité** : Ce sont des éléments génétiques mobiles distincts sur le chromosome des bactéries à Gram positif et négatif, d'environ 14 à 17 kb. Ils codent certaines entérotoxines (ex : SEG, SEI, SEM, SEN, SEO : $\nu SA\beta$), l'Hémolysine α ($\nu SA\gamma$), LukE/LukD ($\nu SA\beta$) ou encore TSST-1 (SaPI1, SaPI2, SaPIbov1, SaPI3, SaPI_{n1/m1}).
- **Les cassettes chromosomiques staphylococciques** : Il s'agit d'un fragment d'ADN de 0,1 à 34 kb qui s'insère dans le chromosome de *S. aureus*, lui conférant la résistance aux antibiotiques (méthicilline : SCC mec) et d'autres facteurs de virulence (polysaccharide capsulaire : SCC $cap1$).

1.1.1 Les pathologies associées

Trente pour cent de la population est porteuse saine de *S. aureus* au niveau des zones humides de la peau comme le périnée, l'intérieur des poignets, la base du cou, les aisselles ou le nez. En cas de bactériémie, le risque de mortalité est inférieur parmi les porteurs sains par rapport aux non porteurs (Rasigade and Vandenesch, 2014). Toutefois, lors d'une rupture de la barrière épithéliale ou d'un bouleversement de l'équilibre immunitaire, la bactérie peut devenir pathogène et causer de nombreuses pathologies affectant l'ensemble du corps (Chessa et al., 2015; Tong et al., 2015) :

- Système vasculaire et cœur : bactériémie, septicémie, endocardite.
- Peau et tissus mous : impétigo, abcès, fasciite nécrosante, pyomyosite, panaris.
- Os et articulations : ostéomyélite, arthrite septique.
- Système respiratoire : pneumonie nécrosante, infections pleuropulmonaires.
- Système nerveux : méningite, abcès.
- Système digestif et urinaire : intoxication alimentaire, infection urinaire, pyélonéphrite.
- Matériel médical implanté : infection sur prothèses, cathéter, valve artificielle, drains...

S. aureus est la cause la plus commune des infections acquises à l'hôpital avec *E. coli* et *P. aeruginosa* (Grumann et al., 2014), ce qui est particulièrement préoccupant en raison du nombre croissant de souches résistantes aux antibiotiques, comme celles à la méthicilline (*Staphylococcus aureus* Résistant à la Méthicilline : SARM) (Foster, 2004). Près de 90 % des souches de *S. aureus* sont résistantes à la pénicilline, car la bactérie a acquis une pénicillinase (Batard et al., 2005; Malachowa and DeLeo, 2010). Les SARM sont résistants à tous les antibiotiques du groupe bêta-lactamine, ils émergent au début des années soixante pour devenir un problème de santé publique dans les années quatre-vingt (Rasigade and Vandenesch, 2014). Dans certaines régions d'Afrique, plus de 80 % des souches sont résistantes à la méthicilline tandis qu'en France cela concerne 29 à 38 % des souches hospitalières et 11 à 15 % des souches communautaires (Batard et al., 2005; Chessa et al., 2015).

1.1.2 Traitements et vaccination

Responsable de 15 à 23 % des bactériémies à l'hôpital en France, le traitement repose principalement sur la prise en charge du choc septique, le traitement chirurgical de la zone d'entrée ou des foyers

septiques et sur une antibiothérapie (Batard et al., 2005). Le traitement de première intention d'une souche résistante est l'utilisation de glycopeptides comme la vancomycine, mais il existe également une résistance à cet antibiotique par le gène *vanI* probablement transféré d'*Enterococcus spp.* Le linézolide est également utilisé, il est bactériostatique, mais un nombre croissant de souches sont devenues résistantes. En France, c'est aussi le cas de la rifampicine car une grande partie des souches sont devenues insensibles (Batard et al., 2005). La daptomycine est un antibiotique de la nouvelle classe des lipopeptides et a une activité bactéricide rapide, il est utilisé en recours lors d'une infection par un SARM, car il n'a pas de résistances croisées avec les autres classes d'antibiotiques (Alder, 2008).

Le développement de vaccins est une piste étudiée pour lutter plus efficacement contre *S. aureus*, comme il en est aussi question pour *Neisseria meningitidis* ou *Streptococcus pneumoniae*. Ces vaccins devraient permettre une réponse immunitaire efficace. Des essais de vaccins dirigés contre *S. aureus* ont été menés avec une sélection efficace des antigènes et les phases pré-cliniques sur les animaux ont été passées. Pourtant, en phase clinique, les vaccins n'ont pas montré de résultats satisfaisants. Les raisons de cet échec peuvent être le nombre élevé d'antigènes différents à la surface de la bactérie ainsi que la redondance dans ses facteurs de virulence, aux fonctions comparables mais d'une antigénicité différente (Rasigade and Vandenesch, 2014). De plus, la majorité de la population possède une immunité anti-*S. aureus*. En effet, il s'agit d'un pathogène commensal ayant une stratégie d'inhibition des défenses immunes très développée car il cible la première ligne de cellules immunitaires. Enfin, le vaccin nécessite plusieurs semaines pour construire une immunité opérationnelle, ce qui n'est pas compatible avec une infection nosocomiale. Il faudrait cibler plus précisément les lymphocytes T qui peuvent induire rapidement la sécrétion d'anticorps après une seule immunisation, surtout lorsque l'antigène est couplé avec un ligand comme les Toll-Like Receptor (TLR) (Rasigade and Vandenesch, 2014; Wang et al., 2015; Yeaman et al., 2014; Yu et al., 2014).

1.1.3 Biofilms et cycle de vie de la bactérie

S. aureus peut adopter différents états pendant son cycle de vie. La forme planctonique permet à la bactérie de disséminer et de coloniser l'organisme hôte au moyen de facteurs comme les adhésines. La forme sessile, quant à elle, adhère à une surface organique ou non, afin de former un biofilm capable de protéger la colonie du système immunitaire et des antibiotiques. Un biofilm se définit par une communauté de microorganismes fixée à un substrat et qui sécrète une matrice extracellulaire de polymères. La plaque dentaire en est un exemple. Fréquemment, les biofilms colonisent le matériel médical comme les cathéters, les valves artificielles ou les prothèses. Ils jouent un rôle important dans le développement des infections nosocomiales. Les biofilms à *S. aureus* ne semblent pas associés à d'autres espèces et il serait même rare de trouver plus d'une souche dans l'infection (Otto, 2008). Ceci serait dû au quorum-sensing qui inhibe l'expression des facteurs de virulence d'autres espèces.

Dans un modèle de biofilm *in vitro*, quatre états se distinguent chez *S. aureus* : croissance anaérobie, fermentation, dormance (persistance et faible croissance) et mort (Archer et al., 2011). Afin de garantir

l'intégrité des bactéries, la matrice extracellulaire permet la séquestration et la concentration des nutriments (carbone, phosphate...), mais également l'évasion du système immunitaire et des antibiotiques pour que la bactérie puisse proliférer et disséminer.

Le biofilm comporte trois phases : attachement, maturation et détachement (Figure I.2) (Archer et al., 2011; Mootz et al., 2015; Otto, 2008, 2013) :

ATTACHEMENT : Sur des surfaces abiotiques (ex : matériel médical, plastique...), l'attachement est dépendant des caractéristiques du matériel et de la surface des bactéries (acide téichoïque, autolysine), et se fait par des liaisons hydrophobes ou des interactions électrostatiques. Sur des surfaces biotiques (ex : tissus humains), le mécanisme est différent et les interactions plus spécifiques, comme avec l'expression de la protéine ancrée à la surface Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMM). Une douzaine de MSCRAMM est exprimée avec la capacité de lier les protéines de la matrice extracellulaire, par exemple le fibrinogène (coagulation et stimulation de l'angiogenèse) ou la fibronectine (adhérence des cellules). Ils font partie des facteurs d'adhésion de la bactérie qui sont liés covalamment à son peptidoglycane, nommés également Cell Wall-Anchored (CWA) (Foster et al., 2014). Pas moins de 24 CWA peuvent être exprimés par *S. aureus* et ils sont retrouvés également chez d'autres staphylocoques comme ceux à coagulase négative (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus lugdunensis*), mais en plus faible nombre. La variété des CWA chez *S. aureus* est relativement limitée, cependant chaque molécule peut avoir plusieurs rôles et il y a également une certaine redondance entre ces facteurs d'adhésion. Ces CWA sont classés en famille par leur structure et les MSCRAMM en sont une.

MATURATION : C'est le processus d'adhésion qui lie les bactéries ensemble pendant la prolifération. Il s'effectue grâce au Polysaccharide Intercellular Adhesin (PIA), un exopolysaccharide indispensable à la formation du biofilm qui permet l'adhésion. Le PIA et d'autres polymères comme l'acide téichoïque forment la matrice extracellulaire, agissant comme une glue chargée positivement qui adhère aux cellules chargées négativement. De plus, cette charge positive de la matrice empêche l'action des peptides antimicrobiens cationiques. La structuration du biofilm permet une apparence tridimensionnelle des biofilms matures avec une forme caractéristique en champignon. Entre ces structures en champignon, des canaux de fluides permettent la délivrance de nutriments dans les différentes couches du biofilm.

DETACHEMENT : C'est l'étape cruciale pour la dissémination de la bactérie vers d'autres sites de colonisation. Les facteurs participant au détachement sont : des forces mécaniques (flux sanguin), l'arrêt de la production du matériau du biofilm (exopolysaccharide) et des enzymes ou des surfactants détruisant la matrice. Ce mécanisme semble être contrôlé par le quorum-sensing Agr.

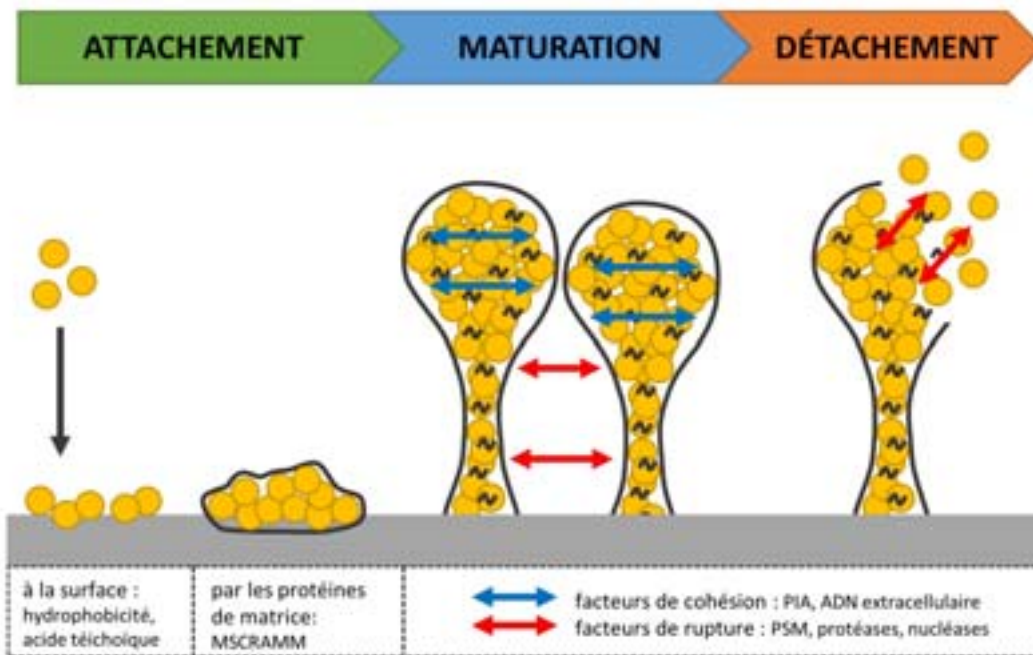


Figure I.2 – Étapes de formation d'un biofilm

L'augmentation de la mortalité cellulaire dans l'hôte influe également sur le biofilm. En effet, le relargage d'ADN après la lyse de la cellule hôte permet de lier des molécules de la matrice (PIA, acide téichoïque...) et peut contribuer au développement du biofilm (Otto, 2008). De plus, la résistance accrue aux antibiotiques dans les biofilms est due à leur diffusion limitée, aux répulsions électrostatiques ou à la séquestration des antibiotiques par les polymères de surface.

1.1.4 Vers l'évasion du système immunitaire

Staphylococcus aureus est une bactérie sécrétant une grande quantité de molécules qui vont faciliter sa dissémination à l'intérieur de l'hôte, mais également sa virulence. Elle cible majoritairement les cellules du système immunitaire afin d'éviter la réponse lymphocytaire : système du complément, phagocytose, sécrétion de peptides antimicrobiens...

LE SYSTÈME DU COMPLÉMENT : Composé de 35 protéines circulantes dans le sang et sécrétées principalement par le foie, le système du complément est un composant majeur de l'immunité innée. Il permet la destruction d'agents infectieux, l'élimination des complexes immuns et la réponse inflammatoire. Le système du complément connaît trois voies d'activation distinctes (Figure I.3) :

- **La voie classique :** Elle est initiée par la fixation de C1q au fragment Fc des immunoglobulines et permet la formation de la C3 convertase classique.
- **La voie des lectines :** Activée par les structures carbohydrates des microorganismes comme le mannose, elle permet grâce à la Mannan Binding Lectin (MBL) de former la C3 convertase classique.

- **La voie alterne** : Certaines molécules comme le LPS des Gram négatifs ou tout simplement les Gram positifs, les virus ou des cellules mutantes, vont permettre à C3b de s'associer avec Bb, formant ainsi la C3 convertase alterne.

Une fois la C3 convertase formée, classique ou alterne, celle-ci peut cliver le C3 en C3a et C3b. L'association du C3b avec la C3 convertase forme la C5 convertase, classique ou alterne, qui peut alors cliver le C5 en C5a et C5b. Le C5a est une anaphylatoxine qui se lie au C5aR et au C5L2 pour activer la cellule tandis que le C5b forme, avec C6, C7, C8 et C9, le Complexe d'Attaque Membranaire (CAM) permettant la lyse de la cellule. Le système du complément permet également, par la libération de ses anaphylatoxines (C3a, C5a...) entre autres, de potentialiser l'inflammation et d'aider à la clairance des pathogènes en lisant la cellule. Il a également un rôle de chimioattraction et d'opsonisation.

La régulation se fait par le facteur H qui contrôle la dissociation de la C3 convertase alterne, mais également par le facteur I qui dégrade C3b. De plus, le Decay Accelerating Factor (DAF) inhibe les convertases C3 et C5. Enfin, le CAM est sous le contrôle de la protéine S et de CD59 qui empêchent la formation du complexe sur la membrane et la polymérisation de C9.

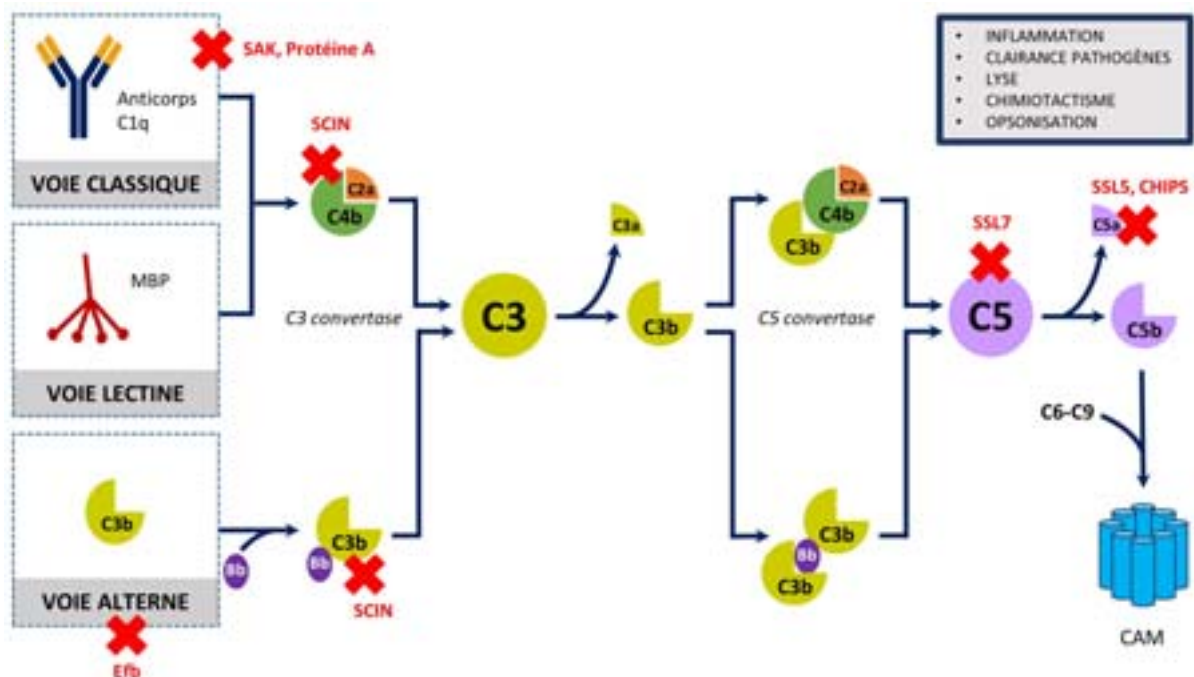


Figure I.3 – Système du complément

Trois voies d'activation différentes permettent d'activer le système du complément. 1) Voie classique. Après l'association de C1q au fragment Fc, il va y avoir une activation de deux estérases associées à C1q, C1r et C1s. C1s clive les peptides C2 et C4 qui se trouvent dans le plasma en deux sous-unités : C2a, C2b, C4a et C4b. Le C4b ainsi formé va s'associer au C2a pour former la C3 convertase classique. 2) Voie des lectines. Les mannoses à la surface des pathogènes vont s'associer à la MBL (Mannan Binding Lectin) qui est liée à des estérases clivant le C2 et le C4. De même que dans la voie classique, le C2a et le C4b s'associent pour former la C3 convertase classique. 3) Voie alterne. Certains pathogènes vont permettre au C3b de se lier au facteur B qui peut alors être clivé par le facteur D circulant en Ba et Bb. Bb peut alors s'associer à C3b pour former la C3 convertase alterne. La C3 convertase permet le clivage de C3 en C3a et C3b. C3a est une anaphylatoxine se liant au C3aR et le peptide C3b va s'associer à la C3 convertase pour former la C5 convertase pour le clivage de C5. Le C5a est une autre anaphylatoxine qui se lie à C5aR et C5L2. C5b s'associe à C6, C7 et C9 tandis que C9 se polymérise pour former un pore transmembranaire, autrement nommé le complexe d'attaque membranaire (CAM).

S. aureus sécrète un certain nombre de facteurs inhibant le système du complément. Ainsi, la Staphylokinase (SAK) et la protéine A inhibent la voie classique et la Extracellular fibrinogen binding protein (Efb), la voie alterne. Le Staphylococcal Complement Inhibitor (SCIN) empêche l'action des C3 convertases. Enfin, le Staphylococcal Superantigen-Like 7 (SSL7)

prévient le clivage du C5 ; le SSL5 et le Chemotaxis Inhibitory Protein of *Staphylococcus aureus* (CHIPS) empêche le C5a de se fixer sur son récepteur, le C5aR.

→ **Évasion du système du complément :** *S. aureus* sécrète un large panel de facteurs de virulence permettant d'inhiber le système du complément (croix rouges, Figure I.3) (de Haas et al., 2004; Jongerius et al., 2010; McGuinness et al., 2016; Serruto et al., 2010; van Wamel et al., 2006) : Le Chemotaxis Inhibitory Protein of *Staphylococcus aureus* (CHIPS) est une protéine inhibant la chimioattraction des neutrophiles et des monocytes, ainsi que la phagocytose, en antagonisant directement le C5aR et le Formyl Peptide Receptor (FPR). Le gène codant CHIPS est localisé sur un bactériophage qui code également le Staphylococcal Complement Inhibitor (SCIN), la Staphylokinase (SAK) et les entérotoxines A et P. SCIN inhibe la C3 convertase et la phagocytose alors que SAK détache le C3b de la surface de la bactérie dans la voie alterne, tout comme la Extracellular fibrinogen binding protein (Efb). Le Staphylococcal Superantigen-Like 7 (SSL7) prévient le clivage de C5, alors que le SSL5 se lie au C5aR pour empêcher la fixation du C5a sur son récepteur. La protéine A est ubiquitaire et fait partie des CWA : elle lie la partie Fc des immunoglobulines. Les anticorps ainsi fixés ne peuvent plus interagir avec le récepteur des IgG qui reconnaît le fragment Fc. La conséquence en est une inhibition de l'opsonisation et donc de la phagocytose. La protéine A se fixe également aux lymphocytes B et inhiberait la réponse mémoire du système immunitaire. De plus, ce facteur de virulence a une action pro-inflammatoire, comme cela a été montré dans un modèle de pneumonie à staphylocoque sur souris, car la protéine A se lie au Tumour Necrosis Factor Receptor 1 (TNFR1) sur l'épithélium pulmonaire.

Il y a des homologies de séquence entre plusieurs de ces facteurs, CHIPS est composé d'une hélice α entourée de quatre feuillets β anti-parallèles ; ce motif est également présent dans la partie C-terminale de SSL5 et SSL7 (Bestebroer et al., 2007). La famille SSL a des similarités avec les superantigènes des staphylocoques et des streptocoques. Cette famille se compose de 7 à 11 SSL différents pour les staphylocoques et présente des homologies de séquence variant de 36 % à 67 %.

LA PHAGOCYTOSE ET LES PEPTIDES ANTIMICROBIENS : Les cellules phagocytaires sont les macrophages, les monocytes et les neutrophiles (Doherty and McMahon, 2009). La reconnaissance des pathogènes se fait par les récepteurs Pattern Recognition Receptors (PRR) (ex : TLR) et ceux à l'opsonine. Ils lient les Pathogen-Associated Molecular Pattern (PAMP) et permettent la surveillance immunitaire. Quand un microorganisme est opsonisé par le système du complément, il est phagocyté dans la cellule dans une vésicule appelée phagosome (Gordon, 2016). Ensuite, le phagosome va fusionner avec un lysosome pour former un phagolysosome, afin d'aboutir à la dégradation de son contenu grâce au pH acide et aux enzymes lysosomiales. Au cours de la phagocytose, la NADPH oxydase est activée et produit les dérivés réactifs de l'oxygène (DRO). De plus, les neutrophiles contiennent des granules de sécrétion qui fusionnent également avec le phagosome. La bactérie se trouve ainsi en contact avec des peptides antimicrobiens (PAM) qui sont la première ligne de défense de

l'immunité innée de la peau humaine. Deux groupes se distinguent chez l'homme : les défensines et les cathélicidines. Les PAM sont tous chargés positivement, excepté la dermicidine isolée dans la sueur humaine (Joo and Otto, 2015). De plus, ils permettent l'élimination des pathogènes de par leur action antimicrobienne, antifongique ou antivirale. Leur mécanisme d'action est encore mal connu, mais les défensines semblent se fixer à la surface du microorganisme sous forme de pores multimériques, entraînant ainsi la lyse du pathogène (Jonard et al., 2006).

→ **Évasion de la phagocytose et des peptides antimicrobiens :** Cet effet est en partie assumé par les mêmes peptides que ceux inhibant le complément (SCIN, CHIPS...), mais d'autres molécules y ont également un rôle (Joo and Otto, 2015; McGuinness et al., 2016) : la catalase, les superoxyde dismutases M et A et la staphyloxanthine inhibent les DRO ; l'aminoacylation du phosphatidylglycérol de la membrane cytoplasmique de la bactérie (gène *mprF*) diminue les charges négatives à la surface et inhibe l'attraction des PAM cationiques ; l'ajout d'une D-alanine par l'opéron *Dlt* sur les acides téichoïques charge positivement la membrane de la bactérie et empêche la fixation des PAM cationiques. Également, la Extracellular adherence protein (Eap) inhibe les sérines protéases (élastase de neutrophile, cathepsine...) et les superantigènes modulent les fonctions phagocytaires. Lorsque la bactérie se présente sous la forme d'agrégats en biofilm, l'exopolymère protège du système immunitaire.

Lors de sa prolifération et dissémination dans l'organisme, *S. aureus* sécrète une grande quantité de facteurs, considérés comme des éléments de virulence pour l'organisme hôte. Ils permettent à la bactérie de persister sous forme de biofilm, ou d'inhiber le système du complément et la phagocytose. Tous ces éléments facilitent la survie du pathogène. D'autres facteurs de virulence présentent une action offensive vis-à-vis des cellules de l'hôte, ce sont les toxines de *S. aureus*.

1.2 LES TOXINES DE *S. AUREUS*

La stratégie d'adaptation de *S. aureus* utilise de nombreuses molécules, parfois au rôle redondant, afin de permettre la colonisation de son hôte. Certaines toxines vont induire le décollement de l'épiderme de surface, afin de faciliter l'entrée de la bactérie dans le corps de l'hôte, ce sont les épidermolysines.

D'autres voies d'entrée que la peau peuvent être utilisées par *S. aureus* et certaines toxines facilitent ce processus, comme les superantigènes qui ciblent les muqueuses. En effet, l'ingestion d'aliments contaminés avec les entérotoxines entraîne une intoxication alimentaire sévère en sensibilisant la paroi intestinale. Quant à la toxine TSST-1, elle traverse la couche épithéliale des muqueuses et est responsable du syndrome du choc toxique.

1.2.1 Les épidermolysines

Les épidermolysines, ou « Exfoliative Toxins » (ET), forment une famille de molécules impliquées dans le « Staphylococcal Scalded Skin Syndrome » (SSSS), une dermatose bulleuse. Elle est causée par les

variants ETA ou ETB, qui peuvent également provoquer l'impétigo bulleux, préférentiellement sur les nouveau-nés. Les ET ont une activité sérine protéase et hydrolysent la desmogléine-1 des desmosomes des jonctions adhérentes dans les couches superficielles de la peau (Prévost et al., 2003). Ceci entraîne ainsi le clivage de l'épiderme de surface, et un décollement de la peau qui facilite l'invasion bactérienne par *S. aureus*. Les plus fréquentes sont ETA et ETB, respectivement codées par un bactériophage et un plasmide, tandis que ETD se situe sur un îlot de pathogénicité. Les ET sont exprimés par 10 % des souches SARM et présentent de 35 % à 50 % d'identité (Grumann et al., 2014). Leur expression est régulée par le quorum-sensing Agr. D'autres variants sont sécrétés par les staphylocoques à coagulase négative, comme *S. hyicus* qui produit SHETA, SHETB et SHETC, des homologues à ETA, ETB et ETD (Prévost et al., 2003).

1.2.2 Les superantigènes

Cette catégorie rassemble les plus puissants mitogènes de cellules T connus à ce jour. Les superantigènes lient le Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II (CMH II) des cellules présentatrices d'antigènes au T Cell Receptor (TCR) du lymphocyte T (L_T). Chaque superantigène interagit avec un répertoire de TCR déterminé par la séquence variable $V\beta$ du TCR. Le génome humain code pour environ 50 TCR $V\beta$ différents et environ 20 % des L_T peuvent être activés par un superantigène donné. De plus, chez l'Homme, l'expression des $V\beta$ varie en nombre et en proportion selon les individus et leur condition. Certains peuvent même stimuler les L_T à des concentrations de l'ordre de la femtomole, et ils effectuent cette stimulation sur une large fraction de L_T , simultanément.

Les superantigènes ont une taille de 19 à 30 kDa et sont codés pour la plupart par des îlots de pathogénicité, sauf SEA qui est localisé sur un bactériophage, SED qui se trouve sur un plasmide et SE/X qui se situe sur le chromosome de *S. aureus* (Spaulding et al., 2013; Stach et al., 2014).

Parmi ces superantigènes, on retrouve deux grands groupes, les entérotoxines et la TSST-1 (Grumann et al., 2014) :

ENTÉROTOXINES : Suite à l'ingestion d'une ou plusieurs Staphylococcal Enterotoxins (SE) présentes sur un aliment contaminé par *S. aureus*, une intoxication alimentaire survient en provoquant des vomissements accompagnés de nausée, de douleurs abdominales ou encore de diarrhées. Les toxines sont extrêmement stables aux fortes températures et résistantes au faible pH, persistant ainsi à la cuisson et à la digestion. C'est pourquoi, elles entraînent une intoxication alimentaire après ingestion de nourriture contaminée. On retrouve plusieurs formes d'entérotoxines : SEA à SEE, SEG à SEJ et SER à SET.

SEI : Les Staphylococcal Enterotoxin-like (SEI) sont semblables aux entérotoxines SE de par leur séquence d'acides aminés, mais leur activité émétique n'a pourtant pas été confirmée chez l'Homme. Ils regroupent les SE/K à SE/Q et les SE/U à SE/X. Cependant, il est à noter que le potentiel émétique des toxines SE/K à SE/Q a été démontré sur un modèle de primate (Omoe et al., 2013).

TSST-1 : La Toxic Shock Syndrome Toxin-1 (TSST-1) est une toxine responsable du syndrome du choc toxique (Toxic Shock Syndrome : TSS), une pathologie aiguë caractérisée par de fortes fièvres, une éruption érythémateuse diffuse, une hypotension, et l'implication d'au moins trois systèmes d'organes. La TSST-1 a été révélée au public dans les années quatre-vingt en raison de son implication dans le syndrome du choc toxique menstruel (Menstrual-related Toxic Shock Syndrome : MTSS) (Murray, 2005). En effet, la toxine se caractérise par sa capacité à traverser les muqueuses, car elle se lie aux cellules épithéliales dans lesquelles elle est rapidement endocytée. Ceci suggérerait que TSST-1 traverse la barrière épithéliale par transcytose (Breshears et al., 2012). De plus, la toxine a une grande solubilité dans l'eau et est très souvent résistante à la chaleur et à la protéolyse, mais est sensible au pH (Dinges et al., 2000)

À l'intérieur de l'organisme, *S. aureus* peut sécréter d'autres toxines ciblant de manière générale les cellules de l'immunité. Ces molécules circulantes sont les Hémolysines et les Leucotoxines. Les Hémolysines doivent leur nom au fait qu'elles ont une action hémolytique sur les globules rouges et l'appellation de « Leucotoxine » met en avant l'effet de ces toxines pour les leucocytes.

1.2.3 L'Hémolysine β

Il s'agit d'une sphingomyélinase qui hydrolyse la sphingomyéline, un lipide présent sur la membrane plasmique de la cellule. Des modifications des microdomaines sont ainsi faites, qui peuvent entraîner la mort cellulaire par la déstabilisation de la bicouche lipidique. Une lyse des globules rouges a pu être observée à faible température, suggérant une activité lytique, mais cette protéine semble moins efficace que les autres Hémolysines (Vandenesch et al., 2012). Elle est codée par un bactériophage présent dans un faible nombre de souches de *S. aureus* d'origine humaine. Son rôle dans la virulence de la bactérie n'est pas clairement établi, mais elle serait plutôt liée aux souches d'origine animale ou faciliterait la formation de biofilm (Huseby et al., 2010).

1.2.4 Les toxines formant des pores

Certaines toxines ou protéines peuvent former des pores à membrane, ce qui résulte en la lyse de la cellule cible. Chez *S. aureus*, on retrouve plusieurs toxines de ce genre. Deux classes forment ce groupe : les toxines formant des pores (TFP) à un composant et celles à deux composants.

HÉMOLYSINE δ : C'est un petit peptide de 20 à 25 acides aminés avec une structure en hélice alpha qui est codé par le génome central (Grumann et al., 2014). Toutes les souches ont ce gène. Il n'y a pas de récepteur spécifique, mais l'Hémolysine δ a une grande affinité pour les lipides présents sur les radeaux lipidiques (Vandenesch et al., 2012). Son activité hémolytique pourrait s'expliquer par sa liaison à la surface et son agrégation jusqu'à former un pore transmembranaire. Elle pourrait également avoir une action sur la courbure de la membrane ou aurait une action de détergent à hautes concentrations. Une famille de molécules semblables par leur structure et leurs effets est celle des Phenol-Soluble

Modulins (PSM). Largement diffusées dans le genre *Staphylococcus*, ces molécules peuvent aussi avoir un rôle de bactériocine (Joo et al., 2011).

HÉMOLYSINE α : Cette toxine est la mieux caractérisée chez *S. aureus* et est codée par des gènes présents sur l'ADN chromosomique. Monomère de 33 kDa, elle est exprimée par 95 % des souches (Grumann et al., 2014). Sept monomères d'Hémolysine α (2 x 7 brins β) s'assemblent en un tonneau β pour former un pore heptamérique d'un diamètre de 14 Å à la surface de la cellule ; ce pore permet le transport de petites molécules inférieures à 2 kDa (K^+ , Ca^{2+}) et entraîne la lyse osmotique (Song et al., 1996; Vandenesch et al., 2012). L'Hémolysine α lyse une grande variété de cellules : épithélium, érythrocytes, fibroblastes, monocytes, macrophages, lymphocytes, mais pas les neutrophiles (Grumann et al., 2014). Les érythrocytes humains sont moins sensibles que ceux de lapin et la lyse des lymphocytes et des monocytes est maximale à 100 ng/mL. Les granulocytes sont résistants et il n'y a pas de lyse même à une concentration élevée de 10 μ g/mL (Vandenesch et al., 2012). Suite à la liaison de la toxine à la cellule et la formation de pores, des enzymes sont activées et dégradent l'E-cadhérine des jonctions adhérentes épithéliales, ce qui entraîne une destruction de l'intégrité de l'épithélium, idéale pour l'invasion bactérienne (Inoshima et al., 2011). De plus, l'Hémolysine α est pro-inflammatoire, elle induit la sécrétion de cytokines comme l'IL-8 (Rose et al., 2002).

LEUCOTOXINES : Toxines à deux composés, les leucotoxines sont également des toxines formant des pores...

2 LES LEUCOTOXINES

2.1 GENERALITES

C'est en 1894 que commence l'histoire des leucotoxines, nommées leucocidines par Honoré Van de Velde en référence à leur activité lytique sur les leucocytes. Il faudra cependant attendre la fin de la Première Guerre mondiale pour que l'existence de plusieurs toxines soit mise à jour par Louis Juliannelle en 1922 et soutenue plus tard par Philip Panton et Francis Valentine en 1932 lors de leurs tests sur une vingtaine de souches de *S. aureus* (Panton and Valentine, 1932). Dans cette étude, ils ont également montré l'implication des souches à faible activité hémolytique et forte activité leucotoxique dans les pathologies cutanées (furoncles) et les infections aiguës (abcès, ostéomyélites). Enfin, en 1936 la « vraie » leucocidine décrite par les deux scientifiques est nommée Leucocidine de Panton et Valentine (LPV) par J. Wright (Wright, 1936). À partir de ce moment-là, les autres leucocidines se distinguent enfin et apparaissent alors l'Hémolysine α , β et γ , puis l'Hémolysine δ une vingtaine d'années plus tard. Aujourd'hui, la famille des leucotoxines s'est élargie et compte ainsi les Hémolysine γ HlgA/HlgB et HlgC/HlgB, la Leucocidine de Panton et Valentine (LukS-PV/LukF-PV), LukA/LukB (nommée aussi LukG/LukH), LukE/LukD et LukM/LukF'-PV. Des leucotoxines sont également sécrétées par des staphylocoques à coagulase négative. C'est le cas de LukS-I et LukF-I probablement exprimés par toutes les souches de *Staphylococcus intermedius*, mais également par *Staphylococcus pseudointermedius*, *Staphylococcus delphini* et *Staphylococcus pettenkoferi* (Ben Zakour et al., 2012; Prévost et al., 1995a; Riegel et al., 2011)

Les deux sous-unités qui composent les leucotoxines sont nommées S et F pour « Slow » et « Fast », en référence à leur vitesse d'élution sur la colonne échangeuse d'ions qui permet de les purifier (Woodin, 1959). Les gènes codant ces composés sont disposés en tandem, celui codant la protéine S est en amont de celui codant la protéine F et ils sont co-transcrits. La sous-unité de classe S est généralement de 31 à 32 kDa tandis que F a une taille de 34 à 35 kDa (Prévost, 1999). LukE et LukD ont été cristallisées et les structures tridimensionnelles de HlgB, LukF-PV et LukS-PV ont été obtenues par diffraction aux rayons X (Galy et al., 2012; Guillet et al., 2004; Joubert et al., 2006; Nocadello et al., 2016; Olson et al., 1999; Pédelacq et al., 1999; Yamashita et al., 2011). Une structure commune aux sous-unités des leucotoxines a ainsi pu être proposée (Figure I.4) et se constitue de trois domaines principaux :

- **Domaine central, « core »** : C'est un sandwich β constitué de deux fois six brins β antiparallèles et constituant le cœur de la sous-unité.
- **Domaine « rim »** : Il s'articule autour de quatre brins β antiparallèles et sert d'ancrage à la membrane de la cellule.
- **Domaine « stem »** : Formé de trois brins antiparallèles, il se déploie dans la membrane pour former le pore.

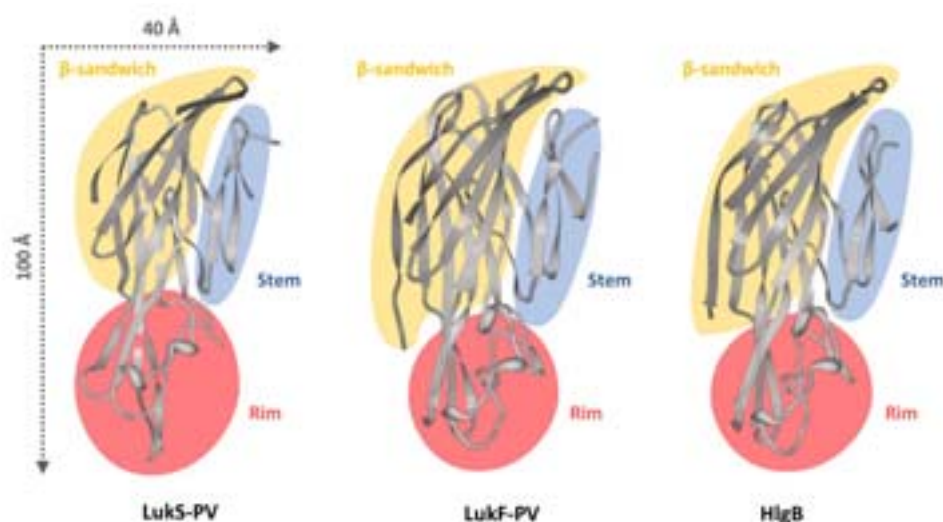


Figure I.4 – Structure tridimensionnelle des sous-unités de la LPV et de HlgB

LukS-PV (pdb : 1T5R, Guillet et al., 2004), LukF-PV (pdb : 1PVL, Pédelacq et al., 1999), HlgB (pdb : 1LKF, Olson et al., 1999).

À l'intérieur d'une même classe de sous-unité, S ou F, il peut y avoir jusqu'à 60 à 80 % d'identité de séquence. Seul LukA/LukB ne partage pas le même pourcentage d'identité que les autres, mais seulement 30 à 40 % (DuMont et al., 2013; Yoong and Torres, 2013). De plus, n'importe quelle sous-unité S peut s'associer à n'importe quelle autre sous-unité F pour former une nouvelle leucotoxine. Les leucotoxines peuvent lyser les cellules de la lignée myéloïde (monocytes, macrophages, neutrophiles...) pour permettre l'évasion du système immunitaire par *S. aureus*. Toutefois, lorsque les sous-unités ne sont pas associées, il n'y a pas de toxicité (Grumann et al., 2014).

2.1.1 L'Hémolysine γ (AB et CB)

Les gènes codant ces deux toxines sont situés sur le même locus, présent sur le chromosome de *S. aureus*, et comportent trois Open-Reading Frame (ORF) qui codent pour les sous-unités de classe S (HlgA et HlgC) et la sous-unité de classe F (HlgB) (Cooney et al., 1993). Ces composants peuvent donc s'associer pour former les Hémolysines HlgA/HlgB et HlgC/HlgB. Le locus *hlg* est exprimé par toutes les souches de *S. aureus*, ce qui ne permet pas de mettre en évidence une pathologie spécifique (Mahoudeau et al., 1997; Prévost et al., 1995b). Cependant, il a été démontré qu'elles participaient à l'inflammation dans le cas de l'endophtalmie simulée chez le lapin (Supersac et al., 1998). De plus, elles seraient partiellement impliquées dans la virulence pendant l'arthrite septique et l'infection systémique chez la souris. Enfin, le monoganglioside GM1 semblerait inhiber la mort cellulaire liée à l'Hémolysine γ (Spaan et al., 2014).

2.1.2 La Leucocidine de Pantone et Valentine

Les gènes codant la Leucocidine de Pantone et Valentine (LPV) se trouvent sur plusieurs bactériophages et s'organisent en opéron avec, en amont, le gène de la protéine de classe S (LukS-PV) et en aval celui codant la protéine de classe F (LukF-PV) (Cooney et al., 1993; Malachowa and DeLeo, 2010). Les deux

gènes sont séparés par une seule base, une thymine (Prévost et al., 1995b). Cette organisation est identique pour LukE/LukD, mais également pour LukA/LukB avec cependant un intervalle entre les gènes de 21 bases. La LPV est responsable de nombreuses pathologies telles que les furoncles, les abcès, les pyomyosites, les ostéomyélites ou encore les pneumonies nécrosantes (Baba-Moussa et al., 2011; Badiou et al., 2008; Diep et al., 2010; Pannaraj et al., 2006). Cependant, le rôle de la LPV dans la pneumonie nécrosante reste à discuter et ce sont les infections de la peau et des tissus mous qui sont les plus fréquentes à l'extérieur de l'hôpital (Grumann et al., 2014). La toxine entraîne également la sécrétion des cytokines IL-8, IL-6, de l'histamine et du leucotriène B4 par les neutrophiles, de même qu'elle augmente la libération de DRO et accélère l'apoptose à une concentration de 1 nM (Graves et al., 2012; Hensler et al., 1994a; König et al., 1995; Staali et al., 1998).

2.1.3 LukA/LukB (nommée également LukG/LukH)

Les gènes *lukA/lukB* semblent se trouver sur le chromosome bactérien et toutes les souches produisent cette toxine (Badarau et al., 2015). Sa structure est différente des autres leucotoxines : LukA (38 kDa) montre une identité de séquence avec les autres composés S d'environ 30 % et LukB (36 kDa) une identité avec les autres composés F d'environ 40 % (Badarau et al., 2015; Dumont et al., 2011). De plus, il y a des différences structurales avec les autres composés, notamment dans le domaine « rim » lorsqu'on compare LukA et HlgA. En effet, l'orientation de la boucle n'est pas la même. LukA/LukB induit la production d'IL-8 comme les autres leucotoxines, mais également d'IL-1 β par l'intermédiaire de l'inflammasome, ce qui a un effet léthal comme montré sur les monocytes (Melehani et al., 2015; Yanai et al., 2014). Ainsi, cette toxine a un rôle dans l'inflammation, ce qui a également été démontré par des études sur la peau de lapin et de singe (Malachowa et al., 2012). Elle induit aussi la NETose et facilite l'évasion de la phagocytose (Grumann et al., 2014; Malachowa et al., 2013). LukA/LukB est plus cytolytique que la LPV, mais l'augmentation du calcium intracellulaire est deux fois plus lente que pour la LPV (Yanai et al., 2014). De plus, aucune activité hémolytique n'a été démontrée, même en associant LukA et LukB avec d'autres composés complémentaires (HlgA, LukS-PV et LukE pour LukB ; HlgB, LukF-PV et LukD pour LukA). Enfin, avec ces associations nouvelles de composés S et F, LukA et LukB ne montrent aucun effet sur l'hémolyse, la cytotoxicité ou l'influx de calcium. Seuls LukA et LukB ensemble entraînent un effet sur la cellule. De plus, cette leucotoxine est sécrétée par la bactérie, mais elle peut également s'associer à sa surface (Ventura et al., 2010).

2.1.4 LukE/LukD

Tout comme LukA/LukB, elle concerne majoritairement les SARM communautaires (Grumann et al., 2014). Toutefois, les études sur la présence du gène codant LukE/LukD se contredisent : tantôt elle concernerait 30 % des souches, tantôt 87 % (Vandenesch et al., 2012). Le locus codant cette leucotoxine est présent sur un îlot de pathogénicité situé sur le chromosome (Grumann et al., 2014). La toxine est pro-inflammatoire et est souvent présente dans l'impétigo lorsque les épidermolysines sont également

produites, et dans des diarrhées associées aux antibiotiques en présence d'entérotoxines (Gravet et al., 1999, 2001).

2.1.5 LukM/LukF'-PV

Les gènes codant cette leucotoxine sont retrouvés chez 27 % à 86 % des isolats d'origine bovine (Haveri et al., 2007; Yamada et al., 2005). Isolée chez les ruminants et d'autres mammifères non humains (souris, chèvre), cette toxine a été retrouvée dans des cas de mammite bovine où elle joue un rôle significatif. Pourtant, il n'y a pas de potentialisation de l'inflammation comme pour les autres leucotoxines et cette toxine n'a pas d'activité notoire sur les cellules humaines (Alonzo and Torres, 2014; Fromageau et al., 2011).

2.2 LES CELLULES CIBLES

Les cibles cellulaires privilégiées des leucotoxines sont les cellules de l'immunité innée, première ligne de défense contre l'infection, et concerne généralement la lignée myéloïde : neutrophiles, macrophages, monocytes...

LES NEUTROPHILES : Ce sont les premières cellules du système immunitaire inné à arriver au site de l'infection et elles sont donc essentielles pour la défense de l'hôte contre un pathogène (McGuinness et al., 2016). Les polynucléaires neutrophiles (PNN) sont produits et maturés dans la moelle osseuse, puis relargués dans le système vasculaire. Ils représentent la majorité des cellules immunitaires circulantes (50 à 75 %), ce qui permet un recrutement rapide dans les tissus infectés grâce aux facteurs chimioattractants (IL-8, C5a...). Après le recrutement, il y aura une activation des intégrines pour permettre une adhésion solide des PNN au tissu. La demi-vie estimée des PNN est de 6 à 12 h dans la circulation sanguine, mais leur phénotype change avec leur vieillissement (Adrover et al., 2016). Par exemple, après plusieurs heures dans la circulation sanguine, l'expression des récepteurs à la surface des neutrophiles est modifiée : le CXCR4 impliqué dans la migration des PNN dans la moelle osseuse et le CD11b sont sur-exprimés tandis que le CXCR2 permettant la chimioattraction et le CD62L sont sous-exprimés. Les PNN contiennent des granules de sécrétion de trois types : les granules primaires (myéloperoxydase, élastase, défensine, lysozyme...), les granules secondaires (collagénase, gélatinase, lactoferrine, lysozyme...) et les granules tertiaires (arginase, lysozyme, gélatinase) (Cheng and Palaniyar, 2013). Ils sécrètent également des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β), des chimioattractants (IL-8, MIP-1) ou d'autres molécules ayant un effet sur l'immunité (interférons, IL-10). La sécrétion de ces composés est régulée négativement par l'interféron γ , IL-3, IL-4 et IL-10, et activée par le leucotriène B₄, le N-Formyl-Met-Leu-Phe (FMLP) ou encore par les signaux des pathogènes (LPS...).

LES MACROPHAGES : Les monocytes produits dans la moelle osseuse circulent dans le sang pendant quelques heures. Ils migrent dans les tissus où ils se différencient en cellules dendritiques ou en

macrophages. Leur durée de vie est de plusieurs mois (Gonzalez-Mejia and Doseff, 2009). Les macrophages phagocytent les pathogènes et les débris, ils permettent aussi la présentation des antigènes aux lymphocytes T. Ils ont également un rôle anti-tumoral (Rey-Giraud et al., 2012). En effet, les macrophages dérivés de monocytes peuvent ainsi être de deux types : M1 et M2. Les macrophages M1 sont différenciés par le Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF) et ont un rôle pro-inflammatoire, microbicide et suppresseur de tumeur. Quant aux macrophages M2, stimulés par le Macrophage-Colony Stimulating Factor (M-CSF), ils permettent la réparation des tissus, le remodelage de la matrice et participent à l'angiogenèse. De ce fait, ils peuvent être promoteurs de tumeurs.

La LPV est ainsi toxique pour ces cellules, à l'exception des lymphocytes. Les cellules de lapin sont tout aussi sensibles que celles humaines, contrairement à d'autres espèces comme les souris ou les rats (Szmigielski et al., 1998). En effet, le modèle murin ne permet pas d'établir une virulence liée à la LPV et il n'y a pas d'activité lytique de la toxine (Alonzo and Torres, 2014). L'insensibilité de la LPV sur certaines espèces, ainsi que sur les lymphocytes, vient du fait de la distribution du récepteur de LukS-PV, le récepteur au C5a, C5aR (Meyer et al., 2009; Spaan et al., 2013). Ainsi, sur les cellules sensibles, la LPV peut lyser les neutrophiles humains et de lapin à des concentrations faibles de l'ordre de 40 ng/mL, mais il faut une concentration mille fois plus importante pour obtenir le même résultat chez la souris ou le langur de Java (Grumann et al., 2014). En effet, le C5aR a une structure différente d'une espèce à l'autre, ce qui change son affinité pour la LPV. Récemment, un nouveau type cellulaire a montré une sensibilité à la toxine : les neurones humains, en particulier les neurones granuleux cérébelleux et les neurones périphériques (Jover et al., 2013).

L'**Hémolysine γ HlgC/HlgB** est hémolytique pour les érythrocytes de mouton, de lapin, de cheval et de l'homme. Elle cible les cellules myéloïdes, mais peut également se fixer à la surface des lymphocytes sans entraîner une lyse (Prévost et al., 2015). Enfin, il a été montré récemment que la toxine a un effet sur les neurones humains, comme pour la LPV (Jover et al., 2013).

L'**Hémolysine γ HlgA/HlgB** a un effet sur les lymphocytes T, contrairement à HlgC/HlgB, et à une plus faible activité lytique sur les érythrocytes en présence de calcium (Prévost et al., 2015). Il s'agit de la leucotoxine la plus active sur les membranes synthétiques (Ferrerias et al., 1998)

LukE/LukD peut cibler les cellules immunitaires murines et de lapin, en plus de celles humaines. Elle vise principalement les neutrophiles, les lymphocytes T, les macrophages, les cellules NK et les cellules dendritiques (Alonzo and Torres, 2014).

La toxine **LukA/LukB** a un effet sur les cellules de l'immunité chez la souris et le lapin, et est beaucoup plus efficace sur ces espèces que sur l'homme (Alonzo and Torres, 2014).

Enfin, la toxicité de la leucotoxine bovine **LukM/LukF'** a été démontrée sur les macrophages et les neutrophiles bovins, mais elle se fixe également sur les neutrophiles, les lymphocytes T et les macrophages de souris (Alonzo and Torres, 2014).

Ainsi, les leucotoxines semblent privilégier la destruction de l'immunité innée pour que la bactérie puisse survivre et disséminer dans l'organisme hôte. Cependant, Jover *et al.* (2013) a montré une sensibilité des neurones granuleux cérébelleux, ainsi que des neurones périphériques à la LPV et à HlgC/HlgB, sans pour autant induire une lyse cellulaire. Ainsi, chaque cellule de l'hôte peut, à priori, être la cible d'une leucotoxine, du moment qu'elle porte à sa surface le récepteur au composé S qui est celui permettant sa fixation (Tawk *et al.*, 2015). Récemment, Prince *et al.* (2016) a montré que des souris avec un système hématopoïétique humain reconstitué étaient sensibles à la LPV, celle-ci augmente la sévérité de l'infection pulmonaire, contrairement à LukA/LukB.

2.3 HYPOTHESES D'ACTION

2.3.1 La formation de pores, un mode d'action historique

Historiquement, les leucotoxines sont considérées uniquement comme des toxines formant des pores, qui entraînent la mort de la cellule par la lyse due au pore membranaire. Ainsi, la protéine de classe S se fixe à la membrane de la cellule tandis que le composé F est recruté secondairement, afin de former un oligomère puis un pore fonctionnel (Figure I.5) (Colin *et al.*, 1994). Cette formation du pore se base sur le modèle plus simple de l'Hémolysine α , car les informations sur les leucotoxines bicomposées sont parcellaires.

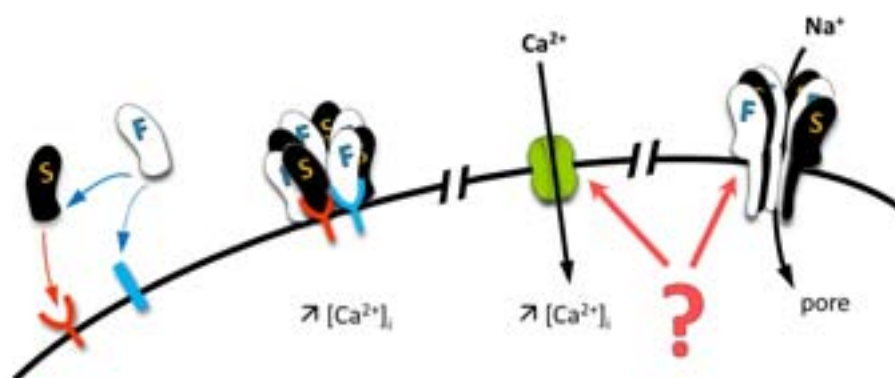


Figure I.5 – Mode d'action historique de la formation d'un pore

Étapes de la formation de pore chez les leucotoxines bi-partites, basé sur le mode d'action de l'Hémolysine α . 1) Fixation sur la membrane. 2) Multimérisation des sous-unités S et F, formation d'un pré-pore. 3) Formation du pore fonctionnel.

FIXATION SEQUENTIELLE A LA MEMBRANE : Les monomères de l'Hémolysine α se lient à la surface de la cellule cible par l'intermédiaire de la métalloprotéase ADAM-10 (Inoshima *et al.*, 2011).

➔ Le prérequis essentiel ici est la liaison du composé S à un récepteur membranaire de la cellule cible. Puis la sous-unité F peut s'associer directement à S ou se fixer d'abord sur un récepteur spécifique avant d'entrer en interaction avec la protéine S (Colin *et al.*, 1994; Meyer *et al.*, 2009). Pour LukS-PV et HlgC, il y a une compétition sur le site de liaison, le C5aR, et HlgC peut inhiber LukS-PV avec un K_i de 0,18 nM (Tawk *et al.*, 2015).

FORMATION DU PRE-PORE ET ENTREE DU CALCIUM : Les sous-unités de la toxine α s'organisent sur la membrane pour former une structure de transition appelée pré-pore et constituée de sept protéines. À cette étape, la région « stem » n'est pas encore déployée pour former le tonneau β . La partie N-terminale, elle, a un rôle stabilisateur dans la formation du pré-pore (Jayasinghe et al., 2006)

→ La fixation alternative des composés de classe S et F aboutit à un oligomère et donc à la formation d'un pré-pore (Joubert et al., 2006; Viero et al., 2006). Une augmentation de calcium intracellulaire se produit et provient des stocks réticulaires et des canaux calciques à la membrane pour la LPV et HlgC/HlgB (Jover et al., 2013; Tawk et al., 2015).

FORMATION DU PORE : Sur les membranes synthétiques, les sept monomères d'Hémolysine α se déplient et les domaines « stem » s'insèrent pour former un tonneau β . Le pore fonctionnel ainsi formé est légèrement conique avec un diamètre de 28 Å du côté extracellulaire et de 14 Å du côté du « stem » (Song et al., 1996). Il est perméable aux molécules d'eau et sélectionne les anions grâce aux charges de certains résidus constituant le pore (Paula et al., 1999; Song et al., 1996).

→ La dernière étape est le déploiement des domaines « stem » en un tonneau β qui s'insère dans la membrane de la cellule pour former le pore transmembranaire, comme montré pour la LPV et HlgA/HlgB (Baba Moussa et al., 1999a; Ferreras et al., 1998; Viero et al., 2006). Toutefois, le déploiement du « stem » peut être inhibé par l'ajout d'un pont disulfure bloquant son extension (Viero et al., 2008). Concernant HlgA/HlgB et HlgC/HlgB, le pore est sélectif des cations monovalents tels que Na^+ et K^+ , contrairement à la toxine α qui sélectionne les anions (Dalla Serra et al., 2005; Sugawara et al., 1997). Cette sélectivité est dépendante des quatre résidus présents à l'entrée du pore : la toxine α a quatre résidus chargés positivement quand les Hémolysines γ ont des charges soit positives soit négatives (Comai et al., 2002). Enfin, le diamètre atomique du pore composé de HlgA/HlgB est compris entre 19 et 21 Å (Sugawara et al., 1997). Des structures hexamériques ou heptamériques ont été montrées en microscopie électronique pour la LPV et HlgA/HlgB, mais il semblerait que ce ne soit que des formes transitoires (Pédelacq et al., 1999; Sugawara-Tomita et al., 2002). Sur membrane synthétique, également, des structures oligomériques peuvent s'assembler, mais les octamères sont les plus stables (Alessandrini et al., 2013). Ainsi, le pore formé par les leucotoxines est plus probablement octamérique (Figure I.6), avec une alternance des composés S et F, comme le suggère également les études en FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) ou avec des mutants de HlgA/HlgB (Joubert et al., 2006; Viero et al., 2006).

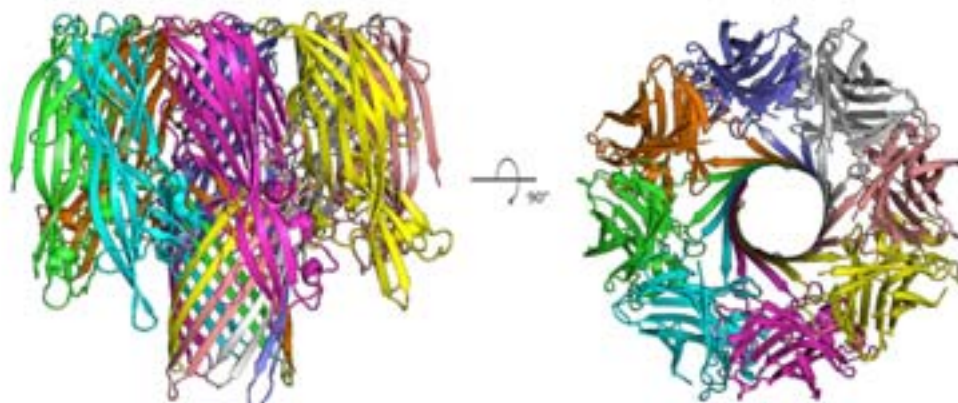


Figure I.6 – Structure tridimensionnelle du pore octamérique formé par HlgA/HlgB
Vue latérale et supérieure, pdb : 3B07 (Yamashita et al., 2011).

L'activation des canaux calciques ainsi que la présence de pores dans la membrane entraînent des réponses cellulaires variées comme une augmentation du volume cellulaire (Meunier et al., 1995). Cependant, la théorie du pore n'est pas suffisante pour expliquer les autres mécanismes activés, notamment à des concentrations très faibles où il n'y a pas de lyse cellulaire.

2.3.2 Activation cellulaire : contradiction avec l'hypothèse d'un pore membranaire

Les leucotoxines bi-composées induisent une libération du contenu des granules du PNN et donc un relargage de protéines inflammatoires comme les leucotriènes B4 (inflammation aiguë) et l'IL-8, l'histamine (vasodilatation et allergies), des métabolites oxygénés ou encore les médiateurs de l'inflammation (Alonzo and Torres, 2014; Colin et al., 1994; Graves et al., 2012; Hensler et al., 1994b; König et al., 1994).

À des doses faibles de LPV, les toxines semblent induire de l'apoptose, préférentiellement par la voie mitochondriale, alors qu'à des concentrations plus fortes, il y a une mort cellulaire par nécrose (Genestier et al., 2005). L'inflammasome est également activé par des signaux pro-inflammatoires (LPS, virus, bactéries...), entraînant ainsi une sécrétion d'IL-8 et de MCP-1 qui attirent les neutrophiles et les macrophages sur le site de l'infection (Perret et al., 2012).

Cette action pro-inflammatoire des leucotoxines peut être causée par le type de récepteur impliqué dans la fixation du composé S. En effet, quatre de ces toxines ciblent un G-Protein Coupled Receptor (GPCR) qui peut activer un grand nombre de voies de signalisations différentes, allant du remodelage de l'actine à la mort de la cellule ou à la prolifération cellulaire (Reyes-Robles et al., 2013; Spaan et al., 2013, 2014).

Ainsi, l'hypothèse de la formation d'un pore a été, certes, démontrée à plusieurs reprises sur des modèles synthétiques ou encore par cristallographie, ce qui a permis d'enrichir nos connaissances sur cette famille de toxines. Cependant, peu de ces études ont été réalisées en conditions physiologiques. De plus,

la complexité des cellules immunitaires, rien qu'au niveau des récepteurs de surface et des voies de signalisation associées, est telle que l'hypothèse de formation d'un pore paraît relativement simpliste. Enfin, ce qui nous éloigne également de cette théorie est la grande avancée réalisée ces dernières années sur la caractérisation des récepteurs aux toxines de *S. aureus*.

3 LA FIXATION DES TOXINES DE *S. AUREUS*

3.1 LES RECEPTEURS

Les récentes recherches ont permis de mettre en évidence les sites de liaisons des toxines, en particulier des leucotoxines. La plupart des récepteurs des leucotoxines de *S. aureus* sont des composants du système immunitaire, ce qui n'est pas surprenant car ces toxines ciblent de manière privilégiée les cellules de l'immunité.

L'Hémolysine α : Pour sa fixation à la surface d'une cellule cible, la toxine alpha de staphylocoque nécessite la présence de la métalloprotéase ADAM-10 (Inoshima et al., 2011). L'action de cette métalloprotéase est dépendante du zinc, elle clive les protéines des jonctions adhérentes, ce qui entraîne une perte d'intégrité de la barrière épithéliale.

L'Hémolysine γ HlgA/HlgB : Plusieurs récepteurs membranaires reconnaissent l'Hémolysine γ HlgA/HlgB avec des affinités différentes. Le plus affin est le C-C Chemokine Receptor 2 (CCR2) qui fixe le C-C Chemokine Ligand 2 (CCL2), il reconnaît HlgA avec un K_d de 3,51 nM (Spaan et al., 2014). Ensuite, deux GPCR fixent la toxine, il s'agit des récepteurs aux chemokines (C-X-C motif) Receptor 1 et 2 (CXCR1 et CXCR2). Le CXCR1 lie le (C-X-C motif) Ligand 6 (CXCL6) et IL-8, ainsi que HlgA avec un K_d de 5,69 nM. Le CXCR2 permet la fixation de CXCL1 et CXCL7, ainsi que HlgA avec un K_d de 27,20 nM. En dernier, la toxine peut également se fixer au Duffy Antigen/Chemokine Receptor (DARC) avec un K_d de 29,2 nM (Spaan et al., 2015). Il est présent à la surface des globules rouges et permet la capacité hémolytique de la toxine. Les caractéristiques moléculaires du récepteur DARC sont encore méconnues ; il est utilisé par *Plasmodium vivax*, l'agent de la malaria, pour se fixer sur les érythrocytes.

L'Hémolysine γ HlgC/HlgB : La toxine cible plutôt les GPCR impliqués dans la reconnaissance de l'anaphylatoxine C5a. Le C5aR et le C5L2 sont des récepteurs liant la sous-unité HlgC, mais à l'exemple de HlgA/HlgB, il n'est pas à exclure l'implication d'autres récepteurs exprimés dans des types cellulaires dépourvus de C5aR (Spaan et al., 2013). HlgC se fixe sur le C5aR humain avec un K_d de 0,87 nM (Tawk et al., 2015). Il n'a jamais été décrit de site de liaison à haute affinité pour le composé HlgB, mais il est admis que cette sous-unité requiert la fixation préalable du composé S à la cellule cible (Meyer et al., 2009).

La LPV : De même que pour HlgC, LukS-PV se fixe au C5aR (Spaan et al., 2013) avec un K_d de 0,21 nM (Tawk et al., 2015). La liaison à C5L2 pourrait également se faire, mais n'a pas été encore démontrée. Il est à noter que certaines études ont montré que la LPV peut se lier au TLR4 (Inden et al., 2009), mais ces résultats sont à prendre avec précaution, car il s'agit d'un modèle murin qui ne partage pas la sensibilité à la LPV des cellules humaines ou de lapin.

LukA/LukB (ou LukG/LukH) : Dans le registre des récepteurs du complément, le Macrophage-1-antigène (Mac-1) est constitué des intégrines CD11b et CD18, et il lie le C3b et le C4b du système du complément. La toxine utilise le CD11b pour se fixer à sa cellule cible avec un K_d de 1,92 nM (DuMont et al., 2013).

LukE/LukD : De nombreux récepteurs ont été découverts pour la toxine LukE/LukD. On retrouve tout d'abord un GPCR, CCR5, qui reconnaît les chémokines comme CCL5 ou encore le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) et est présent sur les lymphocytes, les macrophages et les cellules dendritiques. Puis les récepteurs aux chémokines CXCR1 et CXCR2, présent sur les neutrophiles, dont le ligand naturel CXCL8 prévient la fixation de LukE et la mort des neutrophiles induite par LukE/LukD (Reyes-Robles et al., 2013). De plus, la toxine se fixe également sur DARC, tout comme HlgA/HlgB (Spaan et al., 2015).

TSST-1 : Cette toxine cible ADAM-17, une métalloprotéase et désintégrine cellulaire qui conduit à la perte des jonctions adhérentes de la cellule. Cependant, elle n'interagit pas directement avec cette protéine et active plutôt un GPCR qui, par ses protéines G, va activer ADAM-17 et ADAM-10. ADAM-17 peut, de ce fait, moduler la réponse inflammatoire en stimulant la sécrétion de facteurs d'adhésion ou de croissance, de cytokines ou encore des ligands du récepteur de l'Epidermal Growth Factor (EGFR). En effet, il semble qu'EGFR a un rôle important dans la signalisation via ADAM-17 et qu'il y a un feedback positif entre les deux lors d'un contact avec la TSST-1 (Breshears et al., 2012).

Comprendre la manière dont se fixent les toxines de *S. aureus*, c'est commencer à appréhender la complexité de leur fonctionnement. Car ces molécules agissent par l'intermédiaire de leur récepteur, qui sont quasiment tous liés à l'immunité innée, particulièrement dans le cas des leucotoxines. Les GPCR sont ainsi une plateforme d'interaction avec certaines de ces toxines qui débouchent sur un vaste processus de signalisation intracellulaire.

3.2 LES GPCR

3.2.1 Généralités

Les GPCR ont un rôle important dans la cellule puisqu'ils conduisent à une activation cellulaire qui peut prendre de multiples aspects selon le ligand impliqué. On peut donc retrouver des agonistes (activateurs), des antagonistes (inhibiteurs), mais également des agonistes biaisés ou agonistes partiels.

Les GPCR sont la plus grande famille de protéines transmembranaires chez les vertébrés. Ils sont constitués de sept domaines transmembranaires, ainsi que d'une partie N-terminale dans le milieu externe et d'une partie C-terminale dans le cytosol. Ils tiennent leur nom du fait qu'ils sont couplés à des protéines G : α , β et γ . L'activation par un ligand (neurotransmetteurs, hormones...) induit un

changement conformationnel des domaines transmembranaires et intracellulaires, permettant l'interaction avec ces protéines G.

LA SIGNALISATION DU GPCR (Figure I.7) : Les protéines G permettent le transfert de l'information à l'intérieur de la cellule. Lors de l'activation du GPCR, la sous-unité $G\alpha$ libère le GDP pour fixer un GTP et s'activer (Ritter and Hall, 2009). Ceci déclenche la dissociation de $G\alpha$ -GTP du complexe $G\beta/\gamma$. Ces protéines peuvent ensuite s'associer avec des effecteurs en aval pour moduler la réponse cellulaire. Ensuite, le GPCR s'associe avec les GPCR Kinase (GRK) comme la Phosphokinase A (PKA) ou la Phosphokinase C (PKC) qui vont phosphoryler le récepteur sur sa partie C-terminale. Ceci va diminuer l'interaction entre le GPCR et les protéines G et ces dernières vont se détacher tandis que la β -arrestine vient se fixer. La signalisation du GPCR liée aux protéines G est ainsi interrompue et le processus d'internalisation commence. La β -arrestine lie le récepteur aux puits formés par la membrane et recouverts de clathrine afin de faciliter l'endocytose dans un processus de désensibilisation (Boulay and Rabiet, 2005; Ritter and Hall, 2009; Sorkin and von Zastrow, 2009). Puis le récepteur est internalisé dans la cellule et suit soit la voie de la dégradation soit celle du recyclage à la membrane pour sensibiliser à nouveau la cellule.

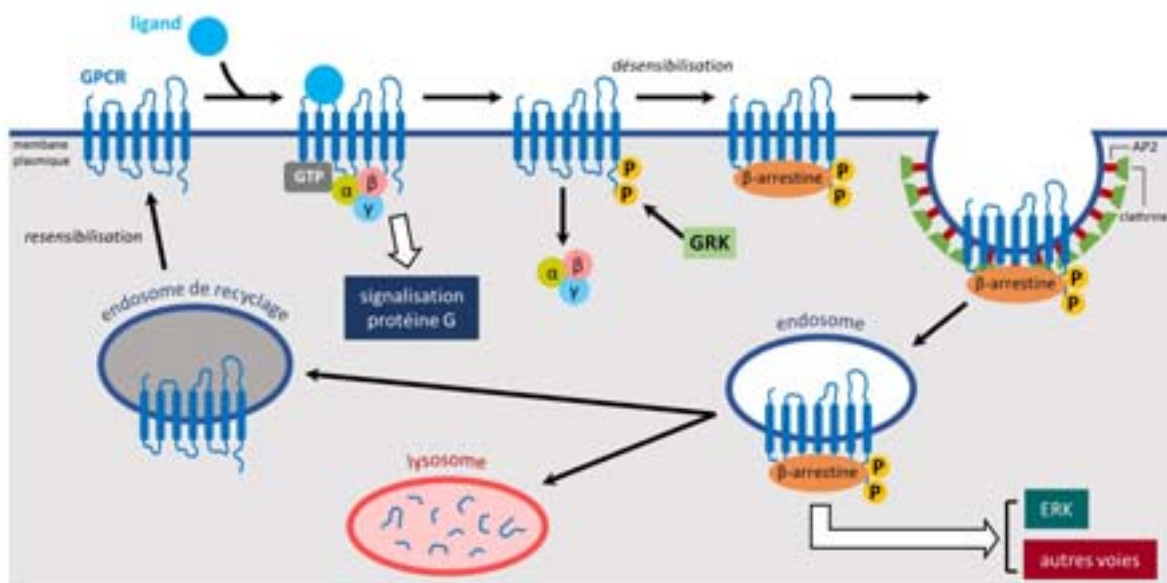


Figure I.7 – Voie de signalisation des GPCR

Les GPCR sont activés par la liaison de leur ligand, induisant ainsi une signalisation dépendante des protéines G. Majoritairement, c'est par la voie de la clathrine que ces récepteurs sont internalisés. Ils sont ensuite dégradés par les lysosomes ou recyclés à la surface de la cellule.

LA β -ARRESTINE : Cette protéine est essentielle à la régulation négative du GPCR. Elle permet la translocation à la membrane de la molécule adaptatrice de la clathrine AP2 pour que l'endocytose par la voie de la clathrine puisse avoir lieu (Drake et al., 2006). Il existe plusieurs β -arrestines comme la β -arrestine 1 et la β -arrestine 2. Ces deux formes se fixent grâce à la phosphorylation du récepteur et les résidus de la partie C-terminale déterminent la classe du GPCR (DeWire et al., 2007; Drake et al., 2006; Oakley et al., 2000) :

- La **classe A** (récepteur β 2-adrénérique) recrute la β -arrestine 2 avec une meilleure affinité que la β -arrestine 1. La liaison est transitoire et la β -arrestine est relarguée rapidement après la formation de la vésicule de clathrine. Ainsi, le recyclage est rapide.
- La **classe B** (récepteur à la vasopressine 2) lie les deux formes de la β -arrestine avec une affinité égale. L'interaction est plus forte et plus stable. Après le recrutement de la clathrine, le GPCR et la β -arrestine restent liés à la surface des vésicules d'endocytose et la β -arrestine peut initier une signalisation spécifique en activant les MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) comme ERK 1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinases 1 & 2). Le recyclage à la membrane est plus lent.

L'AGONISTE BIAISÉ : Par définition, l'agoniste complet va activer au maximum le récepteur et se fixer sur le site allostérique tandis qu'un antagoniste n'affecte pas l'activité du GPCR et occupe un site orthostérique. Cependant, il existe d'autres types de ligands, comme les agonistes biaisés, qui ne vont pas avoir le même effet qu'un agoniste sans avoir le potentiel d'inhibition de l'antagoniste. Lors d'une fixation d'un agoniste biaisé sur un récepteur, soit le GPCR change de conformation et recrute la β -arrestine sans couplage des protéines G, soit il ne change pas de conformation, ne recrute pas la β -arrestine, mais active les protéines G (DeWire et al., 2007; Nygaard et al., 2013). Ainsi, l'activité n'est pas au maximum comme pour l'agoniste, même à saturation.

3.2.2 Le récepteur au C5a, le C5aR

Le récepteur à l'anaphylatoxine du complément C5a est le C5aR. Il est présent sur les cellules myéloïdes (neutrophiles, monocytes, éosinophiles, cellules dendritiques, basophiles) et les cellules gliales, l'endothélium vasculaire ou encore les cellules du poumon et du rein (Rabiet et al., 2007).

L'activation du C5aR déclenche le chimiotactisme, la sécrétion d'enzymes protéolytiques ou la production de superoxyde (Boulay and Rabiet, 2005). La phosphorylation des sérines S334, S338 et S327 est suffisante pour induire la formation du complexe C5aR/ β -arrestine, puis le C5aR est internalisé par un processus dépendant de l'arrestine, de la clathrine et de la dynamine (Suvorova et al., 2005). C'est un GPCR de classe B puisqu'il colocalise avec la β -arrestine 1 et 2 dans les vésicules d'endocytose (Boulay and Rabiet, 2005; Braun et al., 2003). Cependant, ce n'est pas un récepteur de classe B strict puisqu'il y a tout de même un relargage de la β -arrestine dans le cytosol, mais qui n'est pas dû au recyclage (Suvorova et al., 2005).

Lors d'un ajout de 50 nM de C5a dans des cellules de rats transfectées avec le récepteur, le C5aR se retrouve après 10 min dans une région proche du noyau (Naik et al., 1997). Un contact avec 5 nM de C5a (la concentration détectée dans les sepsis) sur des neutrophiles humains entraîne la dégradation rapide du C5aR dans les deux premières heures (60 % du récepteur contre 20 % sans C5a). De plus, le recyclage à la membrane n'est pas clairement observé sur les neutrophiles, ou tout du moins le C5aR n'est pas retrouvé dans les vésicules positives à Rab11 (Suvorova et al., 2005).

Ayant 36% d'identité avec le C5aR, le C5L2 est un récepteur dévoyé du C5a. Il permet l'activation d'une voie anti-inflammatoire non conventionnelle et se retrouve globalement dans les mêmes cellules que le C5aR, avec les lymphocytes en plus (Li et al., 2013a; Rabiet et al., 2007). Le C5L2 a la même affinité de liaison du C5a que le C5aR ($K_d = 2,5$ nM), mais il lie également le C5a-desArg avec une affinité de 12 nM contre 660 nM pour le C5aR (Li et al., 2013a). Le C5a-desArg est le peptide du C5a ayant perdu une arginine sur la région C-terminale de manière naturelle. Le C5L2 est un récepteur à sept domaines transmembranaires, situé à la surface des vésicules internes, mais qui n'est pas lié aux protéines G comme le C5aR (Van Lith et al., 2009). Cependant, il recrute également la β -arrestine dépendamment du ligand. Enfin, des interactions sont possibles entre le C5aR et le C5L2, mais le mécanisme n'est pas encore connu.

3.3 VOIES DE SIGNALISATION ASSOCIEES AUX GPCR

3.3.1 La signalisation des protéines G

Les protéines G fonctionnent comme un switch moléculaire avec une forme « on » liée au GTP et une forme « off » liée au GDP (Stenmark, 2009) :



La GEF (Guanine Exchange Factor) est une protéine qui permet l'échange de GDP en GTP tandis que GAP (GTPase-Activating Protein) catalyse la réaction inverse. La protéine G couplée au GTP est ainsi activée et peut induire des voies de signalisation spécifique. Dans le cas du GPCR, les protéines G α , β et γ sont activées et $G\alpha$ se lie au GTP avant de se détacher tandis que $G\beta$ et $G\gamma$ restent ensemble. Les signalisations induites (Figure I.8) permettent le remodelage du cytosquelette d'actine, les mécanismes dépendant du calcium, l'adhésion de la cellule, la croissance, la prolifération, l'apoptose, la réparation de l'ADN ou encore la survie cellulaire (Ritter and Hall, 2009; Stenmark, 2009).

PROTÉINE $G\alpha$ -GTP : Il existe plusieurs types de protéines $G\alpha$ qui induisent une signalisation différente. $G\alpha_s$ active l'adénylate cyclase et la production d'AMPc tandis que $G\alpha_i$ l'inhibe. La sous-unité $G\alpha_{12/13}$ permet l'activation d'autres protéines G, comme Rho. En dernier, $G\alpha_q$ entraîne la production d'inositol trisphosphate (IP3) et de diacylglycérol (DAG) en activant la PLC- β (Phospholipase C- β).

PROTÉINES G β/γ : Le complexe permet l'activation de la PKC grâce à la production d'IP3 et de DAG par la PLC- β membranaire. La signalisation liée à la protéine Akt est induite par la PI3K (Phosphoinositide 3-Kinase) tandis que la voie des MAPK ERK1/2 est activée grâce à Ras.

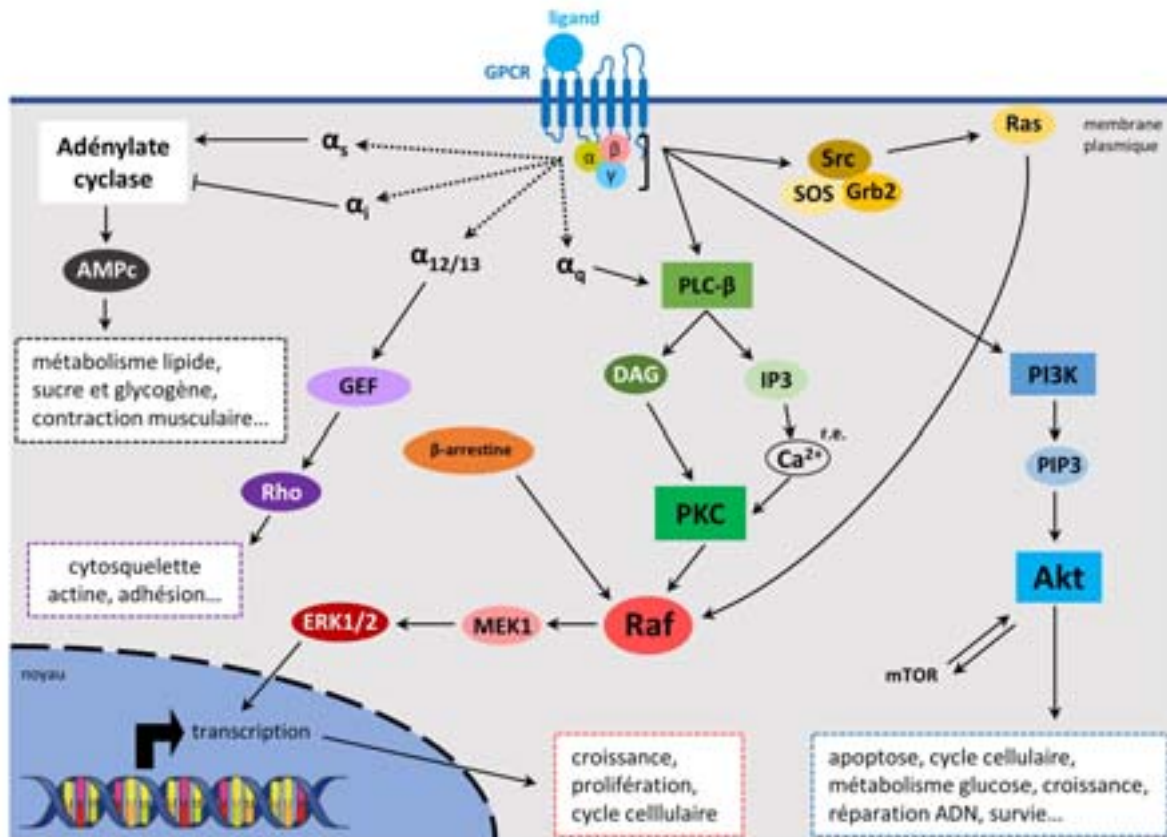


Figure I.8 – Signalisation liée aux protéines G

La signalisation des protéines G se fait à partir de la sous-unité α ou du complexe β/γ . La protéine $G\alpha$ peut être différente selon le GPCR (G-Protein Coupled Receptor) auquel elle est liée. Ainsi, on peut avoir une induction de la sécrétion d'AMP cyclique (adénosine monophosphate cyclique), ou son inhibition, le remodelage de l'actine par le Guanine nucleotide Exchange Factor (GEF) qui active la famille des Rho ou encore l'activation de la phospholipase C- β (PLC- β) membranaire (voir Figure I.9) qui entraîne la production de diacylglycérol (DAG) et d'inositol trisphosphate (IP3). L'IP3 permet le relargage du calcium depuis le réticulum endoplasmique (r.e.) ce qui va activer, avec le DAG, la protéine kinase C (PKC). La voie MAPK/ERK (Mitogen-Activated Protein Kinases/Extracellular signal-Regulated Kinase) est ainsi activée. Quant au complexe β/γ , il active principalement le relargage de calcium par l'intermédiaire de la PLC- β , mais également que la voie ERK1/2 par l'intermédiaire des protéines Src, SOS (Son Of Sevenless) et Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2). Les voies dépendantes de Akt sont également activées grâce à la production de Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PIP3) par la Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K) et ont des conséquences multiples pour la cellule. Akt peut également activer et être activé par mTOR (mammalian Target Of Rapamycin).

3.3.2 La signalisation calcique

Le calcium est largement impliqué lors de l'activation du GPCR et contribue à plusieurs mécanismes comme la prolifération cellulaire, la sécrétion d'électrolytes, la contraction du muscle, le relargage de neurotransmetteurs ou encore l'initiation de l'apoptose. Il provient majoritairement du réticulum endoplasmique qui se remplit grâce au calcium cytoplasmique par l'intermédiaire des pompes Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA). Le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) est transformé en IP3 et DAG par l'intermédiaire de la PLC (Figure I.9) (Berridge, 2016). L'IP3 se fixe sur son récepteur à la surface du réticulum endoplasmique, qui est semblable à celui sensible à

la ryanodine, un alcaloïde végétal. Ces deux récepteurs sont des canaux calciques activés par le calcium, mais également par l'IP₃ pour le récepteur à l'IP₃. Après activation, ils s'ouvrent pour libérer le calcium du réticulum endoplasmique dans le cytoplasme. D'autres seconds messagers permettent de relarguer du calcium comme le NAADP (Kiselyov et al., 2003). Le phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP₃) est régulé grâce à PI3K et au Phosphatase and TENsin homolog (PTEN) présents à la membrane plasmique. En effet, PTEN permet la synthèse de PIP₂ à partir de PIP₃ tandis que la PI3K à une action inverse.

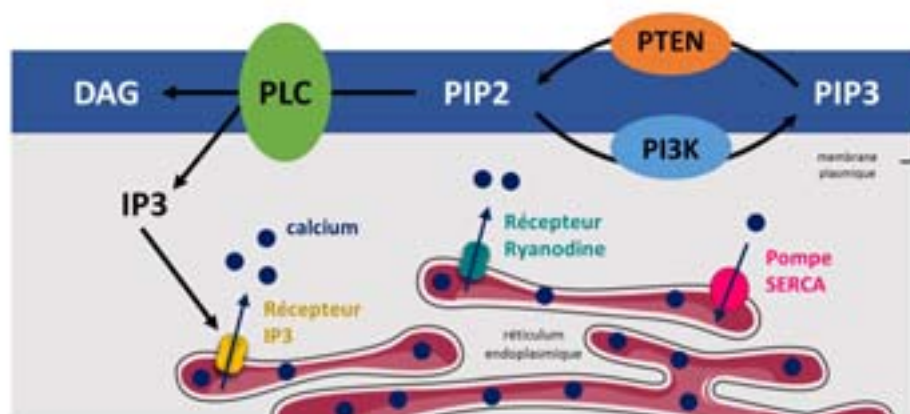


Figure I.9 – Mécanisme de libération du calcium réticulaire

3.3.3 La signalisation du C5aR

Lors de l'activation du C5aR par son ligand naturel, le C5a, plusieurs voies sont activées dans les cellules myéloïdes (Figure I.10) (Rabiet et al., 2007). L'association de Src, SOS et Grb2 permet d'activer la voie de Ras-Raf-MERK-ERK par phosphorylations successives. La PI3K intensifie ce processus, de même qu'elle induit la signalisation liée à Akt. La PLC- β permet la sécrétion de calcium du réticulum endoplasmique grâce à l'IP₃, mais il existe également une provenance extracellulaire du calcium par des canaux à la membrane plasmique. De plus, les protéines GEF activées (Vav1, pRex1) vont permettre d'échanger le GDP en GTP sur les protéines G : RhoA active ROCK1 (Rho-associated, Coiled-coil containing protein Kinase 1) et DIAPH1 (Diaphanous Homologue 1) résultant en l'adhérence des cellules et au chimiotactisme, Cdc42 phosphoryle PAK 1 et PAK 2 pour induire le remodelage du cytosquelette d'actine et Rac2 interagit avec la NADPH oxydase pour pousser à son assemblage. Toutes ces voies vont permettre l'assemblage de la NADPH oxydase et donc la sécrétion de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO). Lors d'un contact du C5aR avec un agoniste complet comme le C5a, l'ensemble des voies de signalisation va être activé, ce qui permet un relargage important de DRO (Rabiet et al., 2007). Un agoniste partiel, par contre, n'activera qu'une partie des voies de signalisation, et ce à un plus faible niveau de stimulation.

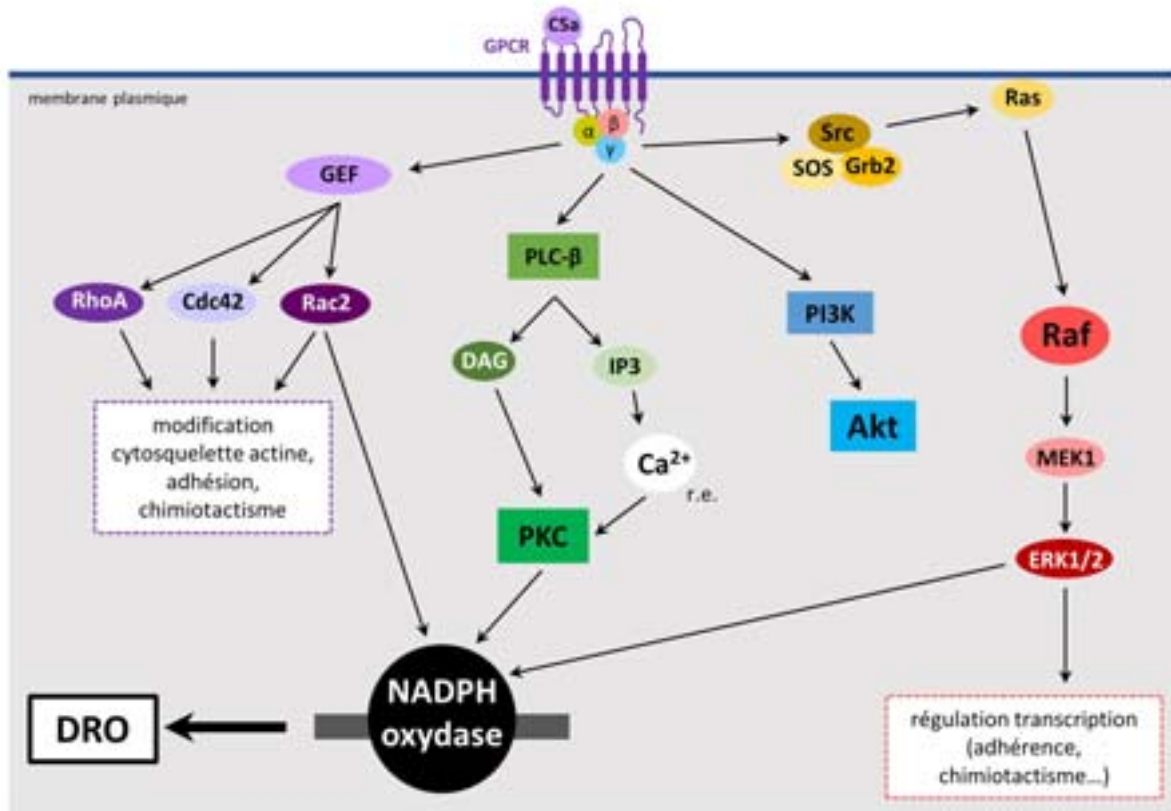


Figure I.10 – Signalisation du C5aR après une activation par le peptide du complément C5a

Les protéines G activées par le C5aR-C5a induisent la signalisation de multiples voies, qui conduisent pour la plupart à une activation de la NADPH oxydase, et donc à une libération de dérivés réactifs de l'oxygène.

4 L'INTERNALISATION DE COMPOSES DANS LES CELLULES HUMAINES

4.1 VOIES D'ENDOCYTOSE CHEZ LES MAMMIFERES

Dans les cellules, l'endocytose de molécules (matériel extracellulaire, ligands, protéines membranaires, lipides...) est un processus nécessaire qui permet notamment le recyclage ou la dégradation. Cependant, le mécanisme d'internalisation peut varier en fonction des cellules, mais également selon le composé à internaliser. Ainsi, il existe des voies déjà bien caractérisées ou encore probablement insuffisamment caractérisées (Figure I.11) (Doherty and McMahon, 2009).

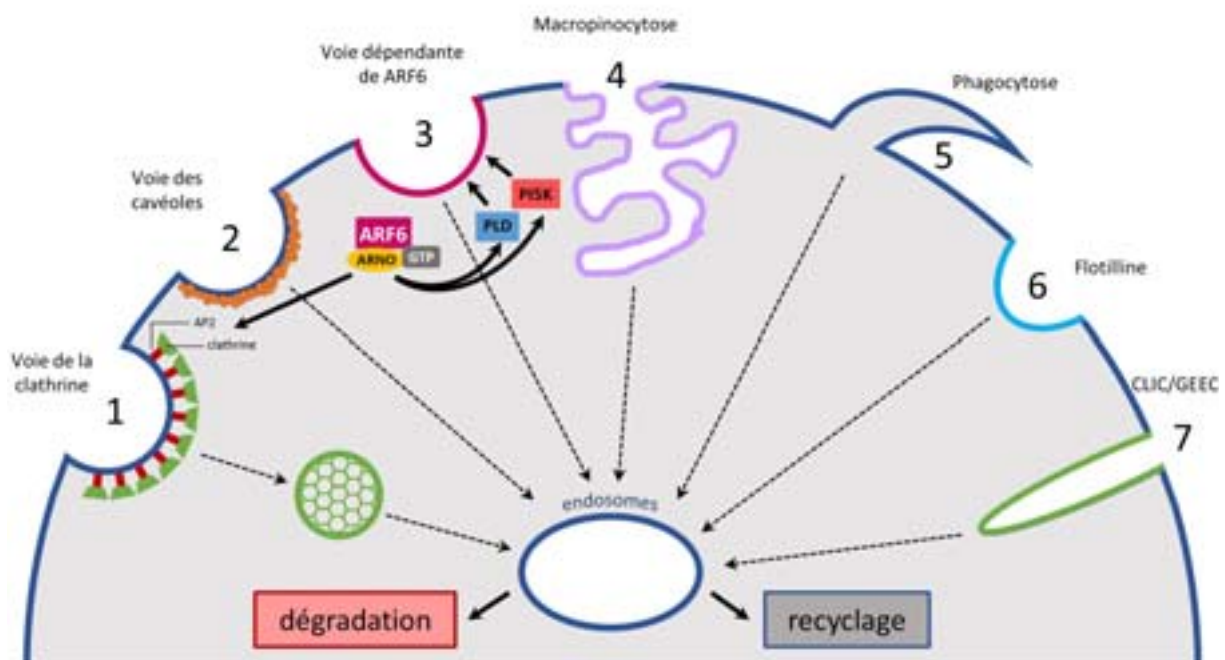


Figure I.11 – Voies d'endocytose

La voie de la clathrine (1) utilise la protéine clathrine pour internaliser un composant, tandis que la voie des cavéoles (2) a besoin de la cavéoline. La voie dépendante de ARF6 (ADP-ribosylation factor 6) (3) est indépendante de la clathrine ou des cavéoles, mais ARF6 a un rôle dans la voie de la clathrine. De plus, ARF6 est activé par ARNO (ARF nucleotide-binding site opener) et permet l'activation de la PLD (Phospholipase D) et de PI3K (Phosphatidylinositol-4-Phosphate 5- Kinase) qui induisent la courbure de la membrane. La macropinocytose (4) permet d'endocyter une phase fluide de grande taille, alors que la phagocytose (5) concerne les particules solides. La flotilline (6) est impliquée dans une voie semblable à celle utilisant la cavéoline. Enfin, le mécanisme CLIC/GEEC (Clathrin-Independent Carriers/GPI-enriched Early Endosomal Compartments) concerne essentiellement les protéines à ancrage sur le glycosylphosphatidylinositol (GPI).

4.1.1 Voie de la clathrine (1)

L'internalisation par la clathrine est l'une des voies d'endocytose la plus étudiée et la mieux connue. Elle utilise la protéine clathrine comme manteau pour la formation de vésicules d'endocytose et a besoin de plusieurs étapes, décrites ci-après (Benmerah and Lamaze, 2002; Doherty and McMahon, 2009; Edeling et al., 2006; Maxfield and McGraw, 2004; McMahon and Boucrot, 2011; Ramanan et al., 2011) :

NUCLEATION : La membrane de la cellule va se déformer pour former un puits qui va concentrer les récepteurs transmembranaires. Les protéines adaptatrices (AP1, AP2...) sont recrutées, notamment par Eps15, et servent de connecteur entre la clathrine et les composants de la membrane (phospholipides, protéines transmembranaires...).

ASSEMBLAGE DU MANTEAU DE CLATHRINE : La clathrine est une protéine constituée de trois chaînes lourdes associées par leur domaine C-terminal et ayant la forme caractéristique d'un triskèle. Elle est donc recrutée aux adaptateurs comme AP2 et s'autoassemble pour former le manteau. La force de polymérisation va accroître l'invagination du puits et former une vésicule. La taille des vésicules est uniforme grâce aux protéines adaptatrices.

DETACHEMENT DE LA VESICULE : Lorsque la cage de clathrine est formée et la vésicule mature, la dynamine est recrutée par le domaine BAR. La dynamine est une GTPase qui forme un polymère en hélice autour de la constriction de la membrane, permettant ainsi la fission de la vésicule. Celle-ci est relarguée à l'intérieur de la cellule.

DECAPSIDATION ET RECYCLAGE DE LA CLATHRINE : Le désassemblage du manteau de clathrine est médié par HSC70. Les triskèles de clathrine reviennent ainsi dans le cytosol pour un recrutement postérieur tandis que la vésicule nue rejoint le trafic intracellulaire.

4.1.2 Voie dépendante de ARF6 (3)

La protéine ARF6 (ADP-ribosylation factor 6) est une protéine G qui est impliquée dans de nombreux mécanismes, notamment dans la voie de la clathrine, mais également dans une voie indépendante de la clathrine et de la cavéoline. Cette voie est mal connue, mais concerne particulièrement les protéines membranaires dépourvues de motifs susceptibles d'interagir avec AP2 (Blouin, 2013).

ARF6 est une petite protéine G qui est activée par l'échange de GDP en GTP médié par ARNO (ARF Nucleotide-binding site Opener), une protéine GEF. ARNO est associé constitutivement à la β -arrestine. Lors de l'inactivation de ARF6, c'est GIT (GRK-Interacting protein), une protéine GAP, qui échange le GTP en GDP (Drake et al., 2006).

Les récentes études décrivent cette internalisation dépendante de ARF6 comme étant liée à deux principaux acteurs : la PIP5K (Phosphatidylinositol-4-Phosphate 5- Kinase) et la PLD (Donaldson and Jackson, 2011; D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006). En effet, ARF6 active la PIP5K de la membrane plasmique, ce qui entraîne l'accumulation de PIP2 et donc une action sur le cytosquelette d'actine et le recyclage endosomal. L'activation de la PLD et de Rac1 promeut également la migration cellulaire.

4.1.3 Autres voies d'endocytose

Il existe également d'autres processus d'internalisation, certains peu connus, mais d'autres largement étudiés comme les cavéoles, ou pour l'endocytose de solide (phagocytose) ou de phase fluide (macropinocytose).

VOIE DES CAVEOLES (2) : Ce mécanisme est caractérisé par une invagination de la membrane plasmique de 60 à 80 nm de diamètre, d'un aspect proche à celui des puits recouverts de clathrine et que l'on nomme cavéole. Le constituant majoritaire est ici la cavéoline-1, mais la cavéoline-2 et -3 existent également et concernent uniquement certaines cellules, comme le tissu musculaire pour la cavéoline-3 (Blouin, 2013). Des protéines auxiliaires jouent un rôle fondamental, comme la cavine-1 qui permet la formation de la cavéole, la cavine-2 qui initie la courbure de la membrane ou encore la dynamine qui permet la scission de la vésicule à la membrane. De par le faible niveau d'endocytose par les cavéoles à l'état basal, les cavéoles sont des mécanosenseurs membranaires puisqu'elles peuvent s'aplanir lors d'un stress mécanique de la membrane plasmique (étirement, choc osmotique...), rendant ainsi disponible une portion de membrane additionnelle (Blouin, 2013). De plus, il est à noter que les cavéoles ne sont pas présentes sur les neutrophiles (Sengelov et al., 1998).

MACROPINOCYTOSE (4) : L'endocytose de phase fluide se fait par micropinocytose ou macropinocytose, selon la taille de formation de la vésicule. Concernant la macropinocytose, la vésicule mesure de 0,5 à 5 µm et est appelée macropinosome (Benmerah and Lamaze, 2002). Le mécanisme est induit par des facteurs de croissance ou encore des agents mitogènes et PAK1 est fortement impliquée en activant Rac1. De plus, la PI3K, les Ras ou Src participent à la macropinocytose (Benmerah and Lamaze, 2002; Doherty and McMahon, 2009).

PHAGOCYTOSE (5) : La phagocytose est le processus par lequel les phagocytes détruisent les pathogènes ou des éléments endogènes comme les cellules apoptotiques. La cellule phagocytaire va produire une extension filopodiale autour de la particule à internaliser, grâce à Cdc42 qui remodèle le cytosquelette d'actine, puis il y a une internalisation dépendante de Rac1 (Doherty and McMahon, 2009).

FLOTILINE (6) : L'endocytose via les flotilline est un processus qui ressemble à celui des cavéoles de par la similitude entre la cavéoline et la flotilline. Dans les deux cas, ces protéines s'associent à des radeaux lipidiques, mais qui sont, dans le cas des flotillines, distincts des cavéolines (Blouin, 2013). Toutefois, ici, la dynamine n'a pas de rôle dans le mécanisme d'internalisation, au contraire des cavéoles. L'endocytose par flotilline a été mis en avant pour l'internalisation des protéines à ancrage sur le glycosylphosphatidylinositol (GPI).

CLIC/GEEC (7) : Une voie d'internalisation spécifique des protéines à ancre GPI est la voie CLIC/GEEC. Ces protéines s'insèrent dans le feuillet externe de la membrane plasmique indépendamment de la clathrine (CLIC : Clathrin-Independent Carrier) (Blouin, 2013). L'internalisation

des CLIC conduit à la création d'un compartiment endosomal riche en protéines à ancre GPI (GEEC : GPI-AP Enriched Endocytic Compartment), mais dépourvu de Rab5 comme l'endosome précoce. Sa forme de croissant est caractéristique et ce mécanisme est indépendant de la dynamine.

Il est à noter que de récentes études ont montré que la membrane pouvait s'autoréparer grâce à un mécanisme d'endocytose indépendant de la dynamine mais nécessitant du calcium (Idone et al., 2008). Le lysosome serait également un acteur de cette forme d'endocytose de réparation, en dehors de son action dans la dégradation de protéines (Tam et al., 2010).

Concernant notre modèle d'étude, le polynucléaire neutrophile humain, il semble que toutes ces voies d'endocytose puissent être utilisées par les composées pour rentrer dans la cellule, mis à part pour les cavéoles. En effet, le neutrophile n'exprime aucune cavéoline, le constituant majeur des cavéoles (Sengelov et al., 1998).

4.2 TRI CELLULAIRE

Une fois que l'internalisation a eu lieu, les vésicules rejoignent le trafic cellulaire afin d'intégrer deux grandes voies : celle du recyclage où la molécule retourne à la surface de la cellule ou celle de la dégradation où le composé est dégradé dans les lysosomes grâce aux hydrolases (Figure I.12). Les endosomes sont les principaux constituants de ces deux voies. Ils servent de plateforme de signalisation pendant la transduction du signal du récepteur. Leur faible diamètre favorise l'association ligand/récepteur et la maintenance de l'activité du récepteur (endosome précoce), ils peuvent user du transport microtubulaire pour se déplacer sur de longues distances jusqu'au noyau et comportent de nombreuses protéines résidentes qui permettent l'assemblage de complexes structuraux (Sorkin and von Zastrow, 2009). Enfin, leur pH acide (endosome tardif, lysosome) favorise les enzymes protéolytiques.

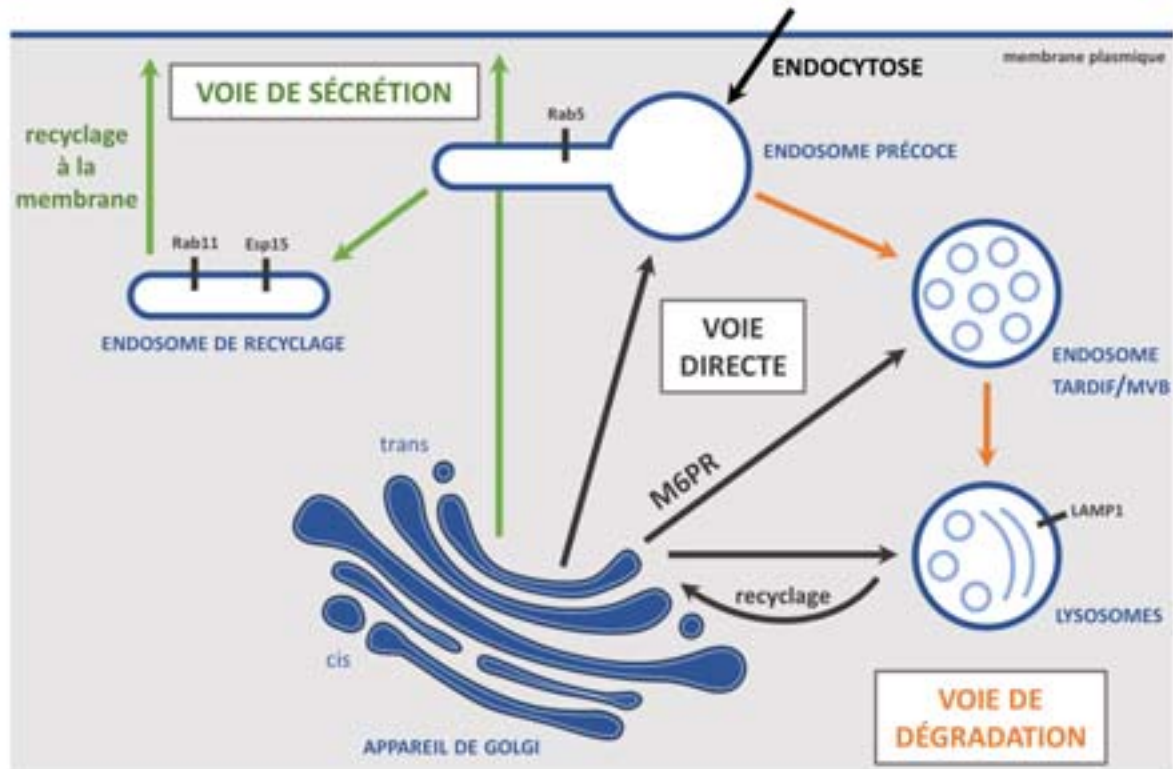


Figure I.12 – Tri cellulaire : recyclage et dégradation de protéines après l'endocytose dans la cellule

Après endocytose, les protéines transitent dans l'endosome précoce, Rab5 est présent à la surface à cette étape. Les parties tubulaires de l'endosome précoce mûrent pour former l'endosome de recyclage et acquérir les marqueurs Rab11 et Esp15, la vésicule transporte ensuite son contenu à la surface de la cellule. À l'opposé, la partie vésiculaire de l'endosome précoce forme l'endosome tardif puis les Multivesicular Bodies (MVB) avant de fusionner avec les lysosomes qui ont la protéine LAMP1 (Lysosomal-Associated Membrane Protein 1) à leur surface. Les protéines sécrétées par le trans-Golgi peuvent également emprunter ces voies. C'est le cas du Mannose-6-Phosphate Receptor (M6PR) qui permet le transport du Mannose-6-Phosphate dans les endosomes précoces et tardifs ou les lysosomes avant de revenir au trans-Golgi.

4.2.1 Tri et endosome précoce

Le tri cellulaire est basé sur la géométrie des organelles plutôt que sur un motif spécifique des protéines cargo. L'endosome de tri, ou endosome précoce, est localisé à la périphérie de la cellule et est tubulaire. Il reçoit le matériel entrant (pendant 5 à 10 min) depuis les vésicules primaires dépendantes ou indépendantes de la clathrine. La lumière de l'endosome est moyennement acide, ce qui facilite le changement conformationnel des protéines qui peuvent se détacher du récepteur. Ce tri est possible grâce à des protéines spécifiques comme Rab5, PI3K ou PIP3 qui sont requises pour la fusion des puits recouverts de clathrine avec l'endosome précoce (Grant and Donaldson, 2009; Maxfield and McGraw, 2004). Il y a trois voies possibles lors du tri cellulaire :

- **Le retour à la membrane plasmique.** Les cargos dépendant de la clathrine peuvent retourner à la membrane sans passer par la voie du recyclage, car ils n'ont pas besoin de séquences cytoplasmiques de reconnaissance et de tri.
- **La voie du recyclage.** La partie tubulaire de l'endosome précoce se transloque sur les microtubules pour permettre le recyclage à la membrane plasmique via les endosomes de recyclage.

- **La voie de dégradation.** L'endosome précoce migre le long des microtubules et devient plus acide, acquérant également des hydrolases acides.

4.2.2 La voie de recyclage

Cette voie permet le retour des protéines endocytées ou des lipides à la membrane plasmique par l'intermédiaire des endosomes de recyclage. L'équilibre entre l'endocytose et le recyclage permet de contrôler la composition de la membrane plasmique et de participer aux processus cellulaires (adhésion, migration, polarité, transduction du signal, division cellulaire...) (Grant and Donaldson, 2009).

L'endosome de recyclage est un assemblage d'organelles tubulaires d'un diamètre d'environ 60 nm et associé aux microtubules (Maxfield and McGraw, 2004). Il peut trier les molécules allant vers différentes destinations (ex : trans-Golgi), mais la majorité de son contenu retourne à la membrane. Sa régulation se fait par l'intermédiaire de Rab11 et de Eps15.

Il existe deux voies de recyclage, une lente et une rapide (Grant and Donaldson, 2009; Maxfield and McGraw, 2004) :

VOIE DE RECYCLAGE LENTE : Elle est dépendante de Rab35 qui se lie à AP2 sur les vésicules recouvertes de clathrine. L'association de Rab35 avec ARF6 permet le transport du cargo à la membrane plasmique. De plus, Rab4 est également important pour le recyclage depuis l'endosome précoce. Le processus se fait donc avant le désassemblage de la clathrine sur les vésicules d'internalisation.

VOIE DE RECYCLAGE RAPIDE : Ici, une étape de maturation est nécessaire. L'endosome précoce va étendre ses tubules pour former l'endosome de recyclage tandis que le reste de la vésicule deviendra un corps multivésiculaire (MVB : Multivesicular Body). Pour former les endosomes de recyclage, il y aura une perte de Rab5 au profit de Rab11.

Lors du transport de l'endosome de recyclage à la membrane plasmique, les microtubules et l'actine ont un rôle, tout comme la PLD présente à la surface de l'endosome. L'acide phosphatique permet la fission de la membrane et le relargage du cargo tandis que le diacylglycérol permet la fusion et la fission de l'endosome à la membrane. Il est également à noter que certaines protéines comme SNX4 préviennent l'entrée du cargo dans la voie de dégradation.

4.2.3 La voie de dégradation

Les molécules intégrant cette voie vont passer par des endosomes intermédiaires avant d'arriver aux lysosomes où elles seront dégradées. Le ciblage des protéines membranaires ayant besoin d'être sous-régulées passe souvent par l'ubiquitination du domaine cytoplasmique. Il s'agit d'une séquence signal composée d'ubiquitine qui induit l'invagination des membranes pour former l'endosomes tardif. L'ubiquitination est principalement décrite comme étant un processus permettant de dégrader les protéines cytosoliques par le protéasome, mais elle peut également jouer un rôle dans la voie de dégradation (Maxfield and McGraw, 2004).

ENDOSOMES INTERMÉDIAIRES : L'endosome précoce commence à se modifier et reconnaît les cargos et les concentre dans une région de la membrane endosomale. Ces sections forment de petites vésicules dans la lumière de l'endosome, ce qui donne un aspect multivésiculaire à l'observation au microscope électronique. On parle ainsi de corps multivésiculaire (MVB) (Davies et al., 2009). De plus, il s'agit d'une étape intermédiaire entre l'endosome précoce et l'endosome tardif (Gruenberg and Stenmark, 2004). Les MVB ont une taille allant de 400 à 500 nm de diamètre, ils se déplacent le long des microtubules jusqu'au centre de la cellule. Après une maturation où le MVB perd toutes les protéines à recycler et où il acquiert l'habileté à fusionner avec les lysosomes grâce à Rab7, on parle d'endosome tardif (Woodman and Futter, 2008). L'endosome tardif est multicomposite et comporte des citernes, des tubulures, des régions multivésiculaires... Il reçoit les protéines nouvellement synthétisées provenant du trans-Golgi, comme le CMH II ou le récepteur au mannose-6-phosphate (M6PR) qui permet le transport des molécules de mannose-6-phosphate depuis le trans-Golgi jusqu'à l'endosome tardif, le lysosome ou la membrane plasmique (Coutinho et al., 2012; Gruenberg and Stenmark, 2004; Saftig and Klumperman, 2009).

LYSOSOMES : Après la fusion avec le lysosome, les vésicules sont relarguées dans l'environnement hydrolytique où les substrats de l'endocytose, de l'autophagie ou de la phagocytose sont dégradés (Davies et al., 2009; Saftig and Klumperman, 2009). Deux classes de protéines sont essentielles à la fonction du lysosome : les hydrolases acides et les protéines de membranes comme LAMP1 (Lysosome-Associated Membrane Protein 1) (Saftig and Klumperman, 2009). Il existe deux sortes de lysosomes : les lysosomes de sécrétion et les lysosomes conventionnels (Blott and Griffiths, 2002). Ces derniers permettent la dégradation de protéines tandis que les lysosomes de sécrétion stockent les molécules à sécréter dans les granules et peuvent fusionner avec la membrane plasmique. Ces lysosomes particuliers se retrouvent dans les ostéoclastes (dégradation des os) ; les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK (protéine cytolitique) ; les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes B (CMH de classe II) ; les basophiles et mastocytes (histamine, sérotonine) ou encore les neutrophiles (défensine).

4.3 TRANSPORT RETROGRADE ET TOXINES BACTERIENNES

L'appareil de Golgi est un compartiment de biosynthèse et de sécrétion, cependant, les endosomes peuvent y être amenés, échappant ainsi aux voies de dégradation ou de recyclage. C'est ce qu'on appelle le transport rétrograde. Ainsi, les cargos de molécules peuvent être transportés jusqu'au trans-Golgi, aux membranes de l'appareil de Golgi ou parfois au réticulum endoplasmique. Le transport rétrograde permet, par exemple, le recyclage de M6PR au trans-Golgi ou le transport de certaines protéines de l'autophagie. La clathrine peut être requise lors du transport rétrograde, notamment pour la déformation de la membrane. La tubulure est ensuite faite grâce au rétromère qui est aussi une protéine du manteau et se compose de dimère Sorting Nexin (SNX) et du trimère VPS26, VPS29 et VPS35 (Johannes and Popoff, 2008). Le rétromère peut également induire la courbure de la membrane à la place de la clathrine.

De nombreux pathogènes et des toxines empruntent une des deux voies principales du trafic intracellulaire (Figure I.13) (Mukhopadhyay and Linstedt, 2013; Sandvig et al., 2015; Sun, 2012) :

1. Internalisation → endosome précoce / endosome tardif / lysosome → translocation vers le cytosol (HIV, toxines AB, *Chlamydia*, *Leishmania*, *Listeria*, toxines AB7).
2. Internalisation → appareil de Golgi → réticulum endoplasmique → translocation vers le cytosol (SV40, toxines AB5).

Les trois grands groupes de toxines sont : les toxines AB (1 sous-unité A et 1 sous-unité B) , AB5 (1 sous-unité A et 5 sous-unités B) et AB7 (1 sous-unité A et 7 sous-unités B). Dans la nomenclature, A représente la sous-unité ayant l'activité catalytique tandis que B contient le domaine de fixation au récepteur. Parmi les toxines AB5, on retrouve la toxine de Shiga, la toxine cholérique ou encore la toxine pertussique, tandis que parmi les toxines AB il y a la toxine diphtérique, la toxine tétanique ou la toxine botulinique.

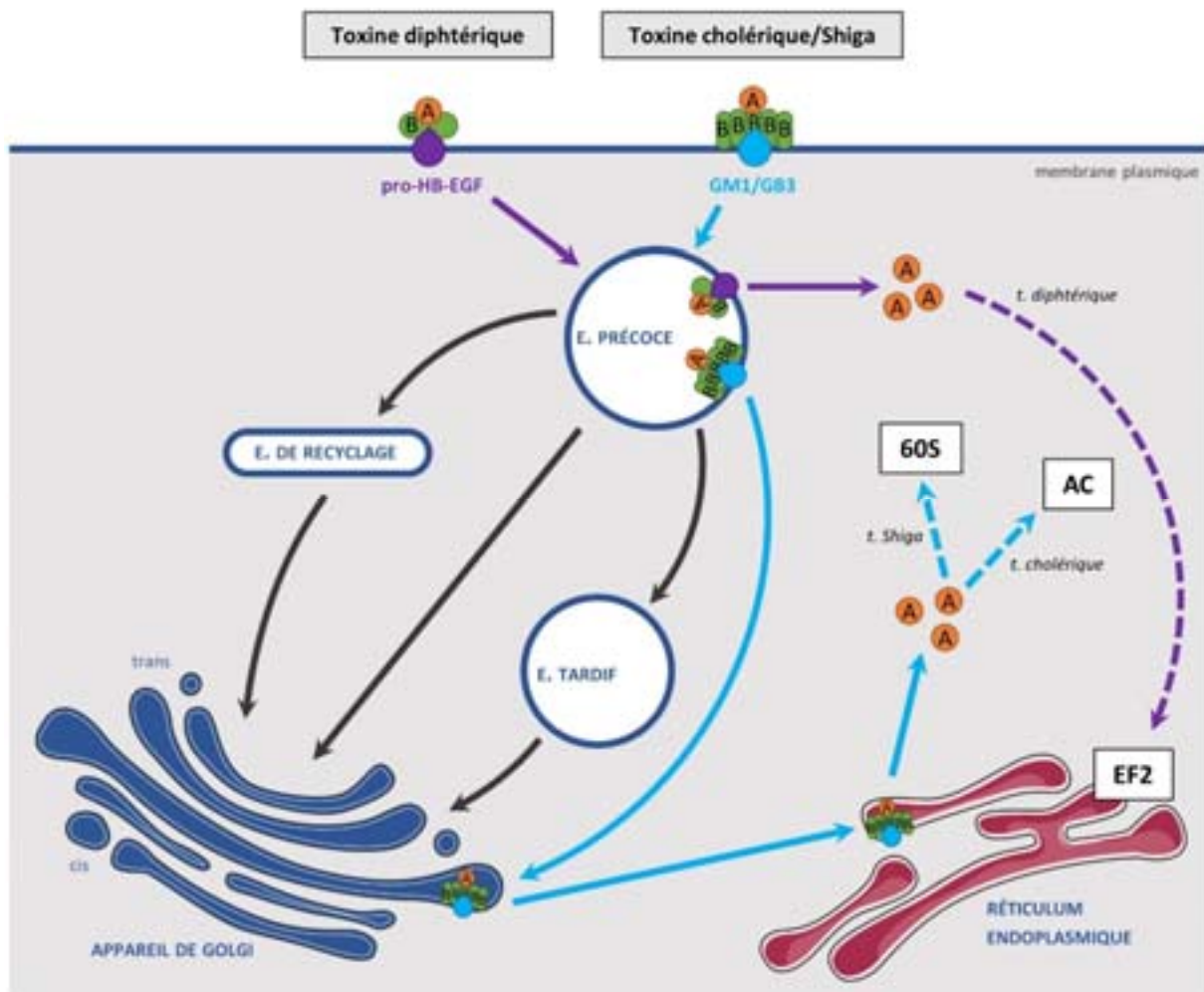


Figure I.13 – Transport rétrograde et trafic cellulaire des toxines diphtérique, cholérique et de Shiga

Le transport rétrograde se fait à partir de l'endosome précoce ou des voies de dégradation ou de recyclage pour aboutir dans le trans-Golgi. Certaines toxines exploitent ce mécanisme. Ainsi, la toxine diphtérique passe dans l'endosome précoce pour être relarguée dans le cytosol tandis que les toxines de Shiga ou cholérique sont transportées au Golgi, puis au réticulum endoplasmique où elles peuvent rejoindre le cytosol. L'activité catalytique des sous-unités A cible le facteur d'élongation

EF2, la sous-unité ribosomale 60S et l'adénylate cyclase (AC), respectivement pour la toxine diphtérique, de Shiga et cholérique.

4.3.1 Toxine diphtérique (AB)

La diphtérie est une infection du pharynx due à *Corynebacterium diphtheriae*. Cette bactérie transporte un bactériophage lysogénique contenant le gène codant pour la toxine diphtérique et sa transcription est notamment activée par une carence en fer. L'infection se caractérise par une pseudomembrane qui se développe dans la gorge. Ensuite, la toxine est relarguée localement et cause des inflammations du myocarde et du tissu nerveux, ce qui peut entraîner la mort.

TOXINE DIPHTÉRIQUE : Elle s'organise en trois domaines : catalytique (C), de translocation (T) et de liaison au récepteur (R). En reprenant la nomenclature, C correspond à A tandis que T et R correspondent à la sous-unité B. La liaison de la toxine à la cellule se fait par l'intermédiaire du précurseur au récepteur HB-EGF (Heparin-Binding Epidermal Growth Factor), nommé pro-HB-EGF (Gillet and Barbier, 2015). Un clivage par la protéase furine intervient entre C et T pour que la toxine puisse devenir active, les sous-unités restent cependant liées par un pont disulfure.

INTERNALISATION : La toxine diphtérique est internalisée par la voie de la clathrine et atteint l'endosome précoce en 5 min (Gillet and Barbier, 2015). Au cours des 5 à 15 min suivantes, la toxine est transférée jusqu'au lysosome par la voie de dégradation. Le pH acide (environ 5,3) permet le changement conformationnel de T et la translocation de C à travers la membrane. Le pont disulfure est réduit et C est relargué dans le cytosol. Toutes les molécules de C ne vont pas dans le cytosol, mais il suffit d'une seule sous-unité pour tuer la cellule.

MODE D'ACTION : L'activité catalytique de la sous-unité C permet l'ADP-ribosylation de EF2 (Elongation Factor 2) (Honjo et al., 1968). La cellule meurt suite à l'arrêt de la synthèse des protéines. L'activité létale de la toxine diphtérique peut également être utilisée comme thérapie pour les cancers (Li et al., 2013b). En effet, en recombinant la toxine pour qu'elle se lie à un ligand surexprimé dans certains cancers (ex : IL-13 dans le carcinome rénal), les tumeurs non solides, dans le sang ou la moelle osseuse, peuvent être inhibées.

4.3.2 Toxine cholérique (AB5)

Le choléra est une infection intestinale aiguë due à *Vibrio cholerae*. Elle se caractérise par une sévère déshydratation et une diarrhée caractéristique causées par la trop grande sortie d'eau et d'ions (sodium, chlore) des cellules intestinales. La mort survient en moins de trois jours en absence de traitement.

TOXINE CHOLÉRIQUE : Elle contient un domaine enzymatique actif, A, responsable de la toxicité, ainsi que cinq sous-unités B qui permettent la fixation aux cellules de l'intestin. Celle-ci se fait grâce au monoganglioside GM1 se situant sur les radeaux lipidiques composés de gangliosides, de cholestérol,

de sphingomyéline ou encore de protéines à ancre GPI (Doherty and McMahon, 2009). La toxine cholérique lie cinq GM1, à raison d'un par sous-unité B.

INTERNALISATION : L'entrée dans la cellule peut se faire par la voie de la clathrine, par les cavéoles ou encore par une voie indépendante de la cavéoline et de la dynamine. Cela dépend de la cellule, mais dans les cellules intestinales humaines (Caco2), l'internalisation se fait majoritairement par la clathrine dans un processus dépendant de la dynamine (Doherty and McMahon, 2009; Wernick et al., 2010). Les cellules avec une faible expression de cavéoline internalisent la toxine cholérique par la voie dépendante de la clathrine (Blouin, 2013). Une fois à l'intérieur, la toxine cholérique passe dans les endosomes précoces et de recyclage, puis est transportée au trans-Golgi en utilisant des molécules comme Rab6 et l'actine ou des complexes de protéines comme les microtubules ou encore le rétromère (Wernick et al., 2010). Ensuite, elle rejoint le réticulum endoplasmique, via une voie dépendante du manteau COPI dans les cellules intestinales humaines T84. La Protéine Disulfure Isomérase (PDI) permet le déploiement de A dans la lumière du réticulum et la translocation dans le cytosol peut se faire grâce à un canal sûrement constitué de Sec61.

MODE D'ACTION : La sous-unité A est stabilisée dans le cytosol par ARF6-GTP, la protégeant ainsi de la dégradation. L'activité de A catalyse l'ADP-ribosylation de la petite protéine G alpha, Gs, qui permet l'activation de l'adénylate cyclase et ainsi l'augmentation d'AMP cyclique dans la cellule (Vanden Broeck et al., 2007). Ceci a pour conséquence une activation des canaux chlorures à la surface des cellules épithéliales et il en résulte une sécrétion d'ions chlorure dans le milieu extérieur, de même qu'un déplacement important d'eau vers la lumière intestinale.

4.3.3 Toxine de Shiga (AB5)

La toxine de Shiga est produite par *Shigella dysenteriae* et est responsable de désordres intestinaux, causés par une intense inflammation et une destruction des tissus. La maladie guérie spontanément le plus souvent, avec tout de même des complications chez les nourrissons et les jeunes enfants. Il existe également des toxines Shiga-like produites par certaines souches d'*E. coli* (Shiga toxin-producing *E. coli* : STEC).

TOXINE DE SHIGA : Elle contient une sous-unité catalytique A et cinq composés B qui forment un pentamère et se fixent au glycosphingolipide Gb3 des radeaux lipidiques (Bergan et al., 2012). Chaque sous-unité B peut lier jusqu'à quinze Gb3, et les cellules cibles sont diverses : épithélium rénal, endothélium, plaquettes, système nerveux... Dans certaines lignées cellulaires, TLR4 permet la fixation de la toxine de Shiga.

INTERNALISATION : L'endocytose de la toxine de Shiga se fait par plusieurs voies : une majorité grâce à une internalisation indépendante de la dynamine et de la clathrine, une partie par la voie de la clathrine, mais il a été également montré une implication des cavéoles ou l'utilisation d'une voie spécifique à la toxine de Shiga (Bergan et al., 2012; Doherty and McMahon, 2009). Pendant le transport

intracellulaire, le composé A est clivé par la furine en un petit fragment A2 et en un fragment enzymatiquement actif A1 qui sont liés par un pont disulfure (Bergan et al., 2012). La toxine va dans l'appareil de Golgi directement depuis l'endosome précoce grâce à Rab6, au rétromère et à des protéines SNARE (Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor). Elle est ensuite transportée dans le réticulum endoplasmique de manière indépendante de COPI, mais en utilisant l'actine, Rab6 et les microtubules. Dans la lumière du réticulum, le pont disulfure entre les deux fragments A est réduit et A1 est transloqué dans le cytosol par le canal Sec61. Une seule molécule A1 peut tuer la cellule et seulement 4 % du fragment internalisé est transloqué en 4h (Bergan et al., 2012; Sandvig et al., 2015).

MODE D'ACTION : Une fois dans le cytosol, A1 inactive les ribosomes en clivant une adénine de l'ARN 28S de la sous-unité ribosomale 60S. La synthèse protéique est interrompue et entraîne la mort de la cellule. C'est ainsi que la toxine de Shiga peut être utilisée en médecine sans modification, car Gb3 est très exprimé dans les cellules cancéreuses (Sandvig et al., 2015). De plus, la toxine induit également un relargage de cytokines (TNF- α , GM-CSF, IL-1, IL-6, IL-8) et une apoptose en conséquence des dommages ribosomiaux (Bergan et al., 2012; Sandvig et al., 2015).

Les exemples donnés ici montrent à quel point le mécanisme d'action de ces toxines peut être différent, même si l'internalisation et le chemin intracellulaire sont identiques. La toxine cholérique est mortelle en absence de traitement ou de réponse immune, alors que la toxine de Shiga induit une pathologie qui se résout par elle-même en absence de complications. Concernant le dernier cas de la toxine de Shiga, celle-ci est également pro-inflammatoire par l'induction de la sécrétion de cytokines et, en dehors d'une mort cellulaire due à l'arrêt de la synthèse protéique, elle peut induire l'apoptose de la cellule. En regard de l'effet de la LPV sur les cellules, la toxine de Shiga comporte de nombreux points communs au niveau de l'activation cellulaire, notamment pour l'apoptose (Genestier et al., 2005a).

5 LE STRESS CELLULAIRE INDUIT CHEZ LES NEUTROPHILES HUMAINS

5.1 FORMATION DE DRO

Les dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) sont des espèces réactives et oxydantes essentielles à l'homéostasie cellulaire, à la défense antimicrobienne, à la relaxation du muscle lisse, à l'adhésion plaquettaire, à l'apoptose... (Migdal and Serres, 2011). Leur production est médiée par la mitochondrie et également par des enzymes. Les chaînes d'électrons présentes sur la membrane interne des mitochondries vont permettre la phosphorylation oxydative de l'ADP en ATP pour produire de l'énergie, mais également des DRO.

DRO : L'oxygène va être dégradé par la NADPH oxydase (NOX) en un radical superoxyde ($O_2 \rightarrow O_2^{\cdot -}$) (Stoiber et al., 2015). La superoxyde dismutase (SOD) permet la production de peroxyde d'hydrogène à partir du radical superoxyde ($O_2^{\cdot -} \rightarrow H_2O_2$). Le peroxyde d'hydrogène génère le plus délétère des DRO, le radical hydroxyl, en réagissant avec les métaux de transition (Fe^{2+} , Cu^+) ($H_2O_2 \rightarrow \cdot OH$). Cependant, la catalase ou la glutathion peroxydase peuvent également transformer le peroxyde d'hydrogène en eau ($H_2O_2 \rightarrow H_2O$). Il existe également d'autres DRO secondaires, comme les radicaux peroxydes RO_2^{\cdot} ou encore l'hydroperoxyde RO_2H .

NADPH oxydase : La NOX permet la production de radicaux superoxydes à partir de l'oxygène grâce au NADPH : $NADPH + 2O_2 \rightarrow NADP^+ + H^+ + 2O_2^{\cdot -}$. Il existe plusieurs NOX qui sont localisés dans la membrane plasmique ou dans certains granules (Migdal and Serres, 2011). La NOX des cellules phagocytaires est NOX2, elle se compose d'un site catalytique présent sur la membrane plasmique et de protéines régulatrices qui se trouvent dans le cytosol. Après stimulation, les protéines régulatrices du cytosol migrent vers la membrane pour s'associer au cytochrome b_{558} , rendant ainsi NOX2 active.

STRESS OXYDATIF : Lorsqu'un déséquilibre se produit entre la production de DRO et les capacités antioxydantes de la cellule, on parle alors de stress oxydatif (Migdal and Serres, 2011). Par exemple, il peut y avoir une production excessive de DRO lors du vieillissement, dans l'athérosclérose, le cancer ou une intoxication aux métaux lourds. Dans le sens inverse, une diminution des antioxydants se fait lors de carence alimentaire, d'obésité ou de tabagisme. Les DRO sont responsables de modifications délétères comme une oxydation des acides aminés et de la chaîne polypeptidique, la formation de protéines carbonylées ou encore la peroxydation lipidique.

5.2 AUTOPHAGIE

L'autophagie est un procédé où le cytosol et les organites sont séquestrés dans des vésicules à double membrane qui vont fusionner avec les lysosomes pour dégrader leur contenu. Ce mécanisme a un rôle important dans la réponse au stress cellulaire, dans la voie du développement et également dans la

suppression de tumeur, mais il peut également servir à éliminer les pathogènes (Chargui and El May, 2014). Il est activé par le stress oxydatif, le métabolisme du glucose, un dysfonctionnement des mitochondries, une carence en acides aminés ou encore tout autre stress cellulaire (Dodson et al., 2013).

En premier lieu, il y a émergence d'une membrane incurvée, appelée phagophore, qui s'allonge et se referme sur elle-même pour donner un autophagosome à double membrane (Figure I.14).

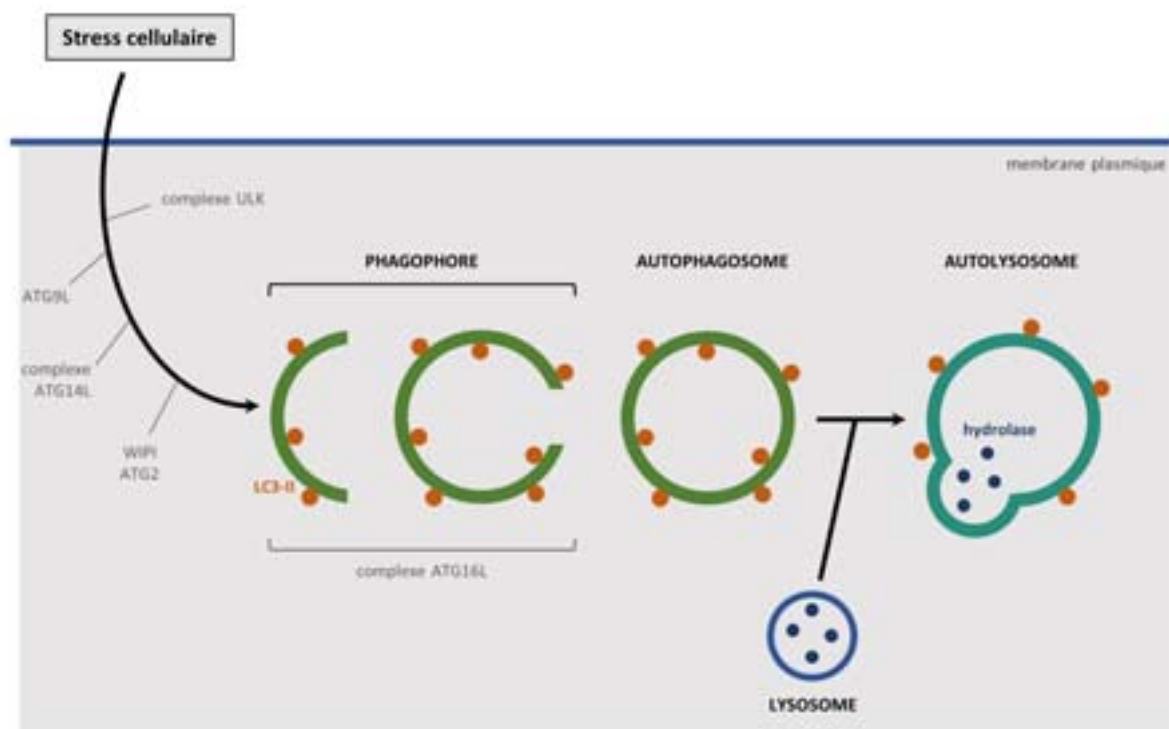


Figure I.14 – Mécanisme de formation des vésicules d'autophagie

Celui-ci contient une partie du cytoplasme qui va être digéré par les hydrolases lors de la fusion avec le lysosome. L'autophagie est réalisée grâce à plusieurs protéines ATG (Autophagy-Related Genes), avec, dans l'ordre (Shibutani et al., 2015) :

1. Le **complexe ULK** (serine-threonine kinase) qui se compose de ULK1 et 2, ATG13, ATG101 et FIP200. Il est inhibé par mTOR et activé par l'AMPK (AMP-activated Protein Kinase).
2. **ATG9L**, composé de ATG9L 1 et 2, permet, avec le complexe ULK, de recruter la PI3K spécifique à l'autophagie depuis le réticulum endoplasmique.
3. Le **complexe ATG14L** (ATG14L, VPS34, beclin-1, VPS15) se lie à la PI3K et permet la synthèse de PIP3.
4. Le **complexe WIPI/ATG2** est recruté grâce à la PIP3 qui recrute elle-même le complexe ATG16L.
5. Le **complexe ATG16L** se compose de ATG16L, ATG5 et ATG2. Il est localisé à la surface du phagophore et permet l'ajout de la phosphatidylethanolamine sur LC3-I pour former le LC3-PE, ou LC3-II.

6. **LC3-II** s'accumule donc sur la membrane de l'autophagosome et constitue un marqueur intéressant lors d'études de l'autophagie.

5.3 APOPTOSE

L'apoptose est une mort cellulaire programmée et impliquée dans le développement, le maintien et le renouvellement tissulaire. Elle est en état d'inhibition quand elle n'est pas requise et peut être induite par des cytokines pro-inflammatoires, des radicaux libres, des toxines, des radiations, etc. (Vachon, 2006). Dans le cas du neutrophile, elle permet sa mort programmée après 12 à 24h dans la circulation sanguine et garantit l'élimination des cellules âgées dont le phénotype change (Adrover et al., 2016).

Plusieurs changements morphologiques sont à l'origine de la particularité de l'apoptose (Fink and Cookson, 2005; McCracken and Allen, 2014; Vachon, 2006). Il y a tout d'abord un bourgeonnement membranaire et la cellule va se vacuoliser. Une condensation nucléaire va avoir lieu et précède la fragmentation de l'ADN. Enfin, il y aura une formation de corps apoptotiques caractéristiques, ainsi qu'une perte de l'asymétrie membranaire, exposant ainsi les phosphatidylsérines (PS) au milieu extracellulaire qui vont servir de signal pour la phagocytose. Si la phagocytose n'est pas possible (*in vitro*, pathologies), la cellule va entrer en nécrose (Fink and Cookson, 2005).

Il y a trois catégories de molécules présentes à la membrane des mitochondries qui jouent un rôle dans l'apoptose : les inhibiteurs (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1...), les activateurs (Bax, Bak, Bok...), mais également les sensibilisateurs (Bad, Bid, Bim...) qui sont pro-apoptotiques (Vachon, 2006). Concernant leurs actions, les inhibiteurs empêchent les activateurs de former un pore à la membrane de la mitochondrie tandis que les sensibilisateurs lient les inhibiteurs pour les empêcher d'agir ou potentialisent directement les activateurs. On retrouve deux voies bien différenciées concernant l'activation de l'apoptose (Figure I.15) : la voie intrinsèque qui dépend de la mitochondrie et la voie extrinsèque qui est activée par des récepteurs à domaines de mort (McCracken and Allen, 2014; Vachon, 2006) :

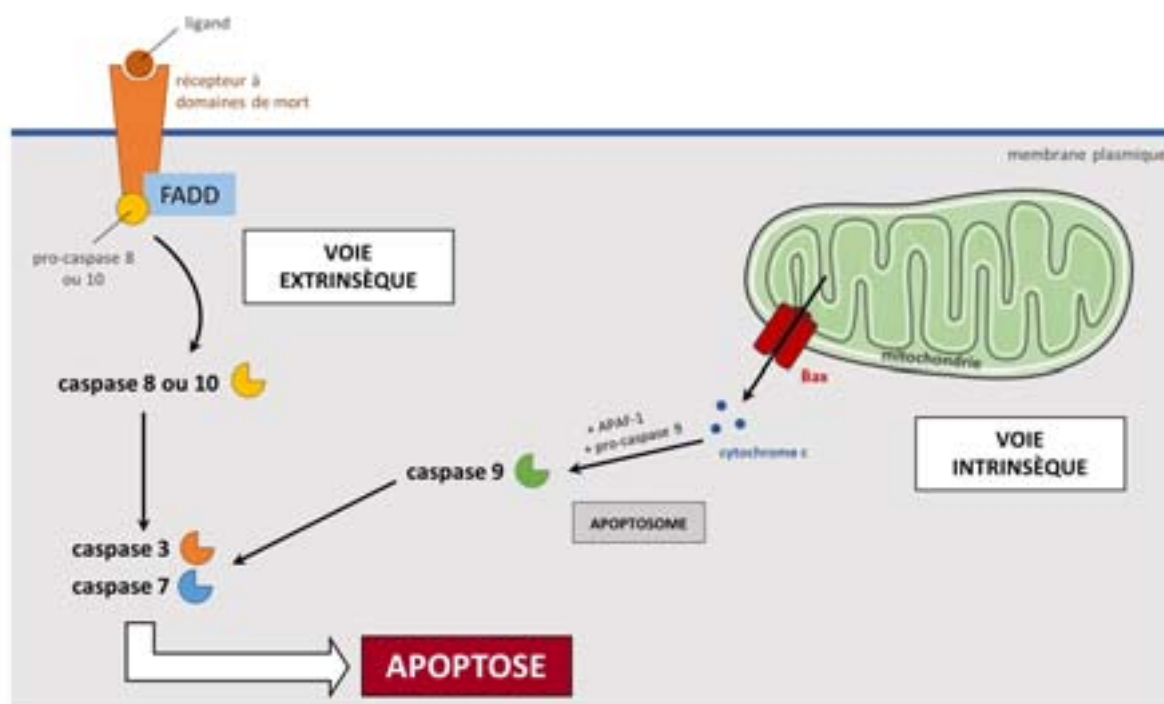


Figure I.15 – Voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose

L'apoptose peut être activée par la voie mitochondriale (voie intrinsèque) ou par les récepteurs à domaines de mort (voie extrinsèque). Les caspases initiatrices (8, 9 et 10) sont activées et permettent en retour le clivage des caspases effectrices (3 et 7) qui vont entraîner le clivage de plusieurs protéines pour aboutir à l'apoptose.

VOIE INTRINSÈQUE : Les activateurs tels que Bax vont former un pore à la membrane de la mitochondrie, induisant ainsi une perte de l'intégrité membranaire qui permet le relargage du cytochrome c dans le cytosol. Le cytochrome c peut alors s'associer au Apoptosis Protease Activating Factor-1 (APAF-1) et à la pro-caspase 9 pour former l'apoptosome. La caspase 9, une caspase initiatrice, va ainsi devenir active par clivage et va pouvoir cliver elle-même les pro-caspases 3 et 7 pour les activer.

VOIE EXTRINSÈQUE : Lorsqu'un ligand se fixe sur le récepteur à domaine de mort (récepteur à Fas, TNF- α , TRAIL), il y a une oligomérisation des récepteurs, ainsi qu'un recrutement du Death-Inducing Signaling Complex (DISC). Le complexe DISC se compose du récepteur, du Fas Associated Death Domain (FADD), qui se lie aux domaines de morts du récepteur, et de la pro-caspase 8 ou 10. DISC permet l'activation des caspases initiatrices 8 ou 10 par clivage, entraînant ainsi l'activation des caspases 3 et 7.

Une fois les caspases initiatrices 3 et 7 activées, elles vont cliver de nombreux substrats (les lamines nucléaires, l'actine, les kinases comme Akt ou ROCK1...) et provoquer les bouleversements morphologiques évoqués précédemment. De plus, la voie extrinsèque peut également activer la voie intrinsèque par le clivage de Bid (McCracken and Allen, 2014; Vachon, 2006).

5.4 NETOSE

Récemment mise en évidence par Brinkmann *et al.* (2004), la NETose est considérée comme une mort cellulaire particulière où le contenu interne de la cellule est relargué dans le milieu. La chromatine en est le composant principal, accompagné d'histones et d'enzymes, ainsi que du contenu des granules de sécrétion dans le cas des neutrophiles. Ce relargage de composés intracellulaires vers l'extérieur forme un filet appelé NET (Neutrophil Extracellular Trap) qui piège les microorganismes dans l'attente des cellules phagocytaires.

La formation de ces NET, ou des structures assimilées à des NET, est un mécanisme très ancien qui se retrouve à travers le règne animal (hommes, souris, chats, poissons, insectes...), mais également chez les plantes. Chez les mammifères, la mort est initiée par les polynucléaires neutrophiles, mais également les macrophages, les éosinophiles, les basophiles et les mastocytes (Cheng and Palaniyar, 2013; Zawrotniak and Rapala-Kozik, 2013). Ce processus étant une découverte récente, les recherches sont concentrées essentiellement sur le phénomène de NETose induite par les neutrophiles. De plus, il n'y a pas de signal de mort par le neutrophile, les caspases ne sont pas activées et il n'y a pas de marquage positif à la F-actine, écartant ainsi les hypothèses d'apoptose ou de nécrose (Almyroudis *et al.*, 2013; Remijsen *et al.*, 2011a; Wartha *et al.*, 2007). Toutefois, il a été démontré que l'autophagie et l'activation de la NADPH oxydase NOX2 étaient nécessaires, du moins dans le cas d'une stimulation par le phorbol myristate acétate (PMA).

INDUCTION : Le signal activant la NETose peut avoir différentes origines : bactéries (*Staphylococcus aureus*, *Borrelia burgdorferi*, *Mycobacterium tuberculosis*), champignons (*Aspergillus*, *Candida albicans*), virus (VIH) ou encore parasites (*Toxoplasma gondii*, *Leishmania amazonensis*) (Brinkmann and Zychlinsky, 2012; Kaplan and Radic, 2012). Cependant, des éléments endogènes peuvent également induire le relargage de NET comme les anticorps, les plaquettes, certains peptides inflammatoires (IL-8, TNF- α , peptides du complément), la stimulation de récepteurs (TLR, Fc) ou par des produits chimiques dont la thapsigargine (augmente le calcium cytosolique) ou le PMA (active les kinases) (Kaplan and Radic, 2012; Remijsen *et al.*, 2011b; Wartha *et al.*, 2007; Zawrotniak and Rapala-Kozik, 2013).

ÉVÈNEMENTS (Figure I.16) : Après l'activation de la NETose, le calcium intracellulaire va augmenter et la PKC sera activée, poussant ainsi à l'assemblage de la NADPH oxydase (NOX2). La sécrétion de DRO entraîne une perméabilisation de la membranaire nucléaire, permettant à l'élastase de neutrophile (EN) et à la myéloperoxydase (MPO) de se transloquer dans le noyau (Brinkmann and Zychlinsky, 2012; Kaplan and Radic, 2012; Zawrotniak and Rapala-Kozik, 2013). Là, l'EN va dégrader les histones H1 pour induire la décondensation de la chromatine que va potentialiser la MPO. La peptidylarginine déiminase 4 (PAD4) va citrulliner les histones H3 pour augmenter la décondensation de la chromatine. Comme la membrane nucléaire est endommagée, la chromatine va s'étendre dans le

cytoplasme pour se mélanger aux facteurs antimicrobiens et au contenu des granules de sécrétion. Enfin, la membrane plasmique se rompt pour libérer les filets de chromatine et ses constituants. Cependant, la cellule pourrait survivre à ce phénomène, comme l'ont supposé Cheng et Palaniyar (2013). Cela a été montré sur les éosinophiles, qui sont viables après le relargage de leurs Eosinophil Extracellular Traps (EET) (Yousefi et al., 2008). Toutefois, la manière dont les neutrophiles survivraient après le relargage de leur NET est encore sujette à discussion, et dépendrait également du stimulus appliqué pour induire la NETose (Cheng and Palaniyar, 2013).

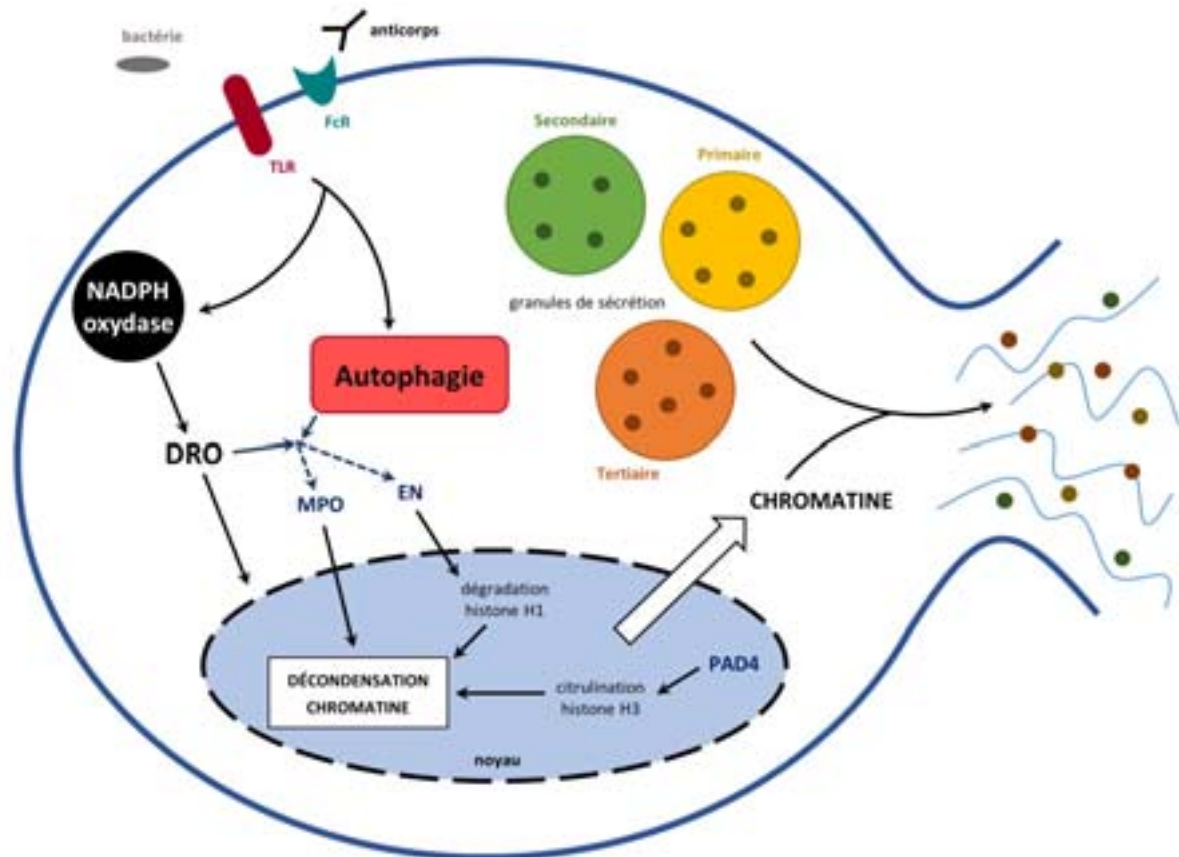


Figure I.16 – Mécanisme de la NETose

La NETose est induite par des pathogènes (virus, parasites, bactéries) ou par des éléments endogènes. L'activation va résulter en la sécrétion de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) et en la formation de vésicules autophagiques. Ces deux événements sont essentiels et permettent à la myéloperoxydase (MPO), à l'élastase de neutrophile (EN) et à la peptidylarginine déiminase 4 (PAD4) de décondenser la chromatine. La membrane nucléaire va se dégrader et libérer la chromatine dans le cytoplasme. Enfin, la membrane de la cellule se rompt et le contenu cytoplasmique (chromatine, protéines des granules de sécrétion, histones...) est relargué dans le milieu extérieur pour former un filet pouvant piéger les pathogènes et avoir une action délétère sur eux.

ACTION SUR LES MICROORGANISMES : L'ADN relargué va empêcher la dissémination jusqu'à permettre aux autres cellules de l'immunité d'arriver sur le site de l'infection, en particulier les macrophages qui vont phagocyter les pathogènes. De plus, une grande concentration de facteurs antimicrobiens vont également jouer un rôle déterminant (Brinkmann and Zychlinsky, 2012; Kaplan and Radic, 2012; Zawrotniak and Rapala-Kozik, 2013) : les histones – majoritaires dans les NET – sont bactéricides, tout comme la MPO et la EN ou encore les peptides antimicrobiens (défensines,

cathélicidines). Les chélateurs d'ions ont une action antifongique (calgranuline, chélateur de zinc) ou bactéricide (lactoferrine, chélateur de fer), tandis que les protéases (EN et protéinase 3) inactivent les facteurs de virulence du pathogène.

La NETose semble donc être une mort cellulaire importante dans la lutte contre les pathogènes. Néanmoins, les microorganismes ont développé des mécanismes de résistance, en particulier les bactéries (Arazna et al., 2013) :

- **Capsule polysaccharidique** : Elle prévient la phagocytose et empêche l'action d'immobilisation des NET tout en protégeant contre la mort de la bactérie.
- **Altération des charges électriques à la surface** : Les charges positives à la surface de *S. aureus* empêchent la fixation des peptides antimicrobiens cationiques. Afin de changer les charges de la bactérie, des modifications sont effectuées comme une aminoacétylation du phosphatidylglycérol (gène *mprF*) ou l'ajout d'une D-alanine (opéron *Dlt*).
- Formation de **biofilm**.
- Inhibition des NET par des **DNase** (*Staphylococcus aureus*, *Sda1* chez les streptocoques de groupe A) qui clivent l'ADN.
- Inhibition des ROS grâce à la **catalase** de certaines bactéries (*S. aureus*) qui permet de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau avec la production d'oxygène, ce qui amène un environnement aérobie.

Des anomalies du mécanisme de la NETose peuvent également induire certaines maladies comme le lupus érythémateux disséminé ou la vascularite, car la MPO, l'ADN et les histones sécrétés jouent un rôle d'auto-antigènes (Diamantopoulos, 2013). Les traitements pour lutter contre une sécrétion de NET anormale sont basés sur l'utilisation d'anticorps anti-histones, d'anti-protéases, de DNase ou encore d'inhibiteurs de MPO ou PAD4 (Cheng and Palaniyar, 2013; Kaplan and Radic, 2012).

6 OBJECTIFS DE LA THESE

Les récentes avancées sur la détermination des récepteurs des leucotoxines, de même que la compréhension de mécanismes cellulaires récents (autophagie, NETose), posent la question de savoir ce que les leucotoxines entraînent comme bouleversements lorsqu'elles se fixent sur leur cellule cible. En effet, la fixation d'une toxine à un GPCR peut, par exemple, induire une signalisation biaisée, car elle ne fonctionne pas de la même manière qu'un agoniste naturel. C'est le cas du C5aR, où le peptide du complément C5a induit une libération du calcium intracellulaire très rapide et brève sur les PNN, tandis qu'avec HlgC/HlgB, ce processus met plus de temps à se mettre en place et le calcium diminue plus lentement. Quant à la LPV, l'augmentation du calcium intracellulaire se fait après une phase de latence longue pour atteindre finalement un plateau (Tawk et al., 2015).

Ainsi, ces deux leucotoxines ne semblent pas avoir la même signalisation que le C5a, mais entraînent également entre elles, une activation de la cellule différente. Connaître le mode d'action de ces toxines est essentiel, surtout en regard de la prévalence importante de souches résistantes à de multiples antibiotiques et des échecs répétés des vaccins ciblant la bactérie elle-même. Les leucotoxines sont, de manière générale, des facteurs de virulence aggravant l'infection à *S. aureus* et il pourrait être utile de développer des stratégies thérapeutiques les ciblant préférentiellement, afin d'apporter un élément en plus dans les options de traitement.

Cette thèse s'est tout d'abord intéressée à savoir si la LPV et HlgC/HlgB étaient internalisées dans la cellule, car ceci invaliderait donc l'hypothèse d'un pore à la membrane cytoplasmique. Cela a été suggéré que la LPV pourrait être internalisée dans la cellule et même dans la mitochondrie (Genestier et al., 2005a). De plus, la question du devenir de la toxine à l'intérieur de la cellule s'est également posée, tout comme de connaître l'effet délétère de la présence de ces toxines sur des temps longs d'exposition. Enfin, il a été nécessaire de revoir les conditions de maintenance des neutrophiles, utilisés majoritairement comme modèle d'étude au laboratoire, et également d'étudier l'effet des leucotoxines sur d'autres types cellulaires plus stables comme les macrophages. Les travaux développés dans ce manuscrit s'articulent ainsi en trois parties :

- Développement d'un modèle alternatif aux neutrophiles.
- Étude de l'internalisation et du transport de la toxine dans la cellule.
- Caractérisation de l'apoptose et de la NETose lors d'un contact avec les leucotoxines.

Chapitre II

Matériels et Méthodes

1 MATÉRIELS

1.1 SOLUTIONS & TAMPONS

DEXTRAN : 6 % (p/v) Dextran Leuconostoc (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), 0,9 % (p/v) NaCl

MOWIOL : 10% (p/v) Mowiol® 4-88 (Polysciences, Eppelheim, Allemagne), 25% glycérol, 100 mM Tris-Base

TAMPON BORATE : 100 mM acide borique, pH 8,4 (NaOH)

TAMPON EGTA : 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM glucose, 10 mM Hepes, 0,1 mM EGTA, pH 7,3 (Tris-base)

TAMPON HBSS-HEPES 20 mM : 1,3 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂-6H₂O, 0,4 mM MgSO₄-7H₂O, 5,4 mM KCl, 0,4 mM KH₂PO₄, 4,2 mM NaHCO₃, 138 mM NaCl, 0,4 mM Na₂HPO₄, 5,6 mM D-Glucose, 20 mM HEPES, pH 7,4

TAMPON RIPA/TRITON X100 : 50 mM Tris, 300 mM NaCl, 2 % (v/v) NP-40, 2 % (p/v) désoxycholate de sodium, 0,2 % SDS (p/v), 0,2 % Triton X100 (v/v), pH 7,6

1.2 ANTICORPS

1.2.1 Anticorps primaires

	MARQUAGE	REFERENCE / FOURNISSEUR	ANIMAL HOTE
RECEPTEURS	C5aR C-ter humain	sc-7089, Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Allemagne)	polyclonal chèvre
	C5aR C-ter non phosphorylé humain	ab59390, Abcam (Cambridge, UK)	polyclonal lapin
	C5aR C-ter phosphorylé (S334) humain	sc-53793, Santa Cruz Biotechnology	monoclonal souris
	C5aR C-ter phosphorylé (S338) humain	ab61022, Abcam	polyclonal lapin
	C5aR N-ter humain	MAB3648, R&D (Minneapolis, USA)	monoclonal souris
	TLR4 humain	ab30667, Abcam	monoclonal souris
TOXINES	HlgC	produit au laboratoire	polyclonal lapin
	HlgB	produit au laboratoire	polyclonal lapin
	LukF-PV	produit au laboratoire	polyclonal lapin
	LukS-PV f(ab') ²	produit au laboratoire	polyclonal lapin
	LAMP1 humain	sc-20011, Santa Cruz Biotechnology	monoclonal souris

	RAB11a humain	sc-166523, Santa Cruz Biotechnology	monoclonal souris
	RAB5 humain	sc-46692, Santa Cruz Biotechnology	monoclonal souris
AUTRES	M6PR humain	ab2733, Abcam	monoclonal souris
	PDI humain	sc-74551, Santa Cruz Biotechnology	monoclonal souris
	Caspase-8 p18 humain	sc-7890, Santa Cruz Biotechnology	polyclonal lapin
	Caspase-9 p10 humain	sc-7885, Santa Cruz Biotechnology	polyclonal lapin
	PI3K p85 α (Tyr 508) humain	sc-12929, Santa Cruz Biotechnology	polyclonal lapin
	ERK 1/2 (Thr202, Tyr204, Thr185, Tyr187)	05-797R, EMD Millipore (Billerica, USA)	polyclonal chèvre
	Élastase de neutrophile humain	ab21595, Abcam	polyclonal lapin
	LC3B humain	L10382, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)	polyclonal lapin

Tableau II.1 – Anticorps primaires utilisés

1.2.2 Anticorps secondaires

MARQUAGE	FLUOROCHROME	REFERENCE / FOURNISSEUR	ANIMAL HOTE	UTILISATION
IgG chèvre H&L f(ab') ²	DyLight 594	A50-207D4, Bethyl	âne	Colocalisation : - C5aR C-ter / Toxines
IgG lapin H&L f(ab') ₂	DyLight 488	120-216D2, Bethyl	âne	
IgG f(ab')² lapin H&L f(ab') ₂	DyLight 594	A120-212D4, Bethyl	chèvre	Colocalisation : - Toxines / Endosomes - Toxines / C5aR C-ter
IgG souris H&L f(ab') ₂	DyLight 488	A90-242D2, Bethyl	âne	- Toxines / TLR4 - C5aR C-ter / Endosomes
IgG lapin H&L f(ab') ₂	Alexa 555	A-21430, Life Technologies	chèvre	- C5aR C-ter - Élastase de neutrophile - LC3B

Tableau II.2 – Anticorps secondaires utilisés

1.3 DROGUES

Le YM-59483 et le trans-Ned-19 proviennent de Tocris Bioscience (Bristol, United Kingdom). Le W-54011 et le SB-290157 proviennent de Calbiochem (EMD Millipore, MA, USA). Les autres inhibiteurs (Thapsigargin, Ionomycin, Bafilomycin A1, GPN et DPI), le Triton X-100 et les sels proviennent de Sigma-Aldrich.

PRODUIT	REFERENCE / FOURNISSEUR	CONCENTRATION UTILISEE	TEMPS D'INCUBATION	EFFET
Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP)	0452, Tocris Bioscience	10 μ M	15 min	Dépolarise les mitochondries
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma-Aldrich	50 nM	divers	Contrôle (+) NETose
Puromycine	Sigma-Aldrich	18,4 μ M	6h	Contrôle (+) apoptose

Tableau II.3 – Composés chimiques utilisés comme contrôle positif

2 CELLULES HUMAINES

2.1 PURIFICATION DES NEUTROPHILES ET DES MONOCYTES

2.1.1 Séparation sur gradient de Ficoll

Les polynucléaires neutrophiles (PNN) et les monocytes humains sont purifiés à partir de concentrés leuco-plaquettaires sanguins (« buffy coat »), obtenus auprès de l'Établissement Français du Sang (Strasbourg, France) moins de 24 h après le prélèvement. Un gradient de densité de Ficoll® et de diatrizoate (densité = 1,077) est utilisé afin de séparer les cellules mononuclées (lymphocytes, monocytes) des PNN et des érythrocytes.

Le concentré cellulaire (40-50 mL) est dilué au 1/3 dans une solution de NaCl 0,9 % (p/v) et 30 mL sont déposés dans chaque tube sur 12 mL de milieu de séparation des lymphocytes (Eurobio, Les Ulis, France). Une centrifugation sans frein est effectuée à 800 x g pendant 20 min et les différentes phases sont ainsi séparées.

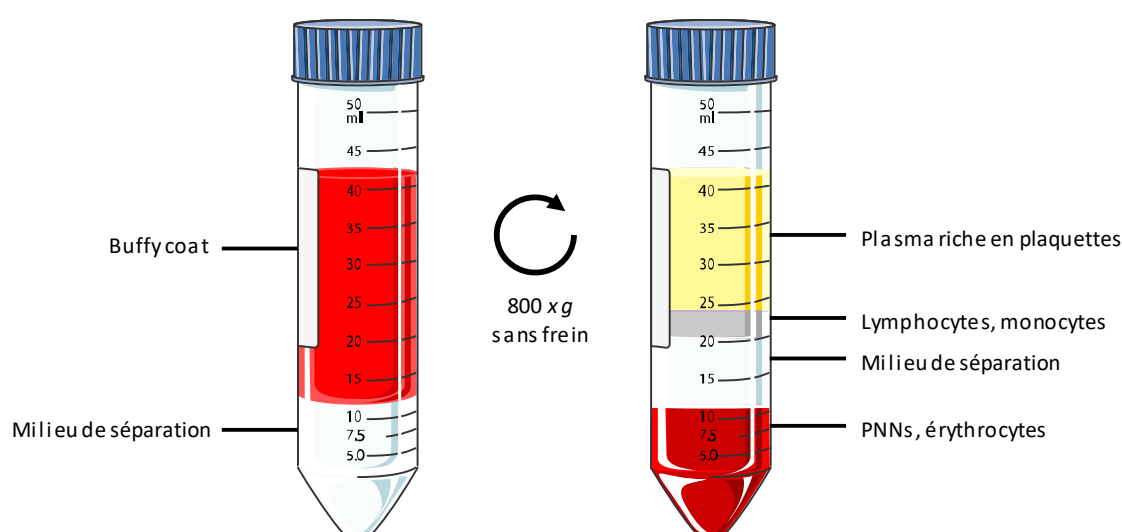


Figure II.1 – Purification des cellules leuco-plaquettaires sanguines.

Un gradient de Ficoll® et de diatrizoate permet de séparer les différents types cellulaires contenus dans le « buffy coat ». Le culot est constitué des PNN et des érythrocytes, puis vient le milieu de séparation, les cellules mononuclées et enfin le plasma.

2.1.2 Purification des neutrophiles

Le culot contenant les érythrocytes et les PNN est récupéré et additionné de 30 mL de NaCl 0,9 % et de 10 mL de Dextran 6 % (p/v) (Sigma-Aldrich). Après 30 min de sédimentation, le surnageant contenant les PNN est transféré dans un nouveau tube et centrifugé 5 min à 1700 \times g. Le culot est remis en suspension dans 500 μ L de NaCl 0,9 % pour procéder à un choc osmotique permettant d'éliminer les globules rouges résiduels : on ajoute 18 mL d'eau MilliQ pendant 45s, puis l'osmolarité est rétablie par 2 mL de NaCl 9 % (p/v). Une nouvelle centrifugation à 1 700 \times g pendant 5 min est effectuée, afin de laver les cellules et le culot est repris dans du tampon EGTA. Après une centrifugation à 1 700 \times g pendant 5 min, les PNN sont récupérés dans du RPMI supplémenté de 10% (v/v) de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF) (PAN Biotech GmbH, Allemagne) et laissés au repos pendant 1h. Finalement, la suspension est centrifugée 5 min à 1 700 \times g et les cellules sont filtrées sur un tamis de 70 μ m (Becton Dickinson, Le Pont-De-Claix, France) afin d'éliminer les agrégats.

2.1.3 Purification des monocytes

Pour la purification des monocytes humains, les étapes sont réalisées stérilement sous hôte à flux laminaire. L'anneau contenant les cellules mononuclées est récupéré avec le plasma et transféré dans un nouveau tube. Une centrifugation à 700 \times g est effectuée pendant 10 min, puis le culot est repris dans du NaCl 0,9 %. Les tubes sont assemblés deux à deux afin de procéder à la lyse osmotique. Dix-huit mL d'eau MilliQ sont ajoutés pendant 40s, puis l'osmolarité est rétablie par 2 mL de NaCl 9 %. À cette étape, les deux tubes sont assemblés et une centrifugation de 10 min à 700 \times g est effectuée. Le culot est repris dans du tampon EGTA. Trois centrifugations de 10 min à 700 \times g permettent ensuite d'éliminer les lymphocytes. Puis, après une dernière centrifugation, le culot est repris dans le milieu approprié (milieu de congélation ou milieu de différenciation).

2.2 DIFFERENCIATION DES MONOCYTES EN MACROPHAGES

Les cellules sont mises en suspension à une concentration de 5.10^6 cellules/mL dans le milieu suivant :

- 90 % (v/v) RPMI-1640 (PAN Biotech GmbH, Allemagne)
- 5 % (v/v) de sérum humain AB mâle décomplémenté
- 2 mM de glutamine (glutaMAX, Gibco®, InVitrogen, Paisley, UK)
- 0,1 % (p/v) de pénicilline/streptomycine (Gibco®, InVitrogen, Paisley, UK)
- 1 ng/mL de GM-CSF

Le sérum humain est de groupe AB et de donneur masculin, afin de permettre une meilleure compatibilité avec les cellules provenant de donneurs différents. Il est obtenu auprès de l'Établissement Français du Sang (Strasbourg, France). Le GM-CSF (Thermo Fisher Scientific) permet de différencier les monocytes humains en macrophages de type 1 qui sont impliqués dans la réponse inflammatoire et la suppression des tumeurs (Rey-Giraud et al., 2012).

Les cellules sont cultivées dans des flasques de 125 cm² où elles adhèrent et dans un incubateur à 37°C sous 5% de CO₂. Le milieu est changé deux fois par semaine et les monocytes se différencient au bout de cinq jours de contact avec le GM-CSF. Les monocytes non différenciés sont éliminés pendant les lavages lors des changements de milieu, car ils se décollent de la flasque alors que les macrophages adhèrent fortement au plastique. Les macrophages dérivés de monocytes peuvent être maintenus en culture pendant trois semaines.

2.3 LIGNEES CELLULAIRES U937 ET U937-C5AR

La lignée des cellules U937 dérive d'un lymphome histiocytaire humain et comporte les caractéristiques des cellules tumorales et également des monocytes (Sundström and Nilsson, 1976). La lignée U937-C5aR a été transfectée pour exprimer le récepteur C5aR humain (Kew et al., 1997). Ces deux lignées ont été généreusement données par le Pr. Jos A. van Strijp (Utrecht, Pays-Bas).

Les cellules sont cultivées en suspension dans un milieu RPMI supplémenté de 10% (v/v) de SVF décomplémenté et de 0,1% (p/v) d'antibiotiques (Pénicilline/Streptavidine), à 37°C, 5% de CO₂. Le milieu est changé tous les trois jours.

2.4 CONGELATION DES CELLULES

Les monocytes humains et les cellules de la lignée U937 peuvent être gardés dans de l'azote liquide. Après la purification, les cellules sont donc reprises dans du milieu de congélation :

- 50 % (v/v) de SVF
- 42 % (v/v) de RPMI
- 8 % (v/v) diméthyl-sulfoxyde (DMSO)

Des aliquotes de 1,8 mL sont préparées et congelées à -80 °C dans un bain d'isopropanol pendant 24 h. Les tubes sont ensuite transférés dans de l'azote liquide. La décongélation des cellules se fait en réchauffant les tubes à 37°C pendant 2 min.

3 TESTS DE L'ACTIVITE DES LEUCOTOXINES

3.1 EXPRESSION ET PURIFICATION DES LEUCOTOXINES

Afin de produire les leucotoxines, les gènes restreints aux protéines sécrétées sont fusionnés à la glutathion-S-transférase (GST) et exprimées dans *E. coli* BL21 (Baba Moussa et al., 1999b). Le tag GST a une activité enzymatique qui permet la quantification de la surexpression, ainsi que la co-purification sur colonne d'affinité GST.

PROTOCOLE : Les bactéries sont cultivées dans le milieu 2 x TY (bactotryptone 17 g/L, extrait de Bacto-levure 10 g/L, NaCl 5 g/L), puis l'expression des protéines est induite par 0,2 mM d'IPTG. Les protéines de fusion leucotoxines-GST sont purifiées par chromatographie d'affinité sur une colonne glutathion-Sepharose 4B™ (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Puis le tag GST est éliminé grâce à la PreScission® Protease (GE Healthcare). Ensuite, les leucotoxines sont purifiées par chromatographie d'échange d'ions pour LukS-PV, LukF-PV et HlgC ou d'interactions hydrophobes pour HlgB (Baba Moussa et al., 1999a; Gravet et al., 1998; Werner et al., 2002). La pureté des protéines est vérifiée par SDS-PAGE 10 à 15 % (p/v) et par immunoprécipitation radiale double en gel d'agarose 0,6 % (p/v) contre des antigènes natifs. Les protéines sont ensuite stockées à -80 °C.

3.2 COUPLAGE A UN FLUOROCHROME

Un fluorochrome peut être couplé aux leucotoxines afin de permettre certaines analyses comme la détermination de la constante de dissociation. Les toxines sont dépourvues naturellement de cystéine, mais il est possible d'en ajouter par mutagenèse dirigée à l'endroit désiré. Les protéines utilisées sont LukS-PV G10C et HlgB S27C. Le thiol (-SH) de la cystéine peut réagir avec une fonction maléïmide greffée sur un fluorochrome.

PROTOCOLE : Les cystéines des protéines sont réduites par 20 mM de Dithiothreitol (DTT). La fluorescéine-5-maléïmide (F5M ; M = 427 g/mol, $\lambda_{ex} = 488$ nm, $\lambda_{em} = 521$ nm, $\epsilon_{490nm} = 81\,900$ M⁻¹.cm⁻¹ ; Molecular Probes, Lerden, Pays-Bas) est préparée dans du diméthylsulfoxyde (DMSO). La réaction s'effectue à pH 7,8, en présence de 30 à 60 µM de protéine cible dans un volume de 300 à 500 µL et d'un excès molaire de F5M de 20 à 50 x selon la leucotoxine, dans du tampon A. Après 2h d'incubation à température ambiante à l'obscurité, l'excès de F5M est éliminé par un dessalage sur une colonne d'exclusion PD10 (GE Healthcare) dans du tampon B. Les fractions de 0,5 mL ayant une absorbance à 280 nm sont rassemblées. Le degré de couplage est estimé en rapportant la concentration de fluorescéine (DO_{490nm}) de la solution à la concentration protéique déterminée par un dosage de Bradford. Ce rendement de marquage doit être compris entre 80 % et 120 % pour que la protéine marquée soit utilisable. Les toxines marquées à la fluorescéine sont notées par le symbole *.

3.3 DETERMINATION DE LA CONSTANTE DE DISSOCIATION, K_d

3.3.1 Cytométrie en flux

La cytométrie en flux permet d'analyser les cellules de manière individuelle et rapide, grâce à la mesure de la lumière diffractée par les cellules, dépendante de paramètres physiologiques comme la taille ou la granularité. Il est possible de détecter la fluorescence provenant directement de la cellule ou d'un marquage spécifique. Le cytomètre en flux FACSort® (Becton-Dickinson, Le Pont de Claix, France) fait passer les cellules en suspension dans un flux continu d'une solution isoosmotique – liquide de gaine –, permettant ainsi l'individualisation des cellules transitant devant le faisceau incident.

Un laser à argon (488 nm) va exciter la cellule et celle-ci va émettre ainsi différents signaux lumineux recueillis par les systèmes optiques de l'appareil. La lumière diffractée entre 3° à 10° par rapport au rayon incident (diffraction à petit angle, FSC « Forward Scatter ») permet d'estimer la taille des cellules. La lumière réfractée à 90° par rapport au rayon incident (réfraction aux grands angles, SSC « Side Scatter ») est une estimation de la complexité interne de la cellule. La fluorescence peut être quantifiée à trois longueurs d'onde d'émission : 530 nm (FL1), 585 nm (FL2) et 650 nm (FL3). Les données sont enregistrées et traitées grâce au logiciel Cell Quest Pro® (Becton-Dickinson).

3.3.2 K_d des leucotoxines

La constante de dissociation (K_d) est l'inverse de l'affinité et mesure la dissociation entre deux composés, dans notre cas entre un ligand et son récepteur. Afin de calculer le K_d des leucotoxines couplées à la fluorescéine, la cytométrie en flux est utilisée pour mesurer la quantité de protéines fixée à la surface de la cellule.

PROTOCOLE : Une suspension cellulaire à 5.10^5 cellules/mL est incubée à des concentrations croissantes (voir ci-après) de LukS-PV*, LukS-PV*/LukF-PV et HlgC/HlgB* jusqu'à l'équilibre à 20 min. La fluorescence de la fluorescéine associée aux cellules est mesurée au cytomètre en flux à FL1.

	LukS-PV* LukS-PV*/LukF-PV	HlgC/HlgB*
Neutrophiles	0 / 0,01 / 0,025 / 0,05 / 0,1 / 0,25 / 0,5 / 1 / 2 / 5 / 10 nM	0 / 0,025 / 0,05 / 0,1 / 0,25 / 0,5 / 1 / 2 / 5 / 10 / 20 nM
Macrophages		
U937 U937-C5aR	0 / 0,1 / 0,25 / 0,5 / 1 / 2 / 5 / 10 / 20 / 25 nM	0 / 0,025 / 0,05 / 0,1 / 0,25 / 0,5 / 1 / 2 / 5 / 10 / 20 nM

Tableau II.4 – Concentration des leucotoxines utilisées

Le logiciel GraphPad Prism (La Jolla, USA) permet de calculer le K_d grâce à une régression non linéaire des valeurs de fluorescence en fonction de la concentration de la protéine marquée. La formule de régression non linéaire « one site binding » est la suivante :

$$y = \frac{Bmax \times x}{K_d + x}$$

où x est la concentration de la leucotoxine marquée (en M), $Bmax$ est la fixation maximale (unité arbitraire), y est la fluorescence de la fluorescéine (unité arbitraire) et K_d est la constante de dissociation (en M).

3.4 DETERMINATION DU CALCIUM INTRACELLULAIRE

3.4.1 Spectrofluorimétrie

La spectrofluorimétrie permet l'excitation de marqueurs fluorescents par une longueur d'onde d'excitation choisie, et également la mesure du spectre d'émission sélectionné. Le spectrofluorimètre Kontron 4000 (Deltascan™, PTI, Birmingham, USA) est constitué d'une lampe au Xénon de 75 W générant, grâce à un miroir rotatif, deux faisceaux lumineux envoyés chacun dans un monochromateur d'excitation (1 et 2) qui traversent une cuve en plastique (trajet optique de 1 cm) contenant la suspension cellulaire à étudier. La fluorescence réémise est analysée à un angle de 90° par deux monochromateurs d'émission (A et B), reliés à deux photomultiplicateurs et deux détecteurs. Le programme Felix® (PTI) assure le pilotage du spectrofluorimètre et le traitement des variations de fluorescence, de manière simultanée et en temps réel, correspondant aux 4 couples excitation-émission : 1A, 1B, 2A, 2B.

3.4.2 Sonde Fura-2

Les variations de concentration libre intracellulaire en Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) sont mises en évidence par le Fura 2/AM (Santa-Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany). La liaison du calcium avec cette sonde ratiométrique entraîne une variation de l'intensité de fluorescence et un déplacement du spectre d'excitation. Les mesures se font à deux longueurs d'onde d'excitation (340 et 380 nm) et une longueur d'onde d'émission (510 nm). L'intensité de fluorescence du Fura-2 augmente suite à la fixation du Ca^{2+} lorsqu'elle est excitée à 340 nm, alors qu'elle diminue à 380 nm. Le ratio de la fluorescence à ces deux longueurs d'onde d'excitation permet de suivre la variation de la concentration du calcium intracellulaire en s'affranchissant du photo-blanchiment et de la concentration de la sonde dans les cellules.

PROTOCOLE : La sonde est acétométhylée, afin de faciliter son incorporation dans la cellule. Les PNN à une concentration de $3,5 \cdot 10^6$ cellules/mL sont incubés 45 min à température ambiante (TA) avec la sonde (4 μM) dans du RPMI/10% SVF. Après deux lavages, les cellules sont filtrées sur tamis de 70 μm et prêtes à l'emploi. La concentration de calcium est estimée par la formule suivante (Grynkiewicz et al., 1985) :

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \times \beta \times (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)$$

où K_d est la constante de dissociation du Fura-2 pour le Ca^{2+} (340 nM, Grynkiewicz et al., 1985) et $\beta = I_{380 \text{ max}} / I_{380 \text{ min}}$ ($3,57 \pm 1,34$). Les valeurs de R , R_{\min} et R_{\max} sont déterminées à chaque fois.

3.5 DETERMINATION DE L'APOPTOSE ET DE LA NECROSE

3.5.1 Perméabilisation au BEt

Le bromure d'éthidium (BEt) est utilisé comme marquage de la perméabilisation membranaire. En effet, il entre dans la cellule lorsque la membrane plasmique est endommagée et se lie aux acides nucléiques sur les régions doubles brins. Il est excité à 526 nm et émet une fluorescence orange-rouge à 605 nm.

PROTOCOLE : Les cellules sont mises en contact pendant 10 min avec 3 $\mu\text{g/mL}$ de BEt (GE Healthcare). L'analyse est effectuée au cytomètre en utilisant FL3.

3.5.2 Sonde de potentiel mitochondrial JC-1

L'apoptose est un processus cellulaire induisant une série d'événements programmés qui conduit à la mort de la cellule. Des modifications de la mitochondrie sont visibles, incluant, entre autres, une perte du potentiel de membrane ($\Delta\Psi\text{m}$). Pour cette raison, $\Delta\Psi\text{m}$ peut être utilisé comme un indicateur de l'état de la cellule.

La sonde lipophile cationique JC-1 (AAT Bioquest, Sunnyvale, USA) s'accumule dans les mitochondries en fonction du potentiel de membrane et passe d'une fluorescence verte à orange. Cette propriété est due à la formation réversible d'agrégats de JC-1 lorsque la membrane de la mitochondrie est polarisée. Lors d'une dépolarisation des membranes des mitochondries, il y a donc un décalage du spectre d'émission à une excitation de 490 nm, passant ainsi d'une fluorescence orange (590 nm, agrégats de JC-1, membrane polarisée) à une fluorescence verte (530 nm, monomères de JC-1, membrane dépolarisée). Pour que ce décalage puisse avoir lieu, la majorité des mitochondries sont donc atteintes.

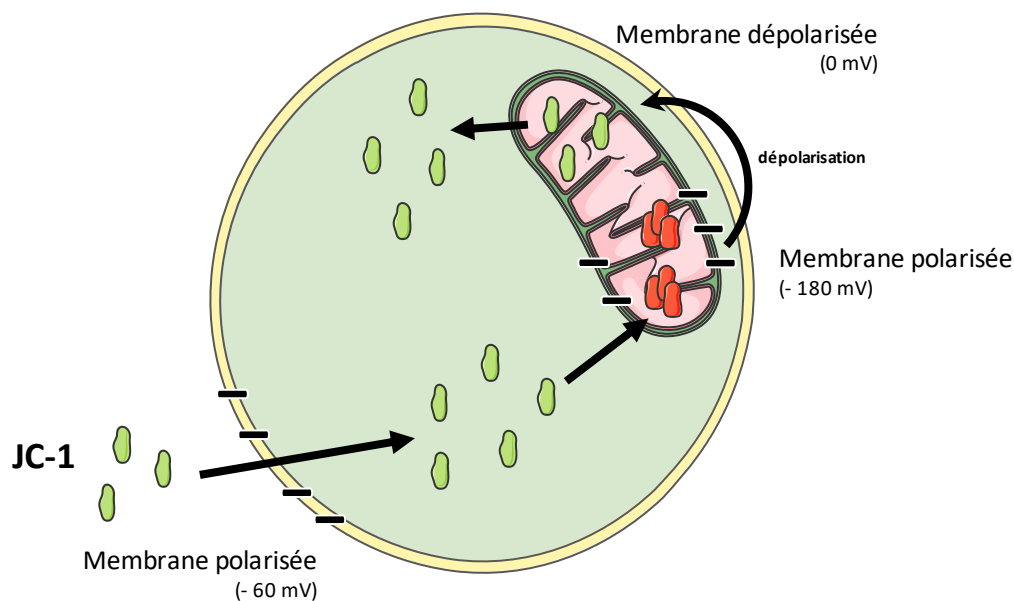


Figure II.2 – Distribution de la sonde JC-1 dans la cellule.

La polarisation de la membrane plasmique (-60 mV) permet à JC-1 d'entrer dans la cellule pour s'accumuler dans le cytoplasme sous forme de monomères (fluorescence verte). Lorsque les membranes des mitochondries sont polarisées (-180 mV), JC-1 se localise dans les mitochondries en formant des agrégats (fluorescence orange). Lors d'une dépolarisation des membranes des mitochondries (0 mV), JC-1 se trouve sous forme de monomères et émet donc une fluorescence verte.

Le contrôle positif pour cette étude est le CCCP (carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone) (Tocris Bioscience, Bristol, UK) qui conduit à une dépolarisation des membranes des mitochondries en inhibant la phosphorylation oxydative.

PROTOCOLE : Cinq cents μL de cellules à 1.10^6 cellules/mL sont incubés en présence de toxines aux temps 3h, 6h, 20h et 26h dans des tubes de cytométrie. À la fin de l'incubation, 1 μL de sonde JC-1 est ajouté (5 μM) pendant 10 min à TA. Les tubes sont lus au cytomètre en utilisant le FL1 et le FL2. Pour l'exploitation des résultats, deux zones sont délimitées grâce au contrôle positif CCCP (15 min, 10 μM), correspondant respectivement à la forme JC-1 agrégés (orange) et JC-1 en monomères (vert). Ceci nous permet d'obtenir le pourcentage de cellules présentes dans chaque zone.

3.5.3 Annexine V et Iodure de Propidium

Une altération morphologique majeure intervenant lors de l'apoptose est certainement la translocation précoce des phosphatidylsérine (PS) depuis le cytoplasme jusqu'à la face externe de la cellule. Cette perte de l'asymétrie membranaire peut être détectée en utilisant les propriétés de fixation de l'annexine V. L'annexine V se lie aux phospholipides chargés négativement, dépendamment du calcium. Le contre-marquage avec l'iodure de propidium (IP) permet de faire la différence entre la cellule en phase précoce de l'apoptose et la phase tardive où il y aura une perte de l'intégrité membranaire avec une entrée de l'IP.

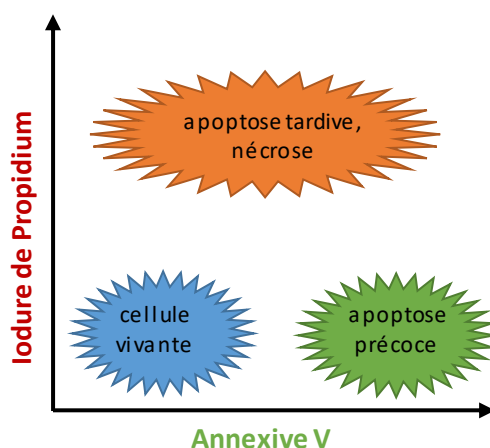


Figure II.3 – Distribution des cellules avec Annexine V / Iodure de Propidium.

Les cellules vivantes se trouvent dans la partie basse gauche du graphique (zone bleue) et ne comportent aucun des deux marquages. L'apoptose précoce est révélée grâce à un marquage unique avec l'annexine V, présentant une fluorescence verte (zone verte). La partie haute (zone orange) montre une fluorescence unique avec l'iodure de propidium (IP) ou un double marquage Annexine V/IP, et correspond aux cellules en nécrose ou dont la membrane est perméabilisée.

Le contrôle positif pour cette étude est la puromycine (Sigma-Aldrich) qui provoque plus de 80 % d'apoptose sur les neutrophiles humains avec 18,4 μM à 6h à 37°C (Nagami et al., 2002).

PROTOCOLE : Cinq cents μL de cellules à 1.10^6 cellules/mL sont incubés en présence de toxines aux temps 3h, 6h, 20h et 26h dans des microtubes. À la fin de l'incubation, les tubes sont centrifugés 4 min à $1700 \times g$, puis les culots sont repris dans 190 μL de tampon HBSS-Hepes. L'annexine V-FITC et l'IP (Santa Cruz Biotechnology) sont ajoutés, respectivement, à raison de 0,5 μL (0,1 μg) et 5 μL (1,3 $\mu\text{g/mL}$) par tube, pendant 10 min à TA. La suspension est transférée dans un tube de cytométrie et

lue au cytomètre en flux avec FL1 et FL3. Une compensation est effectuée grâce aux témoins adéquats, afin de séparer au mieux les deux signaux.

3.5.4 Méthode TUNEL

L'une des autres modifications intervenant au cours de l'apoptose se trouve être une fragmentation de l'ADN qui est spécifique de ce type de mort cellulaire. Cette altération peut être visualisée par la technique TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling) qui permet de révéler les cassures de l'ADN. Le kit (Roche, Bâle, Suisse) comprend des nucléotides marqués à la fluorescéine, qui vont se lier à la partie terminale 3'-OH libre de l'ADN fragmenté grâce à la transférase terminale.

La puromycine est utilisée comme contrôle positif de l'apoptose. La DNase I est utilisée comme témoin positif de la technique, car elle fragmente l'ADN. La solution « label solution » fournie par le kit est utilisée comme témoin négatif de la réaction.

PROTOCOLE : Un mL de cellules à $2 \cdot 10^6$ cellules/mL est incubé pendant 6h en contact des toxines. À la fin de l'incubation, 250 μ L de paraformaldéhyde à 16 % (4 % (v/v) final) est ajouté pendant 10 min à TA. Deux centrifugations à 2100 $\times g$ sont effectuées pendant 1 min, puis le culot est repris dans du HBSS-Hepes. Les tubes sont conservés à +4°C jusqu'au lendemain où une nouvelle centrifugation est faite. Cinq cents μ L de Triton X100 0,05 % (v/v) sont ajoutés pendant 5 min à TA pour perméabiliser les cellules qui sont ensuite lavées une fois. Le « TUNEL mix » est préparé en diluant la transférase terminale dans la « label solution » au 1/10. Le témoin positif de la technique est incubé avec la DNase I à 6 U/mL pendant 10 min à TA, puis les cellules sont lavées. Le témoin négatif de la technique est incubé avec la « label solution » et les autres tubes sont mis en contact avec le « TUNEL mix » pendant 1h à 37°C. Après un lavage, le culot est repris dans 200 μ L de HBSS-Hepes avant la lecture au cytomètre en flux à FL1.

3.6 DETERMINATION DE L'ACTIVATION DES PROTEINES DE SIGNALISATION PAR WESTERN BLOT

3.6.1 Principe

Le Western Blot permet l'évaluation de l'expression des protéines dans un extrait de cellules ou de tissus. Cette technique est basée sur la spécificité de la liaison entre la protéine d'intérêt et un anticorps reconnaissant soit la protéine entière, soit des modifications post-traductionnelles (phosphorylation, acétylation, méthylation, ubiquitination). Il y a trois étapes principales à cette technique : (1) La séparation des protéines selon leur poids moléculaire, (2) le transfert sur support solide et (3) le marquage de la protéine d'intérêt par anticorps.

3.6.2 Protéines d'intérêt pour notre étude

Quatre éléments de voies de signalisation en aval de l'activation du C5aR ont été ciblés. La caspase-8 (18 kDa) et la caspase-9 (10 kDa) permet l'étude de l'apoptose, car elles sont deux caspases initiatrices. La p-ERK1/2 (44 et 42 kDa) est une protéine impliquée dans la voie MEK/ERK conduisant à un effet sur la transcription cellulaire. Enfin, la p82 α (85 kDa) est une sous-unité de la PI3K phosphorylée, donc active, qui entraîne la production de PIP3. LA PI3K et ERK sont deux kinases impliquées dans une signalisation qui induit l'activation de la NADPH oxydase.

3.6.3 Protocole

Les cellules à 4.10^6 cellules/mL sont incubées dans du RPMI/10% SVF en présence de toxines pendant 3h. Un mL de cellules est centrifugé 2 min à $2100 \times g$. Le culot est resuspendu à 40.10^6 cellules/mL dans 100 μ L de tampon de lyse contenant du tampon RIPA/Triton X100 et différents inhibiteurs de protéases : 25 μ M leupeptin (Sigma-Aldrich), 25 μ M aprotinin (Sigma-Aldrich), 25 mM NaF (Sigma-Aldrich), 1 mM levamisole (Sigma-Aldrich), Complete Mini (Roche), 1mM NaVO₃ (Sigma-Aldrich), 1 mM PMSF (Sigma-Aldrich) et 25 μ M pepstatin (Sigma-Aldrich). Les débris cellulaires sont sédimentés par centrifugation à $20\ 000 \times g$ pendant 30 min à 10°C. Le surnageant est récupéré et additionné de 100 μ L de tampon de charge contenant du Laemmli Sample buffer (BioRad, Schiltigheim, France), 5 % (v/v) de β -mercaptoethanol, 5 mM EDTA pH 6,8, 5 mM, EGTA pH 6.8, 23,4 μ M leupeptin, 14,6 μ M pepstatin, 1,54 μ M aprotinin, 10 mM NaF, 5 mM NaVO₃ et 1 mM levamisole. Les échantillons sont ensuite stockés à -80°C.

1) Migration sur SDS-PAGE : Les échantillons sont chauffés 10 min à 95°C et 20 μ L sont prélevés pour la migration électrophorétique. Le gel de polyacrylamide (Tris-HCl, pré-coulés) a une densité déterminée par la protéine à étudier (4-15 % pour PI3K et ERK1/2, 18 % pour caspase-8 et 9). Il est mis dans une cuve Mini-PROTEAN[®]Tetra System (BioRad) dans du tampon de migration (25 mM de Tris, 192 mM de glycine, SDS 0,1 % (v/v), pH 8,3) et mis à migrer à une tension constante de 200V, selon les instructions de BioRad. L'échelle Western C Precision Plus (BioRad) permet la visualisation des bandes allant de 10 à 250 kDa.

2) Transfert électrique : Le gel est démoulé et la membrane de transfert de PVDF de 0,2 μ m de porosité (kit Trans-Blot Turbo, BioRad) est appliquée dessus, puis mise en sandwich selon les instructions de BioRad. Un courant constant de 1,3A est appliqué pendant 7 min (gel 18 %) ou 15 min (gel 4-15 %).

3) Immunorévélation : La feuille de PVDF est immergée dans 50 mL de PBS-Tween 20 0,05% (v/v) contenant 5 % (p/v) de lait écrémé en poudre (gel 18 %) ou 3 % (p/v) de BSA (gel 4-15 %), sous agitation pendant 4h afin de bloquer les sites non spécifiques de liaison. L'anticorps primaire (IgG de lapin anti-caspase-8 et 9, anti-pERK1/2 ou IgG de chèvre anti-PI3K p85 α) est ajouté à 0,5 μ g/mL pendant 18h à +4°C sous agitation. Trois lavages de 5 min au PBS-Tween 20 sont effectués avant l'ajout de l'anticorps secondaire dilué au 1/10 000 et couplé à la biotine pendant 2h sous agitation à TA. À nouveau, trois lavages sont effectués. La détection se fait par ajout de streptavidine couplé à la

peroxydase de raifort (Sigma-Aldrich) au 1/1 000 + 3 μL de Streptactin/Peroxydase de raifort (BioRad) dans du PBS-BSA 1% (v/v) sous agitation pendant 1h à TA. Trois lavages sont effectués. La chimioluminescence est utilisée pour révéler les protéines sur la membrane de transfert grâce au réactif Clarity (BioRad) et à l'appareil Chemiodoc XRS+ (BioRad).

4 IMAGERIE CELLULAIRE

4.1 MICROSCOPES

MICROSCOPE À ÉPIFLUORESCENCE : Le microscope à épifluorescence a été utilisé afin d'observer la NETose et l'autophagie. Il s'agit d'un Olympus BX60 avec une lampe HBO comme source lumineuse. Les objectifs (Olympus) utilisés sont x10 (NETose) et x40 (autophagie). Le jeu de filtres est pour l'UV (Hoechst), la fluorescéine (Alexa 488) et la rhodamine (Alexa 594). Une caméra Orca-flash 4.0 (C11440, Hamamatsu, Massy, France) permet de capturer les images grâce au logiciel HC Image Live (Hamamatsu).

MICROSCOPE CONFOCAL : La microscopie confocale a été utilisée pour les études de colocalisation. Elle permet de réaliser des coupes optiques de moins de 0,5 μm grâce à une excitation avec un laser et aux sténopés qui permettent d'exclure les photons en dehors du plan focal. Les images sont obtenues grâce à un microscope confocal Leica SP5 II (Leica, Nanterre, France), à une résolution de 1024×1024 pixels. L'objectif utilisé est un x63 à immersion dans l'huile. Les différents lasers permettent une excitation à 405 nm (bleu, Hoechst), 488 nm (vert, Alexa/Dylight 488) et 561 nm (rouge, Alexa 555, Dylight 594). Le logiciel LAS 6000 AF® (Leica) permet l'acquisition des photos.

4.2 IMMUNOFLUORESCENCE

4.2.1 Sur lames

La technique d'immunofluorescence sur lame a été utilisée pour l'étude du marquage périphérique des toxines sur les neutrophiles (voir Chapitre III) et pour le marquage du C5aR phosphorylé et non phosphorylé (voir Chapitre IV).

PROTOCOLE : Les lamelles de verre sont lavées à l'éthanol et traitées à la poly-lysine pendant une heure, afin d'améliorer l'adhésion des neutrophiles à la surface. Les cellules sont utilisées à raison de 6.10^6 cellules/mL et incubées avec 1,1 mM de Ca^{2+} pendant 15 min, afin d'atteindre une concentration calcique contrôlée de 1 mM avec le tampon EGTA. Cinq cents μL de suspension cellulaire sont déposés sur les lamelles en verre pendant 30 min. Deux lavages avec 1 mL de tampon EGTA/ Ca^{2+} 1mM sont effectués. Ensuite, 500 μL de toxines diluées dans du PBS sont ajoutés et laissés en contact pendant 5 ou 10 min, puis deux lavages sont à nouveau effectués. Les cellules sont fixées avec 400 μL de paraformaldéhyde (4% PAF (v/v), 4% sucrose (p/v) dans PBS) pendant 20 min, puis sont rincées deux

fois avec du PBS. Une solution contenant de la glycine 150 mM dans du PBS est utilisée (400 μ L) afin de diminuer l'autofluorescence. Deux lavages au PBS sont ensuite effectués. La perméabilisation des cellules s'effectue à -20°C pendant 5 min avec du chloroforme refroidi. Deux lavages sont nécessaires : le premier dans un bain d'éthanol absolu, le second dans du PBS. Le tampon de blocage (10% (v/v) sérum de veau fœtal + 5 mg/mL de BSA) sert à saturer les sites aspécifiques et est laissé toute la nuit à $+4^{\circ}\text{C}$ à raison de 500 μ L par lame. Les lamelles sont rincées deux fois avec du PBS.

L'anticorps primaire, dilué à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans du tampon de dilution (5% sérum de veau fœtal + 1 mg/mL BSA), est incubé en présence des cellules pendant 1h dans un volume de 350 μ L. Puis, après trois lavages, l'anticorps secondaire dilué à 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans du tampon de dilution est ajouté pendant 1h. Trois lavages sont effectués. Le marquage des noyaux est effectif grâce à 350 μ L d'une solution de Hoechst 32258 (Sigma-Aldrich) à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, additionné de la sous-unité B de la toxine cholérique marquée à l'Alexa 488 (Thermo Fisher Scientific) à 0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ qui sert à marquer les membranes. L'incubation est de 30 min à TA. Enfin, après deux autres lavages, les lames sont montées grâce au Mowiol® (Sigma-Aldrich) et laissées polymériser une nuit à TA.

4.2.2 En microtube

La technique d'immunofluorescence en microtube a été utilisée pour les études de colocalisation (voir Chapitre IV) et pour celles sur l'autophagie (voir Chapitre V).

PROTOCOLE : Les cellules sont incubées dans un tube à 8.10^6 cellules/mL dans du RPMI/SVF 10% en présence des toxines, à 37°C et 5 % de CO_2 . Pour la colocalisation, à 10 min, 1 mL est prélevé et transféré dans un microtube, puis fixé grâce à 250 μ L de paraformaldéhyde 16 % (4 % (v/v) final) pendant 10 min à TA. Le reste de la suspension cellulaire est centrifugé 1 min à $2100 \times g$, puis resuspendu dans du RPMI/10% SVF sans toxine et incubé à 37°C encore 10, 20 ou 30 min, afin de constituer les temps 20 min, 30 min et 40 min, respectivement. Pour l'autophagie, les cellules sont incubées 10 min, 1h, 3h ou 6h avant la fixation selon le même protocole. Après fixation de tous les échantillons, les tubes sont centrifugés à $2100 \times g$, puis repris dans du tampon HBSS-Hepes. Après une nouvelle centrifugation, 500 μ L de tampon de blocage (10% (v/v) SVF + 5 mg/mL de BSA) est ajouté pendant 30 min à TA. Une centrifugation permet de reprendre les culots dans 500 μ L de Triton X100 0,05 % pendant 5 min à TA. Les cellules sont lavées une fois.

L'anticorps primaire est dilué à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans du tampon de dilution (5% (v/v) SVF + 1 mg/mL BSA) et ajouté à un volume de 250 μ L pendant une nuit à $+4^{\circ}\text{C}$. Une centrifugation est faite et le culot est resuspendu dans du HBSS-Hepes et laissé au repos pendant 20 min à TA. Un lavage rapide est à nouveau effectué, puis 250 μ L d'anticorps secondaire dilué à 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans le tampon de dilution est ajouté pendant 1h à TA. Deux lavages sont à nouveau effectués : un avec un temps de repos de 20 min, suivi d'un autre rapide. Le marquage des noyaux se fait avec 250 μ L de Hoechst 32258 à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pendant 15 min à TA. Après deux lavages, le maximum de surnageant est éliminé, puis 50 μ L de Mowiol est

ajouté. Le tube est vortexé et mélangé à la pipette avant d'être déposé sur une lame en verre et recouvert d'une lamelle couvre-objet.

4.2.3 Sur boîte

La technique d'immunofluorescence sur boîte a été utilisée pour visualiser la NETose (voir Chapitre V).

PROTOCOLE : Des boîtes de plastiques de 35 mm dédiées à la culture cellulaire sont utilisées. La BSA est utilisée en remplacement du 10 % SVF afin d'obtenir une meilleure adhésion des cellules. Cinq cents μL d'une suspension cellulaire à $0,5 \cdot 10^5$ cellules/mL dans du RPMI/BSA 0,05 % sont déposés et incubés 30 min à 37°C avec 5 % de CO_2 . La suspension est enlevée et remplacée par 500 μL du milieu adéquat contenant les toxines. Les temps d'incubation sont de 10 min, 1h, 3h, et 6h à 37°C . Cent vingt-cinq μL de paraformaldéhyde 16 % (4 % (v/v) final) est ajouté et incubé 5 min à TA. Un lavage avec 1 mL de HBSS est effectué, puis 1 mL de tampon de blocage (10% sérum de veau fœtal (v/v) + 5 mg/mL de BSA) est ajouté pendant une nuit à $+4^\circ\text{C}$.

L'anticorps primaire, dilué à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans du tampon de dilution (5% sérum de veau fœtal + 1 mg/mL BSA), est incubé en présence des cellules pendant 1h TA à raison de 500 μL . Puis, après un lavage avec du HBSS, l'anticorps secondaire dilué à 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans du tampon de dilution est ajouté pendant 1h TA. Un lavage est effectué. Le marquage des noyaux est effectif grâce à du Hoechst 32258 (Sigma-Aldrich) à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pendant 30 min. Enfin, après un dernier lavage, les boîtes sont remplies de 1 mL de HBSS afin de procéder à l'observation.

4.3 TRAITEMENT DES IMAGES

Après acquisition, les images sont analysées grâce au logiciel CellProfiler™ (Broad Institute, Cambridge, USA), afin d'en extraire les données. Le principe de ce logiciel est la création d'un pipeline composé de plusieurs modules ayant chacun une fonction précise, afin d'analyser chaque image de la même manière. Selon l'étude menée, les conditions sont différentes.

4.3.1 Détermination du Coefficient de Pearson

Il s'agit, ici, de déterminer une possible colocalisation entre les toxines et les compartiments internes ou entre les toxines et le C5aR. Pour cela, les images sont traitées par le logiciel afin d'en extraire le Coefficient de Pearson.

COEFFICIENT DE PEARSON : Le Coefficient de Pearson (CP) établit une corrélation entre deux paramètres. Dans notre étude, il s'agira donc de comparer les pixels d'une image prise sur le canal vert (compartiments ou C5aR) avec les pixels d'une image prise sur le canal rouge (toxines). Le coefficient de corrélation de Pearson est compris entre -1 et +1. Entre -1 et 0, il y a une liaison entre les deux caractères, variant dans le sens contraire, et d'autant plus affirmée qu'elle approche de -1. Entre 0 et +1, il y a une forte liaison entre les deux caractères, variant dans le même sens, et d'autant plus affirmée

qu'elle approche de +1. À 0, il y a une absence de relation linéaire entre les deux variables. Dans notre étude, nous nous intéressons donc à une corrélation positive entre nos deux variables, et donc aux valeurs allant de 0 à +1.

PIPELINE n°1 :

1. **Correction de la valeur seuil du signal :** Le seuil est diminué afin de correspondre à un CP d'environ 0,1 pour les cellules sans toxines. Ceci nous permet de réduire le bruit de fond à une valeur choisie (pour un CP de 0,1) et d'unifier les valeurs de corrélation des différentes expérimentations.
2. **Identification des noyaux :** Les noyaux (canal bleu) sont identifiés grâce à une stratégie de seuil « Global » et basé sur la méthode « Background » (facteur de correction de 1, bornes du seuil de 0 à 1) (Padmanabhan et al., 2010; Sezgin and Sankur, 2004). Les objets sont distingués et divisés en se basant sur l'intensité lumineuse avec un lissage de 10. Le diamètre des objets pris en compte est compris entre 5 et 40 pixels.
3. **Identification des artefacts :** Les cellules mortes présentent un marquage fluorescent très intense qui perturbe l'analyse des images. Les artefacts sont identifiés sur le marquage des toxines (canal vert) grâce à une stratégie de seuil « Global », basée sur la méthode « Otsu » (« Two class », « Weight variance », facteur de correction de 6, bornes du seuil de 0 à 1) (Padmanabhan et al., 2010; Sezgin and Sankur, 2004). Les objets sont distingués en se basant sur l'intensité lumineuse et aucune méthode de division n'est appliquée. Le diamètre des objets pris en compte est compris entre 7 et 100 pixels.
4. **Expansion des artefacts :** Afin de prendre en compte l'intégralité des artefacts, une expansion de 2 pixels des artefacts est réalisée.
5. **Masquage des artefacts :** Les artefacts sont masqués sur les images des canaux vert et rouge.
6. **Mesure du CP :** Le Coefficient de Pearson est calculé en comparant les deux canaux d'intérêt (vert et rouge).

Les données sont ensuite récupérées et nous permettent d'étudier le nombre d'artefacts et de noyaux par image, ainsi que le CP. Ces valeurs sont moyennées dans un tableau et transférées sous Prism.

4.3.2 Détermination du ratio de superposition des deux signaux

L'obtention de la région de superposition entre les deux canaux vert (compartiments ou C5aR) et rouge (toxines) permet d'évaluer le pourcentage de superposition par canal, grâce au calcul d'un rapport avec les spots du marquage spécifique de chaque canal :

$$\text{Superposition vert} = \frac{\text{Aire de la superposition}}{\text{Aire des spots verts}}$$

$$\text{Superposition rouge} = \frac{\text{Aire de la superposition}}{\text{Aire des spots rouges}}$$

PIPELINE n°2 :

1. **Identification des artefacts :** Les cellules mortes présentent un marquage fluorescent très intense qui perturbe l'analyse des images. Les artefacts sont identifiés sur le marquage des toxines (canal vert) grâce à une stratégie de seuil « Global » et basé sur la méthode « Otsu » (« Two class », « Weight variance », facteur de correction de 10, bornes du seuil de 0,4 à 1) (Padmanabhan et al., 2010; Sezgin and Sankur, 2004). Les objets sont distingués en se basant sur l'intensité lumineuse et aucune méthode de division n'est appliquée. Le diamètre des objets pris en compte est compris entre 10 et 100 pixels.
2. **Expansion des artefacts :** Afin de prendre en compte l'intégralité des artefacts, une expansion de 2 pixels des artefacts est réalisée.
3. **Masquage des artefacts :** Les artefacts sont masqués sur les images des canaux vert et rouge.
4. **Identification des spots :** Les spots correspondant à un marquage spécifique sont identifiés sur l'image des deux canaux vert et rouge grâce à une stratégie manuelle de seuil (facteur variant de 0,2 à 0,4 selon l'anticorps utilisé). Les objets sont distingués en se basant sur l'intensité lumineuse et aucune méthode de division n'est appliquée. Le diamètre des objets pris en compte est compris entre 1 et 20 pixels.
5. **Obtention de la superposition :** Les spots du canal rouge sont masqués avec ceux du canal vert afin de déterminer la région de superposition entre les deux.
6. **Mesure de l'aire de l'image :** Les aires de la région de superposition, des spots verts et des spots rouges sont quantifiées.
7. **Calculs de la superposition par canal :** L'opération de division est effectuée, comme décrite précédemment.

Les valeurs de superposition par canal sont ensuite récupérées, moyennées dans un tableau et transférées sous Prism.

4.3.3 Détermination du ratio de NETose

La quantification du nombre de noyaux et des filaments de NETose (NET) permet de calculer le ratio de NETose selon la formule suivante, adaptée de Brinkmann *et al.* (2012) :

$$\text{Ratio de NETose en \%} = \frac{\text{Nombre de NETs}}{\text{Nombre de noyaux}} \times 100$$

PIPELINE n°3 :

1. **Identification des noyaux :** Les noyaux (canal bleu) sont identifiés grâce à une stratégie de seuil « Global », basée sur la méthode « Robust Background » (facteur de correction de 2, bornes du seuil de 0,3 à 1) (Padmanabhan et al., 2010; Sezgin and Sankur, 2004). Les objets sont distingués en se basant sur l'intensité lumineuse et aucune méthode de division n'est appliquée. Le diamètre des objets pris en compte est compris entre 5 et 80 pixels.

- 2. Identification des NET :** Les NET (canal vert) sont identifiés grâce à une stratégie de seuil « Global » et basé sur la méthode « Robust Background » (facteur de correction de 1, bornes du seuil de 0,2 à 1) (Padmanabhan et al., 2010; Sezgin and Sankur, 2004). Aucune méthode pour distinguer ou diviser les objets n'est appliquée. Le diamètre des objets pris en compte est compris entre 6 et 200 pixels.

Les données sont ensuite récupérées et nous permettent d'étudier le nombre de noyaux et de NET par image. Ces valeurs sont moyennées dans un tableau, le ratio de NETose est calculé et transféré sous Prism.

4.3.4 Quantification de l'autophagie

Pour l'autophagie, la faible résolution des images ne permettait pas d'extraire le nombre de spots de LC3B par cellule, ce qui nous a poussés à utiliser la variation de l'intensité des pixels comme indice (Klionsky et al., 2016) :

$$\text{Ratio d'autophagie} = \frac{\text{Ecart-type de l'intensité des pixels de l'image}}{\text{Intensité moyenne des pixels de l'image}}$$

PIPELINE n°4 :

- 1. Identification des noyaux :** Les noyaux (canal bleu) sont identifiés grâce à une stratégie de seuil « Global » basée sur la méthode « Robust Background » (facteur de correction de 2, bornes du seuil de 0 à 1) (Padmanabhan et al., 2010; Sezgin and Sankur, 2004). Les objets sont distingués en se basant sur l'intensité lumineuse des pixels (5 à 80 pixels) et un réglage basé sur l'intensité des pixels est appliqué également pour la division des objets.
- 2. Identification des artefacts :** Les artefacts (canal vert) sont identifiés grâce à une stratégie de seuil « Global » basée sur la méthode « Otsu » (facteur de correction de 1, bornes du seuil de 0,2 à 1) (Padmanabhan et al., 2010; Sezgin and Sankur, 2004). La méthode pour distinguer les objets est uniquement basée sur l'intensité. Le diamètre des objets pris en compte est compris entre 20 et 100 pixels.
- 3. Mesure de l'intensité de l'image :** La moyenne et l'écart-type de l'intensité des pixels de l'image sont mesurés sur le canal vert (LC3B).

Les données sont récupérées pour quantifier la variation de l'intensité des pixels de l'image LC3B, afin d'évaluer l'autophagie. Ces valeurs sont moyennées dans un tableau, le ratio d'autophagie est calculé et transféré sous Prism.

5 STATISTIQUES

Le logiciel Prism nous permet de générer des graphiques et d'établir des statistiques détaillées en fonction des différentes expérimentations. Les résultats sont moyennés et exprimés avec l'erreur standard à la moyenne (SEM : Standard Error of the Mean).

Pour l'étude du marquage de la périphérie des cellules après un contact avec les toxines (voir Chapitre IV), un test d'analyse de la variance ANOVA one-way a été effectué, suivi par un test de comparaison multiple de Tukey. Concernant les autres résultats, un test ANOVA two-way a été effectué, suivi par un test de Bonferroni, comparant les conditions par rapport au témoin des cellules seules.

Ceci nous permet d'obtenir des résultats significatifs en nous basant sur cette échelle :

Valeur de p	Symbole	Pourcentage
$p < 0,0001$	****	> 99,99 %
$0,0001 < p < 0,001$	***	99,9 – 99,99 %
$0,001 < p < 0,01$	**	99 – 99,9 %
$0,01 < p < 0,05$	*	95 – 99 %
$p > 0,05$	ns	< 95%

Chapitre III

Cibles cellulaires de la
LPV et de H1gC/H1gB

1 INTRODUCTION

Bras armé du système immunitaire, les leucocytes ont un rôle essentiel dans la défense de l'hôte contre les pathogènes. Ils sont de deux sortes : soit issus de la lignée myéloïde, soit de la lignée lymphoïde. Le progéniteur myéloïde est à l'origine des cellules non-leucocytaires que sont les érythrocytes et les plaquettes, mais également des granulocytes (neutrophiles, éosinophiles, basophiles), des monocytes, des macrophages et des cellules dendritiques. Le progéniteur lymphoïde, quant à lui, se différencie en cellules NK (Natural Killer) et en lymphocytes T ou B.

Il a été montré que la Leucocidine de Pantone et Valentine (LPV) cible les cellules dès le stade des myélocytes (qui se différencient ensuite en neutrophiles, monocytes, macrophages...), tandis que HlgC/HlgB a un effet sur l'ensemble de la lignée myéloïde (Gauduchon et al., 2001; Meunier et al., 1995; Szmigielski et al., 1998). De plus, les deux leucotoxines n'ont pas d'affinité pour la lignée lymphoïde en raison de l'absence du récepteur au composé S. En effet, le C5aR, récepteur majoritaire de LukS-PV, et également de HlgC, n'est pas présent sur les lymphocytes.

Historiquement, au laboratoire, le modèle d'étude privilégié est le polynucléaire neutrophile humain (PNN), qui est le premier type cellulaire à être attiré au site d'infection et à rencontrer le pathogène. C'est ainsi que Gauduchon *et al.* (2001) a déterminé une forte affinité de fixation de LukS-PV sur les PNN ($K_d = 0,07$ nM) et sur les monocytes ($K_d = 0,02$ nM). Cependant, il apparaît que le neutrophile est un modèle d'étude délicat à utiliser.

En effet, le PNN a une durée de vie de 12 à 24h dans la circulation sanguine, ce qui rend de nombreux tests difficiles à mettre en œuvre, comme la transfection. De plus, le neutrophile est le premier élément du système immunitaire à entrer en contact avec le pathogène, permettant ainsi l'activation et l'attraction des autres cellules de l'immunité. De ce fait, il est facilement stimulant par tout élément étranger à l'organisme, et le fait de manipuler le sang, de lui faire subir des variations de température, puis d'isoler les neutrophiles, entraînent souvent une sensibilisation exacerbée des cellules. Au laboratoire, de nombreuses préparations de PNN n'ont ainsi pas pu être utilisées pour les analyses en raison d'une mort prématurée des cellules. Également, au cours des derniers mois, nous avons pu mettre en évidence un lien entre l'âge des patients et l'état physiologique des cellules après isolement. Il semblerait que les cellules des donneurs ayant plus d'une cinquantaine d'années ne puissent pas toujours être utilisées en raison d'une mort précoce des neutrophiles. Cette différence entre les neutrophiles des donneurs « jeunes » et « âgés » pourrait être expliquée par le fait que les donneurs au-dessus de cinquante ans peuvent prendre des traitements médicamenteux au long cours, qui se révéleraient alors néfastes pour les neutrophiles lors de l'isolement des cellules. En effet, seuls certains médicaments sont écartés lors de la sélection des donneurs de sang, comme les traitements des crises d'épilepsie. Nous avons ainsi privilégié l'utilisation de neutrophiles issus de donneurs ne dépassant pas trente-cinq ans.

Pour ces raisons, il est nécessaire d'avoir un autre modèle cellulaire que le neutrophile, d'une part pour s'affranchir de la fragilité et de la sensibilité exacerbée des neutrophiles, mais également pour des études plus longues que 24h. Ainsi, la lignée lymphoïde U937 transfectée avec le C5aR a été utilisée, et la mise en place d'un protocole de différenciation des monocytes a permis l'obtention et la culture de macrophages humains.

2 NEUTROPHILES HUMAINS

Le laboratoire utilise les PNN comme modèle d'étude depuis de nombreuses années et son interaction avec la LPV est plutôt bien caractérisée. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à savoir si les bouleversements morphologiques lors d'une mise en contact avec la LPV pouvaient être visibles au microscope à contraste de phase en vidéomicroscopie. Ainsi, les PNN ont été mis en contact pendant 20 min avec 2 nM de LPV dans du tampon EGTA supplémenté de 1 mM de calcium (Figure III.1).

Au temps 0 (A), la cellule (flèche noire) est étalée sur le fond de la boîte, mais après quelques minutes, elle commence à se rassembler sur elle-même. Dès 10 min (B), le noyau est bien visible car il se condense et s'arrondit. Enfin, à 20 min (C), le contenu de la cellule commence à être relargué vers l'extérieur, montrant ainsi une lyse cellulaire.

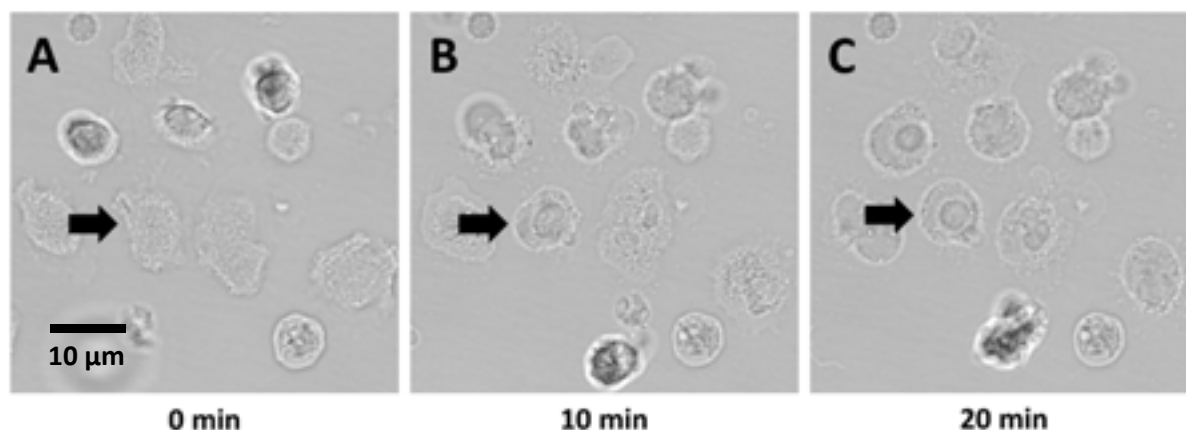


Figure III.1 – Observation au microscope à contraste de phase des neutrophiles en contact avec 2 nM de LPV
 Au début de l'incubation avec 2 nM de LPV dans du tampon EGTA supplémenté de 1 mM de calcium, les cellules adhèrent sur le fond de la boîte (A). Ce n'est qu'à 10 min (B) que la cellule (flèche noire) commence à s'arrondir et le noyau à se rassembler sur lui-même pour perdre sa structure polylobée. À 20 min (C), la cellule commence à relarguer son contenu cellulaire.

Ces résultats permettent donc de mettre en évidence l'effet létal de la LPV au niveau de la morphologie des PNN. Afin de poursuivre cette étude de l'interaction PNN/LPV, l'immunocytochimie a été utilisée pour visualiser directement la toxine fixée à la surface de la cellule (Figure III.2). Nous pouvons ainsi voir que la LPV est présente à la surface de la cellule. De plus, la concentration de 0,25 nM permet d'avoir un signal suffisant et non saturant, mais ne semble pas altérer les noyaux.

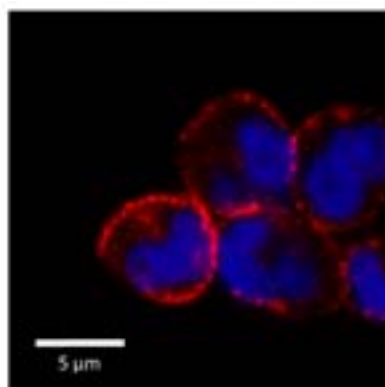


Figure III.2 – Observation au microscope confocal du marquage de la LPV sur neutrophiles humains
Le marquage rouge correspond à la sous-unité S de la LPV 0,25 nM pendant 10 min. Le bleu représente le marquage au Hoescht des noyaux.

La LPV se fixe donc à la surface du neutrophile avec une affinité que nous avons déterminé. Les constantes de dissociation des deux leucotoxines d'intérêt ont été obtenues en mettant les cellules en contact avec LukS*-PV/LukF-PV ou HlgC/HlgB* (Figure III.3). La régression non linéaire permet le calcul du K_d qui est de 0,17 nM pour la LPV (A) et 0,87 nM pour HlgC/HlgB (B). L'Hémolysine γ a ainsi une affinité légèrement inférieure à celle de la LPV.

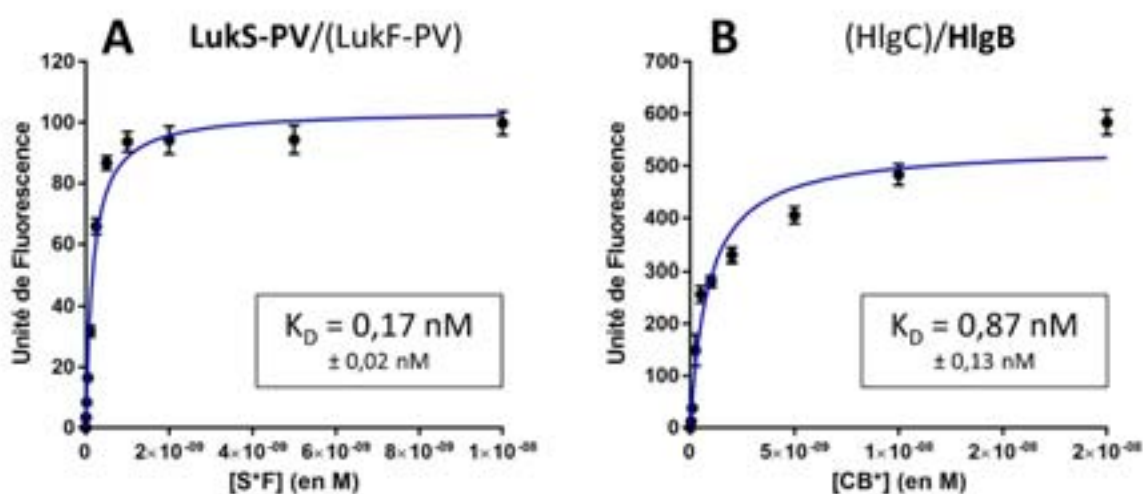


Figure III.3 – Détermination du K_d de la LPV et de HlgC/HlgB sur neutrophiles humains
La constante de dissociation est faible pour la LPV (A) et légèrement plus élevée pour HlgC/HlgB (B) (n=3).

Enfin, notre étude du modèle neutrophile humain s'est également intéressée aux conséquences de la LPV sur les cellules. Il est connu que les leucotoxines entraînent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-8, et c'est ce que nous avons cherché à démontrer (Figure III.4). Ainsi, la LPV à 1 nM pendant 3h ou 6h (A) semble induire une augmentation de la concentration d'IL-8 libéré dans le milieu de l'ordre de 266 et 208 pg/mL, respectivement. Concernant HlgC/HlgB (B), la sécrétion d'IL-8 est plus importante, surtout à 6h où on retrouve 720 pg/mL pour 0,5 nM de toxine et 514 pg/mL pour 1 nM.

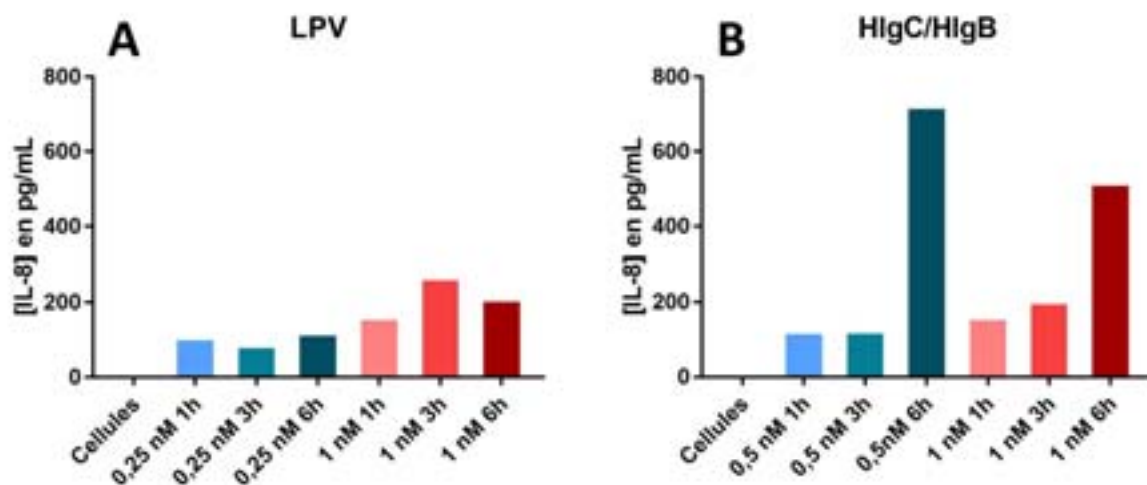


Figure III.4 – Quantification de l'IL-8 sur les neutrophiles humains en contact avec la LPV et HlgC/HlgB. Il y a une sécrétion d'IL-8 avec 1 nM de LPV (A) à partir de 3h. Concernant HlgC/HlgB (B), il y a une forte production de la cytokine à 6h pour 0,5 et 1 nM. (n=1)

Les résultats obtenus précédemment au laboratoire, sur la sécrétion d'IL-8 lors d'un contact avec la LPV (König et al., 1994), suggèrent un effet plus important de la toxine sur les neutrophiles que dans notre étude. En effet, pour une concentration d'environ 0,2 nM, au même temps d'incubation, la sécrétion d'IL-8 est multipliée 5 à 6 fois par rapport à nos résultats. Il faudra refaire cette expérience afin d'avoir des résultats statistiques pour comparer l'effet de la LPV. Cependant, HlgC/HlgB semble entraîner une sécrétion d'IL-8 bien supérieure au bruit de fond.

3 U937-C5aR

Les cellules U937-C5aR sont issues d'une lignée lymphoïde dépourvue de C5aR, mais transfectée par la suite avec ce récepteur. Nous avons testé sa sensibilité à la LPV et à HlgC/HlgB. En premier lieu, les changements morphologiques des U937-C5aR, en contact avec 2 nM de LPV dans du tampon EGTA supplémenté de calcium, semblent plus minimes que sur les PNN (Figure III.5). En effet, nous pouvons voir qu'à partir de 10 min (B, flèche noire), la surface de la membrane subit des altérations par rapport au temps 0 (A), mais la lyse à proprement parler n'est pas visible sur la vidéo, même à 20 min (C).

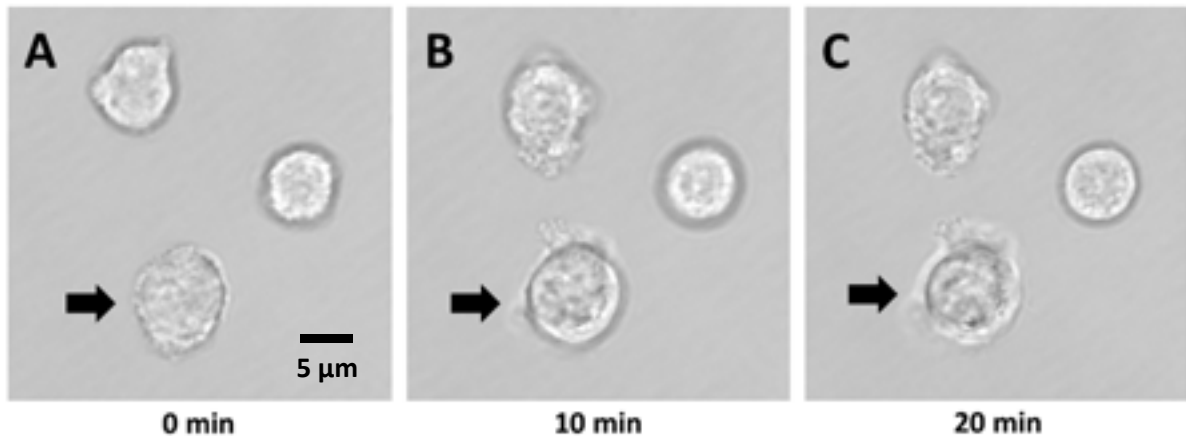


Figure III.5 – Observation au microscope à contraste de phase des cellules U937-C5aR en contact avec 2 nM de LPV
 Au début de l'incubation avec 2 nM de LPV dans du tampon EGTA supplémenté de 1 mM de calcium, les cellules adhèrent sur le fond de la boîte (A). Ce n'est qu'à 10 min (B) que la cellule (flèche noire) commence à s'arrondir légèrement et où les changements à la surface s'opèrent pour augmenter en intensité à 20 min (C).

Comme les U937-C5aR semblent se montrer moins sensibles que les PNN, la question de savoir si la toxine se fixe de la même manière se pose. Dans cette étude en immunofluorescence (Figure III.6), c'est seulement à partir d'une concentration de 2 nM de LPV que le marquage de la toxine commence à être bien visible à la surface de la cellule, soit une concentration dix fois supérieure à celle sur PNN.

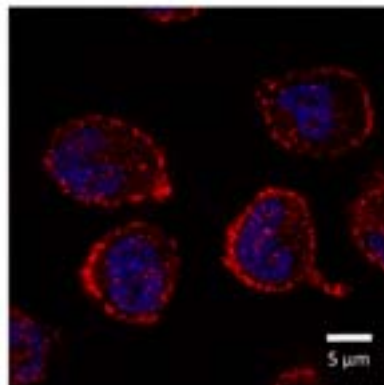


Figure III.6 – Observation au microscope confocal du marquage de la LPV sur U937-C5aR
 Le marquage rouge correspond à la sous-unité S de la LPV 2 nM pendant 10 min. Le bleu représente le marquage au Hoescht des noyaux.

Afin d'étudier la fixation des deux toxines de manière plus quantitative, les cellules U937-C5aR ont été mises en contact avec des concentrations croissantes de LPV et de HlgC/HlgB (Figure III.7). Ainsi, le K_d pour la LPV est de 0,29 nM (A) et celui pour HlgC/HlgB est plus important à 2,16 nM (B). De ce fait, la différence entre les deux toxines est plus importante que pour les PNN.

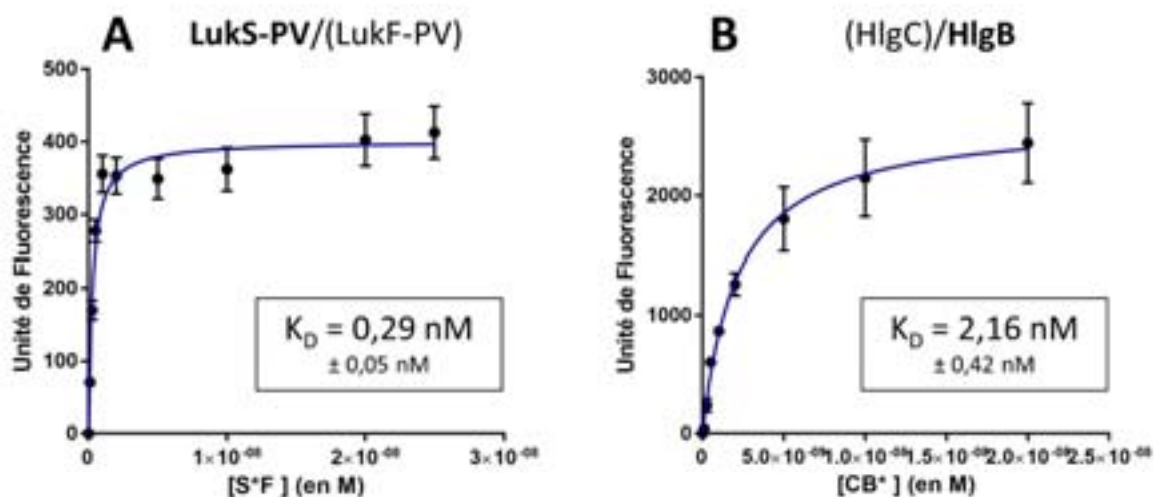


Figure III.7 – Détermination du K_D de la LPV et de HlgC/HlgB sur U937-C5aR

La constante de dissociation est faible pour la LPV (A) et beaucoup plus élevée pour HlgC/HIB (B) (n=3).

4 MACROPHAGES DERIVES DE MONOCYTES

Alors que la lignée U937-C5aR semble être moins sensible à la LPV et à HlgC/HlgB que les PNN, et que les neutrophiles humains ont une durée de vie très courte, la détermination d'un nouveau modèle d'étude est nécessaire. Nous nous sommes ainsi intéressés aux macrophages humains. Dérivés des monocytes – qui ont une affinité de fixation pour LukS-PV encore meilleure que les PNN –, ils ont l'avantage d'être aisément différenciables grâce à l'hormone GM-CSF et peuvent se maintenir jusqu'à 3 semaines. Les expérimentations sont réalisées en présence de milieu RPMI supplémenté de 10 % de sérum de veau fœtal ou de sérum humain. Le milieu RPMI contient une concentration en calcium de 0,4 mM.

Les premiers tests effectués sur ces cellules ont porté sur l'étude morphologique, afin de savoir si la toxine entraînait également des bouleversements visibles. Ainsi, la LPV à 2 nM est mise en contact avec les macrophages dans du milieu RPMI/10% sérum humain pendant 30 min (Figure III.8). La vidéo montre dès 15 min l'altération de la cellule (B, flèche noire du haut) par rapport au temps 0 (A), celle-ci devient plus sombre et le nucléole commence à apparaître (flèche orange). Enfin, à 30 min (C), les macrophages commencent à être lysés (flèche noire du bas) et le contenu cellulaire est relargué vers l'extérieur (flèche bleue).

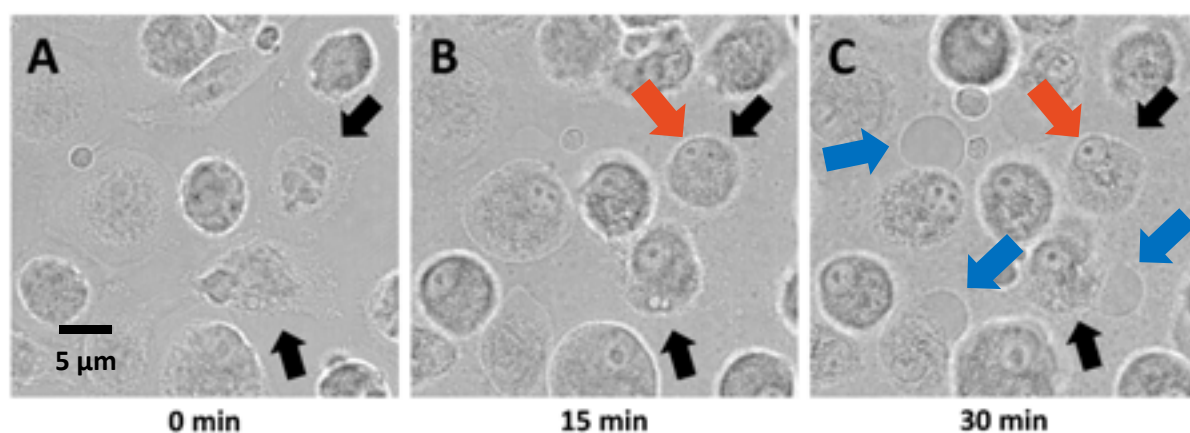


Figure III.8 – Observation au microscope à contraste de phase des macrophages en contact avec 2 nM de LPV
Les macrophages sont mis en contact avec la LPV dans du milieu RPMI supplémenté de sérum humain (A). À 15 min (B), la flèche noire montre l'arrondissement et le grossissement de la cellule. Il ne faut pas plus de quelques minutes pour que des changements morphologiques s'opèrent et rendent visible le nucléole (point noir dans le noyau, flèche orange). Enfin, à 30 min (C), le nucléole est encore plus visible et les cellules commencent à être lysées (flèche bleue).

Comme les macrophages sont plus grands que les neutrophiles (20-60 μm contre 10-14 μm), il est plus aisé d'observer les modifications cellulaires causées par la LPV. Toutefois, la visualisation de la LPV au microscope confocal pose plus de problèmes que sur les PNN (Figure III.9). En effet, il faut 2 nM pour que le signal soit bien visible. De plus, la toxine semble se concentrer majoritairement à la périphérie, alors que pour les PNN ou les U937-C5aR, plusieurs spots de fluorescence étaient visibles à l'intérieur de la cellule également.

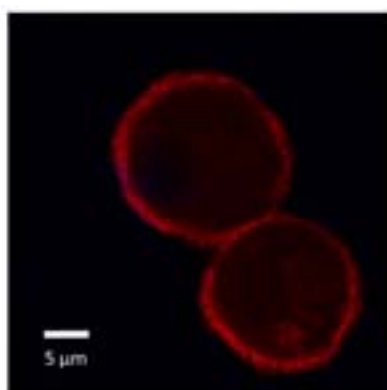


Figure III.9 – Observation au microscope confocal du marquage de la LPV sur macrophages humains
Le marquage rouge correspond à la sous-unité S de la LPV 2 nM pendant 10 min dans du RPMI/SVF. Le Hoescht marque les noyaux en bleu, mais ici, sur les macrophages, il n'est pas visible avec le protocole utilisé.

Afin d'étudier plus en avant cette fixation des leucotoxines sur les macrophages, la détermination du K_d est effectuée en présence de LPV et de HlgC/HlgB dans le milieu RPMI/10 % SVF (Figure III.10). Le K_d pour la LPV est de 0,30 nM (A) et celui de HlgC/HlgB montre, dans des résultats préliminaires, une forte augmentation à 4,85 nM (B).

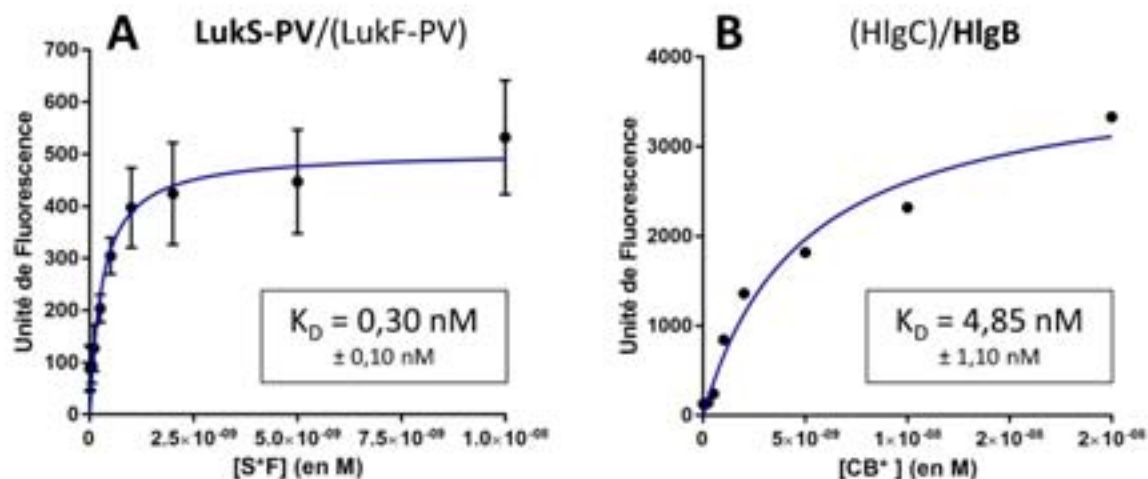


Figure III.10 – Détermination du K_d de la LPV et de HlgC/HlgB sur macrophages humains
La constante de dissociation est faible pour la LPV (A, $n=3$) et augmente de beaucoup pour HlgC/HlgB (B, $n=1$).

5 DISCUSSION

5.1 CONCLUSION

L'étude comparée de trois types de cellules du système immunitaire nous a permis de décrire au mieux les différences entre ces cellules, afin d'avoir une meilleure vision du modèle à utiliser selon l'étude à mener. En effet, les PNN sont très sensibles aux variations extérieures, mais ils sont également sensibles à la LPV et à HlgC/HlgB où les K_d sont les plus faibles. Pour l'affinité de la LPV sur les U937-C5aR et les macrophages, le K_d est sensiblement le même (0,30 nM), au contraire de celui obtenu pour HlgC/HlgB où le K_d double (de 2,16 nM pour les U937-C5aR à 4,85 nM pour les macrophages). Enfin, il est à noter que les U937-C5aR ne présentent pas de lyse au temps donné et que cette lignée et les macrophages ont besoin de 2 nM de LPV pour être visibles à l'immunocytochimie (0,25 nM pour les PNN). Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que le C5aR à la surface de la cellule est moins exprimé ou moins accessible que sur le neutrophile.

	PNN	U937-C5aR	Macrophages
Variations morphologiques (LPV)			
Lyse de la cellule (LPV)		X	
Fixation de LukS-PV			
K_d LPV (en nM)	0,17 ± 0,02	0,29 ± 0,05	0,30 ± 0,10
K_d HlgC/HlgB (en nM)	0,87 ± 0,13	2,16 ± 0,42	4,85 ± 1,10

Tableau III.1 – Récapitulatif des paramètres étudiés par type cellulaire pour la LPV et HlgC/HlgB

La différence des K_d entre les deux toxines est clairement visible. En effet, le K_d de HlgC/HlgB est multiplié par 5, 7 ou 16 pour les PNN, les U937-C5aR et les macrophages, respectivement. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que nous n'utilisons pas la sous-unité S marquée comme c'est le cas pour la LPV, mais bien HlgB couplé à la fluorescéine. Également, si le C5aR est le récepteur majoritaire de LukS-PV, un autre ligand pourrait être impliqué dans la fixation de HlgC. Ainsi, la variation des K_d de HlgC/HlgB pourrait donc être représentative de la présence ou non d'un ou de plusieurs autres récepteurs ou ligands pour HlgC, et également de la quantité de récepteurs qui diffère d'un type cellulaire à l'autre.

De plus, les grandes variations de l'erreur à la moyenne pour le K_d de la LPV sur les macrophages (0,10 nM) montrent en réalité la variation de sensibilité et de réactivité des macrophages selon la durée de culture après différenciation. Comme il s'agissait d'une mise au point de différenciation et de culture des macrophages, nous avons pu remarquer que les cellules ne répondaient pas de la même manière si elles avaient une semaine ou trois semaines. En effet, les macrophages cultivés trois semaines sont plus difficilement stimulables. De plus, les donneurs âgés semblaient donner des macrophages qui ne répondaient pas à la stimulation par les toxines de la même manière dès la troisième semaine.

Enfin, ce chapitre se concentrait sur les cellules de l'immunité innée, mais il est à noter que des neurones granuleux cérébelleux et des neurones périphériques ont montré une sensibilité à la LPV et à HlgC/HlgB (Jover et al., 2013). En effet, ils comportent également le récepteur C5aR pour LukS-PV et HlgC. Ainsi, on peut conclure qu'il suffirait que le C5aR soit présent à la surface pour que la LPV et l'Hémolysine γ HlgC/HlgB aient une action sur la cellule, ou au moins se fixent à la surface. Par extension, la LPV et HlgC/HlgB toucheraient donc tout type cellulaire, du moment qu'il exprime le C5aR.

5.2 PERSPECTIVES

Les neutrophiles humains ont été utilisés dans cette étude comme contrôle, car il s'agit de la cellule la mieux caractérisée dans son interaction avec la LPV ou HlgC/HlgB. La lignée U937-C5aR nous a permis quant à elle de mettre en évidence un changement de la résistance membranaire lors d'un contact avec HlgC/HlgB, au contraire de la LPV. Ceci remet en question l'hypothèse de la toxine formant des pores pour la LPV. Enfin, les macrophages permettront à l'avenir des études longues, comme la transfection qui aura pour but d'inactiver des gènes, afin de déterminer les voies de signalisation impliquées dans l'activation par les leucotoxines, par exemple.

Les macrophages sont obtenus à partir de monocytes isolés facilement à partir d'un concentré leucoplaquettaire sanguin. Ces monocytes peuvent ensuite être congelés, au contraire des neutrophiles, et se différencient en macrophages en cinq jours. Ces cellules comportent donc certains avantages des lignées cellulaires, mais leur durée de vie n'est que de trois semaines. Enfin, il faudra faire attention à l'avenir à n'utiliser que des cellules de donneur « jeune », afin d'avoir un état physiologique et une réponse optimaux des cellules.

L'utilisation d'un autre type cellulaire, indépendant du système immunitaire, peut également présenter certains avantages et permettra une autre approche de l'interaction de la LPV ou de HlgC/HlgB avec sa cellule cible, comme cela a été le cas pour les neurones. En effet, au laboratoire, des études sur des yeux de lapin, où les toxines sont injectées dans le vitré, suggèrent que la LPV ciblerait en 1 à 2h les cellules rétiniennees comme les cellules ganglionnaires et amacrines qui sont deux types de neurones.

Chapitre IV

Internalisation et transport intracellulaire

1 INTRODUCTION

C'est récemment que Spaan *et al.* a déterminé que le C5aR, le récepteur du système du complément pour l'anaphylatoxine C5a, était responsable de la fixation de LukS-PV et de HlgC (Spaan et al., 2013, 2014). Le C5aR est un récepteur couplé à des protéines G (GPCR) qui entraîne l'activation de plusieurs voies de signalisation, comme une libération du calcium réticulaire, une modification du cytosquelette d'actine ou encore l'assemblage de la NADPH oxydase (Rabiet et al., 2007). Après son activation par le C5a, le récepteur est phosphorylé puis internalisé à l'intérieur de la cellule où il va être dégradé ou recyclé à la membrane. C'est ce qu'on appelle le processus de désensibilisation.

La question qui se pose alors est de connaître l'effet des leucotoxines sur la signalisation du C5aR. Le récepteur est-il internalisé avec la LPV ou HlgC/HlgB, et si oui, par quelle voie ? La toxine reste-t-elle associée au récepteur, et pendant combien de temps ? Où vont les leucotoxines une fois internalisées, empruntent-elles la voie de la dégradation ou celle du recyclage ?

En effet, avec une activation par le C5a, le récepteur C5aR est internalisé par la voie de la clathrine. De plus, il s'agit d'un GPCR de classe B qui ne se recycle pas à la membrane avant un long temps de latence. Par contre, la majorité du C5aR emprunte la voie de la dégradation (Suvorova et al., 2005). Nous nous sommes donc intéressés à démontrer l'internalisation de la LPV et de HlgC/HlgB, puis de chercher la localisation de la toxine à l'intérieur de la cellule.

2 ACTIVATION DU RECEPTEUR

Lors du processus d'internalisation, la première étape est la phosphorylation de la partie C-terminale du C5aR. En utilisant des anticorps spécifiques qui reconnaissent la phosphorylation (@C5aR C-ter $\text{\textcircled{P}}$) ou la non-phosphorylation (@C5aR C-ter) de la sérine en position 338, nous avons pu mettre en évidence une variation du signal de fluorescence (Figure IV.1).

En effet, après une mise en contact des neutrophiles avec les deux types d'anticorps, la différence d'intensité de fluorescence est nettement visible. Sur les cellules contrôles maintenues dans du tampon EGTA supplémenté de 1 mM de calcium, l'anticorps C5aR C-ter (**A1**) a un signal plus fort que l'anticorps phosphorylé (**B1**). Lorsqu'on ajoute 2 nM de LPV pendant 5 min (**2**), l'intensité du signal s'inverse par rapport au contrôle : le C5aR non phosphorylé diminue (**A2**) tandis que le récepteur phosphorylé augmente (**B2**). Cette tendance est retrouvée lors de la mise en contact de 2 nM de HlgC/HlgB pendant 5 min (**A3** et **B3**).

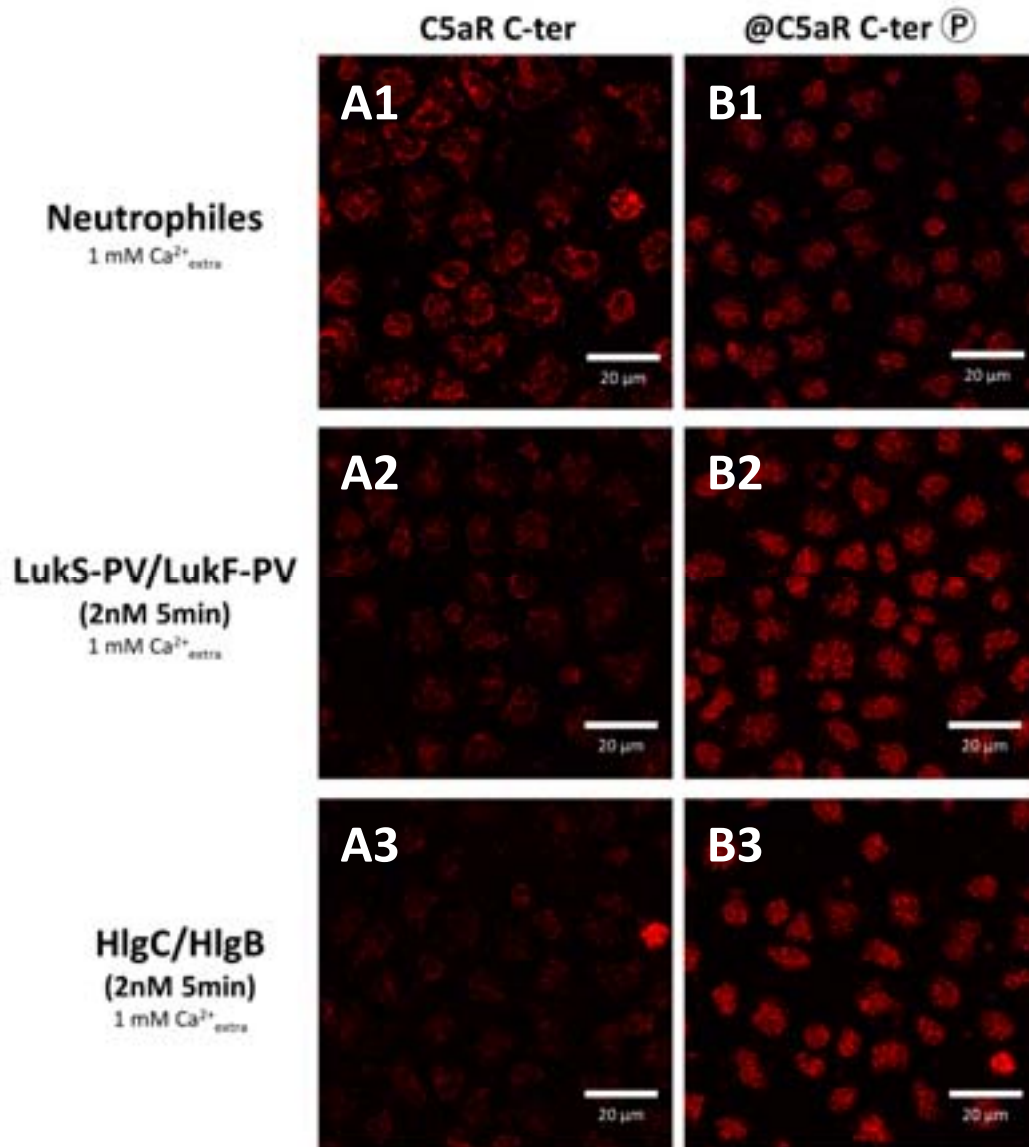


Figure IV.1 – Comparaison de la présence du C5aR phosphorylé et non phosphorylé avec la LPV et HlgC/HlgB
 Les images obtenues par immunocytochimie montrent que le C5aR non phosphorylé est moins présent sur les cellules lors de l'ajout de LPV (A2) ou de HlgC/HlgB (B2). À l'inverse, le signal fluorescent du C5aR phosphorylé augmente nettement lorsque les neutrophiles sont mis en contact avec les deux toxines (A3 et B3).

Ainsi, nous avons pu mettre en évidence la stimulation du C5aR lors de la présence des deux leucotoxines, et également l'activation de la première étape à l'internalisation : la phosphorylation.

3 INTERNALISATION

Sur la piste d'une internalisation de la LPV et de HlgC/HlgB, nous avons pu observer précocement un phénomène intéressant lors de l'étude de la fixation de LukS-PV sur les neutrophiles, dans du tampon EGTA supplémenté de 1 mM de calcium. En effet, lorsque les cellules sont mises en contact avec 0,5 nM de LukS-PV (Figure IV.2), le plateau de fixation est atteint à partir de 20 min. À 30 min, LukF-PV est ajouté (tracé rouge) et la courbe diminue sensiblement par rapport au composé S seul. Cette baisse de la fluorescence de la fluorescéine couplée à LukS-PV pourrait être expliquée par l'internalisation de la

toxine dans la cellule, et son passage dans les vésicules acides qui détruiraient alors le fluorochrome ou diminueraient sa fluorescence.

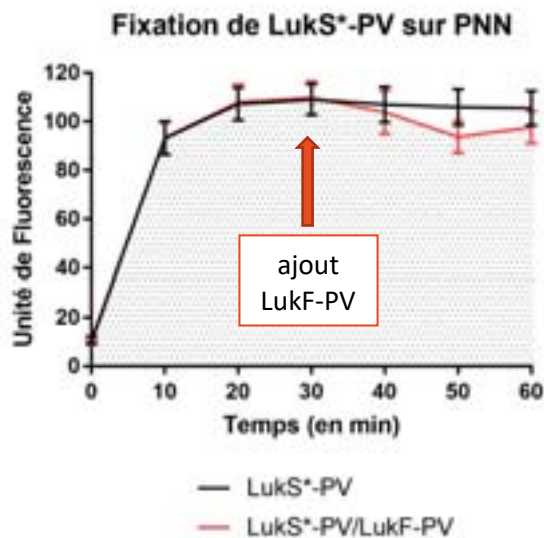


Figure IV.2 – Étude de la fixation de LukS-PV marqué à la fluorescéine sur les neutrophiles humains
La fixation de LukS-PV à 0,5 nM devient stable après 20 min. L'ajout de 2 nM de LukS-PV se fait donc à 30 min et une légère baisse est observée par rapport au contrôle avec le LUKS-PV seul.

Forts de ces premiers éléments démontrant une internalisation des deux leucotoxines, nous avons poussé l'étude plus loin en utilisant la microscopie confocale, afin de visualiser la présence de la toxine sur la cellule (**Article 1**). Une quantification des cellules présentant un marquage périphérique a ainsi été effectuée sur les neutrophiles dans différentes conditions : les sous-unités seules LukS-PV et HlgC, ou la LPV et HlgC/HlgB, dans un milieu sans calcium montrent une forte localisation périphérique de la fluorescence, au contraire des deux leucotoxines mises en contact avec 1 mM de calcium où le signal de surface diminue fortement. De plus, dans cet article, nous avons pu démontrer que la réponse calcique était différente si elle concernait une activation par le C5a, la LPV ou HlgC/HlgB. Cette différence serait due au type de stocks calciques employés. Ainsi, les deux leucotoxines induisent une libération du calcium provenant du réticulum endoplasmique, mais HlgC/HlgB utilise également les stocks acides comme les lysosomes ou les endosomes. De plus, nous avons pu mettre en évidence une absence de formation de pore pour LukF-PV sur les membranes synthétiques ou par électrophysiologie, contrairement à la sous-unité HlgB. Pour aller plus loin, nous avons démontré que c'est la sous-unité F (LukF-PV et HlgB) qui est responsable de la signalisation calcique. En effet, en intervertissant les composés F, les profils calciques de la LPV et de HlgC/LukF-PV, ainsi que de HlgC/HlgB et LukS-PV/HlgB sont sensiblement les mêmes. La sous-unité S semble d'abord responsable de la fixation tandis que le composé F oriente la signalisation cellulaire.

ARTICLE 1

Internalization of staphylococcal leukotoxins that bind and divert the C5a receptor is required for intracellular Ca²⁺ mobilization by human neutrophils.

Internalization of staphylococcal leukotoxins that bind and divert the C5a receptor is required for intracellular Ca^{2+} mobilization by human neutrophils

Mira Y. Tawk,¹ Gaëlle Zimmermann-Meisse,¹ Jean-Louis Bossu,² Cristina Potrich,³ Tristan Bourcier,¹ Mauro Dalla Serra,³ Bernard Poulain,² Gilles Prévost^{1*} and Emmanuel Jover^{1*}

¹Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, EA7290 Virulence Bactérienne Précoce, Institut de Bactériologie et Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Université de Strasbourg, Strasbourg, France.

²INCI – UPR-CNRS 3212, Physiologie des réseaux de neurones, Strasbourg, France.

³National Research Council of Italy, Institute of Biophysics and Bruno Kessler Foundation, Trento, Italy.

Summary

A growing number of receptors, often associated with the innate immune response, are being identified as targets for bacterial toxins of the beta-stranded pore-forming family. These findings raise the new question of whether the receptors are activated or merely used as docking points facilitating the formation of a pore. To elucidate whether the *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin and the leukotoxin HlgC/HlgB act through the C5a receptor (C5aR) as agonists, antagonists or differ from the C5a complement-derived peptide, their activity is explored on C5aR-expressing cells. Both leukotoxins equally bound C5aR in neutrophils and in stable transfected U937 cells and initiated mobilization of intracellular Ca^{2+} . HlgC/HlgB requires the presence of robust intracellular acidic Ca^{2+} stores in order to evoke a rise in free $[\text{Ca}^{2+}]_i$, while the LukS-PV/LukF-PV directly altered reticular Ca^{2+} stores. Intracellular target specificity is conferred by the F-subunit associated to the S-subunit binding the receptor. Furthermore, internalization of the two leukotoxin

components (S- and F-subunits) associated to C5aR is required for the initiation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mobilization. Electrophysiological recordings on living cells demonstrated that LukS-PV/LukF-PV does not alter the membrane resistance of C5aR-expressing cells. The present observations suggest that part of the pore-forming process occurs in distinct intracellular compartments rather than at the plasma membrane.

Introduction

Staphylococcus aureus causes a large variety of human infections, from mild boils and subcutaneous abscesses to the severe toxic shock syndrome, necrotizing pneumonia and sepsis, among others (Lowy, 1998). The bacterium colonizes mucosal and skin surfaces and escapes host immunity through the production of adhesion proteins (Foster *et al.*, 2014; Popov *et al.*, 2014), superantigens (McCormick *et al.*, 2001; Lappin and Ferguson, 2009), cytolytins and pore-forming toxins (Archer, 1998; Vandenesch *et al.*, 2012). Of the latter, α -toxin assembles as single-component heptamers to constitute a pore (Menestrina, 1986; Wilke and Bubeck Wardenburg, 2010; Inoshima *et al.*, 2011). Other members of the β -barrel pore-forming leukotoxin family act through the combination of two subunits commonly known as the fast- (F) and slow-eluted (S) components (Woodin, 1960). To date this group includes six *S. aureus* class S and five class F proteins naturally assembling as γ -haemolysins HlgA/HlgB or HlgC/HlgB, the Panton-Valentine leukocidin LukS-PV/LukF-PV (PVL), LukM/LukF'-PV, LukE/LukD and LukA/LukB (Yoong and Torres, 2013; Otto, 2014), which significantly differ in their specific cellular targets (Meyer *et al.*, 2009; Vandenesch *et al.*, 2012; Alonzo and Torres, 2014). The subunits of the β -barrel leukotoxins, which are secreted as separate molecules, will act synergistically to alter a target cell (Prévost *et al.*, 2001). It is currently assumed that the class S component binds to a 'unique receptor' and that the subsequent binding of the F-subunit initiates the assembly of a pre-pore structure (Meyer *et al.*, 2009; Yoong and Torres, 2013). The class S components LukS-PV and

Received 18 November, 2014; revised 26 January, 2015; accepted 1 March, 2015. *For correspondence. E-mails prevost@unistra.fr, jover@unistra.fr; Tel. (+33) 388 45 6647; Fax: (+33) 38860 1664.

© 2015 John Wiley & Sons Ltd

HlgC associate with human neutrophils by binding a membrane molecule expressed during differentiation to the meta-myelocyte stage (Colin *et al.*, 1994; Meunier *et al.*, 1995). In addition, a link has been suggested between the toxin binding to the receptor and the activation of a Ca^{2+} conductance, which allows the oligomerization of S- and F-subunits and the formation of hetero-octameric pores (Staali *et al.*, 1998; Baba Moussa *et al.*, 1999; Joubert *et al.*, 2006; Miles *et al.*, 2006). However, the recent finding that low concentrations (sublytic) of LukS-PV/LukF-PV activate human neutrophils challenges the view of the formation of a pore at the plasma membrane following the activation of a Ca^{2+} conductance (Graves *et al.*, 2012).

In the past few years, various active membrane proteins emerged as receptors for *S. aureus* virulence factors. The ADAM-10 metalloproteinase allows the initialization of the sequence of events by which the α -toxin is transformed into a pore causing cell lysis. However, low α -toxin concentration caused the activation of ADAM10, resulting in the cleavage of E-cadherin and the disruption of epithelial barrier function (Wilke and Bubeck Wardenburg, 2010; Inoshima *et al.*, 2011). The CCR5 G-protein coupled receptor is considered necessary and sufficient for the killing of T cells, macrophages and dendritic cells by the leukotoxin LukE/LukD (Alonzo *et al.*, 2013), although when targeting neutrophils, the same leukotoxin binds the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 (Reyes-Robles *et al.*, 2013). Moreover, recent data show that the human complement receptors C5a receptor (C5aR) and C5L2 act as host targets for LukS-PV and HlgC, mediating both toxin binding and cytotoxicity (Spaan *et al.*, 2013; 2014). Notwithstanding the above, the identification of steps leading to cell lysis and the process of pore formation after binding of the receptor remain elusive events.

The PVL and the γ -hemolysin HlgC/HlgB bind the C5aR expressed by human neutrophils and the stably transfected U937-C5aR cell line. The toxin-receptor association can be prevented by the C5a peptide. However, similar to α -toxin, HlgC and HlgB subunits polymerize and form pores in planar lipid membranes while the PVL subunits do not (Menestrina *et al.*, 2003). Through a rough analysis of intracellular Ca^{2+} mobilization we show that, after binding the C5aR, the activity of leukotoxins that induced cell activation can be modified by the non-peptide C5aR antagonist W-54011 (Sumichika *et al.*, 2002). The γ -hemolysin HlgC/HlgB triggers a rise in intracellular Ca^{2+} by acting on acidic stores, while LukS-PV/LukF-PV induces Ca^{2+} mobilization from reticular stores. Notably, the specificity of the compartment-associated Ca^{2+} release is supported by the F-subunit linked to the C5aR-S-subunit complex as the LukS-PV bound to HlgB initiates Ca^{2+} release from

acidic stores and the HlgC bound to LukF-PV acts as LukS-PV/LukF-PV. Considering that both LukS-PV/LukF-PV and HlgC/HlgB are endocytosed shortly after the association of the F component to the S component bound to C5aR, our results suggest that part of the pore-forming process possibly occurs in distinct intracellular compartments rather than at the plasma membrane.

Results

PVL and HlgC/HlgB bind to the C5aR and mobilize intracellular Ca^{2+}

Previous work from our group showed that S-subunits of the PVL and the γ -hemolysin HlgC/HlgB compete for the same binding site (Gauduchon *et al.*, 2001), now identified as the C5a peptide receptor C5aR (Spaan *et al.*, 2013; 2014). The two S-subunits, LukS-PV and HlgC, equally bind C5aR in human neutrophils and in U937-C5aR-transfected cells and their binding can be prevented by the presence of the C5a natural peptide (complementary information, Tables S1 and 2). Upon binding to the receptor, the two leukotoxins induced a concentration-dependent intracellular Ca^{2+} release in neutrophils (Fig. 1A and B), with a half-concentration effect similar to the binding dissociation constant (Kd) of each leukotoxin S-subunit (Fig. 1C and D). Moreover, leukotoxin concentrations near the Kd value do not generate cell lysis provided that the incubation buffer contained 1 mM Ca^{2+} (complementary information, Fig. S1). Activation of the C5aR by the complement peptide C5a leads to intracellular Ca^{2+} release (Goldsmith and Dhanasekaran, 2007; Monk *et al.*, 2007), producing a fast and transient peak of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ as recorded both in human neutrophils (Fig. 1E, green traces) and U937-C5aR-transfected cells incubated in 1.2 nM C5a solution (Fig. 1F, green traces). The binding of leukotoxins to the same cells induced an intracellular Ca^{2+} release that diverges both in shape and kinetics. Concentrations matching the leukotoxins binding affinity for the receptor resulted for HlgC/HlgB (0.5 nM) in a slow intracellular rise of free $[\text{Ca}^{2+}]_i$, which in few minutes returned to a steady-state value above the initial resting concentration (Fig. 1E and F, dark blue trace) and for PVL (0.25 nM) in a slow to start effect that gradually reached a long-lasting $[\text{Ca}^{2+}]_i$ plateau (Fig. 1E and F, red trace). High concentration of isolated S components failed to induce $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mobilization (Fig. 1E and F, HlgC light blue trace and LukS-PV pink trace). From these results we conclude that leukotoxins, which bind to the C5aR through their S-subunits, do not act as receptor agonists even though they cause intracellular Ca^{2+} release.

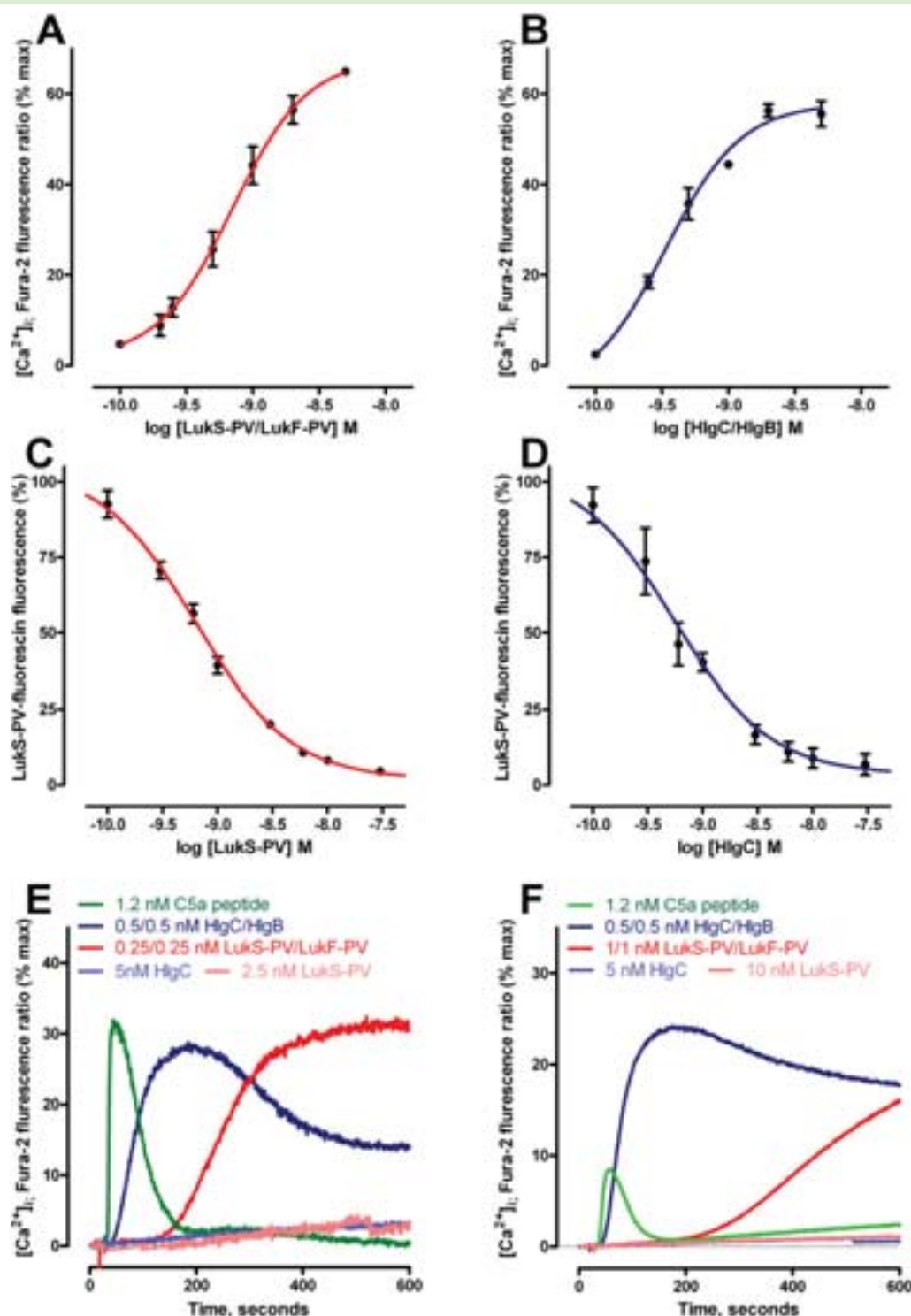


Fig. 1. The intracellular Ca²⁺ rise triggered by PVL and HlgC/HlgB, at low concentrations, parallels the binding of the relevant S-subunits. Panels A and B show free intracellular Ca²⁺ values obtained after 4 min of incubation in the presence of indicated concentrations of PVL (A) or HlgC/HlgB (B). Panels C and D show competition experiments carried out between LukS-PV fluorescein labelled and native LukS-PV (C) or LukS-PV fluorescein and native HlgC (D). The half-maximum concentration for intracellular Ca²⁺ mobilization was the same than the half-concentration values of S-subunits binding (between 0.2 and 0.5 nM). Panels E and F show the kinetics of the response of human neutrophils (E) and U937-C5aR cells (F) incubated with K_{0.5} concentrations: 1.2 nM C5a (green trace), 0.25 nM LukS-PV/LukF-PV (red trace) or 0.5 nM HlgC/HlgB (blue trace) solutions. The light blue trace shows the lack of effect of high concentrations of HlgC (5 nM) and the pink trace LukS-PV (10 nM). Results are normalized to the maximum fura-2 fluorescent signal obtained after bathing the cells in 0.05% Triton X-100 to equilibrate [Ca²⁺]_i with that of the buffer concentration, after which data are expressed as percentage of this value.

The C5aR supports both PVL and HlgC/HlgB to mobilize intracellular Ca²⁺

The inhibitory effect of thapsigargin (1 μ M) pre-incubation confirmed the reticular origin of the intracellular Ca²⁺ release due to C5a, both in human neutrophils (Fig. 2A, light blue trace) and U937-C5aR cells (Fig. 2B, light blue trace). The non-peptide antagonists of C5aR, W-54011 (20 nM) (Proctor *et al.*, 2004), and C3aR, SB-290157 (1 μ M) (Mathieu *et al.*, 2005), discriminated between the intracellular Ca²⁺-releasing effects of C5a and the two leukotoxins. As expected, the presence of W-54011 fully prevented the C5a activation of the receptor in neutrophils (Fig. 2A, red trace) and partially in transfected cells (Fig. 2B, red trace). Moreover, SB-290157 had no significant effect in either cell (Fig. 2A and B, green traces). The antagonist W-54011 reduced by 72% \pm 7% the effect of PVL in human neutrophils ($n = 3$) and by 35% \pm 15% in U937-C5aR cells ($n = 3$) (Fig. 2C and D, red traces). The presence of 1 μ M SB-290157 slightly shortened the latency of PVL effect both in neutrophils and U937-C5aR cells (Fig. 2C and D, green trace). Surprisingly, W-54011 (20 nM) amplified the activity of HlgC/HlgB up to 149% \pm 23% ($n = 3$) in neutrophils and 181% \pm 23% ($n = 3$) in U937-C5aR cells (Fig. 2E and F, red trace) and SB-290157 (1 μ M) slightly decreased the peak amplitude (Fig. 2E and F, green trace). As expected, non-transfected U937 cells were entirely insensitive to very high concentrations of C5a (12 nM), PVL (0.1 μ M) or HlgC/HlgB (0.1 μ M). Taken together, these results strengthen the notion of C5aR fostering the cellular activity of the two leukotoxins, although the outcome of each leukotoxin effect is significantly different from that of C5a. Therefore, to clarify the relationships between C5aR and the cellular activity of leukotoxins we checked for their strategy to raise free intracellular Ca²⁺.

The leukotoxins PVL and HlgC-HlgB deplete diverse intracellular compartments of their Ca²⁺ content

We previously showed that HlgC/HlgB has no direct relationship with plasma membrane Ca²⁺ channels in granular neurons (Jover *et al.*, 2013) and we obtained similar results in human neutrophils. Nevertheless, the alteration of established Ca²⁺ internal stores (Laude and Simpson, 2009) revealed a relationship with the leukotoxins. To achieve this, the endoplasmic reticulum, which releases Ca²⁺ through IP3 and ryanodine receptors, was emptied through the use of the SERCA blocker thapsigargin (Periasamy and Kalyanasundaram, 2007). The more diffuse intracellular Ca²⁺ pool, which is insensitive to inositol 1,4,5-trisphosphate, was depleted through the action of ionomycin (Fasolato *et al.*, 1991). The contribution of acidic organelles was tested through

the action of bafilomycin A1 (a V-type H⁺-ATPase inhibitor) or the cathepsin C substrate glycyl-phenylalanine 2-naphthylamide (GPN), which drives the blockade of lysosomes by altering their osmolarity (Galione *et al.*, 2010). In neurons, HlgC/HlgB action impinges first on the acidic Ca²⁺ stores by modifying a nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP)-activated mechanism (Jover *et al.*, 2013). Herein, in the presence of the NAADP competitor Ned-19 (Rosen *et al.*, 2009), the free [Ca²⁺]_i change due to HlgC/HlgB was increased by 159% \pm 18% (Fig. 3A1) whereas the PVL effect was unaltered by the drug (Fig. 3A2), supporting a particular link between an acidic store and HlgC/HlgB but not with PVL. The blockade of the H⁺-ATPase by bafilomycin A (100 nM, Fig. 3B1, red trace) and the alteration of lysosomes through GPN (50 μ M, Fig. 3B1, green trace) both reduced the peak of free [Ca²⁺]_i due to HlgC/HlgB by 67% \pm 21% and 62% \pm 10% ($n = 3$) respectively. Nevertheless, the PVL response was not significantly altered by these two drugs (Fig. 3B2). The depletion of the Ca²⁺ content of reticular stores by the SERCA blocker thapsigargin (1 μ M, Fig. 3C1 and C2, red traces) or by ionomycin (1 μ M, Fig. 3C1 and C2, green traces) significantly reduced the effect of both leukotoxins. Thapsigargin reduced to 60% \pm 2% ($n = 3$) the effect of HlgC/HlgB and to 56% \pm 8% ($n = 3$) the PVL activity. Ionomycin abolished almost completely the effect of both toxins (Fig. 3C1 and C2). The pyrazole derivative YM-58483 (10 μ M), which specifically blocks the store-operated Ca²⁺ entry (SOCE) (Ishikawa *et al.*, 2003), inhibited HlgC/HlgB activity to 72% \pm 17% ($n = 3$) (Fig. 3D1) whereas it did not significantly alter the effect of PVL (Fig. 3D2). These results confirm that HlgC/HlgB triggers a Ca²⁺ release from acidic stores that can be amplified by a further release of Ca²⁺ from the reticulum, finally leading to SOCE activation (Jover *et al.*, 2013), and unveils a different reticular Ca²⁺ release by PVL. They also raise the question of how the outcome of two leukotoxins binding the same receptor may differ with regard to their effect on intracellular Ca²⁺ release. We therefore focused our attention on the F-subunits and their ability to target specific compartments.

The F-subunit of leukotoxins determines the intracellular compartment releasing Ca²⁺

The two S-subunits, which directly associate with C5aR, can form active compounds with either LukF-PV or HlgB (Ferrerias *et al.*, 1998), although the affinity of HlgB for HlgC is higher than that of LukF-PV for HlgC and, similarly, the association of HlgB to LukS-PV is less effective than HlgC. We checked for the cellular activity of different subunit associations in order to discriminate the specific

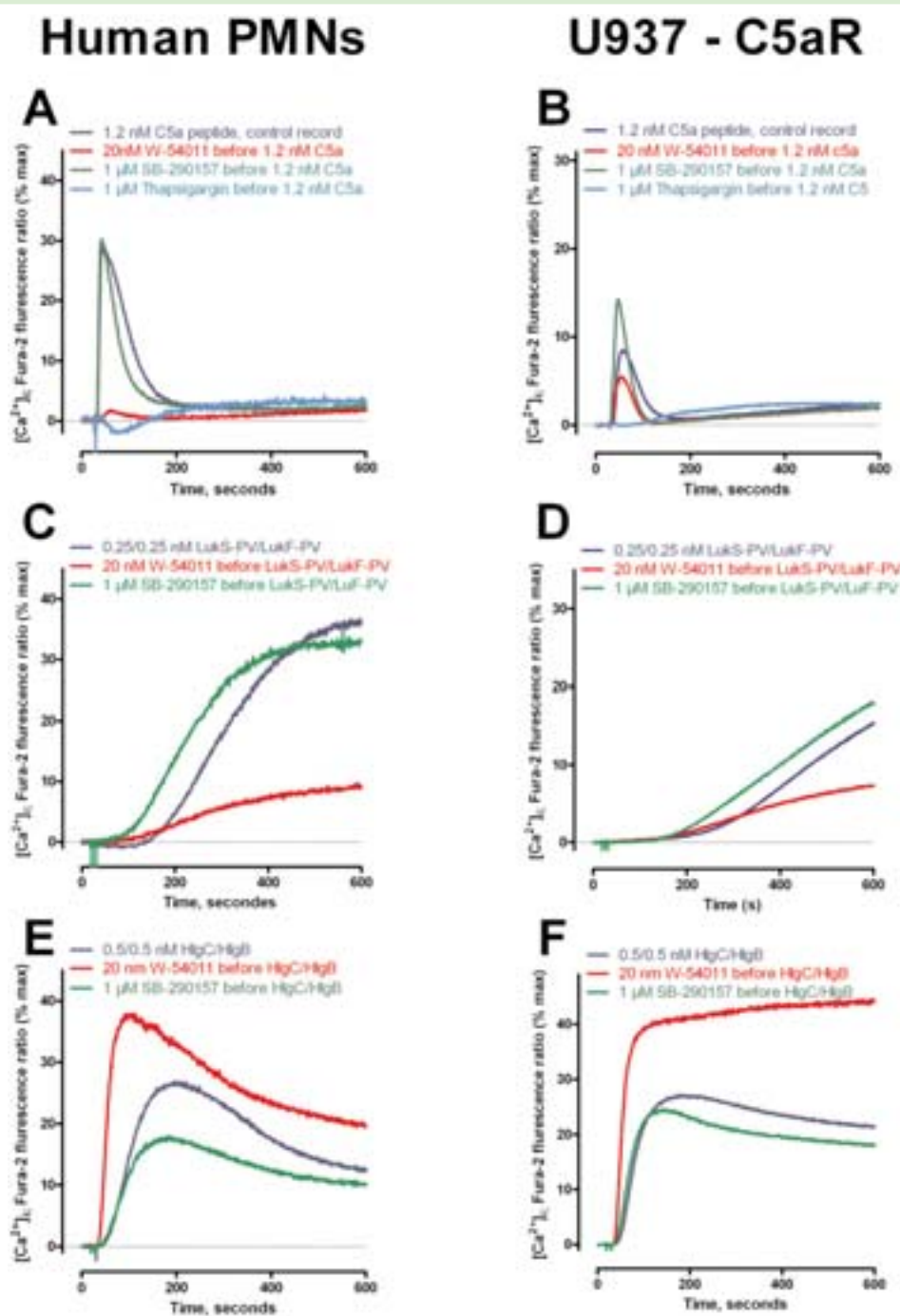


Fig. 2. PVL and HlgC/HlgB trigger specific cellular responses after binding C5aR. Panels on the left (A, C and E) present records carried out on human neutrophils and the right panels (B, D and F) on U937-C5aR-transfected cells. Control traces for C5a peptide (1.2 nM), PVL (0.25 nM) and HlgC/HlgB (0.5 nM) are shown as blue traces. The red traces depict recordings in cells incubated in the presence of 20 nM W-54011 prior to addition of the corresponding inducer: panels A and B: C5a; panels C and D: PVL; and panels E and F: HlgC/HlgB. Similarly, green traces in the same panels illustrate records of cells incubated in the presence of 1 μM SB-290157. In panels A and B, the light blue line corresponds to records in the presence of 1 μM thapsigargin before addition of C5a. Results are normalized to the maximum fura-2 fluorescent signal obtained after bathing the cells in 0.05% Triton X-100 to equilibrate [Ca²⁺]_i with that of buffer concentration, then expressed as a percentage of this value.

contribution to Ca²⁺ release by the F-subunits. The activity of HlgC (1.5 nM) associated to LukF-PV (15 nM) was

compared with the control test of HlgC/HlgB (0.5 nM). The complex HlgC/LukF-PV (Fig. 4A, red trace) induced a rise

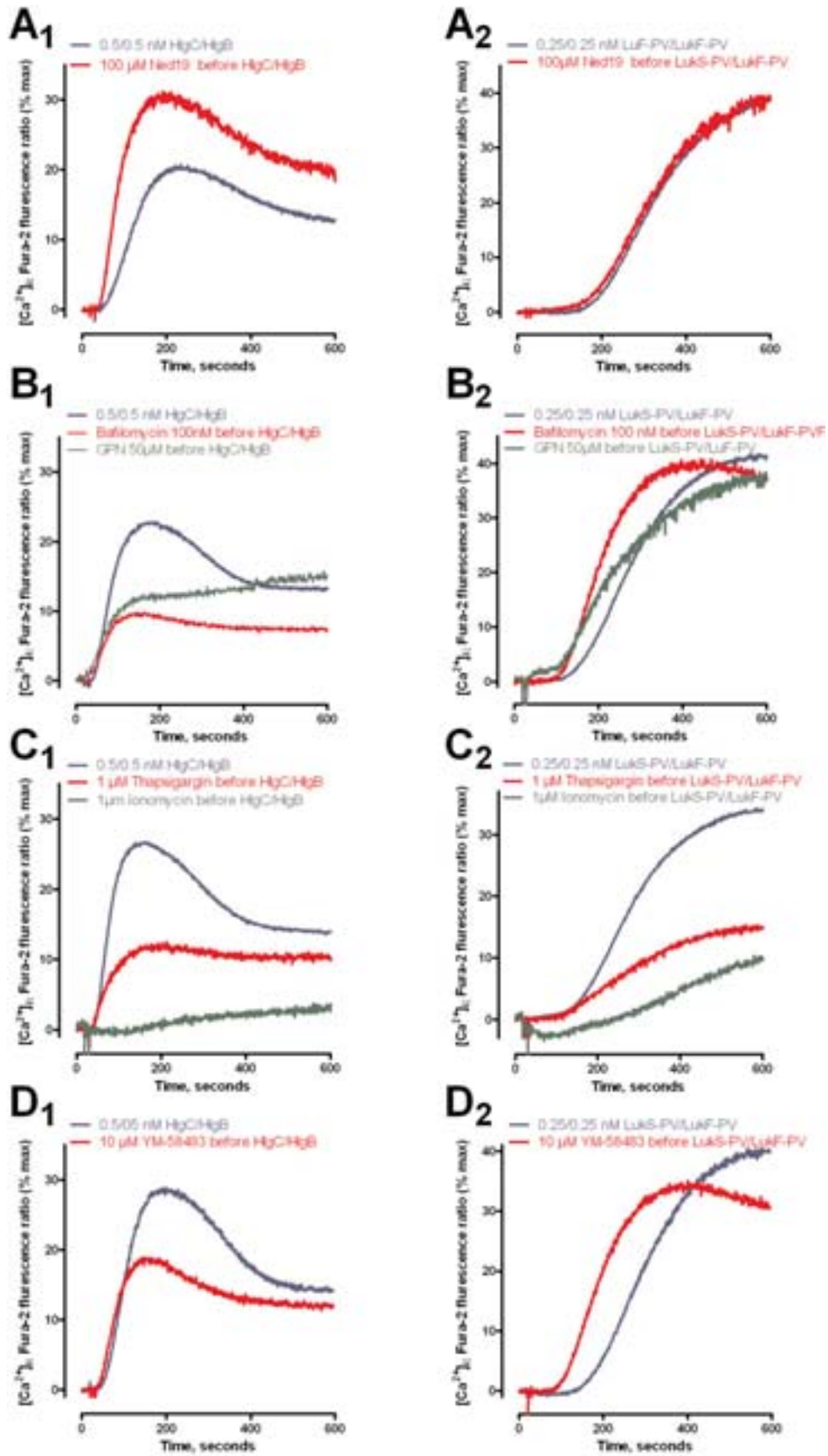


Fig. 3. The leukotoxin identity determines the intracellular compartment releasing Ca²⁺. Panels on the left (under score 1) show human neutrophils fura-2 fluorescence records carried out in the presence of 0.5 nM HlgC/HlgB leukotoxin and panels on the right (under score 2) in the presence of 0.25 nM LukS-PV/LukF-PV (blue traces: leukotoxin control records). A₁ and A₂. The red traces illustrate records of cells previously incubated in the presence of NAADP antagonist Ned19 (100 μM). B₁ and B₂. The H⁺-ATPase blocker bafilomycin (100 nM) in red and the lysosomal disrupter GPN (50 μM) in green. C₁ and C₂ show the results of reticular depletion carried out with 1 μM thapsigargin (SERCA blocker, red) and 1 μM ionomycin (reticular ionophore, green). D₁ and D₂ illustrate the effect of the SOCE blocker pyrazole derivative YM-58483 (10 μM). Results are normalized to the maximum Fura-2 fluorescent signal obtained after bathing the cells in 0.05% Triton X-100 to equilibrate [Ca²⁺]_i with that of buffer concentration, then expressed as a percentage of this value.

in [Ca²⁺]_i with a delayed kinetic relative to HlgC/HlgB (Fig. 4A, bleu trace) and the complex LukS-PV (0.5 nM)/HlgB (1 nM) (Fig. 4B, red trace) initiated an accelerated increase of [Ca²⁺]_i relative to LukS-PV/LukF-PV (0.25 nM) (Fig. 4B, bleu trace). The observed kinetics suggest that LukF-PV may behave as a limiting factor for the initiation of Ca²⁺ mobilization. Hence, after lysosome disruption by GPN, we looked at the cellular activity of the different subunit associations. The same conditions that significantly reduced the HlgC/HlgB-induced Ca²⁺ release left unaltered the PVL effect (Fig. 3B1 and B2, green traces). When the HlgB subunit was associated with LukS-PV, the Ca²⁺-releasing effect was reduced through the action of GPN (Fig. 4D, red trace) but the activity of the HlgC/LukF-PV association remained unaltered (Fig. 4C, red trace). These results argue in favour of a specific role of the F-subunit for the intracellular Ca²⁺ release activation. In addition, they suggest that each particular F-subunit needs a distinct environment to be active.

The HlgB subunit is required in the complex to confer pore-forming properties

The intracellular effect of leukotoxins, highlighted through the pharmacological analysis, leads us to question the capability of each leukotoxin to form a pore at the plasma membrane. Previous observations in lipid membrane preparations (Ferrerias *et al.*, 1998; Comai *et al.*, 2002) separated the PVL and HlgC/HlgB by their ability to form a pore. Using the same preparations, we confirm that the presence of the HlgB subunit when associated with either HlgC or LukS-PV drives the complex to the formation of 185 pS conductance pores. HlgB similarly gives competence of either dimer to induce the release of calcein trapped in lipid microvesicles (see Fig. S2 of complementary results). Further, we recorded the transmembrane resistance of C5aR-transfected cells and U937 control cells in the presence of different combinations of subunits while maintaining the membrane potential at -60 mV (Lonchamp *et al.*, 2010). Membrane resistance ($R_m = V/I$, according to Ohms law) was monitored by analysing the current traces (I) corresponding to changes in transmembrane potential (V). After a control determination of R_m , the studied leukotoxin was applied

to the bath and R_m determined every minute for a minimum of 10 min. No significant changes were observed in R_m of U937-C5aR-transfected cells bathed in saturating concentrations of PVL. Figure 5A1 shows a characteristic example while Fig. 5A2 summarizes the results of eight independent experiments before and after the addition of 2 nM PVL (equal to 10 times its half-concentration effect or its binding affinity to C5aR). In contrast, saturating concentrations of HlgC/HlgB (2 nM) induced an abrupt decrease in membrane resistance after a 5 min incubation of the cells. Figure 5B1 illustrates an example of a cell recorded in the presence of HlgC/HlgB, and Fig. 5B2 depicts the resting membrane resistance values before and after addition of the toxin for eight independent cells. Furthermore, in the presence of high concentration of the mix LukS-PV and HlgB (4 nM each) about 50% of cells generated changes in membrane resistance of C5aR-expressing cells. Figure 5C1 illustrates a responding cell while Fig. 5C2 summarizes the results of resting membrane resistance recordings. Concentrations up to 10 nM HlgC/HlgB failed to induce any modification in membrane resistance in U937 cells (Fig. 5B1, grey triangles). These results reinforce the notion of a cellular specific effect primed by each leukotoxin, even though the two bi-component complexes share the C5aR to bind to the cell.

Both PVL and HlgC/HlgB are internalized by neutrophils

Altogether, the earlier results suggest that the association of either LukS-PV or HlgC to C5aR fails to achieve intracellular Ca²⁺ release, while the consecutive association of the F-subunit to the S-subunit-C5aR complex initiates the release of Ca²⁺ from diverse internal compartments. To achieve this, the internalization of the bound C5aR could provide the leukotoxins with the ability of triggering Ca²⁺ release from internal stores. To verify the hypothesis, specific antibodies raised against each S-subunit were used to observe the leukotoxin location in human neutrophils following various treatments. After incubation with leukotoxins, cells were fixed and fluorescently stained with the appropriate antibodies, together with the B-subunit of cholera toxin (Alexa-488 labelled) to tag the

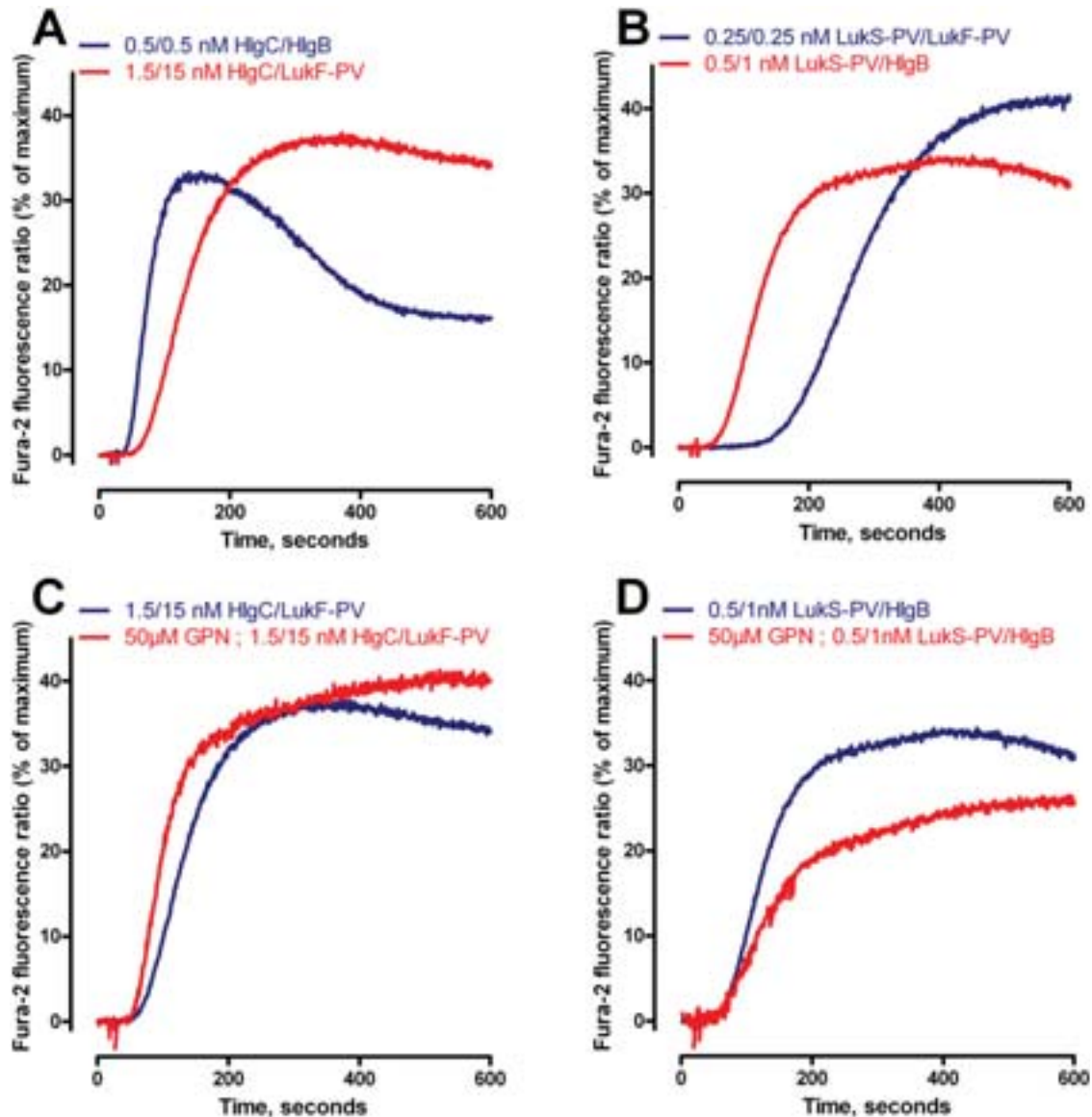


Fig. 4. The leukotoxin F-subunits HlgB and LukF-PV bear the specificity for the compartment releasing Ca^{2+} : HlgB from acidic stores and LukF-PV from neutral stores.
 A. HlgC/HlgB (0.5/0.5 nM, blue trace) and HlgC/LukF-PV (1.5/15 nM, red trace).
 B. LukS-PV/LukF-PV (0.25/0.25 nM, blue trace) and LukS-PV/HlgB (0.5/1 nM, red trace).
 C. Control recording of 1.5/15 nM HlgC/LukF-PV (blue trace) and GPN-treated cells prior to the addition of HlgC/LukF-PV (red trace).
 D. Control recording of 0.5/1 nM LukS-PV/HlgB subunits (blue trace) and GPN-treated cells prior to the addition of LukS-PV/HlgB (red trace).
 Results are normalized to the maximum fura-2 fluorescent signal obtained after bathing the cells in 0.05% Triton X-100 to equilibrate $[\text{Ca}^{2+}]_i$ with that of buffer concentration. The use of these concentrations highlights the similarity between the responses of HlgC/LukF-PV and the LukS-PV/LukF-PV and those between HlgC/HlgB and LukS-PV/HlgB.

plasma membrane. A Leica SP5-II confocal microscope was used to acquire single optical slices of random areas from different preparations. The proportion of cells showing an intense labelling of the membrane was determined for S-subunits alone (Fig. 6A1a: 2 nM LukS-PV and Fig. 6B1a: 2 nM HlgC). After addition of the corresponding F-subunit (Fig. 6A2a: 2 nM PVL and Fig. 6B2a: 2 nM HlgC/HlgB), the leukotoxin-associated fluorescence

migrated from the membrane towards the cytosol. When the cells were incubated in a Ca^{2+} -free buffer, the addition of the F-subunit did not induce the migration of the leukotoxin-associated fluorescence (Fig. 6A3a: 2 nM PVL and Fig. 6B3a: 2 nM HlgC/HlgB). The cell plasma membrane labelling dropped from $74\% \pm 1\%$ of positive cells with LukS-PV to $52\% \pm 2\%$ 5 min after the addition of LukF-PV and to $31\% \pm 3\%$ when cells were incubated for

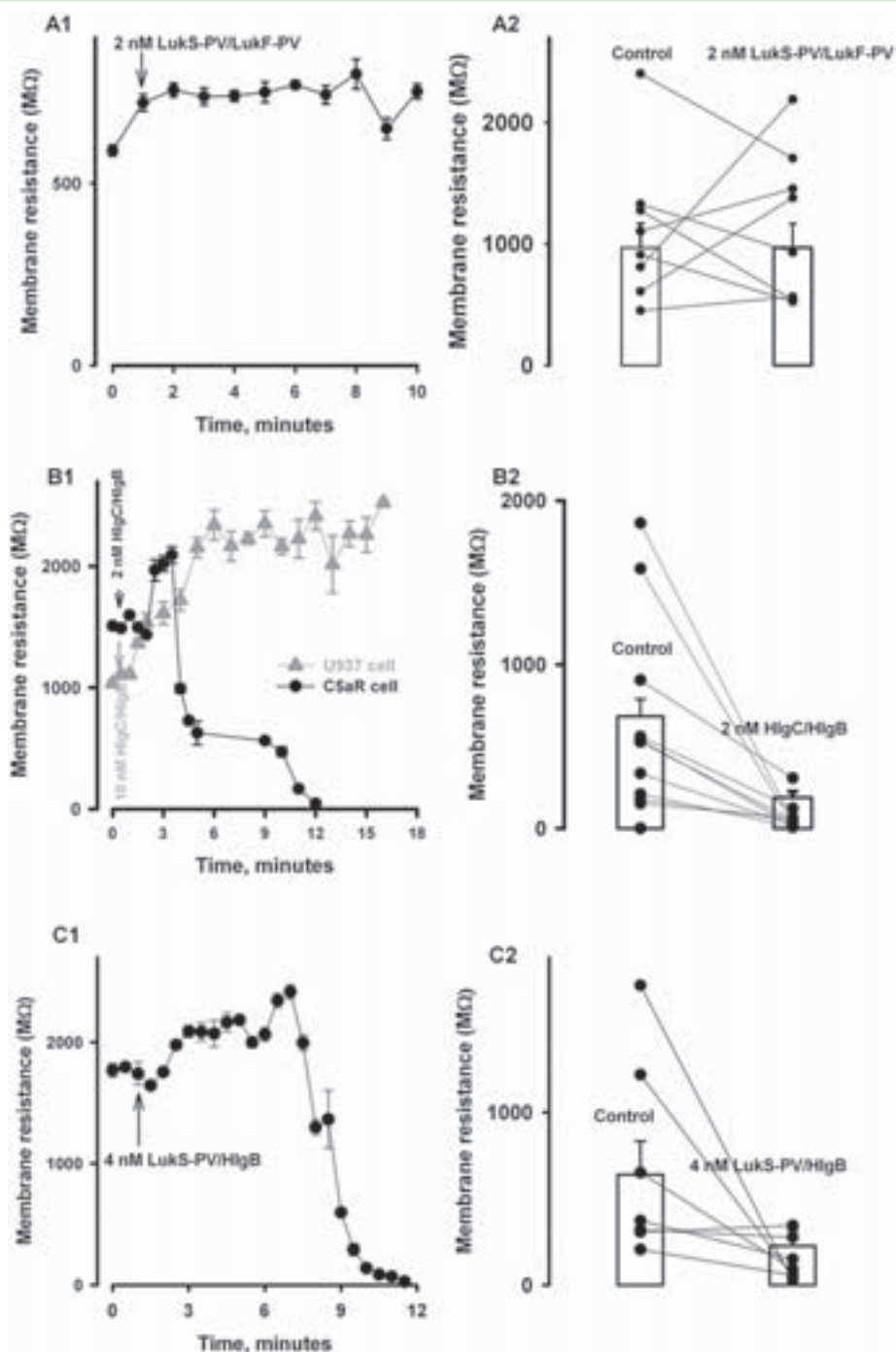
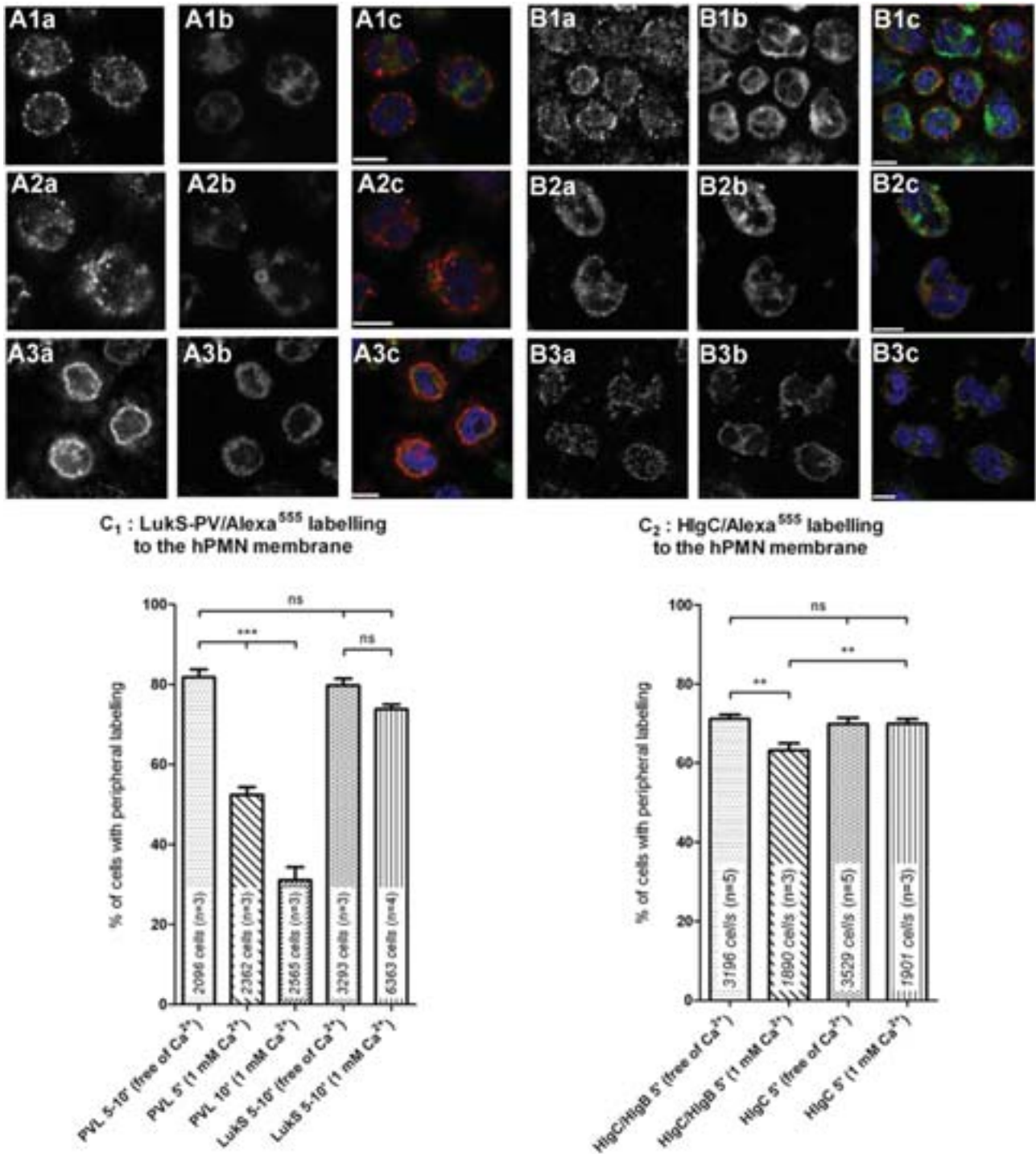


Fig. 5. The HlgB subunit confers the ability to alter the membrane resistance of U937-C5aR-transfected cells.

A. The membrane resistance of C5aR-transfected cells recorded in the presence of 2 nM PVL remained constant over a 10 min incubation period. A1 shows the R_m recording of a representative cell. The histogram in A2 assembles the R_m values of eight independently recorded cells prior to and 10 min after the addition of 2 nM PVL.

B. The R_m of C5aR-transfected cells dropped dramatically in the presence of 2 nM HlgC/HlgB, whereas it remained elevated in non-transfected U937 cells. B1 shows the membrane resistance recording of a C5aR cell incubated in the presence of 2 nM HlgC/HlgB (black) compared with a representative recording of a non-transfected U937 cell (grey triangles) recorded in the presence of 10 nM HlgC/HlgB. B2 summarizes membrane resistance values for 10 independent experiments prior to and after the addition of 2 nM HlgC/HlgB (10 min).

C. C5aR-transfected cells were challenged by a 4 nM solution of LukS-PV/HlgB combination. Membrane resistance dropped in 50% of the cells after an 8 min incubation with the latter combination while in the remaining half, membrane resistance remained unchanged for more than 10 min. C1 shows the R_m recording a C5aR cell incubated in the presence of the LukS-PV/HlgB combination and C2 the R_m values prior to addition of LukS-PV/HlgB and after a 10 min incubation in seven independent experiments. High concentrations of leukotoxins, relative to their affinity for the C5aR, were chosen in order to favour pore formation.



10 min in the presence of PVL (Fig. 6C1). The labelling of cells incubated in the presence of HlgC/HlgB subunits followed a similar distribution pattern (Fig. 6C2).

Discussion

Through this work we confirm that the haemolysin HlgC/HlgB and the leukocidin PVL both bind the C5aR (Tables

S1 and 2, complementary information), which is in agreement with the work of other groups (Spaan *et al.*, 2013; 2014). Moreover, we describe the intracellular Ca²⁺ homeostasis alteration that follows the leukotoxins binding to C5aR. The identification of the leukotoxins cell membrane receptor helps to understand the intriguing conflict between experimental conditions needed to optimize [Ca²⁺]_i records and to determine pore formation.

Fig. 6. F-subunit association to the S-subunit bound to C5aR facilitates the internalization of the resulting complex. After a 10 min incubation of human neutrophils in the presence of 2 nM of isolated S-subunits, labelling with toxin-specific antibodies against LukS-PV (A1a) and HlgC (B1a), and an Alexa-555 secondary antibody, was associated with the plasma membrane as highlighted by Alexa-488-CtxB (A1b and B1b respectively). Panels A1c and B1c show the merge of three fluorescent labels (blue is for the Hoechst 3228 labelling of nuclei). The addition of the F-subunit for 2–5 min induced an attenuation of membrane labelling likely due to the internalization of the complex.

A2a–c. Representative example of cells labelled after 5 min of incubation in a 2 nM solution of PVL (2a: Alexa-555 secondary antibody, 2b: Alexa-488-CtxB, 2c: merge as in A1c).

A3a–c. Cells labeled after 10 min of incubation in a 2 nM PVL solution in Ca²⁺-free buffer (3a: Alexa-555 secondary antibody, 3b: Alexa-488-CtxB, 3c: merge as in A1c).

B2a–c. Representative example of cells labelled after 5 min of incubation in 2 nM HlgC/HlgB (2a: Alexa-555 secondary antibody, 2b: Alexa-488-CtxB, 2c: merge as in B1c).

B3. Cells labeled after 10 min of incubation in a 2 nM HlgC/HlgB solution in Ca²⁺-free buffer (3a: Alexa-555 secondary antibody, 3b: Alexa-488-CtxB, 3c: merge as in B1c). Scale bar in merge panels: 5 μm (A1c, 2c, 3c and B1c, 2c, 3c). The labelled neutrophils presented in panels A and B are representative of the aspect of counted cells included in the histograms presented in C1 and C2, which summarize the percentage of human neutrophils exhibiting fluorescent staining with the specific antibodies associated with the plasma membrane under various incubation conditions indicated at the bottom of each column. Inside the columns the total number of cells considered for the statistics is indicated, into brackets is the number of independent experiments. A standard experiment comprises three sets of cells for each condition. Manual counts, made by two independent persons, were from at least three fields of 0.2 μm optical slices acquired with a LSP5-II confocal microscope. Statistical significance was evaluated by one-way analysis of variance followed by Tukey's multiple group comparisons.

****P* < 0.001; ***P* < 0.01; ns, *P* > 0.05.

The free intracellular Ca²⁺ mobilization by either PVL or HlgC/HlgB in human neutrophils is strongly reduced if cells are incubated in a Ca²⁺-deficient buffer (complementary Fig. S1A and B). Meanwhile, to determine pore formation, through the use of ethidium bromide or propidium iodide, the test is to be carried out in a Ca²⁺-free buffer in order to observe a significant increase of intracellular fluorescence (complementary Fig. S1C and D) (Finck-Barbançon *et al.*, 1993; Colin *et al.*, 1994; Meunier *et al.*, 1995; Spaan *et al.*, 2013). Therefore, and given that human neutrophils are activated by sublytic concentrations of PVL (Graves *et al.*, 2012; Yoong and Pier, 2012), we studied the intracellular Ca²⁺ rise induced by the leukotoxins (Fig. 1A and B) and their binding to C5aR (Fig. 1C and D), working always in the same 1 mM Ca²⁺-containing buffer. Furthermore, because the half-concentration effect of each toxin is the same in either test, the subsequent working concentrations in human neutrophils were of 0.25 nM for PVL and 0.5 nM for HlgC/HlgB (Fig. 1E).

The S-subunits alone (LukS-PV and HlgC) recognize and compete with each other for C5aR in human neutrophils and in stably transfected U937-C5aR cells but, even at very high concentration, they never alter the [Ca²⁺]_i homeostasis (Fig. 1E and F). The presence of the C5a peptide (1.2 nM) reduces the S-subunits binding without altering their affinity for the receptor. Besides, the non-peptide antagonist W-54011 (Klos *et al.*, 2013) decreases the binding of LukS-PV, while leaving unaltered that of HlgC (complementary Table S2), suggesting differences in their molecular relationship with the receptor. Thus, the two leukotoxin S-subunits expand the number of natural proteins known to bind C5aR while acting differently. C5a and the human ribosomal protein homodimer S19 (hRP S19) act as chemoattractants and secretagogues (Nishiura *et al.*, 2010). The 17 kDa Skp

chaperone protein of Gram-negative bacteria works as a pure chemoattractant factor (Shrestha *et al.*, 2004; Jia *et al.*, 2010), and the chemotaxis inhibitory protein of *S. aureus* is a potent antagonist (de Haas *et al.*, 2004; Postma *et al.*, 2005). Although the leukotoxin S-subunits alone never elicit an intracellular Ca²⁺ response, it is important to note a previously reported observation on LukS-PV, which was able to prime human neutrophils for the intracellular production of H₂O₂ stimulated by N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) or phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), an effect that was reversed by LukF-PV in a concentration-dependent manner (fig. 8 in Colin and Monteil, 2003). Adding the F-subunit to the bound S-subunit is a prerequisite to elicit [Ca²⁺]_i mobilization. However, as shown in Fig. 2, the effect induced by PVL upon binding C5aR is different from the effect elicited by HlgC/HlgB, and the presence of the antagonist W-54011 reduces the activity of PVL while it potentiates that of HlgC/HlgB. This is in good agreement with the pharmacological dissection analysis we carried out on the effects of both leukotoxins, which shows that they trigger Ca²⁺ release from distinct internal stores (Fig. 3). Although the expression of C5aR is a necessary condition for a cell to be recognized by PVL or HlgC/HlgB, the significance of same receptor driving dissimilar toxin-activated cell responses remains an open question. The potential for C5aR to adopt at least two active conformations has been previously suggested (Jia *et al.*, 2010), and the active form of the bound C5aR is probably determined by the identity of the leukotoxin S-subunit as their binding and their activity diverge in the presence of W-54011 (complementary information Table S2 and Fig. S2). However, the final outcome of the S- and F-subunits association to the C5aR is specified by the identity of the F-subunit, given that each one drives the leukotoxin dimer to release Ca²⁺ from diverse intracellu-

lar compartments. Acidic stores are targeted by HlgB associated either to HlgC or to LukS-PV, while LukF-PV compels the complex to trigger Ca^{2+} release from reticular stores (Fig. 4). This is in keeping with the immunolabelling work, which shows that the S-subunits bound to the receptor remain associated to the plasma membrane, while the addition of the F-subunit drives the fluorescence of the S-subunit into the cell in a Ca^{2+} -dependent manner (Fig. 6). Then, even a sublytic concentration of PVL will be active in an intracellular environment, given that this toxin neither modifies the cell membrane resistance nor forms pores in artificial lipid membranes contrary to HlgC/HlgB (Fig. 5 and complementary Fig. S2) (Ferrerias *et al.*, 1998; Menestrina *et al.*, 2003; Alonzo and Torres, 2014). The association of HlgB to LukS-PV alters the membrane resistance (Fig. 5C), which suggests that HlgB, but not LukF-PV, is endowed of particular properties to interact with lipids. Interestingly, HlgB and the α -toxin are closely related in their structure, both contain a rim domain with a preponderance of exposed aromatic residues and a binding site for phospholipid head groups, which enables their fusion to lipids (Olson *et al.*, 1999). The α -toxin needs the presence of ADAM10 to initiate self-assembly and to engage cell membrane damage (Wilke and Bubeck-Wardenburg, 2010; Inoshima *et al.*, 2011); likewise, HlgB requires HlgC bound to C5aR to begin altering membrane integrity. However, a plasma membrane effect alone will never explain the block of the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rise by bafilomycin A or GPN, which specifically target acidic intracellular compartments (Galione *et al.*, 2010). Moreover, the rates of change in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and ethidium bromide fluorescence due to PVL or HlgC/HlgB (complementary Fig. S1) argue in favour of the intracellular outcome rather than a plasma membrane process. In living cells, the alteration of the plasma membrane is fully observed only if the buffer is devoid of Ca^{2+} . But, in the presence of a physiological Ca^{2+} concentration, membrane damage starts long after the release of intracellular Ca^{2+} is active. Under this scheme a rapid endocytosis aimed at cell membrane repair does not fit properly as the low leukotoxin concentration starts the activation of neutrophils long before membrane damage. Internalization will ultimately transfer the leukotoxins activity, or membrane-damaging ability, to an internal cell compartment. Nevertheless, competition may exist between receptor-dependent internalization and plasma membrane alteration, particularly when HlgB is part of the active leukotoxin. In artificial lipid membranes, where the pore formation is the only possible outcome for leukotoxin activity, LukS-PV/LukF-PV and HlgC/LukF-PV never produced transmembrane current or vesicle permeabilization contrary to LukS-PV/HlgB (complementary Fig. S2). The recording of membrane resistance in living cells produced similar results prob-

ably due to an inhibitory effect on internalization caused by the presence of 135 mM CsSO_4 in the buffer filling the pipette electrode. Then, in experiments carried out in physiological conditions, the competition between the two mechanisms can be driven in favour of leukotoxin internalization, which is the mechanism supporting the intracellular Ca^{2+} release. Experimental conditions as extracellular Ca^{2+} -free buffer or non-physiological intracellular salts (CsSO_4) probably reinforce the membrane-damaging mechanisms. The discovery of specific cellular receptors binding staphylococcal leukotoxins calls for careful pharmacological studies at low toxin concentration to reach a better understanding of their cellular effects. To focus the attention on plasma membrane damage, which often requires the use of high concentrations of leukotoxins and pharmacological drugs (Yanai *et al.*, 2014), may lead to a wrong interpretation about the cellular and molecular mechanisms involved. The understanding of the cellular effects triggered by low concentration of leukotoxins appears of critical importance given that, out of focal infection areas, low doses of leukotoxin are more likely to support virulence in *S. aureus* diseases. For the leukotoxins that bind C5aR, the study of their effects must be extended to cells and tissues expressing the receptor, such as cells of the endothelial tissue (Jacob *et al.*, 2010; Mueller *et al.*, 2013) or neurons in the brain (Rothermel *et al.*, 2000; Bénard *et al.*, 2004; Jover *et al.*, 2013).

Experimental procedures

Ethics statement

Buffy coat donors were adult volunteers that provided informed consent. Written consent was collected by the 'Établissement Français du Sang (Strasbourg, France)', which kept the information confidential.

Drugs and chemicals

Thapsigargin, ionomycin, bafilomycin A1, glycyl-L-phenylalanine 2-naphthylamide (GPN) and Triton X-100 were purchased from Sigma-Aldrich. YM-59483 and trans-Ned-19 were from Tocris Bioscience. W-54011 and SB-290157 were from Calbiochem while fura-2 acetoxymethyl ester (fura-2/AM) was from Molecular Probes® Life Technologies (Fisher Scientific).

Human polymorphonuclear cell (hPMN) preparation

PMNs were prepared from buffy coats purchased at Établissement Français du Sang obtained from healthy donors of either sex within 24 h after blood donation, following the previously described procedure (Finck-Barbançon *et al.*, 1993; Meyer *et al.*, 2009).

Undifferentiated U937 and U937-C5aR cell cultures

Cell lines, which respectively do not express or stably express the C5aR receptor (Kew *et al.*, 1997), were a generous gift from

Professor J.A. van Strijp (Utrecht University). Cells were cultured in 250 ml flasks at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere in Roswell Park Memorial Institute RPMI-1640 medium (50 ml per flask) supplemented with 10% (v/v) heat-decomplemented foetal calf serum PAN Biotech™ and 0.1% (w/v) of both penicillin and streptomycin PAN Biotech™ (Dominique Dutscher).

Leukotoxin purification

The *S. aureus* HlgC/HlgB and the PVL were purified as previously described (Werner *et al.*, 2002). Leukotoxin mutations and purification were described earlier (Gauduchon *et al.*, 2001). Briefly, proteins were purified by affinity chromatography on glutathione-sepharose 4B followed by cation exchange fast-performance liquid chromatography after removal of the GST tag with Precision Protease (GE Healthcare). They were controlled for homogeneity by radial gel immunoprecipitation and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis before being stored at -80°C.

Leukotoxin labelling

The mutated proteins HlgB S27C, LukS-PV G10C and LukF-PV-Cys were fluorescein labelled to obtain HlgB*, LukS-PV* and LukF-PV*: 500 µL of 50 µM HlgB S27C, LukS-PV G10C or LukF-PV-Cys were mixed with a 20-fold excess of fluorescein 5-maleimide Molecular Probes® Life Technologies (Fisher Scientific) and were incubated for 1 h 30 min in darkness at room temperature in a total volume of 500 µl in 0.1 M 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid (Hepes), 0.2 M NaCl and 1 mM 2,2',2'',2'''-(Ethane-1,2-diylidinitrilo)tetraacetic acid (EDTA) (pH 7.8). The mixtures were then desalted and the coupling yield for HlgB*, LukS-PV* or LukF-PV* determined through the ratio of fluorescein ($\epsilon_{492 \text{ nm}} = 80\,000 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$) concentration to protein concentration obtained from Bradford titration (Bio-Rad). Only leukotoxins with a coupling yield higher than 0.95 but less than 1 were used in this study.

Spectrofluorimetry

Variations in intracellular-free Ca²⁺ levels were determined by recording the fura-2 fluorescence contained in hPMNs as previously described (Finck-Barbançon *et al.*, 1993). Briefly, cells were loaded with 4 µM fura-2 AM in ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA) buffer for 45 min in darkness at room temperature. Thereafter, hPMNs were washed twice and then suspended (3.5×10^6 cells per millilitres) in EGTA buffer. Two millilitres of hPMNs was incubated for 5 min with 1.1 mM CaCl₂ in a 4 ml polystyrene cuvette (1 cm light path). Variations in fluorescence intensity were recorded at 37°C with a dual-excitation spectrofluorometer (Deltascan; PTI) operated in a ratio mode for fura-2 at excitation wavelengths of 340 and 380 nm (slit widths, 4 nm) and an emission wavelength of 510 nm (slit widths, 4 nm). To compare the effects of different toxins in various conditions, the fluorescent signal was standardized by giving the background, or zero value, before the addition of the toxin. The 100% value to the fluorescence is measured after the addition of Triton X-100 (0.05%, final concentration) which equilibrates the internal Ca²⁺ concentration with that of

buffer content. Results are expressed as percentage of the maximum after subtraction of the background value.

Electrophysiological recording of passive plasma membrane resistance in U937-C5aR cells

For single-cell electrophysiological recordings, a suspension of 10⁴ cells (30 µl) was transferred to poly-lysine coated culture dishes; after 5 min, 2 ml of HBSS was added to the cells and the dish moved to the fixed stage of a Nikon upright microscope. Five-5 MΩ micro-electrodes were pulled from borosilicate glass capillaries (Clark Electromedical Instruments) and filled with a solution containing 135 mM CsMeSO₄, 1 mM MgCl₂, 5 mM NaCl, 10 mM HEPES/CsOH, 4 mM Mg-ATP and 0.4 mM Na₂-GTP, pH = 7.3 adjusted with CsOH. For the electrode approach, cells were observed through a 40× objective, Differential interference contrast mode. Whole-cell membrane currents were recorded at room temperature (22–24°C) using the patch clamp technique (Axopatch 200A amplifier; Axon Instruments). Cell transmembrane potential was held at -60 mV, while passive transmembrane resistance (R_m) was determined from membrane current changes (ΔI) induced by a series of hyperpolarizing and depolarizing square pulses (ΔV , 200 ms duration, with stepwise 5 mV increments) under voltage clamp. This protocol was repeated once every minute throughout the duration of the experiment. The recorded signals were digitized at 20 kHz using a Digidata 1320 (Axon Instruments) and stored on a PC hard drive. Offline analyses were performed using pClamp-8 (Axon Instruments) software, which was previously filtered at 1.5 KHz. For each set of data (i.e. one protocol), R_m was determined by averaging the $\Delta V/\Delta I$ values.

Flow cytometry determinations

Flow cytometry data were obtained using a FACSort cytometer (Becton Dickinson) equipped with a 15 mW argon laser tuned to 488 nm. hPMNs were classically distinguished by forward and side light scatter. Binding of toxins on hPMNs was determined by measuring fluorescein fluorescence of labelled toxins. Fluorescence intensities were recorded in the FL1 channel (emission wavelength, 530 nm). The FACSort cytometer was adjusted in such a way that calibrated fluorescent microbeads (Immuno-Brite; Coulter Corporation) displayed the same fluorescence intensity for each experiment. Resulting mean fluorescein fluorescence intensity was expressed in standardized fluorescence units.

Immunocytochemistry

The subcellular localization of leukotoxins in hPMNs was detected using rabbit polyclonal antibodies independently raised against the HlgC, HlgB, LukS-PV and LukF-PV subunits (Finck-Barbançon *et al.*, 1991; Meyer *et al.*, 2009). Cells, attached to poly-lysine treated coverslips, were incubated at room temperature for 5 or 10 min in the presence of S-subunits alone or the complete leukotoxin and, after washing, were fixed in 4% (v/v) paraformaldehyde and 4% (w/v) sucrose in phosphate-buffered saline (PBS) for 5 min at room temperature. Cells were then incubated for 30 min in 150 mM glycine in PBS (for reducing tissue autofluorescence), permeabilized for 5 min in chloroform

at -20°C and washed in ethanol before rehydration in PBS. Fixed cells were incubated overnight in blocking buffer (10% FCS, 5 mg ml⁻¹ BSA in PBS) then transferred for 60 min in a 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ PBS solution of specific primary antibodies, containing 5% FCS and 1 mg ml⁻¹ BSA. After repeated washings, cells were incubated with Alexa-labelled secondary antibodies Molecular Probes® Life Technologies (Fisher Scientific) for 60 min, then washed and incubated for 30 min in the presence of a 0.3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ solution of Alexa-488-labelled cholera toxin B-subunit Molecular Probes® Life Technologies (Fisher Scientific) and 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Hoechst 32258 Sigma-Aldrich for labelling of the plasma membrane and cell nuclei respectively. Coverslips mounted in Mowiol were stored at 4°C until observation. Confocal images were produced at the In vitro Imaging Facility of the Neuropôle/Centre de Neurochimie de Strasbourg using a Leica SP5II inverted confocal microscope (63× objective). Fields of 1024 × 1024 pixels were acquired using a 405 nm diode (ultraviolet), a 488 nm argon laser (green) and a 561 nm diode-pumped solid-state laser (red).

Statistical analysis

Results are expressed as mean ± standard error of the mean of at least three independent experiments. GraphPad Prism (version 5 for Windows) was used for preparation of graphs and statistical analysis. Statistical significant difference between differently immunolabelled groups was evaluated by one-way analysis of variance followed by Tukey's multiple group comparisons. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

Acknowledgements

The authors are particularly grateful to Daniel Keller for constant support, recollection of unpublished results in frequent scientific discussions and the skilful preparation of leukotoxins. The authors thank the Institut Fédératif des Neurosciences IFR37/Strasbourg and the Imaging facilities of the IFR37. Thanks also to the team of C. Moog (Mécanisme de neutralisation du VIH par les anticorps, UMR-1110) for sharing human neutrophils from buffy coats. The authors also thank Professor J.A. van Strijp (Utrecht University, The Netherlands) for generous gift of U937-C5aR-transfected cells. The authors are extremely grateful to Dr P. Pothier (Sherbrooke, Québec Canada) for English. The experimental work was supported by grants from EA-7290 and from UMR 3212. M.Y.T. and G.Z.-M. were supported by a doctoral fellowship from the Fondation Fouassier and Région Alsace and from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche respectively.

Conflict of interest

The funding agencies had no role in any of the study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript. None of the results obtained are part of a patent or commercial product. E.J., J.-L.B. and B.P. are permanent staff of the CNRS (governmental) and G.P. and T.B. are permanent faculty members of the Université de Strasbourg. C.P. and M.D.S. are permanent staff of the CNR (governmental). None of the authors has a conflict of interest to declare.

References

- Alonzo, F., and Torres, V.J. (2014) The bicomponent pore-forming leucocidins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Mol Biol Rev* **78**: 199–230.
- Alonzo, F., III, Kozhaya, L., Rawlings, S.A., Reyes-Robles, T., DuMont, A.L., Myszka, D.G., et al. (2013) CCR5 is a receptor for *Staphylococcus aureus* leukotoxin ED. *Nature* **493**: 51–55.
- Ames, R.S., Lee, D., Foley, J.J., Jurewicz, A.J., Tornetta, M.A., Bautsch, W., et al. (2001) Identification of a selective nonpeptide antagonist of the anaphylatoxin C3a receptor that demonstrates antiinflammatory activity in animal models. *J Immunol* **166**: 6341–6348.
- Archer, G.L. (1998) *Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen. *Clin Infect Dis* **26**: 1179–1181.
- Baba Moussa, L., Werner, S., Colin, D.A., Mourey, L., Pédelacq, J.D., Samama, J.P., et al. (1999) Decoupling the Ca²⁺-activation from the pore-forming function of the bi-component Pantone-Valentine leucocidin in human PMNs. *FEBS Lett* **461**: 280–286.
- Bénard, M., Gonzalez, B.J., Schouft, M.-T., Falluel-Morel, A., Vaudry, D., Chan, P., et al. (2004) Characterization of C3a and C5a receptors in rat cerebellar granule neurons during maturation: neuroprotective effect of C5a against apoptotic cell death. *J Biol Chem* **279**: 43487–43496.
- Colin, D.A., and Monteil, H. (2003) Control of the oxidative burst of human neutrophils by staphylococcal leukotoxins. *Infect Immun* **71**: 3724–3729.
- Colin, D.A., Mazurier, I., Sire, S., and Finck-Barbançon, V. (1994) Interaction of the two components of leukocidin from *Staphylococcus aureus* with human polymorphonuclear leukocyte membranes: sequential binding and subsequent activation. *Infect Immun* **62**: 3184–3188.
- Comai, M., Serra, M.D., Coraiola, M., Werner, S., Colin, D.A., Monteil, H., et al. (2002) Protein engineering modulates the transport properties and ion selectivity of the pores formed by staphylococcal γ -haemolysins in lipid membranes. *Mol Microbiol* **44**: 1251–1267.
- Coupié, P., and Prévost, G. (1997) Les Leucotoxines Staphylococciques. *Ann Dermatol Venerol* **124**: 740–748.
- Dalla Serra, M., and Menestrina, G. (2000) Characterization of molecular properties of pore-forming toxins with planar lipid bilayers. In *Bacterial Toxins: Methods and Protocols*. New York: Humana Press, pp. 171–188.
- Dalla Serra, M., Coraiola, M., Viero, G., Comai, M., Potrich, C., Ferreras, M., et al. (2005) *Staphylococcus aureus* bicomponent γ -Hemolysins, HlgA, HlgB, and HlgC, can form mixed pores containing all components. *J Chem Inf Model* **45**: 1539–1545.
- Fasolato, C., Zottini, M., Clementi, E., Zacchetti, D., Meldolesi, J., and Pozzan, T. (1991) Intracellular Ca²⁺ pools in PC12 cells. Three intracellular pools are distinguished by their turnover and mechanisms of Ca²⁺ accumulation, storage, and release. *J Biol Chem* **266**: 20159–20167.
- Ferreras, M., Höper, F., Dalla Serra, M., Colin, D.A., Prévost, G., and Menestrina, G. (1998) The interaction of *Staphylococcus aureus* bi-component γ -hemolysins and leucocidins with cells and lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* **1414**: 108–126.

- Finck-Barbançon, V., Prévost, G., and Piémont, Y. (1991) Improved purification of leukocidin from *Staphylococcus aureus* and toxin distribution among hospital strains. *Res Microbiol* **142**: 75–85.
- Finck-Barbançon, V., Duportail, G., Meunier, O., and Colin, D.A. (1993) Pore formation by a two-component leukocidin from *Staphylococcus aureus* within the membrane of human polymorphonuclear leukocytes. *Biochim Biophys Acta* **1182**: 275–282.
- Foster, T.J., Geoghegan, J.A., Ganesh, V.K., and Hook, M. (2014) Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Microbiol* **12**: 49–62.
- Galione, A., Morgan, A.J., Arredouani, A., Davis, L.C., Rietdorf, K., Ruas, M., and Parrington, J. (2010) NAADP as an intracellular messenger regulating lysosomal calcium-release channels. *Biochem Soc Trans* **38**: 1424–1431.
- Gauduchon, V., Werner, S., Prévost, G., Monteil, H., and Colin, D.A. (2001) Flow cytometric determination of Panton-Valentine leucocidin S component binding. *Infect Immun* **69**: 2390–2395.
- Goldsmith, Z.G., and Dhanasekaran, D.N. (2007) G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene* **26**: 3122–3142.
- Graves, S.F., Kobayashi, S.D., Braughton, K.R., Whitney, A.R., Sturdevant, D.E., Rasmussen, D.L., et al. (2012) Sublytic concentrations of *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin alter human PMN gene expression and enhance bactericidal capacity. *J Leukoc Biol* **92**: 361–374.
- de Haas, C.J.C., Veldkamp, K.E., Peschel, A., Weerkamp, F., Van Wamel, W.J.B., Heezius, E.C.J.M., et al. (2004) Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial antiinflammatory agent. *J Exp Med* **199**: 687–695.
- Inoshima, I., Inoshima, N., Wilke, G.A., Powers, M.E., Frank, K.M., Wang, Y., and Bubeck-Wardenburg, J. (2011) A *Staphylococcus aureus* pore-forming toxin subverts the activity of ADAM10 to cause lethal infection in mice. *Nat Med* **17**: 1310–1314.
- Ishikawa, J., Ohga, K., Yoshino, T., Takezawa, R., Ichikawa, A., Kubota, H., and Yamada, T. (2003) A pyrazole derivative, YM-58483, potently inhibits store-operated sustained Ca²⁺ influx and IL-2 production in T lymphocytes. *J Immunol* **170**: 4441–4449.
- Jacob, A., Hack, B., Chiang, E., Garcia, J.G.N., Quigg, R.J., and Alexander, J.J. (2010) C5a alters blood-brain barrier integrity in experimental lupus. *FASEB J* **24**: 1682–1688.
- Jia, N., Semba, U., Nishiura, H., Kuniyasu, A., Nsiama, T.K., Nishino, N., and Yamamoto, T. (2010) Pivotal advance: interconversion between pure chemotactic ligands and chemoattractant/secretagogue ligands of neutrophil C5a receptor by a single amino acid substitution. *J Leukoc Biol* **87**: 965–975.
- Joubert, O., Viero, G., Keller, D., Martinez, E., Colin, D.A., Monteil, H., et al. (2006) Engineered covalent leucotoxin heterodimers form functional pores: insights into S-F interactions. *Biochem J* **396**: 381–389.
- Jover, E., Tawk, M.Y., Laventie, B.J., Poulain, B., and Prévost, G. (2013) Staphylococcal leukotoxins trigger free intracellular Ca²⁺ rise in neurons, signaling through acidic stores and activation of store-operated channels. *Cell Microbiol* **15**: 742–758.
- Kew, R.R., Peng, T., DiMartino, S.J., Madhavan, D., Weinman, S.J., Cheng, D., and Prossnitz, E.R. (1997) Undifferentiated U937 cells transfected with chemoattractant receptors: a model system to investigate chemotactic mechanisms and receptor structure/function relationships. *J Leukoc Biol* **61**: 329–337.
- Klos, A., Wende, E., Wareham, K.J., and Monk, P.N. (2013) International union of basic and clinical pharmacology. LXXXVII. Complement peptide C5a, C4a, and C3a receptors. *Pharmacol Rev* **65**: 500–543.
- Lappin, E., and Ferguson, A.J. (2009) Gram-positive toxic shock syndromes. *Lancet Infect Dis* **9**: 281–290.
- Laude, A.J., and Simpson, A.W.M. (2009) Compartmentalized signalling: Ca²⁺ compartments, microdomains and the many facets of Ca²⁺ signalling. *FEBS J* **276**: 1800–1816.
- Laventie, B.J., Potrich, C., Atmanene, C., Saleh, M., Joubert, O., Viero, G., et al. (2013) p-Sulfonato-calix[n]arenes inhibit staphylococcal bicomponent leukotoxins by supramolecular interactions. *Biochem J* **450**: 559–571.
- Lonchamp, E., Dupont, J.-L., Wioland, L., Courjaret, R.L., Mbebi-Liegeois, C., Jover, E., et al. (2010) *Clostridium perfringens* epsilon toxin targets granule cells in the mouse cerebellum and stimulates glutamate release. *PLoS ONE* **5**: e13046.
- Lowy, F.D. (1998) *Staphylococcus aureus* infections. *New Engl J Med* **339**: 520–532.
- McCormick, J.K., Yarwood, J.M., and Schlievert, P.M. (2001) Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annu Rev Microbiol* **55**: 77–104.
- Mathieu, M.-C., Sawyer, N., Greig, G.M., Hamel, M., Kargman, S., Ducharme, Y., et al. (2005) The C3a receptor antagonist SB 290157 has agonist activity. *Immunol Lett* **100**: 139–145.
- Menestrina, G. (1986) Ionic channels formed by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin: voltage-dependent inhibition by divalent and trivalent cations. *J Membr Biol* **90**: 177–190.
- Menestrina, G., Dalla Serra, M., Comai, M., Coraiola, M., Viero, G., Werner, S., et al. (2003) Ion channels and bacterial infection: the case of β -barrel pore-forming protein toxins of *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett* **552**: 54–60.
- Meunier, O., Falkenrodt, A., Monteil, H., and Colin, D.A. (1995) Application of flow cytometry in toxinology: pathophysiology of human polymorphonuclear leukocytes damaged by a pore-forming toxin from *Staphylococcus aureus*. *Cytometry* **21**: 241–247.
- Meyer, F., Girardot, R., Piémont, Y., Prévost, G., and Colin, D.A. (2009) Analysis of the specificity of panton-valentine leucocidin and gamma-hemolysin F component binding. *Infect Immun* **77**: 266–273.
- Miles, G., Jayasinghe, L., and Bayley, H. (2006) Assembly of the bi-component leukocidin pore examined by truncation mutagenesis. *J Biol Chem* **281**: 2205–2214.
- Monk, P.N., Scola, A.M., Madala, P., and Fairlie, D.P. (2007) Function, structure and therapeutic potential of complement C5a receptors. *Br J Pharmacol* **152**: 429–448.
- Mueller, M., Herzog, C., Larmann, J., Schmitz, M., Hilfiker-Kleiner, D., Gessner, J.E., and Theilmeier, G. (2013) The receptor for activated complement factor 5 (C5aR) conveys myocardial ischemic damage by mediating neutrophil transmigration. *Immunobiology* **218**: 1131–1138.

- Nishiura, H., Chen, J., Ota, Y., Semba, U., Higuchi, H., Nakashima, T., and Yamamoto, T. (2010) Base of molecular mimicry between human ribosomal protein S19 dimer and human C5a anaphylatoxin. *Int Immunopharmacol* **10**: 1541–1547.
- Olson, R., Nariya, H., Yokota, K., Kamio, Y., and Gouaux, E. (1999) Crystal structure of staphylococcal LukF delineates conformational changes accompanying formation of a transmembrane channel. *Nat Struct Mol Biol* **6**: 134–140.
- Otto, M. (2014) *Staphylococcus aureus* toxins. *Curr Opin Microbiol* **17**: 32–37.
- Periasamy, M., and Kalyanasundaram, A. (2007) SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle Nerve* **35**: 430–442.
- Popov, L., Kovalski, J., Grandi, G., Bagnoli, F., and Amieva, M.R. (2014) Three-dimensional human skin models to understand *Staphylococcus aureus* skin colonization and infection. *Front Immunol* **5**: 41.
- Postma, B., Kleibeuker, W., Poppelier, M.J.J.G., Boonstra, M., Van Kessel, K.P.M., Van Strijp, J.A.G., and de Haas, C.J.C. (2005) Residues 10–18 within the C5a receptor N terminus compose a binding domain for chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* **280**: 2020–2027.
- Prévost, G., Mourey, L., Colin, D.A., and Menestrina, G. (2001) Staphylococcal pore forming toxins. *Curr Top Microbiol Immunol* **257**: 53–83.
- Proctor, L.M., Arumugam, T.V., Shiels, I., Reid, R.C., Fairlie, D.P., and Taylor, S.M. (2004) Comparative anti-inflammatory activities of antagonists to C3a and C5a receptors in a rat model of intestinal ischaemia/reperfusion injury. *Br J Pharmacol* **142**: 756–764.
- Reyes-Robles, T., Alonzo, F., III, Kozhaya, L., Lacy, D.B., Unutmaz, D., and Torres, V.J. (2013) *Staphylococcus aureus* leukotoxin ED targets the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 to kill leukocytes and promote infection. *Cell Host Microbe* **14**: 453–459.
- Rosen, D., Lewis, A.M., Mizote, A., Thomas, J.M., Aley, P.K., Vasudevan, S.R., et al. (2009) Analogues of the nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) antagonist ned-19 indicate two binding sites on the NAADP receptor. *J Biol Chem* **284**: 34930–34934.
- Rothermel, E., Götze, O., Zahn, S., and Schlaf, G. (2000) Analysis of the tissue distribution of the Rat C5a receptor and inhibition of C5a-mediated effects through the use of two moabs. *Scand J Immunol* **52**: 401–410.
- Shrestha, A., Shi, L., Tanase, S., Tsukamoto, M., Nishino, N., Tokita, K., and Yamamoto, T. (2004) Bacterial chaperone protein, skp, induces leukocyte chemotaxis via C5a receptor. *Am J Pathol* **164**: 763–772.
- Spaan, A.N., Henry, T., van Rooijen, W.J., Perret, M., Badiou, C., Aerts, P.C., et al. (2013) The staphylococcal toxin Panton-Valentine leukocidin targets human c5a receptors. *Cell Host Microbe* **13**: 584–594.
- Spaan, A.N., Vrieling, M., Wallet, P., Badiou, C., Reyes-Robles, T., Ohneck, E.A., et al. (2014) The staphylococcal toxins γ -haemolysin AB and CB differentially target phagocytes by employing specific chemokine receptors. *Nat Commun* **5**: 5438.
- Staal, L., Monteil, H., and Colin, D.A. (1998) The staphylococcal pore-forming leukotoxins open Ca^{2+} channels in the membrane of human polymorphonuclear neutrophils. *J Membrane Biol* **162**: 209–216.
- Sumichika, H., Sakata, K., Sato, N., Takeshita, S., Ishibuchi, S., Nakamura, M., et al. (2002) Identification of a potent and orally active non-peptide C5a receptor antagonist. *J Biol Chem* **277**: 49403–49407.
- Vandenesch, F., Lina, G., and Henry, T. (2012) *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? *Front Cell Infect Microbiol* **2**: 12.
- Werner, S., Colin, D.A., Coraiola, M., Menestrina, G., Monteil, H., and Prévost, G. (2002) Retrieving biological activity from LukF-PV mutants combined with different S components implies compatibility between the stem domains of these staphylococcal bicomponent leukotoxins. *Infect Immun* **70**: 1310–1318.
- Wilke, G.A., and Bubeck-Wardenburg, J. (2010) Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in *Staphylococcus aureus* α -hemolysin-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 13473–13478.
- Woodin, A.M. (1960) Purification of the two components of leukocidin from *Staphylococcus aureus*. *Biochem J* **75**: 158–165.
- Yanai, M., Rocha, M.A., Matolek, A.Z., Chintalacharuvu, A., Taira, Y., Chintalacharuvu, K., and Beenhouwer, D.O. (2014) Separately or combined, LukG/LukH is functionally unique compared to other staphylococcal bicomponent leukotoxins. *PLoS ONE* **9**: e89308.
- Yoong, P., and Pier, G.B. (2012) Immune-activating properties of Panton-Valentine leukocidin improve the outcome in a model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Infect Immun* **80**: 2894–2904.
- Yoong, P., and Torres, V.J. (2013) The effects of *Staphylococcus aureus* leukotoxins on the host: cell lysis and beyond. *Curr Opin Microbiol* **16**: 63–69.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

Fig. S1. Extracellular Ca^{2+} is required for leukotoxins to induce changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, but not to generate membrane damaging.

A,B. Recordings of LukS-PV/LukF-PV (A) or HlgC/HlgB-induced (B) rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in human neutrophils in 1 mM Ca^{2+} -containing buffer (blue traces) or in Ca^{2+} -free EGTA buffer (red traces). Both PVL and HlgC/HlgB can induce $[\text{Ca}^{2+}]_i$ changes after binding C5aR both in the presence of 1 mM Ca^{2+} or, less efficiently, in Ca^{2+} -free EGTA buffer.

C,D. Mean fluorescence intensity of human neutrophils staining by ethidium bromide diffusion due to LukS-PV/LukF-PV (C) or HlgC/HlgB (D) incubation. Blue traces illustrate record in 1 mM Ca^{2+} -containing buffer and the red traces in a Ca^{2+} -free EDTA buffer. Data were obtained using a FACSsort cytometer equipped with a 15 mW argon laser tuned to 488 nm. Ethidium bromide fluorescence was recorded at a 650 nm wavelength. Note the scale time differences with panels A seconds and C minutes and B seconds and D minutes. The time lag for ethidium bromide permeation into the cells stresses the inhibitory role

of extracellular Ca²⁺ for the membrane-disrupting ability of leukotoxins.

Fig. S2. The presence of HlgB is necessary for pore formation in lipid bilayers.

A. Time course of pore opening in diphytanoyl-phosphatidylcholine lipid bilayers challenged by the presence of 4 nM HlgC/HlgB (black trace) or LukS-PV/HlgB (gray trace) in the *cis*-side. Both leukotoxins were consistently able to form pores, although with a different time scale: during a longer recording period, the current measure for LukS-PV/HlgB was 10–20 times lower than that for the HlgC/HlgB combination. Buffer composition was 100 mM KCl, 20 mM HEPES, pH 7.0. Final concentration of the toxin was 4 nM for each component; applied voltage was +40 mV.

B. Histograms of a single-pore conductance (G) for HlgC/HlgB (black bars) and LukS-PV/HlgB (grey bars). The mean conductance was 175.6 ± 15.8 pS ($n = 280$ pores) and 184.8 ± 19.5 pS ($n = 16$ pores) for HlgC/HlgB and LukS-PV/HlgB, respectively, consistent with previously published values (Comai *et al.*, 2002; Dalla Serra *et al.*, 2005).

C. Threshold concentration required to establish a pore obtained by measuring calcein released from dioleoylphosphatidylcholine/cholesterol (1:1 molar ratio) vesicles pre-loaded with a 80 mM calcein solution (pH 7.0). The increasing concentrations of HlgC/HlgB (squares) gave a half-concentration effect of 0.5 nM and for LukS-PV/HlgB (circles) above 1.5 nM. PVL and HlgC/LukF-PV (triangles) failed to induce calcein release. P% (*y*-axis) is the permeabilizing activity as defined in Experimental procedures section. Technical methods were planar lipid bilayer experiments. Solvent-free planar lipid bilayers were prepared by the apposition on both sides of a 0.1 mm aperture made in a 25 μ m thick Teflon septum (pretreated with pentane:n-hexadecane 20:1) of two monolayers of diphytanoyl phosphatidylcholine (DPhPC, > 99% pure from Avanti polar lipids) spread from a 5 mg ml⁻¹ lipid solution in pentane as described previously (Dalla Serra and Menestrina, 2000). Bicomponent couples were added on one side only (called *cis*) to preformed bilayers; the voltage potential was applied on the *cis* side while the *trans* side was grounded. Macroscopic currents were recorded by a patch clamp amplifier (Axopatch 200; Axon Instruments). A PC equipped with a DigiData 1200 A/D converter (Axon Instruments)

was used for data acquisition. Current traces were filtered at 100 Hz and acquired at 500 Hz using the Axoscope 8 software (Axon Instruments). Measurements were performed at room temperature as described previously (Laventie *et al.*, 2013). Permeabilization

of lipid vesicles. Large unilamellar vesicles (LUV) comprised of a 1:1 molar ratio of dioleoyl phosphatidylcholine/cholesterol (DOPC/Ch) were prepared as previously described (Ferrerias *et al.*, 1998) by the extrusion method. A suspension of multilamellar liposomes prepared in the presence of 80 mM calcein (Sigma), pH 7.0, was extruded 31 times through polycarbonate membranes with 100 nm pores. Vesicle permeabilization was assayed in a fluorescence microplate reader (Fluostar Galaxy, BMG Germany) with excitation and emission filters at 480 and 540 nm respectively. The two components of the complex, always at the same concentration, were serially twofold diluted in 10 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl and 0.1 mM EDTA, pH 7.0 and dispensed into wells of a 96-well microplate, after which 100 μ l of calcein-loaded LUVs were added at a final lipid concentration of 5 μ M. The time course of calcein release was recorded for 45 min at room temperature and expressed as the increase in fluorescence owing to the dequenching of the released dye when diluted in the external medium. Toxin-induced permeabilizing activity was calculated as: $P(\%) = 100(F_t - F_i)/(F_m - F_i)$ (Couppié and Prévost, 1997) where F_i is the initial fluorescence prior to adding the toxins, F_t the value at time t (i.e. 45 min), and F_m the maximal value after addition of 1 mM Triton X-100. Spontaneous release of calcein was negligible.

Table S1. Dissociation constants of the S-subunits of LukS-PV/LukF-PV and HlgC/HlgB in human neutrophils and in the U937-C5aR cell line, alone or in the presence of the C5a peptide or the W-54011 antagonist. Data were obtained using a FACSsort cytometer (Becton Dickinson).

Table S2. Competition for binding to the C5aR between LukS-PV or HlgC and the C5a peptide or the antagonist W-54011 both in human neutrophils and in the U937-C5aR cell line. The high affinity antagonist of the C3a receptor, SB-290157 (Ames *et al.*, 2001), had no significant effect on leukotoxin binding. Values in parentheses indicate the number of repetitions.

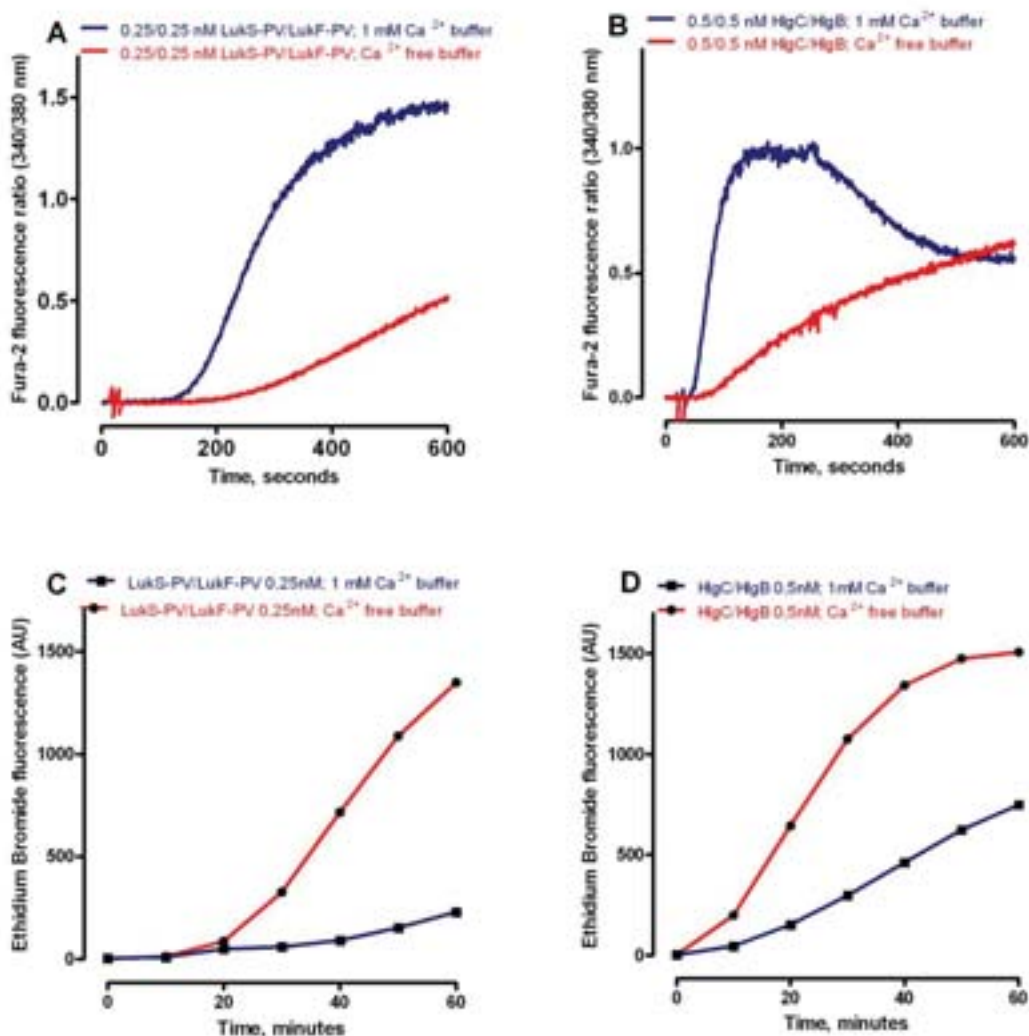
Complementary material to the paper:

Staphylococcal Pantone-Valentine Leukocidin and HlgB/HlgC haemolysin bind and divert the C5aR: internalization and intracellular Ca^{2+} mobilization in human neutrophils

By

Mira Y. Tawk¹, Gaëlle Zimmermann-Meisse¹, Jean-Louis Bossu², Cristina Potrich³, Tristan Bourcier¹, Mauro Dalla Serra³, Bernard Poulain², Gilles Prévost^{1*}, Emmanuel Jover^{1*}

Complementary figure 1

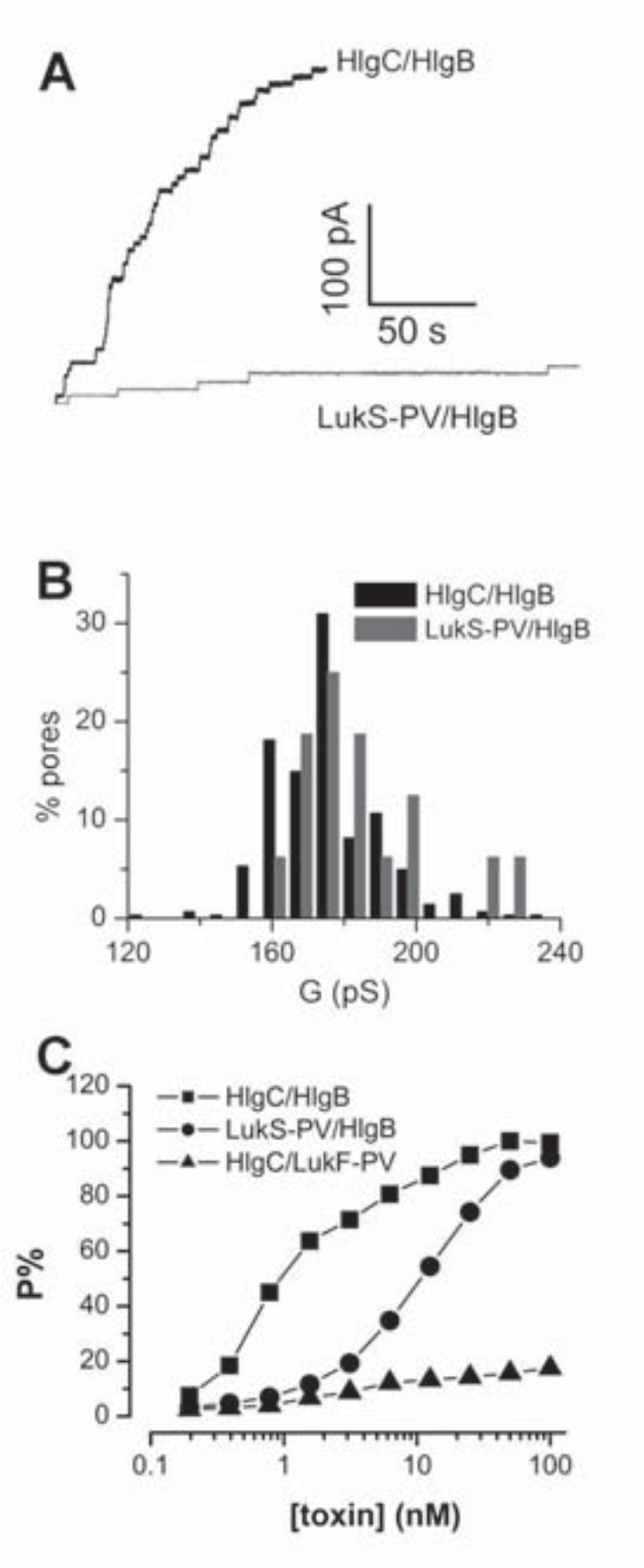


Complementary figure 1: Extracellular Ca^{2+} is required for leukotoxins to induce changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ but not to generate membrane damaging. Panels A and B: Recordings of LukS-PV/LukF-PV (A) or HlgC/HlgB-induced (B) rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in human neutrophils in 1 mM Ca^{2+} -containing buffer (blue

traces) or in Ca^{2+} -free-EGTA buffer (red traces). Both PVL and HlgC/HlgB can induce $[\text{Ca}^{2+}]_i$ changes after binding C5aR both in the presence of 1 mM Ca^{2+} or, less efficiently, in Ca^{2+} free-EGTA buffer.

Panels C and D: Mean fluorescence intensity of human neutrophils staining by Ethidium bromide diffusion due to LukS-PV/LukF-PV (**C**) or HlgC/HlgB (**D**) incubation. Blue traces illustrate record in 1 mM Ca^{2+} containing buffer and the red traces in a Ca^{2+} -free-EDTA buffer. Data were obtained using a FACSort cytometer equipped with a 15 mW argon laser tuned to 488 nm. Ethidium bromide fluorescence was recorded at a 650 nm wavelength. Note the scale time differences with panels **A** seconds and **C** minutes and **B** seconds and **D** minutes. The time lag for Ethidium Bromide permeation into the cells stresses the inhibitory role of extracellular Ca^{2+} for the membrane disrupting ability of leukotoxins.

Complementary figure 2



Complementary figure 2: The presence of HlgB is necessary for pore formation in lipid bilayers.

A: Time course of pore opening in diphytanoyl-phosphatidylcholine lipid bilayers challenged by the presence of 4 nM HlgC/HlgB (black trace) or LukS-PV/HlgB (gray trace) in the *cis*-side. Both leukotoxins were consistently able to form pores, although with a different time scale: during a longer recording period, the current measured for LukS-PV/HlgB was 10 to 20 times lower than that for the HlgC/HlgB combination. Buffer composition was 100 mM KCl, 20 mM Hepes, pH 7.0. Final concentration of the toxin was 4 nM for each component; applied voltage was +40 mV. **B:** Histograms of a single pore conductance (G) for HlgC/HlgB (black bars) and LukS-PV/HlgB (grey bars). The mean conductance was 175.6 ± 15.8 pS (n=280 pores) and 184.8 ± 19.5 pS (n=16 pores) for HlgC/HlgB and LukS-PV/HlgB respectively consistent with previously published values (Comai *et al.*, 2002, Dalla Serra *et al.*, 2005). **C:** threshold concentration required to establish a pore obtained by measuring calcein released from dioleoylphosphatidylcholine/cholesterol (1:1 molar ratio) vesicles pre-loaded with a 80 mM calcein solution (pH 7.0). The increasing concentrations of HlgC/HlgB (squares) gave a half-concentration effect of 0.5 nM and for LukS-PV/HlgB (circles) above 1.5 nM. PVL and HlgC/LukF-PV (triangles) failed to induce calcein release. P% (y axis) is the permeabilizing activity, as defined in material and methods.

Technical methods were: **Planar lipid bilayer experiments.** Solvent-free planar lipid bilayers were prepared by the apposition on both sides of a 0.1 mm aperture made in a 25 μ m thick Teflon septum (pretreated with pentane:n-hexadecane 20:1) of two monolayers of diphytanoylphosphatidylcholine (DPhPC, >99% pure from Avanti Polar Lipids) spread from a 5 mg/ml lipid solution in pentane, as described previously (Dalla Serra *et al.*, 2000). Bicomponent couples were added on one side only (called *cis*) to preformed bilayers; the voltage potential was applied on the *cis* side while the *trans* side was grounded. Macroscopic currents were recorded by a patch clamp amplifier (Axopatch 200; Axon Instruments). A PC equipped with a DigiData 1200 A/D converter (Axon Instruments) was used for data acquisition. Current traces were filtered at 100 Hz and acquired at 500 Hz using the Axoscope 8 software (Axon Instruments). Measurements were performed at room temperature as described previously (Laventie *et al.*, 2013). **Permeabilization of lipid vesicles.** Large unilamellar vesicles (LUV) comprised of a 1:1 molar ratio of dioleoyl phosphatidylcholine/cholesterol (DOPC/Ch) were prepared as previously described (Ferrerias *et al.*, 1998) by the extrusion method. A suspension of multilamellar liposomes

prepared in the presence of 80 mM calcein (Sigma), pH 7.0, was extruded 31 times through polycarbonate membranes with 100 nm pores. Vesicle permeabilization was assayed in a fluorescence microplate reader (Fluostar Galaxy, BMG Germany) with excitation and emission filters at 480 and 540 nm, respectively. The two components of the complex, always at the same concentration, were serially 2-fold diluted in 10 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl and 0.1 mM EDTA, pH 7.0 and dispensed into wells of a 96-well microplate, after which 100 μ l of calcein-loaded LUVs were added at a final lipid concentration of 5 μ M. The time course of calcein release was recorded for 45 min at room temperature and expressed as the increase in fluorescence owing to the dequenching of the released dye when diluted in the external medium. Toxin-induced permeabilizing activity was calculated as: $P(\%) = 100(F_t - F_i)/(F_m - F_i)$ (Couppié *et al.*, 1997) where F_i is the initial fluorescence prior to adding the toxins, F_t the value at time t (i.e. 45 min), and F_m the maximal value after addition of 1 mM Triton X-100. Spontaneous release of calcein was negligible.

Table 1. - Dissociation constants of the S-subunits of LukS-PV/LukF-PV and HlgC/HlgB in human neutrophils and in the U937-C5aR cell line, alone or in the presence of the C5a peptide or the W-54011 antagonist. Data were obtained using a FACSort cytometer (Becton Dickinson).

Human Neutrophils:	Control	1.2 nM C5a	20 nM W-54011
LukS-PV-Fluorescein labeled	0.21 ± 0.04 nM	0.35 ± 0.05 nM	0.49 ± 0.08 nM
LukS-PV-Fluorescein/ LukF-PV	0.17 ± 0.02 nM	0.30 ± 0.02 nM	0.48 ± 0.02 nM
LukS-PV / LukF-PV-Fluorescein labeled	15.35 ± 1.78 nM	15.17 ± 2.44 nM	18.30 ± 2.44 nM
Ki HlgC competition / LukS-PV-Fluorescein labeled	0.18 ± 0.02 nM	irrelevant	irrelevant
HlgC / HlgB Fluorescein labeled	0.87 ± 0.12 nM	1.16 ± 0.15 nM	0.68 ± 0.10 nM
U937-C5aR :	Control	1.2 nM C5a	20 nM W-54011
LukS-PV-Fluorescein labeled	0.32 ± 0.13 nM	0.43 ± 0.17 nM	0.37 ± 0.16 nM
LukS-PV-Fluorescein/ LukF-PV	0.29 ± 0.05 nM	0.38 ± 0.08 nM	0.58 ± 0.12 nM
LukS-PV / LukF-PV-Fluorescein labeled	35.34 ± 9.13 nM	35.16 ± 0.42 nM	29.22 ± 8.05 nM
Ki HlgC competition / LukS-PV-Fluorescein labeled	0.12 ± 0.05 nM	irrelevant	irrelevant
HlgC / HlgB Fluorescein labeled	2.16 ± 0.42 nM	2.21 ± 0.45 nM	1.33 ± 0.24 nM

Table 2. – Competition for binding to the C5aR between LukS-PV or HlgC and the C5a peptide or the antagonist W-54011 both in human neutrophils and in the U937-C5aR cell line. The high affinity antagonist of the C3a receptor, SB-290157 (Ames *et al.*, 2001), had no significant effect on leukotoxin binding. Values in parentheses indicate the number of repetitions).

Human Neutrophils			
	C5a 1.2 nM	W-54011 20 nM	SB-290157 1µM
0.25 nM LukS-PV-Fluorescein labeled	45 ± 9 % (4)	42 ± 8 % (5)	103 ± 6 % (2)
0.25 nM LukS-PV-Fluorescein labelled + 0.25 nM LukF-PV	69 ± 3 % (3)	67 ± 9 % (5)	100 ± 6 % (2)
0.5 nM HlgC + 0.5 nM HlgB Fluorescein labeled	75 ± 6 % (4)	111 ± 3 (5) %	100 ± 1 % (2)
U937-C5aR			
1 nM LukS-PV-Fluorescein labelled	71 ± 4 % (4)	72 ± 4 % (4)	99 % (1)
1 nM LukS-PV-Fluorescein labeled + 1 nM LukF-PV	83 ± 5 % (5)	73 ± 5 % (5)	98 ± 0.8 % (2)
0.5 nM HlgC + 0.5 nM HlgB-Fluorescein labeled	92 ± 3 % (3)	109 ± 5 % (7)	103 ± 3 % (2)

4 TRANSPORT INTRACELLULAIRE

Historiquement, nous utilisons au laboratoire le tampon EGTA pour maintenir les neutrophiles humains. Cependant, afin d'étudier l'internalisation, un ajout de 1 mM de Ca^{2+} est nécessaire, car l'endocytose est un mécanisme dépendant du calcium, comme certaines voies de signalisation cellulaires. Toutefois, il est apparu que l'utilisation de ce tampon n'était pas optimale pour étudier le transport intracellulaire, car l'état des cellules maintenues dans ces conditions ne permettait pas une incubation prolongée. Ainsi, nous avons utilisé du milieu RPMI supplémenté de 10 % de sérum de veau fœtal et une incubation à 37°C avec 5 % de CO_2 pour reproduire au mieux les conditions physiologiques. Le taux de mortalité dans ces conditions est de 15 % à 6h, alors qu'auparavant, avec le tampon EGTA, les cellules étaient en mauvais état dès 2h d'incubation en présence de calcium.

La microscopie confocale nous a permis de suivre le cheminement des deux toxines dans le neutrophile, de même que son interaction avec le C5aR (**Article 2**). Ainsi, la LPV et HlgC/HlgB colocalisent avec le C5aR, même à un temps d'incubation long de 30 min. Concernant la voie empruntée, celle du recyclage ou de la dégradation, il ne semble pas y avoir d'implication des endosomes de recyclage, ou en tout cas, les toxines ne se retrouvent pas dans les compartiments positifs à Rab11. En effet, HlgC/HlgB rejoint dans les toutes premières minutes un compartiment situé près du noyau que nous avons identifié comme étant l'appareil de Golgi. La LPV met plus de temps à rejoindre ce compartiment et une partie transite également dans les lysosomes, donc par la voie de la dégradation. De plus, les toxines semblent rester dans la cellule pendant 3h ou plus, pourtant HlgC/HlgB n'entraîne pas de mortalité, même à 6h d'incubation, contrairement à la LPV qui induit une apoptose précoce des neutrophiles. Enfin, l'utilisation d'un meilleur milieu de culture pour les neutrophiles montre des résultats sur l'origine du calcium différents de ceux obtenus avec du tampon EGTA. Ils rejoignent à présent les conclusions obtenues sur les neurones : une fois que le calcium a été relargué des stocks réticulaires par la signalisation de protéines G, un canal calcique de la membrane plasmique va être activé pour remplir le réticulum endoplasmique (Jover et al., 2013). Ce canal calcique serait différent de celui activé sur les neurones.

ARTICLE 2

Above and beyond C5a receptor targeting by staphylococcal leucotoxins: retrograde transport of Panton-Valentine Leucocidin and γ -haemolysin.

Above and beyond C5a receptor targeting by staphylococcal leucotoxins: Retrograde transport of Panton–Valentine leucocidin and γ -hemolysin

Gaëlle Zimmermann-Meisse, Gilles Prévost*, and Emmanuel Jover*

Université de Strasbourg, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, VBP EA7290, Institut de Bactériologie, 3 rue Koeberlé; F-67000 Strasbourg

* Corresponding authors (Emails: prevost@unistra.fr; jover@unistra.fr)

Abstract: Various membrane receptors associated with the innate immune response have recently been identified as mediators of the cellular action of *Staphylococcus aureus* leucotoxins. Two of these, the Panton–Valentine leucotoxin LukS-PV/LukF-PV and the γ -hemolysin HlgC/HlgB, bind the C5a complement-derived peptide receptor. These leucotoxins utilize the receptor to induce intracellular Ca^{2+} release from internal stores, other than those activated by C5a. The two leucotoxins are internalized with the phosphorylated receptor, but it is unknown whether they divert retrograde transport of the receptor or follow another pathway. Immunolabeling and confocal microscopic techniques were used to analyze the presence of leucotoxins in endosomes, lysosomes, endoplasmic reticulum, and Golgi. The two leucotoxins apparently followed retrograde transport similar to that of the C5a peptide-activated receptor. However, HlgC/HlgB reached the Golgi network very early, whereas LukS-PV/LukF-PV followed slower kinetics. The HlgC/HlgB leucotoxin remained in neutrophils 6 h after a 10-min incubation of the cells in the presence of the toxin with no signs of apoptosis, whereas apoptosis was observed 3 h after neutrophils were incubated with LukS-PV/LukF-PV. Such retrograde transport of leucotoxins provides a novel understanding of the cellular effects initiated by sublytic concentrations of these toxins.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; C5aR binding leucotoxins; human neutrophils; confocal microscopy; retrograde transport; Fura-2 Calcium fluorimetry.

1. Introduction

Staphylococcus aureus is a common constituent of the normal flora of the human body where it occurs in moist areas, such as nasal cavities, neck, or perineum, in roughly one-third of healthy adults. The prevalence of asymptomatic carriers overshadows the incidence of a broad variety of *S. aureus*-linked diseases [1], which range from minor infections of the skin to postoperative wound infections or highly threatening prosthetic resistant biofilms [2]. *S. aureus* strains are of uneven virulence and a higher pathogenic potential has long been associated with antibiotic resistance [3-6]. Nevertheless, the bacterial threat is also associated with the expression of particularly virulent factors [7-10]. The genomes of antibiotic-sensitive and resistant *S. aureus* strains are highly variable, which increases the degree of bacterial hazard [11-13]. An examination of the relationship between virulence determinants in bacterial isolates and human disease suggests the necessity for matching factors between the two species to switch from asymptomatic carriage to disease; thus, expression of one particular virulent gene is not sufficient to predict virulence [14-16]. However, well-characterized staphylococcal secreted factors have been the object of particular attention as candidates for enhanced bacterial virulence [17-21]. Among them, leucotoxins form a family of secreted soluble beta-stranded proteins, which form pores in lipid membranes after seven identical monomers assemble into polymers [22] or by four dimers that organize into a complete octamer [23-30]. The two-component leucotoxins act through a synergistic association between a “slow-eluted” S compound (31–32 kDa), and a “fast-eluted” F compound (34–35 kDa) [31]. Five S and four F subunits affecting the human immune system have been described and they form the Panton–Valentine leucocidin LukS-PV/LukF-

PV (PVL), the γ -hemolysins HlgA/HlgB and HlgC/HlgB, and the leucocidins LukA/LukB (or LukH/LukG) and LukE/LukD [32]. The S-subunit must bind to a membrane receptor to allow further association of the F-subunit and promote formation of the hetero-octameric complexes that subsequently form pores [33,34]. However, the functions ascribed to a particular secreted element according to *in vitro* assays may not accurately reflect behavior *in vivo*, as in infections produced from *S. aureus* PVL-producing strains, where the correlation with outcome severity remains controversial [35-38]. Although focusing on distinct toxins may be an oversimplification when considering *S. aureus* virulence, characterizing their cellular effects is of paramount importance due to the physiological impact of these pathogens on immune cells. Neutrophils are the main target of staphylococcal leucotoxins and a wide range of other bacterial factors. Neutrophils have been widely used in cellular studies, including modification of intracellular Ca^{2+} concentrations [39-42], oxidative burst [43,44], apoptosis [45,46], and neutrophil extracellular trap formation [47,48]. Various G-protein coupled receptors associated with innate immunity have been characterized as explicitly facilitating binding of the S-subunits. The LukS-PV and HlgC subunits bind to the C5a complement peptide receptor (C5aR), the HlgA subunit recognizes the chemokine receptors CXCR1/CXCR2 and CCR2, and the LukE subunit targets the CCR5 receptor [49-53]. However, the leucocidin LukA component (LukH) is an exception, as it targets human phagocytes by binding to CD11b, a component of Mac-1/CR3 integrin [25]. These results require closer scrutiny of leucotoxin–neutrophil interactions to consider an active role of the receptors in immune adaptation to *S. aureus* infection. Functional changes mediated through a receptor occupied by a leucotoxin may alter cell functions beyond the physicochemical multimeric subunit interactions thought to provoke cell lysis.

In a previous study, we characterized changes in free $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induced by the PVL and γ -hemolysin HlgC/HlgB, which both act after binding of their respective S-subunit to the C5aR. Experimental evidence suggests that dissimilar internal stores act as sources of Ca^{2+} distinctly activated by HlgB (acidic stores) or LukF-PV (reticular stores) [39,41]. The cellular reaction to PVL or HlgC/HlgB binding to the C5aR differs from its response to the C5a peptide; therefore, we investigated whether the associations of leucotoxins with the receptor also differ from that of C5a in their intracellular pathway [41,54,55]. We found similar retrograde transport of the leucotoxins associated with the C5aR, but different kinetics were followed. The HlgC/HlgB-C5aR complex reached the Golgi network earlier than the PVL-C5aR complex. Moreover, neutrophils held the HlgC/HlgB intracellularly for up to 6 h without showing signs of cell death and the PVL for up to 3 h before the mitochondria depolarized and apoptosis was initiated.

2. Results

Leucotoxins progress into the cell in association with the C5a receptor following endocytosis

Binding of leucotoxin to human neutrophils increases free $[\text{Ca}^{2+}]_i$ initiated through their interaction with a membrane receptor. The PVL and HlgC/HlgB take advantage of the C5aR [52] and their $[\text{Ca}^{2+}]_i$ responses, which are distinguished by the time to peak of about 1 min for HlgC/HlgB and 5–6 min for the PVL, and by the identity of the internal compartments releasing Ca^{2+} [39,41]. In parallel, a complex comprised of a two-component leucotoxin associated with the receptor is removed from the membrane [41]. Deciphering the mechanism of this withdrawal is important to further understand the relationship between neutrophils and leucotoxins, particularly for the PVL, which does not modify resistance of the plasma membrane in the presence of physiological concentrations of Ca^{2+} , as shown in our previous study [41]. The activated C5aR is known to be phosphorylated on its C-terminal region and internalized after binding the C5a complement-derived peptide [54,55]. We investigated the intracellular presence of leucotoxins presumably associated with the receptor using two monoclonal antibodies that recognize the same native or phosphorylated epitopes of the receptor (Figure S1). The cells were incubated for 10 min in the presence of the leucotoxin and further incubated for extended periods of time after removing the solution. Figure 1 shows an example of the uneven cellular distribution of the two leucotoxins 30 min after their initial binding.

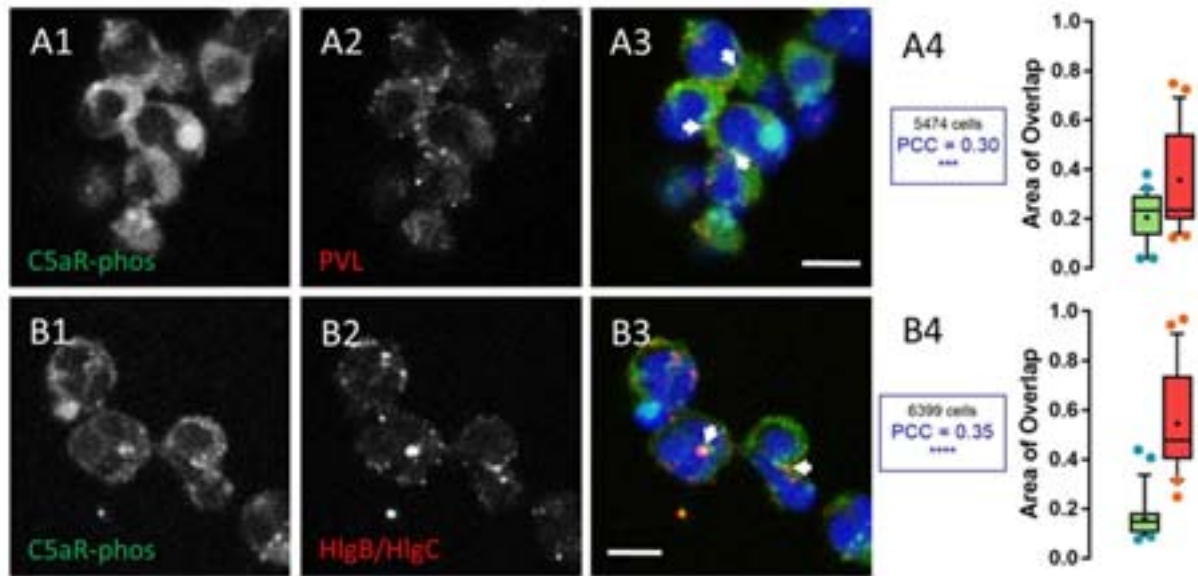


Figure 1. Both PVL and HlgC/HlgB are found with the phosphorylated C5a receptor in intracellular organelles. **A1–A4:** Human neutrophils were incubated for 10 min with the PVL (0.25 nM), the toxin was removed, and the neutrophils were maintained at 37°C for an additional 20 min. The cells were fixed and immunolabeled with C5aR (**A1**) and LukS-subunit (**A2**) antibodies. **A3** shows a merged image of **A1** and **A2**. **A4:** CellProfiler software was used to calculate Pearson’s correlation coefficient (PCC) between the two fluorescent markers. Values are compared with results of control cells, which were processed as experimental cells but in the absence of the leucotoxin. Box and Whisker’s plots show the relationship between the fluorescent labels by overlapping the labeled surfaces calculated with CellProfiler software. The green Box and Whiskers (median and percentiles) correspond to the percentage of total C5aR labeled area stained by the anti-leucotoxin antibody; the red Box is the percentage of the total surface labeled by the leucotoxin also stained with the anti-C5aR antibody. The number of cells considered is indicated above the PCC value. Arrows in the merged image indicate the points of most visible overlap between the two antibodies. **B1–B4:** Human neutrophils incubated in the presence of 0.5 nM HlgC/HlgB. The results are presented as in **A1–A4** using CellProfiler software. Scale bars, 10 μm .

The PVL-C5aR complex settled in a sub-plasmalemmal compartment (arrows, Figure 1A2 and 1A3), whereas the HlgC/HlgB-C5aR complex transited to an area near the nuclei (arrows, Figure 1B2 and 1B3). Pearson’s correlation coefficient (PCC) was determined for all acquired confocal optical slices [insets in Figure 1A4 (C5aR-PVL PCC = 0.30) and Figure 1B4 (C5aR-HlgC/HlgB PCC = 0.35)] to emphasize the presence of the leucotoxins and the phosphorylated C5aR in similar locations. Approximately 20% of the fluorescence associated with phosphorylated C5aR overlapped with the fluorescence associated with either leucotoxin at this point during the incubation. Similarly, more than 40% of the PVL-associated fluorescence and nearly 60% of the HlgC/HlgB-related fluorescence were found in an area also marked by C5aR-associated fluorescence. The fluorescence values associated with one channel overlapping the other from nearly 50 optical slices are presented as Box-and-Whiskers plots, indicating the median, quartiles, and interquartile range (Figure 1A4: PVL and 1B4: HlgC/HlgB). The differences in the size of the interquartile range indicate that the toxins accumulated in specific compartments also stained by the C5aR specific antibody. Moreover, the PCC was consistently positive and significant ($p < 0.005$) compared with the values calculated for control samples. Taken together, these results indicate that a significant proportion of the phosphorylated C5a receptor remains associated with structures also containing leucotoxins.

The experiments were carried out using human neutrophils recovered in RPMI-10% fetal bovine serum (FBS) medium after purification under conditions aimed to preserve cell integrity and Ca^{2+} homeostasis. Then, we confirmed that the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ responses and their pharmacology matched with

published observations using cells temporally maintained in Ca^{2+} free-EGTA buffer [41]. We calculated the of Ca^{2+} concentrations from the Fura-2 fluorescence values using the Grynkiewicz equation [56]. Resting steady state free $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was 108 ± 8 nM, which reached a maximum of 416 ± 39 nM within 90 sec in the presence of 0.5 nM HlgC/HlgB, (Figure 2A and 2B).

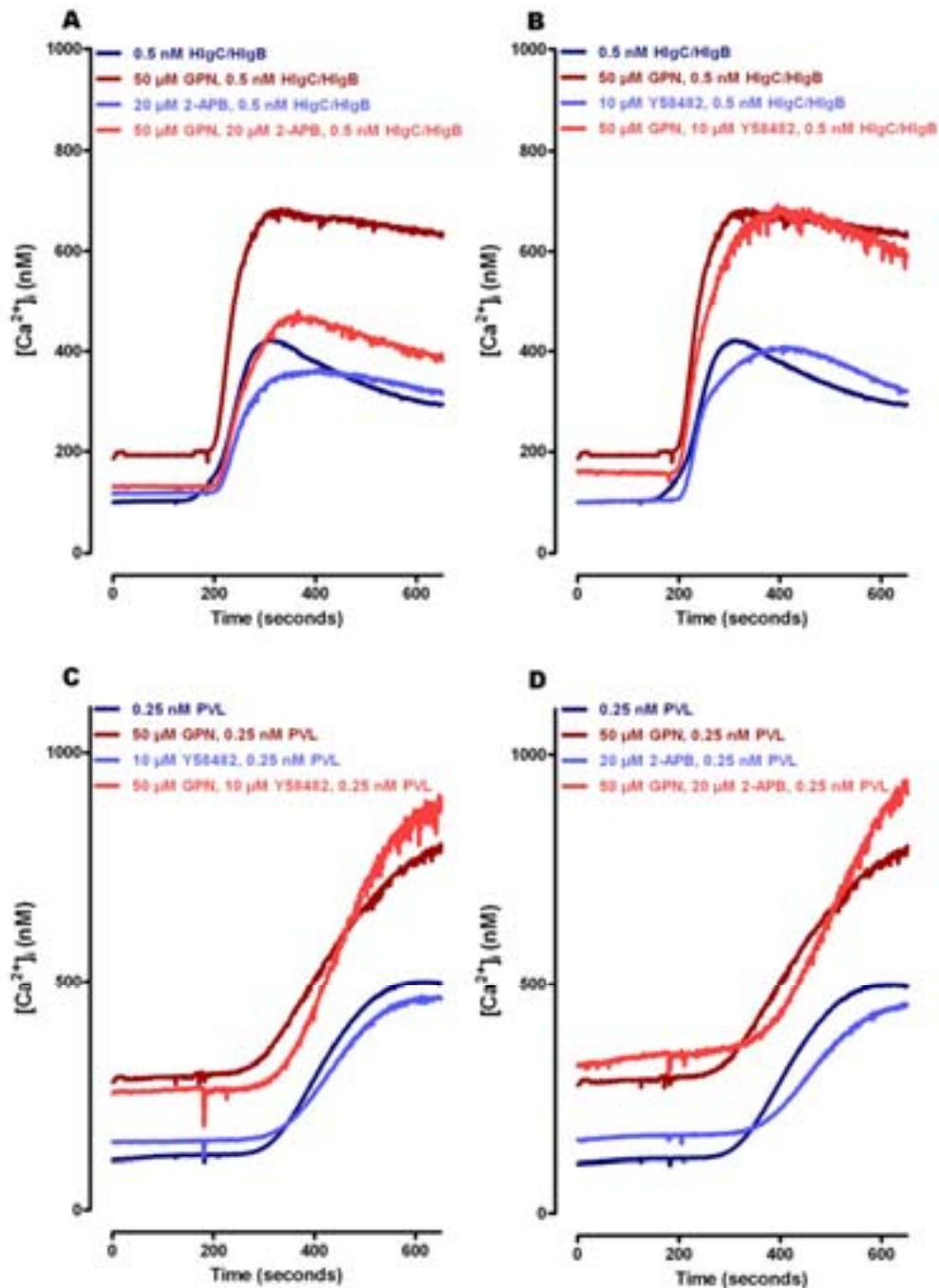


Figure 2. Leucotoxins require optimal buffer conditions for neutrophils to fully develop their activity. Human neutrophils recovered in a RPMI-10% FBS culture medium after purification were incubated for 1 h in 5 μM Fura-2 solution at 37°C, washed by mild centrifugation and filtration, and maintained in the same buffer in the dark until use. **A:** HlgC/HlgB-challenged neutrophils and the effect of blocking the store operated channels using 2-APB under control conditions and after disrupting the lysosomal compartment with GPN. **B:** Effect of treating human neutrophils in the presence of YM 58483, which blocks the store operated channels, before challenge with 0.5 nM HlgC/HlgB as in A. Human neutrophils from the same batches were used to analyze the effect of the PVL after

incubation under identical conditions. Results are shown in **C** and **D**. Traces represent the mean of a minimum of three independent experiments. The cells were incubated for 30 min in the presence of drugs (GPN, 26APB, and YM 58483), if needed, before the fluorescence recording. The toxins were added 180 sec after starting to record.

Peak free $[Ca^{2+}]_i$ in the presence of 0.25 nM PVL was 475 ± 56 nM after > 6 min (Figure 2C and 2D). Pre-treatment of the cells with the lysosomal disrupter glycyl-phenylalanine 2-naphthylamide (GPN) (50 μ M) raised resting free $[Ca^{2+}]_i$ to 246 ± 29 nM. The higher free $[Ca^{2+}]_i$ contributed to a stronger increase of free $[Ca^{2+}]_i$ in cells challenged by HlgC/HlgB [$\odot [Ca^{2+}]_i + 37\%$] (Figure 2B) and in cells subjected to PVL [$\odot [Ca^{2+}]_i + 44\%$] (Figure 2D). Release of $[Ca^{2+}]_i$ from internal compartments of rat cerebellar neurons in response to the action of HlgC/HlgB activates store operated channels (SOCs) [39]. This effect can be pharmacologically blocked by YM 58483 (nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate and SOC antagonist) or by the D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate receptor antagonist 2-APB, which also blocks particular transient receptor potential cation channels (TRP) [57,58]. The presence of 2-APB resulted in a 15% reduction in the free $[Ca^{2+}]_i$ peak due to HlgC/HlgB before GPN treatment and a 30% reduction after treatment (Figure 2A). The presence of YM 58483 also resulted in a 14% reduction in the HlgC/HlgB effect, but only in cells with preserved lysosomes (not exposed to GPN; Figure 2B). The increase in free $[Ca^{2+}]_i$ due to PVL was not associated with activation of a plasma membrane Ca^{2+} channel sensitive to 2-APB or to YM 58483 (Figure 2C and 2D), confirming previous observations [41]. Taken together, these results suggest the participation of an incoming Ca^{2+} pathway paired to SOCs, under the influence of HlgC/HlgB but not that of PVL.

HlgC/HlgB quickly reaches the Golgi apparatus, while the PVL transits through the lysosomal system

The formation of pores in the lipid bilayer has been demonstrated for HlgC/HlgB but not for the PVL [59], and we previously reported that the PVL was unable to modify resistance of the plasma membranes of healthy cells under physiological conditions [41]. However, the particular intraluminal properties of cellular organelles may favor polymerization of leucotoxins and the formation of pores. Therefore, we identified cellular organelles where leucotoxins concentrated after internalization. We labeled early endosomes (anti-GTPase Rab5), recycling endosomes (anti-GTPase Rab11a), lysosomes (anti-lysosome-associated membrane glycoprotein 1, LAMP1), the endoplasmic reticulum (anti-protein disulfide isomerase, PDI), and the trans-Golgi network (TGN; anti-cation-independent mannose 6-phosphate receptor, CI-M6PR) using specific antibodies. Human neutrophils were incubated in the absence or presence of leucotoxins for different time periods and were labeled with both anti-toxin and anti-cellular organelle-specific antibodies. Samples of cells unchallenged by leucotoxins were processed as the experimental test cells and used as cell preservation controls to calculate PCC for randomly distributed fluorescence.

Only 20% of the fluorescent signal due to the anti-Rab5a antibody overlapped with the fluorescence produced by anti-leucotoxin antibodies after a 10 min incubation of neutrophils with the PVL or HlgC/HlgB. The PCC values for the overlapping portion of the two labels (anti-Rab5 and a leucotoxin) revealed a random signal distribution (Figure 3A1 and 3A2 for the PVL and Figure 3B1 and 3B2 for HlgC/HlgB).

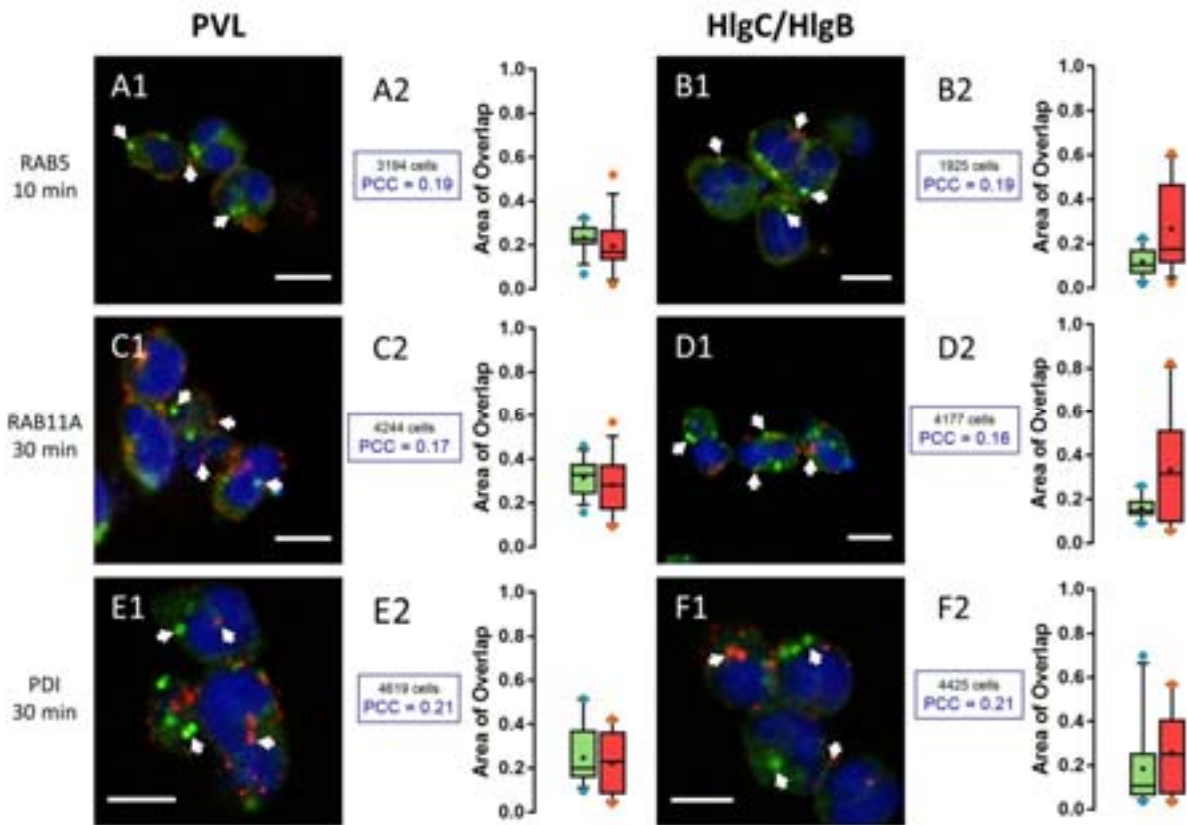


Figure 3. PVL and HlgC/HlgB leucotoxins do not remain in the early endosome (Rab5 labeling), the recycling endosome (Rab11b labeling), or the endoplasmic reticulum (PDI labeling). Examples of human neutrophils incubated with 0.25 nM PVL (**A**: 10 min, **C**: 30 min, and **E**: 30 min) or 0.5 nM HlgC/HlgB (**B**: 10 min, **D**: 30 min, **F**: 30 min) and stained with antibodies against Rab5 (**A1**, **B1**), which concentrates in early endosomes. Labelling with anti-Rab11a antibody (**C1**, **D1**) highlights recycling endosomes, whereas the anti-PDI antibody (**E1**, **F1**) targets the endoplasmic reticulum. Arrows in each image indicate segregation between leucotoxin labeling and the three cell compartments. Overlap between the two markers can be observed in some cases, although the PCC values (**A2**, **B2**, **C2**, **D2**, **E2**, and **F2**) for fluorescence co-distribution were low and not significantly different from control values, suggesting a random distribution. As in Figure 1, the Box-and-Whiskers plots (median and percentiles) are used to show the relationship between the fluorescent labels through overlap of the labeled surfaces. Green boxes indicate the values for the fraction of total surface labeled by the anti-RAB5 antibody (**A2**, **B2**), the anti-RAB11A antibody (**C2**, **D2**), and the anti-PDI antibody (**E2**, **F2**) that was also labeled by the anti-leucotoxin antibody. Red boxes represent the percentage of total area labeled by the anti-leucotoxin antibody and stained by antibodies against the specific cellular compartments. The numbers of cells considered are indicated above the respective PCC values. In all cases, the percentage of surface labeled is compared with that of a control where the cells were processed with the same antibodies, but in the absence of leucotoxin. Scale bars, 10 μm .

Very similar results were obtained for neutrophils stained with recycling endosomes (anti-Rab11a antibody) challenged with leucotoxins for various time periods. Cells incubated for 30 min are shown in Figure 3C1 and 3C2 for the PVL and Figure 3D1 and 3D2 for HlgC/HlgB. No specific co-distribution with the anti-leucotoxin antibodies is seen in the endoplasmic reticulum staining (anti-PDI antibody) after varying the incubation period. Figure 3E1 and 3E2 shows neutrophils incubated for 30 min with the PVL prior to staining and Figure 3F1 and 3F2 shows neutrophils after 30 min in the presence of HlgC/HlgB.

Staining of lysosomes (anti-LAMP1 antibody) uncovered accumulation of the PVL (Figure 4), whereas staining of the TGN (anti-CI-M6PR) unmasked aggregation of HlgC/HlgB (Figure 5). Figure

4 shows human neutrophils incubated for 10 min with the PVL, then maintained for 20, 40, and 180 min before fixation and staining with the anti-LAMP1 antibody. About 30% of the surface labeled by the toxin was also labeled by the anti-LAMP1 antibody (red boxes in Figure 4A–4C), whereas the proportion of area stained by the anti-LAMP1 antibody also labeled by the anti-leucotoxin antibody and increased slightly with time (green boxes in Figure 4A–4C).

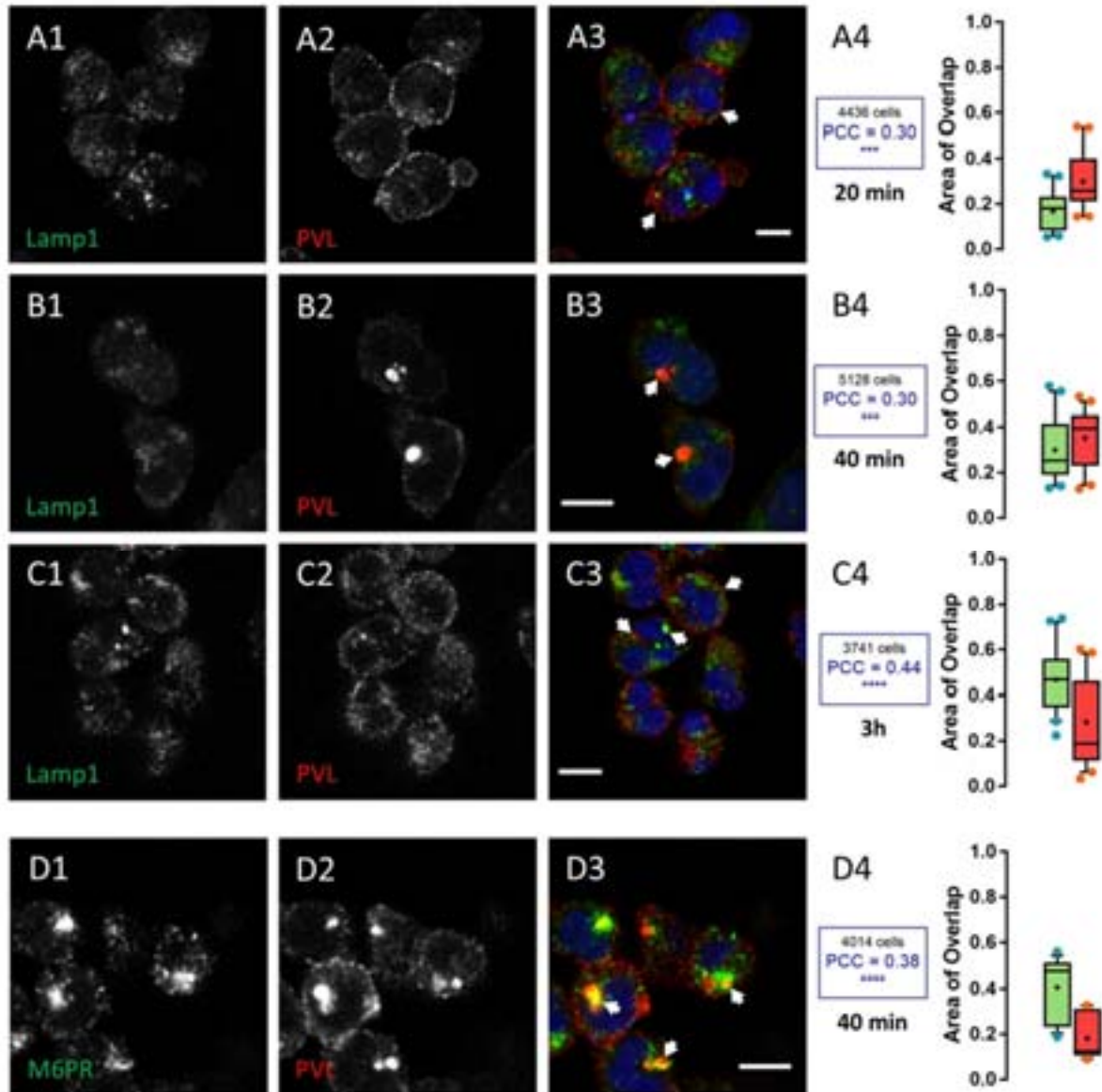


Figure 4. The PVL reaches the trans-Golgi network (TGN) 30 min after transiting through the lysosomal compartment. The human neutrophil lysosomal compartment was incubated with 0.25 nM PVL for 20 (A1–A4), 40 (B1–B4), and 180 min (C1–C4) and immunostained with the anti-LAMP1 antibody. A significant proportion of the total surface labeled with the antibody is also associated with PVL-related fluorescence (arrows). Labelling was mainly concentrated in the area proximal to the nuclei. B1–B3 show the results after 40 min. D1–D3 show the TGN labeled with the anti-M6PR antibody after a 40 min incubation in the presence of the PVL. The Box-and-Whiskers plot shows the overlapping surfaces labeled by the two antibodies compared to the control. Red boxes show the percentage of total area labeled by the anti-leucotoxin antibody that is also stained by the other antibody. The number of cells considered in each case and the PCC for specific labeling are indicated in insets from A4–D4. Scale bars, 10 μ m.

The PCC values revealed a significant non-random labeling distribution compared with control samples without toxin ($p < 0.001$ for 20 and 40 min and $p < 0.0001$ for the 3 h). The PVL began to concentrate in an area likely associated with the TGN (stained with anti-CI-M6PR) after a 40 min incubation with the toxin. About 40% of the anti-CI-M6PR staining significantly co-localized ($p < 0.0001$) with toxin-associated fluorescence (Figure 4D1–4D4). However, HlgC/HlgB quickly transited to the TGN, as shown by the anti-CI-M6PR staining after a 10 min incubation with the toxin. Figure 5 shows HlgC/HlgB present in the TGN.

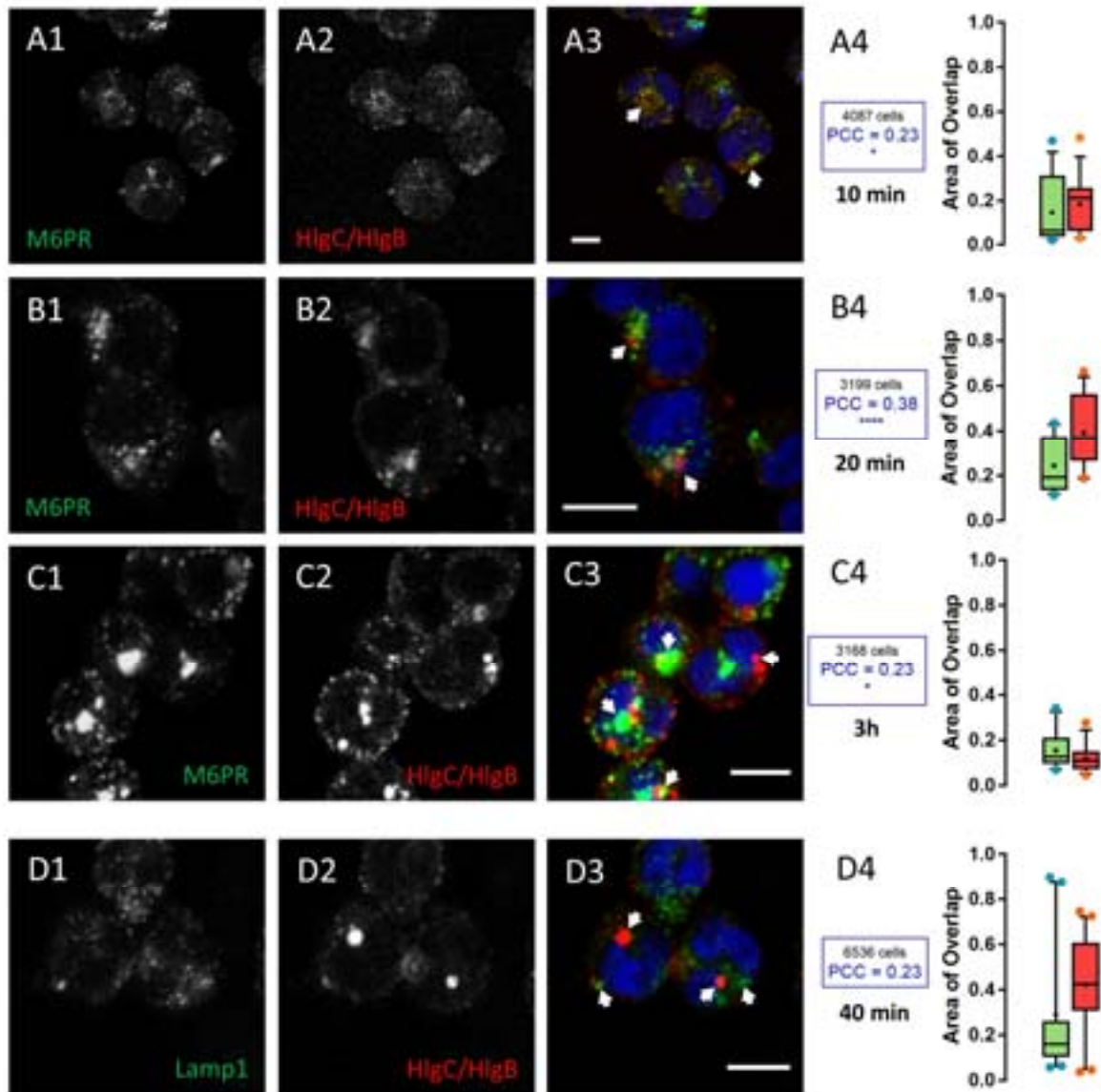


Figure 5. The HlgC/HlgB begins concentrating in the trans-Golgi network (TGN) 10 min after binding to the receptor. Human neutrophils incubated with 0.5 nM HlgC/HlgB for 10 (A1–A4), 20 (B1–B4), and 180 min (C1–C4) were immunostained with the anti-M6PR antibody to highlight the TGN. Cells were processed as described in Figure 4. The results indicate that HlgC/HlgB began concentrating in the TGN after 10 min (A1–A4). A significant proportion of fluorescence emitted by the labels overlapped with the others, as shown in the Box-and-Whiskers plots. D1–D4 illustrate an example of the segregation systematically observed after 40 min between the lysosomal compartment (stained by the anti-LAMP1 antibody) and intracellular localization of HlgC/HlgB. Scale bars, 10 μ m.

A 20 min incubation in the presence of leucotoxin resulted in 25% of the surface stained with the M6PR antibody, which was also stained by the anti-leucotoxin antibody (green box in Figure 5A4). In contrast, nearly 40% of HlgC/HlgB staining was detected over the surface corresponding to the

TGN (red box in Figure 5A4, $p < 0.0001$). Values for the overlapping staining were similar after 40 min (Figure 5B1–5B4, $p < 0.001$). However, co-distribution of anti-CI-M6PR and anti-HlgC/HlgB antibody staining decreased after 3 h in the presence of the leucotoxin (Figure 5C1–5C4, $p < 0.05$), suggesting that the leucotoxin left the TGN. Staining for the HlgC/HlgB antibody never significantly overlapped with that of the anti-LAMP1 antibody. For example, neutrophils were stained after a 40 min incubation in the presence of HlgC/HlgB before fixation and labeling (Figure 5D1–5D4). The concentrations of leucotoxins in the TGN have been confirmed by staining the Golgi apparatus with CTB-488 [60,61].

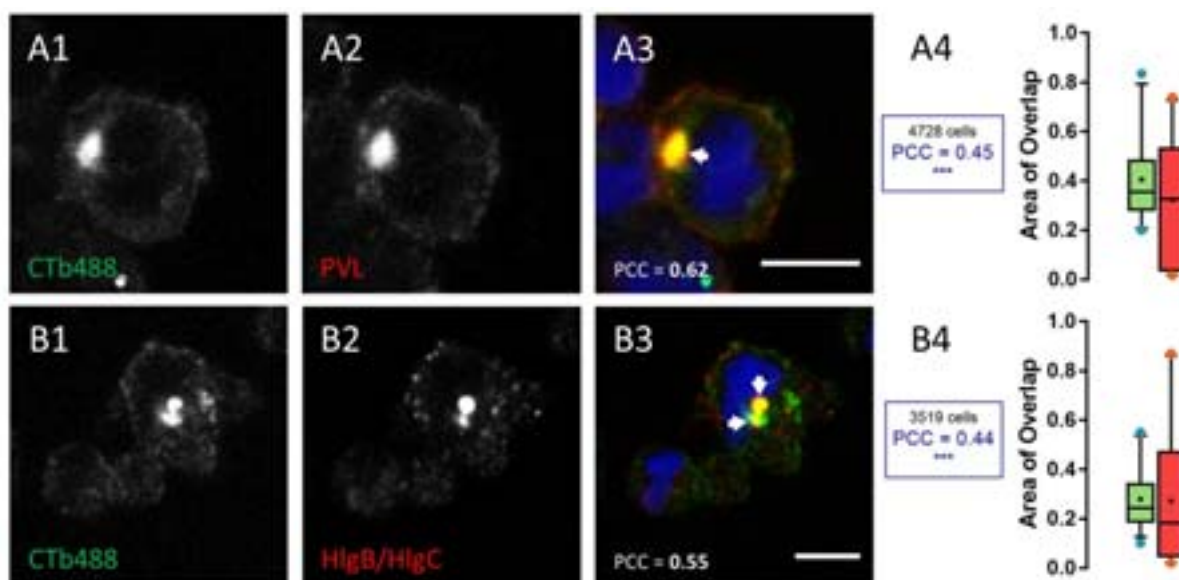


Figure 6. Co-localization of leucotoxins with the Cholera toxin b-subunit in the trans-Golgi network (TGN). Examples of human neutrophils incubated in the presence of 0.25 nM PVL (A1–A4) or 0.5 nM HlgC/HlgB (B1–B4) for 40 min and then counterstained with the Alexa-488-derived b-subunit of the Cholera toxin, which binds GM1 gangliosides found in lipid rafts and subsequently concentrates in the TGN. A4 and B4 show the overlapping percentage of surface labeled through Box-and-Whiskers plots. Scale bars, 10 μ m.

Figure 6 shows examples of neutrophils incubated for 10 min at 37°C in the presence of 0.25 nM PVL (Figure 6A1–6A4) or 0.5 nM HlgC/HlgB (Figure 6B1–6B4). After removing the leucotoxins, the cells were maintained for an additional 30 min at 37°C in RPMI-FBS containing 2 μ g/ml Alexa-488-CTB. Both leucotoxins were co-distributed with CTB, and a significant positive PCC was detected ($p < 0.001$) when compared to control neutrophils treated without leucotoxins. The HlgC/HlgB finding in the TGN early after internalization and in association with the C5a receptor (Figure 1) suggests that the latter drives leucotoxins [54]. On the other hand, the kinetics of PVL retrograde transport was slower than the kinetics of HlgC/HlgB transport.

Taken together, these observations suggest that leucotoxins do not modify permeability of the intracellular compartment membranes they pass through. The free Ca^{2+} in the cytosol after the PVL action is released from the endoplasmic reticulum [39,41], although the toxin is found early in the lysosomal compartment. The release of Ca^{2+} induced by HlgC/HlgB is from acidic stores [39,41], yet the toxin reaches the TGN during the early period of its activity.

Do leucotoxins modify the life span of human neutrophils by remaining in intracellular compartments?

The long-standing presence of the PVL and HlgC/HlgB in human neutrophils without causing any apparent damage is unexpected given the usual characteristic of staphylococcal leucotoxins as pore-forming molecules and the short half-life of neutrophils in the bloodstream [62]. Considering that these cells undergo apoptosis before being cleared by stromal macrophages [63], we used three

approaches to assess likely early activation of apoptosis. The membrane-permeant 5,5,6,6-tetrachloro-1,1,3,3-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide dye (JC-1) is widely used to monitor mitochondrial polarity. About $53 \pm 5\%$ of observed neutrophils incubated for 6 h in the presence of leucotoxins and 0.25 nM PVL had depolarized mitochondria, whereas none of the cells challenged for 6 h with 0.5 nM HlgC/HlgB had depolarized mitochondria (Figure 7A).

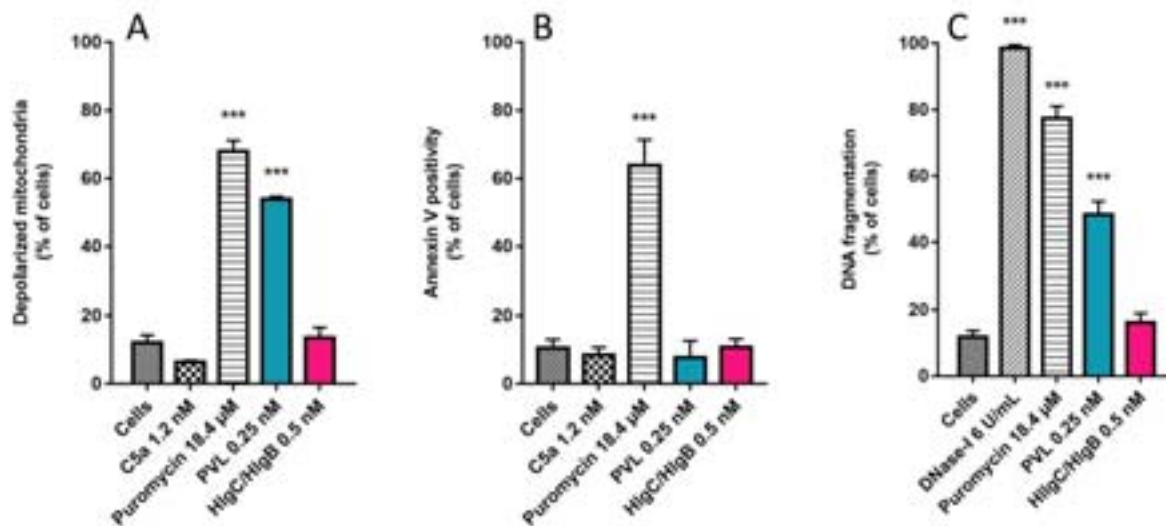


Figure 7. Human neutrophils overcame the intracellular presence of HlgC/HlgB for more than 6 h, whereas the PVL initiated apoptosis during this period. Three independent tests were used to estimate the initiation of apoptosis in human neutrophils incubated for 3 h in the presence of 0.25 nM PVL or for 6 h with 0.5 nM HlgC/HlgB by flow cytometry. **A:** CCCP fluorescence associated with depolarized mitochondria showing $54 \pm 1\%$ of the PVL-treated cells compared to none of the HlgC/HlgB with labeling above background. **B:** Annexin V labeling of externalized phosphatidylserine failed to highlight apoptotic human neutrophils treated with the PVL, whereas the TUNEL assay (**C**) confirmed that approximately 50% of PVL-treated cells were apoptotic. All three apoptosis detection protocols failed to reveal apoptotic activity in human neutrophils in the presence of HlgC/HlgB during the same time period.

Untreated cells or cells incubated (6 h) in the presence of 1.2 nM C5a peptide were used as negative controls, whereas neutrophils challenged with $18.4 \mu\text{M}$ puromycin ($68 \pm 3\%$ of cells analyzed) were the positive control [64]. Annexin V binding to externalized phosphatidylserine was also used to detect apoptosis. Neutrophils incubated in the presence of $18.4 \mu\text{M}$ puromycin were positive for Annexin V ($64 \pm 8\%$; Figure 7B), but cells incubated in the presence of PVL or HlgC/HlgB for 3 or 6 h were not. Fragmented apoptotic DNA was detected using a terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay after incubating neutrophils for 6-h with puromycin ($77 \pm 4\%$) or 0.25 nM PVL ($48 \pm 4\%$). No fragmented DNA was detected in the neutrophils incubated with 0.5 nM HlgC/HlgB (Figure 7C).

3. Discussion

A primary aim of this study was to suggest the fate of staphylococcal leucotoxins after binding to the C5aR on human neutrophils and not altering the resistance of the plasma membrane of healthy cells while eliciting an increase in free $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [41]. We and others previously supported the notion that neutrophils *in vitro* can overcome the presence of low staphylococcal leucotoxin concentrations, provided that the experiments are carried out using physiological concentrations of extracellular Ca^{2+} [39,41,44]. Although the test proposed by our colleagues Fink-Barbançon and Gauduchon *et al.* [65-67] is widely accepted, neither we nor others have demonstrated that ethidium bromide or propidium iodide cross the plasma membrane through a pore formed by the PVL. This observation indicates

that *in vitro* data do not exactly match the consequences of infection, as suggested by the inverse association between cytotoxicity and mortality [10]. Indeed, use of particular physicochemical conditions, including high concentrations of leucotoxins, has generated valuable results regarding the interaction between subunits in lipid bilayers and their crystalline structure [68-71]. However, a holistic explanation about the cellular activity of leucotoxins must consider the functional consequences of identifying specific cellular receptors for leucotoxins [25,49-53]. Moreover, previous observations from our laboratory and others [39-48] are better understood by considering active participation of these receptors in cellular leucotoxin activities. In the present study, maintaining human neutrophils in RPMI-10% FBS medium improved cell survival and supported vigorous intracellular Ca^{2+} responses. Accordingly, estimates of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ were obtained in resting and activated neutrophils based on the Fura-2 fluorescent signal (Figure 2) [56,72]. Additionally, the neutrophil responses were better estimated in cells challenged by leucotoxins under various pharmacological conditions (Figure 2). Our present HlgC/HlgB activity data agree with previous observations on neurons [39] and suggest activation of a plasma membrane Ca^{2+} channel in neutrophils that was not expressed by neurons. A likely candidate is TRPM2, which is also sensitive to 2-APB [57,58]. Notably, PVL action in neutrophils in the presence of GPN revealed a source for release of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ other than the lysosomes, as neutrophils responded similarly to PVL stimulation (amplitude and time to maximum) of control cells and cells with a disrupted lysosomal system (Figure 2).

We have previously suggested that internalization of leucotoxin components (S- and F-subunits) associated with C5aR may precede mobilization of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [41]. After partially challenging this hypothesis, we confirmed internalization of the two leucotoxins and the receptor but failed to demonstrate endocytosis as the primary mechanism for mobilizing free $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Comparing the kinetics of Ca^{2+} mobilization with those of retrograde transport will not help uncover the initial step in the process. Moreover, the intracellular locations of the leucotoxins do not suggest release of Ca^{2+} through a pore formed in the compartment. The PVL accumulated in the lysosomal compartment, but induced Ca^{2+} release from the ER, and HlgC/HlgB reached the TGN early but provoked Ca^{2+} release from acidic compartments. Previous studies suggested that the PVL may control oxidative burst [43] and alter gene expression [44] in human neutrophils. The agonist-mediated internalization of the C5aR is modulated by phosphorylation of the C-terminal domain [54]. Here, we found that the two leucotoxins internalized with the phosphorylated form of the receptor (Figure 1). Furthermore, binding of LukS-PV was regulated by protein kinase C [66]. Intriguingly, LukS-PV and HlgC do not bind the C5aR through the same interactions [41,52]. Such a disparity may be part of the gap between the actions of the two leucotoxins. Formation of the dimer requires binding of the S-subunit to the receptor, which may justify the preferred associations between HlgC with HlgB and that of LukS-PV with LukF-PV. Moreover, the high affinity binding site for LukF-PV described previously [73] and the increase in intracellular Ca^{2+} generated by the associations between Luk-S-PV with HlgB or HlgC with Luk-F-PV [41] suggest other elaborate interactions with unknown cell components. Retrograde transport of the leucotoxins associated with the C5aR is roughly the same as transport initiated by C5aR after binding C5a [54,55]. These similarities suggest a route that facilitates the intracellular activities of the leucotoxins and provides cues to uncover other partners for their actions. The prolonged survival of cells loaded with leucotoxins (Figure 7) before initiation of the apoptotic pathway was verified with three tests of increasing sensitivity, and the results were consistent with the half-life of circulating neutrophils and their degradation [63]. Such a long survival duration fits with the global changes in gene expression after the 3 h treatment with a low PVL concentration [44] and is consistent with other cellular effects [47,48].

Is cytotoxicity induced *in vitro* in the absence of Ca^{2+} more threatening than any effect observed at a low concentration *in vivo*? Significant levels of circulating antibodies are detected in infected individuals [74,75] but no available data suggest the leucotoxin concentrations in blood, even though extremely high quantities of leucotoxins are detectable in skin, respiratory tract, and joint fluid from infected individuals [76]. The initial rise of free $[\text{Ca}^{2+}]_i$ evoked by low concentrations of leucotoxins bound to the C5aR is sufficient to activate neutrophils. Ca^{2+} -induced mobilization and internalization of the receptor-toxin complex could be more of a diversion of the initial function of neutrophils rather

than a true immune response. Then, the absence of this neutrophil function and their priming for other cellular functions could facilitate bacterial replication. In addition, cells from tissues that also express the C5aR would be targeted by leucotoxins, which increases the *S. aureus* threat. The notion that a host factor predisposes severe disease related to *S. aureus* is emerging [10,14,15,77]. This is a compelling argument for a careful consideration of the molecular interactions between bacterial factors and the first host cells exposed. Finally, we must consider that the affinity of leucotoxins for their receptors is not equal in all species and that differences in the responses of the receptors cannot be excluded depending on the laboratory animal model.

4. Materials and Methods

Ethics statement

Buffy coats, purchased from the “Établissement Français du Sang (Strasbourg, France),” were from adult volunteers who provided informed consent. Written consent was collected by the Établissement Français du Sang, which maintained confidentiality of the donor information.

Drugs, chemicals, and antibodies

Glycyl-1-phenylalanine 2-naphthylamide (GPN), puromycin, and Triton X-100 were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Blockers of store-operated Ca^{2+} entry, such as *N*-[4-[3,5-Bis(trifluoromethyl)-1*H*-pyrazol-1-yl]phenyl]-4-methyl-1,2,3-thiadiazole-5-carboxamide (YM 58483), and glycyl-phenylalanine 2-naphthylamide (GPN) and the uncoupler of oxidative phosphorylation carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazine (CCCP) were obtained from Tocris Bioscience (Bristol, United Kingdom). Fura-2 acetoxymethyl ester (Fura-2/AM) was purchased from Molecular Probes/Life Technologies (Fisher Scientific, Illkirch, France). Primary mouse monoclonal antibodies against human C5aR-C-terminal phosphorylated (p-CD88 32-G1; sc-53793), LAMP1 (H4A3; sc-20011), Rab11a (D-3; sc-166523), Rab5 (D-11; sc-46692), and protein disulfide-isomerase (PDI, C-2; sc-74551) were obtained from Santa-Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany). The anti-M6PR (cation independent) antibody (2G11; ab2733) was purchased from Abcam (Cambridge, UK) and JC-1 [5,5,6,6-tetrachloro-1,1,3,3-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide] fluorescent dye, an indicator of mitochondrial membrane potential, was obtained from ATT Bioquest (Souffelweyersheim, France).

Preparation of human polymorphonuclear (hPMN) cells.

Human PMNs were prepared from buffy coats. The cells were prepared within 24 h after blood donation, according to a procedure described previously [65,73]. hPMNs were resuspended in RPMI media supplemented with 10% FBS after purification.

Leucotoxin purification

The *S. aureus* HlgC/HlgB and the PVL LukS-PV/LukF-PV were purified as described previously [78] [66] by affinity chromatography on glutathione-Sepharose 4B followed by cation-exchange fast-performance liquid chromatography after removing the GST tag with Precision Protease (GE Healthcare, Villacoublay, France). Preparation homogeneity was assessed by radial gel immunoprecipitation and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis before storage at -80°C [66].

Spectrofluorimetry

Variations in intracellular free Ca^{2+} levels were determined by recording the Fura-2 fluorescence contained in hPMNs, as described previously [65]. Briefly, neutrophils were loaded with 4 μM Fura-2 AM in EGTA buffer for 45 min in the dark at room temperature. The hPMNs were washed twice

and then suspended (3.5×10^6 cells/ml) in EGTA buffer. Two ml of hPMNs were incubated for 5 min with 1.1 mM CaCl_2 in a 4-ml polystyrene cuvette (1-cm light path). Changes in fluorescence intensity were recorded at 37°C with a dual-excitation spectrofluorometer (Deltascan; PTI, Houston, TX, USA) operated in Fura-2 ratio mode at excitation wavelengths of 340 and 380 nm (slit width, 4 nm) and an emission wavelength of 510 nm (slit width, 4 nm). The fluorescence intensity ratio ($R = \text{Ex}340 \text{ nm}/\text{Ex}380 \text{ nm}$) was calculated as arbitrary fluorescence units for each pair of wavelengths determined. Calcium concentration was estimated by the following formula [56]:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \times \beta \times (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)$$

Where K_d is the dissociation constant of Fura-2 for Ca^{2+} [340 nM, [56]], and $\beta = (I_{380 \text{ max}}) / (I_{380 \text{ min}})$ (3.57 ± 1.34). The R_{\min} and R_{\max} values were determined for the regular experimental series.

Mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) estimates

To assess $\Delta\psi_m$ of neutrophils, 10^6 cells/mL in RPMI-10% FBS were incubated with either toxin. The cells were stained with JC-1 fluorescent dye (5 μM) for 10 min at room temperature after 3 and 6 h incubations at 37°C. Positive controls for mitochondrial membrane depolarization were obtained by incubating the cells in a 10 μM CCCP solution for 15 min. Fluorescence intensities were estimated on a FACSort cytometer (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) equipped with a 15-mW argon laser tuned to 488 nm by recording through the FL1 channel (emission wavelength, 530 nm) and the FL2 channel (emission wavelength, 585 nm). Cell Quest software was used to approximate the percentage of cells analyzed in both populations: the polarized mitochondrial membrane was observed as orange fluorescence and the depolarized membrane as green fluorescence.

Assessment of neutrophil apoptosis by Annexin-V binding and TUNEL assays

The percentage of apoptotic neutrophils was determined according to the manufacturer's specifications (Santa Cruz Biotechnology) using Annexin V-FITC, which binds phosphatidylserine. Cells (10^6 cells/mL in RPMI-10% FBS) were incubated with either of the two toxins. After 3, 6, or 20 h incubation at 37 °C, the cells were centrifuged, and the pellet was resuspended and stained by adding 0.1 μg Annexin V and 1.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ propidium iodide for 10 min at room temperature. The analysis was performed using flow cytometry. The TUNEL assay was used to observe DNA fragmentation in accordance with the manufacturer's specifications (Roche, Bâle, Suisse). DNase I (Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) was used as a positive control at 6 U/ml. The cells were incubated in the presence of leucotoxins for 6 h at 37°C (2×10^6 cells/mL, RPMI-10% FBS) and then fixed for 10 min at room temperature in 4% (v/v) paraformaldehyde-HBSS-HEPES. After washing with Hank's Balanced Salt Solution in 20 mM HEPES buffer (HBSS-HEPES), the neutrophils were permeabilized in the same buffer containing 0.05% Triton X-100, washed, and incubated in the TUNEL mixture for 1 h at 37°C. The cells were centrifuged, the pellet was resuspended in HBSS-HEPES, and the number of labeled cells was determined by flow cytometry.

Immunocytochemistry

Rabbit polyclonal antibodies independently raised against the HlgC, HlgB, LukS-PV f(ab')₂, and LukF-PV subunits [73,79] were used to detect the cellular location of leucotoxins in human hPMNs. Diverse intracellular compartments were labeled using monoclonal antibodies raised against Rab5 (early endosome, sc-46692, Santa Cruz Biotechnology), Rab11a (recycling endosome, sc-166523, Santa Cruz Biotechnology), LAMP1 (lysosome), PDI (endoplasmic reticulum, sc-74551, Santa Cruz Biotechnology), M6PR (TGN/lysosome, ab2733, Abcam, Cambridge, UK), and Alexa-488-labeled Cholera toxin B-subunit (Golgi apparatus, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Cells, (8×10^6 cells/mL in RPMI-10% FBS) were maintained for 10 min at 37°C, in a 5% CO_2 incubator with 0.25 nM

of the PVL or 0.5 nM of HlgC/HlgB. The toxins were removed by centrifugation (2100 \times g, 1 min), resuspended in fresh medium, and deprived of toxins for further incubation (10, 20, 30 min, and 3 h). After each incubation period, the cells were fixed for 10 min in 4% (v/v) paraformaldehyde- HBSS-HEPES and maintained for 30 min in blocking buffer (10% FBS, 5 mg/ml bovine serum albumin [BSA] in PBS) at room temperature after washing. The cells were permeabilized by a 5 min incubation in 0.05% Triton X-100 containing HBSS-HEPES, and then washed before the adding the antibodies. Cells and primary antibodies were diluted 1 μ g/mL in HBSS-HEPES containing 5% FBS and 1 mg/ml BSA and were maintained overnight at 4°C. After two washes, the cells were incubated with DyLight labeled secondary antibodies (Bethyl, Souffelweyersheim, France) for 60 min, washed, and incubated for 15 min in the presence of 10 μ g/ml Hoechst 32258 (Sigma-Aldrich) for labeling of cell nuclei. The pellets were resuspended in Mowiol coverslip mounting solution (Mowiol 4.88; cat# 475904; Calbiochem, La Jolla, CA, USA), mounted on slides, and stored at 4°C until observation on a Leica SP5-II inverted confocal microscope (63 \times objective). Fields of 1024 \times 1024 pixels were acquired using a 305 nm diode (ultraviolet), a 488 nm argon laser (green), and a 561 nm diode-pumped solid-state laser (red).

Image analysis

Confocal microscope-acquired images were analyzed with CellProfiler software [80] which allows the determination of PCC and the overlap ratio with D488 (DyLight 488) and D594 (DyLight 594) images. Results are obtained by a sequence of modules forming a pipeline, both of which are described and can be downloaded at: http://cellprofiler.org/published_pipelines.html. PCCs were determined on full images without cell segmentation after removing cellular debris images, in which a threshold was used to determine a background on cells with a PCC = 0.1. Percentage overlap was determined using segmentation to establish the D488 and D594 spots in each channel; the process does not include cellular debris-associated light, and the two ratios were calculated based on the area measurement.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm standard error of the mean of at least three independent experiments. GraphPad Prism ver. 5 for Windows software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) was used to calculate the means for each experimental condition, prepare the graphs, and perform the statistical analysis. A two-way analysis of variance followed by a Bonferroni post-test was used to detect differences between experimentally treated and control cells. A p -value < 0.05 was considered significant.

Acknowledgements: The authors are particularly grateful to Daniel Keller for constant support, recollection of unpublished results in frequent scientific discussions, and for the skillful preparation of leucotoxins. G.Z.-M. was supported by a doctoral award from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. The experimental work was supported by grants from Direction de la Recherche (University of Strasbourg) and by funds provided by industrial activity (CONNECTUS) of EA-7290. The authors thank the Institut Fédératif des Neurosciences IFR37/Strasbourg and the IFR37 imaging facilities. Thanks also to the team of C. Moog (Mécanisme de neutralisation du VIH par les anticorps, UMR-1110) for sharing human neutrophils from buffy coats. The authors are grateful to Dr. P. Pothier (Sherbrooke, Québec Canada) for improving the English.

Authors' contributions: G Z-M, GP, and EJ conceived and designed the experiments. G Z-M and EJ performed the experiments and prepared the figures. G Z-M, GP, and EJ analyzed the data. EJ wrote the manuscript. G Z-M, GP, and EJ revised the manuscript.

Conflicts of interest: The funding agencies had no role in the study design, data collection or analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. None of the results obtained are part of a patent or commercial product. E.J. is permanent staff of the CNRS (governmental) and G.P. is a

permanent faculty member of the Université de Strasbourg. None of the authors has a conflict of interest to declare.

REFERENCES

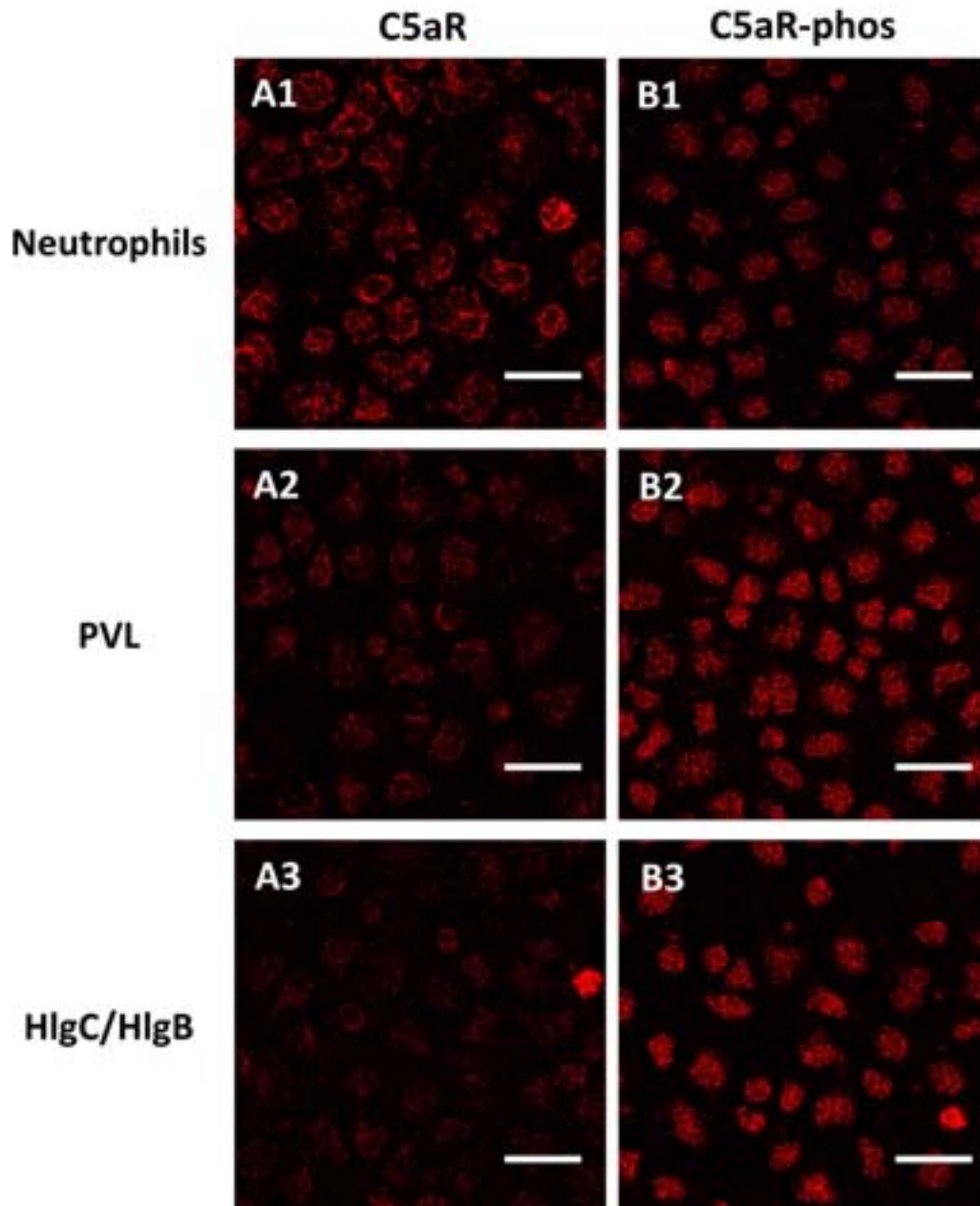
1. Wertheim, H.F.L.; Melles, D.C.; Vos, M.C.; van Leeuwen, W.; van Belkum, A.; Verbrugh, H.A.; Nouwen, J.L. The role of nasal carriage in *staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* **2005**, *5*, 751-762.
2. Tong, S.Y.C.; Davis, J.S.; Eichenberger, E.; Holland, T.L.; Fowler, V.G. *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews* **2015**, *28*, 603-661.
3. Barber, M.; Rozwadowska-Dowzenko, M. Infection by penicillin-resistant staphylococci. *The Lancet* **1948**, *252*, 641-644.
4. Chambers, H.F.; DeLeo, F.R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Micro* **2009**, *7*, 629-641.
5. David, M.Z.; Boyle-Vavra, S.; Zychowski, D.L.; Daum, R.S. Methicillin-susceptible *staphylococcus aureus* as a predominantly healthcare-associated pathogen: A possible reversal of roles? *PLoS ONE* **2011**, *6*, e18217.
6. Peacock, S.J.; Paterson, G.K. Mechanisms of methicillin resistance in *staphylococcus aureus*. *Annual Review of Biochemistry* **2015**, *84*, 577-601.
7. Benson, M.A.; Ohneck, E.A.; Ryan, C.; Alonzo, F.; Smith, H.; Narechania, A.; Kolokotronis, S.-O.; Satola, S.W.; Uhlemann, A.-C.; Sebra, R., *et al.* Evolution of hypervirulence by a mrsa clone through acquisition of a transposable element. *Molecular Microbiology* **2014**, *93*, 664-681.
8. Diep, B.A.; Palazzolo-Ballance, A.M.; Tattevin, P.; Basuino, L.; Braughton, K.R.; Whitney, A.R.; Chen, L.; Kreiswirth, B.N.; Otto, M.; DeLeo, F.R., *et al.* Contribution of panton-valentine leukocidin in community-associated methicillin-resistant *staphylococcus aureus* pathogenesis. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e3198.
9. Jenkins, A.; Diep, B.A.; Mai, T.T.; Vo, N.H.; Warrenner, P.; Suzich, J.; Stover, C.K.; Sellman, B.R. Differential expression and roles of *staphylococcus aureus* virulence determinants during colonization and disease. *mBio* **2015**, *6*.
10. Rose, H.R.; Holzman, R.S.; Altman, D.R.; Smyth, D.S.; Wasserman, G.A.; Kafer, J.M.; Wible, M.; Mendes, R.E.; Torres, V.J.; Shopsin, B. Cytotoxic virulence predicts mortality in nosocomial pneumonia due to methicillin-resistant *staphylococcus aureus*. *Journal of Infectious Diseases* **2015**, *211*, 1862-1874.
11. Baba, T.; Bae, T.; Schneewind, O.; Takeuchi, F.; Hiramatsu, K. Genome sequence of *staphylococcus aureus* strain newman and comparative analysis of staphylococcal genomes: Polymorphism and evolution of two major pathogenicity islands. *Journal of Bacteriology* **2008**, *190*, 300-310.
12. Holden, M.T.G.; Feil, E.J.; Lindsay, J.A.; Peacock, S.J.; Day, N.P.J.; Enright, M.C.; Foster, T.J.; Moore, C.E.; Hurst, L.; Atkin, R., *et al.* Complete genomes of two clinical *staphylococcus aureus* strains: Evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101*, 9786-9791.
13. Uhlemann, A.-C.; Otto, M.; Lowy, F.D.; DeLeo, F.R. Evolution of community- and healthcare-associated methicillin-resistant *staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution* **2014**, *21*, 563-574.
14. Laabei, M.; Uhlemann, A.-C.; Lowy, F.D.; Austin, E.D.; Yokoyama, M.; Ouadi, K.; Feil, E.; Thorpe, H.A.; Williams, B.; Perkins, M., *et al.* Evolutionary trade-offs underlie the multi-faceted virulence of *staphylococcus aureus*. *PLoS Biol* **2015**, *13*, e1002229.
15. Messina, J.A.; Thaden, J.T.; Sharma-Kuinkel, B.K.; Fowler, V.G., Jr. Impact of bacterial and human genetic variation on *staphylococcus aureus* infections. *PLoS Pathog* **2016**, *12*, e1005330.
16. Peacock, S.J.; Moore, C.E.; Justice, A.; Kantzanou, M.; Story, L.; Mackie, K.; O'Neill, G.; Day, N.P.J. Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity* **2002**, *70*, 4987-4996.
17. Chatterjee, S.S.; Chen, L.; Joo, H.-S.; Cheung, G.Y.C.; Kreiswirth, B.N.; Otto, M. Distribution and regulation of the mobile genetic element-encoded phenol-soluble modulins psm-mec in methicillin-resistant *staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e28781.
18. DuMont, A.L.; Torres, V.J. Cell targeting by the *staphylococcus aureus* pore-forming toxins: It's not just about lipids. *Trends in Microbiology* **2014**, *22*, 21-27.

19. Kaneko, J.; Kamio, Y. Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: Structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes. *Biosci Biotechnol Biochem* **2004**, *68*, 981-1003.
20. Peraro, M.D.; van der Goot, F.G. Pore-forming toxins: Ancient, but never really out of fashion. *Nat Rev Micro* **2016**, *14*, 77-92.
21. Zecconi, A.; Scali, F. *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. *Immunology Letters* **2013**, *150*, 12-22.
22. Song, L.; Hobaugh, M.R.; Shustak, C.; Cheley, S.; Bayley, H.; Gouaux, J.E. Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* **1996**, *274*, 1859-1866.
23. Badarau, A.; Rouha, H.; Malafa, S.; Logan, D.T.; Håkansson, M.; Stulik, L.; Dolezilko, I.; Teubenbacher, A.; Gross, K.; Maierhofer, B., *et al.* Structure-function analysis of heterodimer formation, oligomerization, and receptor binding of the staphylococcus aureus bi-component toxin lukgh. *Journal of Biological Chemistry* **2015**, *290*, 142-156.
24. Cooney, J.; Kienle, Z.; Foster, T.J.; O'Toole, P.W. The gamma-hemolysin locus of staphylococcus aureus comprises three linked genes, two of which are identical to the genes for the f and s components of leukocidin. *Infection and Immunity* **1993**, *61*, 768-771.
25. DuMont, A.L.; Yoong, P.; Day, C.J.; Alonzo, F.; McDonald, W.H.; Jennings, M.P.; Torres, V.J. *Staphylococcus aureus* lukab cytotoxin kills human neutrophils by targeting the cd11b subunit of the integrin mac-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2013**, *110*, 10794-10799.
26. Gravet, A.; Colin, D.A.; Keller, D.; Girardot, R.; Monteil, H.; Prévost, G. Characterization of a novel structural member, luke-lukd, of the bi-component staphylococcal leucotoxins family. *FEBS Letters* **1998**, *436*, 202-208.
27. Kaneko, J.; Muramoto, K.; Kamio, Y. Gene of lukf-pv-like component of panton-valentine leukocidin in staphylococcus aureus p83 is linked with lukm. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **1997**, *61*, 541-544.
28. Prévost, G.; Cribier, B.; Couppié, P.; Petiau, P.; Supersac, G.; Finck-Barbancon, V.; Monteil, H.; Piemont, Y. Panton-valentine leucocidin and gamma-hemolysin from *staphylococcus aureus* atcc 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infect Immun* **1995**, *63*, 4121-4129.
29. Woodin, A.M. Fractionation of a leucocidin from *staphylococcus aureus*. *Biochemical Journal* **1959**, *73*, 225-237.
30. Yanai, M.; Rocha, M.A.; Matolek, A.Z.; Chintalacharuvu, A.; Taira, Y.; Chintalacharuvu, K.; Beenhouwer, D.O. Separately or combined, lukg/lukh is functionally unique compared to other staphylococcal bicomponent leukotoxins. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e89308.
31. Woodin, A.M. Purification of the two components of leucocidin from *staphylococcus aureus*. *Biochem J* **1960**, *75*, 158-165.
32. Otto, M. *Staphylococcus aureus* toxins. *Current Opinion in Microbiology* **2014**, *17*, 32-37.
33. Joubert, O.; Viero, G.; Keller, D.; Martinez, E.; Colin, D.A.; Monteil, H.; Mourey, L.; Dalla Serra, M.; Prévost, G. Engineered covalent leucotoxin heterodimers form functional pores: Insights into s-f interactions. *Biochem J* **2006**, *396*, 381-389.
34. Meunier, O.; Ferreras, M.; Supersac, G.; Hoepfer, F.; Baba-Moussa, L.; Monteil, H.; Colin, D.A.; Menestrina, G.; Prévost, G. A predicted b-sheet from class s components of staphylococcal g-hemolysin is essential for the secondary interaction of the class f component. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1997**, *1326*, 275-286.
35. Bae, I.-G.; Tonthat, G.T.; Stryjewski, M.E.; Rude, T.H.; Reilly, L.F.; Barriere, S.L.; Genter, F.C.; Corey, G.R.; Fowler, V.G. Presence of genes encoding the panton-valentine leukocidin exotoxin is not the primary determinant of outcome in patients with complicated skin and skin structure infections due to methicillin-resistant staphylococcus aureus: Results of a multinational trial. *Journal of Clinical Microbiology* **2009**, *47*, 3952-3957.
36. Hamilton, S.M.; Bryant, A.E.; Carroll, K.C.; Lockary, V.; Ma, Y.; McIndoo, E.; Miller, L.G.; Perdreaux-Remington, F.; Pullman, J.; Risi, G.F., *et al.* In vitro production of panton-valentine leukocidin among strains of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* causing diverse infections. *Clinical Infectious Diseases* **2007**, *45*, 1550-1558.
37. Lalani, T.; Federspiel, J.J.; Boucher, H.W.; Rude, T.H.; Bae, I.-G.; Rybak, M.J.; Tonthat, G.T.; Corey, G.R.; Stryjewski, M.E.; Sakoulas, G., *et al.* Associations between the genotypes of staphylococcus aureus bloodstream isolates and clinical characteristics and outcomes of bacteremic patients. *Journal of Clinical Microbiology* **2008**, *46*, 2890-2896.

38. Sharma-Kuinkel, B.K.; Ahn, S.H.; Rude, T.H.; Zhang, Y.; Tong, S.Y.C.; Ruffin, F.; Genter, F.C.; Braughton, K.R.; DeLeo, F.R.; Barriere, S.L., *et al.* Presence of genes encoding panton-valentine leukocidin is not the primary determinant of outcome in patients with hospital-acquired pneumonia due to staphylococcus aureus. *Journal of Clinical Microbiology* **2012**, *50*, 848-856.
39. Jover, E.; Tawk, M.Y.; Laventie, B.J.; Poulain, B.; Prévost, G. Staphylococcal leukotoxins trigger free intracellular ca^{2+} rise in neurons, signaling through acidic stores and activation of store-operated channels. *Cell Microbiol* **2013**.
40. Staali, L.; Monteil, H.; Colin, D.A. The staphylococcal pore-forming leukotoxins open ca^{2+} channels in the membrane of human polymorphonuclear neutrophils. *J Membrane Biol* **1998**, *162*, 209-216.
41. Tawk, M.Y.; Zimmermann-Meisse, G.; Bossu, J.-L.; Potrich, C.; Bourcier, T.; Dalla Serra, M.; Poulain, B.; Prévost, G.; Jover, E. Internalization of staphylococcal leukotoxins that bind and divert the c5a receptor is required for intracellular ca^{2+} mobilization by human neutrophils. *Cellular Microbiology* **2015**, *17*, 1241-1257.
42. Woodin, A.M.; Wieneke, A.A. The accumulation of calcium by the polymorphonuclear leucocyte treated with staphylococcal leucocidin and its significance in extrusion of protein. *Biochem J.* **1963**, *87*, 487-495.
43. Colin, D.A.; Monteil, H. Control of the oxidative burst of human neutrophils by staphylococcal leukotoxins. *Infection and Immunity* **2003**, *71*, 3724-3729.
44. Graves, S.F.; Kobayashi, S.D.; Braughton, K.R.; Whitney, A.R.; Sturdevant, D.E.; Rasmussen, D.L.; Kirpotina, L.N.; Quinn, M.T.; DeLeo, F.R. Sublytic concentrations of staphylococcus aureus panton-valentine leukocidin alter human pmn gene expression and enhance bactericidal capacity. *Journal of Leukocyte Biology* **2012**, *92*, 361-374.
45. Chi, C.-Y.; Lin, C.-C.; Liao, I.-C.; Yao, Y.-C.; Shen, F.-C.; Liu, C.-C.; Lin, C.-F. Panton-valentine leukocidin facilitates the escape of *staphylococcus aureus* from human keratinocyte endosomes and induces apoptosis. *Journal of Infectious Diseases* **2014**, *209*, 224-235.
46. Genestier, A.-L.; Michallet, M.-C.; Prévost, G.; Bellot, G.; Chalabreysse, L.; Peyrol, S.; Thivolet, F.; Etienne, J.; Lina, G.; Vallette, F.M., *et al.* *Staphylococcus aureus* panton-valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces bax-independent apoptosis of human neutrophils. *The Journal of Clinical Investigation* **2005**, *115*, 3117-3127.
47. Malachowa, N.; Kobayashi, S.D.; Freedman, B.; Dorward, D.W.; DeLeo, F.R. Staphylococcus aureus leukotoxin gh promotes formation of neutrophil extracellular traps. *The Journal of Immunology* **2013**, *191*, 6022-6029.
48. Pilszczek, F.H.; Salina, D.; Poon, K.K.H.; Fahey, C.; Yipp, B.G.; Sibley, C.D.; Robbins, S.M.; Green, F.H.Y.; Surette, M.G.; Sugai, M., *et al.* A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *staphylococcus aureus*. *The Journal of Immunology* **2010**, *185*, 7413-7425.
49. Alonzo III, F.; Kozhaya, L.; Rawlings, S.A.; Reyes-Robles, T.; DuMont, A.L.; Myszka, D.G.; Landau, N.R.; Unutmaz, D.; Torres, V.J. Ccr5 is a receptor for *staphylococcus aureus* leukotoxin ed. *Nature* **2013**, *493*, 51-55.
50. Reyes-Robles, T.; Alonzo III, F.; Kozhaya, L.; Lacy, D.B.; Unutmaz, D.; Torres, Victor J. *Staphylococcus aureus* leukotoxin ed targets the chemokine receptors cxcr1 and cxcr2 to kill leukocytes and promote infection. *Cell Host & Microbe* **2013**, *14*, 453-459.
51. Spaan, A.N.; Henry, T.; van Rooijen, W.J.; Perret, M.; Badiou, C.; Aerts, P.C.; Kemmink, J.; de Haas, C.J.; van Kessel, K.P.; Vandenesch, F., *et al.* The staphylococcal toxin panton-valentine leukocidin targets human c5a receptors. *Cell Host Microbe* **2013**, *13*, 584-594.
52. Spaan, A.N.; Schiepers, A.; de Haas, C.J.C.; van Hooijdonk, D.D.J.J.; Badiou, C.; Contamin, H.; Vandenesch, F.; Lina, G.; Gerard, N.P.; Gerard, C., *et al.* Differential interaction of the staphylococcal toxins panton-valentine leukocidin and g-hemolysin cb with human c5a receptors. *The Journal of Immunology* **2015**, *195*, 1034-1043.
53. Spaan, A.N.; Vrieling, M.; Wallet, P.; Badiou, C.; Reyes-Robles, T.; Ohneck, E.A.; Benito, Y.; de Haas, C.J.C.; Day, C.J.; Jennings, M.P., *et al.* The staphylococcal toxins g-haemolysin ab and cb differentially target phagocytes by employing specific chemokine receptors. *Nat Commun* **2014**, *5*.
54. Naik, N.; Giannini, E.; Brouchon, L.; Boulay, F. Internalization and recycling of the c5a anaphylatoxin receptor: Evidence that the agonist-mediated internalization is modulated by phosphorylation of the c-terminal domain. *Journal of Cell Science* **1997**, *110*, 2381-2390.
55. Suvorova, E.S.; Gripentrog, J.M.; Miettinen, H.M. Different endocytosis pathways of the c5a receptor and the n-formyl peptide receptor. *Traffic* **2005**, *6*, 100-115.

56. Gryniewicz, G.; Poenie, M.; Tsien, R.Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **1985**, *260*, 3440-3450.
57. Togashi, K.; Inada, H.; Tominaga, M. Inhibition of the transient receptor potential cation channel *trpm2* by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-apb). *British Journal of Pharmacology* **2008**, *153*, 1324-1330.
58. Yamashita, M.; Somasundaram, A.; Prakriya, M. Competitive modulation of Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel gating by *stim1* and 2-aminoethyldiphenyl borate. *Journal of Biological Chemistry* **2011**, *286*, 9429-9442.
59. Ferreras, M.; Höper, F.; Dalla Serra, M.; Colin, D.A.; Prévost, G.; Menestrina, G. The interaction of *staphylococcus aureus* bi-component g-hemolysins and leucocidins with cells and lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1998**, *1414*, 108-126.
60. Bastiaens, P.I.; Majoul, I.V.; Verveer, P.J.; SÅ¶lling, H.D.; Jovin, T.M. Imaging the intracellular trafficking and state of the ab5 quaternary structure of cholera toxin. *The EMBO Journal* **1996**, *15*, 4246-4253.
61. Thieblemont, N.; Wright, S.D. Transport of bacterial lipopolysaccharide to the golgi apparatus. *The Journal of Experimental Medicine* **1999**, *190*, 523-534.
62. Summers, C.; Rankin, S.M.; Condliffe, A.M.; Singh, N.; Peters, A.M.; Chilvers, E.R. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in Immunology* **2010**, *31*, 318-324.
63. Adrover, J.M.; Nicolás-Ávila, J.A.; Hidalgo, A. Aging: A temporal dimension for neutrophils. *Trends in Immunology* **2016**.
64. Nagami, K.; Kawashima, Y.; Kuno, H.; Kemi, M.; Matsumoto, H. *In vitro* cytotoxicity assay to screen compounds for apoptosis-inducing potential on lymphocytes and neutrophils. *The Journal of Toxicological Sciences* **2002**, *27*, 191-203.
65. Finck-Barbançon, V.; Duportail, G.; Meunier, O.; Colin, D.A. Pore formation by a two-component leucocidin from *staphylococcus aureus* within the membrane of human polymorphonuclear leukocytes. *Biochim Biophys Acta* **1993**, *1182*, 275-282.
66. Gauduchon, V.; Werner, S.; Prévost, G.; Monteil, H.; Colin, D.A. Flow cytometric determination of panton-valentine leucocidin s component binding. *Infect Immun* **2001**, *69*, 2390-2395.
67. Gauduchon, V.r.; Cozon, G.; Vandenesch, F.o.; Genestier, A.-L.; Eyssade, N.; Peyrol, S.; Etienne, J.; Lina, G. Neutralization of *staphylococcus aureus* panton valentine leucocidin by intravenous immunoglobulin *in vitro*. *Journal of Infectious Diseases* **2004**, *189*, 346-353.
68. Alonzo, F.; Torres, V.J. The bicomponent pore-forming leucocidins of *staphylococcus aureus*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2014**, *78*, 199-230.
69. Guillet, V.; Roblin, P.; Werner, S.; Coraiola, M.; Menestrina, G.; Monteil, H.; Prévost, G.; Mourey, L. Crystal structure of leucotoxin s component: New insight into the staphylococcal b-barrel pore-forming toxins. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 41028-41037.
70. Menestrina, G.; Dalla Serra, M.; Comai, M.; Coraiola, M.; Viero, G.; Werner, S.; Colin, D.A.; Monteil, H.; Prévost, G. Ion channels and bacterial infection: The case of b-barrel pore-forming protein toxins of *staphylococcus aureus*. *FEBS Letters* **2003**, *552*, 54-60.
71. Yamashita, D.; Sugawara, T.; Takeshita, M.; Kaneko, J.; Kamio, Y.; Tanaka, I.; Tanaka, Y.; Yao, M. Molecular basis of transmembrane beta-barrel formation of staphylococcal pore-forming toxins. *Nat Commun* **2014**, *5*.
72. Tisch-Idelson, D.; Sharabani, M.; Kloog, Y.; Aviram, I. Stimulation of neutrophils by prenylcysteine analogs: Ca^{2+} release and influx. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1999**, *1451*, 187-195.
73. Meyer, F.; Girardot, R.; Piémont, Y.; Prévost, G.; Colin, D.A. Analysis of the specificity of panton-valentine leucocidin and gamma-hemolysin f component binding. *Infection and Immunity* **2009**, *77*, 266-273.
74. Mudd, S.; Gladstone, G.P.; Lenhart, N.A. The antigenicity in man of staphylococcal leucocidin toxoid, with notes on therapeutic immunization in chronic osteomyelitis. *British Journal of Experimental Pathology* **1965**, *46*, 455-472.
75. Verkaik, N.J.; Dauwalder, O.; Antri, K.; Boubekri, I.; de Vogel, C.P.; Badiou, C.d.; Bes, M.l.; Vandenesch, F.o.; Tazir, M.; Hooijkaas, H., *et al.* Immunogenicity of toxins during *staphylococcus aureus* infection. *Clinical Infectious Diseases* **2010**, *50*, 61-68.
76. Badiou, C.; Dumitrescu, O.; George, N.; Forbes, A.R.N.; Drougka, E.; Chan, K.S.; Ramdani-Bouguessa, N.; Meugnier, H.; Bes, M.; Vandenesch, F., *et al.* Rapid detection of *staphylococcus aureus* panton-valentine leucocidin in clinical specimens by enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic tests. *Journal of Clinical Microbiology* **2010**, *48*, 1384-1390.

77. Popovich, K.J.; Hayden, M.K. Delineating the epidemiology-host-microbe relationship for methicillin-resistant staphylococcus aureus infection. *Journal of Infectious Diseases* **2015**, *211*, 1857-1859.
78. Werner, S.; Colin, D.A.; Coraiola, M.; Menestrina, G.; Monteil, H.; Prévost, G. Retrieving biological activity from lukf-pv mutants combined with different s components implies compatibility between the stem domains of these staphylococcal bicomponent leucotoxins. *Infect. Immun.* **2002**, *70*, 1310-1318.
79. Finck-Barbançon, V.; Prévost, G.; Piémont, Y. Improved purification of leukocidin from *staphylococcus aureus* and toxin distribution among hospital strains. *Res Microbiol* **1991**, *142*, 75-85.
80. Carpenter, A.E.; Jones, T.R.; Lamprecht, M.R.; Clarke, C.; Kang, I.H.; Friman, O.; Guertin, D.A.; Chang, J.H.; Lindquist, R.A.; Moffat, J., *et al.* Cellprofiler: Image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biology* **2006**, *7*, R100-R100.



Supplementary materials: Figure S1: Binding of the PVL or HlgB/HlgC induces phosphorylation of C5aR. **A1:** Human neutrophils stained with antibody recognize the C5aR non phosphorylated C-terminal peptide. Immunolabeling at the periphery of the cells suggests that the receptor is located near the plasma membrane. **B1:** Human neutrophils from the same preparation stained with an antibody that recognizes the phosphorylated form of the same peptide in A1. The labeling is concentrated in the cytosol. A short 5 min incubation of human neutrophils with 2 nM PVL (**A2** and **B2**) is sufficient to reduce labeling intensity by the antibody against the non-phosphorylated receptor (**A2**) and to increase staining intensity by the antibody against the phosphorylated receptor (**B2**). Similarly, a 5 min incubation of cells with 2 nM HlgC/HlgB also reduces the labeling due to the unphosphorylated receptor antibody (**A3**) and increases staining intensity of the phosphorylated receptor antibody (**B2**). Two different experiments were conducted on 500–1000 cells. Scale bar, 20 μ m. CellProfiler pipelines were created to establish the percentage of the signal overlapping between the two fluorescent probes and measured distinct confocal microscope recording channels. Two input modules were created in the CellProfiler cell image analysis software 2.1.1. (Windows 64-bit, revision 6c2d896). Additional information of each module is also given.

5 DISCUSSION

5.1 CONCLUSION

Comme pour une activation naturelle par le peptide du complément C5a, la LPV et l'Hémolysine γ HlgC/HlgB entraînent une activation du C5aR, ainsi qu'une désensibilisation du récepteur à la membrane de la cellule. En effet, dans tous les cas, une phosphorylation a lieu sur la partie C-terminale du C5aR qui permet l'internalisation du complexe récepteur-ligand. Les toxines sont donc internalisées, peut-être par la voie de la clathrine, comme c'est majoritairement le cas pour le C5a-C5aR qui utilise l'arrestine, la clathrine et la dynamine (Rabiet et al., 2007; Suvorova et al., 2005).

Les deux leucotoxines semblent rester un certain temps avec le C5aR puisqu'une interaction entre eux est encore visible à 30 min. Ensuite, ni la LPV ni HlgC/HlgB ne semblent emprunter la voie du recyclage, mais les toxines se retrouvent pour une part dans la voie de la dégradation. La majorité de la LPV et de HlgC/HlgB semblent toutefois être contenus dans l'appareil de Golgi, en particulier dans le trans-Golgi, avec une cinétique beaucoup plus rapide pour HlgC/HlgB, cependant. Ces résultats sont corrélés à ceux obtenus par Naik *et al.* (1997) et Suvorova *et al.* (2005) sur le C5a où le peptide est retrouvé dans une région périnucléaire, semblable à l'emplacement de l'appareil de Golgi, et où la voie du recyclage n'est pas utilisée, contrairement à celle de la dégradation qui concerne 60 % du récepteur. L'échappement du C5aR au recyclage à la membrane provient du fait qu'il s'agit d'un GPCR de classe B et que les β -arrestines interagissant avec lui mettent longtemps avant de se détacher, du fait de leur interaction très stable.

Les résultats sur membranes synthétiques ainsi que l'électrophysiologie, montrent qu'il n'y a pas de formation de pore avec la sous-unité LukF-PV, ce qui est corrélé avec les profils calciques différents pour les deux sous-unités LukF-PV et HlgB. En effet, le calcium n'est pas mobilisé de la même manière avec les deux composants F, même si les composants LukS-PV et HlgC se fixent au récepteur C5aR mais sur des sites différents. La sous-unité F serait donc responsable du cheminement de la toxine et de l'activation cellulaire tandis que le composé S permettrait la fixation à la cellule et induirait la spécificité cellulaire des deux toxines.

Le fait que la LPV et HlgC/HlgB soient internalisées, puis transitent dans les vésicules internes, montre que l'hypothèse d'un pore à la membrane plasmique n'est pas le principal mécanisme d'action de ces toxines. Néanmoins, il n'est pas impossible que la toxine se multimérise à l'intérieur de la cellule, par exemple à la membrane de l'appareil de Golgi, des endosomes ou encore du lysosome. De plus, ces deux toxines pourraient également rejoindre la mitochondrie une fois dans le cytosol et y former un pore, comme cela a été suggéré par Genestier *et al.* (2005) pour la LPV.

L'utilisation du transport rétrograde de la LPV et de HlgC/HlgB pour rejoindre l'appareil de Golgi montre des similitudes avec les toxines AB5 comme la toxine cholérique ou la toxine de Shiga.

Cependant, nous n'avons pas noté une présence des toxines dans le réticulum endoplasmique et le principe de fonctionnement avec les AB5 n'est pas le même puisque les sous-unités S et F ne comportent pas d'activité catalytique. Cependant, les leucotoxines ont une action différente en ciblant des GPCR associés à de nombreuses voies de signalisation diverses.

5.2 PERSPECTIVES

L'internalisation du C5aR après une activation par le C5a est plutôt bien caractérisée. Le récepteur emprunte majoritairement la voie de la clathrine afin d'être endocyté. Hypothétiquement, la LPV et HlgC/HlgB devraient elles aussi utiliser cette voie d'internalisation, mais cela reste à démontrer. Les études préliminaires que nous avons menées avec différents inhibiteurs de l'endocytose n'ont pas donné de résultats probants. Le phenylarsine oxyde a été utilisé pour inhiber l'endocytose générale par une action sur les tyrosines phosphatases (Song et al., 2011). La voie de la clathrine a été inhibée par le monodansylcadavérine et la chlorpromazine qui ont une action, respectivement, sur les transglutaminases et la protéine adaptatrice AP2 (McMahon and Boucrot, 2011; Uriarte et al., 2009). Enfin, la voie dépendante de ARF6 a été ciblée par la molécule SecinH3 qui inhibe le complexe que forme ARF6 avec ARNO (El Azreq and Bourgoïn, 2011; Zhu et al., 2013). Notre étude a porté sur la visualisation de la présence interne de toxines dans les neutrophiles mais n'a pas été concluante. En effet, certains inhibiteurs ont entraîné une altération morphologique des cellules et ne semblent pas être assez spécifiques. Pour remédier à cela, l'utilisation de la transfection sur un modèle adapté comme les macrophages est une bonne piste dans l'étude de la voie d'endocytose, puisqu'il s'agirait ici d'inhiber directement la synthèse des protéines comme la clathrine, la molécule ARF6 ou son activateur ARNO.

La présence des deux toxines dans l'appareil de Golgi montre que la LPV et HlgC/HlgB utilisent le transport rétrograde une fois à l'intérieur de la cellule pour la majorité de la toxine. L'autre partie se retrouve dans les lysosomes pendant les premières minutes, puis la plupart de la LPV et de HlgC/HlgB rejoignent la voie de la dégradation après 3h. Cependant, ces résultats ont été obtenus par visualisation au microscope confocal, ainsi, une étude de la présence des toxines par fractionnement subcellulaire pourrait confirmer nos hypothèses et apporter un aperçu plus précis du transit des leucotoxines dans les différents compartiments intracellulaires.

Chapitre V

Stress cellulaire

1 INTRODUCTION

En étudiant la Leucocidine de Panton et Valentine et l'Hémolysine γ HlgC/HlgB, deux leucotoxines considérées comme formant des pores, nous observons que leur capacité à former des pores sur membranes synthétiques n'est pas forcément transposable sur un modèle cellulaire. En effet, le composé LukS-PV, par exemple, ne diminue pas la résistance membranaire de la cellule U937-C5aR, au contraire de HlgB (Tawk et al., 2015). Cependant, la toxine HlgC/HlgB est également hémolytique, ce qui pourrait expliquer cette différence. En visualisant les deux toxines à l'intérieur de la cellule, nous remettons ainsi en question ce modèle historique de formation de pores à la membrane plasmique. Cependant, l'hypothèse d'un pore n'est pas à écarter, car il pourrait se former sur les membranes de vésicules internes.

Le C5aR étant un récepteur du système du complément, et également un GPCR, il est à l'origine de l'activation de voies de signalisation diverses ayant comme possible impact l'augmentation du calcium intracellulaire, une libération du contenu des granules de sécrétion ou encore la sécrétion de DRO. De ce fait, il est possible que d'autres ligands que le C5a soient à l'origine de bouleversements cellulaires de ce type, comme les sous-unités de classe S qui se fixent sur le C5aR (LukS-PV et HlgC). Le peptide CHIPS sécrété par *S. aureus* est également intéressant, car il se fixe sur le C5aR avec un K_d de 1,1 nM sur les U937-C5aR et inhibe le chimiotactisme de la cellule ainsi que la phagocytose en empêchant la fixation du C5a, cependant il n'est pas internalisé dans le neutrophile comme pour LukS-PV et HlgC (Postma et al., 2004). De plus, nous savons à présent que c'est le composé F des deux leucotoxines (LukF-PV et HlgB) qui induit la signalisation intracellulaire (Tawk et al., 2015). Il est donc fort possible qu'un récepteur ou un ligand soit également associé à la fixation du composant F sur la cellule, ou tout du moins pour LukF-PV (Meyer et al., 2009). Ainsi, notre étude s'est portée sur la caractérisation de la mort cellulaire induite par la LPV ou HlgC/HlgB. La LPV pourrait être considérée comme un facteur nécrosant tandis que HlgC/HlgB peut lyser les érythrocytes (Diep et al., 2010; Ferreras et al., 1998).

Les neutrophiles ont une durée de vie très courte dans la circulation sanguine, de l'ordre de 24h. Ce sont des cellules différenciées qui vont modifier l'expression de leurs récepteurs au cours de leur vieillissement, pour finalement mourir par un processus contrôlé d'apoptose. Genestier *et al.* (2005) a montré qu'une apoptose précoce survient avec la LPV à des concentrations faibles (69 % des cellules à 0,5 nM, 6h d'incubation), tandis que le contact avec des concentrations élevées entraîne une nécrose (61 % des cellules à 5 nM, 1h d'incubation). De plus, ils ont déterminé que les mitochondries étaient atteintes et ont émis l'hypothèse que des pores se formeraient à leur membrane. Nous avons donc cherché l'implication d'une apoptose prématurée ou de la NETose lors d'un contact des neutrophiles avec la LPV ou HlgC/HlgB.

2 PERMEABILISATION CELLULAIRE

En premier lieu, nous avons pu remarquer que l'utilisation du tampon EGTA avec ou sans calcium avait un impact sur la mortalité cellulaire (Figure V.1). En effet, lorsqu'une concentration de 2 nM de LPV est ajoutée aux neutrophiles en présence de 1 mM de calcium (tracé bleu foncé), la perméabilisation au bromure d'éthidium (BET) atteint 500 unités de fluorescence à 14 min tandis que sans calcium (tracé bleu clair), ce point est atteint à 9 min. De même avec HlgC/HlgB, les 500 unités de fluorescence sont atteintes à 5 min avec calcium (tracé rouge foncé) contre 4 min sans calcium (tracé rouge clair). Aussi, la toxine HlgC/HlgB entraîne une augmentation plus importante de la perméabilisation membranaire que la LPV. L'entrée de BET dans la cellule commence dès les premières secondes alors qu'il faut un temps de latence d'environ 4 min pour la LPV avant de montrer un effet sur les neutrophiles. De manière générale, le tampon EGTA sans calcium induit une plus grande perméabilité des membranes au BET tandis que la présence de calcium semble avoir un effet protecteur, sûrement dû à l'internalisation des toxines dans la cellule. De plus, les sous-unités seules n'induisent aucune augmentation de la fluorescence du BET, démontrant ainsi qu'il faut les deux composés des leucotoxines pour avoir un effet sur la perméabilisation des membranes, tout comme pour l'augmentation du calcium intracellulaire.

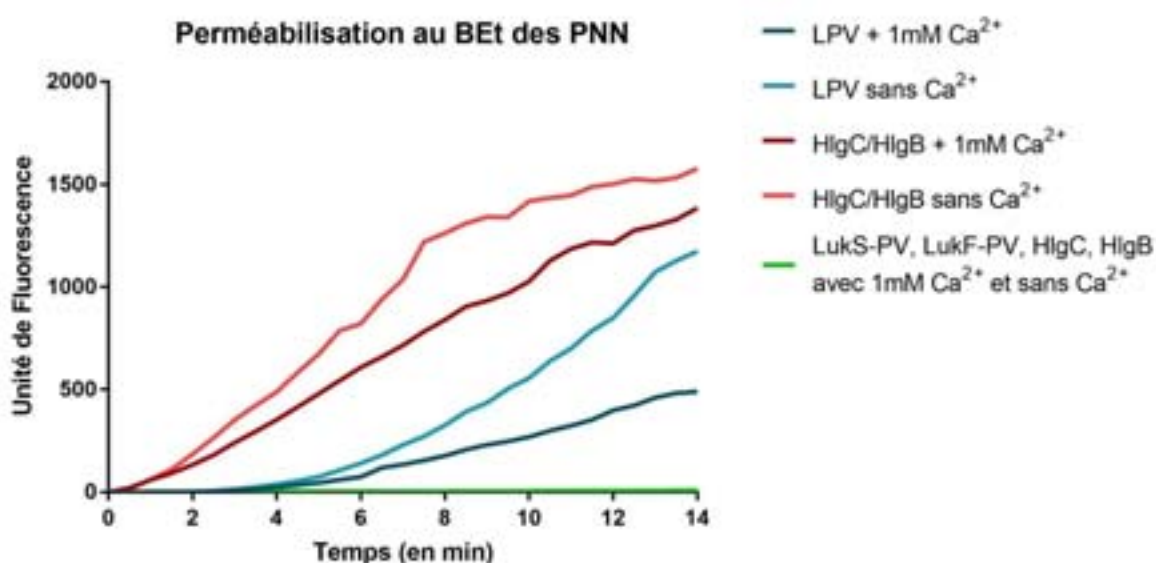


Figure V.1 – Perméabilisation au BET des neutrophiles en contact avec la LPV et HlgC/HlgB avec ou sans calcium
L'absence de calcium dans le milieu extracellulaire entraîne une plus grande perméabilité des cellules au bromure d'éthidium (BET) par rapport au tampon EGTA avec 1 mM de calcium, pour 2 nM de toxines. Les sous-unités seules n'induisent aucun changement de la perméabilité de la membrane des neutrophiles. (n=3)

3 APOPTOSE

Les résultats précédents ont montré la nécessité de travailler dans un milieu comportant du calcium à une quantité physiologique (1 mM), afin de se trouver le plus proche possible des conditions physiologiques. Tout comme les expériences sur le transport intracellulaire ont requis l'utilisation de

RPMI et de 10 % de sérum de veau fœtal, c'est également ainsi que les essais sur l'apoptose ont été menés.

La première étape a été de caractériser les changements de potentiel membranaire sur les mitochondries des neutrophiles en utilisant la sonde JC-1 (Figure V.2). La LPV (A) a un effet significatif sur les mitochondries aux concentrations allant de 0,1 nM à 2 nM, avec environ 60 % de cellules touchées à 6h d'incubation avec la toxine. La puromycine, qui est un inducteur de l'apoptose, entraîne une dépolarisation des mitochondries pour 68 % des neutrophiles. Enfin, HlgC/HlgB (B) a un effet sur les mitochondries des neutrophiles seulement à forte concentration (à partir de 2 nM). Les différences entre les deux leucotoxines sont à nouveau visibles et la LPV semble plus délétère pour les mitochondries puisqu'elle a un effet à des concentrations sublytiques, soit 0,1 nM.

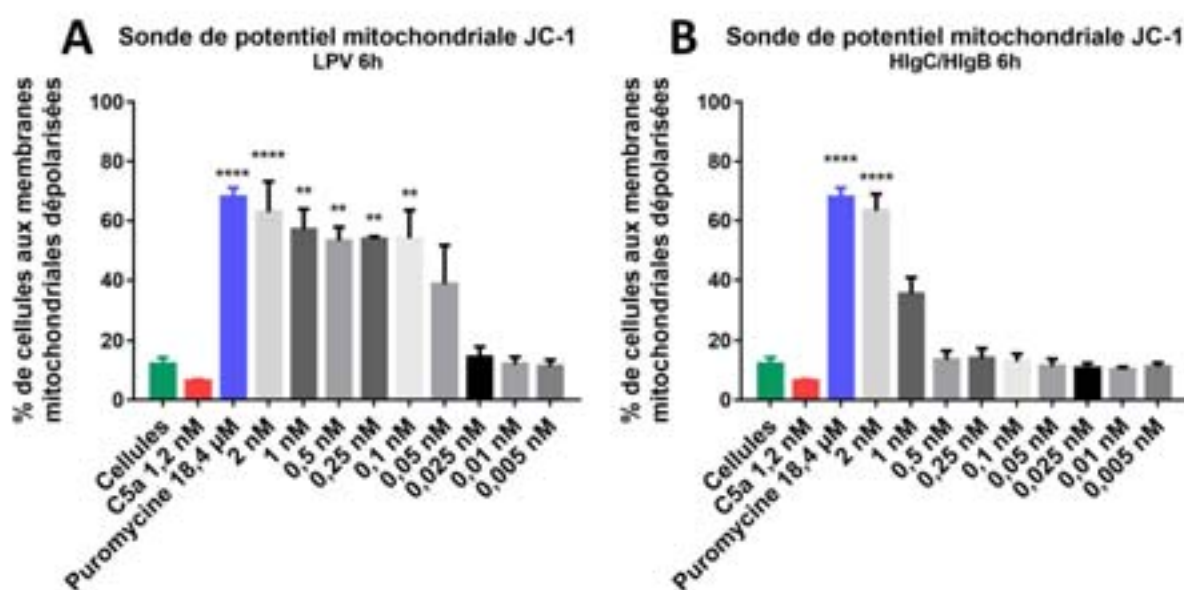


Figure V.2 – Détermination du pourcentage de neutrophiles aux membranes mitochondriales dépolarisées à 6h d'incubation avec la LPV et HlgC/HlgB.

Les concentrations croissantes de LPV (A, 0,1 à 2 nM) entraînent une augmentation significative des cellules aux mitochondries dépolarisées, tout comme pour le contrôle puromycine, contrairement à HlgC/HlgB (B) où seul 2 nM induit cette dépolarisation (n=4).

L'Annexine V et le contre-marquage à l'iodure de propidium (IP) est un test couramment utilisé pour la détermination des populations de cellules en apoptose précoce ou en nécrose. Ainsi, des temps d'incubation de 3h, 6h, 20h et 26h ont permis de mettre en évidence une action des toxines dès 3h, alors qu'à 20h et 26h il n'y a plus que 20 à 40 % de cellules encore vivantes dans le contrôle.

À 3h (Figure V.3), la LPV (A) induit une perméabilisation des neutrophiles à partir de 0,5 nM ($p < 0,01$) et jusqu'à 2 nM ($p < 0,001$) qui touche environ 50 % de la population (tracé rouge). À 6h (C), l'iodure de propidium est toujours incorporé pour 50 % de la population, mais cela concerne également la concentration de 0,25 nM de LPV ($p < 0,001$). Statistiquement, HlgC/HlgB ne montre aucune

perméabilisation membranaire pour les temps de 3h (B) et de 6h (D), même s'il semble y avoir un léger effet pour 2 nM de toxine à 6h (36 % des cellules, non significatif).

Concernant l'apoptose précoce, le contrôle positif de la puromycine montre 64 % ($p < 0,0001$) de neutrophiles en apoptose, alors qu'aucune des deux toxines ne semble avoir un effet significatif sur l'induction de cette mort programmée.

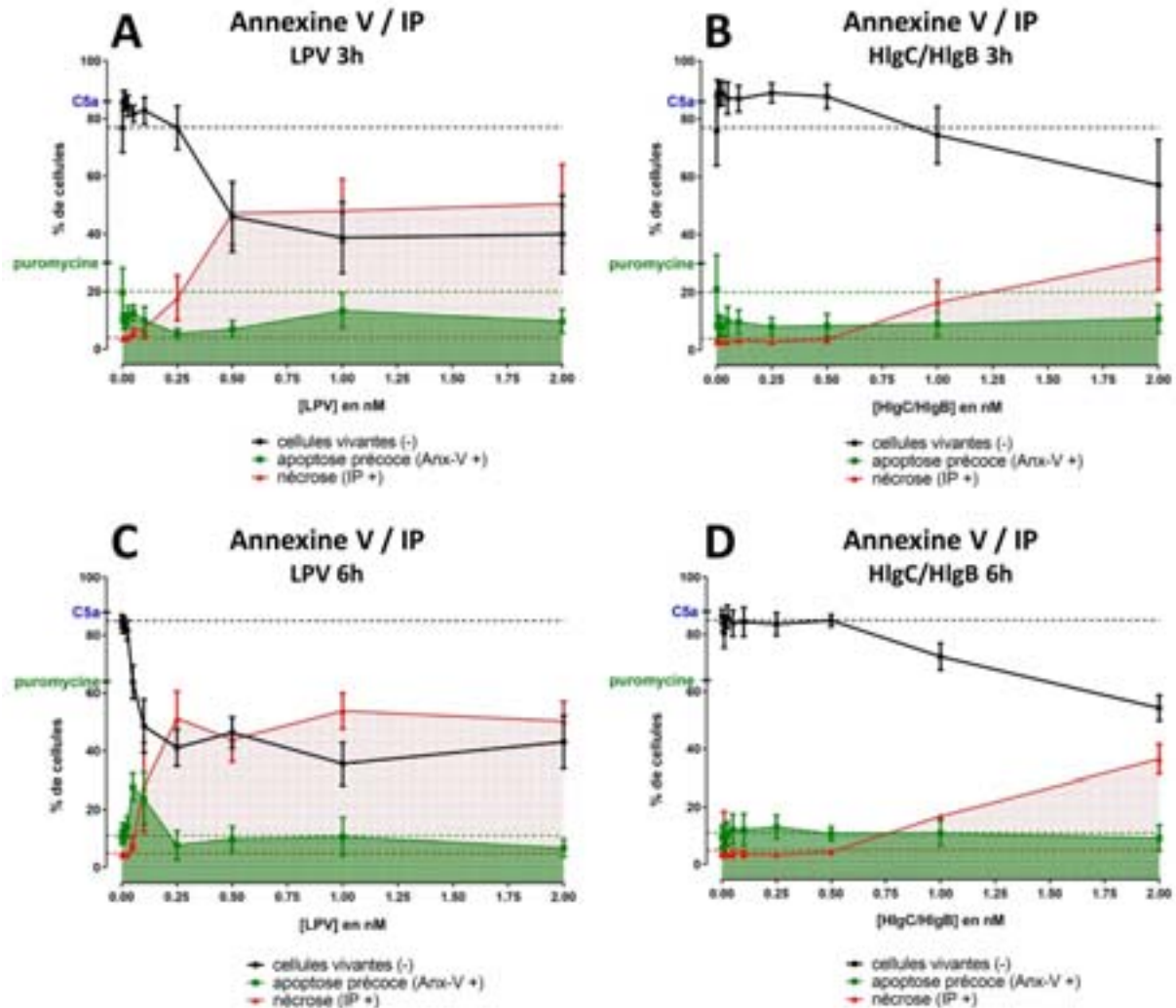


Figure V.3 – Courbe dose réponse de la LPV et HlgC/HlgB sur l'apoptose et la nécrose

L'Annexine V permet de mettre en évidence de l'apoptose précoce pour la puromycine à 6h (C et D, en vert sur l'axe des Y). L'iodure de propidium (IP) montre une perméabilisation des membranes pour la LPV à des concentrations de 0,25 nM à 2 nM à 3h (A, tracé rouge) et également pour la concentration de 0,25 nM à 6h (C). Aucun effet statistiquement significatif n'est visible avec HlgC/HlgB, à 3h (B) ou 6h (D) par rapport au contrôle des cellules seules (lignes pointillées). Le C5a (en bleu sur l'axe des Y) n'entraîne aucun changement par rapport au contrôle. (n=4)

Lorsqu'il est utilisé comme contre-marquage de l'Annexine V, l'iodure de propidium est considéré comme marqueur de la nécrose. En effet, il ne peut pénétrer dans la cellule et se lier aux acides nucléiques seulement quand la membrane est endommagée. Cependant, cette perméabilisation des membranes visible avec la LPV pourrait également être synonyme d'une autre mort cellulaire comme la NETose, qui entraîne également une perte de l'intégrité membranaire.

Concernant la détection à la surface membranaire de l'apoptose, l'Annexine V est couramment employée dans les publications scientifiques, mais le test TUNEL est beaucoup plus performant et sensible. Nous l'avons donc utilisé afin de mettre en évidence l'apoptose précoce sur les neutrophiles en contact avec la LPV, comme montré précédemment par Genestier *et al.* (2005). La fragmentation de l'ADN cellulaire est ainsi visible par cette méthode et le contrôle du test avec DNase I atteint presque le 100 % de cellules dans les trois réplicats (Figure V.4). La fragmentation de l'ADN avec la puromycine, le témoin positif de l'apoptose, concerne 77 % des cellules. De plus, la LPV à une concentration de 1 nM ou de 0,25 nM montre également une apoptose significative sur 30 % et 48 % des neutrophiles, respectivement, contre 12 % d'apoptose pour les cellules seules. Ici encore, HlgC/HlgB n'entraîne aucun changement significatif.

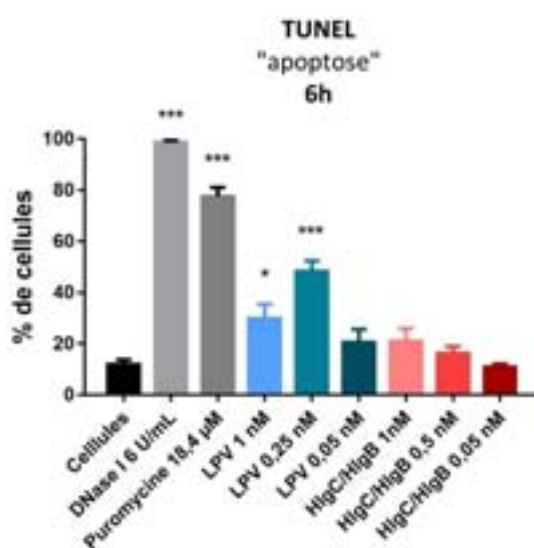


Figure V.4 – Détermination de l'apoptose par méthode TUNEL sur neutrophiles en contact avec la LPV et HlgC/HlgB. Les contrôles positifs de la fragmentation de l'ADN (DNase I) et de l'apoptose (puromycine) induisent une positivité de 99 % et 77 % des neutrophiles, respectivement. La LPV induit également une apoptose pour les concentrations de 1 et 0,25 nM. Aucun effet n'est visible avec HlgC/HlgB. (n=3)

Afin de pousser notre étude sur l'apoptose, une recherche de l'activation des caspases 8 et 9, impliquées respectivement dans la voie extrinsèque et intrinsèque, a été menée. Aucune bande correspondante à la caspase 8 (18 kDa) n'a pu être retrouvée à 3h d'incubation, contrairement à la caspase 9 (10 kDa). En effet, la forme active – donc clivée – de la caspase 9 (Figure V.5) semble présente dans tous les échantillons, même le témoin négatif avec les cellules seules.

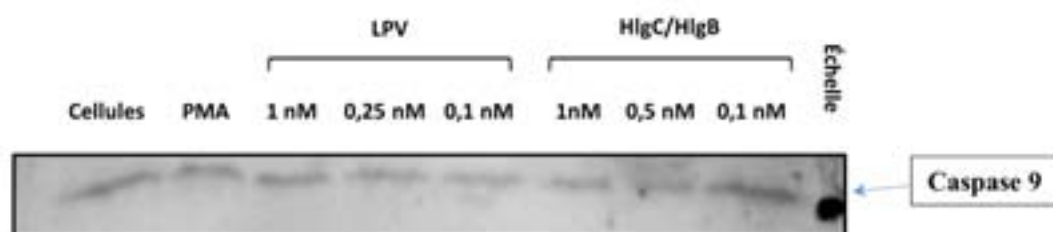


Figure V.5 – Étude au Western Blot de la présence de la caspase 9 après un contact avec la LPV ou HlgC/HlgB

Une bande de 10 kDa est visible sur le gel dans tous les échantillons à 3h d'incubation des neutrophiles, elle correspond à la caspase 9 (n=1).

En conclusion, entre 0,25 et 1 nM, la LPV entraînerait une apoptose prématurée des neutrophiles, de même qu'une perméabilisation de la membrane pour cet intervalle, mais également pour des concentrations plus hautes. Dans cette partie, nous avons pu voir que HlgC/HlgB n'avait aucun effet sur la mortalité de la cellule. C'est ainsi que nous nous sommes penchés sur un autre type de morte cellulaire spécifique aux neutrophiles : la NETose.

4 NETose

Cette forme de mort cellulaire a été démontrée récemment en collaboration avec V. Mazzoleni (Master 2) et se traduit par le relargage du contenu cellulaire – en majorité de la chromatine, des histones et des enzymes – en une sorte de filet appelé Neutrophil Extracellular Trap (NET) qui piège les pathogènes. Plusieurs molécules interviennent pour induire cette mort cellulaire, en particulier des enzymes comme l'élastase de neutrophile (EN). C'est cette protéine que nous avons suivie en microscopie à épifluorescence afin d'étudier la formation des NET.

Les neutrophiles ont ainsi été mis en contact avec les toxines pendant 10 min, 1h (non montré), 3h ou 6h (Figure V.6). Aucune présence d'EN n'est visible dans les cellules à 10 min. Le contrôle positif est le Phorbol Myristate Acétate (PMA) à 50 μ M qui active la PKC et entraîne à 3h une formation importante de NET, tout comme la LPV 1 nM (47 % et 52 %, respectivement). À 6h, l'effet est encore plus visible et la positivité à l'EN concerne environ 60 % des neutrophiles pour les concentrations de LPV à 0,1 – 0,25 – 1 nM. HlgC/HlgB ne montre aucun marquage à l'EN significativement différent du témoin négatif des cellules seules.

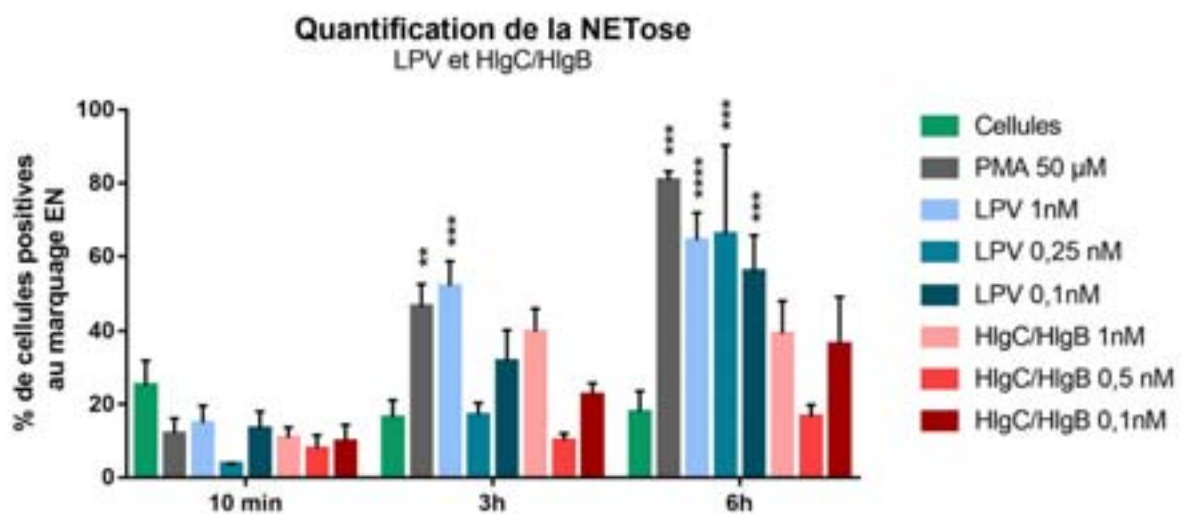


Figure V.6 – Positivité des neutrophiles à l'élastase de neutrophile (EN) après un contact avec la LPV et HlgC/HlgB. Le contrôle positif du PMA montre un marquage à l'EN dès 3h (47 %) et jusqu'à 6h (81 %). La LPV montre un effet dès 3h pour 1 nM, et pour toutes les concentrations testées à 6h. HlgC/HlgB n'a aucun effet significatif sur les cellules. (n=3–5)

Les résultats précédents ont été obtenus grâce à la quantification sur images de microscopie à épifluorescence (Figure V.7). Le relargage du contenu de la cellule, marqué par l'EN, est nettement visible pour le PMA dès 3h, et encore plus à 6h (**A**). Avec la LPV à 1 nM (**B**), les NET commencent à se former dès 1h pour atteindre à 6h un recouvrement du plan d'observation très intense. Enfin, pour la LPV à 0,25 nM (**C**), les images sont bien corrélées avec les résultats précédents et un effet est visible seulement à partir de 6h d'incubation.

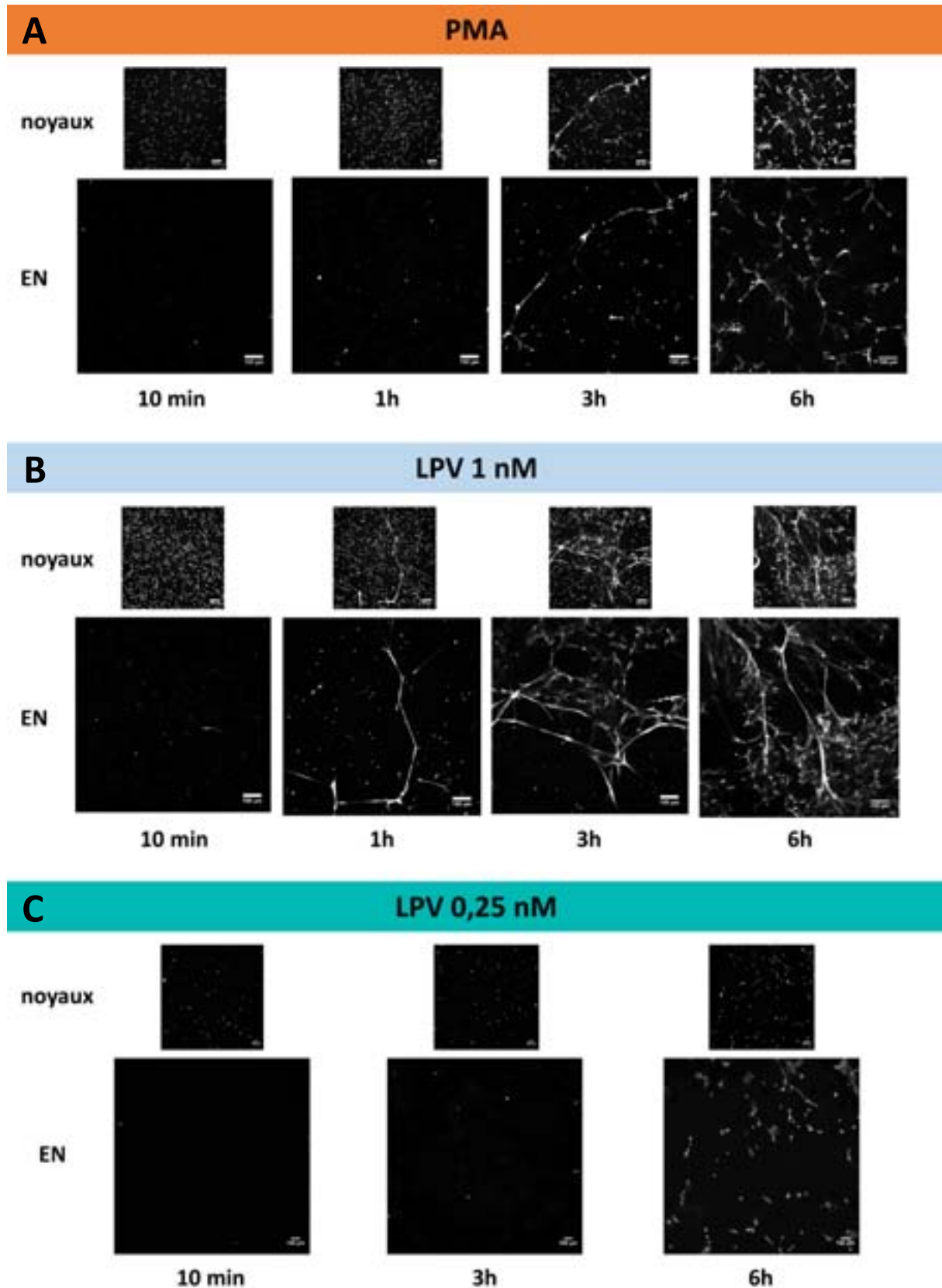


Figure V.7 – Visualisation de la formation de NET par l'EN sur les neutrophiles en contact avec la LPV
Le contrôle positif du PMA induit une formation intense des NET dès 3h. La LPV 1 nM entraîne un marquage net à l'EN à partir de 1h pour devenir très fort à 6h. Enfin, 0,25 nM de LPV montre un effet seulement à 6h. Grossissement x 100.

Plusieurs étapes sont nécessaires à la NETose et il apparaît que, pour une stimulation via le PMA, l'activation de l'autophagie et de la NADPH oxydase sont essentielles (Remijsen et al., 2011a; Wartha et al., 2007). L'utilisation du diphénylène iodonium (DPI) permet ainsi l'inhibition de la NADPH oxydase en ciblant le flavocytochrome b558 qui compose NOX2 (Bedard and Krause, 2007). Nous l'avons donc testé sur la formation de NET (Figure V.8).

Les résultats préliminaires avec 10 μM de DPI montrent tout d'abord un effet sur les cellules en contact avec le PMA avec une réduction de 78 % des cellules positives à l'EN. Avec la LPV 1 nM et 0,25 nM, un effet d'inhibition de la formation de NET est également visible et concerne 21 % et 7 % des cellules, respectivement. Cependant, cette expérience doit être reproduite, car la LPV à 1 nM ou 0,25 nM entraîne en général une formation de NET chez 60 % des cellules contre 20 à 30 %, ici.

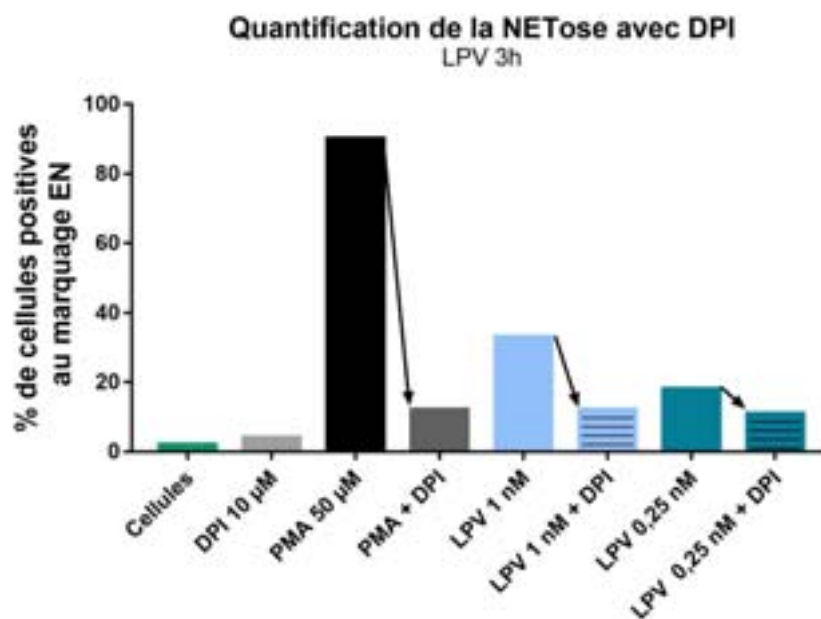


Figure V.8 – Inhibition de la NADPH oxydase par le DPI et effet sur la formation des NET

L'ajout de DPI entraîne une baisse du pourcentage de cellules marquées à l'EN pour les trois conditions étudiées : PMA, LPV 1 nM et LPV 0,25 nM (n=1).

Si l'activation de la NADPH semble nécessaire à la NETose, il en est de même pour l'autophagie, un processus de séquestration et de dégradation des molécules et des organites grâce aux lysosomes. Les différentes expériences avec la LPV et HlgC/HlgB à des temps longs d'incubation (1h, 3h ou 6h) n'ont montré aucun résultat significatif. De plus, Remijsen *et al.* (2011) a montré que l'autophagie avec le PMA survenait à partir de 15 min d'incubation, ce qui nous a poussés à nous intéresser à un temps de 10 min d'incubation avec les deux toxines (Figure V.9). Ainsi, seules la LPV à 0,25 nM et HlgC/HlgB à 0,1 nM montrent une variation de l'intensité de fluorescence de l'image à 10 min : le coefficient de variabilité passe de 0,52 pour les cellules seules à 1,14 pour la LPV et 1,17 pour HlgC/HlgB ($p < 0,05$).

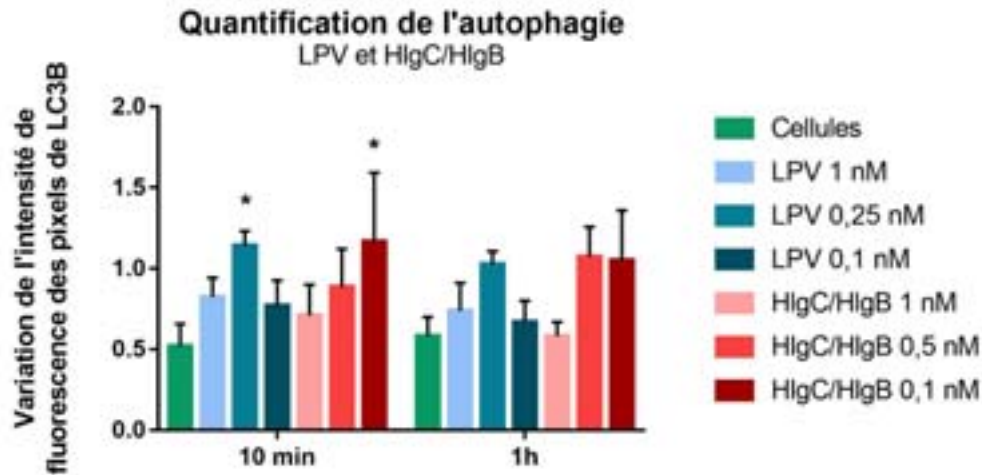


Figure V.9 – Étude de la variation d'intensité de fluorescence de l'image du marquage LC3B avec la LPV ou HlgC/HlgB. La LPV à 0,25 nM et HlgC/HlgB à 0,1 nM entraîne une variation de l'intensité de signal, démontrant ainsi l'activation de l'autophagie (n=3).

La LPV semble donc induire de la NETose avec une activation de la NADPH oxydase et de l'autophagie. À l'inverse, HlgC/HlgB entraîne seulement une activation de l'autophagie à des doses faibles. Cependant, les toxines n'ont pas seulement un effet sur la mort cellulaire ou l'autophagie, mais plus généralement, elles peuvent induire d'autres bouleversements dans la cellule.

5 SIGNALISATION INTRACELLULAIRE

Un premier essai de caractérisation des voies de signalisation intracellulaires dans les neutrophiles a été effectué. L'idée était de cibler des molécules clés de certaines voies comme la PI3K ou ERK afin d'étudier leur présence par Western Blot. Cependant, les résultats préliminaires avec ERK ne sont pas exploitables, contrairement à ceux avec la PI3K (Figure V.10). La phosphorylation de la sous-unité p85 α de la PI3K est visible par une bande à 85 kDa, que nous retrouvons après un contact des neutrophiles avec 0,25 et 1 nM de LPV, ainsi qu'avec HlgC/HlgB à 1 nM. Le contrôle avec le PMA montre également cette bande mais l'intensité est plus faible. Enfin, la bande correspondant à p85 α en présence de 1 nM de LPV est très intense par rapport aux autres.

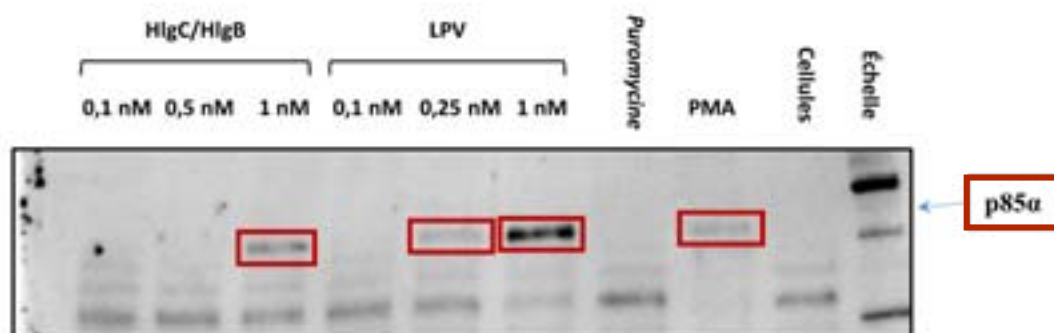


Figure V.10 – Visualisation de la phosphorylation de la sous-unité p85 α de la PI3K après contact avec les toxines

La bande à 85 kDa est présente après un contact avec la LPV à 1 nM où elle est très intense. Une concentration plus faible de 0,25 nM montre une intensité plus faible, tout comme pour HlgC/HlgB 1 nM ou le contrôle PMA (n=1).

6 DISCUSSION

6.1 CONCLUSION

Dans des conditions physiologiques de culture et à 6h d'incubation avec la LPV, l'apoptose est effectivement observée à des concentrations de 0,25 nM et 1 nM, ainsi qu'une perméabilisation des membranes des neutrophiles dès 0,25 nM. Ces résultats appuient les conclusions de Genestier *et al.* (2005) sur l'apoptose déclenchée par des concentrations faibles de LPV. Cependant, la perméabilisation des membranes que cette équipe associe à de la nécrose est effective à faible concentration, alors qu'ils démontraient que cela ne concernait que les fortes concentrations comme 5 nM. De plus, cette perte d'intégrité des membranes ne semble pas forcément associée au phénomène de nécrose, mais plus sûrement à de la NETose. En effet, la NETose intervient dans les mêmes temps d'incubation, pour les mêmes concentrations de LPV et concernent le même pourcentage de cellules que pour les cellules perméables à l'iodure de propidium. Les neutrophiles en contact avec la LPV entreraient donc précocement en apoptose pour une part, ou en NETose pour une autre partie de la population cellulaire. Enfin, HlgC/HlgB n'entraîne aucune conséquence pour le neutrophile, que ce soit au niveau d'une perméabilisation de la membrane plasmique, de l'apoptose ou encore de la NETose. Cependant, HlgC/HlgB est impliqué dans une activation de l'autophagie à faible concentration (0,1 nM), tout comme la LPV à 0,25 nM.

L'absence d'activation de la caspase 8 suggérerait que la voie extrinsèque n'est pas celle utilisée par la LPV pour déclencher l'apoptose. De plus, la présence de la forme active de la caspase 9 dans toutes les conditions serait due au fait que le neutrophile est une cellule qui entre naturellement en apoptose à la fin de sa vie, et cette apoptose s'opère via à la voie intrinsèque qui dépend des mitochondries. Il s'agit de résultats préliminaires et les expériences sont à poursuivre, afin de confirmer ou non l'hypothèse de Genestier *et al.* (2005) sur l'activation de la voie intrinsèque lors d'un contact des cellules avec la LPV.

La différence de résultats entre le test TUNEL et celui de l'Annexine V montre effectivement que la méthode TUNEL est plus performante et plus sensible pour quantifier l'apoptose. En effet, pour le témoin de l'apoptose, la puromycine, le TUNEL permet d'observer un pourcentage de cellules positives au marquage de plus de 10 % supérieur à celui retrouvé avec l'Annexine V. De plus, les résultats d'un donneur à l'autre sont plus reproductibles avec la méthode TUNEL. L'Annexine V permet d'étudier les changements membranaires tandis que la méthode TUNEL permet l'observation de la fragmentation de l'ADN. Cette dernière est très reproductible et l'erreur à la moyenne est relativement faible, ce qui n'était pas le cas avec l'Annexine V. De plus, il est à noter une grande variabilité dans les résultats lors de la détermination de l'apoptose avec l'Annexine V, de la NETose ou encore de l'autophagie. En effet, entre

4 à 8 expériences ont été nécessaires dans ces cas-là afin d'obtenir des contrôles représentatifs et des résultats significatifs. Cette variation entre les expériences pourrait être causée par le type d'analyse et la méthode utilisée, mais également par la différence entre les populations de neutrophiles. Effectivement, une population de neutrophiles donnée n'est pas stimulable de manière homogène et toutes les cellules ne répondent pas de la même manière. De plus, il existe une différence entre les donneurs, ce qui entraîne également une certaine hétérogénéité dans la réponse des neutrophiles. C'est ainsi que l'utilisation d'un autre modèle cellulaire, dont la population réagira homogènement face à une stimulation donnée, permettra de remédier à ce problème. L'emploi de macrophages, par exemple, semble une bonne alternative aux neutrophiles.

6.2 PERSPECTIVES

L'autophagie et l'activation de la NADPH oxydase NOX2 sont deux éléments qui semblent requis pour le processus de NETose lors d'un contact avec la LPV, tout comme avec le PMA. Cependant, l'implication de ces deux mécanismes nécessite une étude plus approfondie, avec d'autres inhibiteurs de NOX2, par exemple, ou même de l'autophagie. La transfection est également un bon outil qui permettrait d'inhiber complètement l'autophagie (protéine LC3) ou la NADPH oxydase (sous-unité de NOX2), afin d'étudier au mieux l'effet sur la NETose (Dickinson et al., 2011; Mohan et al., 2013).

Également, ce chapitre aborde très rapidement la recherche des voies de signalisation activées lors d'un contact avec la LPV ou HlgC/HlgB. Toutefois, cette question est particulièrement importante pour mieux comprendre le mécanisme d'action de ces toxines et trouver une stratégie de lutte ciblée. Ainsi, la première étape sera de se concentrer sur des molécules clés de certaines voies de signalisation afin de les inhiber. Nous pourrons ainsi étudier plus en avant la PI3K, ERK ou encore les protéines G comme RhoA, Rac2 ou Cdc42 qui sont impliquées dans le remodelage de l'actine, l'adhésion ou encore la formation de la NADPH oxydase.

Chapitre VI

Conclusion

L'ODYSEE DES LEUCOTOXINES DANS LE NEUTROPHILE HUMAIN

APPORTS DE LA THESE

Le C5aR, récepteur du système du complément pour l'anaphylatoxine C5a, est impliqué dans l'activation de nombreuses voies de signalisation via les petites protéines G α , β et γ qui sont associées à ce GPCR. Que ce soit une augmentation du calcium entraînant l'activation de la PKC, les multiples phosphorylations débouchant sur celle d'ERK1/2, l'activation de protéines G comme RhoA ou encore de la PI3K et de Akt, le C5a permet l'activation simultanée de toutes ces voies en tant qu'agoniste complet, ce qui résulte en la formation de la NADPH oxydase et en la production de dérivés réactifs oxygénés (Rabiet et al., 2007). Cette cascade de signalisation est inhibée par la phosphorylation de la partie C-terminale du C5aR qui conduit au détachement des petites protéines G. Dans cette thèse, cette phosphorylation de la partie C-terminale a été retrouvée avec la LPV et HlgC/HlgB pendant les premières minutes de mise en contact. Ensuite, le C5aR-C5a est internalisé dans la cellule par la voie de la clathrine, un phénomène que l'on retrouve avec nos deux leucotoxines, même si la voie d'internalisation utilisée n'a pas encore été confirmée.

Une fois à l'intérieur de la cellule, le C5a lié à son récepteur chemine à travers les vésicules internes pour rejoindre une région péri-nucléaire, comme celle que l'on a pu observer avec la LPV et HlgC/HlgB et qui correspondrait à l'appareil de Golgi, à la région trans-Golgi pour être plus précis (Naik et al., 1997). Ensuite, après une activation avec le C5a, une partie du C5aR est dégradé via les lysosomes, tout comme pour les deux leucotoxines (Suvorova et al., 2005). De plus, il est à noter que la voie du recyclage à la membrane ne semble pas utilisée dans les premières heures avec le C5a, la LPV et HlgC/HlgB, car les β -arrestines restent liées au récepteur de manière stable, ce qui empêche un recyclage rapide.

Il est intéressant d'observer la différence de cinétique entre ces trois ligands. En effet, le C5a entraîne une augmentation du calcium intracellulaire rapide et transitoire alors que ce phénomène survient peu après pour HlgC/HlgB et beaucoup plus tardivement pour la LPV. Ensuite, HlgC/HlgB rejoint rapidement l'appareil de Golgi, dans les premières minutes d'incubation, tout comme pour le C5a-C5aR. Ici encore, la LPV met plus longtemps (20 minutes de plus) avant de se trouver également dans ce compartiment. Toutefois, malgré ces différences, les trois composants sont encore retrouvés après 2 à 3h d'incubation à l'intérieur de la cellule.

Enfin, la sous-unité S des leucotoxines serait responsable de la fixation à la cellule par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique. C'est le cas pour LukS-PV et HlgC qui se lient tous les deux au C5aR. Avec la LPV, l'affinité de fixation de LukS-PV est de 0,17 nM sur les neutrophiles humains et augmente à 0,30 nM sur les macrophages humains dérivés de monocytes. Ainsi, les macrophages feraient un bon

modèle d'étude pour les leucotoxines, en regard de l'affinité de fixation de la LPV et HlgC/HlgB, mais également de sa stabilité et de sa durée de vie en culture.

DISCUSSION

Alors que les leucotoxines se fixent sur les neutrophiles, les macrophages et les lymphocytes transfectés avec le C5aR, il semblerait que la présence du récepteur à la LPV et à HlgC/HlgB soit un prérequis essentiel à la fixation de la toxine sur la cellule cible. Ainsi, il est probable que toutes les cellules humaines comportant le C5aR à sa surface aient la possibilité de fixer LukS-PV et HlgC. Les neurones ont ainsi montré une sensibilité à nos deux leucotoxines (Jover et al., 2013). Toutefois, les mécanismes ne semblent pas comparables aux cellules immunitaires. En effet, les neurones ne meurent pas après un contact avec la LPV ou HlgC/HlgB, contrairement aux neutrophiles, aux macrophages ou encore aux érythrocytes pour l'Hémolysine γ . Au laboratoire, des travaux sur la rétine de lapin sont en cours et ont montré une présence de la LPV sur les cellules ganglionnaires et amacrines tandis que les cellules gliales changent de morphologie, ce qui suggérerait une certaine forme de communication cellulaire. Ces cellules rétiniennes sont des neurones qui permettent l'étanchéité de la barrière hématorétinienne dans l'œil et, s'ils sont ciblés par la LPV, ceci pourrait expliquer l'implication de la toxine dans les cas d'endophtalmie. Ainsi, la signalisation induite par la LPV et HlgC/HlgB est sûrement différente d'un type cellulaire à l'autre, mais les leucotoxines semblent dans tous les cas amener un terrain favorable à la colonisation par *S. aureus*. De plus, il est à noter que les cellules amacrines n'ont pas le récepteur C5aR à leur surface et que la LPV semble se détacher de leur surface après 30 minutes. Ceci suggérerait qu'un récepteur de moindre affinité permettrait la fixation de LukS-PV, et peut-être de HlgC.

PERSPECTIVES

Le cheminement de la LPV et de HlgC/HlgB a été étudié grâce à la microscopie confocale. Cependant, une autre technique comme le fractionnement subcellulaire permettrait une précision supplémentaire dans l'élaboration d'une chronologie de ces deux leucotoxines. De plus, il serait intéressant de montrer l'internalisation et les compartiments internes impliqués lors d'un contact de nos deux toxines avec un autre type cellulaire comme les macrophages. Une meilleure compréhension de ce mécanisme d'endocytose et du transport intracellulaire permettrait peut-être de cibler un élément de ces voies pour empêcher l'action néfaste des toxines.

Nous ne savons pas à quels types d'agonistes appartiennent la LPV et HlgC/HlgB. En effet, le C5a est un agoniste complet pour le C5aR, mais qu'en est-il de nos deux leucotoxines ? S'agirait-il également d'agonistes complets ou d'agonistes partiels ? Un agoniste complet se définirait par sa capacité à activer toutes les voies de signalisations liées au C5aR, comme c'est le cas pour le C5a. Dans le cas d'un agoniste partiel, seules quelques voies seraient impliquées dans la signalisation. La mise en évidence, d'une part, du processus d'internalisation des deux leucotoxines qui pourrait se faire via la clathrine est

important, tout comme, d'autre part, la caractérisation des voies de signalisation activées, de même que l'étude des petites protéines G associées au C5aR. Ceci permettrait de comprendre le mécanisme d'action des leucotoxines et de développer au mieux de possibles traitements.

DES LEUCOTOXINES DANS LA CELLULE ? UN ÉVÈNEMENT NON SANS CONSÉQUENCES

APPORTS DE LA THESE

Genestier *et al.* (2005) a démontré que la LPV à une concentration faible (0,5 nM) conduisait à une apoptose précoce des neutrophiles (69 % des cellules à 6h) tandis qu'une concentration élevée (5 nM) entraînait la nécrose (61 % à 1h). Cette thèse s'est également intéressée à l'apoptose sur les neutrophiles humains et a retrouvé des pourcentages plus bas d'apoptose (48 % à 6h) pour la LPV à faible concentration (0,25 nM). Concernant la nécrose, l'utilisation du BEt ou de l'iodure de propidium ne permettent pas de conclure. En effet, ce sont des marqueurs de perméabilisation membranaire et non de la nécrose directement. Néanmoins, nous avons pu corrélérer le pourcentage de cellules perméables à l'iodure de propidium avec un autre type de mort cellulaire : la NETose, qui concernerait 66 % des cellules avec 0,25 nM de LPV à 6h. Quant à l'Hémolysine γ HlgC/HlgB à des concentrations de 0,1, 0,5 et 1 nM, aucune mort cellulaire ne semble associée même si l'autophagie a pu être détectée à 10 min à la plus faible concentration, de même qu'avec la LPV. Nous avons conclu que la NETose associée à la LPV serait dépendante de l'autophagie et également de NOX, tout comme c'est le cas lors d'une activation par le PMA.

Ces résultats, et ceux préliminaires sur l'activation de la PI3K avec les leucotoxines, sont un premier pas vers la caractérisation des voies de signalisation induite par la LPV et HlgC/HlgB. Cette activation cellulaire est corrélée à la sous-unité F des leucotoxines, comme nous avons pu le démontrer. En effet, HlgB entraîne une formation de pore à la membrane des lymphocytes transfectés avec le C5aR, à l'inverse de LukF-PV. De même, ce sont ces composés qui sont à l'origine de la spécificité de la signalisation calcique. Ainsi, tandis que la sous-unité S permet la fixation à la membrane, la sous-unité F, quant à elle, entraîne la cellule dans un certain type d'activation.

DISCUSSION

Les différences d'activation cellulaire que nous retrouvons pour la LPV et HlgC/HlgB sont nettement visibles et proviendraient donc de la sous-unité F. En effet, la LPV entraîne l'apoptose et la NETose alors que rien n'est observable avec HlgC/HlgB. La différence entre ces deux toxines se situe au niveau du composé F. Il a été démontré que LukF-PV nécessitait un récepteur propre sur la cellule cible, à l'inverse de HlgB qui semble ne requérir que HlgC pour se fixer. Le co-récepteur à la LPV permettrait

donc une activation de la cellule différente en interagissant avec le C5aR, car il est connu qu'une synergie peut s'opérer entre un GPCR et d'autres récepteurs ou ligands de l'immunité comme les TLR ou les intégrines. D'autre part, HlgC/HlgB a un cheminement différent dans la cellule par rapport à la LPV, elle colocalise avec le C5aR et atteint l'appareil de Golgi beaucoup plus précocement. Enfin, si elle ne semble pas entraîner de mort cellulaire, à part une lyse des globules rouges, il est à noter qu'elle induit tout de même de l'autophagie. Ce n'est d'ailleurs pas la seule toxine bactérienne à agir de cette manière. En effet, la cytolysine de *Vibrio cholerae* est une toxine formant des pores mais qui induit également l'autophagie (Gutierrez et al., 2007). Lors d'un contact des cellules intestinales avec une faible concentration de cytolysine, l'autophagie ainsi activée permet la survie cellulaire, alors que des concentrations fortes de cette toxine induiraient seulement la lyse de la cellule, sans autophagie. C'est ce qu'il semblerait également se produire pour HlgC/HlgB, et l'autophagie ainsi déclenchée pourrait donc être protectrice vis-à-vis de la capacité de l'Hémolysine γ à lyser la cellule – probablement due à sa capacité à former des pores. D'autres toxines modulent l'autophagie, comme la ricine qui l'active pour permettre la lyse de la cellule. Ainsi, les toxines activent l'autophagie dans un mécanisme permettant la viabilité ou au contraire, la mort cellulaire. L'orientation de la réponse dépend de l'habileté de chaque toxine à moduler la signalisation de l'autophagie. La LPV pourrait donc induire une autophagie délétère pour le neutrophile, au contraire de HlgC/HlgB qui induirait une réponse protectrice.

La population de neutrophiles n'est pas homogène lors d'un contact avec la LPV. Ainsi, l'apoptose et la NETose sont présentes dans des portions similaires, mais la question se pose de savoir ce que choisirait un autre type de cellule avec une population homogène, comme les macrophages. Quel mécanisme prédominerait ? Car les macrophages sont également connus pour faire de la NETose, dans un processus nommé Macrophage Extracellular Trap (Wong and Jacobs, 2013). Alors que la NETose est activée pour la LPV, dans un mécanisme qui semble dépendant de l'autophagie et de NOX, il est à noter qu'il existe également une NETose indépendante de NOX avec une génération des dérivés réactifs oxygénés via les mitochondries (Stoiber et al., 2015). Au contraire de la NETose dépendante de NOX, celle indépendante est accompagnée de l'activation de ERK et de Akt, deux éléments de la signalisation du C5aR. La nécessité d'étudier les voies d'activation liées aux protéines G du récepteur prend encore une fois tout son sens.

Le modèle historique de formation du pore semble fonctionner en absence de conditions physiologiques de calcium, comme c'est le cas sur les membranes synthétiques ou lors d'étude de la résistance membranaire. Ainsi, en absence de calcium, par exemple, les neutrophiles humains meurent rapidement lors d'un contact avec la LPV, peut-être à cause de la lyse cellulaire induite par les pores à la membrane plasmique. Toutefois, en condition physiologique, la mort survient longtemps après, à partir de 3h à fortes concentrations de LPV. Cette différence peut s'expliquer par l'internalisation. En effet, il faut des conditions physiologiques pour que l'internalisation puisse avoir lieu, du moins dans la voie dépendante de la clathrine. Il semblerait donc que l'internalisation des leucotoxines à l'intérieur de la cellule

empêche la formation d'un pore à la surface, et donc la lyse osmotique. Néanmoins, la possibilité qu'un pore se forme effectivement à la membrane des compartiments intracellulaires n'est pas à écarter.

En activant la NETose en conditions physiologiques, la LPV induit un processus qui inhiberait l'invasion de *S. aureus*. Cependant, la bactérie sécrète un large panel de facteur de virulence comme la DNase qui peut inhiber la NETose en clivant la chromatine. Grâce à cette molécule, l'action anti-bactérienne de la NETose est inhibée et la bactérie peut acquérir les nutriments ainsi relargués dans le milieu. D'autres enzymes permettent à *S. aureus* d'avoir des conditions de vie idéale dans l'hôte, c'est le cas de la catalase. Celle-ci inhibe l'effet des DRO en entraînant une production d'oxygène, ce qui permet de recréer un microenvironnement aérobie pour la bactérie et permet ainsi sa prolifération.

PERSPECTIVES

La caractérisation de la NETose est essentielle. Nous avons abordé le fait que la LPV entraînait une NETose dépendante de NOX2 pour les neutrophiles, et ceci resterait à confirmer. Ainsi, la recherche de l'origine des DRO (mitochondriale ou à partir de NOX) à travers différentes concentrations de LPV ou temps d'incubation serait intéressante, afin d'observer si des différences d'activation de la NETose peuvent apparaître. De même, l'autophagie impliquée dans la NETose est à approfondir, surtout que HlgC/HlgB induit également ce mécanisme dans la cellule. La mise en évidence du récepteur à LukF-PV permettrait de grandes avancées, il pourrait s'agir d'un TLR, par exemple, car il est connu que des TLR peuvent induire de la NETose (Kusunoki et al., 2016). Enfin, l'utilisation de macrophages permettrait d'étudier l'implication des Macrophage Extracellular Traps lors d'un contact avec la LPV, ou peut-être même avec HlgC/HlgB.

UNE AFFAIRE A SUIVRE...

Au contraire de la plupart des domaines scientifiques, la microbiologie est une discipline relativement récente. En effet, il fallut attendre les découvertes de Louis Pasteur (1822-1895) et de Koch (1843-1910) pour que les micro-organismes soient enfin révélés au grand jour et associés à certaines maladies, mais également au processus de fermentation alimentaire. De tout temps, les épidémies ont ravagé les terres avant l'arrivée des premiers antibiotiques. Ce n'est qu'en 1928 qu'Alexander Fleming montra qu'une moisissure, le *Penicillium*, empêchait la prolifération des bactéries, ouvrant ainsi le champ à l'antibiothérapie actuelle. À présent, les épidémies bactériennes comme celles de peste sont rapidement enrayerées, mais le XXI^e siècle se retrouve confronté à d'autres types d'épidémies, voire de pandémies, comme c'est le cas pour le SIDA, les hépatites, la malaria ou, plus récemment, les virus Ebola et Zika.

À l'inverse des virus, les bactéries semblent moins dangereuses, car une dizaine de familles d'antibiotiques existent pour s'en prémunir. Pourtant, les résistances multiples se répandent et les SARM concernent tout de même 17,4 % des souches en France en 2014 (European Centre for Disease

Prevention and Control), même si ce chiffre a montré une diminution sensible de 16 % depuis 2001. Il en demeure que *S. aureus* est un pathogène dangereux, notamment en raison de son arsenal de facteurs de virulence très développé. Les recherches sur les leucotoxines s'étalent sur plusieurs décennies à présent, cependant nous sommes encore loin de comprendre leur fonctionnement.

Pendant ces dernières années, l'hypothèse de la formation d'un pore à la membrane plasmique de la cellule est demeurée inchangée, appuyée par des techniques de cristallographie et d'expérimentation sur membranes synthétiques. Ce n'est que récemment que les premiers récepteurs de ces leucotoxines se sont révélés : C5aR pour la LPV et HlgC/HlgB, CD11b pour LukA/LukB, CCR5 et CXCR1/2 pour LukE/LukD, etc, apportant la preuve qu'autre chose semblerait se jouer dans la cellule en relation avec ces récepteurs de l'immunité, pour certains des GPCR. Nous n'en sommes qu'aux balbutiements pour comprendre la signalisation spécifique liée aux leucotoxines, mais cette thèse apporte sa contribution dans l'optique de s'extraire de cette hypothèse historique de formation d'un pore à la membrane de la cellule (**Figure VI.11**). Une meilleure compréhension du mécanisme d'action de ces toxines permettrait l'émergence de thérapies ciblées, utilisées conjointement avec un traitement antibiotique, ceci dans le but de renforcer notre capacité à répondre à de telles menaces.

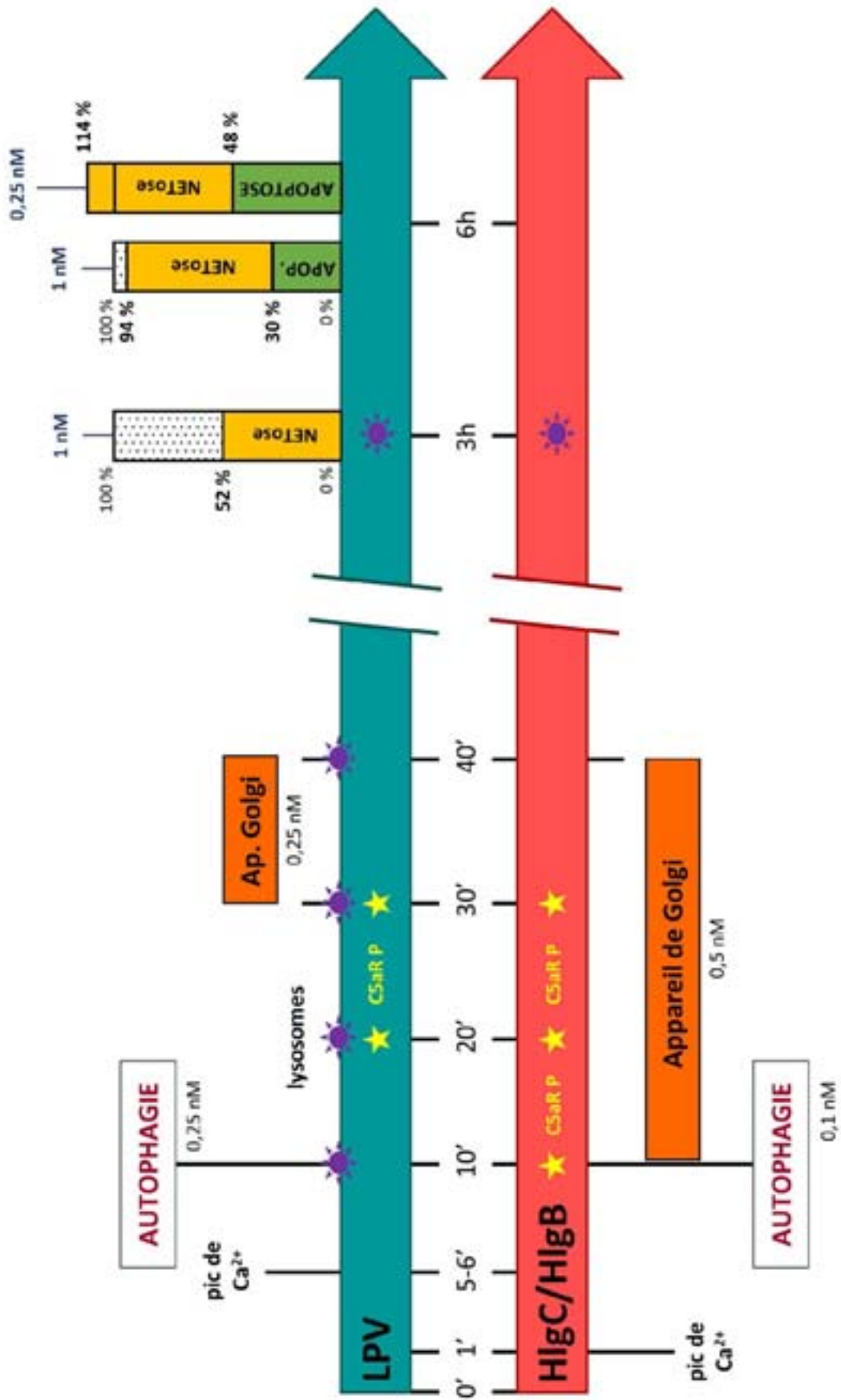


Figure VI.11 – Chronologie des événements liés à la LPV ou à HlgC/HlgB sur les neutrophiles humains

Chapitre VII

Bibliographie

- Adrover, J.M., Nicolás-Ávila, J.A., and Hidalgo, A. (2016). Aging: A Temporal Dimension for Neutrophils. *Trends Immunol.* 37, 334–345.
- Alder, J. (2008). The Use of Daptomycin for Staphylococcus Aureus Infections in Critical Care Medicine. *Crit. Care Clin.* 24, 349–363.
- Alessandrini, A., Viero, G., Dalla Serra, M., Prévost, G., and Facci, P. (2013). γ -Hemolysin oligomeric structure and effect of its formation on supported lipid bilayers: an AFM investigation. *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 405–411.
- Alibayov, B., Baba-Moussa, L., Sina, H., Zdeňková, K., and Demnerová, K. (2014). Staphylococcus aureus mobile genetic elements. *Mol. Biol. Rep.* 41, 5005–5018.
- Almyroudis, N.G., Grimm, M.J., Davidson, B.A., Rohm, M., Urban, C.F., and Segal, B.H. (2013). NETosis and NADPH oxidase: at the intersection of host defense, inflammation, and injury. *Front Immunol* 4, 45.
- Alonzo, F., and Torres, V.J. (2014). The bicomponent pore-forming leucocidins of Staphylococcus aureus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 78, 199–230.
- Arazna, M., Pruchniak, M.P., and Demkow, U. (2013). Neutrophil extracellular traps in bacterial infections: Strategies for escaping from killing. *Respir Physiol Neurobiol.*
- Archer, N.K., Mazaitis, M.J., Costerton, J.W., Leid, J.G., Powers, M.E., and Shirtliff, M.E. (2011). Staphylococcus aureus biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence* 2, 445–459.
- Baba Moussa, L., Werner, S., Colin, D.A., Mourey, L., Pédelacq, J.D., Samama, J.P., Sanni, A., Monteil, H., and Prévost, G. (1999a). Discoupling the Ca(2+)-activation from the pore-forming function of the bi-component Panton-Valentine leucocidin in human PMNs. *FEBS Lett.* 461, 280–286.
- Baba Moussa, L., Werner, S., Colin, D.A., Mourey, L., Pedelacq, J.D., Samama, J.P., Sanni, A., Monteil, H., and Prevost, G. (1999b). Discoupling the Ca(2+)-activation from the pore-forming function of the bi-component Panton-Valentine leucocidin in human PMNs. *FEBS Lett* 461, 280–286.
- Baba-Moussa, L., Sina, H., Scheftel, J.M., Moreau, B., Sainte-Marie, D., Kotchoni, S.O., Prevost, G., and Couppie, P. (2011). Staphylococcal Panton-Valentine leucocidin as a major virulence factor associated to furuncles. *PLoS One* 6, e25716.
- Badarau, A., Rouha, H., Malafa, S., Logan, D.T., Håkansson, M., Stulik, L., Dolezilkova, I., Teubenbacher, A., Gross, K., Maierhofer, B., et al. (2015). Structure-function analysis of heterodimer formation, oligomerization, and receptor binding of the *Staphylococcus aureus* bi-component toxin LukGH. *J. Biol. Chem.* 290, 142–156.
- Badiou, C., Dumitrescu, O., Croze, M., Gillet, Y., Dohin, B., Slayman, D.H., Allaouchiche, B., Etienne, J., Vandenesch, F., and Lina, G. (2008). Panton-Valentine leukocidin is expressed at toxic levels in human skin abscesses. *Clin Microbiol Infect* 14, 1180–1183.
- Batard, É., Ferron-Perrot, C., Caillon, J., and Potel, G. (2005). Antibiothérapie des infections causées par *Staphylococcus aureus*. *Médecine Thérapeutique* 11, 395–403.
- Bedard, K., and Krause, K.-H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 87, 245–313.

- Ben Zakour, N.L., Beatson, S.A., van den Broek, A.H.M., Thoday, K.L., and Fitzgerald, J.R. (2012). Comparative genomics of the *Staphylococcus intermedius* group of animal pathogens. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2, 44.
- Benmerah, A., and Lamaze, C. (2002). Endocytose : chaque voie compte! *médecine/sciences* 18, 1126–1136.
- Bergan, J., Dyve Lingelem, A.B., Simm, R., Skotland, T., and Sandvig, K. (2012). Shiga toxins. *Toxicol. Off. J. Int. Soc. Toxicology* 60, 1085–1107.
- Berridge, M.J. (2016). The Inositol Trisphosphate/Calcium Signaling Pathway in Health and Disease. *Physiol. Rev.* 96, 1261–1296.
- Bestebroer, J., Poppelier, M.J.J.G., Ulfman, L.H., Lenting, P.J., Denis, C.V., Kessel, K.P.M. van, Strijp, J.A.G. van, and Haas, C.J.C. de (2007). Staphylococcal superantigen-like 5 binds PSGL-1 and inhibits P-selectin-mediated neutrophil rolling. *Blood* 109, 2936–2943.
- Blott, E.J., and Griffiths, G.M. (2002). Secretory lysosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 122–131.
- Blouin, C.M. (2013). Endocytose sans clathrine - La voie est libre ! *médecine/sciences* 29, 890–896.
- Boulay, F., and Rabiet, M.-J. (2005). The chemoattractant receptors FPR and C5aR: same functions--different fates. *Traffic Cph. Den.* 6, 83–86.
- Braun, L., Christophe, T., and Boulay, F. (2003). Phosphorylation of key serine residues is required for internalization of the complement 5a (C5a) anaphylatoxin receptor via a beta-arrestin, dynamin, and clathrin-dependent pathway. *J Biol Chem* 278, 4277–4285.
- Breshears, L.M., Schlievert, P.M., and Peterson, M.L. (2012). A disintegrin and metalloproteinase 17 (ADAM17) and epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling drive the epithelial response to *Staphylococcus aureus* toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1). *J. Biol. Chem.* 287, 32578–32587.
- Brinkmann, V., and Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol* 198, 773–783.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., and Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303, 1532–1535.
- Brinkmann, V., Goosmann, C., Kühn, L.I., and Zychlinsky, A. (2012). Automatic quantification of in vitro NET formation. *Front. Immunol.* 3, 413.
- Chargui, A., and El May, M.V. (2014). Autophagy mediates neutrophil responses to bacterial infection. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 122, 1047–1058.
- Cheng, O.Z., and Palaniyar, N. (2013). NET balancing: a problem in inflammatory lung diseases. *Front Immunol* 4, 1.
- Chessa, D., Ganau, G., and Mazzarello, V. (2015). An overview of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* with a focus on developing countries. *J. Infect. Dev. Ctries.* 9, 547–550.
- Colin, D.A., Mazurier, I., Sire, S., and Finck-Barbançon, V. (1994). Interaction of the two components of leukocidin from *Staphylococcus aureus* with human polymorphonuclear leukocyte membranes: sequential binding and subsequent activation. *Infect Immun* 62, 3184–3188.
- Comai, M., Dalla Serra, M., Coraiola, M., Werner, S., Colin, D.A., Monteil, H., Prévost, G., and Menestrina, G. (2002). Protein engineering modulates the transport properties and ion selectivity of the

pores formed by staphylococcal gamma-haemolysins in lipid membranes. *Mol. Microbiol.* *44*, 1251–1267.

Cooney, J., Kienle, Z., Foster, T.J., and O'Toole, P.W. (1993). The gamma-hemolysin locus of *Staphylococcus aureus* comprises three linked genes, two of which are identical to the genes for the F and S components of leukocidin. *Infect. Immun.* *61*, 768–771.

Coutinho, M.F., Prata, M.J., and Alves, S. (2012). Mannose-6-phosphate pathway: a review on its role in lysosomal function and dysfunction. *Mol. Genet. Metab.* *105*, 542–550.

Dalla Serra, M., Coraiola, M., Viero, G., Comai, M., Potrich, C., Ferreras, M., Baba-Moussa, L., Colin, D.A., Menestrina, G., Bhakdi, S., et al. (2005). *Staphylococcus aureus* bicomponent gamma-hemolysins, HlgA, HlgB, and HlgC, can form mixed pores containing all components. *J. Chem. Inf. Model.* *45*, 1539–1545.

Davies, B.A., Lee, J.R.E., Oestreich, A.J., and Katzmann, D.J. (2009). Membrane protein targeting to the MVB/lysosome. *Chem. Rev.* *109*, 1575–1586.

DeWire, S.M., Ahn, S., Lefkowitz, R.J., and Shenoy, S.K. (2007). Beta-arrestins and cell signaling. *Annu. Rev. Physiol.* *69*, 483–510.

Diamantopoulos, A.P. (2013). Extracellular neutrophil traps: a novel therapeutic target in ANCA-associated vasculitis? *Front Immunol* *4*, 24.

Dickinson, B.C., Peltier, J., Stone, D., Schaffer, D.V., and Chang, C.J. (2011). Nox2 redox signaling maintains essential cell populations in the brain. *Nat. Chem. Biol.* *7*, 106–112.

Diep, B.A., Chan, L., Tattevin, P., Kajikawa, O., Martin, T.R., Basuino, L., Mai, T.T., Marbach, H., Braughton, K.R., Whitney, A.R., et al. (2010). Polymorphonuclear leukocytes mediate *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin-induced lung inflammation and injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 5587–5592.

Dinges, M.M., Orwin, P.M., and Schlievert, P.M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* *13*, 16–34.

Dodson, M., Darley-Usmar, V., and Zhang, J. (2013). Cellular metabolic and autophagic pathways: traffic control by redox signaling. *Free Radic. Biol. Med.* *63*, 207–221.

Doherty, G.J., and McMahon, H.T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem* *78*, 857–902.

Donaldson, J.G., and Jackson, C.L. (2011). ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *12*, 362–375.

Drake, M.T., Shenoy, S.K., and Lefkowitz, R.J. (2006). Trafficking of G protein-coupled receptors. *Circ. Res.* *99*, 570–582.

D'Souza-Schorey, C., and Chavrier, P. (2006). ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* *7*, 347–358.

Dumont, A.L., Nygaard, T.K., Watkins, R.L., Smith, A., Kozhaya, L., Kreiswirth, B.N., Shopsin, B., Unutmaz, D., Voyich, J.M., and Torres, V.J. (2011). Characterization of a new cytotoxin that contributes to *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Mol. Microbiol.* *79*, 814–825.

- DuMont, A.L., Yoong, P., Day, C.J., Alonzo, F., 3rd, McDonald, W.H., Jennings, M.P., and Torres, V.J. (2013). *Staphylococcus aureus* LukAB cytotoxin kills human neutrophils by targeting the CD11b subunit of the integrin Mac-1. *Proc Natl Acad Sci U A* 110, 10794–10799.
- Edeling, M.A., Smith, C., and Owen, D. (2006). Life of a clathrin coat: insights from clathrin and AP structures. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 32–44.
- El Azreq, M.A., and Bourgoin, S.G. (2011). Cytohesin-1 regulates human blood neutrophil adhesion to endothelial cells through beta2 integrin activation. *Mol Immunol* 48, 1408–1416.
- Ferreras, M., Hoper, F., Dalla Serra, M., Colin, D.A., Prevost, G., and Menestrina, G. (1998). The interaction of *Staphylococcus aureus* bi-component gamma-hemolysins and leucocidins with cells and lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* 1414, 108–126.
- Fink, S.L., and Cookson, B.T. (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect. Immun.* 73, 1907–1916.
- Foster, T.J. (2004). The *Staphylococcus aureus* “superbug.” *J Clin Invest* 114, 1693–1696.
- Foster, T.J., Geoghegan, J.A., Ganesh, V.K., and Höök, M. (2014). Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 49–62.
- Fromageau, A., Cunha, P., Gilbert, F.B., and Rainard, P. (2011). Purified *Staphylococcus aureus* leukotoxin LukM/F’ does not trigger inflammation in the bovine mammary gland. *Microb. Pathog.* 51, 396–401.
- Galy, R., Bergeret, F., Keller, D., Mourey, L., Prévost, G., and Maveyraud, L. (2012). Crystallization and preliminary crystallographic studies of both components of the staphylococcal Luke-LukD leukotoxin. *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 68, 663–667.
- Gauduchon, V., Werner, S., Prevost, G., Monteil, H., and Colin, D.A. (2001). Flow cytometric determination of Panton-Valentine leucocidin S component binding. *Infect Immun* 69, 2390–2395.
- Genestier, A.-L., Michallet, M.-C., Prévost, G., Bellot, G., Chalabreysse, L., Peyrol, S., Thivolet, F., Etienne, J., Lina, G., Vallette, F.M., et al. (2005). *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 115, 3117–3127.
- Gillet, D., and Barbier, J. (2015). Diphtheria toxin. In *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins* 4th Edition, (J. Alouf, D. Ladant, M.R. Popoff editors: Elsevier), pp. 111–132.
- Gonzalez-Mejia, M.E., and Doseff, A.I. (2009). Regulation of monocytes and macrophages cell fate. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 14, 2413–2431.
- Gordon, S. (2016). Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity* 44, 463–475.
- Grant, B.D., and Donaldson, J.G. (2009). Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 597–608.
- Graves, S.F., Kobayashi, S.D., Braughton, K.R., Whitney, A.R., Sturdevant, D.E., Rasmussen, D.L., Kirpotina, L.N., Quinn, M.T., and DeLeo, F.R. (2012). Sublytic concentrations of *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin alter human PMN gene expression and enhance bactericidal capacity. *J Leukoc Biol* 92, 361–374.

- Gravet, A., Colin, D.A., Keller, D., Girardot, R., Monteil, H., Prévost, G., and Giradot, R. (1998). Characterization of a novel structural member, LukE-LukD, of the bi-component staphylococcal leucotoxins family. *FEBS Lett.* *436*, 202–208.
- Gravet, A., Rondeau, M., Harf-Monteil, C., Grunenberger, F., Monteil, H., Scheftel, J.M., and Prevost, G. (1999). Predominant *Staphylococcus aureus* isolated from antibiotic-associated diarrhea is clinically relevant and produces enterotoxin A and the bicomponent toxin LukE-lukD. *J Clin Microbiol* *37*, 4012–4019.
- Gravet, A., Couppié, P., Meunier, O., Clyti, E., Moreau, B., Pradinaud, R., Monteil, H., and Prévost, G. (2001). *Staphylococcus aureus* isolated in cases of impetigo produces both epidermolysin A or B and LukE-LukD in 78% of 131 retrospective and prospective cases. *J. Clin. Microbiol.* *39*, 4349–4356.
- Gruenberg, J., and Stenmark, H. (2004). The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 317–323.
- Grumann, D., Nübel, U., and Bröker, B.M. (2014). *Staphylococcus aureus* toxins--their functions and genetics. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* *21*, 583–592.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R.Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* *260*, 3440–3450.
- Guillet, V., Roblin, P., Werner, S., Coraiola, M., Menestrina, G., Monteil, H., Prévost, G., and Mourey, L. (2004). Crystal structure of leucotoxin S component: new insight into the Staphylococcal beta-barrel pore-forming toxins. *J. Biol. Chem.* *279*, 41028–41037.
- Gutierrez, M.G., Saka, H.A., Chinen, I., Zoppino, F.C.M., Yoshimori, T., Bocco, J.L., and Colombo, M.I. (2007). Protective role of autophagy against *Vibrio cholerae* cytolysin, a pore-forming toxin from *V. cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 1829–1834.
- de Haas, C.J., Veldkamp, K.E., Peschel, A., Weerkamp, F., Van Wamel, W.J., Heezius, E.C., Poppelier, M.J., Van Kessel, K.P., and van Strijp, J.A. (2004). Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial antiinflammatory agent. *J Exp Med* *199*, 687–695.
- Haveri, M., Roslöf, A., Rantala, L., and Pyörälä, S. (2007). Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. *J. Appl. Microbiol.* *103*, 993–1000.
- Hensler, T., König, B., Prévost, G., Piémont, Y., Köller, M., and König, W. (1994a). Leukotriene B₄ generation and DNA fragmentation induced by leukocidin from *Staphylococcus aureus*: protective role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and G-CSF for human neutrophils. *Infect. Immun.* *62*, 2529–2535.
- Hensler, T., Koller, M., Prevost, G., Piemont, Y., and Konig, W. (1994b). GTP-binding proteins are involved in the modulated activity of human neutrophils treated with the Pantone-Valentine leukocidin from *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* *62*, 5281–5289.
- Honjo, T., Nishizuka, Y., and Hayaishi, O. (1968). Diphtheria toxin-dependent adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis. *J. Biol. Chem.* *243*, 3553–3555.
- Huseby, M.J., Kruse, A.C., Digre, J., Kohler, P.L., Vocke, J.A., Mann, E.E., Bayles, K.W., Bohach, G.A., Schlievert, P.M., Ohlendorf, D.H., et al. (2010). Beta toxin catalyzes formation of nucleoprotein matrix in staphylococcal biofilms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 14407–14412.

- Idone, V., Tam, C., Goss, J.W., Toomre, D., Pypaert, M., and Andrews, N.W. (2008). Repair of injured plasma membrane by rapid Ca²⁺-dependent endocytosis. *J Cell Biol* 180, 905–914.
- Inden, K., Kaneko, J., Miyazato, A., Yamamoto, N., Mouri, S., Shibuya, Y., Nakamura, K., Aoyagi, T., Hatta, M., Kunishima, H., et al. (2009). Toll-like receptor 4-dependent activation of myeloid dendritic cells by leukocidin of *Staphylococcus aureus*. *Microbes Infect* 11, 245–253.
- Inoshima, I., Inoshima, N., Wilke, G.A., Powers, M.E., Frank, K.M., Wang, Y., and Bubeck Wardenburg, J. (2011). A *Staphylococcus aureus* pore-forming toxin subverts the activity of ADAM10 to cause lethal infection in mice. *Nat. Med.* 17, 1310–1314.
- Jayasinghe, L., Miles, G., and Bayley, H. (2006). Role of the amino latch of staphylococcal alpha-hemolysin in pore formation: a co-operative interaction between the N terminus and position 217. *J. Biol. Chem.* 281, 2195–2204.
- Johannes, L., and Popoff, V. (2008). Tracing the retrograde route in protein trafficking. *Cell* 135, 1175–1187.
- Jonard, L., Banh, L., Pressac, M., Just, J., and Bahuau, M. (2006). Les défensines en physiopathologie humaine. *Immuno-Anal. Biol. Spéc.* 21, 342–347.
- Jongerijs, I., Puister, M., Wu, J., Ruyken, M., van Strijp, J.A., and Rooijackers, S.H. (2010). Staphylococcal complement inhibitor modulates phagocyte responses by dimerization of convertases. *J Immunol* 184, 420–425.
- Joo, H.-S., and Otto, M. (2015). Mechanisms of resistance to antimicrobial peptides in staphylococci. *Biochim. Biophys. Acta* 1848, 3055–3061.
- Joo, H.-S., Cheung, G.Y.C., and Otto, M. (2011). Antimicrobial activity of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is caused by phenol-soluble modulins derivatives. *J. Biol. Chem.* 286, 8933–8940.
- Joubert, O., Viero, G., Keller, D., Martinez, E., Colin, D.A., Monteil, H., Mourey, L., Dalla Serra, M., and Prevost, G. (2006). Engineered covalent leucotoxin heterodimers form functional pores: insights into S-F interactions. *Biochem J* 396, 381–389.
- Jover, E., Tawk, M.Y., Laventie, B.-J., Poulain, B., and Prévost, G. (2013). Staphylococcal leukotoxins trigger free intracellular Ca²⁺ rise in neurones, signalling through acidic stores and activation of store-operated channels. *Cell. Microbiol.* 15, 742–758.
- Kaplan, M.J., and Radic, M. (2012). Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J Immunol* 189, 2689–2695.
- Kew, R.R., Peng, T., DiMartino, S.J., Madhavan, D., Weinman, S.J., Cheng, D., and Prossnitz, E.R. (1997). Undifferentiated U937 cells transfected with chemoattractant receptors: a model system to investigate chemotactic mechanisms and receptor structure/function relationships. *J Leukoc Biol* 61, 329–337.
- Kiselyov, K., Shin, D.M., and Muallem, S. (2003). Signalling specificity in GPCR-dependent Ca²⁺ signalling. *Cell. Signal.* 15, 243–253.
- Klionsky, D.J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M.J., Abeliovich, H., Acevedo Arozena, A., Adachi, H., Adams, C.M., Adams, P.D., Adeli, K., et al. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 12, 1–222.

- König, B., Köller, M., Prévost, G., Piemont, Y., Alouf, J.E., Schreiner, A., and König, W. (1994). Activation of human effector cells by different bacterial toxins (leukocidin, alveolysin, and erythrogenic toxin A): generation of interleukin-8. *Infect. Immun.* *62*, 4831–4837.
- König, B., Prévost, G., Piémont, Y., and König, W. (1995). Effects of *Staphylococcus aureus* leukocidins on inflammatory mediator release from human granulocytes. *J. Infect. Dis.* *171*, 607–613.
- Kusunoki, Y., Nakazawa, D., Shida, H., Hattanda, F., Miyoshi, A., Masuda, S., Nishio, S., Tomaru, U., Atsumi, T., and Ishizu, A. (2016). Peptidylarginine Deiminase Inhibitor Suppresses Neutrophil Extracellular Trap Formation and MPO-ANCA Production. *Front. Immunol.* *7*, 227.
- Le, K.Y., and Otto, M. (2015). Quorum-sensing regulation in staphylococci-an overview. *Front. Microbiol.* *6*, 1174.
- Li, R., Coulthard, L.G., Wu, M.C.L., Taylor, S.M., and Woodruff, T.M. (2013a). C5L2: a controversial receptor of complement anaphylatoxin, C5a. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *27*, 855–864.
- Li, Y.M., Vallera, D.A., and Hall, W.A. (2013b). Diphtheria toxin-based targeted toxin therapy for brain tumors. *J. Neurooncol.* *114*, 155–164.
- Lowy, F.D. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* *339*, 520–532.
- Mahoudeau, I., Delabranche, X., Prevost, G., Monteil, H., and Piemont, Y. (1997). Frequency of isolation of *Staphylococcus intermedius* from humans. *J. Clin. Microbiol.* *35*, 2153–2154.
- Malachowa, N., and DeLeo, F.R. (2010). Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *67*, 3057–3071.
- Malachowa, N., Kobayashi, S.D., Braughton, K.R., Whitney, A.R., Parnell, M.J., Gardner, D.J., and DeLeo, F.R. (2012). *Staphylococcus aureus* Leukotoxin GH Promotes Inflammation. *J. Infect. Dis.* *206*, 1185–1193.
- Malachowa, N., Kobayashi, S.D., Freedman, B., Dorward, D.W., and DeLeo, F.R. (2013). *Staphylococcus aureus* leukotoxin GH promotes formation of neutrophil extracellular traps. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *191*, 6022–6029.
- Maxfield, F.R., and McGraw, T.E. (2004). Endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 121–132.
- McCracken, J.M., and Allen, L.-A.H. (2014). Regulation of human neutrophil apoptosis and lifespan in health and disease. *J. Cell Death* *7*, 15–23.
- McGuinness, W.A., Kobayashi, S.D., and DeLeo, F.R. (2016). Evasion of Neutrophil Killing by *Staphylococcus aureus*. *Pathog. Basel Switz.* *5*.
- McMahon, H.T., and Boucrot, E. (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* *12*, 517–533.
- Melehani, J.H., James, D.B.A., DuMont, A.L., Torres, V.J., and Duncan, J.A. (2015). *Staphylococcus aureus* Leukocidin A/B (LukAB) Kills Human Monocytes via Host NLRP3 and ASC when Extracellular, but Not Intracellular. *PLoS Pathog.* *11*.
- Meunier, O., Falkenrodt, A., Monteil, H., and Colin, D.A. (1995). Application of flow cytometry in toxinology: pathophysiology of human polymorphonuclear leukocytes damaged by a pore-forming toxin from *Staphylococcus aureus*. *Cytometry* *21*, 241–247.

- Meyer, F., Girardot, R., Piemont, Y., Prevost, G., and Colin, D.A. (2009). Analysis of the specificity of Panton-Valentine leucocidin and gamma-hemolysin F component binding. *Infect Immun* 77, 266–273.
- Migdal, C., and Serres, M. (2011). [Reactive oxygen species and oxidative stress]. *Médecine Sci. MS* 27, 405–412.
- Mohan, N., Chakrabarti, M., Banik, N.L., and Ray, S.K. (2013). Combination of LC3 shRNA Plasmid Transfection and Genistein Treatment Inhibited Autophagy and Increased Apoptosis in Malignant Neuroblastoma in Cell Culture and Animal Models. *PLoS ONE* 8.
- Mootz, J.M., Benson, M.A., Heim, C.E., Crosby, H.A., Kavanaugh, J.S., Dunman, P.M., Kielian, T., Torres, V.J., and Horswill, A.R. (2015). Rot is a key regulator of *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Mol. Microbiol.* 96, 388–404.
- Mukhopadhyay, S., and Linstedt, A.D. (2013). Retrograde trafficking of AB₅ toxins: mechanisms to therapeutics. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 91, 1131–1141.
- Murray, R.J. (2005). Recognition and management of *Staphylococcus aureus* toxin-mediated disease. *Intern Med J* 35 *Suppl* 2, S106-19.
- Nagami, K., Kawashima, Y., Kuno, H., Kemi, M., and Matsumoto, H. (2002). In vitro cytotoxicity assay to screen compounds for apoptosis-inducing potential on lymphocytes and neutrophils. *J. Toxicol. Sci.* 27, 191–203.
- Naik, N., Giannini, E., Brouchon, L., and Boulay, F. (1997). Internalization and recycling of the C5a anaphylatoxin receptor: evidence that the agonist-mediated internalization is modulated by phosphorylation of the C-terminal domain. *J. Cell Sci.* 110, 2381–2390.
- Nocadello, S., Minasov, G., Shuvalova, L., Dubrovskaya, I., Sabini, E., Bagnoli, F., Grandi, G., and Anderson, W.F. (2016). Crystal structures of the components of the *Staphylococcus aureus* leukotoxin ED. *Acta Crystallogr. Sect. Struct. Biol.* 72, 113–120.
- Nygaard, R., Zou, Y., Dror, R.O., Mildorf, T.J., Arlow, D.H., Manglik, A., Pan, A.C., Liu, C.W., Fung, J.J., Bokoch, M.P., et al. (2013). The dynamic process of beta(2)-adrenergic receptor activation. *Cell* 152, 532–542.
- Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Caron, M.G., and Barak, L.S. (2000). Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J. Biol. Chem.* 275, 17201–17210.
- Olson, R., Nariya, H., Yokota, K., Kamio, Y., and Gouaux, E. (1999). Crystal structure of staphylococcal LukF delineates conformational changes accompanying formation of a transmembrane channel. *Nat. Struct. Biol.* 6, 134–140.
- Omoe, K., Hu, D.-L., Ono, H.K., Shimizu, S., Takahashi-Omoe, H., Nakane, A., Uchiyama, T., Shinagawa, K., and Imanishi, K. 'ichi (2013). Emetic potentials of newly identified staphylococcal enterotoxin-like toxins. *Infect. Immun.* 81, 3627–3631.
- Otto, M. (2008). Staphylococcal biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 322, 207–228.
- Otto, M. (2013). Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu. Rev. Med.* 64, 175–188.
- Padmanabhan, K., Eddy, W.F., and Crowley, J.C. (2010). A novel algorithm for optimal image thresholding of biological data. *J. Neurosci. Methods* 193, 380–384.

- Pannaraj, P.S., Hulten, K.G., Gonzalez, B.E., Mason, E.O., Jr., and Kaplan, S.L. (2006). Infective pyomyositis and myositis in children in the era of community-acquired, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis* 43, 953–960.
- Panton, P.N., and Valentine, F.C.O. (1932). Staphylococcal toxin. *Lancet* 222, 506–508.
- Paula, S., Akeson, M., and Deamer, D. (1999). Water transport by the bacterial channel alpha-hemolysin. *Biochim. Biophys. Acta* 1418, 117–126.
- Pédelacq, J.D., Maveyraud, L., Prévost, G., Baba-Moussa, L., González, A., Courcelle, E., Shepard, W., Monteil, H., Samama, J.P., and Mourey, L. (1999). The structure of a *Staphylococcus aureus* leucocidin component (LukF-PV) reveals the fold of the water-soluble species of a family of transmembrane pore-forming toxins. *Struct. Lond. Engl.* 1993 7, 277–287.
- Perret, M., Badiou, C., Lina, G., Burbaud, S., Benito, Y., Bes, M., Cottin, V., Couzon, F., Juruj, C., Dauwalder, O., et al. (2012). Cross-talk between *Staphylococcus aureus* leukocidins-intoxicated macrophages and lung epithelial cells triggers chemokine secretion in an inflammasome-dependent manner. *Cell Microbiol* 14, 1019–1036.
- Postma, B., Poppelier, M.J., van Galen, J.C., Prossnitz, E.R., van Strijp, J.A.G., de Haas, C.J.C., and van Kessel, K.P.M. (2004). Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* binds specifically to the C5a and formylated peptide receptor. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 172, 6994–7001.
- Prévost, G. (1999). The bi-component staphylococcal leucotoxins and γ -haemolysins (toxins). *Compr. Sourceb. Bact. Protein Toxins* 2, 402–418.
- Prévost, G., Bouakham, T., Piemont, Y., and Monteil, H. (1995a). Characterisation of a synergohymenotropic toxin produced by *Staphylococcus intermedius*. *FEBS Lett.* 376, 135–140.
- Prévost, G., Cribier, B., Couppié, P., Petiau, P., Supersac, G., Finck-Barbançon, V., Monteil, H., and Piemont, Y. (1995b). Panton-Valentine leucocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infect Immun* 63, 4121–4129.
- Prévost, G., Couppié, P., and Monteil, H. (2003). Staphylococcal epidermolysins. *Curr Opin Infect Dis* 16, 71–76.
- Prévost, G., Tawk, M.Y., Zimmermann-Meisse, G., and Jover, E. (2015). The staphylococcal alpha-toxin and leukotoxins. In *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins 4th Edition*, (J. Alouf, D. Ladant, M.R. Popoff editors: Elsevier), pp. 739–772.
- Prince, A., Wang, H., Kitur, K., and Parker, D. (2016). Humanized mice exhibit increased susceptibility to *Staphylococcus aureus* pneumonia. *J. Infect. Dis.*
- Rabiet, M.J., Huet, E., and Boulay, F. (2007). The N-formyl peptide receptors and the anaphylatoxin C5a receptors: an overview. *Biochimie* 89, 1089–1106.
- Ramanan, V., Agrawal, N.J., Liu, J., Engles, S., Toy, R., and Radhakrishnan, R. (2011). Systems biology and physical biology of clathrin-mediated endocytosis. *Integr. Biol.* 3, 803–815.
- Rasigade, J.-P., and Vandenesch, F. (2014). *Staphylococcus aureus*: a pathogen with still unresolved issues. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 21, 510–514.
- Remijnsen, Q., Vanden Berghe, T., Wirawan, E., Asselbergh, B., Parthoens, E., De Rycke, R., Noppen, S., Delforge, M., Willems, J., and Vandenabeele, P. (2011a). Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res* 21, 290–304.

- Remijsen, Q., Kuijpers, T.W., Wirawan, E., Lippens, S., Vandenabeele, P., and Vanden Berghe, T. (2011b). Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell Death Differ* 18, 581–588.
- Reyes-Robles, T., Alonzo, F., Kozhaya, L., Lacy, D.B., Unutmaz, D., and Torres, V.J. (2013). Staphylococcus aureus leukotoxin ED targets the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 to kill leukocytes and promote infection. *Cell Host Microbe* 14, 453–459.
- Rey-Giraud, F., Hafner, M., and Ries, C.H. (2012). In vitro generation of monocyte-derived macrophages under serum-free conditions improves their tumor promoting functions. *PLoS One* 7, e42656.
- Riegel, P., Jesel-Morel, L., Laventie, B., Boisset, S., Vandenesch, F., and Prévost, G. (2011). Coagulase-positive Staphylococcus pseudintermedius from animals causing human endocarditis. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 301, 237–239.
- Ritter, S.L., and Hall, R.A. (2009). Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 819–830.
- Rose, F., Dahlem, G., Guthmann, B., Grimminger, F., Maus, U., Hänze, J., Dummer, N., Grandel, U., Seeger, W., and Ghofrani, H.A. (2002). Mediator generation and signaling events in alveolar epithelial cells attacked by S. aureus α -toxin. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 282, L207–L214.
- Saftig, P., and Klumperman, J. (2009). Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 623–635.
- Sandvig, K., Lingelem, A.B.D., Skotland, T., and Bergan, J. (2015). Shiga toxins: properties and action on cells. In *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins 4th Edition*, (J. Alouf, D. Ladant, M.R. Popoff editors: Elsevier), pp. 267–286.
- Sengelov, H., Voldstedlund, M., Vinten, J., and Borregaard, N. (1998). Human neutrophils are devoid of the integral membrane protein caveolin. *J Leukoc Biol* 63, 563–566.
- Serruto, D., Rappuoli, R., Scarselli, M., Gros, P., and van Strijp, J.A. (2010). Molecular mechanisms of complement evasion: learning from staphylococci and meningococci. *Nat Rev Microbiol* 8, 393–399.
- Sezgin, M., and Sankur, B. (2004). Survey over image thresholding techniques and quantitative performance evaluation. *J. Electron. Imaging* 13, 146–168.
- Shibutani, S.T., Saitoh, T., Nowag, H., Münz, C., and Yoshimori, T. (2015). Autophagy and autophagy-related proteins in the immune system. *Nat. Immunol.* 16, 1014–1024.
- Song, L., Hobaugh, M.R., Shustak, C., Cheley, S., Bayley, H., and Gouaux, J.E. (1996). Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* 274, 1859–1866.
- Song, M.S., Baker, G.B., Todd, K.G., and Kar, S. (2011). Inhibition of beta-amyloid1-42 internalization attenuates neuronal death by stabilizing the endosomal-lysosomal system in rat cortical cultured neurons. *Neuroscience* 178, 181–188.
- Sorkin, A., and von Zastrow, M. (2009). Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 609–622.
- Spaan, A.N., Henry, T., van Rooijen, W.J., Perret, M., Badiou, C., Aerts, P.C., Kemmink, J., de Haas, C.J., van Kessel, K.P., Vandenesch, F., et al. (2013). The staphylococcal toxin panton-valentine leukocidin targets human c5a receptors. *Cell Host Microbe* 13, 584–594.

- Spaan, A.N., Vrieling, M., Wallet, P., Badiou, C., Reyes-Robles, T., Ohneck, E.A., Benito, Y., de Haas, C.J.C., Day, C.J., Jennings, M.P., et al. (2014). The staphylococcal toxins γ -haemolysin AB and CB differentially target phagocytes by employing specific chemokine receptors. *Nat. Commun.* *5*, 5438.
- Spaan, A.N., Reyes-Robles, T., Badiou, C., Cochet, S., Boguslawski, K.M., Yoong, P., Day, C.J., de Haas, C.J.C., van Kessel, K.P.M., Vandenesch, F., et al. (2015). *Staphylococcus aureus* Targets the Duffy Antigen Receptor for Chemokines (DARC) to Lyse Erythrocytes. *Cell Host Microbe* *18*, 363–370.
- Spaulding, A.R., Salgado-Pabón, W., Kohler, P.L., Horswill, A.R., Leung, D.Y.M., and Schlievert, P.M. (2013). Staphylococcal and Streptococcal Superantigen Exotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* *26*, 422–447.
- Staali, L., Monteil, H., and Colin, D.A. (1998). The staphylococcal pore-forming leukotoxins open Ca²⁺ channels in the membrane of human polymorphonuclear neutrophils. *J. Membr. Biol.* *162*, 209–216.
- Stach, C.S., Herrera, A., and Schlievert, P.M. (2014). Staphylococcal Superantigens Interact with Multiple Host Receptors to Cause Serious Diseases. *Immunol. Res.* *59*, 177–181.
- Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 513–525.
- Stoiber, W., Obermayer, A., Steinbacher, P., and Krautgartner, W.-D. (2015). The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Formation of Extracellular Traps (ETs) in Humans. *Biomolecules* *5*, 702–723.
- Sugawara, N., Tomita, T., and Kamio, Y. (1997). Assembly of *Staphylococcus aureus* gamma-hemolysin into a pore-forming ring-shaped complex on the surface of human erythrocytes. *FEBS Lett* *410*, 333–337.
- Sugawara-Tomita, N., Tomita, T., and Kamio, Y. (2002). Stochastic assembly of two-component staphylococcal gamma-hemolysin into heteroheptameric transmembrane pores with alternate subunit arrangements in ratios of 3:4 and 4:3. *J. Bacteriol.* *184*, 4747–4756.
- Sun, J. (2012). Roles of Cellular Redox Factors in Pathogen and Toxin Entry in the Endocytic Pathways, Intech.
- Sundström, C., and Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* *17*, 565–577.
- Supersac, G., Piemont, Y., Kubina, M., Prevost, G., and Foster, T.J. (1998). Assessment of the role of gamma-toxin in experimental endophthalmitis using a hlg-deficient mutant of *Staphylococcus aureus*. *Microb Pathog* *24*, 241–251.
- Suvorova, E.S., Gripenrog, J.M., and Miettinen, H.M. (2005). Different endocytosis pathways of the C5a receptor and the N-formyl peptide receptor. *Traffic* *6*, 100–115.
- Szmigielski, S., Sobiczewska, E., Prévost, G., Monteil, H., Colin, D.A., and Jeljaszewicz, J. (1998). Effect of purified staphylococcal leukocidal toxins on isolated blood polymorphonuclear leukocytes and peritoneal macrophages in vitro. *Zentralblatt Für Bakteriologie. Int. J. Med. Microbiol.* *288*, 383–394.
- Tam, C., Idone, V., Devlin, C., Fernandes, M.C., Flannery, A., He, X., Schuchman, E., Tabas, I., and Andrews, N.W. (2010). Exocytosis of acid sphingomyelinase by wounded cells promotes endocytosis and plasma membrane repair. *J Cell Biol* *189*, 1027–1038.
- Tawk, M.Y., Zimmermann-Meisse, G., Bossu, J.-L., Potrich, C., Bourcier, T., Dalla Serra, M., Poulain, B., Prévost, G., and Jover, E. (2015). Internalization of staphylococcal leukotoxins that bind and divert

- the C5a receptor is required for intracellular Ca(2+) mobilization by human neutrophils. *Cell. Microbiol.* 17, 1241–1257.
- Tong, S.Y.C., Davis, J.S., Eichenberger, E., Holland, T.L., and Fowler, V.G. (2015). *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* 28, 603–661.
- Uriarte, S.M., Jog, N.R., Luerman, G.C., Bhimani, S., Ward, R.A., and McLeish, K.R. (2009). Counterregulation of clathrin-mediated endocytosis by the actin and microtubular cytoskeleton in human neutrophils. *Am J Physiol Cell Physiol* 296, C857-67.
- Vachon, P.H. (2006). Survie cellulaire : différences et différenciation. *MS Médecine Sci.* 22, 423–429.
- Van Lith, L.H., Oosterom, J., Van Elsas, A., and Zaman, G.J. (2009). C5a-stimulated recruitment of beta-arrestin2 to the non-signaling 7-transmembrane decoy receptor C5L2. *J Biomol Screen* 14, 1067–1075.
- Vanden Broeck, D., Horvath, C., and De Wolf, M.J.S. (2007). *Vibrio cholerae*: Cholera toxin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 1771–1775.
- Vandenesch, F., Lina, G., and Henry, T. (2012). *Staphylococcus aureus* Hemolysins, bi-component Leukocidins, and Cytolytic Peptides: A Redundant Arsenal of Membrane-Damaging Virulence Factors? *Front Cell Infect Microbiol* 2, 12.
- Ventura, C.L., Malachowa, N., Hammer, C.H., Nardone, G.A., Robinson, M.A., Kobayashi, S.D., and DeLeo, F.R. (2010). Identification of a novel *Staphylococcus aureus* two-component leukotoxin using cell surface proteomics. *PloS One* 5, e11634.
- Viero, G., Cunaccia, R., Prevost, G., Werner, S., Monteil, H., Keller, D., Joubert, O., Menestrina, G., and Dalla Serra, M. (2006). Homologous versus heterologous interactions in the bicomponent staphylococcal gamma-haemolysin pore. *Biochem J* 394, 217–225.
- Viero, G., Gropuzzo, A., Joubert, O., Keller, D., Prévost, G., and Dalla Serra, M. (2008). A molecular pin to study the dynamics of beta-barrel formation in pore-forming toxins on erythrocytes: a sliding model. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 65, 312–323.
- van Wamel, W.J.B., Rooijackers, S.H.M., Ruyken, M., van Kessel, K.P.M., and van Strijp, J.A.G. (2006). The Innate Immune Modulators Staphylococcal Complement Inhibitor and Chemotaxis Inhibitory Protein of *Staphylococcus aureus* Are Located on β -Hemolysin-Converting Bacteriophages. *J. Bacteriol.* 188, 1310–1315.
- Wang, X.-Y., Huang, Z.-X., Chen, Y.-G., Lu, X., Zhu, P., Wen, K., Fu, N., and Liu, B.-Y. (2015). A Multiple Antigenic Peptide Mimicking Peptidoglycan Induced T Cell Responses to Protect Mice from Systemic Infection with *Staphylococcus aureus*. *PloS One* 10, e0136888.
- Wartha, F., Beiter, K., Normark, S., and Henriques-Normark, B. (2007). Neutrophil extracellular traps: casting the NET over pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* 10, 52–56.
- Werner, S., Colin, D.A., Coraiola, M., Menestrina, G., Monteil, H., and Prévost, G. (2002). Retrieving Biological Activity from LukF-PV Mutants Combined with Different S Components Implies Compatibility between the Stem Domains of These Staphylococcal Bicomponent Leucotoxins. *Infect. Immun.* 70, 1310–1318.
- Wernick, N.L.B., Chinnapen, D.J.-F., Cho, J.A., and Lencer, W.I. (2010). Cholera toxin: an intracellular journey into the cytosol by way of the endoplasmic reticulum. *Toxins* 2, 310–325.

- Wong, K.-W., and Jacobs, W.R. (2013). Mycobacterium tuberculosis exploits human interferon γ to stimulate macrophage extracellular trap formation and necrosis. *J. Infect. Dis.* *208*, 109–119.
- Woodin, A.M. (1959). Fractionation of a leucocidin from *Staphylococcus aureus*. *Biochem. J.* *73*, 225–237.
- Woodman, P.G., and Futter, C.E. (2008). Multivesicular bodies: co-ordinated progression to maturity. *Curr. Opin. Cell Biol.* *20*, 408–414.
- Wright, J. (1936). Staphylococcal leucocidin (Neisser-Wechsberg type) and antileucociddin. *230:1002-4*.
- Yamada, T., Tochimaru, N., Nakasuji, S., Hata, E., Kobayashi, H., Eguchi, M., Kaneko, J., Kamio, Y., Kaidoh, T., and Takeuchi, S. (2005). Leukotoxin family genes in *Staphylococcus aureus* isolated from domestic animals and prevalence of lukM-lukF-PV genes by bacteriophages in bovine isolates. *Vet. Microbiol.* *110*, 97–103.
- Yamashita, K., Kawai, Y., Tanaka, Y., Hirano, N., Kaneko, J., Tomita, N., Ohta, M., Kamio, Y., Yao, M., and Tanaka, I. (2011). Crystal structure of the octameric pore of staphylococcal γ -hemolysin reveals the β -barrel pore formation mechanism by two components. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 17314–17319.
- Yanai, M., Rocha, M.A., Matolek, A.Z., Chintalacharuvu, A., Taira, Y., Chintalacharuvu, K., and Beenhouwer, D.O. (2014). Separately or combined, LukG/LukH is functionally unique compared to other staphylococcal bicomponent leukotoxins. *PLoS One* *9*, e89308.
- Yeaman, M.R., Filler, S.G., Schmidt, C.S., Ibrahim, A.S., Edwards, J.E., and Hennessey, J.P. (2014). Applying Convergent Immunity to Innovative Vaccines Targeting *Staphylococcus aureus*. *Front. Immunol.* *5*, 463.
- Yoong, P., and Torres, V.J. (2013). The effects of *Staphylococcus aureus* leukotoxins on the host: cell lysis and beyond. *Curr. Opin. Microbiol.* *16*, 63–69.
- Yousefi, S., Gold, J.A., Andina, N., Lee, J.J., Kelly, A.M., Kozlowski, E., Schmid, I., Straumann, A., Reichenbach, J., Gleich, G.J., et al. (2008). Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat. Med.* *14*, 949–953.
- Yu, L., Fan, Z., Ma, J., Tong, C., Song, B., Zhu, Z., and Cui, Y. (2014). Cross-protective effect of a novel multi-antigen-chimeric vaccine against *Streptococcus* and *Staphylococcus aureus* infection in mice. *J. Med. Microbiol.* *63*, 1732–1740.
- Zawrotniak, M., and Rapala-Kozik, M. (2013). Neutrophil extracellular traps (NETs) - formation and implications. *Acta Biochim. Pol.* *60*, 277–284.
- Zhu, Y., Casey, P.J., Kumar, A.P., and Pervaiz, S. (2013). Deciphering the signaling networks underlying simvastatin-induced apoptosis in human cancer cells: evidence for non-canonical activation of RhoA and Rac1 GTPases. *Cell Death Dis* *4*, e568.

LISTE DES COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS

- (1) **Gaëlle Zimmermann-Meisse**, Gilles Prévost, Emmanuel Jover. Above and beyond C5a receptor targeting by staphylococcal leukotoxins: retrograde transport of Panton-Valentine Leucocidin and γ - haemolysin. *Toxins, soumis*.
- (2) Mira Y. Tawk, **Gaëlle Zimmermann-Meisse**, Jean-Louis Bossu, Cristina Potrich, Tristan Bourcier, Mauro Dalla Serra, Bernard Poulain, Gilles Prévost, Emmanuel Jover, Internalization of staphylococcal leukotoxins that bind and divert the C5a receptor is required for intracellular Ca^{2+} mobilization by human neutrophils. *Cellular Microbiology*, 2015;17:1241–57.
- (3) Gilles Prévost, Mira Y. Tawk, **Gaëlle Zimmermann-Meisse**, Emmanuel Jover. "The staphylococcal alpha-toxin and leukotoxins", pp 739-772, In: The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins, Fourth Edition, J. Alouf, D. Ladant, M.R. Popoff editors. Elsevier, AMSTERDAM • BOSTON • HEIDELBERG • LONDON • NEW YORK • OXFORD • PARIS • SAN DIEGO • SAN FRANCISCO • SINGAPORE • SYDNEY • TOKYO. ISBN: 978-0-12-800188-2
- (4) Paul Attien, Haziz Sina, Wardi Moussaoui, **Gaëlle Zimmermann-Meisse**, Thomas Dadié, Daniel Keller, Philippe Riegel, Vincent Edoh, Simeon O. Kotchoni, Marcelin Djè, Gilles Prévost, Lamine Baba-Moussa, Mass Spectrometry and Multiplex antigens Assays to Assess Microbial Quality and Toxin Production of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Clinical and Food Samples. *BioMed Research International*, 2014. ePub 2014:485620; bmri.doi/10.1155/2014/485620

COMMUNICATIONS ORALES

- (1) ETOX 17 (European Workshop on Bacterial Proteins Toxins), Braga – Portugal, 20-24 Juin 2015 : Prévost G.*, **Zimmermann-Meisse G.**, Tawk M.Y., Bossu JL, Potrich C., Masseron A., Bourcier T., Dalla Serra M., Poulain B., , Jover E, *Staphylococcal leukotoxins: not only pore-forming toxins*.
- (2) 3^{ème} congrès « Pore-Forming Proteins » (Protéines formant des Pores), Prato – Italie, 11-14 Mai 2015 : Jover E.*, **Zimmermann-Meisse G.**, Tawk M.Y., Bossu JL, Potrich C., Masseron A., Bourcier T., Dalla Serra M., Poulain B., Prévost G., *The staphylococcal Panton and Valentine Leukocidin and γ -haemolysin HlgC/HlgB share C5aR as a receptor, but operate diverse intracellular activities in human polymorphonuclear neutrophils*.
- (3) Séminaire de Microbiologie de Strasbourg (SMS), Strasbourg – France, 9 Avril 2015 : **Zimmermann-Meisse G.***, Tawk M.Y., Bossu JL, Potrich C., Bourcier T., Dalla Serra M., Poulain B., Prévost G., Jover E., *The C5aR, a receptor for two staphylococcal toxins Panton and Valentine Leukocidin and γ -Haemolysin HlgC/HlgB : diverse intracellular activities in human neutrophils*.
- (4) 22^{ème} Rencontres en Toxinologie RT22 (Société Française pour l'Étude des Toxines : SFET), Paris – France, 11 Décembre 2014 : 45. **Zimmermann-Meisse G.***, Tawk M.Y., Bossu JL, Potrich C., Bourcier T., Dalla Serra M., Poulain B., Prévost G., Jover E., *The staphylococcal*

Panton and Valentine Leukocidin and γ -Haemolysin HlgC/HlgB share C5aR as a receptor, but operate diverse intracellular activities in human polymorphonuclear neutrophils.

- (5) Congrès « Pore-Forming Toxins » (Toxines formant des Pores) en mémoire de G. Menestrina, Trento – Italie, 28-30 Août 2014 : Prévost G.*, **Zimmermann-Meisse G.**, Tawk M.Y., Heitz P., Megherbi A., Emmanuel J., *The long way of staphylococcal leukotoxins to form pores.*
- (6) Congrès de la Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Strasbourg – France, 2-3 Juillet 2014 : Prévost G.*, Tawk M.Y., **Zimmermann-Meisse G.**, Keller D., Jover E., *Le jeu des facteurs de virulence de Staphylococcus aureus avec les récepteurs couplés aux protéines G.*
- (7) Congrès de la Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Strasbourg – France, 2-3 Juillet 2013 : Prévost G.*, Tawk M.Y., **Zimmermann-Meisse G.**, Keller D., Jover E., *The hidden faces of the C5a receptor : C5aR.*

POSTERS

- (1) ETOX 17 (European Workshop on Bacterial Proteins Toxins), Braga – Portugal, 20-24 Juin 2015 : **Gaëlle Zimmermann-Meisse***, Mira Y. Tawk, Jean-Louis Bossu, Bernard Poulain, Gilles Prévost, Emmanuel Jover, *Staphylococcal bicomponent leukotoxins are internalized in human neutrophils,*
- (2) Congrès « Pore-Forming Toxins » (Toxines formant des Pores) en mémoire de G. Menestrina, Trento – Italie, 28-30 Août 2014 : **Gaëlle Zimmermann-Meisse***, Mira Y. Tawk, Emmanuel Jover, Gilles Prévost, *The influence of extracellular Ca^{2+} on the staphylococcal leukotoxins activity acting through C5aR.*



Gaëlle ZIMMERMANN-MEISSE
Internalisation des leucotoxines
de *S. aureus* dans les cellules
cibles et conséquences cellulaires
associées



Résumé

S. aureus sécrète de nombreux facteurs de virulence qui lui permettent de lutter efficacement contre le système immunitaire, afin de favoriser la dissémination de la bactérie dans l'organisme hôte. Parmi ces molécules, les leucotoxines ciblent principalement les cellules myéloïdes comme les neutrophiles, les macrophages ou encore les monocytes, et sont formées par deux sous-unités : une de classe S et une de classe F. La Leucodine de Panton et Valentine (LPV) et l'Hémolysine γ HlgC/HlgB sont deux leucotoxines dont le composant de classe S se fixe sur l'un des récepteurs du système du complément, le C5aR. Naturellement activé par l'anaphylatoxine C5a, le C5aR voit son activité modifiée lors d'une interaction avec la LPV ou HlgC/HlgB, tout du moins pour la libération du calcium intracellulaire. Ces deux leucotoxines, à l'instar du C5a, sont internalisées dans le neutrophile humain et utilisent le transport rétrograde pour atteindre l'appareil de Golgi. Elles peuvent rester dans la cellule jusqu'à 3h sans susciter la mort pour le neutrophile. Plus tard, à 6h, seule la LPV induit de l'apoptose et de la NETose.

Mots clés : *Staphylococcus aureus*, Leucocidine de Panton et Valentine, Hémolysine γ , neutrophiles humains, internalisation, transport rétrograde, apoptose, NETose, immunocytochimie

Abstract

S. aureus secretes many virulent factors which allow to efficiently fight the immune system, in a way to promote the bacterial spreading inside the host. Among these molecules, the leukotoxins target myeloid cells such as neutrophils, macrophages and monocytes, and are composed of two subunits: one of class S and one of class F. Panton and Valentine Leukocidin (PVL) and γ -Haemolysin HlgC/HlgB are two leukotoxins whose S-component binds to the C5aR, one of the complement system receptors. Naturally activated by the C5a anaphylatoxin, the activity of the C5aR is modified by the PVL and HlgC/HlgB interaction, for the intracellular calcium release. These two leukotoxins, as C5a, are internalised inside the human neutrophils and use the retrograde transport to reach the Golgi apparatus. These can rest inside the cells until 3h without neutrophil dead. Later, at 6h, only PVL induces apoptosis and NETosis.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Panton and Valentine Leukocidin, γ -Haemolysin, human neutrophils, internalisation, retrograde transport, apoptosis, NETosis, immunocytochemistry