



HAL
open science

Endocytose du facteur oedémateux de *Bacillus anthracis* et des *Bacillus cereus anthracis-like*

Emilie Tessier

► To cite this version:

Emilie Tessier. Endocytose du facteur oedémateux de *Bacillus anthracis* et des *Bacillus cereus anthracis-like*. Réseaux moléculaires [q-bio.MN]. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASQ031 . tel-03793821

HAL Id: tel-03793821

<https://theses.hal.science/tel-03793821>

Submitted on 2 Oct 2022

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.

Endocytose du facteur oedémateux de *Bacillus anthracis* et des *Bacillus cereus* anthracis-like

*Endocytosis of the edema factor of Bacillus anthracis
and Bacillus cereus anthracis-like*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 569 innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA)
Spécialité de doctorat : Microbiologie
Graduate School : Santé et médicaments. Référent : Faculté de pharmacie

Thèse préparée dans l'unité de recherche
Unité Immuno-Pathologies, Institut de Recherche Biomédicale des Armées,
sous la direction de **Cyril BADAUT**, chargé de recherche,
le co-encadrement de **Clémence ROUGEAUX**, chargée de recherche

Thèse soutenue à Brétigny-sur-Orge, le 29 juin 2022, par

Emilie TESSIER

Composition du Jury

Didier LERECLUS Directeur de recherche, INRAE, Université Paris-Saclay	Président
Pascal BOIREAU Directeur de recherche, ANSES, Sorbonne Université Pierre et Marie Curie	Rapporteur & Examineur
Dominique MISSIAKAS Professeur, Université de Chicago	Rapportrice & Examinatrice
Thomas CANDELA Maître de conférences, Faculté de pharmacie, Université Paris-Saclay	Examineur
Alice CHATEAU Maître de conférences, Université d'Avignon	Examinatrice
Cyril BADAUT Chargé de recherche, IRBA, Université Paris-Saclay	Directeur de thèse

Remerciements

Ecrire une thèse, c'est un peu comme réaliser un voyage dans le temps. C'est se rendre compte de l'évolution des techniques, et de la vivacité d'esprit dont ont fait preuve nos précurseurs avec les moyens de l'époque. Sans eux, le travail que l'on mène aujourd'hui n'existerait pas et il donne du sens à celui que l'on développera demain.

Ecrire une thèse, c'est un peu comme voir des épisodes de ce dessin-animé « Il était une fois... », et se rendre compte que l'on interagit avec l'un de ces petits personnages qui vadrouillent partout dans le corps humain. J'ai choisi de me lancer dans cette aventure, voulant voir si je pouvais être capable de gérer un projet en son tout. Concevoir et planifier, manipuler, analyser, synthétiser, interpréter et recommencer une boucle, un pas après l'autre. La communication est la clé de beaucoup de choses, de nombreuses avancées ; elle nous permet de faire évoluer nos connaissances et d'aborder les expérimentations sous un nouvel angle. Coordonner nos visions n'est pas facile, mais j'ai eu la chance de trouver auprès de collègues des interactions constructives nécessaires à mon évolution. J'espère pouvoir continuer à développer ces échanges, à avoir un regard critique et faire naître de nouveaux projets collaboratifs.

Ecrire une thèse et plonger dans la bibliographie en période de Covid, c'est un peu le pays de « Walking Dead » avec tous ces gens masqués défilant devant ma fenêtre, ces gants et masques dévalant les parkings lors de mon ravitaillement au supermarché... C'est aussi se retrouver en plein cœur de ce pour quoi nous travaillons chaque jour et donner encore plus de sens à nos travaux, un sentiment à double ressenti.

Je remercie tout d'abord les membres de mon jury : mes rapporteurs Mme le Professeur Dominique Missiakas et M. le Professeur Pascal Boireau, mes examinateurs M. le Docteur Thomas Candela, M. le Professeur Didier Lereclus et Mme le Docteur Alice Château, ainsi que Mme le Docteur Leyla Slanti, d'avoir accepté de se pencher sur mon travail de thèse et de pouvoir m'enrichir de leur regard, ainsi que des retours et idées qui naîtront suite à ce moment redouté des questions.

Je remercie mes supérieurs hiérarchiques, Jean-Nicolas Tournier et Marie Mura pour m'avoir fourni un laboratoire et un lieu de travail où j'ai pu passer quelques petites heures. Mon directeur de thèse, Cyril Badaut, pour m'avoir donné la chance de concrétiser cette envie farfelue de faire cette thèse qui me trottait depuis longtemps dans la tête. Mon encadrante, Clémence Rougeaux, pour avoir tenté de me canaliser, parce qu'il paraît que j'ai une légère tendance à vouloir tout et trop faire, ce qui vous a épargné un manuscrit de 300 pages.... (« Emilie, ton manuscrit n'a pas à être un catalogue de tout ce

que tu as pu lire sur la bactérie », tout moi, best comment ever! ☺). Je remercie Pierre Goossens pour nos échanges lors du lancement de mon projet de thèse. Je pense également à celui qui m'a embauché et avec qui cette thèse aurait été pavée de discussions interminables malgré tout.

Merci à ma team de doctorantes pour les sessions bières, les débriefs, les échanges d'expériences. Vivre les mêmes périodes d'effervescence et de déprime, de stress et de sur-motivation, ce yoyo inhérent à la thèse. Merci à vous tous, population du couloir B0, c'est chouette de vous retrouver au café, et de coloniser vos encadrements de porte et les chaises d'invités de vos bureaux. Il est agréable de parler de tout, de rien, et parfois une peu de manips aussi. Des rencontres de personnes qui n'étaient pas destinées à travailler avec moi, mais avec qui il serait si simple de se lancer sur des projets communs #monptit, #thésardedenface, #biomolgirl.

Ma Bichounette, une amie avant d'être une collègue et parce les tabous c'est beaucoup trop contraignant. Et puis il faut avouer que les heures de confocal sans un hymne digne de ce nom, bah c'est vraiment pas pareil : « bébé tu vaux ça » ! Nabou, ma petite elfe de labo, marraine de mes protéines fluo, toujours prête à aider, pleine de sourires et de bonne humeur. Laurence, la super tata de mes manips les plus répétitives et la co-maman de ce petit projet de bébés fluo (chut...c'est le teaser de mon 8^e post-doc !!). Et parce qu'elles sont bien plus que des collègues, et que travailler avec des gens qu'on aime et avec qui on peut râler en toute liberté, c'est vraiment génial.

Bien sûr, ma Belindou, mon amie, ma sœur de campagne et d'âme avec qui j'ai traversé beaucoup d'épreuves, toujours là pour me remotiver, et avec qui j'ai partagé tant d'apéros, de discussions, de voyages et de rires, #taspasfinidemavoirdanslespattes.

Ma Maman, pour m'avoir permis de redevenir une étudiante digne de ce nom avec service blanchisserie et tupperwares pour la semaine. Mon Papa, parce que évidemment comme toutes les petites filles je l'adore, et qu'il a toujours une bonne blague... Vous en voulez une ? : « Moi aussi j'ai beaucoup utilisé l'entraxe, c'est très utile en soudure ».

*J'ai beaucoup voyagé
ces dernières années,*

*Je suis partie en sucette et en cacahouète
Je me suis même rendue à l'évidence*

J'envisage de repartir en théories...

À suivre ;)

Table des matières

Remerciements.....	3
Liste des figures.....	11
Table des abréviations	15
INTRODUCTION	19
1. Présentation.....	21
1.1. Historique.....	21
1.1.1. <i>Emergence et épidémies.....</i>	21
1.1.2. <i>Identification et premiers traitements.....</i>	22
1.2. Agent biologique de guerre et bioterrorisme	23
1.3. La maladie au 21 ^e siècle.....	24
2. Bacillus anthracis et environnement.....	26
2.1. Le groupe <i>Bacillus cereus</i>	26
2.1.1. <i>Classification et particularités.....</i>	26
2.1.2. <i>Plasticité génétique.....</i>	26
2.2. Distribution géographique.....	27
2.3. Ecologie	28
2.3.1. <i>Cycle de vie de B. anthracis.....</i>	28
2.3.2. <i>Sporulation et germination</i>	29
2.3.3 <i>Dissémination et persistance des spores.....</i>	29
2.4. <i>Bacillus cereus anthracis-like</i>	30
2.4.1. <i>Origines : divergences et similarités</i>	30
2.4.2. <i>Les souches B. cereus anthracis-like isolées chez l'Homme</i>	31
2.4.3. <i>Les souches B. cereus anthracis-like isolées chez l'animal.....</i>	31
3. Bacillus anthracis : pathogénie et pathologie.....	33
3.1. Les types d'anthrax	33
3.1.1. <i>La forme cutanée.....</i>	33
3.1.2. <i>La forme pulmonaire.....</i>	33
3.1.3. <i>La forme gastro-intestinale.....</i>	34
3.1.4. <i>La forme injectionnelle</i>	35
3.1.5. <i>Les complications.....</i>	35
3.2. Diagnostic de laboratoire	36
3.3. Traitements et prophylaxie.....	37

3.3.1. Traitement antibiotique.....	37
3.3.2. Vaccins et anticorps.....	38
4. Les facteurs de virulence	39
4.1. Les régulateurs de virulence	39
4.1.1. Facteurs environnementaux.....	39
4.1.2. Régulateurs géniques généraux.....	40
4.2. La capsule PDGA et les capsules des souches <i>B. cereus</i> anthracis-like.....	41
4.2.1. Conditions d'expression et régulation génique.....	41
4.2.2. Virulence.....	42
4.2.3. Capsules des souches G9241 et Bcbva.....	42
4.2.3.1. La souche G9241.....	43
4.2.3.2. Les souches Bcbva.....	43
4.3. Les toxines.....	44
4.3.1. Découverte des 3 facteurs.....	44
4.3.2. Expression <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	44
4.3.3. Génétique et régulation génique.....	45
4.3.4. L'antigène protecteur.....	46
4.3.4.1. Présentation.....	46
4.3.4.2. Dénominateur commun des toxines.....	48
4.3.5. La toxine létale.....	48
4.3.5.1. Structure et fonction.....	48
4.3.5.2. Inhibition de la voie MAPKK.....	49
4.3.5.3. Mortalité cellulaire.....	49
Pyroptose des macrophages.....	50
Mort lente apoptotique.....	50
4.3.6. La toxine oedémateuse.....	51
4.3.6.1. Présentation.....	51
4.3.6.2. Structure et activité.....	51
4.3.6.3. Effets biologiques de EF.....	53
4.3.7. Implication des toxines dans la pathogenèse.....	54
4.3.7.1. Phase précoce : dérouter l'immunité.....	54
4.3.7.2. Phase systémique : atteinte des organes.....	54
4.4. Autres facteurs contribuant à la virulence.....	55
4.4.1. Les hémolysines.....	55
4.4.1.1. L'anthrolysine O.....	56
4.4.1.2. Les phospholipases C.....	56
4.4.2. Les protéases.....	56

5. Endocytose	58
5.1. Présentation.....	58
5.2. Le réseau endosomal.....	59
5.2.1. <i>Les endosomes et identité endosomale</i>	59
5.2.2. <i>Les endosomes précoces</i>	62
5.2.3. <i>Voie de recyclage</i>	63
5.2.4. <i>Voie de dégradation</i>	65
5.2.4.1. <i>Les corps multivésiculaires : fournisseur de cargos</i>	66
5.2.4.2. <i>Maturation endosomale</i>	67
5.2.5. <i>Endosomes tardifs</i>	67
5.3. Les voies d'endocytose.....	69
5.3.1 <i>Phagocytose et macropinocytose</i>	69
5.3.1.1. <i>Similarités</i>	69
5.3.1.2. <i>La phagocytose</i>	70
La phagocytose par le récepteur au complément.....	71
La phagocytose par le récepteur aux immunoglobulines.....	71
5.3.1.3. <i>La macropinocytose</i>	72
La macropinocytose constitutive.....	72
La macropinocytose dépendante d'un facteur de croissance.....	73
5.3.2. <i>La voie clathrine</i>	74
5.3.2.1. <i>Assemblage</i>	75
5.3.2.2. <i>Invagination</i>	75
5.3.2.3. <i>Scission</i>	76
5.3.2.4. <i>Perte du revêtement</i>	76
5.3.3. <i>La voie cavéole</i>	77
5.3.3.1. <i>Composition et assemblage des cavéoles</i>	78
5.3.3.2. <i>Invagination</i>	78
5.3.3.3. <i>Scission et trafic intracellulaire</i>	79
5.3.4. <i>Les voies indépendantes de la clathrine et cavéoline</i>	81
5.3.4.1. <i>Les voies dépendantes de la dynamine</i>	81
La voie Fast endophiline-A (FEME).....	81
L'endocytose du récepteur à l'IL-2 dépendante de RhoA.....	81
L'endocytose du récepteur EGFR.....	82
5.3.4.2. <i>Les voies indépendantes de la dynamine</i>	82
La voie CLIC/GEEC.....	82
L'endocytose associée à la petite GTPase Arf6.....	82
L'endocytose assistée par les flotillines.....	83
L'endocytose massive.....	83

5.4. Entrée des toxines	83
5.4.1. Toxines AB et modèle d'endocytose.....	83
5.4.2. Etape 1 : la fixation au récepteur	84
5.4.3. Etape 2 : le site de clivage à la furine et domaine de fixation des facteurs.....	86
5.4.4. Etape 3 : le domaine d'oligomérisation.....	86
5.4.5. Etape 4 : Le domaine d'insertion membranaire et de formation du pore	87
5.4.6. Etape 5 : le pore.....	89
5.4.7. La translocation endosomale.....	90
5.5. Voie d'endocytose des toxines.....	91
5.5.1. Surface cellulaire et voies endocytaires.....	91
5.5.2. Endosomes et suivi de trafic intracellulaire	93
5.5.3. Devenir intracellulaire des facteurs	94

OBJECTIFS DE LA THESE 97

RESULTATS EXPERIMENTAUX..... 101

Matériel et méthode	103
<i>Lignées cellulaires</i>	103
<i>Souches bactériennes</i>	103
<i>Molécules et inhibiteurs</i>	103
<i>Clonage des constructions EFhis, EF fluorescents et LF fluorescents</i>	104
<i>Conjugaison hétérogramique</i>	108
<i>Techniques d'analyses protéiques</i>	109
<i>Lysats cellulaires</i>	109
<i>SDS-PAGE</i>	109
<i>Colorations protéiques</i>	109
<i>Western blot</i>	109
<i>Test d'expression des protéines et détermination de la solubilité</i>	110
<i>Expression et purification des protéines</i>	110
<i>Détermination de la cytotoxicité cellulaire des inhibiteurs</i>	111
<i>Détermination des voies d'endocytose</i>	113
<i>Cytométrie de flux</i>	113
<i>Microcopie confocale et immunofluorescence</i>	114
<i>Dosage de EF</i>	114
<i>Dosage de l'AMPC</i>	115
Résultats	116
<i>1/ Obtention de facteurs EF et LF fluorescents solubles</i>	116
<i>1.1/ Clonage : constructions géniques codant pour des facteurs fluorescents</i>	116

1.2/ Optimisation des conditions d'expression en système bactérien <i>E. coli</i>	121
2/ Purification et pureté des EF fluorescents solubles	123
2.1/ Une double purification des facteurs fluorescents est nécessaire.	123
2.2/ Présence de clivages au cours de la purification de certains EF fluorescents.	124
3/ Caractérisation des EF fluorescentes solubles purifiés.....	127
3.1/ Influence de la position de l'étiquette histidine.	127
3.2/ Le signal de fluorescence de EFvenus est spécifique de la protéine chimérique.	128
3.3/ Les EF fluorescents sont internalisés en présence de PA et enzymatiquement actifs.	130
4/ Etude de l'internalisation des EF fluorescents.	132
4.1/ Internalisation de EF en absence de PA.....	132
4.1.1/ Internalisation de EFvenus en absence de PA dans les macrophages.	132
4.1.2/ Internalisation de EF dans différents types cellulaires en absence de PA.	133
4.1.3/ L'internalisation, en absence ou en présence de PA, de EFvenus est représentative de l'endocytose du EF natif du commerce.....	134
4.1.4/ Internalisation dépendante du pôle des cellules épithéliales en présence et en absence de PA.	135
4.1.5/ Observation dynamique de l'entrée de EFvenus et EFscarlet dans les cellules RAW264.7 et les A549.....	136
4.1.6/ Synthèse des résultats	136
4.2/ Etude des voies d'endocytose des EF fluorescents, en présence et en absence de PA.....	139
4.2.1/ L'endocytose de EFvenus dépend d'un processus cellulaire actif.	139
4.2.2/ Les EF fluorescents sont présents dans les endosomes an absence et en présence de PA.	140
4.2.3/ Utilisation d'inhibiteurs pour l'étude des voies endocytaires.	141
4.2.4/ Endocytose de protéines habituellement utilisées comme contrôles.	144
4.2.4/ Endocytose des facteurs EF fluorescents en absence et en présence de PA.	148
4.2.5/ Bilan des résultats d'endocytose des EF fluorescents.	151
5/ Activité des facteurs EF fluorescents en absence de PA.....	156
5.1/ Les facteurs EF fluorescents sont inactifs en absence de PA.	156
5.2/ Un intoxication séquentielle permet d'augmenter le taux d'AMPc intracellulaire.	157
5.3/ Bilan de l'activité de EF et des EF fluorescents.....	160

ARTICLE..... 161

DISCUSSION 191

Études de l'internalisation et de la translocation : développement d'outils fluorescents	193
EF est capable d'être internalisé en absence de PA à la surface de la cellule	196
L'endocytose de EF en cellules épithéliales dépend du pôle cellulaire	198
PA serait majoritairement impliqué dans la translocation endosomale.....	200
Complexité de la dissection des voies endocytaires.....	202

<i>Entrée de EF en absence de PA et effet physiopathologique.....</i>	<i>204</i>
Curriculum Vitae	209
REFERENCES	211

Liste des figures

INTRODUCTION

Figure 1. Recensement des occurrences de cas de maladie du charbon dans le monde entre 2005 et 2016.....	27
Figure 2. Cycle de vie de <i>Bacillus anthracis</i>	29
Figure 3. Les formes de la maladie du charbon.	35
Figure 4. Régulation génique des facteurs de virulence de <i>B. anthracis</i>	41
Figure 5. Aspect des colonies de la souche Pasteur.	42
Figure 6. Structure protéique de l'antigène protecteur PA.	47
Figure 7. Structure du facteur létal LF.	49
Figure 8. Structure du facteur oedémateux EF complexé à la calmoduline.	52
Figure 9. Schéma général des voies d'endocytose.	59
Figure 10. Identité des compartiments endosomaux.	61
Figure 11. Schéma du cycle d'activation/inactivation des petites GTPases Rab.	61
Figure 12. Le trafic intracellulaire endosomal.	63
Figure 13. Mécanisme de formation des tubules de recyclage.	65
Figure 14. Formation des ILV en endosomes précoces et tardifs.	66
Figure 15. Les vésicules intraluminales des endosomes et leur devenir.	69
Figure 16. La macropinocytose induite par facteur de croissance.	74
Figure 17. Etapes de l'endocytose par la voie clathrine.	77
Figure 18. Mécanisme de l'endocytose par la voie cavéole.	80
Figure 19. Heptamère de PA, le pré-pore.	87
Figure 20. Modèle d'insertion membranaire pour la formation du pore.	88
Figure 21. Structure du pore.	90
Figure 22. Etapes de translocation des facteurs enzymatiques à travers le pore.	91
Figure 23. Endocytose des toxines de <i>Bacillus anthracis</i>	96

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Tableau A. Amorces utilisées pour les clonages par restriction.	105
Tableau B. Récapitulatif des amorces utilisées pour le clonage HiFi.	106
Tableau C. Amorces utilisées pour la construction des plasmides de recombinaison homologue. .	108
Tableau D. Liste des inhibiteurs : cibles et concentrations.	112

Tableau E. Pourcentage d'identité de séquence nucléotidique et protéique des toxines de 3 souches de Bacillus responsables de la maladie du charbon (<i>B. anthracis</i>) ou de pathologies similaires (<i>B. cereus</i> G9241, <i>B. cereus anthracis-like</i> Côte d'Ivoire).	116
Figure 1. Représentation schématique de la séquence codant les protéines fluorescentes.	117
Figure 2. Conjugaison hétérogramique des souches Bcbva CAR-H pour l'intégration du gène codant EF-eGFP.	118
Tableau F. Liste des plasmides construits contenant les fusions géniques des gènes codant les facteurs EF ou LF, avec les gènes codant les protéines fluorescentes.	120
Figure 3. Expression des protéines chimériques EF par induction à 37°C/2h et 30°C/3h et solubilité.	122
Figure 4. Expression des protéines chimériques EF et LF par induction sur la nuit à 16°C et 20°C.	122
Figure 5. Culots obtenus suite à l'induction de l'expression des facteurs EF fluorescents recombinants.	123
Figure 6. Purification de la protéine EF-venus-his.	124
Figure 7. Pureté des EF fluorescents purifiés.	125
Figure 8. Détection de formes clivées des EF fluorescents purifiés.	127
Figure 9. Influence de la position de l'étiquette histidine sur l'entrée et l'activité des EF fluorescents.	128
Figure 10. Le signal fluorescent est spécifique de EFvenus lors de l'internalisation cellulaire.	129
Figure 11. Spécificité de fluorescence intracellulaire de EFvenus <i>in vitro</i> en cytométrie de flux. ...	130
Figure 12. Les protéines fluorescentes purifiées sont actives en tampon de purification.	131
Figure 13. Les protéines fluorescentes internalisées par les macrophages sont actives.	131
Figure 14. Internalisation de EFvenus en absence de PA dans les macrophages.	132
Figure 15. Gamme de concentration de EFvenus et endocytose.	133
Figure 16. Cinétique d'entrée du facteur EF en présence ou absence de PA.	134
Figure 17. L'internalisation de EFvenus dans les cellules épithéliales dépend du pôle.	135
Figure 18. Cinétique d'endocytose de EFvenus et EFscarlet.	138
Figure 19. L'endocytose de EFvenus est dépendante de l'énergie cellulaire.	139
Figure 20. EFvenus colocalise avec les endosomes en absence et en présence de PA.	141
Figure 21. Concentration d'inhibiteurs d'endocytose et maintien de viabilité cellulaire.	142
Figure 22. Comparatif de détection du signal EFvenus dans les macrophages RAW264.7.	143
Figure 23. Endocytose simultanée de EFvenus et EFscarlet dans les macrophages.	144
Figure 24. Voies endocytaires empruntées par les protéines contrôles dans les cellules A549 et RAW264.7.	147
Figure 25. Endocytose de EFvenus et EFscarlet dans les cellules A549 et RAW264.7.	156
Figure 26. L'activité enzymatique de EF et des EF fluorescents est dépendante de PA.	157
Figure 27. Distribution cellulaire de PA, effets des lavages et de la présence de EF.	158

Figure 28. Le taux d'AMPc augmente sui à une entrée séquentielle de EF et PA..... 159

DISCUSSION

Figure 29. Modes d'entrée des toxines bactériennes..... 197

Tableau G. Les toxines AB : fonction, cibles et récepteurs cellulaires..... 198

Figure 30. Expression du CMHII par les cellules de l'épithélium pulmonaire..... 206

Table des abréviations

AC : adénylate cyclase
ADN : Acide désoxyribonucléique
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
ATXR1 : anthrax receptor 1 (TEM8)
ATXR2 : anthrax receptor 2 (CMG2)
ARN : Acide ribonucléide
ATP : Adénosine triphosphate
ATPase: enzyme hydrolisant l'ATP
AVA : Anthrax-Vaccine-Precipitated
AVP : Anthrax-vaccine-Precipitated
BafA : bafilomycine A
BAR : bin, amphiphysin and Rvs
Bcbva : iBacillus cereus biovar anthracis
BEAS : lignée épithéliale bronchique humaine
BHI : Brain Heart Infusion
BHK : Baby Hamster Kidney
CA : Cameroun
Ca²⁺ : ion alcium
CaM : calmoduline
CaSR : Calcium sensing Receptor
CCP : clathrin-coated pits
CCV : clathrin-coated vesicles
CDC : Center of Disease and Prevention
Cdc42 : Cell division control protein 42
CHO : Chinese Hamster Ovary
CHOK1 : Chinese Hamster Ovary K1
CI : Côte d'Ivoire
CIE : clathrin-independant endocytosis
Cl⁻ : ion chlorure

CLIC : clathrin-independant carriers
CME : clathrin-mediated endocytosis
CMG2 : Capillary Morphogenesis Gene 2
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CMHI : complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
CMHII : complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
CQ : chloroquine
CREB : Camp responsive element binding protein
CtBPI : C-terminal binding protein 1
CTRL : contrôle
CTxB: toxines cholériques
DAG : diacylglycerol
DMSO : Diméthylsulfoxyde
ECV : endosomal carrier vesicle
EE : early endosomes
EF : Facteur œdémateux
EGF : facteur de croissance épidermique
EHD : Eps15 homology domain
EIPA: Ethylisopropyl amiloride
ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*
Epac : exchange protein activated by cAMP
ESCRT : endosomal sorting complex required for transport
ET : Toxine œdémateuse
FcR : récepteur au fragment Fc des immunoglobulines
FEME : fast endophilin mediated endophytosis
GAP : GTPase-activating proteins
GBF1 : golgi-specific brefeldin A resistance factor 1
GDI : guanine nucleotide dissociation factors
GDP : guanosine diphosphate
GEEC : GPI-AP enriched endosomal compartments
GEF : Guanine-nucleotide exchange factors

GFP : Green Fluorescent Protein
GPI-AP : glycosylphosphatidylinositol
GTP : guanosine triphosphate
GTPases : enzyme hydrolysant la GTP
H⁺: ion hydrogène
HA : acide hyaluronique
HCO₃ : bicarbonate
HeLa : Lignée cellulaire épithéliale utérine humaine
HIV-1 : Human immunodeficiency virus 1
ILV : vésicules intraluminales
InhA1 : Immune Inhibitor A
Ins3P : inositol-1,4,5-triphosphate
IPTG : Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
LB : Luria Bertani
LBPA : acide lisobisphosphatidique
LDL : lipoprotéine de faible densité
LE : late endosomes
LF : Facteur létal
LFn : Domaine I de LF en N-terminal
LT : Toxine létale
MAPKKs : Mitogen-activated protein kinase kinase (ou MEK)
MAPKs : Mitogen-activated protein kinase
MbCD : méthyl bêta-cyclo dextran
MDC : monodansylcadaverine
MDCK : Madin-Darby Canine Kidney
MEK : Mitogen-activated protein kinase kinase (ou MAPKKs)
MFI : moyenne des fluorescences
Mg²⁺ : ion magnésium
MIDAS : adhésion dépendant d'ion métallique
MLCK : Myosin light chain kinase
Mn²⁺ : ion manganèse

MVB : corps multivésiculaires

PA : antigène protecteur

PBMC : cellules mononuclées du sang périphérique

PBS : Tampon phosphate salin

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDGA : poly- γ -D-glutamique

PhA : acide phosphatidique

PI : phosphoinositides

PI3K : phosphoinosite-3 kinases

PI3P : Phosphatidylinositol-3-phosphate

PIP : phosphorylation de PI

PKA : protéine kinase A

PKC : protéines kinases C

PLCs : phospholipases C

PLC γ : phospholypase C γ

PtdIns : Phosphatidylinositol

Rac1 : Rac Family Small GTPase 1

RhoA : Ras homolog family member A

RTK : récepteurs tyrosine kinase

SDS : sodium dodécyl phosphate

SDS-PAGE : Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium

SNX : sorting nexins

SNX3 : sorting nexin 3

SNX5 : sorting-nexine-5

SV40 : virus simien 40

TEM8 : Tumor Endothélial marker 8

TFP : toxines bactériennes formant des pores

TGN : trans-Golgien

Trf : transferrine

TS : tétrasaccharidique

INTRODUCTION

1. Présentation

1.1. Historique

1.1.1. Emergence et épidémies

L'anthrax est la dénomination connue de tous de la maladie du charbon suite à l'épisode bioterroriste de 2001 aux Etats-Unis. Le terme « *anthrax* » pour les anglo-saxons vient du grec « *anthrakos* » faisant référence aux escarres noires typiques de la pathologie, et porte le nom français de « maladie du charbon ». A travers les temps, plusieurs désignations lui ont été attribuées : fièvre/bactériémie/peste charbonneuse, pustule maligne, peste rouge, charbon bactérien, feu perse, sang de rate chez les moutons et maladie de sang chez le bovin.

Cette maladie trouverait son origine dans l'ancienne Egypte aux alentours du IV^{ème} siècle avant Jésus Christ et serait désignée au sein des premiers écrits retrouvés dans la Bible décrivant les 10 plaies d'Egypte. Sa présence fut également signalée en Grèce et en Rome antique en -700 au travers de l'Iliade d'Homère et de poèmes décrivant une grave épidémie qui a touché Rome à cette époque.

La maladie du charbon fut tout d'abord décrite comme **maladie animale**. De nombreuses épidémies affectant le bétail sévirent au 17^è siècle à travers l'Europe. En France, on évoqua alors le concept de « champs maudits » où certains lieux de pâturage causaient la mort du bétail qui y était installé. La première grande épidémie se répandit à partir de 1613 dans toute l'Europe ; on parla du « fléau noir » en France, de « black bane » en Angleterre, ou encore de « milzbrand » en Allemagne. Celle-ci causa de nombreuses pertes animales et humaines. D'autres épidémies furent également signalées outre-Atlantique en Louisiane, au Texas et au Mississippi, ainsi qu'en Afrique dans les années 1800. Ce n'est que plus tard que Louis Pasteur apportera l'explication des « champs maudits » (Schwartz, 2001) par l'identification d'une contamination terrestre par le bacille du charbon.

La première forme cutanée de la maladie chez l'Homme est décrite par M. Moret en 1752 évoquant la présence de « pustules malignes » (Morens *et al.*, 2003). La contamination de l'animal vers l'homme est établie par M. Fournier en 1769. La maladie est alors identifiée comme une **anthropozoonose** qui peut être transmise à l'homme lors du travail de produits animaux contaminés (peau, laine) ou encore lors de la consommation de viande infectée, à l'origine de formes cutanée et gastro-intestinale (Morens *et al.*, 2003). Il s'agit de la première évocation de maladie du charbon comme maladie professionnelle, touchant principalement des trieurs de laine. La caractérisation de l'atteinte animale est faite par M. Chabert en 1780, faisant réponse à un concours de l'Académie des Sciences de Dijon pour l'identification des causes et d'un traitement de la maladie du charbon (Morens *et al.*, 2003). Problème

agricole et sanitaire européen, la maladie a même été exportée en Haïti en 1770, alors colonie française. L'intérêt pour la maladie du charbon est à l'époque grandissant, et les découvertes se multiplient.

1.1.2. Identification et premiers traitements

Une série de découvertes majeures eut lieu au 19^e siècle (Turnbull et Shadomy, 2011). En 1823, Eloy Barthélémy démontra la transmission de la maladie par injection de sang contaminé de cheval à un animal sain. L'identification progressive d'un agent responsable de la maladie du charbon se poursuivit en 1849 avec M. Pollender puis en 1850 avec M. Davaine et M. Rayet qui observèrent la présence de « corps » dans le sang contaminé. Monsieur Delafond fut, quant à lui, le premier à les appeler « bactéries » en 1860, puis M. Cohn les nomma *Bacillus anthracis*, membre du groupe *Bacillus* produisant des spores, en 1872. Monsieur Davaine montra l'infectiosité pour diverses espèces à partir d'injections sous-cutanées de sang infecté non filtré en 1863, et nota la transmission vers l'Homme en observant la bactérie au sein de pustules humaines cutanées. De leur côté, Messieurs Wahl et Bell firent respectivement le lien avec la forme intestinale en 1861 et la forme pulmonaire chez les trieurs de laine en 1879.

Ce sont deux des plus grands personnages du monde de la microbiologie qui complétèrent les caractéristiques de l'infection. Ainsi, Robert Koch en 1877 (Koch, 1877) entérina la cause bactérienne par isolation et injection de la bactérie ; il démontra sa capacité à survivre durant de longues périodes sous forme de spores sans perte du caractère infectieux. Il établira les célèbres Postulats de Koch reliant un pathogène identifié à une maladie spécifique en 1890. Louis Pasteur valorisa, quant à lui les travaux vaccinaux initiés par M. Greenfield en 1880 (Tigertt, 1980), avec le **premier vaccin anti-charbon** à partir d'une souche vivante atténuée en 1881 suite à son expérience sur des moutons à Pouilly-le-Fort (Pasteur, *et al.*, 2002). Il dut son succès à Messieurs Toussaint, Roux et Chamberland ayant mis au point la formulation utilisée. Ce vaccin fut amélioré par Max Sterne en 1937 (Sterne, 1939) : le vaccin contenant des souches vivantes non capsulées pour la vaccination du bétail.

Le 12 octobre 1913, une réglementation spécifique parue au Journal Officiel puis complétée par un nouveau décret en 1937 (Institut National de Recherche et de Sécurité - INRS) liste les produits bruts issus d'animaux ainsi que les métiers à risque associés à la maladie du charbon, tels que les tanneurs, les trieurs de laine, d'os ou les préparateurs de crins, et établit les règles d'hygiène à mettre en œuvre. La maladie est alors officiellement inscrite en France comme maladie professionnelle. Utilisé pour la première fois à Philadelphie en 1944 (Murphy *et al.*, 1944), le traitement antibiotique à la pénicilline constitue le traitement de première intention. Aux vaccins à usage animal s'ajoute un vaccin humain en 1950, testé sur des travailleurs de laine volontaires, prouvant une efficacité de 92,5% contre la forme cutanée (Center of Disease Control and Prevention - CDC). Ce vaccin, amélioré en 1970, est disponible aux Etats-Unis.

1.2. Agent biologique de guerre et bioterrorisme

Bien que la majorité des cas d'anthrax identifiés soit d'origine naturelle environnementale, il existe quelques contaminations dues à une utilisation intentionnelle comme arme biologique ou bioterroriste. Cet agent biologique est classé par le CDC comme le **second agent de catégorie A**, en 2009 il est au 6^e rang des agents utilisables dans le bioterrorisme. Il représente en effet un pathogène de choix au regard de la haute résistance de ces spores aux conditions extérieures et à la facilité de leur dispersion sous forme d'aérosols.

Les utilisations comme **arme biologique** ont été décrites dans de nombreux pays, de l'Angleterre au Japon (Sweeney *et al.*, 2011 ; Doganay et Demiraslan, 2015 ; Cole, 2010 ; Riedel, 2004). Durant la Première Guerre Mondiale, les Allemands auraient contaminé par voie alimentaire les chevaux destinés aux Alliés. Cet évènement sera pris en compte pour la rédaction du Protocole de Genève de 1925, constituant le premier accord international de « prohibition d'emploi à la guerre de gaz asphyxiants, toxiques ou similaires et de moyens bactériologiques ». Néanmoins, aucune mention n'est faite de la détention ou encore d'une éventuelle riposte.

Durant la Seconde Guerre Mondiale, en 1942, les Anglais ont mené des essais de dissémination par relargage aérien de spores sur l'île Gruinard située au large de la côte Nord-Ouest de l'Ecosse (Manchee *et al.*, 1981), tuant des moutons placés comme cible et laissant une terre contaminée, interdite d'accès pendant plus de 50 ans. Face à la pression en 1981 du « Dark harvest commando » pour l'assainissement de l'île et grâce aux tentatives de décontamination évaluées comme concluantes après lavages à l'eau de mer et au formaldéhyde (Manchee *et al.*, 1983), l'île a été réouverte en 1990. Ces essais, alliant Anglais et Américains, ont été menés dans l'optique d'une contre-attaque en réponse au programme secret d'arme biologique conduit par les Japonais de 1932 à 1945 en Mandchourie. Ce programme de l'unité 731, incluant également les agents de la peste et du choléra, fut testé sur les villages chinois conquis pendant l'invasion et sur des captifs, tuant près de 3000 personnes (Cole, 2010 ; Riedel, 2004). L'intérêt montré par l'Etat américain ne poussa à aucune représaille. Les Américains continuèrent leur recherche d'armement en réalisant de nombreux tests de dissémination jusqu'en 1969, sur de grandes villes telles que San Francisco ou Minneapolis, ainsi que dans le métro new-yorkais, employant des bactéries « test ». Ces essais cessèrent sous la présidence de Nixon. La Convention sur les Armes Biologiques de 1972, réunissant entre autres les Etats-Unis, l'Angleterre et l'Union Soviétique signa l'arrêt de l'utilisation des armes biologiques. Dans un souci de protection de l'Humanité, il fut convenu de « l'interdiction de la mise au point, de la fabrication et du stockage des armes bactériologiques (biologiques) ou à toxines et sur leur destruction » hormis « à des fins prophylactiques, de protection ou à d'autres fins pacifiques ».

Pourtant, malgré la signature de cet accord, plusieurs projets secrets furent mis à jour. Les Russes menèrent un projet secret d'armement biologique qui fut suspecté suite à un accident de relargage de spores à Sverdlovsk en 1979 (Meselson *et al.*, 1994). Tout d'abord prétendue environnementale, l'approche militaire fut révélée par l'enquête demandée en 1992 par le Président Boris Yeltsine après l'effondrement de l'Union Soviétique. En 1995, le programme existait toujours, délocalisé au Kazakhstan. Suite aux accords signés après la Guerre du Golfe (1991) incluant le désarmement biologique de l'Irak, une enquête mit à jour l'existence de recherches sur divers agents biologiques, dont *B. anthracis*, mandatées par Saddam Hussein (Cole, 2011).

La plus grande épidémie humaine mondiale a eu lieu au Zimbabwe en 1979 pendant la guerre civile, avec près de 10 000 cas cutanés et 182 morts en 2 ans, contre seulement 500 cas sur les 50 ans qui l'ont précédé. L'origine de cette épidémie n'a jamais été prouvée mais serait intentionnelle : le parti blanc au pouvoir aurait notamment utilisé *B. anthracis* pour mettre fin aux guérillas menées par les insurgés noirs nationalistes (Wilson *et al.*, 2016 ; Martinez, 2002).

La secte japonaise Aum Shinrikyo est impliquée dans la première tentative d'**utilisation bioterroriste**, par dissémination de spores de *B. anthracis* depuis le toit d'un immeuble de Tokyo en 1993. Celle-ci fut infructueuse du fait de l'emploi de la souche vaccinale Sterne 34F2 disponible dans le commerce pour la vaccination des animaux (Takahashi *et al.*, 2004). Le premier acte bioterroriste avec l'utilisation d'une souche pleinement virulente a eu lieu en 2001 aux Etats-Unis, par l'envoi de lettres contenant des spores de la souche virulente Ames à des institutions médiatiques et des bureaux gouvernementaux en Floride, à New York et à Washington DC. Cette attaque a causé l'infection de 22 personnes dont 5 morts par voie inhalatoire, et le traitement de 32 000 personnes en prophylaxie (Jernigan *et al.*, 2002). Il en a découlé une panique sociale conséquente. Depuis, plusieurs tentatives d'attaques bioterroristes, commanditées notamment par l'Etat Islamique ont été déjouées au Kenya en 2016 et en Italie en 2018. Jusqu'à ce jour, l'envoi de poudres blanches a été rapporté aux Etats-Unis ainsi qu'en Belgique auprès de grandes instances et de centres de tri, ou encore en France à Disneyland Paris en 2018 (Radio-télévision belge de la Fédération Wallonie-Bruxelles).

Au regard de ces informations et du fait qu'à ce jour, certains pays n'ont toujours pas signé la Convention de 1972 (Arms Control Association), la question d'un risque d'utilisation par un état non signataire d'une arme biologique, ou d'un groupe bioterroriste ne peut être ignorée.

1.3. La maladie au 21^e siècle

Aujourd'hui, la maladie du charbon sévit toujours, touchant principalement le bétail et les animaux de la faune sauvage. Ainsi, la France n'est pas exempte d'épizooties affectant le bétail : en 2008, 21 foyers ont été recensés dans le Doubs et 17 foyers en Savoie en 2009 ; en globalité jusqu'à 8 foyers ont été

signalés chaque année en France entre 1999 et 2017 ([Avis de l'Anses, Saisine n° 2016-SA-0286](#)). A l'été 2018 est survenue la plus grande épidémie depuis 20 ans, avec la mort de 50 bovins, ovins et équidés, ainsi que 103 personnes mises sous prophylaxie dans le département français des Hautes-Alpes qui comptaient 23 foyers ([Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentaire, de l'Environnement et du Travail ; Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation ; journal Le Point, août 2018](#)). La France n'est pas indemne de cas humains. Sur les vingt dernières années, 3 cas de charbons cutanés ont été répertoriés en Moselle en 2009 ([Cinquetti *et al.*, 2009](#)) et un cas de charbon injectionnel en Savoie en 2012 ([Thouret *et al.*, 2020](#)).

Des épizooties affectant la faune sauvage au sein de parcs nationaux sont bien documentées, dont le Parc National Etosha en Namibie, avec une première infection répertoriée en 1964, le Nord-Ouest du Canada avec 9 épidémies chez les bisons depuis 1962 aux alentours du Parc National Wood Bison ([Dragon *et al.*, 1999](#)), ou encore le Parc National Kruger en Afrique du Sud avec un premier cas confirmé en 1954.

Les événements les plus récents ont eu lieu notamment en Russie, en Afrique et au Canada où 451 carcasses de bisons ont été retrouvées en 2012 au Mackenzie Bison Sanctuary ([New *et al.*, 2017](#)). En Russie, dans la région de Yamalo-Nenets, bien que le dernier épisode de charbon connu ait eu lieu en 1941, la réexposition d'une carcasse de renne infectée par fonte exceptionnelle du permafrost a conduit au décès d'un enfant de douze ans, à l'hospitalisation de 72 personnes et au sacrifice de 2300 rennes afin de limiter la contamination qui aurait été relayée par des insectes volants ([Popova, 2016 ; Siberian Times, août 2016](#)). En Afrique du Sud, le Lesotho a connu 3 épisodes épidémiques depuis mai 2019, touchant le bétail et 50 personnes ayant consommé de la viande contaminée (proche de la zone endémique du parc national Kruger) ([National Institute for Communicable Diseases](#)). Un épisode touchant 114 hippopotames et 20 buffles a été rapporté en 2017 en Namibie dans le parc national Bwabwata, ne faisant aucune victime humaine parmi les 1050 personnes ayant été en contact, suite à une intervention rapide du gouvernement et du *Center of Disease Control and prevention* (CDC) ([Cossaboom *et al.*, 2019 ; CDC](#)).

2. *Bacillus anthracis* et environnement

2.1. Le groupe *Bacillus cereus*

2.1.1. Classification et particularités

Phylogénétiquement, le groupe *Bacillus cereus* appartient au phylum des Firmicutes et comprend 8 espèces que sont *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. cytotoxicus* et *B. toyonensis*. Ces bactéries sont des bacilles à Gram positif, sporulantes, aéro-anaérobies facultatives et sont endémiques dans les sols. Leur génome, constitué d'un ADN à faible taux de GC%, et d'une taille d'environ 5-6Mb, est très conservé, de même que leurs ARN 16S et 23S, et présente un degré de synténie élevé (Ehling-Schulz *et al.*, 2019). Ces bactéries contiennent également du matériel extrachromosomique, jusqu'à 6 plasmides dont la taille varie de 2 à 600kb selon la souche (Tourasse *et al.*, 2006 ; Patiño-Navarrete et Sanchis, 2017). Leur hétérogénéité réside principalement dans leur profil plasmidique, souvent relié au caractère virulent de la bactérie. La plupart des espèces se différencient selon des critères phénotypiques. Trois d'entre-elles sont connues pour leur impact médical (classe I) reposant sur des plasmides codant des facteurs de virulence spécifiques à l'origine de pathologies distinctes : *B. cereus* (plasmide pCER270 et sa toxine émétique), *B. thuringiensis* (les plasmides codant les toxines insecticides Cry et Cyt) et *B. anthracis*, (plasmides pXO1 et pXO2 codant respectivement les toxines létale et oedémateuse, et la capsule d'acide poly- γ -D-glutamique dite PDGA).

2.1.2. Plasticité génétique

Parmi les plasmides retrouvés au sein des souches *B. cereus*, certains sont décrits comme des plasmides pXO1-like, le plasmide pXO1 de référence provenant de *B. anthracis* (Kolstø *et al.*, 2009). Ces plasmides présentent une grande similarité de séquence à l'exception des gènes responsables de la pathogénicité (*B. cereus*/toxines émétiques, *B. anthracis*/toxines ET et LT) (Rasko *et al.*, 2006). Des plasmides de type pXO2-like sont retrouvés chez *B. thuringiensis*, sans similarité des gènes de virulence, mais possédant des gènes de transfert permettant leur auto-conjugaison ou la mobilisation de plasmides dans le processus de conjugaison (Hu *et al.*, 2009; Van der Auwera *et al.*, 2005 et 2008). Certains plasmides du groupe *B. cereus sensu lato* possèdent une aptitude à la transmission de matériel génétique. De fait, des échanges et transferts peuvent avoir lieu entre les différentes espèces du groupe *cereus*. La diversité de combinaisons entre chromosome et plasmides génère ainsi de nouvelles souches avec de nouvelles propriétés. La plasticité génétique est due à des éléments génétiques et enzymes contribuant aux transferts génétiques (Patiño-Navarrete et Sanchis, 2017 ; Tourasse *et al.*, 2006 ; Kolstø *et al.*, 2009).

2.2. Distribution géographique

Bien que devenue rare dans les pays industrialisés grâce aux traitements antibiotiques et à la vaccination, la maladie reste **endémique à travers le monde**, principalement dans les terres agricoles. Sa distribution géographique s'étend sur les zones climatiques chaudes et tempérées de notre globe terrestre (**Figure 1**) (Doganay et Demiraslan, 2015 ; CDC ; Schmid et Kaufmann, 2002). De nombreux animaux de la vie sauvage et domestique sont exposés au bacille du charbon.

Selon Carlson *et al* (2019), ce sont 1,8 milliard de personnes qui vivent dans des zones à risque, concernant plus particulièrement le monde rural avec 63,8 millions d'éleveurs et 1,1 milliard de têtes de bétail, en **Eurasie, Afrique et Amérique du Nord**. Leur étude sur 20 ans, dans plus de 70 pays a permis d'établir une carte répertoriant la distribution géographique des cas d'anthrax de 2005 à 2016, mettant bien en évidence les zones endémiques en Chine, Australie, Asie centrale (Kazakhstan), Amérique du Nord (Alberta et territoires Nord-Ouest), du Sud et Centrale ainsi que la zone subsaharienne africaine (Carlson *et al.*, 2019 ; Ehling-Schulz *et al.*, 2019). Ces zones couvrent les pays en voie de développement qui ne bénéficient que de peu de moyens prophylactiques pour la vaccination de leurs troupeaux, or, limiter l'incidence animale permettrait, par extension, de limiter les contaminations humaines.

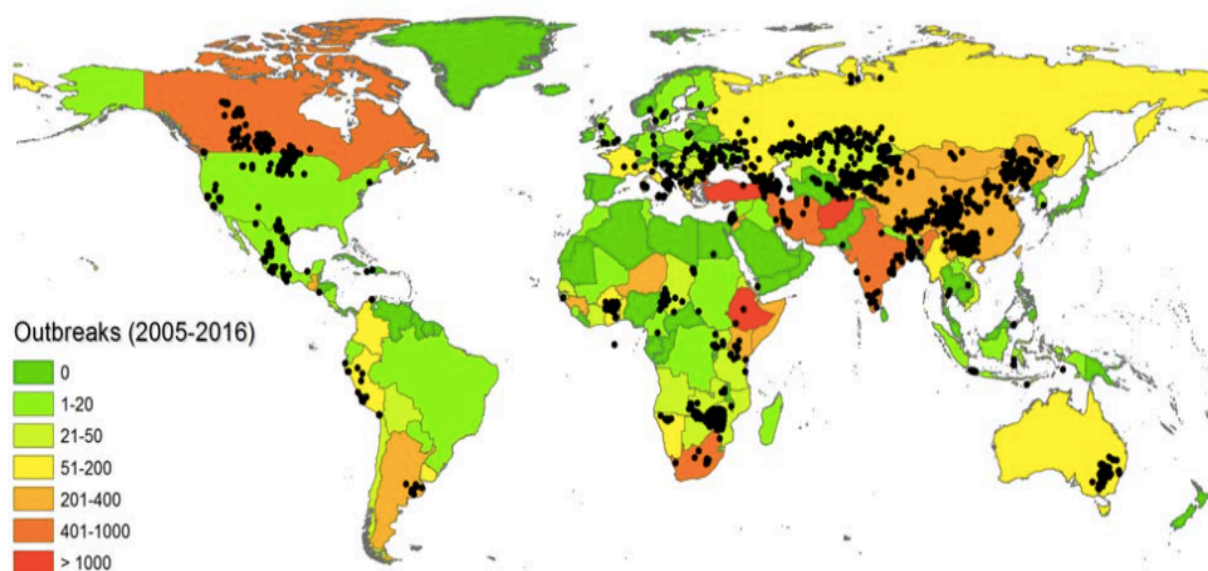


Figure 1. Recensement des occurrences de cas de maladie du charbon dans le monde entre 2005 et 2016. Les occurrences sont indiquées par les points noirs et le nombre d'évènements par pays est indiqué par le code couleur (Carlson *et al.*, 2018).

2.3. Ecologie

2.3.1. Cycle de vie de *B. anthracis*

La maladie du charbon est la conséquence d'une infection d'origine bactérienne. L'agent biologique responsable est le **bacille à Gram positif *B. anthracis***, un bâtonnet pouvant se présenter sous forme de chainettes. Il présente une capacité de sporulation qui lui confère une résistance aux conditions environnementales extrêmes, permettant sa survie sur de longues périodes et constituant des réservoirs au niveau des sols.

Les animaux font partie intégrante du cycle de vie de *B. anthracis* (**Figure 2**). La décomposition des animaux morts infectés va permettre le passage du bacille sous une **forme dormante, la spore**, qui sera retrouvée dans les sols. Ces spores vont ensuite être ingérées par de nouveaux animaux et germer grâce à l'environnement favorable que procure l'hôte (élévation de la température et présence de CO₂, oxygène, eau et nutriments).

Les métabolites fournis, appelés germinants, constituent un signal essentiel de germination. La L-alanine, seule ou combinée avec la L-Proline, la L-Histidine ou un acide aminé aromatique, est capable d'induire la germination. L'inosine couplée à de nombreux acides aminés peut également conduire à la germination (Ireland et Hanna, 2002). Dans un milieu naturel, les signaux sont multiples, simultanés et inter-régulés en fonction du germinant et de son co-germinant, mais également des concentrations de chacun (Luu *et al.*, 2011). L'interaction du germinant avec les récepteurs de la membrane interne de la spore conduit à la rupture du cortex par les enzymes lytiques qu'il contient, ce qui réhydrate la spore et permet la croissance bactérienne. La germination de la spore vers la **forme végétative** qu'est le **bacille**, permet la sécrétion des toxines (aspect toxémique de la maladie) et la multiplication bactérienne (aspect infectieux de la maladie) pour envahir et conduire à la mort d'un nouvel hôte.

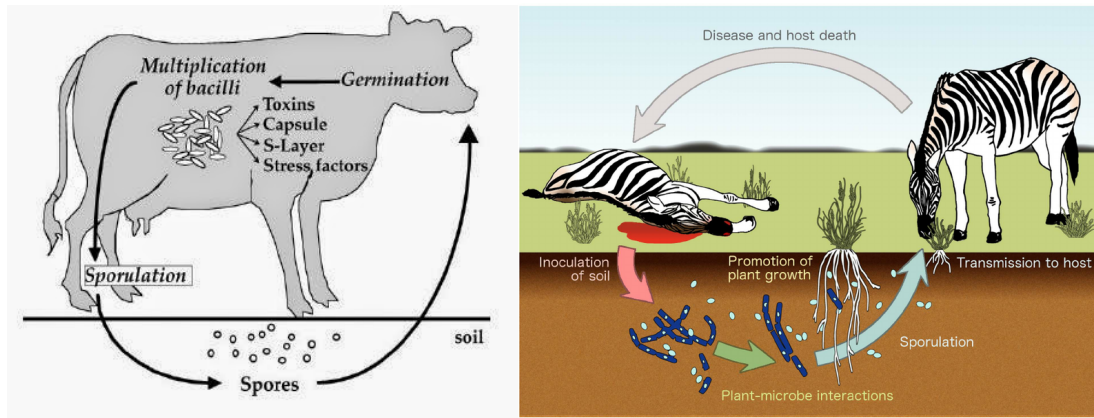


Figure 2. Cycle de vie de *Bacillus anthracis*. Les spores sont ingérées par les animaux permettant leur germination en bacilles responsables de l'expression de facteurs de virulence provoquant la mort de l'hôte. Les bacilles sporulent alors et réinfectent le sol et les plantes pour un nouveau cycle (à droite, Mock et Fouet, 2001 ; à gauche, Ganz et al., 2014).

2.3.2. Sporulation et germination

Les spores de *B. anthracis*, d'une taille de 2 µm par 1 µm, représentent la forme dormante. La survie de la forme végétative est très faible en dehors d'un hôte.

La sporulation de la forme végétative laisse apparaître en position centrale ou sub-terminale du bacille une spore en forme d'ellipse uniquement **lorsque le milieu est épuisé et en présence d'oxygène**, c'est-à-dire lorsque le sang des carcasses est exposé à l'environnement (Figure 2). L'absence d'ouverture de la carcasse d'un animal infecté conduit à la mort du pathogène par défaut de sporulation (Hugh-Jones et De Vos, 2002). Les sols sont favorables à la sporulation. **La température et le taux d'humidité relative** sont également des facteurs importants puisque la baisse de l'un de ces facteurs induit une sporulation et une germination globalement retardée et/ou réduite (Davies, 1960). La germination est possible entre 20 et 44°C, optimale entre 30 et 39°C, et nécessite un taux d'humidité relative supérieur à 80% (Davies, 1960). La théorie évoquant *B. anthracis* comme un pathogène hôte-obligatoire est remise en question en faveur d'un processus de germination possible hors mammifères. Ainsi, bien qu'il soit suggéré un antagonisme bactérien en défaveur de *B. anthracis* quant à sa germination dans les sols (Carlson et al., 2018 ; Hugh-Jones et De Vos, 2002), celle-ci pourrait avoir lieu au niveau de la **rhizosphère** de plantes (Saile et Koehler, 2006). Par ailleurs, les **amibes** pourraient constituer un hôte environnemental de choix permettant un cycle complet de germination et de multiplication de la forme végétative (Dey et al., 2012). Un mode de survie de la forme végétative est également décrit suite à l'infection de *B. anthracis* par des **bactériophages** conférant au bacille une production d'exopolysaccharide accrue permettant la formation de biofilm nécessaire à la survie dans le sol ainsi que dans l'intestin d'hôte invertébré pendant 6 mois (Schuch et Fischetti, 2009).

2.3.3 Dissémination et persistance des spores

Le rôle indispensable des vautours et autres charognards (chacals, hyènes, insectes nécrophiles) dans la dissémination du pathogène est mis en lumière dans le passage vers la forme dormante et l'extension des zones de contagion par infection de nouveaux animaux, transport de morceaux de carcasses, dépôt de fèces, contamination de points d'eau et de la végétation (Hugh-Jones et Blackburn 2009; Hugh-Jones et De Vos, 2002 ; Lindeque et Turnbull, 1994). Par ailleurs, la décomposition des carcasses infectées permet l'apport en nutriments requis pour le développement d'une végétation, contribuant à l'attractivité du site pour les herbivores, qui vont s'infecter par consommation d'herbes contaminées par des spores de *B. anthracis* (Ganz *et al.*, 2014 ; Turner *et al.*, 2014).

La capacité de persistance des spores dans les sols constitue la cause majeure des réinfections d'une année à l'autre, voire même plusieurs décennies après les derniers épisodes survenus. Les spores de *B. anthracis* sont hautement résistantes aux facteurs environnementaux : fortes températures, pression, agents chimiques, ultraviolets et radiations ionisantes (Mitscherlich et Marth, 1984 ; Setlow, 2014). Certaines **conditions physicochimiques** permettent le maintien des spores dans l'environnement, tels qu'un pH alcalin ou une forte concentration en calcium (Dragon et Rennie, 1995). Une forte concentration en matières organiques, et une température supérieure à 15,5°C sont également favorables à la persistance des spores, en permettant leur concentration localisée au point de contact avec le sol (Hugh-Jones et Blackburn, 2009). La persistance dans les sols permet la conservation d'un taux de spores suffisant à la réémergence de la maladie près de 200 ans après la contamination initiale comme le démontrent les derniers épisodes de contamination du 20^e siècle (Popova, 2016). Bien qu'étant résistantes aux contraintes environnementales, la concentration locale en spores peut diminuer au fil du temps, ne laissant qu'un faible taux de spores dans la végétation après 2 ans (Turner *et al.*, 2014).

Il existe un **schéma climatique** favorable à la réémergence de la maladie avec des périodes de pluies intenses suivies par une saison très sèche. En effet, le caractère hydrophobe de la surface des spores permet leur remontée du sous-sol. Entraînées par les eaux, les spores peuvent également créer des zones secondaires localement concentrées dites de stockage. Les habitudes alimentaires animales sont ainsi modifiées mettant à disposition, par temps sec, des plantes abrasives favorables à un nouveau cycle d'infection face à des herbivores aux défenses immunitaires affaiblies (Hugh-Jones et Blackburn, 2009 ; Lindeque et Turnbull, 1994 ; Turner *et al.*, 2013).

2.4. *Bacillus cereus anthracis-like*

2.4.1. Origines : divergences et similarités

Les **échanges génétiques** sont fréquents entre *B. anthracis*, *B. cereus* et *B. thuringiensis* qui sont phylogénétiquement très proches. Les plasmides pXO1 et pXO2 peuvent être transférés par les

plasmides conjugatifs pXO12 et pXO14 de *B. thuringiensis* vers des souches *B. anthracis* et *B. cereus* receveuses, leur conférant par exemple la capacité à synthétiser la capsule lors du transfert de pXO2 (Battisti *et al.*, 1985; Reddy *et al.*, 1987). Le transfert génétique parmi les *B. cereus* a été identifié dans divers environnements, notamment par les expérimentations menées par Saile et Koehler (2006) qui montrent un transfert de matériel génétique possible chez *B. anthracis* dans le sol au niveau de la rhizosphère. Ainsi, des isolats combinant les caractéristiques de deux bactéries ont été découverts, probablement suite à l'hypothèse d'un transfert lors des phases végétatives de *B. anthracis* vers *B. cereus* (Okinaka *et al.*, 2006). Ceci suggère un modèle d'acquisition plasmidique par *B. cereus* selon deux possibilités : un transfert latéral avant divergence des deux espèces ou un ancêtre commun avec perte de pXO1 et/ou pXO2 par certains descendants.

2.4.2. Les souches *B. cereus anthracis-like* isolées chez l'Homme

C'est lors de l'étude de cas de **pneumonies**, que les premiers cas de pathologies de type anthracis-like ont été décrits chez des patients en bonne santé présentant une infection à *B. cereus*. La première évocation date de 1965 (Stapler *et al.*, 1965). D'autres cas sont survenus chez des **travailleurs de métaux** en Louisiane en 1994, 1997 et 2007 (Miller *et al.*, 1997 ; Hoffmaster *et al.*, 2004 ; Pena-Gonzalez *et al.*, 2017) et au Texas en 2003 et 2011 (Avashia *et al.*, 2007; Wright *et al.*, 2011). L'inhalation quotidienne de poussières et de fumées métallurgiques pourrait fragiliser ces travailleurs et les sensibiliser à une infection pulmonaire (Avashia *et al.*, 2007). Un cas de charbon cutané est également signalé en Floride en 2013 et présente des similarités avec la souche G9241 isolée en 1994 (Gee *et al.*, 2014). Ces souches ont la particularité de contenir un plasmide pXO1-like avec les gènes codant les toxines létale (LT) et oedémateuse (ET) de *B. anthracis* et une capsule d'acide hyaluronique (HA) absente chez *B. anthracis* par mutation non-sens (Oh *et al.*, 2011 ; Baldwin, 2020). Certaines souches bactériennes possèdent un second plasmide pBC210 codant une capsule polysaccharidique (Sue *et al.*, 2006 ; Hoffmaster *et al.*, 2006; Baldwin, 2020). Le fond chromosomique appartient à *B. cereus*, classe I.

2.4.3. Les souches *B. cereus anthracis-like* isolées chez l'animal

B. anthracis infecte habituellement les herbivores et ongulés de la savane africaine, plus rarement l'homme, et peu de cas sont rapportés chez les primates. De nouvelles souches ont émergé **en Afrique**, responsables de pathologies anthracis-like **principalement chez les grands singes** (Klee *et al.*, 2006 ; Antonation *et al.*, 2016), en forêt tropicale contrairement à l'environnement aride habituel de *B. anthracis* (Romero-Alvarez *et al.*, 2020). Les premiers cas observés en Côte d'Ivoire (CI) avec 6 chimpanzés en 2001/2002 (Leendertz *et al.*, 2004) puis 3 chimpanzés et 1 gorille au Cameroun (CA) en 2004/2005 (Leendertz *et al.*, 2006), ont été attribués à *B. anthracis*. Des cas d'infection chez d'autres

animaux de la faune sauvage ont également été répertoriés en 2012/2013 en République Centrafricaine et en République Démocratique du Congo (Antonation *et al.*, 2016). Dans le parc national Taï de Côte d'Ivoire, la susceptibilité d'hôte s'étend aux céphalophes et plus rarement aux mangoustes et porc-épics avec une transmission classique *via* les carcasses et les insectes (Hoffmann *et al.*, 2017). De plus, les données collectées par l'équipe de Hoffmann de 1989 à 2014 font état de 38% de mortalité due à *Bacillus cereus* biovar *anthracis* (Bcbva) et une détection de l'ADN dans 40% des carcasses, 35% des os et 5% des insectes analysés. L'identification des souches CI et CA par l'équipe de Klee *et al* en 2006, a permis leur classification en tant que *B. cereus anthracis-like*, différente de la souche G9241.

Les Bcbva se distinguent des souches humaines : elles possèdent à la fois des plasmides de type pXO1 et pXO2 avec presque 100% d'identité de séquence, codant les toxines LT, ET et la capsule HA, et la capsule PDGA respectivement (Klee *et al.*, 2006 et 2010; Brézillon *et al.*, 2015). Deux autres souches isolées chez un bovin au Cameroun et un kangourou en Chine, possèdent les mêmes caractéristiques de virulence (Baldwin, 2020).

3. Bacillus anthracis : pathogénie et pathologie

L'homme est contaminé par la spore, forme infectante de la maladie du charbon. Classiquement, la contamination peut avoir lieu par contact avec des animaux ou des produits animaux, notamment dans les industries spécialisées (viande, peau, laine) ou chez les éleveurs et agriculteurs (Doganay et Demiraslan, 2015). Différentes portes d'entrée ont été identifiées que ce soit par l'alimentation, l'aérosolisation, ou une blessure. Chaque voie d'infection définit une forme bien spécifique de la maladie du charbon, laquelle est classifiée en quatre formes de pathologies.

3.1. Les types d'anthrax

3.1.1. La forme cutanée

L'infection par voie cutanée est la forme **la plus répandue**, avec près de 95% des cas, mais aussi **la moins dangereuse**, avec 80% de survie en l'absence de traitement, la disponibilité de traitements efficaces permettant de réduire considérablement le taux de mortalité à moins de 1% (CDC, Sweeney *et al.*, 2011). L'infection cutanée est principalement localisée sur les mains et bras, le cou ou encore le visage. Elle survient suite au contact de spores au niveau d'une **lésion de l'épiderme (Figure 3)**, notamment lors de manipulations de produits animaux contaminés, de piqûres d'insectes ou encore via le follicule pileux suite à l'abrasion de l'épiderme (Hahn *et al.*, 2005).

Après une période d'incubation variant de 24h à une semaine, des signes cliniques sont observés au niveau du site d'infection et des tissus alentours (Sweeney *et al.*, 2011 ; Doganay et Demiraslan, 2015 ; Hilmas et Anderson, 2015). L'infection débute par un prurit parfois associé à une papule (2 à 5 jours post-exposition) qui va progressivement grossir et s'accompagner de vésicules pour atteindre environ 1-2cm de diamètre en 24-72h. Elle évolue en ulcère qui peut se rompre pour laisser apparaître une escarre nécrotique noire, typique de la forme cutanée, entourée d'un œdème (Figure 3). Parmi les signes cliniques associés, on observe fièvre, maux de tête, malaise, toxémie et adénopathie lymphatique régionale. Cette forme de la maladie tend à guérir de façon générale en 2 à 3 semaines avec disparition de l'escarre et jusqu'à 6 semaines.

3.1.2. La forme pulmonaire

Le charbon dit « pulmonaire » est la forme **la plus mortelle** de la maladie avec une période d'incubation allant de 1 à 6 jours (jusqu'à 43 jours pour l'accident de Sverdlovsk), et une mortalité atteignant les 85% en l'absence de traitement contre 45% après un lourd traitement (Doganay et Demiraslan, 2015 ; CDC). Dans près de 50% des cas, des complications de type méningites sont évoquées (Doganay et

Demiraslan, 2015). Les poumons ne représenteraient qu'une porte d'entrée pour les spores suite à leur **inhalation** dans un environnement aérien contaminé (**Figure 3**). La maladie débiterait au niveau du système lymphatique d'où les bacilles dissémineraient dans l'organisme (**Anthrax in humans and animals, WHO 2008**).

Les symptômes relatifs à l'infection se décomposent en 2 phases (**Frazier et al., 2006 ; Doganay et Demiraslan, 2015; Sweeney et al., 2011**). La première s'apparente aux symptômes grippaux avec fièvre, malaises et toux associées à l'infection des voies respiratoires supérieures ; la seconde est observée entre 2 et 4 jours après l'apparition des symptômes, avec une évolution vers une dyspnée, une cyanose et une toxémie. La mort du sujet infecté est due à une détresse respiratoire, une hypotension par rétrécissement des voies circulatoires, une intoxication et un choc septique. On observe un épaississement péribronchovasculaire témoignant d'une hémorragie et d'un œdème au niveau du ganglion médiastinal, une nécrose des voies aériennes et des canaux lymphatiques adjacents (**Frazier et al., 2006**). L'observation d'effusions pleurales et d'un médiastin élargi permet de distinguer la maladie du charbon d'une pneumonie (**Frazier et al., 2006**).

3.1.3. La forme gastro-intestinale

Bien que **rare**, la forme gastro-intestinale présente un taux de mortalité important atteignant 25 à 60% (**Hilmas et Anderson, 2015 ; Sweeney et al., 2011 ; Doganay et Demiraslan, 2015**). Les symptômes ne sont pas spécifiques et induisent par conséquent une sous-estimation des cas. La période d'incubation est similaire à la forme cutanée (une semaine maximum), la survie étant estimée à moins de 50% sans traitement contre 60% avec traitement avec un rétablissement en 10 à 14 jours (**Hilmas et Anderson, 2015**). Suite à l'**ingestion de viandes crues, insuffisamment cuites, ou d'eau contaminées** par des spores, l'infection peut se développer au niveau du tractus gastro-intestinal supérieur, de l'estomac et des intestins (**Figure 3**). Deux sous-types sont alors à distinguer : l'infection oropharyngée et l'infection gastro-intestinale, plus fréquente.

L'infection oropharyngée est caractérisée par des lésions au niveau de la langue, de la cavité buccale et du pharynx, un gonflement des ganglions cervicaux se présentant sous forme de lésions d'environ 2cm de diamètre recouvertes d'une pseudomembrane grise entourée d'un œdème (**Doganay et Demiraslan, 2015**). L'infection gastro-intestinale présente des symptômes similaires à une intoxication alimentaire : nausées et vomissements, douleurs abdominales, diarrhées, fièvre. Elle résulte directement des lésions du tractus gastro-intestinal, principalement au niveau de l'iléum terminal et du caecum, moins fréquemment pour les autres parties situées entre l'estomac et le gros intestin. Des ulcérations de la muqueuse avec œdème, obstruction et perforation ou encore hémorragie intestinale, distension abdominale et diarrhée hémorragique sont observées (**Doganay et Demiraslan, 2015 ; Hilmas et Anderson, 2015**).

3.1.4. La forme injectionnelle

Le charbon injectionnel est la forme **la moins fréquente** de la maladie, mais elle présente une forte mortalité ne descendant pas sous les 33% malgré les traitements, par augmentation du risque de complications de type méningites et choc septique (Zasada, 2018 ; Berger *et al.*, 2014 ; Sweeney *et al.*, 2011). Identifiée chez quelques **héroïnomanes** de la partie nord de l'Europe, les premiers cas sont apparus en Norvège en 2000 (Ringertz *et al.*, 2000). Le début des années 2010 est marqué par 2 grands épisodes infectieux (Berger *et al.*, 2014 ; Thouret *et al.*, 2012). Le premier en 2009-2010 avec 119 cas en Ecosse, 5 cas au Royaume-Uni et 2 cas en Allemagne. Le second en 2012-2013 avec de nouveaux cas dans les pays précédemment cités auxquels s'ajoutent le Danemark, le Pays de Galles ainsi qu'un cas à Chambéry en France signalé par la Société Française de Médecine d'Urgence en 2012.

L'injection par **voies intraveineuse, sous-cutanée ou intramusculaire**, provoque une infection qui atteint les tissus plus profondément. La période d'incubation s'étend de 1 à 10 jours et la guérison, suite à hospitalisation, peut durer jusqu'à 1 mois (Zasada, 2018). Les manifestations typiques de l'anthrax cutané sont absentes, remplacées par une infection sévère des tissus mous ainsi qu'un important œdème au site d'injection (Sweeney *et al.*, 2011 ; Berger *et al.*, 2014). L'exploration par débridement des tissus montre des saignements capillaires, un œdème tissulaire et une nécrose des tissus adipeux superficiels. (Sweeney *et al.*, 2011).

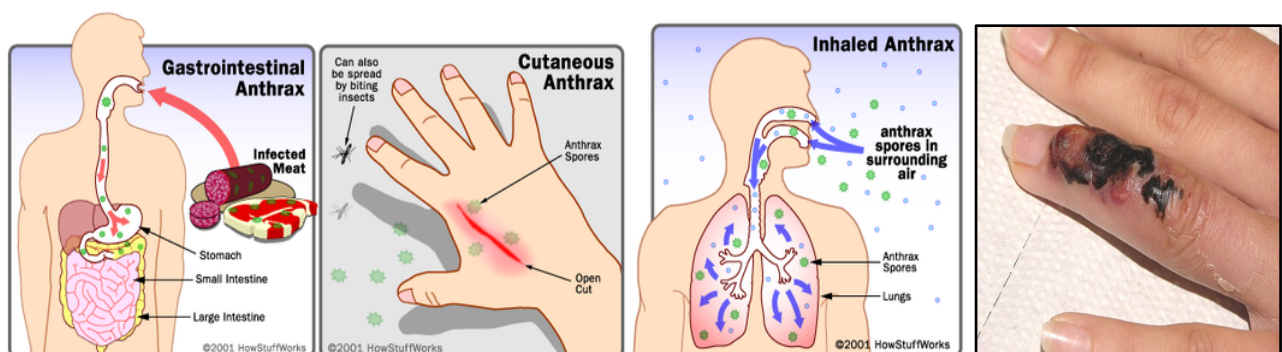


Figure 3. Les formes de la maladie du charbon. Les 3 formes principales et le mode d'infection (source : dessins dans « HowStuffWorks »). Photo d'une escarre noire caractéristique de la maladie du charbon (Van den Enden *et al.*, 2006).

3.1.5. Les complications

La méningite, une complication possible de la maladie du charbon, est rare mais hautement fatale (plus de 90% de mortalité). Dans 50% des cas, elle fait suite à une infection primaire de type pulmonaire mais

reste possible à partir de chaque forme de la maladie (Doganay et Demisralan, 2015 ; Sejvar, 2005). Le pathogène, qui se dissémine dans la circulation sanguine ou le système lymphatique, cible le système nerveux central par traversée de la barrière hématoencéphalique et conduit à l'infection des méninges et du fluide cérébrospinal (Sejvar, 2005). Le traitement antibiotique n'est malheureusement que peu efficace, la mort survenant très rapidement après l'apparition des symptômes (fièvre, maux de tête, nausée et vomissements, malaise, frissons, agitation et rigidité de la nuque). Les signes critiques pronostiquant le décès du patient, sont les atteintes de type neurologique tels que délire, coma et dégénération survenant en général dans les 2 à 4 jours (Sejvar, 2005). Les bacilles sont retrouvés dans les méninges, l'espace subarachnoïdique, le parenchyme ou encore dans les fluides cérébrospinaux sanguinolents témoignant d'une hémorragie cérébrale (Sejvar, 2005).

La septicémie dérive de la dispersion de *B.anthraxis* par voie lymphohématogène. Elle est principalement observée lors des infections pulmonaire et gastro-intestinale. Les signes cliniques incluent une détresse respiratoire, un statut mental altéré et de la fièvre. La mort peut survenir rapidement suite à une forte toxémie et un choc septique (Doganay et Demisralan, 2015).

3.2. Diagnostic de laboratoire

Selon la forme de la maladie suspectée, l'identification de l'infection par *B. anthracis* peut être effectuée à partir de différents types d'échantillons tels que le sang, les biopsies, les expectorations, les ascites, les fluides cérébrospinaux et pleuraux ou encore des écouvillonnages provenant des lésions cutanées et oropharyngées. Cependant, le traitement antibiotique peut contribuer à diminuer la détection du pathogène selon son degré de sensibilité. Par ailleurs, certaines caractéristiques sont communes avec les autres bacilles du groupe *B. cereus* (Zasada, 2020). Il est donc nécessaire d'ajouter les méthodes pour procéder à l'identification.

Classiquement, l'isolation de la bactérie est faite par des techniques de microbiologie (Hilmas et Anderson, 2015 ; Zasada, 2020). Il est alors recherché la présence de bacilles à Gram positif de taille 1 µm par 4 µm, en courte chaînette, non motiles, non hémolytiques, catalase-positifs, sensibles au bactériophage gamma et à la pénicilline G. La morphologie de colonies plates et larges en « tête de méduse » de coloration gris/blanc et à bords irréguliers est observée sur gélose au sang de mouton. La capsule PDGA est mise en évidence en présence de CO₂ et bicarbonate, par coloration à l'encre de Chine (halo blanc autour du bacille) ou par coloration M'Fadyean (bacille bleu entouré d'une capsule rose). La capacité de sporulation est observée lors de l'épuisement du milieu nutritif par présence d'une spore subterminale au sein du bacille ou à l'aide de colorations telle que la coloration de Gram (spores incolores), la coloration vert malachite/ fuchsine (spores vertes et bacilles roses), ou Ziehl-Neelsen (spores roses et bacilles bleus).

Le diagnostic est ensuite confirmé à l'aide de techniques complémentaires (Zasada, 2020 ; Kim *et al.*, 2015). La PCR en temps réel est utilisée pour la détection de locus chromosomiques ou des plasmides de virulence (gènes codant les toxines et la capsule). Le marquage immunohistochimique ainsi que des techniques basées sur la fluorescence, les réactions enzymatiques ou antigéniques, permettent de détecter des marqueurs de surfaces ou les facteurs de virulence ; il y a ainsi des ELISA pour la détection directe de PA ou bien d'IgG dirigés contre PA.

Cas des *B. cereus anthracis-like*

Les souches de *B. cereus anthracis-like* possèdent une forte identité protéique des facteurs PA, EF et LF avec *B. anthracis* (Hoffmaster *et al.*, 2004 ; Klee *et al.*, 2010). Elles se distinguent néanmoins de *B. anthracis* par des caractères phénotypiques et biochimiques différents (Klee *et al.*, 2006 ; Hoffmaster *et al.*, 2004 ; Brézillon *et al.*, 2015 ; Scarff *et al.*, 2018). La découverte récente d'une protéine sécrétée par Bcbva nommée pXO2-60, absente chez *B. anthracis* du fait d'une mutation non-sens, permet une détection spécifique par ELISA (Dupke *et al.*, 2019). Elle permettrait par association à l'ELISA anti-PA de discriminer Bcbva de *B. anthracis* dans les populations humaines et la faune sauvage.

3.3. Traitements et prophylaxie

3.3.1. Traitement antibiotique

Le traitement de première intention consiste en une antibiothérapie puisque la sensibilité et la résistance du pathogène sont largement connues (Sweeney *et al.*, 2011 ; Doganay et Demiraslan, 2015 ; Hilmas et Anderson, 2015). Les recherches s'orientent vers la découverte de nouveaux antibiotiques afin de combattre les résistances émergentes, et vers de nouvelles cibles antibactériennes telles que la réplication de l'ADN, la synthèse de l'ARN, la division cellulaire ou encore le quorum sensing (Head *et al.*, 2016). Les préconisations pour le traitement sont fournies par le CDC (Hilmas et Anderson, 2015 ; Sejvar, 2005). Le choix de la voie d'administration de l'antibiotique dépend de la sévérité de l'infection. Le mode oral est utilisé pour des infections moyennes tandis que la voie intraveineuse sera privilégiée lors des cas sévères et d'infections systémiques. L'administration de combinaisons d'antibiotiques ainsi qu'un traitement précoce permettent de combattre la bactériémie. Un traitement de longue durée d'environ 60 jours, contribue à pallier la germination tardive des spores. Selon le type d'infection par *B. anthracis*, différentes stratégies complémentaires peuvent être adoptées (Sweeney *et al.*, 2011 ; Doganay et Demiraslan, 2015) tels que le drainage des fluides pleuraux pour la forme pulmonaire, l'assistance respiratoire dans les cas de choc septique, l'administration de stéroïdes dans les cas de méningoencéphalites, les glucocorticoïdes pour la forme cutanée, une résection chirurgicale des lésions intestinales ou un débridement chirurgical des tissus dans les cas injectionnels.

3.3.2. Vaccins et anticorps

Outre le contrôle de l'infection bactérienne en tant que telle, il est évident que l'effet des toxines doit aussi être pris en compte et traité.

L'établissement d'une immunité cellulaire constitue un élément essentiel du combat contre *B. anthracis*. **Deux vaccins**, actuellement autorisés chez l'Homme, sont basés sur la protection contre l'antigène protecteur (PA). Le premier, Anthrax-Vaccine-Adsorbed AVA ou Biothrax est utilisé aux Etats-Unis. Il peut être employé en post-exposition et nécessite 5 injections sous-cutanées sur 18 mois (Ehling-Schulz, 2019). Le second, Anthrax-Vaccine-Precipitated AVP, est utilisé au Royaume-Uni (Ehling-Schulz, 2019). Il est administré en 4 injections intramusculaires sur 32 semaines et semblerait avoir un avantage immunitaire supplémentaire, étant composé de petites quantités de facteurs EF et LF stimulant la production d'anticorps pour leur neutralisation (Ehling-Schulz, 2019). Actuellement, le CDC préconise un traitement par antibiotiques de première ligne que sont la ciprofloxacine et la doxycycline pendant 2 mois, combinés avec des injections du vaccin anthrax adsorbé en 3 injections à espacer de 2 semaines (Sweeney *et al.*, 2011).

Les nouveaux inhibiteurs de toxines en développement ciblent des étapes cruciales : la fixation au récepteur, le clivage par la furine, l'heptamérisation, l'activité enzymatique de EF et de LF (Head *et al.*, 2016). Le résultat de ces recherches a conduit à l'approbation par la *Food and Drug Administration (FDA)* de **2 anticorps monoclonaux et un sérum polyclonal anti-PA** inhibant la fixation de PA au récepteur cellulaire. Le Raxibacumab, un anticorps IgG1 monoclonal humain (Migone *et al.*, 2015), et l'Anthim, un anticorps monoclonal humanisé, ont été autorisés respectivement en 2012 et 2016 (Yamamoto *et al.*, 2016). L'Anthraxil (Anthrax Immune Globulin) est un sérum polyclonal humain obtenu chez des volontaires vaccinés avec Biothrax, approuvé en 2015 (Sprenkle *et al.*, 2014 ; Walsh *et al.*, 2007). Cependant, ces anticorps ne sembleraient convenir qu'à un traitement pré-exposition ou très précoce de la maladie puisque que le titre de toxines circulatoires au stade tardif n'est pas endigué (Tournier *et al.*, 2019). L'Anthraxil est utilisé en complément du traitement antibiotique dans des cas d'infections pulmonaires (Walsh *et al.*, 2007 ; Sprenkle *et al.*, 2014 ; Cui *et al.*, 2017).

4. Les facteurs de virulence

Le matériel génétique de *B. anthracis* est constitué d'un **chromosome bactérien** et de **2 plasmides de virulence** : pXO1 (181kb) codant notamment les facteurs PA, EF et LF composant les toxines ET et LT, et pXO2 (96kb) codant notamment la capsule PDGA. Des îlots de pathogénicité de 44,8kb et 35kb ont été identifiés respectivement sur les plasmides pXO1 (opéron *gerX*, gènes codant les composants des toxines : *pagA*, *lef*, *cya* et leurs régulateurs : *atxA*, *pagR*,) et pXO2 (gènes codant la capsule PDGA : opéron *capABC*, et ses régulateurs *acpA*, *acpB*) (Okinaka *et al.*, 1999 ; Pannucci *et al.*, 2002). Ceux-ci contiennent donc l'ensemble des gènes responsables de la virulence et de leur régulation. Les souches *B. anthracis* virulentes (pXO1+ pXO2+), Sterne (pXO1+ pXO2-) et Pasteur (pXO1- pXO2+) servent de base à l'étude des facteurs et de leurs mécanismes de régulation. L'association entre la capsule et la sécrétion des toxines permet à la bactérie de dérouter la machinerie de défense immunitaire, et de conduire à divers dommages cellulaires et tissulaires aboutissant à la mort de l'hôte.

Les plasmides pBCXO1 et pBCXO2 retrouvés chez les souches *B. cereus* anthracis-like présentent une forte homologie de séquence et des facteurs de virulence similaires, leur régulation peut être assimilée comme étant identique à *B. anthracis*, les particularités connues à ce jour seront notifiées.

4.1. Les régulateurs de virulence

4.1.1. Facteurs environnementaux

L'expression des facteurs de virulence, toxines et capsule, est dépendante des signaux environnementaux fournis lors de l'infection de l'hôte. La transcription des gènes *pagA* (PA), *cya* (EF) et *lef* (LF) est plus élevée à 37°C qu'à 28°C, et suit la courbe de croissance bactérienne (Sirard *et al.*, 1994). Ces résultats sont en corrélation avec les premières observations de Metchnikoff en 1884, où grenouilles et lézards normalement insensibles, succombent à l'infection dans un environnement atteignant les 37°C (cité par Sirard *et al.*, 1994). Une synthèse accrue est observée en présence de CO₂/bicarbonate pour la capsule PDGA (Thorne *et al.*, 1952 ; Meynell et Meynell, 1964 ; Makino *et al.*, 1988 ; Uchida *et al.*, 1997) et les toxines (Bartkus et Leppla, 1989 ; Koehler *et al.*, 1994). En effet, comparé au taux de transcription en condition atmosphérique classique, la transcription des gènes *pagA*, *cya* et *lef* est augmentée et ce, uniquement lors de la culture des bactéries en présence de 5% de CO₂ d'un facteur 8, 10 et 18 respectivement (Sirard *et al.*, 1994).

Ainsi, l'expression des facteurs de virulence *in vitro* est optimale en **milieu minimum contenant 0,8% de bicarbonate**, avec une incubation à **37°C à 5% de CO₂** (figure 4). Une très faible transcription est observée en milieu riche BHI (*Brain Heart Infusion*) (Bartkus et Leppla, 1989 ; Sirard *et al.*, 1994).

4.1.2. Régulateurs géniques généraux

Les produits de l'expression de l'opéron **GerX** présent au sein de l'îlot de pathogénicité du plasmide pXO1 favorisent la germination *in vitro* et *in vivo* (Guidi-Rontani *et al.*, 1999).

Le régulateur **PlcR**, est un élément clé de la virulence de *B. cereus* et *B. thuringiensis*. En effet, il contrôle l'expression de diverses protéines sécrétées telles que collagénases, phospholipases, entérotoxines, protéases et hémolysines, mais aussi de peptides à activité antibactérienne (Gohar *et al.*, 2002 et 2008). Le gène *plcR* est présent sur le chromosome de toutes les espèces du groupe *B. cereus*. Il est fonctionnel dans la souche *B. cereus* anthracis-like G9241 mais non fonctionnel pour toutes les souches de *B. anthracis* et Bcbva (Sastalla *et al.*, 2010).

Le régulateur **AtxA** codé par le gène *atxA* appartenant à l'îlot de pathogénicité de pXO1 est au centre de la virulence (Uchida *et al.*, 1993b). En présence de CO₂/bicarbonate, il augmente l'expression de PA (Koehler *et al.*, 1994 ; Bartkus et Leppla 1989 ; Cataldi *et al.*, 1992) ainsi que des gènes codant pour la capsule (Guignot, 1997) (**figure 4**). La transcription du gène *atxA* est régulée par la température, optimale à 37°C (Dai et Koehler, 1997), mais ne dépend pas de la présence de CO₂/bicarbonate (Dai *et al.*, 1995 ; Dai et Koehler, 1997). Néanmoins, le CO₂ est nécessaire à l'expression des gènes de virulence dépendants de AtxA : *pagA*, *lef* et *cya* et le régulateur *pagR* (pXO1), opéron *capBCADE* et ses régulateurs *acpA* et *acpB* (pXO2) (Hoffmaster et Koehler, 1997 et 1999 ; Bourgogne *et al.*, 2003). De ce fait, dans la souche Sterne 7702 acapsulée, le mutant *atxA* est avirulent en modèle murin puisque démuné de facteurs de virulence (Dai *et al.*, 1995). Son rôle reste à nuancer puisque un mutant *atxA* d'une souche possédant les deux plasmides de virulence ne présente aucune modification de virulence et conserve une capsule lors de l'infection *in vivo* (Château *et al.*, 2011). AtxA contrôle également la transcription d'un inhibiteur de sporulation, ainsi en condition « hôte » (CO₂/bicarbonate et 37°C), les signaux environnementaux favorisent la germination et l'infection, et expliquent l'absence de spores lors de l'infection *in vivo* (Dale *et al.*, 2018).

La **figure 4** ci-dessous présente une vue schématique de la régulation des facteurs de virulence. La description de la régulation de l'expression de la capsule et des toxines sera traitée dans les paragraphes 4.2.1 et 4.3.3 respectivement.

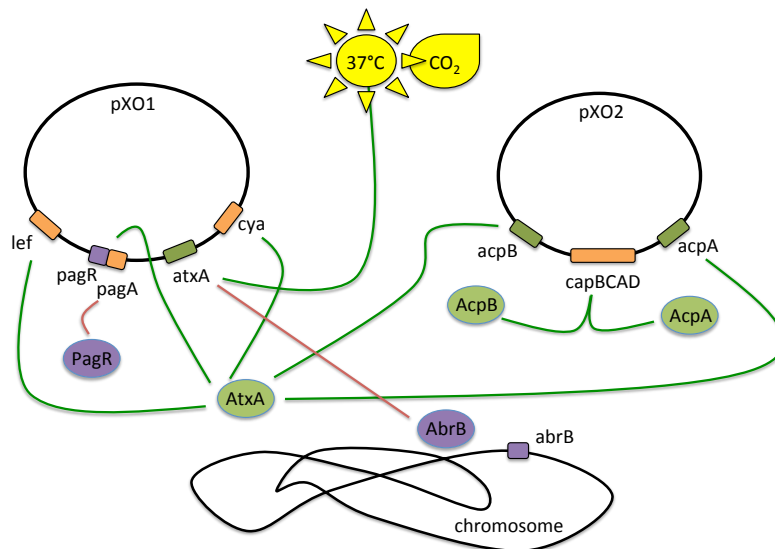


Figure 4. Régulation génique des facteurs de virulence de *B. anthracis*. Les plasmides *pXO1* et *pXO2* ainsi que le chromosome bactérien sont indiqués en noir. Les gènes de virulence sont en orange, les régulateurs positifs en vert et négatifs en violet. Les lignes vertes et rouges indiquent une activation et une répression de transcription respectivement.

4.2. La capsule PDGA et les capsules des souches *B. cereus anthracis-like*

4.2.1. Conditions d'expression et régulation génique

La capsule de *B. anthracis* est composée d'acide poly- γ -D-glutamique (PDGA) (Bruckner *et al.*, 1953), contrairement aux autres bactéries habituellement entourées d'une capsule polysaccharidique. Les colonies de bactéries acapsulées sont d'aspect rugueux, et mucoïde en présence de capsule (Figure 5). Naturellement capsulée lors d'infections *in vivo*, la présence de la capsule *in vitro* est dépendante d'ions bicarbonates fournis par le sérum, de l'ajout de bicarbonate et de 5 à 20% de CO₂ (Sterne, 1937 ; Thorne *et al.*, 1952). L'association des 3 facteurs permet de diminuer le taux de CO₂ et le pH de 7,4 à 6,2 (Meynell et Meynell, 1964 et 1966). Par ailleurs, si les ions HCO₃⁻ sont nécessaires à l'initiation de formation de la capsule, la synthèse en elle-même en est indépendante (Meynell et Meynell, 1966).

La capsule est codée par l'opéron *capBCADE* au sein de l'îlot de pathogénicité de *pXO2* (Green *et al.*, 1985 ; Makino *et al.*, 2002 ; Candela *et al.*, 2005). Les gènes *capA*, *capB* et *capC* (Makino *et al.*, 1989) sont responsables de la synthèse, du transport et de l'attachement de la capsule PDGA à la surface de la bactérie. Le gène *capD* (Uchida *et al.*, 1993) code une enzyme de dépolymérisation générant de petits fragments qui sont ensuite relargués, contribuant à la virulence (Makino *et al.*, 2002). L'îlot de pathogénicité comprend les régulateurs **AcpA** et **AcpB** possédant 62% d'homologie, exprimés à un niveau basal et présumés fonctionnellement similaires (Vietri *et al.*, 1995 ; Drysdale *et al.*, 2004). Ils régulent positivement l'opéron *capBCADE* (figure 4). L'expression de la capsule dépend de la transcription des gènes *acpA* et *acpB* qui est contrôlée par le régulateur *AtxA*, et dépendante du CO₂

(Makino *et al.*, 1988 et 2002; Green *et al.*, 1985; Vietri *et al.*, 1995 ; Uchida *et al.*, 1997 ; Drysdale *et al.*, 2004 et 2005).

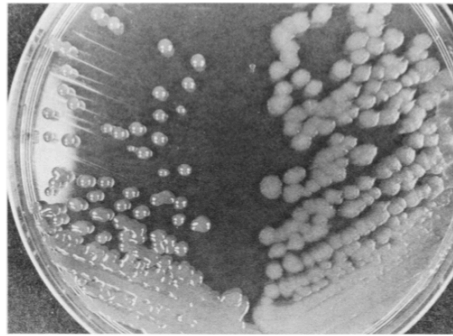


Figure 5. Aspect des colonies de la souche Pasteur. La croissance des bactéries a été réalisée en condition LB agar et 20%/bicarbonate. Souche sauvage d'aspect mucoïde (gauche) et souche acapsulée dépourvue de pXO2 d'aspect rugueux (droite). (Green *et al.*, 1985).

4.2.2. Virulence

La capsule, composée de poly- γ -D-glutamate, est peu immunogène. Cette particularité permet ainsi à la bactérie capsulée d'**échapper aux défenses immunitaires** de l'hôte, telles que la phagocytose ou les protéases. La capsule est retrouvée dans le sang durant l'infection (Kozel *et al.*, 2004 ; Sutherland *et al.*, 2008), mais également dans les tissus, principalement le foie, et en plus faible quantité dans la rate et le rein, ainsi que dans les urines sous forme dégradée (Sutherland *et al.*, 2008).

La capsule constitue un **facteur de virulence** reconnu. Des anticorps dirigés contre le PDGA sont capables de conférer une protection lors d'une infection murine pulmonaire (Kozel *et al.*, 2004). La capsule seule contribue à la létalité de l'infection (Welkos *et al.*, 1993 ; Drysdale *et al.*, 2005 ; Chand *et al.*, 2009). En effet, l'infection par une souche acapsulée est très atténuée et présente une faible dissémination, témoignant de l'importance de la capsule (Drysdale *et al.*, 2005b). La virulence est notamment assurée par CapD qui ancre la capsule à la membrane plasmique (Candela et Fouet, 2005), ainsi que par la dépolymérisation de la capsule puisqu'il a été montré *in vivo* chez la souris que ce sont les produits de dégradation de la capsule PDGA qui permettent d'éviter l'élimination du pathogène en échappant à la phagocytose et aux enzymes du complément (Makino *et al.*, 2002).

4.2.3. Capsules des souches G9241 et Bcbva

La principale différence dans les facteurs de virulence entre les souches *B. cereus anthracis-like* et *B. anthracis* résidant dans la présence de diverses capsules, la virulence sera traitée dans cette partie. Tout comme la capsule PDGA produite par *B. anthracis*, la **capsule tétrasaccharidique** (TS) de la souche G9241 et la **capsule d'acide hyaluronique** (HA) des souches Bcbva et G9241 sont faiblement

immunogènes. En effet, acide sialique et hyaluronique sont des molécules également produites par l'hôte.

4.2.3.1. La souche G9241

Deux homologues de AtxA sont codés sur les plasmides porteurs des gènes de virulence : AtxA1 (100% identiques) sur pBCXO1, AtxA2 (78% identique) sur pBC218 (Oh *et al.*, 2011 ; Hoffmaster *et al.*, 2004). AtxA1 contrôle l'expression de la capsule HA (et des toxines) tandis que la synthèse de la capsule TS peut être contrôlée par AtxA1 ou AtxA2 (Scarff *et al.*, 2016).

La virulence de la souche G9241 chez l'animal semble dépendre de la voie d'entrée de la bactérie et de l'étude (Hoffmaster *et al.*, 2004 ; Oh *et al.*, 2011 ; Wilson *et al.*, 2011 ; Scarff *et al.*, 2018). L'ensemble des facteurs, capsules et toxines, reste néanmoins nécessaire à la virulence de G9241, quelle que soit sa voie d'entrée (Wilson *et al.*, 2011 ; Oh *et al.*, 2011). La capsule HA apparaît plus importante que la capsule TS dans la virulence chez des souris infectées par voie sous-cutanée et intranasale (Scarff *et al.*, 2018). Les capsules permettent d'éviter la phagocytose par les macrophages (Oh *et al.*, 2011), leur absence simultanée entraînant une perte de virulence en modèle murin (Scarff *et al.*, 2018 ; Oh *et al.*, 2011).

4.2.3.2. Les souches Bcbva

Les capsules PDGA et HA, codées sur pBCXO2 et pBCXO1 respectivement, sont produites en conditions CO₂/bicarbonate et sous le contrôle du régulateur AtxA (Klee *et al.*, 2006 et 2010 ; Brézillon *et al.*, 2015). Contrairement à *B. anthracis*, les souches Bcbva produisent également leurs capsules lors de la culture en milieu minimum tel que le LB (Luria Bertani), et en condition atmosphérique ambiante (Klee *et al.*, 2006).

Les travaux menés par Brézillon *et al* en 2015, chez la souris, ont permis de mieux comprendre l'implication de chaque capsule dans l'infection. La présence des 2 capsules en l'absence des toxines suffit à maintenir une virulence similaire à la souche sauvage, contrairement à une souche toxigène acapsulée. Chaque capsule est impliquée dans la virulence en présence des toxines. La capsule PDGA jouerait un rôle plus important dans la virulence lors de l'infection sous-cutanée alors que la capsule HA jouerait elle un rôle aussi important que la capsule PDGA dans l'infection intranasale chez la souris. La capsule HA induit une virulence, où la dissémination bactérienne systémique est augmentée par la présence des toxines et/ou de la capsule PDGA. Contrairement à la souche Sterne de *B. anthracis* (Tox+/PDGA-) avirulente en intranasal, la présence de cette capsule HA additionnelle permet de conserver le pouvoir infectieux de la bactérie en absence de capsule PDGA.

4.3. Les toxines

4.3.1. Découverte des 3 facteurs

A l'origine, la démonstration a été faite de l'existence d'une toxine constituée de 2 composants : l'antigène protecteur PA et une toxine létale LT responsable des signes cliniques (Thorne *et al.*, 1960). PA, engendrant une immunisation protectrice en modèle animal, a été isolé à partir de cultures de la souche Sterne (Strange et Thorne, 1958). L'injection du EF purifié, alors appelé facteur I, montre que celui-ci cause les oedèmes caractéristiques chez le lapin uniquement en *combinaison* avec le facteur II, PA (Stanley et Smith, 1961). La présence de LF, nommé facteur III, a été mise en évidence lors de la purification du facteur II comparé à des fractions brutes non purifiées. Associé à PA, il cause la mort de souris (Smith et Stanley, 1962). Il existe bien **3 facteurs indépendants, qui seuls ne présentent aucune toxicité** (Thorne *et al.*, 1960 ; Beall *et al.*, 1962 ; Stanley et Smith, 1961 ; Smith et Stanley, 1962) mais qui provoquent des effets spécifiques chez les animaux lorsqu'il y a association entre PA et LF ou EF : EF est responsable d'œdèmes et LT de la létalité (Beall *et al.*, 1962 ; Pezard *et al.*, 1991 ; Cataldi *et al.*, 1990). Un **rôle central de PA dans la virulence** est donc dès lors évoqué.

4.3.2. Expression *in vitro* et *in vivo*

Aucune toxine n'est détectée à partir de spores non germées (Cote *et al.*, 2005 ; Welkos *et al.*, 2001). Classiquement, *in vivo*, les spores germent en bacilles capables de produire et de sécréter les facteurs composant les toxines. *In vitro*, les bacilles peuvent synthétiser et sécréter PA en phase précoce de germination, avec une transcription de *pagA* dès 15 minutes et une détection de PA en 1h (Cote et Welkos, 2015). L'expression des toxines *in vitro* nécessite un **milieu minimum** (milieu R, Ristroph et Ivins, 1983) **additionné de CO₂/bicarbonate**, et non un milieu riche tel que le BHI (Bartkus et Leppla, 1989 ; Sirard *et al.*, 1994). L'expression des toxines est optimale à une température de **37°C** et un **pH supérieur à 7** permet une accumulation des facteurs en intracellulaire et évite leur dégradation (Sirard *et al.*, 1994). Le **bicarbonate**, en plus de son effet tampon, est requis précocement dans la phase de croissance afin de relarguer les facteurs dans le milieu extracellulaire, car il influencerait sur la perméabilité membranaire de la bactérie (Puziss et Howard, 1963). Dépendante de la **phase de croissance bactérienne**, la production des toxines est graduelle à partir de la phase exponentielle pour atteindre une concentration maximale en début de phase stationnaire (Cataldi *et al.*, 1992 ; Sirard *et al.*, 1994). En phase stationnaire de croissance *in vitro*, la sécrétion d'une protéine régulatrice, InhA1 (Immune Inhibitor A), est maximale : elle dégrade et contrôle ainsi la quantité de facteurs PA, EF et LF disponibles (Pflughoeft *et al.*, 2014).

Les profils d'expression de EF et LF *in vitro* et *in vivo* sont similaires. *In vitro*, la culture de souches *B. anthracis* produit chaque toxine individuellement avec un ratio de PA:LF:EF qui est de 20:5:1 (Sirard

et al., 1994). La transcription des gènes *atxA*, *pagA*, *cya* et *lef* est détectée 3 heures après infection de macrophages RAW264.7 par des spores (Guidi-Rontani *et al.*, 1999). La quantité de toxines détectée dans le sérum de lapins infectés en sous-cutané par des spores montre un **ratio constant LF:EF de 5:1** avec des valeurs de l'ordre de 10-35 µg/mL de LF et 2-6 µg/mL de EF en phase systémique (Dal Molin *et al.*, 2008). La quantification des toxines montre une prépondérance de LF par rapport à EF dès la phase précoce d'infection dans des souris infectées par voie sous-cutanée, leur concentration est croissante jusqu'à la phase systémique létale de l'infection (Rougeaux *et al.*, 2016). Les toxines sont détectées très précocement dans le plasma, dès 30 minutes lors d'infection sous-cutanée de souris par des spores (Rougeaux *et al.*, 2016). EF et LF sont aussi détectés dès 1h lors d'infection intranasale des souris, indépendamment de toute bactériémie sanguine (Rougeaux *et al.*, 2020). *In vivo*, PA n'est pas détecté durant la phase initiale de la maladie (Kobiler *et al.*, 2006 ; Mabry *et al.*, 2006 ; Dal Molin *et al.*, 2008 ; Solano *et al.*, 2019 ; Boyer *et al.*, 2009). Il faut attendre au mieux la phase intermédiaire de la maladie pour que PA soit détecté dans un modèle de macaque infecté par voie intranasale (Solano *et al.*, 2019).

Cas particulier des vésicules extracellulaires

Outre la sécrétion directe dans les tissus, les facteurs EF, LF et PA peuvent être retrouvés dans des vésicules extracellulaires produites par les bactéries (Rivera *et al.*, 2010). La production de ces vésicules est un phénomène connu, conservé et ubiquitaire chez les bactéries Gram-négatif qui permet de propager les produits bactériens tels que les facteurs de virulence dont les toxines dans le milieu extracellulaire (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *Helicobacter pylori* par exemple). Il apparaît également chez les bactéries Gram-positif telles que *S. aureus*, *Mycobacterium ulcerans* et *Bacillus spp.* Des vésicules extracellulaires ont été retrouvées dans le surnageant de culture de *B. anthracis*. Celles-ci possèdent une double membrane composée de lipides et un diamètre variant de 50 à 300 nm, et émergent depuis la surface de la bactérie (Rivera *et al.*, 2010). Elles contiennent des facteurs de virulence dans leur lumière, toxines et anthrolysine, et sont capables d'induire une toxicité sur les macrophages (Rivera *et al.*, 2010). Ces facteurs sont empaquetés de façon aléatoire, combinée et concomitante puisque PA/EF ou EF/LF sont retrouvés dans la même vésicule. Ces vésicules peuvent être relarguées depuis l'intérieur de macrophages infectés par *B. anthracis* au sein des phagosomes et sont aussi présentes en surface cellulaire (Rivera *et al.*, 2010).

4.3.3. Génétique et régulation génique

Le lien entre les toxines et l'ADN plasmidique a été établi en 1983 par Mikesell *et al.* Le **plasmide pXO1** contient un îlot de pathogénicité de 44,8 kb qui contient les gènes *pagA*, *cya* et *lef* codant respectivement PA, EF et LF (Okinaka *et al.*, 1999). Il code également 2 régulateurs, AtxA (cf chapitre

4.1.2) et le répresseur PagR (Hoffmaster et Koehler, 1999). L'opéron *pag* contient le gène *pagA* en amont du gène *pagR*. Les gènes *pagA*, *cya* et *lef* sont induits par le CO₂/bicarbonate (Koehler *et al.*, 1994 ; Cataldi *et al.*, 1992 ; Bartkus et Leppla 1989 ; Sirard *et al.*, 1994) et leur expression est dépendante de AtxA (Uchida *et al.*, 1993b ; Dai *et al.*, 1995) (figure 4). Il en est de même pour *pagR* puisqu'il est cotranscrit à partir du promoteur de *pagA* (Hoffmaster et Koehler, 1999). Le régulateur pagR établit une boucle d'autorégulation négative de l'opéron *pag* et limite la transcription de *pagA* (Hoffmaster et Koehler, 1999) (figure 4). Cette répression serait elle-même sous contrôle de son homologue, dont le gène est porté par pXO₂, par régulation négative de la transcription de *pagR* levant ainsi la réduction de transcription des gènes de toxines (Liang *et al.*, 2016).

L'expression des 3 facteurs PA, LF et EF est également régulée par le gène chromosomique *abrB* (Saile et Koehler, 2002). AbrB est un régulateur de phase de transition qui permet une expression croissante des toxines, de la phase exponentielle à la phase stationnaire de croissance (Saile et Koehler 2002). AbrB a un effet répresseur sur *atxA* par fixation sur sa région promotrice (figure 4), et contrôle graduellement le moment de l'expression de gènes de toxines (Sirard *et al.*, 1994 ; Cataldi *et al.*, 1992). Cependant, bien qu'appartenant au même régulon, la transcription de chacun des gènes n'est pas retrouvée en quantités similaires : le gène *pagA* est 20 fois et 5 fois plus transcrit que les gènes *cya* et *lef* respectivement (Sirard *et al.*, 1994).

Les souches *B. cereus* anthracis-like possèdent toutes les gènes codant les facteurs PA, EF et LF, dans un îlot de pathogénicité similaire à *B. anthracis*. Les séquences protéiques des facteurs et régulateurs de la souche G9241 sont hautement similaires à celles de *B. anthracis* : PA/99,7%, LF/99%, EF/96%, protéines régulatrices AtxA/100% et pagR/98,6% (Kolsto *et al.*, 2009 ; Hoffmaster *et al.*, 2004). Il en est de même pour les souches Bcbva puisque AtxA, PA, EF et LF ne diffèrent que de 1, 3, 4 et 8 acides aminés respectivement (Klee *et al.*, 2010), L'expression de PA, LF et EF dépend de AtxA et elle est soumise à régulation par le CO₂/bicarbonate (Scarff *et al.*, 2016 ; Klee *et al.*, 2006 ; Brézillon *et al.*, 2015). Ainsi la régulation de l'expression des toxines de ces souches pourrait suivre le même mécanisme que celles de *B. anthracis*.

4.3.4. L'antigène protecteur

4.3.4.1. Présentation

L'antigène protecteur (PA) est le partenaire commun de fixation des facteurs enzymatiques responsables de la virulence. Il tient son nom de sa capacité à induire une réponse immune protectrice contre la maladie du charbon et est utilisé en tant que composante vaccinale. Les premières expériences animales en 1946 montrent une protection lors de challenges infectieux grâce à un composant soluble produit par *B. anthracis* (Gladstone, 1946). La capacité protectrice sera confirmée suite l'obtention de PA, non

contaminé par EF et LF, lors de challenges toxiques chez des rats et contre l'infection de cobayes par des spores (Ivins et Welkos, 1986).

La découverte du gène *pagA* codant PA (Vodkin et Leppla, 1983) et de sa séquence nucléotidique a permis d'identifier une protéine mature de 735 acides aminés soit 83 kDa (PA83) (Welkos *et al.*, 1988). La protéine mature est constituée de 4 domaines fonctionnels (Petosa *et al.*, 1997). Chaque domaine assure une fonction bien précise dans le processus d'entrée des toxines (Figure 6). Le domaine 1 est impliqué dans la fixation des facteurs enzymatiques EF et LF, le domaine 2 dans l'oligomérisation, la formation du pore, la translocation et la fixation au récepteur, le domaine 3 dans l'oligomérisation et le domaine 4 dans la fixation au récepteur (Petosa *et al.*, 1997).

Récemment, une nouvelle activité a été attribuée à PA83, celle de sérine protéase dépendante du calcium qui serait impliquée dans la fixation de PA au récepteur cellulaire (Storm *et al.*, 2018). Lors de l'infection d'animaux, PA est détecté dans le sang sous 2 formes suite à un clivage enzymatique (Figure 6) : PA63 (63kDa) et PA20 (20kDa) (Petosa *et al.*, 1997). Un rôle de PA20 est suggéré lors de l'intoxication de PBMC humains, il semblerait impliqué dans l'adhésion cellulaire, la production de cytokines et l'augmentation de l'apoptose (Hammamieh *et al.*, 2008).

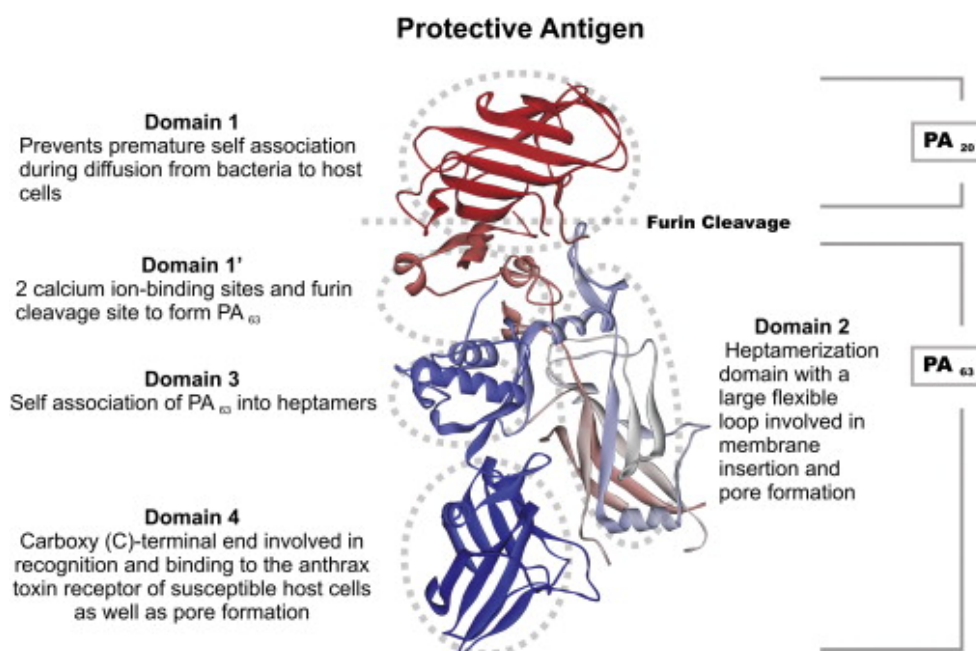


Figure 6. Structure protéique de l'antigène protecteur PA. Le site de clivage à la furine sépare PA83 en PA20 et PA63. La fonction des 4 domaines protéiques de PA83 est indiquée (Hilmas et Anderson, 2015 ; PDB ID : 1ACC ; Petosa *et al.*, 1997).

4.3.4.2. Dénominateur commun des toxines

PA est requis pour l'activité des facteurs EF et LF à l'origine des effets cellulaires et pathologiques décrits pour la maladie du charbon. L'activité enzymatique de EF et LF est portée par leur domaine C-terminal respectifs (Bragg et Robertson, 1989 ; Quinn *et al.*, 1991).

Ces facteurs fixent PA par interaction avec leur domaine N-terminal (1-300) (Bragg et Robertson, 1989 ; Quinn *et al.* 1991 ; Little *et al.*, 1994). Les domaines N-terminaux de EF et LF possèdent 35% d'identité nucléotidique et une homologie de séquence particulièrement marquée par une série de 7 acides aminés (136-142 pour EF et 147-153 pour LF) (Kumar *et al.*, 2001). Leur structure, similaire, est impliquée dans la fixation à PA (Shen *et al.*, 2005). De fait, une compétition pour la fixation à PA existe entre les 2 facteurs. En effet l'activité de EF (augmentation du taux d'AMPc, élongation cellulaire) est réduite proportionnellement à l'ajout de LF dans les cellules épithéliales CHO. De même l'activité létale de LF est réduite dans les macrophages J774A.1 en présence d'un excès de EF (Leppla, 1982 ; Kumar *et al.*, 2001).

4.3.5. La toxine létale

4.3.5.1. Structure et fonction

La découverte du gène *lef* codant LF (Robertson et Leppla, 1986) et son séquençage a permis d'identifier une protéine de 809 acides aminés (93,7 kDa) (Bragg et Robertson, 1989). Après clivage du peptide signal de sécrétion, LF est une protéine mature de 776 acides aminés (90 kDa).

Le facteur LF est composé de 4 domaines pour une taille de 100 Å sur 70 Å (Pannifer *et al.*, 2001) (**Figure 7**). Le **domaine I (1-254)** en N-terminal, appelé **LFn**, est responsable de la **fixation à PA** requise pour la cytotoxicité (Quinn *et al.*, 1991 ; Arora et Leppla, 1993). LFn est suffisant pour la translocation à travers le pore de PA (Arora and Leppla, 1993). Le **domaine IV (552-776)** en C-terminal, est le centre catalytique qui contient le **site de fixation au zinc** (Quinn *et al.*, 1991 ; Arora et Leppla, 1993). Ce site est un motif consensus HExxH en position 686-690 (HEFGH) où la présence du zinc est nécessaire à la létalité dans les macrophages (Klimpel *et al.*, 1994 ; Hammond *et al.*, 1998). Le domaine II (263-297 et 385-550) n'a pas de fonction particulière connue et le domaine III (303-382) restreint l'accès au site actif et contribue à la spécificité de l'interaction avec le substrat (Pannifer *et al.*, 2001). LF est une **métalloprotéase à zinc** (Klimpel *et al.*, 1994) et l'interface entre les domaines II, III et IV crée un profond sillon de 40 Å de longueur, chargé négativement, près du site actif où s'insère la partie N-terminale de son substrat, les MAPKKs (*Mitogen-activated protein kinase kinase*) (Pannifer *et al.*, 2001). Parmi les protéases à zinc, on retrouve la neurotoxine clostridiale tétanique et la neurotoxine botulique, cependant aucune similarité de séquence n'est retrouvée avec LF.

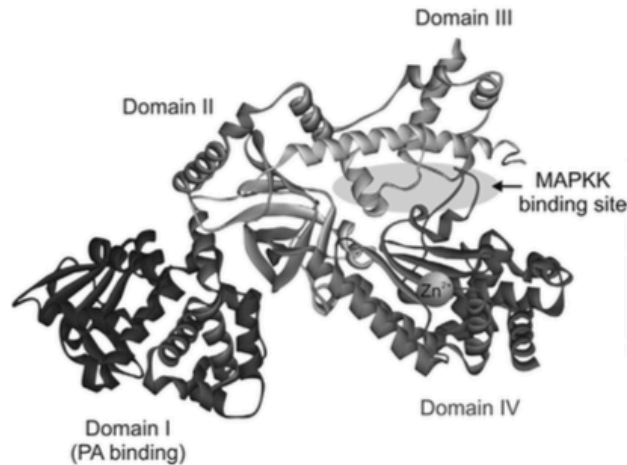


Figure 7. Structure du facteur létal LF. Les 4 domaines sont indiqués, ainsi que le site de fixation du zinc et le site enzymatique actif de clivage des MAPKK (Hilmas et Anderson, 2015 ; PDB ID : 1JKY ; Pannifer et al., 2001).

4.3.5.2. Inhibition de la voie MAPKK

L'étude de divers processus dépendants des MAPKKs montre que LT les inhibe (Duesbery *et al.*, 1998). LF provoque le clivage de la partie N-terminale des MAPKKs 1 à 7, excepté MAPKK5, au niveau d'un site consensus, laissant le domaine kinase C-terminal intact (Duesbery *et al.*, 1998 ; Vitale *et al.*, 1998 et 2000). La cible des MAPKKs sont les MAPKs (*Mitogen-activated protein kinase*) : ERK1/2, JNK, p38. La voie des MAPKKs et la signalisation via ERK, p38 et JNK régulent divers processus cellulaires tels que la prolifération, le cycle cellulaire, la réponse immune. Le clivage par LF réduit la fixation des MAPKs et ainsi leur phosphorylation par les MAPKKs, résultant en un défaut d'activation des MAPKs et donc de transcription de leurs gènes cibles (Duesbery *et al.*, 1998 ; Chopra *et al.*, 2003 ; Bardwell *et al.*, 2004).

4.3.5.3. Mortalité cellulaire

Certaines souches de rats sont particulièrement sensibles à LT et meurent rapidement (Beall *et al.*, 1962) tandis que d'autres y sont résistantes, même en présence de fortes doses de LT en intracellulaire (Friedlander *et al.*, 1993). Deux voies conduisant à la mort cellulaire sont décrites, où la susceptibilité des lignées murines dépend de la version allélique d'un gène spécifique : une mort lente par apoptose ou rapide par pyroptose. On observe une infection en 2 étapes : une infection précoce où une concentration sublytique de LT interfère avec la voie MAPKK et réduit la stimulation immune et la réponse cytokine ; une infection tardive, lors de l'augmentation en concentration, provoquant la pyroptose. L'absence de mort précoce des macrophages et cellules dendritiques lors de l'infection initiale permet une

prolifération bactérienne stratégique au sein de ces cellules immunes avant de les anéantir (Alileche *et al.*, 2005 ; Muehlbauer *et al.*, 2007).

Pyroptose des macrophages

La mort cellulaire observée au sein des macrophages et induite par LT survient par pyroptose, phénomène de mort cellulaire programmée rapide (Bergsbaken *et al.*, 2009). Elle implique la reconnaissance de signaux de dangers par le récepteur Nlrp1, conduisant la formation de l'inflammasome, qui va activer la caspase-1 provoquant la pyroptose. Le clivage des MAPKKs n'est pas impliqué dans la pyroptose (Pellizzari *et al.*, 2000 ; Alileche *et al.*, 2005).

Il existe différents **allèles du gène *Nlrp1*** conférant un caractère sensible ou résistant à la pyroptose selon la lignée murine et de rats (Boyden et Dietrich, 2006 ; Newman *et al.*, 2010a). LF clive et active la protéine Nlrp1 « sensible » et conduit à la pyroptose (Levinsohn *et al.*, 2012 ; Chavarria-Smith *et al.*, 2013) par activation de la caspase-1 (Boyden et Dietrich, 2006). Chez le rat, pyroptose des macrophages et mortalité animale sont directement corrélées (Levinsohn *et al.*, 2012 ; Newman *et al.*, 2010a et b), tandis qu'elles sont inversement associées chez la souris (Newman *et al.*, 2010 ; Moayeri *et al.*, 2012). En effet, Nlrp1 « sensible » suffit à la production de cytokines proinflammatoires à l'origine de la résistance des souris lors de l'infection (Terra *et al.*, 2010). En réponse à LT, Nlrp1 « sensible » provoque également le relargage dans le cytosol de la cathepsine B, une hydrolase acide lysosomale par perméabilisation de la membrane lysosomale, contribuant à la mort cellulaire (Averette *et al.*, 2009).

Mort lente apoptotique

Selon le fond génétique des souris, les macrophages et cellules dendritiques peuvent subir une pyroptose rapide (souris BALB/c) ou une apoptose lente (souris C57BL/6) (Alileche *et al.*, 2005 ; Muehlbauer *et al.*, 2007). **Lors d'une résistance à la pyroptose**, ces cellules subissent une mort apoptotique lente, indépendante de la caspase-1, sans relargage de cytokines et quelle que soit la sensibilité des souches murines à LT (Muehlbauer *et al.*, 2007 ; Park *et al.*, 2002). L'apoptose est observée dans les macrophages activés par des signaux pathogéniques lors de l'exposition à de faibles quantités de LF, par inhibition des MAPKs (Popov *et al.*, 2002 ; Park *et al.*, 2002). Toutefois les observations faites chez les rongeurs ne le sont pas chez l'humain, où Nlrp1 n'est pas activé par LF, rendant les macrophages et les cellules dendritiques résistants à la pyroptose par LT (Newman *et al.*, 2010b ; Moayeri *et al.*, 2012). On y observe une apoptose lente en présence de LT ainsi que l'inhibition de la division cellulaire via la voie MEK1/2 (Muehlbauer *et al.*, 2007 ; Alileche *et al.*, 2005 ; Moayeri et Leppla, 2009).

4.3.6. La toxine oedémateuse

4.3.6.1. Présentation

Le gène *cya* codant pour EF a été identifié, il est transcrit dans le sens 3'-5' contrairement aux gènes *pagA* et *lef* (Tippetts et Robertson, 1988 ; Mock *et al.*, 1988). Sa séquence protéique de 800 acides aminés (92 kDa) contient un peptide signal de 33 acides aminés impliqué dans la sécrétion, qui suite à son clivage libère une protéine mature hydrophile de 89 kDa (Robertson *et al.*, 1988 ; Escuyer *et al.*, 1988).

EF est une **adénylate cyclase** dépendante de la calmoduline (Leppla, 1982 ; Mock *et al.*, 1988), qui clive l'ATP en AMPc, augmentant ainsi le taux de ce second messenger au sein de la cellule. C'est une adénylate cyclase (AC) qui nécessite des facteurs de l'hôte pour exercer son activité (Tang *et al.*, 2009). Cette classe d'AC comprend les AC bactériennes dont CyaA de *Bordetella pertussis*, ExoY de *Pseudomonas aeruginosa* ou encore des toxines bactériennes capables d'activer de façon indirecte des AC telles que *Yersinia pseudotuberculosis*, *Vibrio cholera* et *Burkholderia thailandensis* (Tang *et al.*, 2009).

L'activité du facteur EF provoque de façon strictement dépendante de PA l'augmentation du taux d'AMPc (Leppla, 1982 ; Kumar *et al.*, 2001). Très efficace, EF convertit 1000 à 2000 molécules d'ATP en AMPc par seconde (Tang *et al.*, 2009 ; Liu *et al.*, 2014). EF est transloqué près du noyau et génère un **gradient d'AMPc** décroissant du périnucléaire vers la périphérie cellulaire (Dal Molin *et al.*, 2006). La concentration d'AMPc produit varie en fonction du temps et du type cellulaire (Kumar *et al.*, 2002). En cellules Jurkat, il croît graduellement à partir de 2h, là où les autres AC (toxine cholérique et diphtérique) présentent un pic en moins de 2h (Puhar *et al.*, 2008). L'AMPc provoque l'élongation des cellules CHO (Leppla, 1982 ; Kumar *et al.*, 2001) ou encore la sécrétion de Cl⁻ en cellules T84 (Beauregard *et al.*, 1999).

4.3.6.2. Structure et activité

La protéine est composée de **3 domaines** (Figure 8). La partie **N-terminale** (1-261) assure la **fixation à PA** (Labruyère *et al.*, 1990). La **partie C-terminale** (261-767) constitue le domaine adénylate cyclase. Elle contient le **centre catalytique (292-622)** réparti en 2 sous-domaines C_A (294-349 et 490-622) et C_B (350-489) à l'interface desquels se trouve une séquence consensus conservée de **fixation de l'ATP** (342-358) (Goyard *et al.*, 1989 ; Drum *et al.*, 2002 ; Shen *et al.*, 2005 ; Xia et Storm, 1990). Elle contient également un domaine hélicoïdal (660-767) de **fixation à la calmoduline** dépendant du calcium (Escuyer *et al.*, 1988 ; Labruyère *et al.*, 1990 ; Tang *et al.*, 2009) qui est connecté à C_A par un linker (623-659) (Drum *et al.*, 2002).

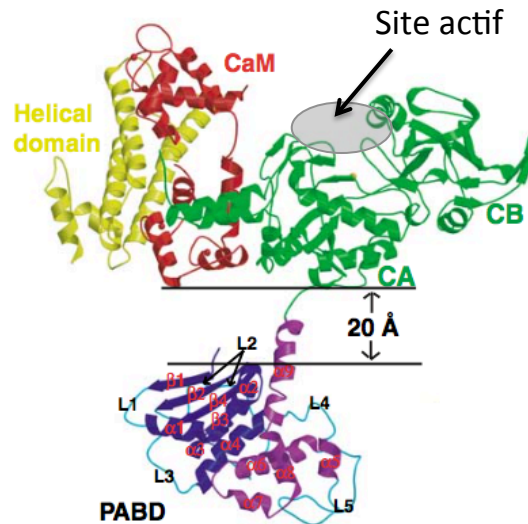


Figure 8. Structure du facteur oedémateux EF complexé à la calmoduline. Les domaines structuraux sont en couleur. En N-terminal, le domaine de fixation à PA nommé PABD (bleu et violet). En C-terminal, le domaine hélicoïdal (jaune) et domaine catalytique (vert). La calmoduline CaM est indiquée en rouge. Le site actif de fixation de l'ATP est indiqué en gris (adapté de Shen et al., 2005 ; PDB ID : 1XFV).

L'activité est **dépendante de la calmoduline (CaM)**, une protéine eucaryote qui fixe les ions calcium Ca^{2+} , tout comme CyaA de *Bordetella pertussis* (Leppla, 1982 ; Mock *et al.*, 1988). Le facteur EF est maintenu inactif par interaction entre les domaines C_A et hélicoïdal (Shen *et al.*, 2002). La CaM dépend des ions Ca^{2+} pour adopter une conformation augmentant son affinité pour EF en s'insérant entre ces domaines. EF subit à son tour un changement de conformation responsable de la formation de la poche de fixation de l'ATP et permet ainsi son activité (Drum *et al.*, 2002 ; Shen *et al.*, 2002 et 2005 ; Ulmer *et al.*, 2003). Le taux basal de calcium intracellulaire n'est pas suffisant pour l'interaction entre EF et la CaM (Shen *et al.*, 2002). Un **influx de calcium extracellulaire** est requis pour augmenter l'affinité de EF pour CaM et l'activité de EF, au sein de plusieurs types cellulaires (neutrophiles, lymphocytes et macrophages) (Shen *et al.*, 2002 ; Kumar *et al.*, 2002). L'influx est provoqué après translocation de EF dans le cytosol et précède l'augmentation de l'AMPc, dépendante de la concentration en calcium (Kumar *et al.*, 2002). De plus, l'AMPc contribue à augmenter le taux de Ca^{2+} intracellulaire, de même que l'anthrolysine O, inhibant l'activité de EF à trop forte concentration (Shen *et al.*, 2002 ; Tang *et al.*, 2009). Lors de la fixation de CaM en présence de Ca^{2+} , il y a une dissociation de 20 Å entre les domaines N-terminal et catalytique de EF, exposant EF à la dégradation par la trypsine (Shen *et al.*, 2005). Ainsi, une trop forte concentration en Ca^{2+} peut être délétère pour EF.

Le site de fixation de l'ATP est conservé au sein de l'AC de *B. pertussis* et montre des similarités avec les AC eucaryotes (Escuyer *et al.*, 1988 ; Goyard *et al.*, 1989 ; Glaser *et al.*, 1989). La formation d'AMPc est catalysée par la présence de 2 ions magnésium Mg^{2+} au site de fixation de l'ATP (Shen *et*

al., 2005). Ces ions contribuent à la fixation de l'ATP mais aussi à la dissociation entre EF, l'AMPC et le phosphate (Martinez *et al.*, 2011). Une compétition entre l'excès d'ions Ca^{2+} et les ions Mg^{2+} peut engendrer une inhibition d'activité de EF (Shen *et al.*, 2002 ; Tang *et al.*, 2009).

4.3.6.3. Effets biologiques de EF

L'augmentation de l'AMPC intracellulaire par ET permet l'activation de **2 cibles** : la protéine kinase A (PKA) et Epac (*exchange protein activated by cAMP*) (Liu *et al.*, 2014). L'AMPC active la PKA, qui va migrer dans le noyau et phosphoryler le facteur de transcription CREB (*cAMP responsive element binding protein*) (Puhar *et al.*, 2008) et d'autres cibles (Zhang *et al.*, 2005). La phosphorylation de CREB dans les cellules Jurkat reste élevée jusqu'à 12h puis retourne à un niveau basal à 24h (Puhar *et al.*, 2008). Cette baisse est due à une incapacité de ET à induire la re-phosphorylation de CREB, malgré la hausse continue de AMPC (Puhar *et al.*, 2008).

Une faible quantité de ET suffit à la **surexpression des récepteurs** TEM8 (*Tumor Endothelial marker 8*) et CMG2 (*Capillary Morphogenesis Gene 2*) à la surface des macrophages et cellules dendritiques, de façon dépendante de l'AMPC et de PKA, sans implication de CREB (Maldonado-Arocho *et al.*, 2006). Cette surexpression a été observée en cellules épithéliales CHO et *in vivo* dans le foie et la rate au sein de cellules non myéloïdes (Sastalla *et al.*, 2012). Cette surexpression permet d'augmenter l'endocytose de ET ainsi que celle de LF dès la phase précoce d'infection. La surexpression des récepteurs est rapide et stable, observée durant 3 jours après élimination de ET (Maldonado-Arocho *et al.*, 2006). Le taux d'expression dépend de la lignée, les macrophages issus de souris BALB/c (J774A.1 et RAW264.7) exprimant plus de récepteurs que ceux de souris C57Bl/6 (IC21, représentatifs de la réponse humaine à LT).

La **virulence de ET**, jusqu'alors masquée par la capacité létale de LT, a été remise en lumière. Chez le macaque, en présence de LT, ET ne montre pas d'effet particulier sur la létalité de l'infection (Hutt *et al.*, 2014), de même lors d'infections de souris Swiss (Pezard *et al.*, 1991). Néanmoins, ET est létale lors de l'intoxication de souris BALB/c par voie intraveineuse où 50% des animaux meurent en 40h avec 37,5 μg de ET en 6h pour 100 μg de ET (Firoved *et al.*, 2005). Elle est responsable de dommages tissulaires différents de ceux observés avec LT notamment une hémorragie au niveau des ganglions et du tractus gastro-intestinal (Firoved *et al.*, 2005). ET en présence de la capsule suffit à provoquer la mort de lapins New Zeland White lors d'une infection pulmonaire (Lovchik *et al.*, 2012), de cobayes lors d'infections sous-cutanée ou pulmonaire (Dumetz *et al.*, 2011 ; Levy *et al.*, 2012). Par ailleurs, un effet intéressant a été démontré pour EF, et non LF, dépendant de son activité enzymatique et dose-dépendante, qui permet de préserver la quantité de EF et de PA circulants lors de l'infection *in vivo* (Sastalla *et al.*, 2012). Ce retard de la clairance protéique augmente ainsi la disponibilité en facteurs de virulence, mais son mécanisme n'a pas été élucidé.

4.3.7. Implication des toxines dans la pathogénèse

Durant la pathogénèse, les toxines semblent intervenir selon 2 phases (Moayeri *et al.*, 2015). Une phase précoce durant laquelle elles favorisent la survie et la dissémination bactériennes en affectant la réponse immunitaire ; et une phase tardive ou systémique, au cours de laquelle les toxines augmentent en concentration et atteignent les tissus cibles afin de provoquer la mort de l'hôte.

4.3.7.1. Phase précoce : dérouter l'immunité

Les toxines ont un **effet de courte portée** localisé au lieu de production pour dérouter l'immunité innée, effet impliqué dans la survie et la dissémination systémique de *B. anthracis* (Lovchik *et al.*, 2012 ; Hutt 2014). EF et LF, suite à la production d'AMPc et au clivage des MAPKKs, ont un **effet immunomodulateur** en diminuant le recrutement et la prolifération de cellules immunitaires, la phagocytose, la chimiotaxie, la production de cytokines pro-inflammatoires et chémokines, et favorisant la mort cellulaire (Moayeri et Leppla, 2009 et 2015; Lowe et Glomski, 2012). LT n'est pas cytotoxique pour les neutrophiles et lymphocytes (Alileche *et al.*, 2005). ET n'est pas létale pour les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes T, les neutrophiles ou les cellules endothéliales microvasculaires humaines (Moayeri et Leppla, 2009).

Les neutrophiles sont ciblés à différents niveaux par ET qui inhibe leur capacité phagocytaire et migratoire, et par LT qui inhibe leur activité antibactérienne, migratoire et l'accumulation au site d'inflammation (Tournier *et al.*, 2009 ; Liu et a, 2014 ; Moayeri et Leppla, 2015). Au sein des macrophages et cellules dendritiques, les toxines coopèrent pour diminuer la phagocytose, la production de cytokines et la présentation d'antigènes (Moayeri et Leppla, 2009 ; Tournier *et al.*, 2009). Des effets sont observés sur la prolifération et l'activation des lymphocytes T et B, et la production d'anticorps.

Les toxines peuvent néanmoins favoriser le recrutement des polymorphonucléaires et la migration des macrophages et cellules dendritiques (Tournier *et al.*, 2009). Ainsi les toxines se complètent et peuvent avoir des effets opposés : LT inhibe l'activité sporicide et antibactérienne des macrophages et induit leur mort, tandis que ET favorise leur survie via PKA/CREB les protégeant en partie d'une apoptose par LT (Tournier *et al.*, 2009). LT induit la mort des cellules dendritiques immatures mais pas des cellules dendritiques matures, tandis que ET provoque leur maturation (Tournier *et al.*, 2009 ; Moayeri et Leppla, 2015).

4.3.7.2. Phase systémique : atteinte des organes

La dose létale de toxines pour une souris est de 20-30 µg pour ET et 40-100 µg pour LT (Liu et a, 2014). Ainsi bien que la quantité de EF communément observée soit inférieure à celle de LF (Dal Molin *et al.*, 2008), celle-ci suffit à induire une virulence. L'efficacité de l'intoxication *in vivo* est dépendante de la voie d'injection en modèle murin, en faveur d'une administration intraveineuse comparé à la voie intrapéritonéale pour ET comme LT (Firoved *et al.*, 2005 ; Merritt *et al.*, 2022). Les toxines affectent le

système cardiovasculaire au niveau tissulaire ainsi que par diminution des pulsations, de la contractilité et de la pression sanguine en phase finale, conduisant à la cyanose (Lowe et Glomski, 2012). La vascularisation est endommagée par augmentation de la perméabilité, ET perturbe l'intégrité de l'endothélium en créant des macro-ouvertures transendothéliales favorisant la dissémination bactérienne (Maddugoda *et al.*, 2011 ; Lowe et Glomski, 2012). Les toxines permettent la traversée de la **barrière hémato-encéphalique**, ET la détériorent et LT étant nécessaire à l'invasion bactérienne (Lowe et Glomski, 2012). LT détériore la fonction des **barrières épithéliales pulmonaire et gastro-intestinale** (Moayeri *et al.*, 2015).

L'intoxication par LF est observée dans tous les organes, particulièrement dans le cœur, le rein, le foie, les poumons et la rate, excepté dans l'intestin, la peau et le cerveau (Merritt *et al.*, 2022). Un effet dose de LF induit une atteinte graduelle des organes avec une intoxication restreinte aux poumons à faible dose (5 µg), étendue ensuite au foie (15 µg), puis au cœur, à la rate et au rein à forte dose (25 µg) (Merritt *et al.*, 2022). ET est responsable de l'accumulation de fluides dans l'intestin, d'une hémorragie du tractus gastro-intestinal, d'un œdème au niveau du foie, de lésions nécrotiques, et d'une défaillance multi-organes conduisant à la mort (Firoved *et al.*, 2005 ; Liu *et al.*, 2013). ET influe sur la dissémination de *B. anthracis* lors d'infections chez la souris BALB/c (Dumetz *et al.*, 2011). ET perturbe l'homéostasie hydrique et conduit à l'œdème (Leppla, 1982), elle relocalise les aquaporines en surface apicale de l'épithélium rénal provoquant une perturbation hydrique et de la fonction rénale (Sastalla *et al.*, 2012). Chaque toxine induit une mortalité associée à des dommages au niveau de **tissus cibles spécifiques** : LT cible les cardiomyocytes et les cellules vasculaires des muscles lisses tandis que ET cible les cellules épithéliales intestinales et les hépatocytes (Liu *et al.*, 2013).

4.4. Autres facteurs contribuant à la virulence

B. anthracis et Bcbva contiennent des gènes codant des facteurs impliqués dans la protéolyse et l'hémolyse, participant au processus infectieux et à la réponse immunitaire (Chitlaru *et al.*, 2006 et 2007) par action sur la croissance bactérienne, la dissémination du pathogène ou encore la réponse aux antibiotiques.

4.4.1. Les hémolysines

Plusieurs gènes codant pour des hémolysines ont été identifiés sur le chromosome de *B. anthracis*. Celles-ci sont fortement homologues aux hémolysines et phospholipases C présentes parmi les *B. cereus*. Elles provoquent une lyse des cellules sanguines humaines et une réduction de la croissance bactérienne en condition anaérobie (Klichko *et al.*, 2003 ; Levin, 2015).

4.4.1.1. L'anthrolysine O

L'anthrolysine O est une cytolysine dépendante du cholestérol, sécrétée par *B. anthracis* en phase tardive de croissance. Ces cytolysines sont retrouvées chez différentes espèces pathogènes Gram-positives incluant *B. cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pneumoniae* et *Clostridium perfringens* et sont généralement impliquées dans la pathogenèse. Ces protéines, suite à la fixation du cholestérol membranaire, forment des pores de 20 à 30 nm de diamètre à travers les membranes (Shannon *et al.*, 2003). Ceci leur confère une activité hémolytique (érythrocytes) et de lyse des cellules phagocytaires (monocytes, macrophages, neutrophiles) et lymphocytes (Shannon *et al.*, 2003 ; Mosser *et al.*, 2006). On observe une sensibilité à la lyse plus marquée en fonction du type cellulaire : maximale envers les neutrophiles, moins élevée pour les monocytes et lymphocytes et encore moins pour les macrophages (Mosser *et al.*, 2006). L'action de l'anthrolysine O en association avec le facteur létal conduit à l'apoptose des macrophages (Park *et al.*, 2004).

In vitro, l'anthrolysine O a un effet lytique sur les épithéliums, en particulier l'épithélium alvéolaire (Mosser *et al.*, 2006). Elle augmente également la perméabilité des barrières épithéliales polarisées conduisant à leur dysfonctionnement (Bourdeau *et al.*, 2009 ; Bishop *et al.*, 2010). La traversée de l'épithélium par le pathogène est donc facilitée par la présence de l'anthrolysine O.

4.4.1.2. Les phospholipases C

Les phospholipases (PLCs) contribuent à la virulence en déroutant les signaux cellulaires impliqués dans l'immunité. Elles sont impliquées dans la perturbation des membranes cellulaires, l'échappement intracellulaire hors des phagosomes, ou encore contribuent à la dégradation tissulaire et du mucus, facilitant l'invasion par le pathogène (Titball, 1998 ; Levin, 2015). On retrouve 3 types de PLCs chez *B. anthracis*, chacune hydrolysant un substrat phospholipidique spécifique : anthralysine A/phosphatidylcholine, anthralysine B/sphingomyéline et anthralysine C/phosphatidylinositol.

Lors de la phagocytose des spores, celles-ci germent rapidement au sein de vacuoles phagocytaires puis les bacilles sont relargués dans le cytosol des macrophages. On parle de multiplication bactérienne associée aux macrophages. Les PLCs sont impliquées dans ce processus en permettant leur échappement de la vacuole phagocytaire et leur multiplication cytosolique (Heffernan *et al.*, 2006). Par ailleurs, les PLCs interagissent avec l'anthrolysine O et complètent son activité cytolytique. L'absence de l'anthrolysine O et des 3 PLCs montre une absence de multiplication bactérienne et une impossibilité à induire la mort des macrophages, avec une atténuation de virulence de 40 fois (Heffernan *et al.*, 2006).

4.4.2. Les protéases

Les protéases extracellulaires jouent également un rôle en participant au clivage de peptides antimicrobiens ou à la modulation de l'infection. L'utilisation d'inhibiteurs de protéases à large spectre

ou de sérums dirigés contre certaines métalloprotéases, a montré une efficacité dans le traitement de formes systémiques de la maladie du charbon (Popov *et al.*, 2005). La résistance de *B. anthracis* est due à la sécrétion de métalloprotéases. Toutefois, les spores qui ne sécrètent pas de protéases et les bacilles nouvellement germés sont sensibles aux peptides antimicrobiens durant les étapes précoces de l'infection (Thwaite *et al.*, 2006).

Deux métalloprotéases à zinc, Npr599 et InhA1 sont sécrétées en abondance par *B. anthracis* (Chung *et al.*, 2006). Npr599 est hautement homologue aux bacillolysines de l'espèce *Bacillus* et InhA1 a des homologues chez *B. cereus* et *B. thuringiensis*. Npr599 et InhA1 ont de nombreuses cibles incluant les composants de la matrice extracellulaire, le système de fibrinolyse et les composants de la cascade de coagulation du sang (Chung *et al.*, 2006). InhA1 est impliqué dans l'apparition de troubles sanguins (coagulation et thromboses) (Chung *et al.*, 2006, 2008 et 2011), dans l'adhésion bactérienne à l'endothélium humain (Tonry *et al.*, 2012). Il perturbe également la perméabilité de l'endothélium facilitant la traversée de la barrière hémato-encéphalique par *B. anthracis* (Mukherjee *et al.*, 2011). La survie bactérienne intracellulaire au sein des cellules endothéliales et des macrophages est par ailleurs augmentée en présence de InhA1 (Tonry *et al.*, 2012). La protéase InhA1 clive entre autres Npr599, l'anthrolysine O et les toxines (Chung *et al.*, 2006 ; Pflughoeft *et al.*, 2014).

5. Endocytose

5.1. Présentation

L'endocytose est le processus utilisé par les cellules pour internaliser des éléments variés (appelés cargos) : macromolécules, fluides, nutriments, composants de la matrice extracellulaire, composants de la membrane plasmique et des protéines de surface tels que les complexes récepteur-ligand et les lipides, bactéries, virus, etc. Il s'agit d'un **phénomène actif** régi par l'énergie cellulaire, donc par une cellule dynamiquement active, qui agit par déformation de la membrane à l'origine de la formation de vésicules intracellulaires. L'endocytose contrôle et régule ainsi de nombreux processus cellulaires tels que l'ingestion de nutriments, l'expression des protéines de surface, les interactions cellulaires avec le milieu extracellulaire.

On distingue deux types d'endocytose : la **phagocytose** qui prend en charge les gros cargos (>500 µm) et la **pinocytose** (ubiquitaire). La pinocytose est sous-divisée entre **macropinocytose** et micropinocytose. La micropinocytose comprend la **voie dépendante de la clathrine** (CME, clathrin-mediated endocytosis), et des **voies indépendantes de la clathrine** (CIE, clathrin-independent endocytosis) parmi lesquelles on compte la voie cavéole, les voies indépendantes de la clathrine et cavéoline, dépendantes ou non de la dynamine (**Figure 9**).

L'endocytose provoque la **formation des vésicules endocytaires** qui peut dépendre de la présence de protéines de revêtement cytosoliques (clathrine, cavéoline, endophiline A) ou de forces physiques ([Thottacherry et al., 2019](#)). Ces vésicules sont générées depuis la membrane plasmique et leur formation suit des **étapes caractéristiques communes** : fixation du cargo à la membrane *via* des récepteurs ou des interactions non spécifiques (électrostatiques ou hydrophobes), formation d'invaginations ou de protrusions membranaires, puis détachement des vésicules endocytaires, et enfin leur trafic intracellulaire ([Thottacherry et al., 2019](#)). La scission peut impliquer ou non la dynamine, l'actine, les microtubules et des protéines motrices telles que la dynéine, ou encore l'insertion d'hélices amphipathiques des protéines à domaine BAR ([Thottacherry et al., 2019](#)). Suite à leur internalisation, les vésicules sont prises en charge par les endosomes précoces qui vont les rediriger vers différentes voies telles que le recyclage, la dégradation ou vers d'autres organelles ([Scott et al., 2014](#)). On observe également des phénomènes de transcytose des cargos endocytaires permettant la traversée des épithéliums, endothéliums et de la barrière hémato-encéphalique ([Gruenberg, 2001](#)). L'actine reste un acteur central de l'endocytose puisqu'elle intervient à des étapes variées de ce processus selon la voie empruntée, au niveau de la formation des invaginations comme du relargage de la vésicule en intracellulaire. La polymérisation de l'actine est contrôlée par les petites GTPases de la famille Rho

telles que RhoA (voie endophiline), Cdc42 (voie CLIC/GGEC), ou encore Rac1 (voie endophiline et macropinocytose) (Thottacherry *et al.*, 2019 ; Koivusalo *et al.*, 2010).

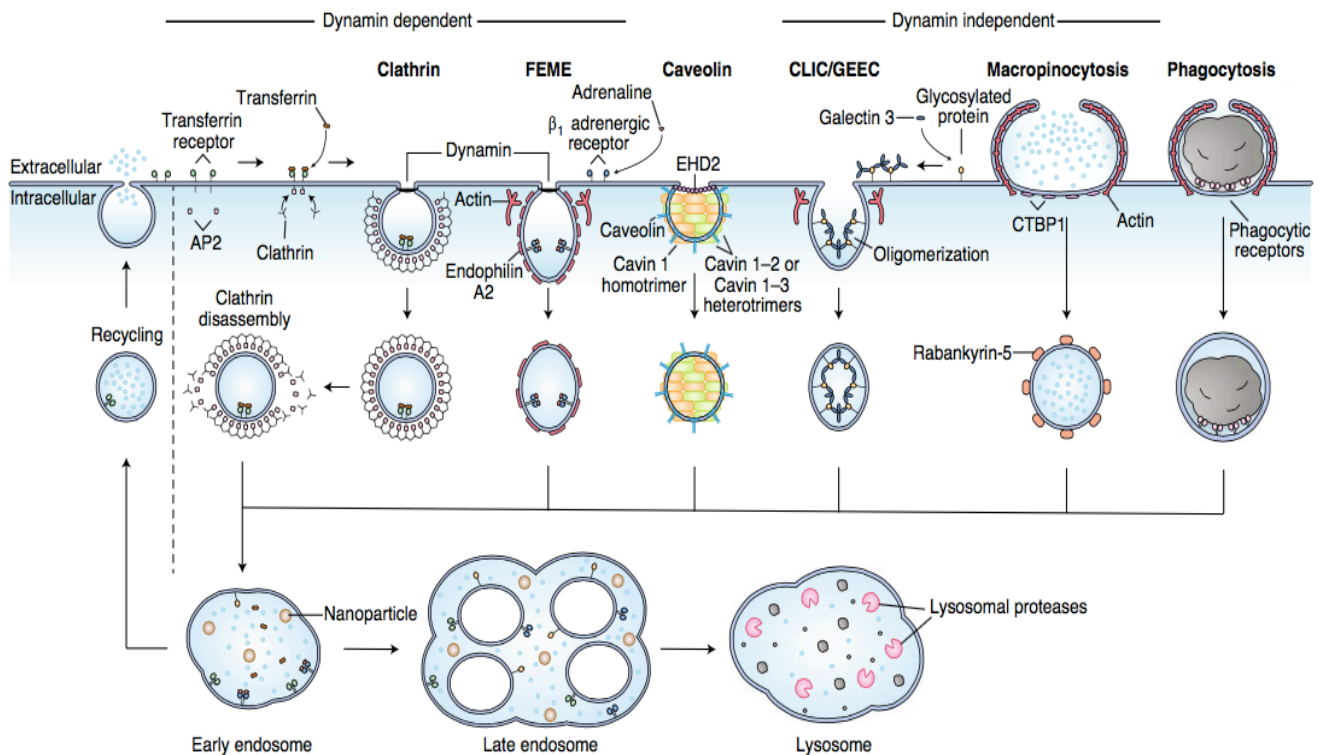


Figure 9. Schéma général des voies d'endocytose. (Rennick *et al.*, 2021).

5.2. Le réseau endosomal

5.2.1. Les endosomes et identité endosomale

Chaque compartiment intracellulaire assure une fonction spécifique et leurs pH diffèrent : les endosomes précoces (EE, *early endosomes*) pH 6,2-6,5, les endosomes tardifs (LE, *late endosomes*) pH 5,5-6,0 et les lysosomes pH 4,5-5,0 (Huotari et Helenius, 2011) (Scott *et al.*, 2014). Le pH contrôle les réactions endocytaires, notamment le lieu de dissociation du ligand de son récepteur et le compartiment d'action des enzymes lytiques.

Le réseau endosomal est une plateforme dynamique et interconnectée chargée de collecter et diriger les cargos vers leur destination finale. Le cytosquelette est impliqué dans cette dynamique. Les endosomes sont mobiles et suivent un mouvement centripète le long des microtubules via les moteurs moléculaires kinésine et dynéine (Huotari et Helenius, 2011). Ces moteurs moléculaires, de directions opposées, participent à la fission de vésicules depuis les EE (recyclage ou dégradation) et à la localisation périnucléaire des endosomes tardifs. La perturbation des microtubules disperse les LE et lysosomes dans

le cytosol, et interfère avec la maturation endosomale et donc la voie de dégradation (Huotari et Helenius, 2011). L'actine interviendrait également dans l'émergence des vésicules de recyclage, le transport depuis les EE vers le Golgi et dans la fusion des lysosomes avec les LE, phagosomes et autophagosomes (Huotari et Helenius, 2011).

Les phosphoinositides et Rab GTPase : identité endosomale

Le feuillet interne de la membrane est constitué de phosphatidylcholine, phosphatidylsérine, phosphatidyléthanolamine et phosphatidylinositol (PtdIns). Le PtdIns est synthétisé dans le réticulum endoplasmique et possède différents niveaux de phosphorylation, créant 7 types de phosphoinositides (PI). Le contrôle local de la **phosphorylation des PI** par les phosphoinosite-3 kinases (PI3K) et phosphatases lipidiques définit le lieu de production, leur conversion lors de l'endocytose, le trafic intracellulaire et les modifications du cytosquelette d'actine (Swanson, 2008 ; Viaud *et al.*, 2015). Ainsi, l'état de phosphorylation du PI (PIP) définit l'identité du compartiment intracellulaire et la voie endocyttaire empruntée. Ceci est permis par fixation et recrutement de diverses protéines, d'adaptateurs et de régulateurs, ou par l'activation de cibles. PI(4,5)P2 (PIP2) et PI(3,4,5)P3 (PIP3) sont majoritaires dans la membrane plasmique, PI(4)P au niveau du golgi, PI(3)P (PI3P) dans les endosomes précoces et PI(3,5)P2 dans les endosomes tardifs et lysosomes (Viaud *et al.*, 2015 ; Elkin *et al.*, 2016) (**Figure 10**).

Les **protéines Rab** sont des petites GTPases appartenant à la famille des petites GTPases Ras, et fonctionnent en tant qu'échangeurs moléculaires pour la fixation au GDP ou au GTP (**Figure 11**). Elles sont assistées par les protéines GEF (Guanine-nucleotide exchange factors) qui les activent et les protéines GAP (GTPase-activating proteins) qui les inactivent au cours de leur cycle de fixation au GTP et GDP respectivement, chaque état de fixation étant réversible (Swanson, 2008). Elles peuvent également être séquestrées sous forme GDP par les GDI (guanine nucleotide dissociation factors) (Swanson, 2008). Les Rab-GTP sont actives, fixent leur effecteur et assurent l'identité structurale et fonctionnelle de la vésicule (**Figure 10**). Leur distribution restreinte en fait des **marqueurs spécifiques des organelles**. L'identité de l'endosome reste toutefois dynamique, spatiale et temporelle grâce aux cycles de fixation de Rab au GDP et GTP (Elkin *et al.*, 2016).

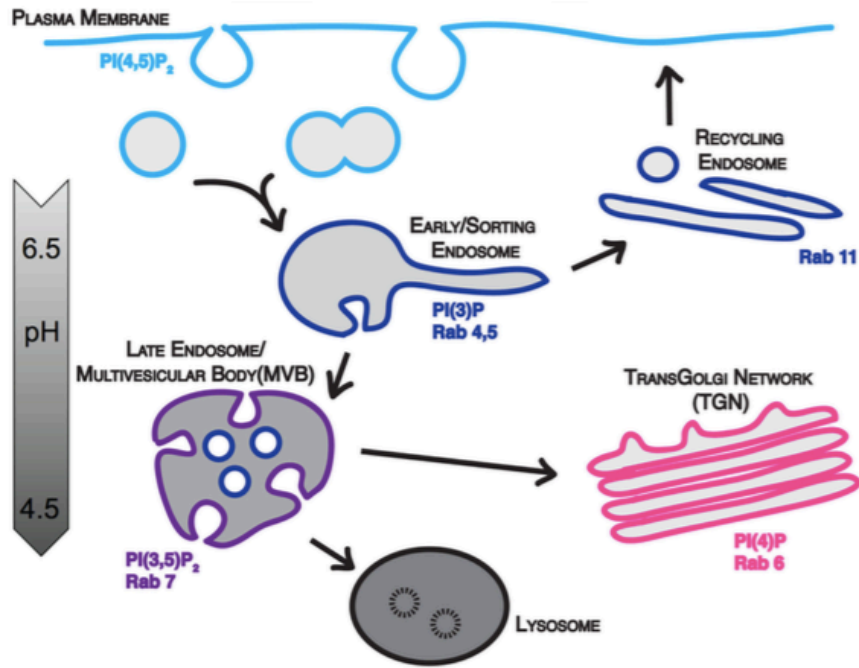


Figure 10. Identité des compartiments endosomaux. Chaque endosome est défini par une association en lipide, Rab GTPase et pH particulière (Elkin et al., 2016).

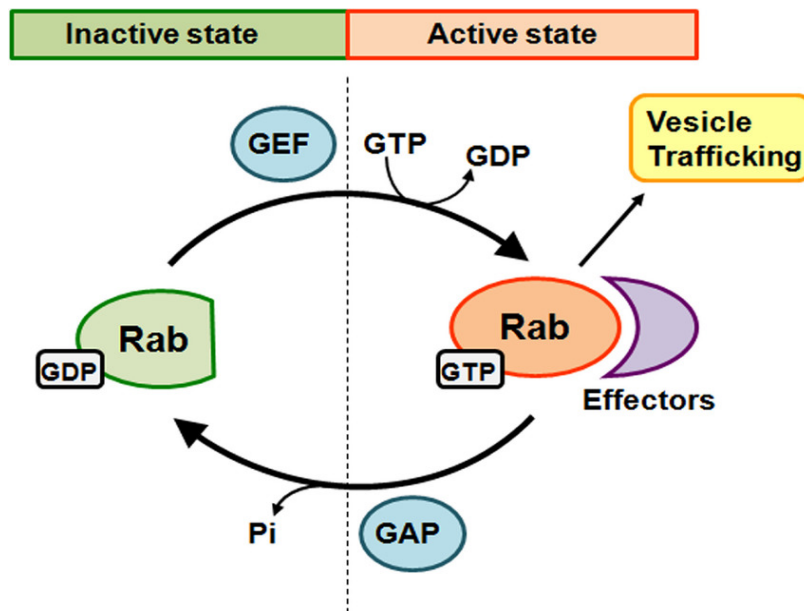


Figure 11. Schéma du cycle d'activation des petites GTPases Rab. Les Rab fixée au GDP sont inactive, et deviennent actives par fixation au GTP. Les GEF permettent l'activation et les GAP l'inactivation. Les Rab-GTP fixent des effecteurs pour le trafic vésiculaire, celui-ci se dissocie lors de la conversion du GTP en GDP. (Wang et al., 2017).

5.2.2. Les endosomes précoces

Les vésicules endocytaires néoformées et leurs cargos sont adressés de façon commune aux endosomes précoces également appelés **endosomes de tri**, à partir desquels 3 voies sont possibles (**Figure 12**) : **recyclage** à la membrane direct ou indirect via les endosomes de recyclage, **dégradation** par les lysosomes, envoi au réseau **trans-Golgien (TGN)** par transport rétrograde (*Scott et al., 2014*).

Les endosomes précoces patrouillent en périphérie cellulaire proche de la membrane plasmique *via* les microtubules (*Huotari et Helenius, 2011*). Ils sont dynamiques et fusionnent fréquemment entre eux et avec les vésicules endocytaires (*Naslavsky et al., 2018*). L'identité du EE est portée par **Rab5** et le **PI3P** (*Gruenberg et al., 2001 ; Huotari et Helenius, 2011*). Ce sont des vésicules pléiomorphiques dont le lumen a un pH 6.2-6.5 moyennement acide. On distingue une **partie vacuolaire** large et sphérique de 100-500 nm de diamètre accueillant le ligand lors de sa dissociation du récepteur ainsi que des vésicules internes, et des **parties tubulaires** étroites de 20-50 nm de diamètre se projetant vers le cytosol qui concentrent la majeure partie de la membrane et accumulent les récepteurs destinés au recyclage (*Gruenberg et al., 2001 ; Huotari et Helenius, 2011 ; Elkin et al., 2016*). Les zones tubulaires qui ont plus de membrane et les zones vacuolaires qui ont plus de lumen définissent les voies d'adressage (*Scott et al., 2014*).

Les EE ont une **composition membranaire hétérogène** composée de nombreux domaines sub-membranaires qui diffèrent en fonction (Rab5, Rab4, Rab11, ARf1/COPI, rétromère, cavéole) principalement dans les tubulations pour générer des vésicules à destination de la membrane plasmique, du TGN, ou des endosomes de recyclage (*Huotari et Helenius, 2011 ; Naslavsky et al., 2018*). Les tubulations membranaires endosomales sont formées par des protéines à domaine BAR, de fixation aux lipides, capables d'induire des courbures membranaires ; ou encore par les protéines de la famille *sorting nexins* (SNX) qui interagissent avec les membranes et induisent la tubulation (*Elkin et al., 2016*). La répartition du cargo entre les deux régions est régie par le pH du EE qui induit la dissociation entre le ligand et son récepteur : le récepteur membranaire à recycler (ex. récepteurs de la transferrine ou du LDL) est accumulé dans les tubulations tandis que le ligand soluble est contenu dans la partie vacuolaire (*Elkin et al., 2016*). Le tri en général est effectué dans les 10 minutes post-endocytose (*Huotari et Helenius, 2011 ; Puhar et Montecucco, 2007*).

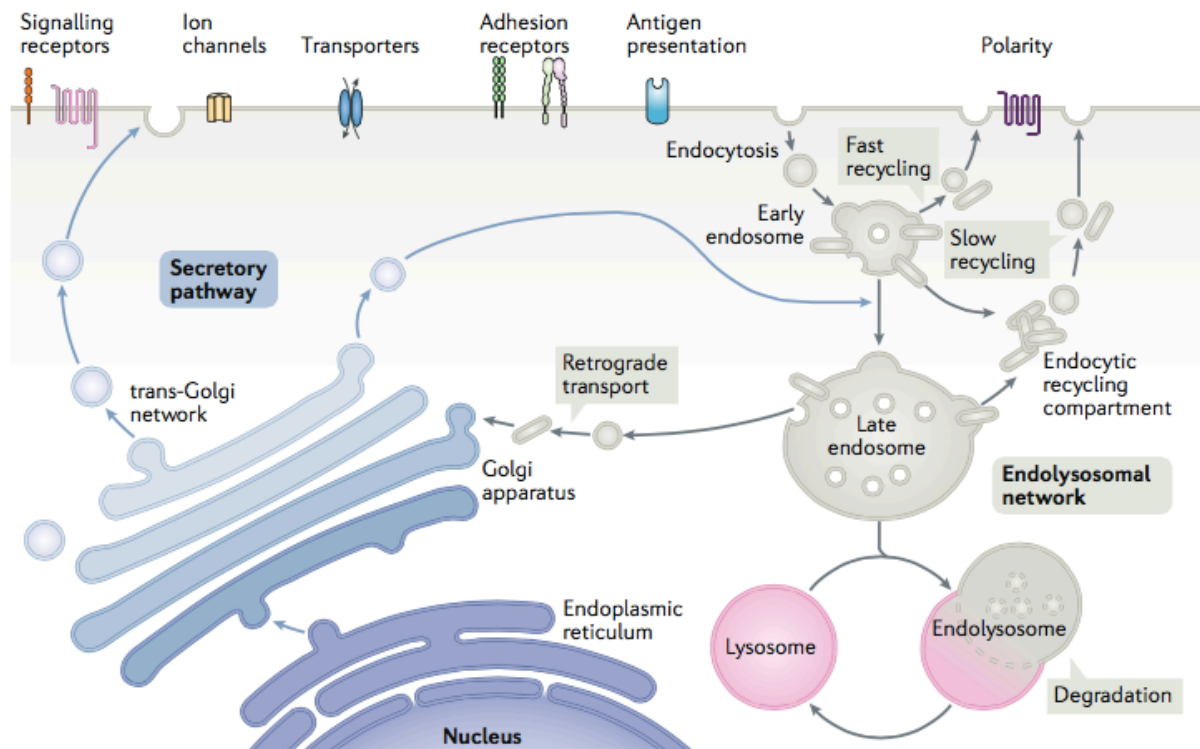


Figure 12. Le trafic intracellulaire endosomal. Les voies de recyclage, de dégradation (endolysosomale), de transport rétrograde et de sécrétion sont illustrées (Cullen *et al.*, 2018).

5.2.3. Voie de recyclage

La majorité de la surface membranaire, et ses composants, est restituée à la membrane plasmique depuis les endosomes précoces, avec 50 à 180% de surface membranaire recyclée par heure (Huotari et Helenius, 2011). Ce recyclage permet le maintien des membranes et protéines en surface cellulaire. Les récepteurs à recycler sont dissociés de leur ligand dans l'endosome précoce quelques minutes après leur arrivée (Scott *et al.*, 2014).

L'étude de la cinétique de recyclage endocytaire dans les cellules CHO, MDCK et Hep-2 a montré l'existence de 2 voies de recyclage (Figure 12) : une voie rapide avec 50% recyclé en 1-2 minutes et une plus lente à 8-14 minutes (Hao et Maxfield, 2000). Le **recyclage rapide** renvoie directement le cargo à la membrane depuis le EE et met en jeu Rab4 (assisté par Rab35, AP-1, Snx17, Snx27) et le **recyclage lent** est indirect par transport de vésicules vers les endosomes de recyclage et dépend de Rab11 (assisté par Rab8, Rab22a, Arf6, EHD1) (Scott *et al.*, 2014 ; Naslavsky *et al.*, 2018). Les endosomes de recyclage sont tubulaires et regroupés en un réseau périnucléaire au niveau du centre organisateur des microtubules. Ils émettent des vésicules qui se servent des microtubules pour retourner à la membrane plasmique (Naslavsky *et al.*, 2018). Le recyclage rapide compterait pour 33-60% du recyclage cellulaire (Hao et Maxfield, 2000). La répartition entre les voies dépendrait de

l'hydrophobicité du cargo, où les cargos hydrophobes sont préférentiellement localisés dans les régions tubulaires et directement recyclés, et les cargos hydrophiles redistribués vers la partie vacuolaire et recyclés plus lentement (ex. récepteur de la transferrine) (Hao et Maxfield, 2000).

Le complexe rétromère, associé à la face cytosolique des EE et LE *via* les protéines SNX3 (*sorting nexin 3*) et Rab7-GTP respectivement, est commun aux voies de recyclage et d'envoi au TGN depuis l'endosome précoce (Scott *et al.*, 2014 ; Cullen *et al.*, 2018 ; Naslavsky *et al.*, 2018). Il est responsable de la reconnaissance de séquences/motifs spécifiques portés par les cargos, parfois assistée par des protéines SNX et autres protéines adaptatrices (Cullen *et al.*, 2018). Ils sont alors réarrangés dans des microdomaines membranaires des EE qui bourgeonnent pour donner des structures tubulovésiculaires transportées ensuite par les microtubules vers l'endosome de recyclage ou la membrane plasmique (Naslavsky *et al.*, 2018). La formation de ces structures est coordonnée par l'**actine**, les **protéines BAR** (*bin, amphiphysin and Rvs*) et **SNX-BAR** de remodelage membranaire (**Figure 13**). Le complexe rétromère interagit avec WASH pour la polymérisation de l'actine *via* Arp2/3 (Cullen *et al.*, 2018 ; Naslavsky *et al.*, 2018). Les protéines à domaine BAR imposent une courbure membranaire du fait de leur association rigide, les SNX ont un domaine de fixation au PI3P et un domaine BAR ; elles conduisent à la formation et stabilisation de tubules (Scott *et al.*, 2014 ; Cullen *et al.*, 2018). La scission implique des **protéines EHD** (*Eps15 homology domain*), qui sont des ATPase ressemblant à la dynamine et associées aux endosomes, qui s'oligomérisent en anneau pour étrangler les membranes. Les **moteurs moléculaires de microtubules** et un contact avec le **réticulum endoplasmique** y participent également (Cullen *et al.*, 2018).

Une autre voie permet d'échapper à la dégradation : l'envoi au TGN ou **transport rétrograde**. Un récepteur-type de cette voie est le récepteur au mannose-6-phosphate. Cet adressage est utilisé par la toxine cholérique, la shiga toxine et la ricine. Les endosomes précoces et tardifs peuvent émettre des vésicules à destination du TGN. Le trafic endosomes/TGN est continu et le mécanisme de formation des tubules est le même que pour la voie de recyclage, et implique Rab9, Rab7, la clathrine et ses adaptateurs, les SNX-BAR et le complexe rétromère (Huotari et Helenius, 2011 ; Tu *et al.*, 2020). Les complexes AP-1 et AP-3 interviennent dans le trafic intracellulaire Golgi/endosomes associé à la clathrine, où AP-1 fixe le lipide PI4P présent sur le Golgi et crée des vésicules indépendamment de la dynamine (Kirchhausen *et al.*, 2014).

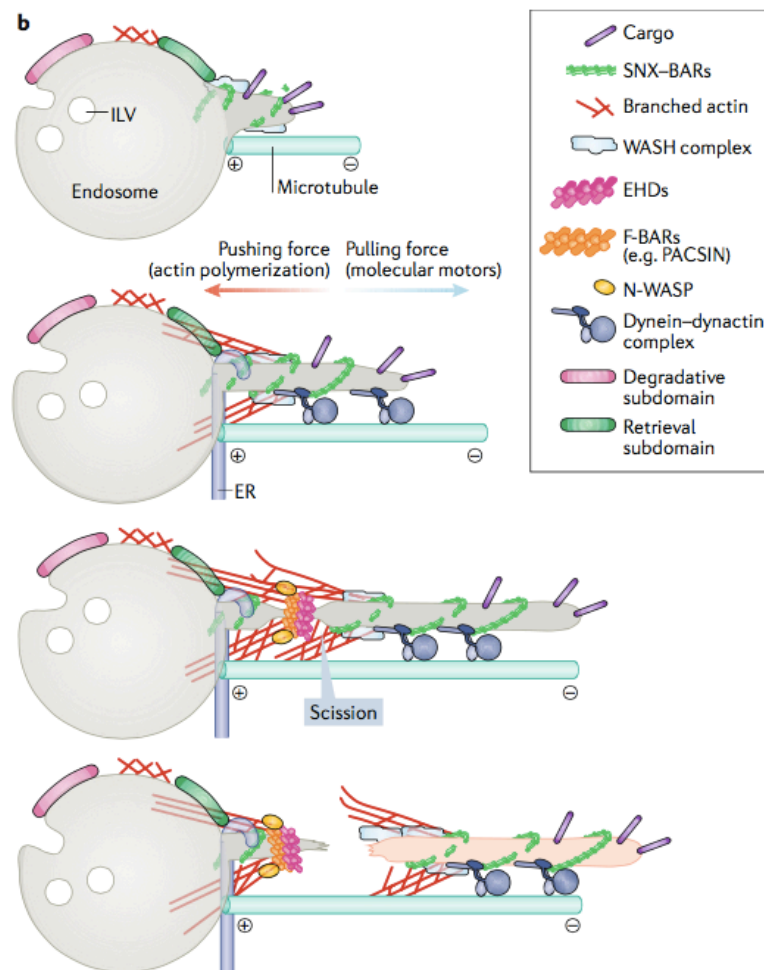


Figure 13. Mécanisme de formation des tubules de recyclage. *Le processus de formation des tubules implique différentes protéines depuis l'initiation d'une élongation membranaire jusqu'à la scission donnant naissance à un tubule de recyclage (Cullen et al., 2018).*

5.2.4. Voie de dégradation

La voie de dégradation correspond à la voie endolysosomale et nécessite la maturation des endosomes précoces (EE) en endosomes tardifs (LE) puis la fusion avec les lysosomes (Figure 12). L'ubiquitinylation du domaine cytoplasmique constitue un signal d'adressage au lysosome (Gruenberg, 2001). La maturation des EE en LE peut se produire n'importe où dans le cytosol (Huotari et Helenius, 2011). La **maturation des endosomes** possède 3 caractéristiques : acidification, composition lipidique en phosphatidylinositol et expression de protéines Rab GTPase. Une maturation est aussi observée pour les phagosomes, les autophagosomes et probablement les micropinosomes (Huotari et Helenius, 2011). La fusion avec des vésicules issues des EE apporte les cargos à dégrader.

5.2.4.1. Les corps multivésiculaires : fournisseur de cargos

On observe au sein de la **partie vacuolaire** des EE, l'émergence de **vésicules intraluminales ILV** par invagination de la membrane endosomale (**Figure 14, 15A**). L'accumulation d'ILV forme des régions multivésiculaires qui se détachent de l'endosome précoce pour former des corps multivésiculaires (MVB) ou « *endosomal carrier vesicle* » (ECV) qui transportent le cargo vers les LE *via* les microtubules (Gruenberg *et al.*, 2001 ; Scott *et al.*, 2014). Les ILV sont critiques pour l'adressage du cargo vers la dégradation. Les ILV et MVB/ECV, d'environ 50 nm et 0,5 µm respectivement, s'acidifient rapidement (pH5.5), subissent la conversion des Rab, fusionnent avec les LE. Le domaine cytosolique du cargo ILV est ubiquitinylé (**Figure 14**), reconnu par PI3P et par la machinerie ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*) dont les composants sont séquentiellement recrutés à la membrane endosomale (Cullen *et al.*, 2018). ESCRT regroupe les cargos et les redistribue dans un domaine membranaire spécifique, crée une invagination en réponse à la tension membranaire générée ; le cargo est dé-ubiquitinylé avant fermeture de l'ILV (Scott *et al.*, 2014 ; Huotari et Helenius, 2011). Cependant, des ILV peuvent provenir de processus indépendants de ESCRT sans ubiquitinylation comme le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMHII) dans les cellules dendritiques activées.

L'entrée dans les ILV précoces inactive les récepteurs de signalisation par perte de contact avec le cytosol. Leur contenu arrive facilement accessible aux hydrolases lysosomales car non protégés par LAMP1 contrairement aux LE et lysosomes (Huotari et Helenius, 2011 ; Scott *et al.*, 2014).

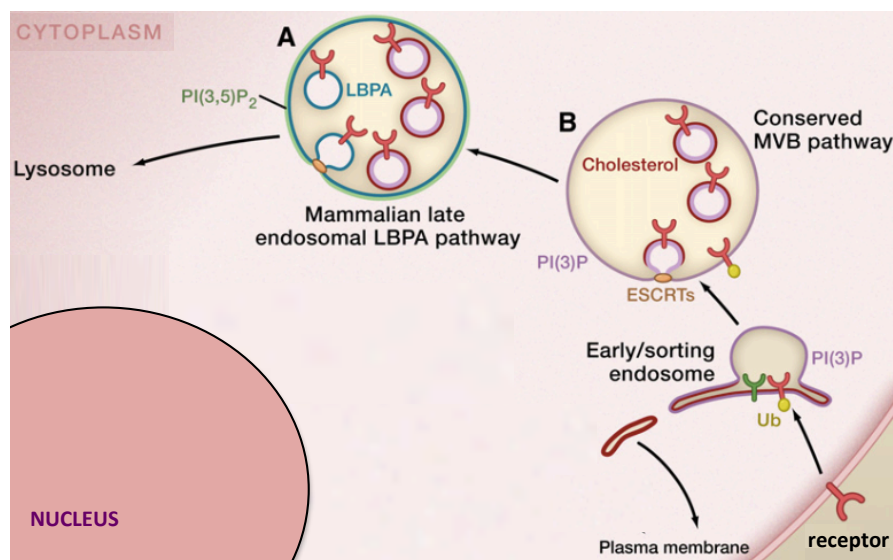


Figure 14. Formation des ILV en endosomes précoces et tardifs. Les récepteurs ubiquitinylés intègrent les ILV précoces. ESCRT permet l'invagination nécessaire à la formation de l'ILV. Les ILV varient dans leur composition lipidique selon leur endosome d'émergence (adapté de Hurley *et al.*, 2010).

5.2.4.2. Maturation endosomale

La **conversion des PIP et des Rab GTPases** est au centre de la maturation des endosomes. La maturation endosomale est dictée selon une cascade Rab (**Figure 11**) : une Rab (Rab5) recrute une GEF qui active et recrute une Rab (Rab7), qui va à son tour recruter une GAP pour inactiver la Rab précédente (Rab5), terminant la conversion de l'endosome précoce (Rab5) vers l'endosome tardif (Rab7). (Elkin *et al.*, 2016). Lors de la maturation, des endosomes hybrides transitoires apparaissent, exprimant Rab5 et Rab7 simultanément (Huotari et Helenius, 2011). Le reste du EE contenant Rab5, Rab4, Rab11 est séparé du LE formé via les microtubules (Huotari et Helenius, 2011). Parallèlement, le recrutement de Rab7 permet la conversion du PI3P en PI(3,5)P2, lipide de la membrane des LE. Les PIP et les enzymes les convertissant sont impliqués dans la régulation des protéines Rab (Huotari et Helenius, 2011 ; Thottacherry *et al.*, 2019).

L'acidification du lumen est réalisée par l'action des pompes à protons capables d'hydrolyser l'ATP et par influx de H⁺. Celles-ci sont localisées dans les régions riches en cholestérol de la membrane endosomale, les ATPases vacuolaires v-type (Menard *et al.*, 1996 ; Huotari et Helenius, 2011). Leur activité dépend de l'association des domaines ATPase et pompe à protons, ainsi que de leur concentration dans les membranes (Huotari et Helenius, 2011). Lors de la maturation, le pH chute rapidement de 0,5 unité et diminue jusqu'à fusion avec le lysosome. On observe également des **changements ioniques** : un efflux de calcium qui permet la fusion avec les lysosomes et la reformation du lysosome depuis l'endolysosome, une diminution des ions sodium et une augmentation des ions potassium et Cl⁻ (Huotari et Helenius, 2011).

5.2.5. Endosomes tardifs

Les LE, de 250-1000 nm de diamètre, sont multivésiculaires (souvent plus de 30 ILV). La charge de surface est négative et leur lumen a un pH 6,0-4,9 acide (Huotari et Helenius, 2011 ; Scott *et al.*, 2014). Ils sont caractérisés par la présence de **Rab7**, des lipides **PI(3,5)P2** et de **LBPA** (phospholipid lysobisphosphatidic acid) (Huotari et Helenius, 2011). Ils acquièrent la protéine membranaire LAMP1 permettant de résister aux hydrolases dont le lumen est enrichi. L'endosome tardif reçoit les produits de l'autophagie lors de la fusion avec l'autophagosome, de la biosynthèse du golgi et du trafic endocyttaire. Il émet des vésicules vers le Golgi ou la membrane plasmique, transporte le cholestérol aux endosomes de recyclage (Scott *et al.*, 2014).

Suite à leur maturation, on observe une relocalisation dans la **zone périnucléaire**. La modification des protéines responsables de la capacité d'ancrage et de fusion endosomale permet la fusion avec les ECV/MVB, les LE eux-mêmes, les lysosomes et les autophagosomes (Huotari et Helenius, 2011). Le cargo peut arriver dans les LE 30–40 minutes post-endocytose (Puhar et Montecucco, 2007). Les LE

fusionnent avec les lysosomes pour former un compartiment hybride transitoire, l'**endolysosome**, afin de procéder à la dégradation du cargo (Huotari et Helenius, 2011 ; Scott *et al.*, 2014). Cette fusion se produit dans les 10-40 min après formation des LE (Huotari et Helenius, 2011). Les **hydrolases** (enzymes lytiques) proviennent de vésicules issues du TGN qui fusionnent avec les endosomes ; fixées au récepteur mannose-6-phosphate, leur dissociation se produit à pH 5,5 acide dans les LE (Elkin *et al.*, 2016). Les **lysosomes**, présents en périnucléaire, nécessitent l'arrivée d'hydrolases par fusion avec les LE pour assurer et maintenir la capacité à dégrader, puisque ces enzymes sont actives à pH acide (Huotari et Helenius, 2011). Les lysosomes sont sphériques et protégés des hydrolases par expression de LAMP1 comme les LE (Scott *et al.*, 2014).

On retrouve également l'émergence de **nouveaux ILV** (Huotari et Helenius, 2011 ; Naslavsky *et al.*, 2018). Les lipides des ILV diffèrent de ceux de la membrane endosomale : PI3P, cholestérol et sphingolipides en ILV précoces, LBPA (acide lysobisphosphatidique) et céramides en ILV tardifs (Huotari et Helenius, 2011 ; Scott *et al.*, 2014) (**Figure 14**). Le LBPA est spécifiquement présent au sein des régions multivésiculaires du LE et abondant dans les ILV tardifs. Il est résistant aux hydrolases dont les ILV tardifs se chargent. Si PI(3,5)P2 fixe ESCRT, LBPA interagit avec Alix (protéine associée à ESCRT) et montre une capacité à déformer les membranes comme observé par la génération spontanée de vésicules internes en liposomes à pH acide (Huotari et Helenius, 2011 ; Scott *et al.*, 2014). D'autres vésicules intraluminales peuvent se former par **microautophagie** (**Figure 15B**), qui correspond à la capture de composés cytosoliques par invagination de la membrane du LE de façon sélective ou non (Huotari et Helenius, 2011).

Les endosomes tardifs sont une **seconde plateforme de tri** au niveau des ILV qui peuvent échapper à la dégradation lysosomale selon deux processus. Certains ILV sont relargués comme **exosomes** après fusion des endolysosomes sécrétoires avec la membrane plasmique (Scott *et al.*, 2014) (**Figure 15C**). Ces exosomes sont des vésicules de petite taille (40-100 nm de diamètre) à simple membrane contenant du LBPA, dépendent de ESCRT et de la protéine ALIX, et assurent la communication intercellulaire (Huotari et Helenius, 2011). Les ILV peuvent aussi fusionner avec la membrane du LE (processus de « **back fusion** »), et réintégrer la membrane endosomale ou être relargués dans le cytosol (Huotari et Helenius, 2011) (**Figure 15D**). Le LBPA est nécessaire à la *back fusion* des ILV (Scott *et al.*, 2014).

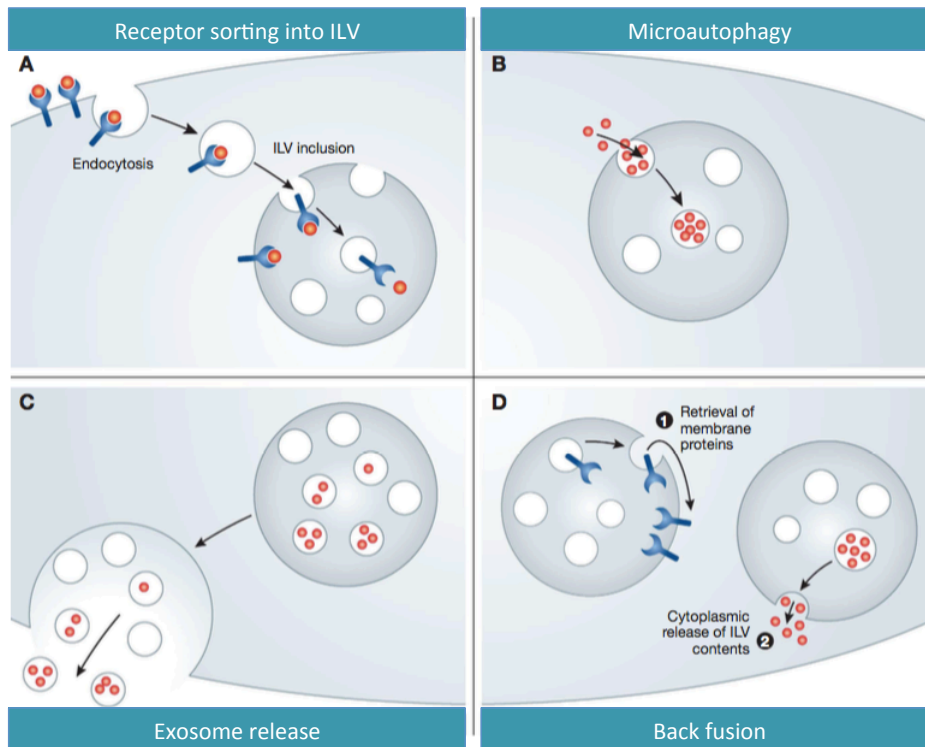


Figure 15. Les vésicules intraluminales des endosomes et leur devenir. (A) formation des ILV, (B) microautophagie, (C) relargage extracellulaire d'exosomes, (D) Back fusion avec relargage cytosolique ou réintégration de cargo à la membrane endosomale (Huotari et Helenius, 2011).

5.3. Les voies d'endocytose

5.3.1 Phagocytose et macropinocytose

5.3.1.1. Similarités

Les phagocytes sont des cellules en constante exploration du milieu extérieur, émettant de nombreuses protrusions en quête de signaux à transmettre. Deux types d'endocytose sont caractérisés par la formation de ces déformations membranaires vers le milieu extracellulaire par activation de la **polymérisation de l'actine** : phagocytose et macropinocytose. La phagocytose dépend de l'interaction du cargo avec un récepteur, tandis que la macropinocytose ingurgite de grandes quantités de fluides extracellulaires sans contact avec le cargo.

L'ensemble du processus d'internalisation est contrôlé par la présence de lipides et de petites GTPases selon une organisation spatiale et temporelle spécifique (Swanson, 2008 ; Thottacherry *et al.*, 2019). La plupart nécessitent la **PI3K** pour former du PIP3 à partir de PIP2 (Swanson, 2008). La PI3K n'impacte pas la formation des protrusions mais bloque la fermeture de la coupe, laissant une coupe macropinocyttaire circulaire ou une coupe phagocyttaire ouverte en surface cellulaire (Araki *et al.*, 1996).

Ces processus sont régulés par transduction du signal vers des petites GTPase puis vers les facteurs protéiques de nucléation WASP, N-WASP ou WASH. Ces facteurs agissent sur la polymérisation de l'actine via le complexe Arp2/3 et l'inhibition des protéines de coiffe pour l'élongation des filaments d'actine par ajout de monomères (Mylvaganam *et al.*, 2021). De nombreuses interconnexions existent entre phagocytose et macropinocytose dans l'emploi des GTPases : Rac1, Cdc42, Arf6, contribuent à la macropinocytose et la phagocytose ; Rab5 et RhoG à la macropinocytose et à la phagocytose de cellules apoptotiques ; RhoA inhibe la phagocytose des cellules apoptotiques mais est requise pour la phagocytose dépendante du complément CR3 (Swanson, 2008 ; Mylvaganam *et al.*, 2021). La **phospholipase C γ** (PLC γ) participe également en hydrolysant le PIP2 en 2 sous produits : l'inositol-1,4,5-triphosphate (Ins3P) qui stimule un relargage de calcium par le réticulum endoplasmique et le diacylgcérol (DAG) qui reste associé à la membrane et recrute des protéine kinases C (PKC) et relargue Rac1 (Swanson, 2008). Au niveau des coupes phagocytaires et macropinocytaires, **PIP3** et **DAG** sont augmentés jusqu'à fermeture, afin d'assurer l'activation des enzymes nécessaires à l'activité contractile de fermeture.

La **clathrine** facilite également la phagocytose de petites particules opsonisées ou la macropinocytose dépendante de facteurs de croissance, de façon non significative. La fixation du ligand induit une autophosphorylation du récepteur et le recrutement de partenaires qui vont ubiquitinyler les récepteurs et réguler leur présence sur la face externe des protrusions par endocytose dépendante de la clathrine (Swanson, 2008). Elle participe notamment à la phagocytose de *L. monocytogenes* par les cellules épithéliales (Swanson, 2008).

La maturation des phagosomes et macropinosomes suit un **parcours endolysosomal** par fusion avec les endosomes puis les lysosomes. Pris en charge par les microtubules, on observe une distribution finale centripète, un rétrécissement par efflux d'eau et de solutés permettant l'acidification et une diminution de la tension membranaire en faveur de la tubulation (King et Ray, 2019 ; Mylvaganam *et al.*, 2021). En début de maturation, WASH et l'ancrage au réticulum endoplasmique créent des zones de tubulation et leur scission à l'origine de vésicules de recyclage essentielles afin d'assurer la continuité de surveillance extracellulaire (Mylvaganam *et al.*, 2021).

5.3.1.2. La phagocytose

Un intérêt immunitaire majeur de la phagocytose consiste en l'internalisation des microorganismes pour la présentation d'antigènes afin d'activer la réponse immune, ainsi que l'élimination des cellules apoptotiques et nécrotiques. Présente dans presque tous les types cellulaires, elle est pratiquée de façon très efficace par les **phagocytes professionnels** : macrophages, cellules dendritiques, neutrophiles, monocytes et ostéoclastes. Parmi les **phagocytes non professionnels**, peu actifs, on retrouve les cellules épithéliales et endothéliales, les fibroblastes impliqués dans l'élimination des cellules mortes et non de pathogènes (Uribe-Querol et Rosales, 2020).

La phagocytose est une voie **saturable, dépendante de récepteurs cellulaires**, ciblant des cargos opsonisés ou porteurs de motifs associés aux pathogènes. La vésicule endocyttaire formée, appelée **phagosome**, permet l'ingestion et la destruction des **microorganismes de plus de 0,5 µm** (Thottacherry *et al.*, 2019). Il existe 2 types de récepteurs phagocytaires (Uribe-Querol et Rosales, 2020 ; Mylvaganam *et al.*, 2021). Les récepteurs non opsoniques reconnaissent directement les motifs associés aux pathogènes du cargo, ainsi que des constituants membranaires exprimés par les cellules mourantes. Les récepteurs opsoniques détectent les opsonines, protéines du soi fixées sur le cargo (anticorps, la fibronectine, le complément et lectines fixant le mannose). Une particule semi opsonisée ne sera pas complètement internalisée.

La phagocytose par le récepteur au complément

Le récepteur CR3 est le plus efficace de la famille des récepteurs du complément. Il internalise les particules revêtues par C3bi, un composant activé du complément, par **dépression membranaire dépendante de Rho**, et non de Rac et Cdc42, sans protrusions extracellulaires (Uribe-Querol et Rosales, 2020). Rho dirige la polymérisation de l'actine, et établit un lien avec les myosines et les microtubules.

La phagocytose par le récepteur aux immunoglobulines

Le modèle le plus décrit de coupe phagocyttaire est celui de la phagocytose FcR en « **fermeture éclair** » qui progresse de façon étroite de part et d'autre de la particule par polymérisation et contraction (myosines) directionnelle de l'actine vers le sommet de la particule (Swanson, 2008). La phagocytose est dépendante de PI3K lorsque les particules ont un diamètre supérieur à 3 µm. La fixation du cargo initie le regroupement des récepteurs FcR au sein de domaines riches en cholestérol. Une cascade aboutit à la polymérisation de l'actine. La phosphorylation des récepteurs par les tyrosines **kinases Src** permet la fixation de la kinase Syk. Syk phosphoryle divers substrats dont une PI3K qui augmente la production de PIP3 au niveau de la coupe phagocyttaire afin d'activer **Rac**, la myosine, et la PLCγ (Swanson, 2008 ; Thottacherry *et al.*, 2019 ; Uribe-Querol et Rosales, 2020).

La signalisation à l'origine des protrusions membranaires implique **Cdc42, Rac et Arf6** qui recrutent WASP et WAVE. Cependant, la dépendance au complexe Arp2/3 ne s'avère pas absolue. De façon générale, les extrémités contiennent du PIP2, Rac1, Cdc42 et Arf6 pour une polymérisation localisée tandis que la base est riche en PIP3 et DAG (Swanson, 2008). A la base de la coupe phagocyttaire a lieu **l'intégration intracellulaire d'endomembranes** provenant des endosomes (recyclage, tardifs), lysosomes et du réticulum endoplasmique (Swanson *et al.*, 2008). Ceci est permis grâce à l'exocytose des vésicules le long des microtubules, ainsi que par PIP3 qui inactive Cdc42 et Rac pour désassembler l'actine (Mylvaganam *et al.*, 2021). La fermeture complète de la coupe dépend de la PI3K (Araki *et al.*, 1996), accompagnée d'un pic localisé de polymérisation d'actine et d'une force constrictive générée par la myosine ou la dynamine (Swanson, 2008 ; Mylvaganam *et al.*, 2021).

5.3.1.3. La macropinocytose

La macropinocytose est **indépendante de la dynamine, de la clathrine et de la cavéoline**. C'est un processus dynamique contrôlé par l'actine qui permet d'internaliser de grandes quantités de fluides extracellulaires et de membranes au sein de grandes vésicules. En effet, les macrophages peuvent internaliser 26% de leur volume et 190% de leur surface par heure (Steinman *et al.*, 1976). Les vésicules formées sont appelées **macropinosomes**, d'un diamètre de **0,2 µm à 10 µm**, bien plus grandes que les autres types de vésicules endocytaires et capables d'internaliser de grosses particules allant jusqu'à 1 µm (Swanson, 2008 ; Elkin *et al.*, 2016). Elle représente une voie d'entrée **non-spécifique**, non sélective, indépendante du contact cellulaire. Elle est **non saturable** puisque les macrophages présentent une augmentation de la quantité de cargo contenue plutôt que du nombre de vésicules (Steinman *et al.*, 1976).

Chez les mammifères, la macropinocytose est observée dans divers types cellulaires tels que les cellules endothéliales et épithéliales, les neurones, la microglie, les cellules cancéreuses, les fibroblastes et les cellules immunitaires (lymphocytes B et T, macrophages et cellules dendritiques immatures) (Lin *et al.*, 2020). Elle permet la présentation d'antigènes, l'ingestion de nutriments, de molécules extracellulaires et des composants de la membrane plasmique, le recyclage de protéines, la migration et la signalisation cellulaire (Elkin *et al.*, 2016).

La macropinocytose correspond à un assemblage de l'actine formant des **protrusions extracellulaires** qui viennent se fermer lors du contact des deux extrémités, englobant ainsi le contenu du milieu extracellulaire (Mylvaganam *et al.*, 2021). Ces protrusions peuvent se résorber à la membrane ou former des macropinosomes (Swanson, 2008). L'ensemble du cytosquelette semble être impliqué puisque les inhibiteurs d'actine, de microtubules et de leurs moteurs moléculaires respectifs, myosine et dynéine, empêchent la fermeture des macropinosomes (Williamson et Donaldson 2019).

Il existe **deux types de macropinocytose** : constitutive dans les macrophages et les cellules dendritiques immatures ou induite par stimulus dans tous les types cellulaires (Swanson, 2008). La macropinocytose reste toutefois délicate à appréhender puisqu'il existe plusieurs voies macropinocytaires impliquant différents mécanismes moléculaires et devenir post-internalisation selon les conditions, le stimulus, le pathogène ou le type cellulaire (Lin *et al.*, 2020). En effet, la PI3K ferme les macropinosomes des macrophages mais contrôle les renflements des cellules endothéliales ; la SNX5 est requise dans les macrophages mais sans effet dans les dendritiques spléniques; l'amiloride inhibe la macropinocytose dans les macrophages mais pas dans les dendritiques (Lin *et al.*, 2020).

La macropinocytose constitutive

La macropinocytose constitutive se produit de façon dynamique à l'état basal chez les **macrophages et les cellules dendritiques immatures uniquement**. Les macrophages internaliseraient l'intégralité de

leur surface cellulaire toutes les 30 minutes (Steinman *et al.*, 1976) et les cellules dendritiques près de 40% de leur volume en 1 heure (Sallusto *et al.*, 1995). Cette voie assure une capture antigénique continue par les cellules dendritiques immatures, les cargos étant ensuite délivrés aux lysosomes pour traiter les antigènes et les présenter en surface cellulaire. Les cellules dendritiques matures arrêtent la macropinocytose afin de ne pas internaliser les complexes CMH-antigène présentés (Lin *et al.*, 2020). Les macrophages sont des cellules-clé de l'immunité qui assurent la phagocytose, la présentation d'antigènes, la production de cytokines médiatrices de l'inflammation, la réparation tissulaire. Les macrophages anti-inflammatoires maintiennent la macropinocytose tandis que les pro-inflammatoires chargés de présenter les antigènes éteignent cette fonction de la même façon que les cellules dendritiques matures (Lin *et al.*, 2020).

Cette forme de macropinocytose est induite par le Ca^{2+} **extracellulaire** détecté spécifiquement par un récepteur couplé aux protéines G (Calcium Sensing Receptor, CaSR) exprimé à la surface des phagocytes (Canton *et al.*, 2016). Il active la PI3K et génère du PIP3 à la membrane plasmique (Lin *et al.*, 2020). Ces cellules contiennent également un taux très élevé d'**acide phosphatidique** (PhA) à la membrane plasmique comparé aux cellules non phagocytaires (Bohdanowicz *et al.*, 2013). L'accumulation de PhA résulte d'une cascade enzymatique modifiant des lipides et initiée par PIP3 (Canton *et al.*, 2016 ; Bohdanowicz *et al.*, 2013). La présence concomitante de PhA et de PIP3 recrute des activateurs de la **GTPase Rac**, activant le complexe Arp2/3 de la polymérisation de l'actine via WAVE (Bohdanowicz *et al.*, 2013 ; Mylvaganam *et al.*, 2021).

La macropinocytose dépendante d'un facteur de croissance

La macropinocytose dépendante d'un facteur de croissance est **indépendante du Ca^{2+}** et forme de plus grands macropinosomes (Mylvaganam *et al.*, 2021). Les **lymphocytes B et T** sont capables de macropinocytose lors d'une infection par un pathogène (Lin *et al.*, 2020). Les **cellules endothéliales et épithéliales** sont la cible de nombreux pathogènes bactériens et viraux, qui entrent par macropinocytose : virus HIV-1, l'herpès virus de Kaposi ou la bactérie *E.coli K1* dans les cellules endothéliales microvasculaires, *Salmonella typhimurium* dans les cellules Hep-2, echovirus1 dans les cellules Caco-2 (Lin *et al.*, 2020). Les A549 font peu de macropinocytose mais l'infection par *Mycobacterium tuberculosis* ou ses facteurs solubles la déclenche (Lin *et al.*, 2020).

Ce type de macropinocytose est activé par les **récepteurs tyrosine kinase** (RTK) qui transmettent le signal à la **GTPase Ras** qui active à son tour Rac1, PI3K, Arf6 et Rab5 (Swanson, 2008 ; Kami *et al.*, 2020) contrôlant la polymérisation de l'actine ou la fermeture de la coupe (**figure 16**). Des PI3K produisent des domaines riches en PIP3, nécessaire à la fixation de Rac qui va activer le complexe Arp2/3 *via* WAVE pour la polymérisation de l'actine à l'origine de la formation de la coupe macropinocytaire. PIP3 initie également la fermeture de la coupe par recrutement de la PLC γ , phosphorylée et activée par les RTK, produisant le DAG nécessaire au recrutement de la PKC. La PI3K

est requise pour la fermeture de la coupe par polymérisation locale d'actine (Araki *et al.*, 1996 ; Yoshida *et al.*, 2009) définissant ainsi les régions membranaires de formation des macropinosomes (Quinn *et al.*, 2021). La scission est indépendante de la dynamine et serait dépendante de Rac par translocation de CtBP1 (protéine à domaine BAR) vers la coupe (Thottacherry *et al.*, 2019 ; Mylvaganam *et al.*, 2021). Après relargage de la vésicule dans le cytosol, le PIP3 est reconverti en PI(3,4)P2 (King et Ray, 2019).

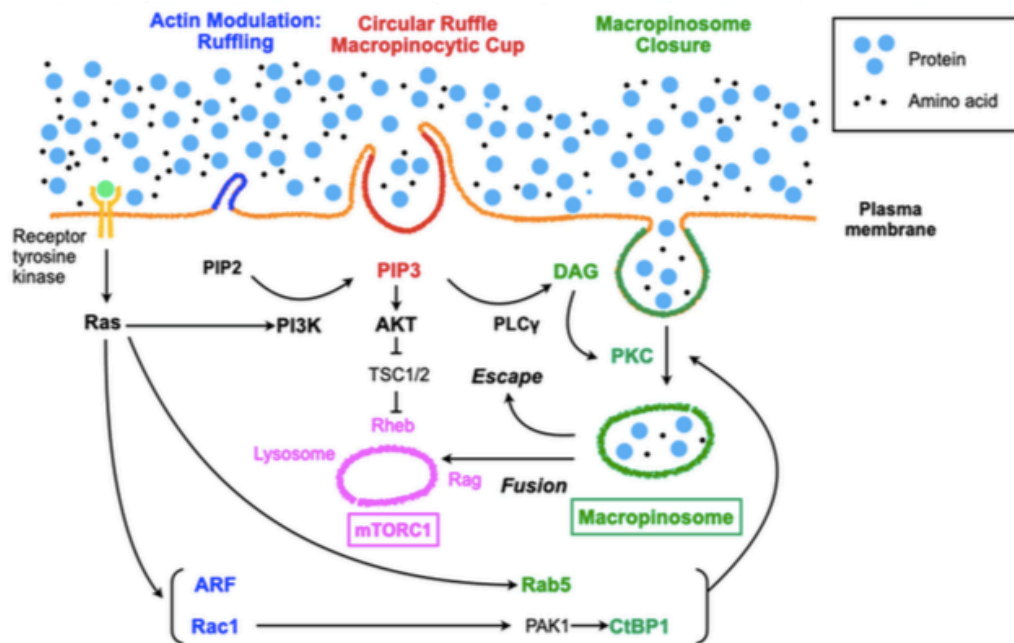


Figure 16. La macropinocytose induite par facteur de croissance. Les étapes de l'endocytose par macropinocytose sont schématisées depuis la formation de protrusions membranaires (bleu), puis la formation de la coupe phagocytaire (rouge) et enfin la fermeture du macropinosome (vert). Les protéines et lipides impliqués à chaque étape sont indiqués. (Kami *et al.*, 2020).

5.3.2. La voie clathrine

L'endocytose dépendante de la clathrine (CME) est la voie d'endocytose la plus étudiée, initialement identifiée pour son implication dans l'entrée de la transferrine (Trf), de la lipoprotéine de faible densité (LDL) et du facteur de croissance épidermique (EGF). La CME est **dépendante de récepteurs membranaires, de la dynamine** et d'un **revêtement en clathrine** du feuillet interne de la membrane plasmique *via* le **complexe adaptateur AP-2**, et produit des vésicules sphériques de **50-100 nm** de diamètre (Kirchhausen *et al.*, 2014 ; Thottacherry *et al.*, 2019). AP-2 interagit avec plus de 20 protéines et contrôle les étapes de l'endocytose (Traub, 2011 ; Kirchhausen *et al.*, 2014).

Plusieurs étapes ont été caractérisées et font intervenir plus de 50 protéines selon un ordre bien spécifique, de façon séquentielle et interconnectée avec la clathrine, le complexe AP-2 ou le PIP2 membranaire (Traub, 2011 ; Kaksonen *et al.*, 2018). On distingue 4 étapes : le revêtement par la

clathrine, l'invagination de la membrane formant les « *clathrin-coated pits* » (CCP), la scission de la membrane et le relargage de vésicules revêtues de clathrine (« *clathrin-coated vesicles* » CCV), puis la perte du revêtement avec libération de la vésicule contenant le cargo (**figure 17**).

L'actine n'est pas obligatoirement nécessaire mais le devient lorsque la tension membranaire ou la taille du cargo empêchent la fermeture de la vésicule (Kirchhausen *et al.*, 2014). On observe également l'existence de larges plaques recouvertes de clathrine, formées lors d'une forte tension membranaire, plus planes et plus grandes que les CCV classiques et nécessitant l'actine ; la dissociation de la clathrine à partir des plaques peut favoriser une CME locale classique (Humphries *et al.*, 2013 ; Kirchhausen *et al.*, 2014). Ces plaques sont aussi présentes dans les microdomaines endosomaux concentrant les protéines ubiquitylées (Humphries *et al.*, 2013). Par ailleurs, la clathrine peut être requise dans une voie moins classique, *via* les adaptateurs non canoniques DAB2 et epsine, où le recrutement de l'actine dépend de la clathrine indépendamment de AP-2, comme observé lors de la CME des bactéries *Listeria monocytogenes* et *E. coli* entéropathogéniques (Humphries *et al.*, 2013 ; Kirchhausen *et al.*, 2014).

5.3.2.1. Assemblage

La première étape consiste en l'assemblage du revêtement de clathrine au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique. Le complexe adaptateur AP-2 est recruté à la membrane plasmique au niveau de **régions enrichies en PIP2** (Kirchhausen *et al.*, 2014 ; Elkin *et al.*, 2016 ; Kaksonen *et al.*, 2018). Il connecte la clathrine au PIP2, puis recrute d'autres protéines adaptatrices AP-2 à la clathrine et/ou au PIP2 (Traub, 2009 ; Kaksonen *et al.*, 2018). L'ensemble forme un réseau de polymérisation locale de la clathrine à la membrane et contribue à sa stabilisation (Kaksonen *et al.*, 2018 ; Thottacherry *et al.*, 2019). Le PIP2 présent dans les membranes depuis l'initiation jusqu'à la scission, est reconnu par AP-2, les protéines adaptatrices d'assemblage, de scission et de désassemblage (Traub, 2011).

La fixation du cargo et l'assemblage du revêtement de clathrine semblent être concomitants et permettent de ne pas endocyter de vésicules vides (Traub, 2009). Les protéines d'assemblage interagissent avec des motifs spécifiques de la queue cytosolique du cargo. Parmi les interactions possibles, AP-2 interagit avec le motif tyrosine du récepteur de la transferrine alors que certaines protéines adaptatrices interagissent avec le motif du récepteur au LDL ou reconnaissent des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation ou l'ubiquitylation (Traub, 2009).

5.3.2.2. Invagination

L'invagination débute rapidement et progresse graduellement, avec la clathrine comme élément central. La clathrine est composée d'une chaîne lourde (190kDa) et d'une chaîne légère (25 kDa). Leur association forme un treillis pour lequel différents degrés de courbure sont observables (Kirchhausen *et al.*, 2014). La membrane forme alors une invagination tapissée appelée « *clathrin coated pits* » (CCP).

Suite à l'augmentation de la tension membranaire, la clathrine ne suffit plus et rend l'endocytose dépendante de l'actine, selon les conditions et types cellulaires (Kirchhausen *et al.*, 2014), régulée par WASP et le complexe Arp2/3, ainsi que par les myosines (Kaksonen *et al.*, 2018). L'invagination est assistée de façon transitoire et localisée par le **cytosquelette d'actine** qui entoure la vésicule en cours de formation, connecté au PIP2 et à la clathrine par les epsines et d'autres protéines adaptatrices (Kaksonen *et al.*, 2018). L'invagination est également assistée par les **protéines à domaine BAR** telles que les endophilines et amphiphysines, qui interagissent avec les lipides membranaires au niveau de zone courbes préférentiellement, AP-2, la dynamine et la lipide phosphatase synaptojanine (Kirchhausen *et al.*, 2014 ; Kaksonen *et al.*, 2018).

5.3.2.3. Scission

La scission des vésicules revêtues de clathrine (CCV) depuis la membrane plasmique est **dépendante de la dynamine**, une large GTPase alors recrutée au niveau des CCP (Thottacherry *et al.*, 2019). La dynamine encercle l'invagination à la base de la membrane et forme un collier hélicoïdal étrangleur qui libère la CCV par hydrolyse du GTP (Kirchhausen *et al.*, 2014). Elle est assistée par le réseau d'actine qui dirige le relargage en intracellulaire puis se dépolymérise aussitôt (Kaksonen *et al.*, 2018 ; Thottacherry *et al.*, 2019). Elle coopère avec les **protéines BAR**, senseurs de courbure membranaire (Kaksonen *et al.*, 2018). En absence de dynamine, certaines protéines BAR peuvent induire une scission en association avec des forces générées par l'actine ou la dynéine, moteur des microtubules (Kaksonen *et al.*, 2018).

5.3.2.4. Perte du revêtement

Une fois libre, la CCV perd son revêtement rapidement. En plus de la clathrine et du complexe AP-2, les CCV contiennent les **protéines de désassemblage** (auxiline et *heat shock cognate protein 70-HSC70*), ou encore une GEF de Rab5 (Kirchhausen *et al.*, 2014 ; Thottacherry *et al.*, 2019). L'auxiline qui fixe la clathrine et les phosphoinositides est recrutée immédiatement après scission d'une CCV (Kirchhausen *et al.*, 2014). Elle recrute et active l'ATPase HSC70 qui démantèle la machinerie d'assemblage par interaction avec la clathrine et dislocation du treillis (Kirchhausen *et al.*, 2014 ; Kaksonen *et al.*, 2018).

La **synaptojanine** déphosphoryle PIP2 en PI4P (Kirchhausen *et al.*, 2014). Elle serait recrutée au sein de domaines courbes par les protéines BAR lors de la scission en même temps que la dynamine (Kirchhausen *et al.*, 2014 ; Kaksonen *et al.*, 2018). Le **PI4P** est un facteur clé précédant la perte de revêtement (Kaksonen *et al.*, 2018), base d'une cascade de phosphorylation/déphosphorylation aboutissant à l'obtention du PI3P caractéristique des vésicules matures précoces (Kaksonen *et al.*, 2018). AP-2 est dissocié des CCV matures relarguées (Traub, 2009). La vésicule nouvellement formée et non revêtue va ensuite pouvoir fusionner avec un endosome précoce (Thottacherry *et al.*, 2019).

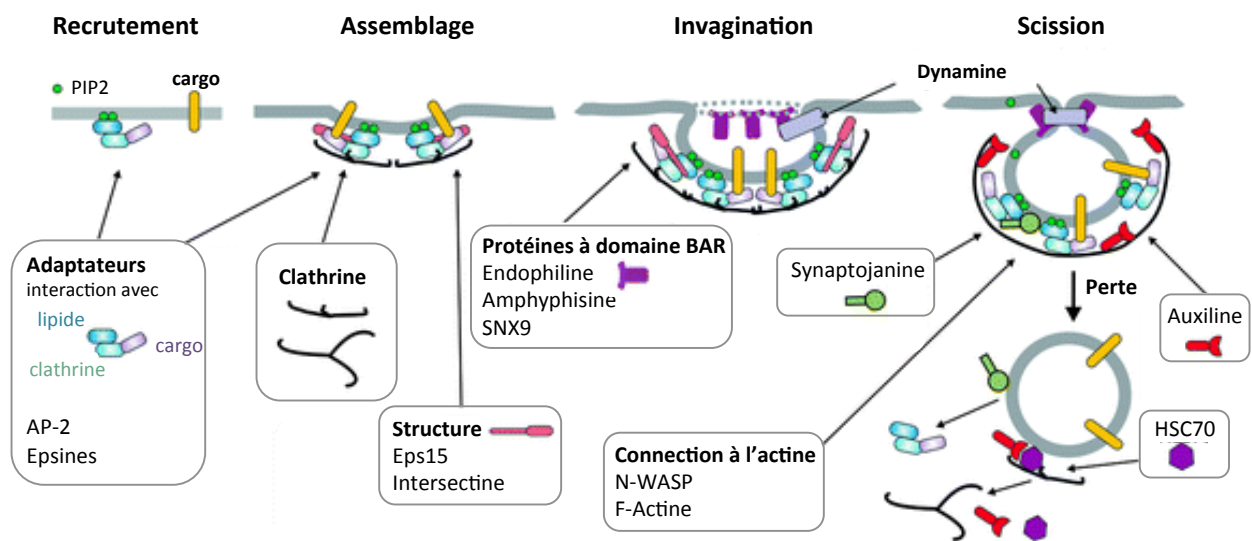


Figure 17. Etapes de l'endocytose par la voie clathrine. *Quatre étapes conduisent à l'endocytose par la voie clathrine. Les acteurs impliqués à chaque étape sont indiqués dans les encadrés. (adapté de Sorkin et al., 2013).*

5.3.3. La voie cavéole

Il s'agit de la seconde voie la plus étudiée, impliquée dans la transcytose endothéliale et la régulation des lipides. Elle est utilisée pour l'internalisation de cholestérol et glycosphingolipides, de protéines ancrées au glycosylphosphatidylinositol (GPI-AP). Elle est également utilisée par certains pathogènes : les toxines cholérique (CTxB) et tétanique, la shiga toxine, des bactéries et certains virus comme le SV40 (Nabi et Le, 2003 ; Pelkmans et Helenius, 2002).

Les cavéoles sont des **radeaux lipidiques** spécialisés contenant des **cavéolines** qui forment des **invaginations flasques** de la membrane plasmique dites « omega » (Pelkmans et Helenius, 2002 ; Nabi et Le, 2003), rondes de **50-100 nm** de diamètre (Kiss, 2012 ; Elkin et al., 2016 ; Matthaues et Taraska, 2021). Les radeaux lipidiques sont des régions membranaires de 10 à 200 nm, de faible densité et très hydrophobes, enrichis en cholestérol et sphingolipides, résistants aux détergents et remodelés par le cytosquelette d'actine (Lajoie et Nabi, 2010). Ils sont retrouvés à la membrane plasmique mais aussi au niveau d'organelles tels que le réticulum endoplasmique, le Golgi, les endosomes et phagosomes (Lajoie et Nabi, 2010). L'apparence, la composition et la fonction des cavéoles varient toutefois en fonction du type cellulaire (Mayor et al., 2014) : une constriction plus restreinte dans les cellules endothéliales, des regroupements linéaires dans les cellules musculaires, ou en grappe dans les cellules épithéliales (Pelkmans et Helenius, 2002). Ils sont présents dans le muscle lisse, les cellules endothéliales, les fibroblastes, les adipocytes et absents des lymphocytes (Lajoie et Nabi, 2010).

A l'heure actuelle aucun cargo n'est entièrement spécifique de cette voie (Matthaeus et Taraska, 2021). SV40 et CTxB ne sont pas internalisés exclusivement par voie cavéole et utiliseraient majoritairement une voie non cavéolaire (Lajoie et Nabi, 2010). La CTxB utilise la voie cavéole jusqu'au Golgi mais peut également suivre une voie radeau lipidique sans cavéoline ou encore la CME (Nabi et Le, 2003). Une internalisation par les radeaux lipidiques n'est donc pas synonyme de voie cavéole puisque certains ligands sont dépendants des radeaux, indépendants de la clathrine dans des cellules sans cavéoles (Pelkmans et Helenius, 2002).

Le mécanisme d'endocytose par voie cavéole est décrit ci-dessous et illustré dans la **Figure 18**.

5.3.3.1. Composition et assemblage des cavéoles

Les cavéoles sont constituées de **cavéoline, de cavines, de protéines BAR (syndapin/Pacsin2) et de l'ATPase EHD2** (Matthaeus et Taraska, 2021). Les cavéoles sont dynamiques et capable de mouvement latéral au sein de la membrane tout comme les radeaux lipidiques.

Les cavéolines sont des protéines transmembranaires aux extrémités cytosoliques, la plus commune étant la cavéoline-1 (Pelkmans et Helenius, 2002). L'appareil de Golgi assemble les cavéoline-1 et 2 avec le cholestérol et émet des vésicules exocytaires cavéolaires qui vont fusionner avec les radeaux lipidiques membranaires pour former les cavéoles, contenant environ 140 cavéolines-1 et 30 à 70 cavéolines-2 (Lajoie et Nabi, 2010 ; Kiss, 2012 ; Thottacherry *et al.*, 2019). Cependant, les cavéolines, nécessaires mais non suffisantes, requièrent la présence de protéines cytosoliques solubles, les **cavines**, qui viennent fixer les cavéoles et aident à stabiliser l'invagination (Pelkmans et Helenius, 2002 ; Kiss, 2012). Les cavines s'oligomérisent et englobent l'invagination du revêtement de cavéoline (Matthaeus et Taraska, 2021). L'actine stabilise les cavéoles par fixation à la cavéoline-1 (Lajoie et Nabi, 2010).

5.3.3.2. Invagination

La **protéine EDH2** est un régulateur négatif d'endocytose situé à la base de la vésicule en formation, établissant le contact entre cavéole et cytosquelette d'actine (Mayor *et al.*, 2014). La **protéine BAR Pacsin2** qui interagit avec EHD2 et la cavéoline-1, module localement la courbure membranaire enserrant la base d'un anneau (Mayor *et al.*, 2014 ; Matthaeus et Taraska, 2021). Ces protéines participent à la déformation de la membrane et stabilisent l'invagination cavéolaire limitant leur mobilité et l'endocytose (Matthaeus et Taraska, 2021).

Les cavéoles sont globalement statiques, ancrées au cytosquelette d'actine, et la formation de vésicules dépend de signaux spécifiques suite au **contact avec un ligand** (Pelkmans et Helenius, 2002). La fixation de ligands, la réticulation de composants cavéolaires, l'accumulation de récepteurs peuvent déclencher l'internalisation (Kiss, 2012). La **phosphorylation des cavéolines** est initiatrice de l'endocytose où la tyrosine kinase Src phosphoryle la cavéoline-1, provoquant son désassemblage de la

membrane, la formation de vésicules puis l'internalisation des cavéoles (Pelkmans et Helenius, 2002 ; Nabi et Le, 2003 ; Kiss, 2012 ; Matthaeus et Taraska, 2021). La tyrosine kinase Abl phosphoryle également la cavéoline-1 en réponse au stress (oxydatif ou tension) (Matthaeus et Taraska, 2021).

5.3.3.3. Scission et trafic intracellulaire

La **dynamine** est requise pour la scission de la vésicule en cours de formation, recrutée de façon transitoire au niveau de la base des vésicules en formation pour donner naissance à une vésicule revêtue de cavéolines (Pelkmans et Helenius, 2002 ; Nabi et Le, 2003). Elle se fixe sur les zones contraintes par EHD2 et Pacsin2, et agit en hydrolysant du GTP (Matthaeus et Taraska, 2021). **L'actine** joue un rôle central par sa capacité à dépolymériser et repolymériser localement pour permettre l'endocytose, contrairement à la CME où l'actine favorise l'internalisation mais n'est pas strictement nécessaire (Pelkmans et Helenius, 2002).

Les vésicules post-scission peuvent suivre la **voie endolysosomale classique** (exemple de CTxB) où cavéolines-1, cavines et marqueurs endosomaux sont co-exprimés (Mayor *et al.*, 2014 ; Matthaeus et Taraska, 2021). Cependant les domaines membranaires de vésicules issues de l'endocytose cavéolaire ne se mélangent pas avec celles de l'endosome précoce et peuvent parfois s'en réextraire pour former de nouvelles vésicules (Kiss, 2012).

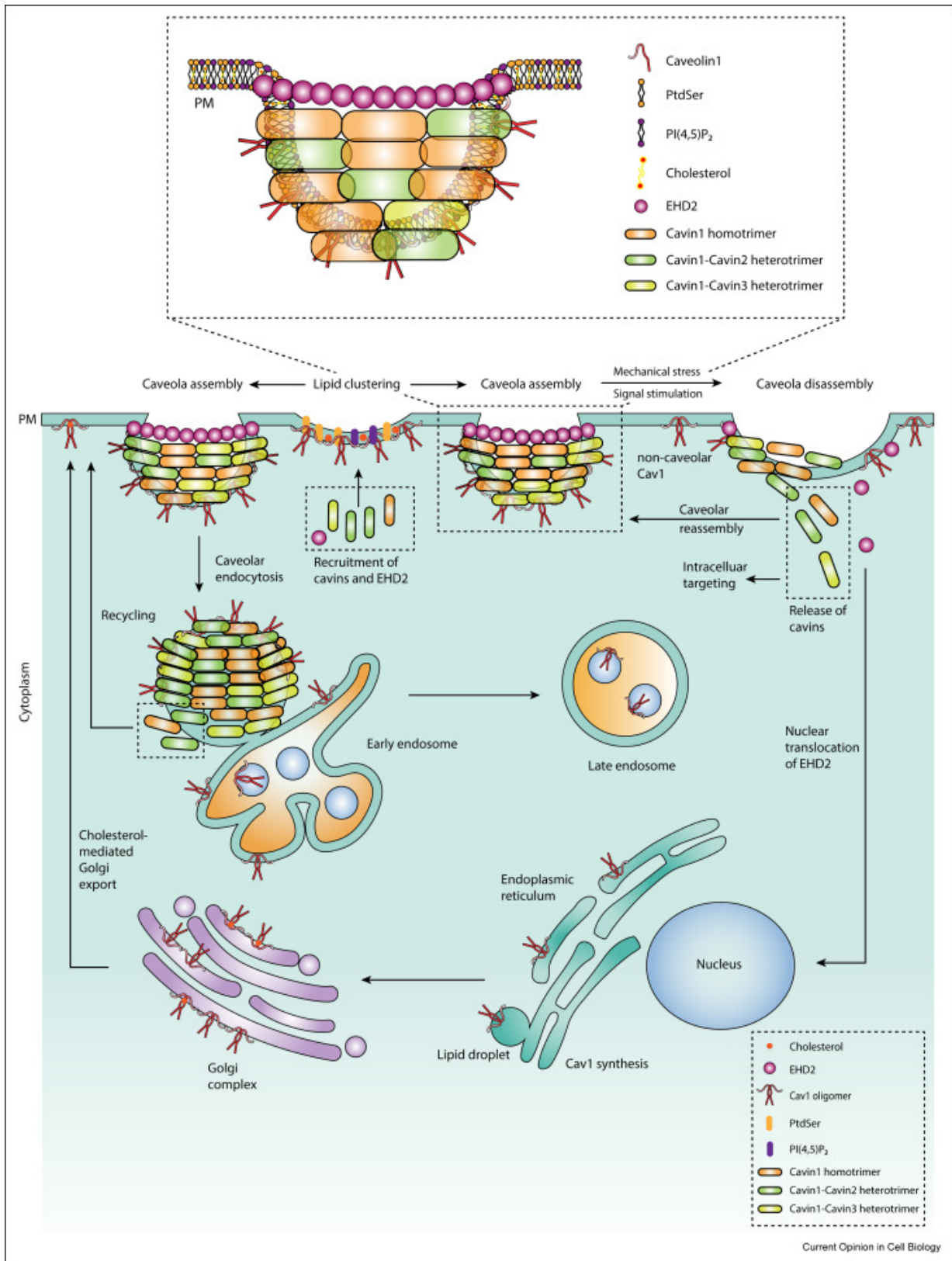


Figure 18. Mécanisme de l'endocytose par la voie cavéole. Les étapes de formation des cavéoles à la membrane plasmique par assemblage de cavéoline-1 et de cavines sont décrites (Parton et al., 2020).

5.3.4. Les voies indépendantes de la clathrine et cavéoline

L'endocytose peut être indépendante de la clathrine et de la cavéoline. La plupart est nommée endocytose **dépendante de radeaux lipidiques**, sensible à la déplétion en cholestérol (Lajoie et Nabi, 2010). En absence de revêtement, l'accumulation spécifique de lipides ou de protéines ancrés à la membrane peut déformer la membrane et provoquer l'endocytose sans dynamine. L'endocytose indépendante de la dynamine est notamment observée lors de la fixation des glycosphingolipides par la Shiga toxine (Johannes et Mayor, 2010). On classifie ces voies selon plusieurs critères : leur dépendance à la dynamine, l'implication des GTPases et celle de protéines particulières (Arf6, flotilline, Cdc42, RhoA, Rac1). Les vésicules associées après internalisation peuvent suivre différentes voies : adressage vers les endosomes tardifs/lysosomes, le recyclage à la membrane ou alors être dirigées vers le Golgi.

L'existence de ces voies en tant que processus distinct ou variations de la même voie n'est pas encore définie (Elkin *et al.*, 2016), et certains cargos sont retrouvés dans plusieurs de ces voies comme le CD59 (GPI-anchored protein) dans les voies CLIC/GEEC et flotilline, ou CD44 dans les voies Arf6 et CLIC/GEEC.

5.3.4.1. Les voies dépendantes de la dynamine

La voie Fast endophilin-A (FEME)

Cette voie est impliquée dans la signalisation par les facteurs de croissance et la migration cellulaire (Boucrot *et al.*, 2015). Elle est utilisée par la Shiga toxine, la CTxB et le récepteur à l'IL-2.

Elle est à l'origine de compartiments tubulovésiculaires (inférieur à 1 µm) endophilin-A positifs de façon **dépendante de l'actine**, de la dynamine et de la fixation d'un ligand pour **l'activation d'un récepteur** (Boucrot *et al.*, 2015 ; Thottacherry *et al.*, 2019). Une PI3K produit du PIP3 par phosphorylation de PIP2 lors de l'activation du récepteur, qui est ensuite déphosphorylé en **PI(3,4)P2** qui est détecté par la lamellipodine, recrutant ainsi l'**endophilin** au niveau de l'extrémité motrice. Le recrutement est réduit par l'activité de la synaptojanine qui déphosphoryle le PIP2 (Boucrot *et al.*, 2015). Cdc42 contribue en recrutant 2 protéines BAR qui recrutent à leur tour une phosphatase pour produire du PIP2 et la lamellipodine pour l'enrichissement en endophilin (Shafaq-Zadah *et al.*, 2020). L'endophilin fixe le récepteur du cargo, et étant une protéine à domaine BAR, elle induit la courbure membranaire. La scission est induite par l'insertion de plusieurs hélices amphipathiques de l'endophilin et le recrutement de la dynamine (Thottacherry *et al.*, 2019 ; Shafaq-Zadah *et al.*, 2020).

L'endocytose du récepteur à l'IL-2 dépendante de RhoA

Cette voie, utilisée par différentes cytokines (interleukines 2, 4, 7, 9, 15, 21), est dépendante de la dynamine, sensible au cholestérol. Elle nécessite l'actine *via* l'activation en cascade de RhoA, Rac1,

Pak1, N-WASP et Arp2/3. Les récepteurs s'accumulent dans les radeaux lipidiques (Mayor *et al.*, 2014).

L'endocytose du récepteur EGFR

Ce mécanisme d'entrée est sensible au cholestérol par association des récepteurs à l'EGF dans les radeaux lipidiques ; RhoA et N-WASP agissent comme régulateurs négatifs et l'implication de la dynamine est controversée (Mayor *et al.*, 2014). Cette voie est empruntée en présence de fortes doses d'EGF. Cependant, son utilisation dépend de la concentration en EGF : à faible dose, la voie CME est utilisée, à forte dose la voie CIE est privilégiée et la macropinocytose est employée en présence de plus hautes doses d'EGF (Mayor *et al.*, 2014 ; Boucrot *et al.*, 2015).

5.3.4.2. Les voies indépendantes de la dynamine

La voie CLIC/GEEC

Cette voie est constitutive, indépendante de la dynamine, de la clathrine et la cavéoline, **dépendante de l'actine** et implique la petite GTPases **Cdc42** (Elkin *et al.*, 2016 ; Shafaq-Adah *et al.*, 2020). L'endocytose débute par recrutement de GBF1 (*goli-specific brefeldin A resistance factor 1*), qui, par une cascade d'activations impliquant Cdc42 conduit à la polymérisation de l'actine *via* Arp2/3 pour l'invagination (Mayor *et al.*, 2014 ; Thottacherry *et al.*, 2019) et la scission de la vésicule (Thottacherry *et al.*, 2019). La protéine à domaine BAR GRAF1 colocalise avec Cdc42 et pourrait induire la courbure de la membrane et participer à la scission en association avec l'actine (Mayor *et al.*, 2014). Cette voie internalise des fluides, les GPI-AP et plusieurs cargos, dont des toxines protéiques qui fixent les glycolipides (exemple de CTxB qui fixe le ganglioside GM1), des protéines transmembranaires telles que CD44 (Sandvig *et al.*, 2018 ; Thottacherry *et al.*, 2019 ; Shafaq-Adah *et al.*, 2020).

Les vésicules libérées depuis la membrane sont non revêtues de protéines, de grande capacité et contiennent les GPI-AP membranaires et en grande partie des fluides extracellulaires. Elles assurent un recyclage membranaire rapide (Mayor *et al.*, 2014). Ces vésicules, appelées « **clathrin-indépendant carriers** » (CLIC), fusionnent pour former des **endosomes précoces spécialisés** appelés « **GPI-AP enriched endosomal compartments** » (GEEC) (Mayor *et al.*, 2014). Suite à leur scission, 50% est recyclé à la membrane et le reste fusionne pour former les GEEC qui s'acidifient et acquièrent les marqueurs typiques des endosomes précoces classiques (PI3P, Rab5, EEA1) (Mayor *et al.*, 2014). Ils fusionneront ensuite avec les endosomes précoces classiques de façon dépendante de Rab5 et de la PI3K (Thottacherry *et al.*, 2019). Ces vésicules sont hautement acides et leur pH est régulé à la baisse par les inhibiteurs des ATPases vacuolaires, et elles sont sensibles aux changements de températures contrairement à la CME (Thottacherry *et al.*, 2019).

L'endocytose associée à la petite GTPase Arf6

Cette voie est indépendante de la dynamine et de la clathrine mais **dépendante du cholestérol** (Thottacherry *et al.*, 2019). Elle est utilisée lors de l'entrée de protéines impliquées dans l'interaction avec la matrice, le transport de nutriments, la fonction immune (CMHI) et des GPI-AP (Mayor *et al.*, 2014 ; Thottacherry *et al.*, 2019). Arf6, présente en surface cellulaire, régule l'internalisation selon des cycles d'activation et inactivation : l'activation de la phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase pour produire **PIP2** stimule l'assemblage de l'actine nécessaire à l'endocytose (Thottacherry *et al.*, 2019). Arf6 doit être inactivée après endocytose au risque de séquestrer le cargo dans des vacuoles de PIP2 ; l'endocytose est accompagnée d'une perte de PIP2 et acquisition des marqueurs endosomaux précoces Rab5 et PI3P (Mayor *et al.*, 2014).

L'endocytose assistée par les flotillines

Cette voie est indépendante de la dynamine. Elle internalise des fluides extracellulaires et elle est utilisée par GPI-AP et CTxB dans les cellules HeLa (Mayor *et al.*, 2014 ; Thottacherry *et al.*, 2019). L'internalisation serait initiée par **phosphorylation de la flotilline** par une tyrosine kinase. Les flotillines sont des protéines ancrées à la membrane créant des courbures induisant une invagination dose-dépendante (Mayor *et al.*, 2014 ; Elkin *et al.*, 2016). Leur présence préviendrait une endocytose précoce des récepteurs membranaires ou participerait au regroupement en vue de l'endocytose (Sandvig *et al.*, 2018).

L'endocytose massive

Il s'agit d'une endocytose **indépendante de l'actine** et de la dynamine. Elle est induite par le **calcium intracellulaire** et suite à diverses atteintes membranaires par des agents de perturbation de la membrane, ou par l'activation de sphingomyélinases acides en surface cellulaire. L'endocytose massive internalise préférentiellement les domaines organisés de la membrane plasmique (Thottacherry *et al.*, 2019).

5.4. Entrée des toxines

5.4.1. Toxines AB et modèle d'endocytose

Les toxines bactériennes formant des pores (TFP) sont classées en fonction de leur structure (hélice α ou feuillet β). Elles sont sécrétées sous forme soluble capable de se lier à la surface cellulaire en fixant des protéines membranaires, des protéines ancrées à des lipides ou encore des lipides. Ces récepteurs se regroupent et les toxines s'oligomérisent en une structure amphipatique permettant leur insertion transmembranaire pour former un pore (Gonzalez *et al.*, 2008).

Les **toxines de *B. anthracis*** s'apparentent aux toxines TFP de type β , et appartiennent à la famille de toxines de **type AB**, où la partie B fixant la cellule est requise pour l'endocytose puis la translocation dans le cytosol de la partie A portant l'activité enzymatique. Si les TFP sont aptes à s'insérer dans la membrane plasmique, les toxines AB attendent de transiter par la voie endocytaire pour l'insertion de la partie B dans la membrane endosomale provoquant une translocation de la partie A depuis l'intérieur de la cellule (Barth *et al.*, 2004 ; Gonzalez *et al.*, 2008). On retrouve notamment parmi les toxines AB : les toxines de *V. cholerae*, *C. botulinum*, *C. tetani*, *B. pertussis*, l'exotoxine A de *P. aeruginosa*, la shiga toxine, ou encore la toxine diphtérique (Barth *et al.*, 2004 ; Gonzalez *et al.*, 2008).

Les toxines de *B. anthracis* résultent de **l'association binaire de 3 composants**. Le composant commun PA est capable de fixer soit le facteur oedémateux EF pour former la toxine oedémateuse ET, soit le facteur léthal LF pour former la toxine létale LT.

Le **mécanisme d'entrée des toxines** dans la cellule hôte est bien décrit. L'endocytose des facteurs enzymatiques dépend de l'heptamère de PA où chacun des domaines structuraux de PA assure une fonction spécifique vers la formation d'un pore permettant la translocation des facteurs dans le cytosol. Ainsi, PA subit une succession de modifications (clivage, oligomérisation, formation d'un pore) pour le relargage de EF et LF dans le cytosol. Un large panel de tissus et cellules possède à leur surface des récepteurs présentant une forte affinité pour PA, les principaux récepteurs connus étant TEM8 et CMG2. PA83 est clivé par la furine, libérant PA20. Le PA63 résiduel fixé au récepteur va ensuite s'heptamériser ou s'octamériser afin de former un pré-pore. Les facteurs EF et LF circulants vont fixer le pré-pore *via* leur domaine de fixation à PA. Le complexe est endocyté, localisé dans un endosome dont le pH va s'acidifier avec la maturation, permettant au facteur de transloquer vers le cytosol à travers le pore de PA nouvellement formé. Une fois dans le compartiment cytosolique, chaque toxine peut exercer son activité.

Ces changements constituent des étapes clés du processus endocytaire. Les mécanismes mis en jeu pour que les facteurs puissent exercer leur activité enzymatique sont décrits dans les paragraphes suivants.

5.4.2. Etape 1 : la fixation au récepteur

Le **domaine 4 de PA**, excentré par rapport aux autres, contient le **site de fixation au récepteur** qui présente un repliement de type immunoglobuline, et assure la stabilisation de l'interaction (Singh *et al.*, 1991 ; Petosa *et al.*, 1997 ; Varughese *et al.*, 1999). L'interaction PA/récepteur contribue à stabiliser le pré-pore à pH neutre et évite une conversion prématurée en pore à la surface cellulaire (Lacy *et al.*, 2004 ; Santelli *et al.*, 2004). Si le domaine 4 est le seul élément en contact avec TEM8, l'interaction

avec CMG2 est renforcée par une interaction supplémentaire au niveau du domaine 2 de PA (Lacy *et al.*, 2004 ; Scobie *et al.*, 2006).

L'existence d'un récepteur protéique spécifique, de forte affinité pour PA et saturable est démontrée en 1991 par les travaux de Escuyer *et al.* PA reconnaît **deux récepteurs membranaires** : **TEM8** et **CMG2** (Bradley *et al.*, 2001 ; Scobie *et al.*, 2003). Ils contiennent un domaine extracellulaire von Willebrand type A (VWA), une région transmembranaire et une queue cytoplasmique (Bradley *et al.*, 2001 ; Scobie *et al.*, 2003). Présents sur de nombreux types cellulaires et tissulaires des voies d'infection par *B. anthracis*, leur distribution et leur expression dépendent du type et de la lignée cellulaire ou encore du pôle pour les cellules polarisées (Beauregard *et al.*, 1999 ; Bradley *et al.*, 2001 et 2003 ; Bonucelli *et al.*, 2005).

Leur **domaine VWA** est capable de fixer PA, et possède une fonction antitoxine sous forme soluble (Bradley *et al.*, 2001 et 2003 ; Scobie *et al.*, 2003). Domaine conservé présent dans les protéines extracellulaires et de surface (intégrines, collagènes, composants du complément), il assure les interactions entre protéines, avec la matrice extracellulaire ou encore participe à l'adhésion cellulaire. Le domaine VWA possède un site conservé d'adhésion dépendant d'ion métallique (MIDAS) qui interagit avec l'acide aspartique 683 situé dans une boucle exposée du domaine 4 de PA (Scobie *et al.*, 2006) : les ions Mn^{2+} et Mg^{2+} sont importants pour la fixation PA/TEM8, tandis que l'ion Ca^{2+} , non impliqué avec TEM8, prédomine pour CMG2 (Bradley *et al.*, 2001 et 2003 ; Scobie *et al.*, 2003 ; Lacy *et al.*, 2004).

Le récepteur **CMG-2 est le récepteur dominant** majoritairement responsable de la pathogénicité de *B. anthracis* lors de challenges sur souris et rats, le récepteur TEM-8 assurant un rôle mineur (Liu *et al.*, 2009 et 2013, Scobie *et al.*, 2006). L'affinité de CMG2 pour PA est 11 fois supérieure à celle de TEM8 (Liu *et al.*, 2009). *In vivo*, CMG2 est requis pour l'intoxication du cœur et du foie, tandis que TEM8 est requis pour le rein et la rate (Merritt *et al.*, 2022). L'absence des 2 récepteurs empêche l'intoxication de tous les tissus. Au sein des cellules immunes, bien que l'intoxication des leucocytes soit peu efficace avec seulement 2% de cellules intoxiquées, CMG2 prédomine ainsi que pour les lymphocytes B et T, les neutrophiles et les cellules dendritiques ; les monocytes utilisent aussi bien TEM8 que CMG2 (Merritt *et al.*, 2022).

L'**intégrine $\beta 1$** a été identifiée au sein de macrophages comme récepteur alternatif de faible affinité pour PA lors de l'exposition à de faibles doses de LF (Martchenko *et al.*, 2010). Complexée à l'intégrine $\alpha 4$ ou $\alpha 5$ possédant le domaine VWA, elle fixe PA et induit son entrée dans la cellule. Elle modulerait la virulence lorsque le récepteur CMG2 est employé (Martchenko *et al.*, 2010), sans être impliquée dans la létalité *in vivo* même en tant que récepteur mineur (Liu *et al.*, 2013).

5.4.3. Etape 2 : le site de clivage à la furine et domaine de fixation des facteurs

Le **domaine 1**, localisé en N-terminal de PA, comporte un **site de clivage par la furine** qui conduit au relargage de PA20 et PA63 conservant le domaine 1' résiduel du clivage (Petosa *et al.*, 1997 ; **figure 6**). Ce site en position 164 à 167 (Arg-Lys-Lys-Arg) est reconnu par la furine, une sérine protéase calcium-dépendante active entre pH 6 et 8,5 (Molloy *et al.*, 1992 ; Klimpel *et al.*, 1992). D'autres protéases de la famille des furines (PC1, PC7 et PACE4) ou encore de faibles concentrations de trypsine peuvent assurer cette fonction (Friedman *et al.*, 1995 ; Gordon *et al.* 1997 ; Klimpel *et al.*, 1992 ; Chekanov *et al.*, 2005). Le clivage peut avoir lieu en surface cellulaire après fixation au récepteur (Novak *et al.*, 1992) ; ainsi que dans le sérum avant fixation, puisque l'on retrouve dans le sang des animaux infectés PA63 complexé à EF ou LF, mais très peu de PA83 (Ezzel et Abshire, 1992 ; Panchal *et al.*, 2005).

Le **clivage et le relargage de PA20** sont nécessaires à la virulence *in vitro* et *in vivo* (Singh *et al.*, 1989 ; Klimpel *et al.*, 1992). Le clivage est requis pour l'heptamérisation de PA63 et pour l'endocytose qui s'ensuit (Milne *et al.*, 1994 ; Beauregard *et al.*, 2000). Le relargage de PA20 expose sur PA63 une large surface hydrophobe, le **domaine 1'**, pour la **fixation des facteurs** (Petosa *et al.*, 1997 ; Little *et al.*, 1996).

5.4.4. Etape 3 : le domaine d'oligomérisation

L'heptamérisation de PA63 est permise par interaction et **superposition des domaines 1'**, expliquant la nécessité du clivage préalable de PA83 par la furine, pour éviter l'encombrement stérique de PA20 (Petosa *et al.*, 1997). L'oligomérisation nécessaire à la formation du pré-pore est ensuite assurée par le **domaine 2** (Petosa *et al.*, 1997) assisté en partie par le **domaine 3** (Mogridge *et al.*, 2001) (**figure 6**). Cependant, il a été décrit que des heptamères composés de 1 à 2 PA83 parmi les PA63, où la fixation de EF et LF resterait possible, sont retrouvés en intracellulaire (Chekanov *et al.*, 2005).

L'heptamérisation de PA63 a été mise en évidence par microscopie électronique par Milne *et al.* en 1994, à partir de PA63 purifié en solution (**figure 19A**). Sa formation peut avoir lieu *in vitro* et *in vivo*. Des dimères ou association de dimères constituent une étape dans la formation d'oligomères complets (Milne *et al.*, 1994 ; Kintzer *et al.*, 2009). L'**heptamère** ou pré-pore forme une structure en anneau (**figure 19B**) de 160 Å de diamètre et 85 Å de haut, chargée négativement (Petosa *et al.*, 1997). Les domaines 1' et 2 sont retrouvés à l'intérieur de l'anneau tandis que les domaines 3 et 4 sont exposés vers l'extérieur. Le complexe pré-pore/récepteur a donc pour chaque monomère PA63, le domaine 1' en extracellulaire, le domaine 4 et une partie du domaine 2 vers la membrane (Petosa *et al.*, 1997). Le pré-pore peut aussi être un **octamère** de PA dont le diamètre est 10% plus large que l'heptamère (Kintzer *et al.*, 2009).

Les deux oligomères sont présents dans le plasma ou en surface cellulaire, complexés ou non avec les facteurs EF ou LF (Kintzer *et al.*, 2009). Chaque dimère est capable de fixer un facteur, soit 4 au total pour l'octamère et 3 pour l'heptamère (Mogridge *et al.*, 2002 ; Kintzer *et al.*, 2009). La différence entre les 2 oligomères réside dans la capacité de l'octamère à maintenir sa solubilité en solution, à persister en conditions acides (pH 5.7) et à présenter une stabilité en conditions physiologiques alors que l'heptamère s'agrège (Kintzer *et al.*, 2009). Ainsi, l'octamère est prépondérant dans le plasma et plus à même de propager l'intoxication à travers la circulation sanguine (Kintzer *et al.*, 2010 ; Bann, 2012). L'heptamère, stabilisé par la fixation au récepteur en surface cellulaire (Lacy *et al.*, 2004 ; Santelli *et al.*, 2004), peut être retrouvé dans le plasma des animaux infectés (Panchal *et al.*, 2005).

L'heptamère existe sous 2 conformations dans la cellule en fonction du pH (Milne *et al.*, 1994) :

- le pré-pore : une forme « fermée » à pH neutre ou basique, sensible au SDS et extracellulaire
- le pore : une forme « ouverte » à pH acide, résistante au SDS et présente en intracellulaire.

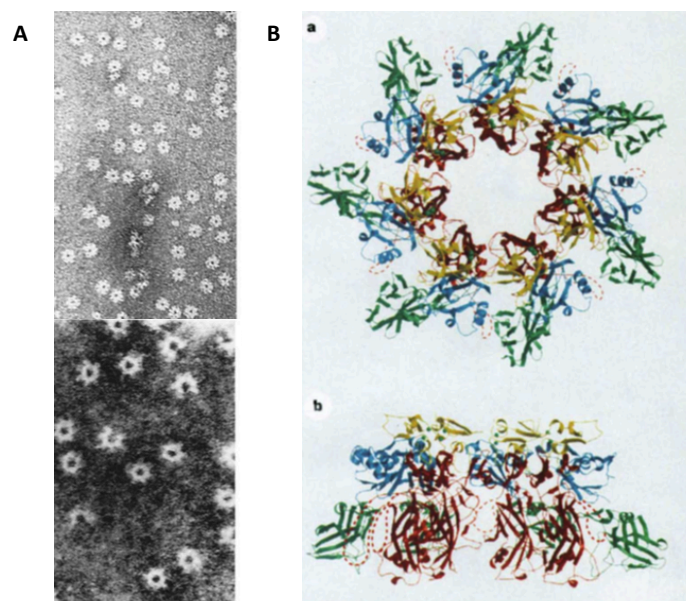


Figure 19. Heptamère de PA, le pré-pore. A. Oligomères en solution observé par microscopie électronique (Milne *et al.*, 1994). B. Représentation structurelle du pré-pore. (A) vue axiale (B) vue de côté où 3 monomères ont été enlevés afin de révéler la structure interne. (Petosa *et al.*, 1997).

5.4.5. Etape 4 : Le domaine d'insertion membranaire et de formation du pore

L'heptamère est soluble à pH neutre ou basique et son insertion membranaire est dépendante d'un pH acide, menant à la formation d'un tonneau β traversant la membrane, le pore (Petosa *et al.*, 1997). La

diminution du pH n'est cependant requise que pour l'insertion membranaire et non pour l'activité du pore (Milne et Collier, 1993).

Conversion structurelle

Le changement de conformation de la forme pré-pore vers le pore est causé par une réorganisation structurale du **domaine 2** permettant son **insertion dans la membrane**. Le domaine 2 contient notamment 4 feuillets β formant un motif dit « clé grecque » et une large boucle flexible (302-325) exposée en dehors de l'heptamère (Petosa *et al.*, 1997). La **diminution du pH** entraîne un changement conformationnel à l'origine du dépliement de la « clé grecque » permettant l'insertion de la boucle dans la membrane cellulaire (Petosa *et al.*, 1997 ; Miller *et al.*, 1999) (**figure 20**). L'acidification entraîne une **dissociation partielle entre le récepteur et le pré-pore** (Rainey *et al.*, 2005 ; Wimalasena *et al.*, 2010) au niveau du domaine 2 (Santelli *et al.*, 2004 ; Bann, 2012 ; Scobie *et al.*, 2007) et du domaine 4, ceci permettant de conserver une fixation au récepteur à pH faible (Williams *et al.*, 2009) et de laisser l'espace nécessaire à l'insertion membranaire (Santelli *et al.*, 2004). La partie transmembranaire forme un tonneau composé de 14 feuillets β où alternent les résidus polaires hydrophiles côté lumière et les résidus apolaires hydrophobes côté membrane (Petosa *et al.*, 1997 ; Benson *et al.*, 1998 ; Nassi *et al.*, 2002). Il est critique dans la capacité à transloquer (Miller *et al.*, 1999) pour laquelle la plupart des résidus de la lumière sont impliqués (Mourez *et al.*, 2003).

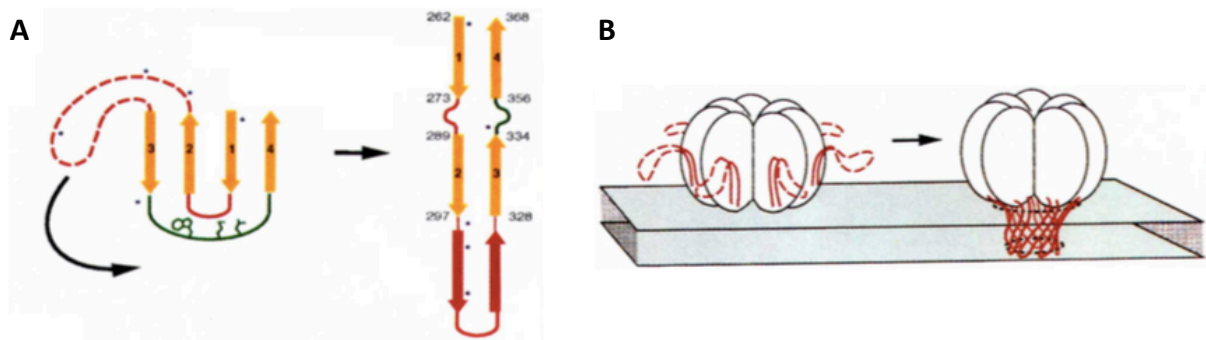


Figure 20. Modèle d'insertion membranaire pour la formation du pore. (A) Changement structurel du motif clé grecque (jaune) pour la formation d'une tête d'épingle. La boucle flexible est en rouge et les résidus désorganisés par le pH en vert. (B) L'association des 7 têtes d'épingle (rouge) forme un tonneau β inséré dans la membrane (Petosa *et al.*, 1997).

Dépendance au pH et au récepteur impliqué

La formation du pore a été observée en milieu acide en bicouches lipidiques (Blaustein *et al.*, 1989) et en liposomes, où l'augmentation d'hydrophobicité des acides aminés de PA63 concorde avec l'insertion membranaire (Koehler et Collier, 1991). La capacité à former des pores en milieu acide (pH 4-5 et non à

pH 7) et à transloquer EF est aussi démontrée *in vitro* sur cellules CHO-K1, RAW264.7, J774A.1, HeLa et Vero (Milne et Collier, 1993 ; Rainey *et al.*, 2005 ; Gordon *et al.*, 1988 ; Wesche *et al.*, 1998).

Le seuil de pH nécessaire à la conversion varie selon la fixation ou non à un récepteur et de son identité (Miller *et al.*, 1999 ; Lacy *et al.*, 2004). En solution, le pH est supérieur d'au moins 1 unité (pH 7-7,5) à celui requis en présence d'un récepteur (Miller *et al.*, 1999 ; Lacy *et al.*, 2004 ; Rainey *et al.*, 2005). La formation de pores a lieu à **pH 6,4 avec TEM8** et **pH 5,2 avec CMG2** (Rainey *et al.*, 2005). Cette différence de pH serait due à l'interaction supplémentaire de CMG2 avec le domaine 2 (Santelli *et al.*, 2004 ; Lacy *et al.*, 2004 ; Nassi *et al.*, 2002). La fixation au récepteur contrôle le moment de formation du pore et évite une formation prématurée à pH physiologique, « attendant » de rencontrer un milieu acide (Lacy *et al.*, 2004 ; Rainey *et al.*, 2005). Ainsi selon la lignée cellulaire et les récepteurs exprimés, la formation du pore et la translocation peuvent avoir lieu à différentes étapes de la maturation des endosomes : en endosomes tardifs (pH 5.2) pour les RAW264.7 et CHO-K1 exprimant CMG2, et en endosomes précoces (pH 6) pour les HeLa exprimant TEM8 (Rainey *et al.*, 2005).

5.4.6. Etape 5 : le pore

Le pore forme un **canal ion-conducteur, cation sélectif, dépendant du pH et du voltage** au sein de bicouches phospholipidiques et de membranes cellulaires (Blaustein *et al.*, 1989 ; Koehler et Collier, 1991 ; Milne et Collier, 1993) et n'est pas réversible par réexposition dans un milieu basique (Miller *et al.*, 1999).

Le pore est composé de 2 domaines (**figure 21**) : un domaine large de 75 Å par 160 Å de diamètre où sont fixés les facteurs, et un tonneau transmembranaire de 105 Å dont 30 Å transmembranaires pour 27 Å de diamètre maximum (Jiang *et al.*, 2015) soutenu par les récepteurs (Santelli *et al.*, 2004). La lumière du tonneau est chargée négativement et majoritairement hydrophile, ce qui permet le passage de cations et de polypeptides respectivement. Son diamètre interne varie et impose des contraintes structurelles (Jiang *et al.*, 2015). Capable d'accueillir en partie supérieure les structures protéiques secondaires, un goulet d'étranglement (Phi-clamp) de 6 Å imperméable ne laisse passer que les structures complètement dépliées. Le tonneau s'élargit modérément après le Phi-Clamp.

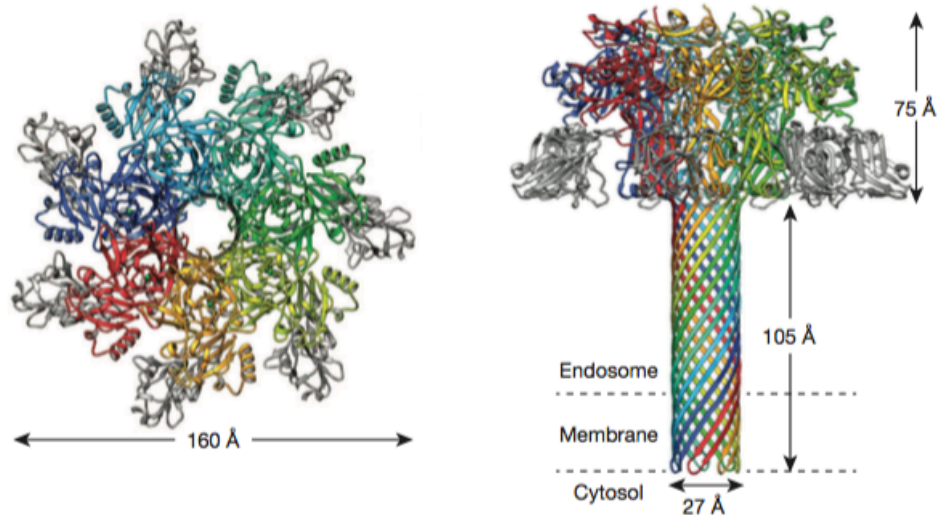


Figure 21. Structure du pore. (Gauche) vue du dessus (Droite) vue de profil. Chaque couleur correspond à un monomère, excepté le domaine 4 qui est représenté en gris (Jiang et al., 2015).

5.4.7. La translocation endosomale

Le **Phi-clamp** est une structure clé dans la lumière du pore issue de la convergence en condition acide des phénylalanines en position 427 de chaque monomère, créant un œillette hydrophobe (Krantz et al., 2005). Il établit des interactions hydrophobes non spécifiques et avec des cations (Krantz et al., 2005). Son intégrité est critique pour la translocation (Sellman et al., 2001b ; Mourez et al., 2003 ; Janowiak et al., 2009). Il forme un anneau imperméable autour de la chaîne polypeptidique EF ou LF transloquée (Krantz et al., 2005 et 2006) bloquant alors également le passage d'ions par encombrement du Phi-clamp.

La structure du pore n'est pas apte à accueillir un facteur EF ou LF natif, bien trop volumineux (Wesche et al., 1998). Différentes études structurales ont mis en évidence un processus de **déplieurement-repliement** de part et d'autre du Phi-clamp lors de la translocation des facteurs, et notamment lors de leur insertion (Feld et al., 2010 ; Hardenbrook et al., 2020 ; Machen et al., 2021).

Le mécanisme impliqué dans la translocation des facteurs EF et LF à travers le pore est décrit ci-dessous et schématisé sur la **figure 22** :

Lors de la formation du pore, une modification du domaine de fixation sur PA surélève le facteur, aidant son insertion dans le pore (Krantz et al., 2004 ; Feld et al., 2010 ; Hardenbrook et al., 2020). La translocation est initiée par l'extrémité N-terminale des facteurs constituée de résidus chargés (Zhang et al., 2004 ; Feld et al., 2010 ; Pentelute et al., 2010). Le Phi-clamp agit comme une cloison entre

endosome et cytosol permettant de conserver un gradient de protons de part et d'autre, où le pH de l'endosome est inférieur à celui du cytosol (Krantz *et al.*, 2006). Cette **force proton-motrice** initie le dépliement et la translocation des facteurs (Thoren *et al.*, 2009 ; Feld *et al.*, 2012 ; Jiang *et al.*, 2015), cohérente avec le modèle « *charge-state Brownian ratchet* » (Krantz *et al.*, 2006 ; Brown *et al.*, 2011). Les facteurs sont globalement de charge négative (LF pI 5,4 et EF pI 6,6) et particulièrement leur domaine N-terminal (pI 4,9). A pH 5,5 acide leur charge est neutralisée par protonation, et devient compatible avec une barrière cation-sélective (Brown *et al.*, 2011), et les appauvrissant globalement en structures secondaires (Krantz *et al.*, 2004). Le pH cytosolique neutre rencontré par le facteur suite à la traversée du Phi-clamp, déprotonne les facteurs, les rend incapables de rétro-transloquer et initie leur repliement (Brown *et al.*, 2011 ; Machen *et al.*, 2021). Plusieurs cycles de protonation/déprotonation aboutissent au passage de l'intégralité des facteurs et contribuent au dépliement des structures secondaires (Brown *et al.*, 2011). La translocation est donc un **processus unidirectionnel** dépliant les facteurs du N-terminal vers le C-terminal, de l'endosome vers le cytosol.

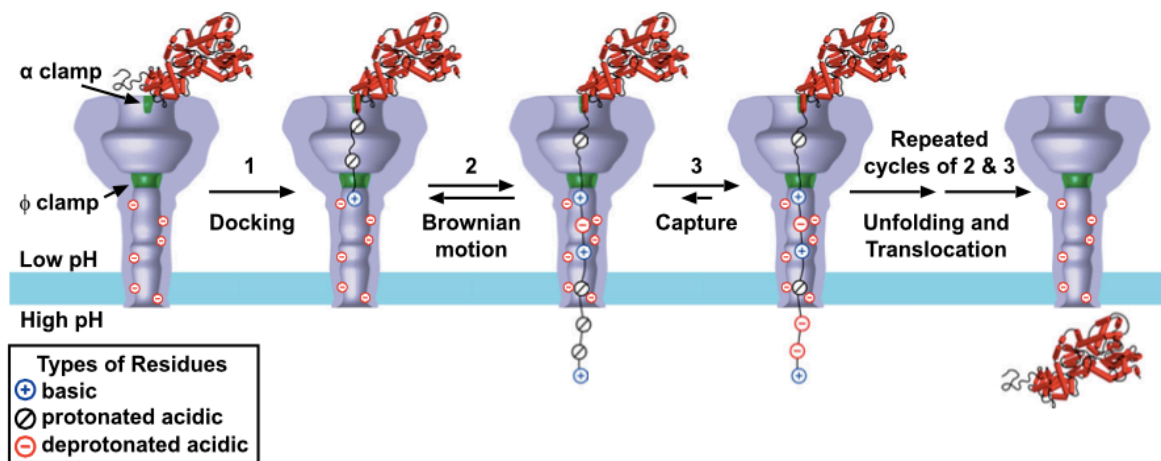


Figure 22. Etapes de translocation des facteurs enzymatiques à travers le pore. Le facteur (rouge) subit un dépliement puis un repliement de part et d'autre du Phi-Clamp (vert) afin de traverser le pore (Brown *et al.*, 2011).

5.5. Voie d'endocytose des toxines

5.5.1. Surface cellulaire et voies endocytaires

L'endocytose des toxines est un **processus actif**, ne pouvant pas avoir lieu à 4°C, observé en cellules épithéliales humaines T84 (Beauregard *et al.*, 1999), dans les macrophages J774A.1 (Novak *et al.*, 1992) et les cellules CHO-K1 (Milne *et al.*, 1994). L'heptamère de PA63 est rapidement formé en surface cellulaire à 37°C et endocyté (Beauregard *et al.*, 2000). Cette internalisation est **rapide**, dès 5 minutes dans les cellules épithéliales CHO (Abrami *et al.*, 2003) et les cellules BHK (Zornetta *et al.*,

2010). C'est également le temps nécessaire à l'internalisation de la totalité de LF en présence de PA dans les macrophages J774A.1 (Novak *et al.*, 1992).

Les récepteurs sont naturellement présents dans les régions membranaires constituées de glycérophospholipides. Ils sont **palmitoylés** ce qui empêche leur endocytose prématurée vers la voie de dégradation lysosomale (Abrami *et al.*, 2006). Associé à PA, le récepteur est maintenu en surface jusqu'à son heptamérisation, ce qui provoque alors le regroupement des récepteurs et leur redistribution dans les **radeaux lipidiques** riches en sphingolipides et en cholestérol non cavéolaire de la membrane plasmique (Beauregard *et al.*, 2000 ; Abrami *et al.*, 2003). La distribution des facteurs EF et LF en surface cellulaire est également cohérente avec une présence au sein des radeaux lipidiques (Zornetta *et al.*, 2010). L'**ubiquitinylation** de la queue cytoplasmique des récepteurs TEM8 et CMG2 est permise suite à leur regroupement au sein des radeaux lipidiques et induit alors l'internalisation, indiquant que l'intégrité de ces radeaux est nécessaire (Abrami *et al.*, 2003 et 2006). Par ailleurs, l'actine régule la distribution de TEM8, mais pas de CMG2, en surface cellulaire et requiert la fixation de PA pour sa mobilité vers les radeaux lipidiques (Abrami *et al.*, 2010).

Des études montrent que **PA est indispensable à l'entrée et à l'activité des facteurs EF et LF** (Little *et al.*, 1988 ; Friedlander, 1986 ; Dal Molin *et al.*, 2006 ; Abrami *et al.*, 2013). Ceci est également observé depuis le lumen d'un compartiment intracellulaire. En effet, les toxines peuvent être retrouvées au sein des phagolysosomes 3 heures après la germination des spores phagocytées par les macrophages RAW264.7 (Guidi-Rontani *et al.*, 1999b). Les toxines sécrétées dans ces vésicules, couplées à la présence des récepteurs TEM8 et CMG2, engendrent une cytotoxicité depuis l'intérieur du macrophage (Banks *et al.*, 2005). Ainsi, l'association de PA et son récepteur est requise à la fois pour l'entrée depuis la membrane plasmique mais aussi pour la traversée de la membrane endosomale.

Le **cytosquelette d'actine** joue un rôle important dans l'internalisation. Il est requis pour l'endocytose et l'activité des facteurs LF (Abrami *et al.*, 2010) et EF (Milne *et al.*, 1994 ; Gordon *et al.*, 1988).

L'implication des **voies clathrine et cavéole dans l'endocytose des toxines** semble être dépendante des types cellulaires étudiés. Impliquée dans les 2 voies, la **dynamine** joue un rôle important puisque son absence inhibe l'endocytose (Abrami *et al.*, 2003 et 2010). Une dépendance à la voie clathrine a été montrée dans les cellules HeLa (TEM8), BHK (CMG2) et CHO quel que soit le récepteur cellulaire. PA est endocyté par voie clathrine (Abrami *et al.*, 2003) et l'activité de EF est inhibée par un inhibiteur de la voie clathrine (Leppla, 1982). L'endocytose dépendante de la clathrine implique l'adaptateur AP-1, mais pas AP-2 (Abrami *et al.*, 2010). L'endocytose dans les cellules CHO semble indépendante de la voie cavéole, de même que dans les macrophages RAW264.7 et cellules FRT n'exprimant pas la

cavéoline (Abrami *et al.*, 2003). Ces résultats sont toutefois différents de ceux observés lors d'une étude menée dans les cellules BHK où une entrée est associée à la cavéoline-1 (50%) et peu à la clathrine (3%) (Zornetta *et al.*, 2010).

Une **voie d'entrée auxiliaire** indépendante de la dynamine est également possible pour LF, comme observé pour la transferrine pourtant décrite comme utilisant la CME (Boll *et al.*, 2004). De plus, PA est retrouvé au sein d'invaginations non associées à la clathrine et aux cavéosomes (Abrami *et al.*, 2003). Il semblerait donc que les facteurs soient capables d'emprunter une autre voie d'entrée indépendante de la dynamine. Il y aurait donc utilisation de différentes voies endocytaires pour atteindre la voie endosomale.

5.5.2. Endosomes et suivi de trafic intracellulaire

Après l'internalisation, la détection de l'activité enzymatique des toxines LT et ET est dépendante de **l'acidification du milieu** et de la **translocation** (Friedlander, 1986 ; Gordon *et al.*, 1988 ; Guidi-Rontani *et al.*, 2000).

L'utilisation d'inhibiteurs d'acidification à différents temps post-intoxication permet de stopper la maturation vers les endosomes tardifs, et inhibe la formation de pores dans les cellules CHO-K1 (Milne *et al.*, 1994). Les inhibiteurs de pompes à protons vacuolaires ATPase spécifiques des endosomes et lysosomes, confirment ces résultats et indiquent le temps de trafic endosomal nécessaire à LT pour établir la toxicité en macrophages J774.1 (Menard *et al.*, 1996).

La cinétique d'augmentation de l'AMPc en réponse à ET est similaire dans plusieurs lignées cellulaires exprimant différents récepteurs (TEM8 pour les cellules Jurkat et HeLa, CMG2 pour les macrophages RAW264.7). Elle débute après 1 heure environ pour les cellules HeLa et RAW264.7, et les cellules Jurkat produisent un taux d'AMPc supérieur aux lignées précédentes et détecté dès 30 minutes (Dal Molin *et al.*, 2006). L'AMPc est détecté dans les cellules CHO (Leppla *et al.*, 1982 ; Gordon *et al.*, 1989), T84 (Beauregard *et al.*, 1999) et BHK (Zornetta *et al.*, 2010) à partir de 30-40 minutes. Les facteurs sont donc soumis à un trafic intracellulaire pour atteindre une **localisation cytoplasmique nécessaire à leur fonction enzymatique**, le laps de temps nécessaire à la détection de l'activité enzymatique étant compatible avec un relargage depuis les endosomes tardifs.

L'entrée des toxines est rapide, de l'ordre de 5 minutes, avec une présence dans les endosomes précoces après 10 minutes, d'après l'observation de leur colocalisation avec divers marqueurs : Rab5 (40%), PI3P (30%), EEA1 (12%) et transferrine (13%) (Zornetta *et al.*, 2010). Les facteurs EF et LF ne montrent **pas**

de différence de trafic intracellulaire depuis la fixation en surface jusqu'à leur arrivée en endosomes tardifs à 40 min (80% de colocalisation des 2 facteurs et 94% avec le LBPA) (Zornetta *et al.*, 2010). Une série d'analyses a permis de préciser la localisation des facteurs dans différentes lignées : HeLa, Jurkat, BHK et RAW264.7 (Dal Molin *et al.*, 2006 ; Zornetta *et al.*, 2010 ; Guidi-Rontani 2000). Ainsi, LF et EF atteignent le cytosol à partir des endosomes tardifs (**figure 23**), mais chacun possède une localisation intracellulaire spécifique : **LF est totalement relargué dans le cytosol** à proximité d'organelles contenant les cibles MAPKKs (Golgi, endosomes, mitochondrie) tandis que **EF reste associé à la face cytosolique membranaire** des endosomes tardifs avec une localisation plus périnucléaire. Ces localisations différentes peuvent s'expliquer par la capacité des facteurs à interagir avec les vésicules lipidiques. Si l'interaction de LF avec ces vésicules est dépendante du pH et réversible à pH neutre ; celle de EF est forte, indépendante du pH et assurée par le domaine catalytique C-terminal (Wang *et al.*, 1997). PA quant à lui fixe les vésicules de façon irréversible et dépendante du pH (acide) (Wang *et al.*, 1997), et n'est donc pas retrouvé dans le cytosol suite à la translocation (Dal Molin *et al.*, 2006). Une translocation des facteurs EF et LF est également possible à partir des endosomes précoces (**figure 23**) comme observé dans les macrophages (Guidi-Rontani *et al.*, 2000), et dans les CHO et HeLa (Abrami *et al.*, 2004 et 2013).

5.5.3. Devenir intracellulaire des facteurs

PA est observé dans les vésicules intraluminales et dans quelques endosomes multivésiculaires en microscopie électronique (Abrami *et al.*, 2004). Son devenir est cohérent avec un parcours lysosomal (**figure 23**) et non de recyclage. En effet, il n'est pas retrouvé dans le cytosol (Dal Molin *et al.*, 2006) et la dégradation des heptamères est observée dès 30 minutes après internalisation (Abrami *et al.*, 2003). La dégradation de PA a lieu à partir des endosomes tardifs (Abrami *et al.*, 2004).

L'insertion membranaire de l'heptamère a lieu dans les membranes des **ILV des endosomes précoces**, relarguant ainsi les facteurs dans la lumière des ILV (**figure 23**). Une dysfonction de la biogenèse des ILV bloque LF dans les endosomes précoces, et favorise une translocation vers le cytosol où il est rapidement dégradé par le protéasome (Abrami *et al.*, 2013). Suite à l'internalisation dans les macrophages, LF est retrouvé dans le cytosol en 15 minutes et dégradé en partie à 60 minutes, tandis que EF n'est pas dégradé à 45min (Guidi-Rontani *et al.*, 2000). Le facteur LF maintenu en endosomes tardifs est adressé à la **voie lysosomale** (**figure 23**), tandis qu'il est pris en charge par le **protéasome** s'il transloque vers le cytosol (Abrami *et al.*, 2013).

La dynamique endosomale est nécessaire pour observer l'activité de LF. L'accès de LF aux endosomes tardifs est nécessaire à son activité enzymatique (Abrami *et al.*, 2004). Les ILV fusionnant avec les endosomes tardifs contiennent du LF protégé de la dégradation lysosomale, et contrôlent son relargage dans le cytosol par un **processus de back fusion** avec la membrane endosomale (Abrami *et al.*, 2013)

(figure 23). La séquestration de LF dans les ILV des endosomes tardifs empêche son activité enzymatique, qui ne sera restaurée que si une échappatoire vers le cytosol est permise (Abrami *et al.*, 2004). Un **réservoir** de facteurs enzymatiquement actifs est constitué par les ILV au sein des endosomes tardifs, avec une translocation possible sur le long terme observée par clivage des MEK jusqu'à 5 jours *in vitro* et 3 jours *in vivo* après intoxication (Abrami *et al.*, 2013 ; Zheng *et al.*, 2014). De façon intéressante, l'existence d'**exosomes** issus des ILV contenant LF assurant un effet longue distance a été mis en évidence (Abrami *et al.*, 2013). Leur relargage dépend de Rab11 et Rab35. Ces exosomes sont capables de transmettre du LF actif à des cellules naïves mais aussi à des cellules dépourvues de récepteurs, donc indépendamment de PA et par endocytose dépendante de la dynamine (Abrami *et al.*, 2013). L'activité enzymatique observée 2 heures après internalisation des exosomes est dépendante des ILV et la capacité de persistance de LF est observée dans la cellule réceptrice.

Le modèle admis est le suivant (Abrami *et al.*, 2004 et 2013) : le complexe heptamère/facteur entre dans les endosomes précoces où il est intégré aux ILV, puis le facteur se transloque dans le lumen des ILV à pH acide. Les facteurs dans les ILV ont donc 3 possibilités suite à leur arrivée dans les endosomes tardifs : i) *back fusion* et relargage en cytosol, ii) exosomes pour intoxication de cellules naïves voisines ou iii) réservoir de facteur actif protégé des enzymes lysosomales. La dysfonction des ILV entraîne une translocation depuis l'endosome précoce vers le cytosol. Si la translocation n'a pas lieu, le facteur est maintenu dans les endosomes tardifs et adressé au lysosome (Abrami *et al.*, 2013).

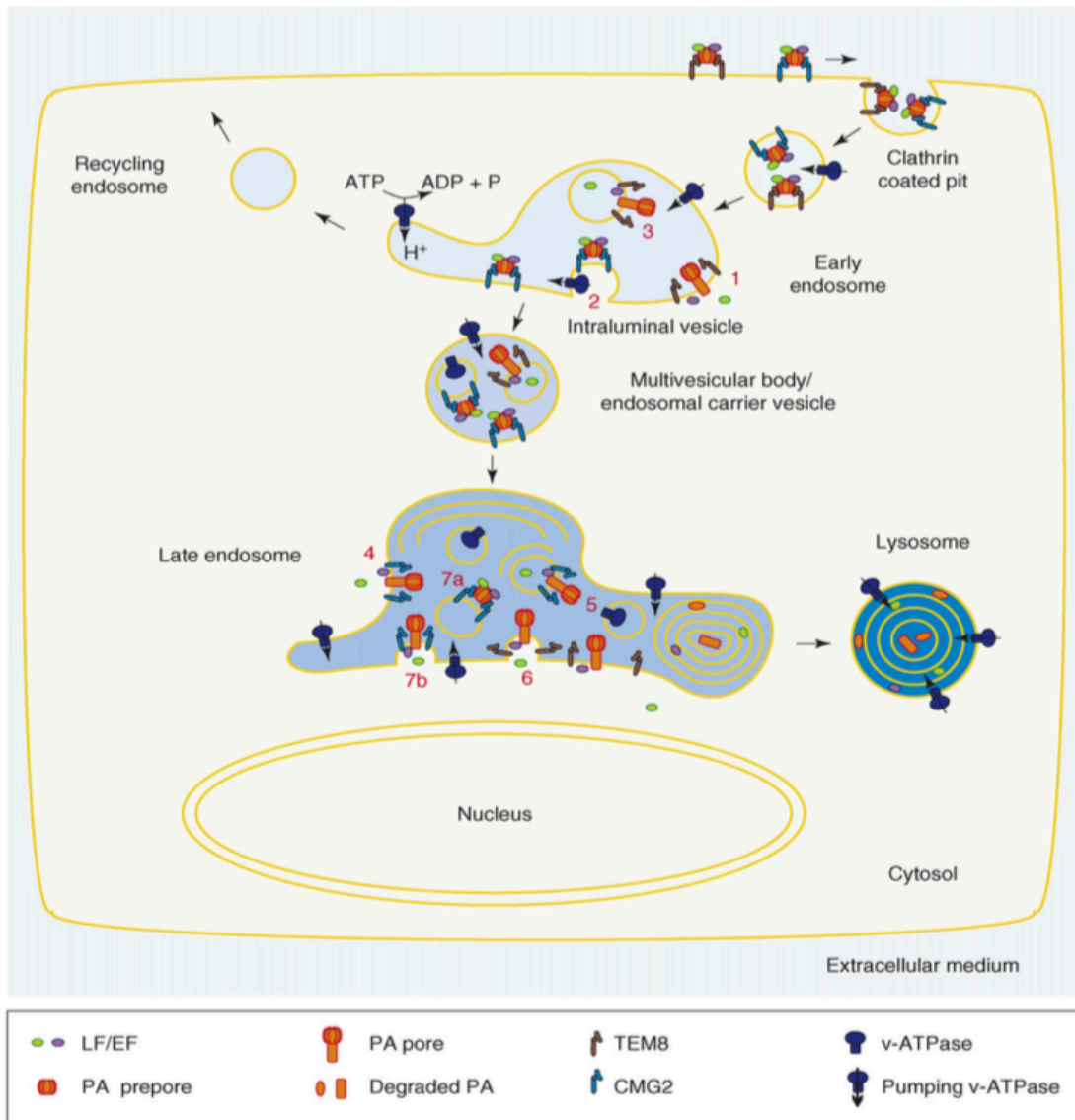


Figure 23. Endocytose des toxines de *Bacillus anthracis*. Sur ce schéma les toxines utilisent la voie clathrine. La translocation a lieu à partir des endosomes précoces lors d'une endocytose avec TEM8 (1) et des endosomes tardifs pour CMG2 (4). Des vésicules intraluminales (ILV) se forment au sein des endosomes précoces (2) et peuvent être le lieu de translocation des facteurs EF et LF (3). Lors de la fixation à CMG2, la translocation peut avoir lieu dans les endosomes tardifs depuis leur membrane (4) ou au sein de leurs ILV (5). Les facteurs EF et LF transloqués dans les ILV peuvent regagner le cytosol par « back fusion » avec la membrane des endosomes tardifs (6). Les ILV présents dans les endosomes tardifs (7a) peuvent réintégrer la membrane endosomale avant d'effectuer la translocation des facteurs EF et LF dans le cytosol (7b). Les facteurs EF, LF et PA sont dégradés par le lysosome (Puhar et al., 2007).

OBJECTIFS DE LA THESE

Les toxines représentent un élément central de la virulence de *B. anthracis* et des *B. cereus* anthracis-like. Pathologie endémique mondiale, la maladie du charbon touche principalement le bétail et par extension les personnes en contact avec des produits animaux bruts, lors d'une exposition à caractère professionnel ou par ingestion. Les pathologies anthracis-like émergentes depuis les années 90, dues à des bacilles présentant un contenu plasmidique hautement similaire à *B. anthracis*, atteignent l'Homme et les animaux de la vie sauvage. Ce pathogène, ayant déjà été utilisé en tant qu'arme biologique, continue à constituer une menace bioterroriste. De plus, ces nouvelles souches anthracis-like sont présentes sur les terrains opérationnels des forces armées françaises en Afrique.

Les composants des toxines létale et oedémateuse (PA, LF et EF) de *Bacillus anthracis* et des *Bacillus cereus* anthracis-like, possèdent une identité de séquence protéique dépassant les 99%, à l'origine d'effets physiopathologiques similaires. Ces toxines agissent au stade précoce de la maladie en paralysant le système immunitaire, puis au stade tardif en induisant des dommages tissulaires.

L'entrée des toxines dans la cellule a fait l'objet de diverses études. L'entrée et l'activité des facteurs sont décrites depuis plus de 50 ans comme étant dépendantes de PA. L'endocytose des toxines létale et oedémateuse nécessite un réseau d'actine fonctionnel, ainsi qu'un passage par des compartiments intracellulaires acides pour conduire à l'observation d'une activité enzymatique *in vitro* et des effets pathologiques *in vivo*.

Différentes études orientées sur le facteur enzymatique en présence de PA montrent que différentes voies peuvent être empruntées par les toxines selon le type cellulaire. Une implication des radeaux lipidiques, de la clathrine et de la cavéoline a été mise en évidence dans les cellules BHK, CHO et HeLa. Par ailleurs, il a été montré l'existence de voies multiples au sein d'une même cellule, et non de l'emprunt d'une voie unique. L'utilisation de certains des types cellulaires est liée à leur caractère phénotypique, cellules adhérentes à large cytoplasme, facilitant l'observation de l'endocytose et du trafic intracellulaire. L'activité adénylate cyclase du facteur oedémateux EF a été étudiée dans les cellules CHO, BHK, HeLa, Jurkat, RAW264.7 et T84 et détectée aux alentours de 30 minutes post-intoxication. L'observation au sein de cellules épithéliales polarisées a peu été exploitée, ne faisant l'objet que d'une étude sur une lignée de cellules intestinales T84.

L'objectif de cette thèse est de comprendre et d'identifier les mécanismes endocytaires impliqués dans la physiopathologie dès la phase initiale de l'infection. L'épithélium pulmonaire représente la première barrière à franchir lors d'une infection par aérosols avant une dissémination systémique. Il paraît donc intéressant d'intégrer des données concernant les cellules épithéliales humaines respiratoires établissant le premier contact avec le pathogène, en utilisant une lignée de cellules bronchiques, les cellules Calu-3 et une lignée de cellules alvéolaires, les cellules A549. Ainsi que les macrophages qui constituent un des types de cellules immunitaires capables d'internaliser bactéries et toxines au niveau de l'épithélium, et responsables de leur dissémination vers les ganglions et les organes. L'identification des voies d'entrée

au sein de chaque type cellulaire se positionne ainsi comme une étape clé dont l'inhibition assurera un point de contrôle critique dans la capacité pathogénique des toxines de *Bacillus anthracis*. L'ensemble des données obtenues pourra contribuer à cibler plus précisément les acteurs endocytaires et aider au développement d'inhibiteurs toxiques.

Stratégie expérimentale de la thèse :

- ✚ Dans un premier temps, le développement d'outils facilitant le suivi du processus d'internalisation a été réalisé. La construction de plasmides par génie génétique et l'optimisation des conditions de purification ont permis l'obtention de protéines de fusion fluorescentes et solubles. Fluorescence et activité enzymatique des facteurs oedémateux EF chimériques ont ensuite été validées.
- ✚ La fluorescence a permis de suivre l'endocytose *in vitro* de facteurs EF chimériques, en présence ou non de PA, en microscopie confocale, en imagerie dynamique et en cytométrie de flux. Pour tenir compte des différences pouvant exister entre les cellules, nous avons utilisé plusieurs types et lignées cellulaires (macrophages et cellules épithéliales). Peu de données étant disponibles quant au pôle d'entrée au sein de cellules épithéliales polarisées, nous avons caractérisé les éventuelles différences entre ces lignées.
- ✚ Cette étude a remis en cause le dogme établi concernant la nécessité de PA dans la capacité de EF à être internalisé. Les expérimentations ont donc été orientées vers l'exploration des voies endocytaires en alliant cytométrie de flux et microscopie confocale. Un panel d'inhibiteurs a été utilisé afin d'identifier les voies d'endocytose empruntées par EF et EF+PA, dans un type de macrophages et dans une lignée de cellules épithéliales pulmonaires.
- ✚ L'activité adénylate cyclase de EF et des EF fluorescents en présence ou non de PA, a été suivie au cours du temps par dosage de la concentration en AMPc dans différents types cellulaires.
- ✚ Pour terminer, puisque EF peut être internalisé en absence de PA, l'idée d'une potentielle restauration d'activité suite à une exposition ultérieure à PA (et *vice versa*) a été explorée par dosage de l'AMPc intracellulaire.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Matériel et méthode

Lignées cellulaires

Les lignées murines de macrophages RAW264.7 (ECACC 91062702) et J774.1 (ECACC 91051511) sont cultivées en milieu DMEM GlutaMAX additionné de 10% sérum de veau fœtal (SVF). La lignée murine de macrophage IC21 (ATCC, TIB-186) est cultivée en milieu RPMI GlutaMAX additionné de 10% SVF. La lignée canine de cellules épithéliales de rein MDCK (ATCC, CCL_34) et la lignée de cellules épithéliales alvéolaires humaines A549 (ATCC, CCL-185) sont cultivées en milieu DMEM GlutaMAX + 10% FBS + pyruvate. La lignée humaine de cellules épithéliales bronchiques Calu-3 (ATCC, HTB55) est cultivée en milieu advanced-MEM + 5% FBS + GlutaMAX ; et la lignée de cellules épithéliales ovariennes de hamster CHOK1 (ATCC, CCL_61) en milieu RPMI+ 10% FBS + GlutaMAX.

Souches bactériennes

Les souches bactériennes *Escherichia coli* NEB5alpha (NEB C2987H) et NEBexpressIq (NEB C3037H) chimiocompétentes sont cultivées en milieu LB, additionné d'ampicilline (100 µg/mL) ou kanamycine (50 µg/mL) lorsque nécessaire. La souche CAR-H toxigène acapsulée (pBCX01+, $\Delta hasA$) est cultivée en milieu BHI.

Molécules et inhibiteurs

Le PA recombinant provient d'une production du laboratoire du Dr Tournier, le facteur EF recombinant (#178) a été obtenu chez List Laboratory.

Les inhibiteurs d'endocytose suivants ont été utilisés : latrunculine A (L5153), dyngo4a (ab120689), filipine (SAE0088), nystatine (N4014), méthyl- β -cyclodextrine (C4555), pitstop2 (ab120687), bafilomycine A (196000), NH₄Cl (A9434), EIPA (A3085), nocodazole (SML1665), dynasore (D7693), monodansylcadaverine (D4008), rottlerine (557310), wortmannine (W1628), genisteine (345834), CASIN (SML1253), chloroquine (C6628), et cytochalasine D (250255).

Les anticorps utilisés en western blot : souris anti-histine (Clontech, 631212), chèvre anti-EF (List Laboratory, #773L), souris anti-actine (Santa Cruz, sc-47778), lapin anti-GAPDH (Cell Signaling, 5174), lapin anti-GFP (Abcam, ab6556), chèvre anti-souris HRP (Jackson immunoresearch, 111-035-003), âne anti-chèvre HRP (Jackson immunoresearch, 705-035-003), chèvre anti-lapin HRP (Jackson immunoresearch, 111-035-003).

Les anticorps utilisés en immunofluorescence : chèvre anti-EEA1 (Santa Cruz, sc6415), lapin anti-Rab7 (PA5-78238), poulet anti-chèvre AF594 (ThermoFisher, A21468), et poulet anti-lapin AF647

(ThermoFisher, A21443). Les protéines fluorescentes suivantes sont utilisées : transferrine AF647 (Jackson ImmunoResearch, JIR015-600-050), sous-unité B de la toxine cholérique AF594 (Biotium, BTM00072), Dextran 10kDa AF594 (Biotium, BTM80114) et Dextran 70kDa AF488 (Biotium, BTM80117). Le montage avec les lamelles a été réalisé avec le ProlongGlass with NucBlue (ThermoFisher P36981).

L'ADN polymérase Q5 (M0491), le kit de clonage « HiFi cloning MasterMix » (E2621), les enzymes de restriction et la ADN ligase T4 (M0202) ont été obtenus chez New England Biolabs. Le plasmide pQE60 provient de chez Qiagen.

L'AMPC, l'antisérum AMPC, le traceur enzymatique AMPC acétylcholinestérase, le réactif d'Ellman et l'anhydride acétique utilisés dans le dosage ELISA de l'AMPC proviennent de BertinTechnologies (Montigny-Le-Bretonneux, France).

Clonage des constructions EFhis, EF fluorescents et LF fluorescents

Le gène *cya* de la souche *Bacillus cereus* anthracis-like G9241 codant pour le facteur oedémateux EF a été utilisé pour la construction de fusion géniques avec différents gènes codant diverses protéines fluorescentes. Le gène *lef* codant le facteur létal LF de la souche *Bacillus cereus* biovar anthracis Côte d'Ivoire a été synthétisé par GeneArt (Thermo Fisher Scientific). Le plasmide pQ60 contenant un promoteur T5 inductible à l'IPTG est le plasmide dans lequel les inserts *cya*, *lef* et gènes codant les protéines fluorescentes sont insérés. Les gènes codant les protéines fluorescentes obtenus chez Addgene, proviennent des plasmides suivants : mTurquoise2 (#98837), eCFP (#31306), eGFP (#32702), eYFP (#31306), mAmetrine (#58170), LSSmOrange (#99868), mApple (#54918), mScarlet-I (#85043), mCyRFP (#84486), mStrawberry (#58170), mMaroon1 (#84486) mKate2 (#99868), mNeptune2.5 (#51310), Flamindo2 (#73938), pHuji (#61555). Les gènes codant les protéines mCherry et mVenus proviennent de plasmides présents au laboratoire. Les gènes codant les protéines fluorescentes à séquence optimisée pour les bactéries Gram+ à bas GC% proviennent du Bacillus Genetic Stock Center : CFPopt (#ECE300), FFPopt (#ECE299) et YFPopt (#ECE301).

Clonage par restriction : Le vecteur pQE60 a été digéré NcoI/BamHI. Les inserts *cya* ont été amplifiés par PCR à l'aide de l'ADN polymérase Q5 de haute fidélité et d'amorces spécifiques flanquées en 5' et en 3' par des sites de restriction (**Tableau A**), de manière à obtenir les inserts BspHI-*cya*-BamHI (Cya-b) et BspHI-*cya*-SacI,BamHI (Cya-sb) où un site de restriction SacI a été ajouté pour l'insertion ultérieure d'un gène codant pour une protéine fluorescente. Les PCR « insert » sont ensuite digérées BspHI/BamHI. Une première réaction de ligation des inserts Cya BspHI/BamHI est réalisée dans le pQE60 NcoI/BamHI (ratio vecteur:insert de 1:2, ligation sur la nuit à 16°C en thermocycleur) afin d'obtenir les constructions suivantes : pQE60-Cya(b)-His et pQE60-Cya(sb)-His.

Les inserts contenant le gène codant les protéines fluorescentes GFPopt, CFPopt et YFPopt sont amplifiés par PCR avec des amorces flanquant les sites de restriction SacI en 5' et BamHI en 3' (**Tableau A**). Le plasmide pQE60-Cya-(sb)-His est digéré SacI/BamHI afin d'insérer le produit PCR « insert fluoOpt » digéré SacI/BamHI par ligation avec la T4 DNA ligase, ratio vecteur:insert de 1:2 sur la nuit à 16°C en thermocycleur. Les constructions obtenues sont nommées pQE60-Cya-GFPopt-His, pQE60-Cya-CFPopt-His et pQE60-Cya-YFPopt-His.

N.B : les sites NcoI/BspHI sont cohésifs et compatibles.

Tableau A. Amorces utilisées pour les clonages par restriction.

PCR	Matrice	Nom de l'amorce et séquence	
Inserts Cya-b et cya-sb	ADNg G9241	1/FWDmatureEF- <u>BspHI</u>	catgc TCATGA ATGAACATTACACTGAGAG
		2/RevEF- BamHI	cgc GGATCC TTTT CATCAATAATTTTTTGGAAGACC
		2/RevEF- SacI + BamHI	cgc GGATCCGAGCTC TTTT CATCAATAATTTTTTGGAAGACC
Insert GFPopt ou YFPopt	ECE299 ou ECE301	4/FWD-opt- SacI	cgc GAGCTC ATGTCAAAGGAGAAGAATTATTTAC
		4/REV-opt- BamHI	acgcGGATCC CTTATATAATTCATCCATCCG
Insert CFPopt	ECE300	5/FWD-CFPopt- SacI	cgc GAGCTC ATGGTTTCAAAGGAGAAGAATTA TTTAC
		5/REV-CFPopt- BamHI	acgcGGATCC cttatataattcatccattcctagtg

Clonage par HiFi : Les vecteurs et inserts sont amplifiés par PCR, avec ADN polymérase Q5 de haute fidélité et des amorces comportant une homologie de séquence avec le gène à amplifier pour la partie 3' et le fragment à associer pour la partie 5'. Les PCR vecteur ont été digérées par DpnI afin d'éliminer la matrice. La méthode de clonage NEB HiFi permet par une action 5' exonucléase de générer des extrémités protubérantes 3' permettant l'hybridation des extrémités complémentaires. Une ADN polymérase synthétise ensuite les séquences ADN manquantes et une ADN ligase termine la jonction. Cette technique permet donc d'effectuer le clonage simultané des 3 fragments, le vecteur, l'insert 1 et l'insert 2, sans cicatrice. Le clonage est effectué selon un ratio vecteur:insert1:insert2 de 1:2:2, incubation 1h à 50°C en thermocycleur.

Le plasmide pQE60 ainsi que les gènes *cya*, *lef* et gènes codant les protéines fluorescentes sont amplifiés par PCR à l'aide des amorces listées dans le **Tableau B**. L'homologie de séquence des extrémités des produits PCR permet un clonage en une étape selon un ordre prédéfini des produits PCR aboutissant aux plasmides suivants : pQE60-*cya*-fluo-His et pQE60-*lef*-fluo-His. Les plasmides

pQE60-*cya*-his et pQE60-*lef*-his, codant pour les protéines EFhis et LFhis respectivement, comportent uniquement une étiquette 6his C-terminale sans fusion à une protéine fluorescente. Le produit de la réaction de clonage HiFi est ensuite transformé en bactéries chimiocompétentes NEB5alpha et sélectionné sur LBagar + ampicilline. Après extraction plasmidique, les clones sont présélectionnés par analyse du profil de digestion par les enzymes de restriction ApaI/EcoRI et XhoI/SacI pour les constructions pQE60-*cya*-fluo et pQE60-*lef*-fluo respectivement. Le séquençage des clones permet la sélection des plasmides attendus.

Les plasmides pQE60-his-*cya*-fluo avec une étiquette 6his en 5' du gène *cya*, sont construits par clonage HiFi des PCR « vecteur » et PCR « insert » obtenus à partir des plasmides pQE60-*cya*-fluo-His et des amorces indiquées dans le **Tableau B**, ajoutant le 6his en 5' et l'éliminant en 3'.

N.B : Le clonage HiFi a été optimisé en terme de rentabilité de clonage par insertion d'un mélange d'inserts fluo (2 à 3 couleurs simultanément) puisque les extrémités pour les homologies avec le gène *cya* ou le plasmide pQE60 sont identiques. Ceci permet en 1 réaction de clonage, d'obtenir 3 clonages distincts !

Tableau B. Récapitulatif des amorces utilisées pour le clonage HiFi.

Cible	Matrice	Nom de l'amorce et séquence	
Amorces clonage expression			
pQE60	pQE60	1/Fwd-pQE60	ggatctcatcaccatcacc
		1/Rev-pQE60	catggtaattctctctttaaataaattctgtg
Cya	ADNg G9241	2/Fwd-(pQE60)-Cya	aagaggagaattaacctgaatgaacattactg agag
		2a/Rev-Cya-(Fluo+)	tgctcaccatgagctcttttcatcaataattttggaa g
		2b/Rev-Cya-(GYFPopt)	cttttgacatgagctcttttcatcaataattttggaa g
		2c/Rev-Cya-(CFPopt)	ttgaaacctgagctcttttcatcaataattttggaa g
Fluo+ (eCFP, eGFP, eYFP, mCherry, mVenus, pHuji, mTurquoise2, LSSmOrange, mApple, Flamindo2, mAmetrine, mScarlet, mNeptune2.5, mCyRFP1, mStrawberry mMaroon1)	Voir la liste dans le Matériel et Méthode	3a/Fwd-(Cya)-Fluo+	tgatgaaaaagagctcatggtgagcaaggcgag
		3b/Rev-Fluo+-(pQE60)	atggtgatggtgatgatccctgtacagctgctc atgc
mKate2	99868	3a/Fwd-(Cya)-mKate2	tgatgaaaaagagctcatggtgagcgagctgatta ag

		3b/Rev-mKate2-(pQE60)	atggtgatggtgatgatgagatcctctgtgccccagttg ctag
GFPopt, YFPopt	ECE299 ou ECE301	4a/Fwd-(Cya)-GYFPopt	tgatgaaaaagagctcatgtcaaaaggagaagaat tatttac
		4b/Rev-GYFPopt-(pQE60)	atggtgatggtgatgatgagatcccttataaattcatcca ttccg
CFPopt	ECE300	5a/Fwd-(Cya)-CYFPopt	tgatgaaaaagagctcatggttcaaaaggagaag
		5b/Rev-CFPopt-(pQE60)	atggtgatggtgatgatgagatcccttataaattcatcca ttcctagtg
Clonage His Nter (matrice pQE60-Cya-fluoHis)			
pQE60	pQE60- EFmVenusHis	6/Fwd-pQE60Fluo	gctgtacaagtaagcttaattagctgagc
		6a/Rev-pQE60Cya NterHis	aatgttcattgtgatggtgatggtgatgcatggttaattctctctttaatg
EFmVenus	pQE60- EFmVenusHis	7a/Fwd-EFVenus- NterHis	attaacctgcatcaccatcaccatcacaatgaacattacactgagagtg
		7/Rev-EFVenus- Nter	attaagcttactgtacagctcgtccatg
Clonages lef fluo			
Lef	Plasmide lef GeneArt	2/Fwd-(pQE60)-Lef	aagaggagaaattaacctggcggggcgtcatgg tgat
		2a/Rev-Lef-(Fluo+)	tgctcaccatgagctctgagttaataatgaacttaattgacgtaataaattggaaagttttc
		2b/Rev-Lef-(GYFPopt)	cttttgacatgagctctgagttaataatgaacttaattgatcgttaataaattggaaagttttc
		2c/Rev-Lef-(CFPopt)	ttgaaacctgagctctgagttaataatgaacttaattgacgtaataaattggaaagttttc
		2/rev-Lef-His	atggtgatggtgatgatgagatcctgagttaataatgaacttaattgatcgttaataaattggaaagttttc
Fluo+ (eCFP, eGFP, eYFP, mCherry, mVenus, pHuji, mTurquoise2, LSSmOrange, mApple, Flamindo2, mAmetrine, mScarlet, mNeptune2.5, mCyRFP1, mStrawberry mMaroon1)	Voir la liste dans le Matériel et Méthode	3a/Fwd-(Lef)-Fluo+	tattaactcagagctcatggtgagcaaggcgag
GFPopt, YFPopt	ECE299 ou ECE301	4a/Fwd-(Lef)-GYFPopt	tattaactcagagctcatgtcaaaaggagaagaatt atttac
CFPopt	ECE300	5a/Fwd-(Lef)-CFPopt	tattaactcagagctcatggttcaaaaggagaag

Le clonage des plamides de recombinaison homologue est réalisé par clonage HiFi dans le plasmide pBKJ236. Les amorces PCR sont désignées de façon à conserver une homologie de séquence d'environ 500pb entre le produit PCR et le gène endogène de *Bcbva*. Le produit PCR Nter, amplifié à partir de pQE60-Cya-GFPopt-His, contient les 500pb en 3' du gène *cya*, le gène codant GFPopt et le 6His remplacé par un codon Stop. Le produit Cter correspond à la séquence endogène située immédiatement en 3' du codon Stop du gène *Cya* endogène, amplifiée à partir de l'ADNg de la souche G9241. Les amorces sont indiquées en **Tableau C**.

Tableau C. Amorces utilisées pour la construction des plasmides de recombinaison homologue.

Cible	Matrice	Nom de l'amorce et séquence	
pBKJ236	pBKJ236	1/Fwd-pBKJ236	aggtcgacggatcttttc
		1/Rev-pBKJ236	cggatccactagttag
Homologie NTer (Cya)	pQE60-Cya-GFPopt-His	1fwd/(pBKJ236)-CyaGYFP NEW	cgtctagaactagtgatccgcgttcttataataaaatagctcc
		1rev/CyaGYFP-(HomolCterEF)	aattatataattactatataattcatccattccg
Homologie CTer (Cya)	ADNg G9241	2fwd/(CyaGYFP)-HomolCterEF NEW	cacggaatggatgaattatataagtaaataatataaattgttttctg aaaattcatcatttaagaagacac
		2rev/HomolCterEF-(pBKJ236)	cggaaaagatccgtcgacctccaccagcctcctcaactaac

Conjugaison hétérogramique.

La souche CAR-H de *Bacillus cereus* biovar anthracis et les bactéries *E.coli* HB101Tra ou SCS110 transformées avec le plasmide pBKJ236-cya-GFPopt sont cultivées dans 5mL de milieu BHI à 37°C sur la nuit. Le lendemain, chaque culture est lavée en milieu LB par centrifugation 5min à 3000 rpm et les culots repris dans 500 µL. La conjugaison est effectuée sur en déposant au centre d'une gélose BHI : 150µL CAR-H + 150 µL HB101Tra/pBKJ236-cyaGFPopt-his ou 150µL CAR-H + 150 µL SCS110/pBKJ236-cyaGFPopt-his. Après séchage, la gélose est incubée 24h à température ambiante. La sélection des bactéries conjuguées est réalisée 2 fois par resuspension dans 200 µL de milieu LB et étalement sur gélose BHI + 2µL/mL érythromycine + polymyxine B, puis incubation 48h à température ambiante. L'érythromycine permet la sélection des bactéries conjuguées possédant le plasmide pBKJ236-cyaGFPopt-his, la polymyxine B élimine les bactéries *E. coli*. La fluorescence des bactéries CAR-H conjuguées résistantes à l'érythromycine est observée au microscope confocal

Techniques d'analyses protéiques

Lysats cellulaires.

Les cellules sont lavées avec du PBS puis lysées avec le tampon d'extraction protéique M-PER (ThermoFisher Scientific, 78501) additionné d'anti-protéases Complete EDTA-free (Roche, 04693159001) par dissociation mécanique au grattoir et pipetage, puis incubation 5 minutes à température ambiante. Le surnageant contenant la fraction protéique cytosolique est collectée après centrifugation 10 minutes, 12000rpm à 4°C. La quantité de protéines totales contenue dans le lysat cellulaire est obtenue par la méthode de Bradford. Ces lysats sont utilisés pour une analyse sur gel SDS-PAGE.

SDS-PAGE.

Les échantillons sont dénaturés en Laemmli/ β -mercaptothanol pendant 5 minutes à 95°C. La migration de ces échantillons sur gel d'acrylamide dénaturant permet une migration en fonction de la taille de chaque protéine. La migration est réalisée à 150 volts constants en tampon Tris-Glycine-SDS. Après migration, le gel peut être utilisé pour coloration des protéines totales ou pour analyse par western blot.

Les quantités ou volumes de dépôt sur SDS-PAGE utilisés sont les suivants : 10 μ L de surnageant de culture bactérienne, 10 μ L de culot de culture bactérienne pur ou préalablement dilué au 10e, 15 μ L de fraction de purification, 1 μ g de protéine purifiée, 15 μ g de lysats cellulaires.

Colorations protéiques

Le gel SDS-PAGE après migration des protéines est utilisé pour coloration des protéines totales. Les colorations de détermination de solubilité et de sélection des fractions de purification ont été réalisées au bleu de Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma Aldrich, B8647) pendant 1h à température ambiante sous agitation, puis décoloration à l'acide acétique. Les colorations pour analyse des protéines purifiées ont été réalisées avec l'Imperial Protein Stain (ThermoFisher Scientific, 24615, sensibilité 3-6ng) pendant 1h à température ambiante sous agitation, puis décoloration à l'eau. La coloration au nitrate d'argent a été réalisée à l'aide du kit Silver Xpress Staining (ThermoFisher Scientific, LC6100, sensibilité 0,86ng) selon les instructions du fournisseur.

Western blot

Après migration, le gel est utilisé pour transfert semi-sec des protéines sur membrane de PVDF en 7 minutes à l'aide de l'appareil iBlot (Invitrogen). La membrane est saturée en TBS/Tween20 0,1%/Lait 5%, pendant 1h à température ambiante, puis lavée 3 fois 5 minutes en TBS/Tween20 0,1%/. L'anticorps primaire en TBS/Tween20 0,1%/Lait 5% est incubé à 4°C sur la nuit : souris anti-histidine

(1/5000e), chèvre anti-EF (1/2000e), anti-GFP (1/2000e), anti-actine (1/200e), anti-GAPDH (1/1000e). La membrane est lavée 3 fois puis incubée avec l'anticorps secondaire en TBS/Tween20 0,1%/Lait 5% pendant 1h à température ambiante : chèvre anti-souris (1/10000), chèvre anti-lapin HRP (1/10000), âne anti-chèvre (1/10000). Après 3 lavages en TBS/Tween20 0,1%, la révélation est effectuée avec l'ECL novex (Invitrogen WP20005) sur le ChemiDoc MP (Biorad).

Afin de procéder à un nouveau western blot sur la même membrane, les anticorps sont décrochés comme suit. La membrane est insérée dans un tube et incubée 30 minutes à 52°C au bain-marie en tampon de décrochage (62,5mM Tris-HCl, 2% SDS, pH 6,8 et 7µL/mL β-mercaptothanol ajouté extemporanément), en agitant le tube toutes les 10 minutes. La membrane est ensuite lavée 4 fois en TBS/Tween20 0,1% avant de procéder à l'étape de saturation du western blot.

Test d'expression des protéines et détermination de la solubilité.

Les plasmides d'expression pQE60-*cya*-his, pQE60-*cya*-fluo-his, pQE60-*lef*-fluo-his ont été transformés en bactéries NEB express Iq, puis cultivées en milieu LB additionné de 100 µg/mL d'ampicilline à 37°C, 220 rpm jusqu'à atteindre une densité optique d'environ 0,6. L'expression des protéines est induite par ajout d'IPTG 0,4mM, 200rpm pendant 2h à 37°C ou 3h à 30°C. Le culot bactérien est repris en tampon de lyse natif (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 10mM imidazole, pH 8) associé à une lyse par 1mg/mL lysozyme et sonication 3 fois 2 minutes, puis incubé 30 minutes sur glace. Après centrifugation à 10000g, 30 minutes, 4°C, le contenu du surnageant et du culot sont analysés par migration sur un gel SDS-PAGE et western blot anti-histidine.

Des tests supplémentaires d'expression ont été menés. A DO=0,6, un échantillon de culture est prélevé avant induction, ainsi qu'en l'absence ou en présence d'induction à l'IPTG 0,5mM à 16°C et 20°C sur la nuit ou à 25°C et 30°C en cinétique à 2h, 3h, 4h, 5h et 6h d'induction. Après resuspension du culot bactérien et dénaturation, les échantillons ont été analysés par SDS-PAGE puis par western blot anti-histidine et coloration au bleu de Coomassie.

Parallèlement la coloration des culots bactériens, relative à l'expression des protéines fluorescentes, a été observée pour chaque condition d'induction.

Expression et purification des protéines.

Les plasmides pQ60-*cya*-his, pQ60-*cya*-fluo-his, pQ60-*his*-*cya*-fluo, pQE60-*lef*-his et pQE60-*lef*-fluo-his sont transformés dans les bactéries chimiocompétentes NEB express Iq et cultivées en milieu LB additionné d'ampicillin à 37°C, 220 rpm jusqu'à atteindre une densité optique 600 nm d'environ 0,6.

L'induction de l'expression des protéines correspondantes est réalisée par ajout de 0,5mM IPTG à 20°C sur la nuit, 200 rpm. Après centrifugation, les culots d'induction sont conservés à -80°C avant purification.

Les culots sont décongelés sur glace et resuspendus dans un tampon de lyse (20 mM Tris, 100 mM NaCl, 25 µg/mL DNase, 2.5 mM MgCl₂, 0.1 mg/mL lysozyme, 10 mM imidazole, complete EDTA-free, pH 7.7) additionné d'anti-protéases Compete EDTA-free. La lyse bactérienne est assurée ensuite par sonication 4 fois 2 minutes avec 1 minute de pause, amplitude 40%, cycle 0,3, et incubation 1h30 à 4°C. Après centrifugation 1h, 15000g à 4°C, le surnageant est utilisé pour une purification en 2 étapes. Le surnageant est chargé sur colonne HisTrapHP prééquilibrée avec le tampon A (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 7.7). Un gradient de 10-400 mM d'imidazole en tampon A permet l'élution des protéines. Les fractions contenant la protéine d'intérêt sont sélectionnées suit à l'analyse sur gel SDS-PAGE, western blot (anti-His, anti-EF), et coloration au bleu de Coomassie. Les fractions d'intérêt sont concentrées sur des unités de concentration avec un seuil de coupure de 30Kda par centrifugations. Les protéines ainsi concentrées sont ensuite chargées sur colonne Superdex S200increase 10/300GL prééquilibrée en tampon B (20 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 7.7) pour une purification supplémentaire. Les fractions sont sélectionnées comme décrit ci-dessus et concentrées sur des unités de concentration avec un seuil de coupure de 50Kda. La concentration en protéines est déterminée en mesurant l'absorbance à 280 nm.

Détermination de la cytotoxicité cellulaire des inhibiteurs.

Les cellules RAW264.7 ou A549 ont étéensemencées la veille en plaques 96 puits à 0.1 x 10⁶ cells/150 µL, puis incubées avec différentes concentrations d'inhibiteurs pendant 1h30 à 37°C. Après lavages en PBS, les cellules sont incubées 15 min avec 0,2% de cristal violet (Sigma Aldrich, V5265). L'excès de colorant est ensuite éliminé par lavages successifs en eau, et les puits asséchés. Le cristal violet incorporé dans les cellules est relargué par lyse cellulaire avec 200 µL de Triton X-100 0.5%. L'absorbance à 595 nm est mesurée au spectrophotomètre. Le pourcentage de viabilité cellulaire a été calculé à partir des valeurs d'absorbance normalisées par rapport au contrôle négatif (cellules sans inhibiteur) représentant 100% de viabilité. Les résultats sont issus d'au minimum trois expérimentations où chaque condition est étudiée en triplicat.

La liste des inhibiteurs ainsi que leurs cibles et la concentration utilisée pour chaque lignée sont indiquées dans le **Tableau D**.

Tableau D. Liste des inhibiteurs : cibles et concentrations.

Inhibiteur	cible	A549	RAW264.7
Cytochalasin D	Dépolymérisation de l'actine par inhibition de l'élongation des filament F-actine à l'extrémité (+)	5µM	10µM
Latrunculina	Dépolymérisation de l'actine par séquestration des monomères de G-actine	0,2µ/mL	0,4µ/mL
CASIN	Cdc42 GTPase	5µM	10µM
Nocodazole	Dépolymérisation des microtubules	10µg/mL	
Dynasore	Dynamine GTPase	100µM	
Dyngo4a	dynamine GTPase	25µM	25µM
BafilomycinA	Acidification des endosomes (spécifique de l'ATPase vacuolaire-type H ⁺)	400nM	
NH4Cl	Acidification des endosomes (diffuse dans endosomes et "proton sink")	40mM	
Chloroquine	Acidification des endosomes	500µM	400µM
EIPA	échangeurs Na ⁺ /H ⁺ de la membrane plasmique : inhibe l'acidification du pH sous-membranaire bloquant Rac1 et Cdc42	30µM	50µM
Rottlerin	Protéine kinase C (PKC)	5µM	
Wortmannin	PI3kinase/PI4K inhibitor	1000nM	
Genistein	Tyrosine kinases	400 µM	
Filipin	Fixation du cholestérol	0,5 µg/mL	
Nystatin	séquestration/fixation du cholestérol	5µM	25µM
Methyl β cyclodextrin (MβCD)	Déplétion en cholestérol	7,5 mM	
Monodansylcadaverine (MDC)	tissu transglutaminase inhibitor	100µM	
Pitstop2	inhibe l'association clathrin/amphiphysin	5µM	

Détermination des voies d'endocytose.

La cinétique d'endocytose est effectuée en incubant les cellules avec 100 nM EFvenus ou EFscarlet avec ou sans 300 nM PA pendant 1, 2, 5, 10, 20, 40, 60 ou 120 minutes à 37°C. Après lavages au PBS, les cellules sont traitées pour analyse au cytomètre de flux.

L'effet des inhibiteurs est observé en préincubant les cellules avec l'inhibiteur d'intérêt pendant 30 min à 37°C. Les cellules sont ensuite exposées pendant 1h à 37°C à 100 nM EFvenus ou EFscarlet avec ou sans 300 nM PA, ou à 10µg/mL de transferrine AF647 et 0,2µg/mL de toxine cholérique AF594, ou à 200µg/mL de Dextran 10kDa AF594 et 200µg/mL de Dextran 70kDa AF488. Après lavages au PBS, les cellules sont traitées pour analyse au cytomètre de flux ou par microscopie confocale.

Cytométrie de flux

Les cellules RAW264.7 ou A549 ont étéensemencées la veille en plaques 96 puits à 0.1×10^6 cellules/150 µL. Les cellules sont détachées avec 100 µL de trypsine 0,25% (A549) ou 0,55% (RAW264.7). Elles sont lavées au PBS et centrifugées 5 minutes, 2000 rpm à 4°C, puis marquées 30 minutes à 4°C avec du PBS + 2% BSA additionné de LiveDead blue (Thermofisher #L34962). Les cellules sont centrifugées puis lavées au PBS + 2% BSA, avant d'être fixées avec 4% de formaldéhyde pendant 10 minutes à température ambiante. Après centrifugation et lavage PBS + 2% BSA, les cellules sont resuspendues en PBS + 2% BSA. L'analyse est réalisée sur le cytomètre de flux CytoFlex LX (Beckman Coulter) sur la base de l'acquisition de 30.000 cellules viables. Les données obtenues sont analysées à l'aide du logiciel Kaluza.

Pour les expérimentations de cytométrie visant à détecter PA, l'anticorps anti-PA (List Laboratory, #781) a été biotinylé selon les instructions du fournisseur (Miltenyi, 130-093-389). Après l'étape de marquage au LiveDead blue, les cellules sont centrifugées puis lavées au PBS + 2% BSA, avant d'être saturées avec 100 µL de Fc-Block 10 minutes à température ambiante. Les cellules sont centrifugées puis marquées avec 100 µL anti-PA biotinylé ($1/100^e$) 10 minutes à 4°C, puis centrifugées et lavées avant d'être fixées avec 4% de formaldéhyde pendant 10 minutes à température ambiante. Après centrifugation et lavage PBS + 2% BSA, les cellules sont marquées 10 minutes à température ambiante avec 100 µL de Vio bright B515 reafinity ($1/50^e$, Miltenyi, 130-110-957) en SVF+Fc-Block pour le marquage extracellulaire ou en PermWash (BD biosciences, 51-2091KZ) pour le marquage intracellulaire, puis centrifugées et lavées avant d'être resuspendues en PBS + 2% BSA. L'analyse est réalisée sur le cytomètre de flux CytoFlex LX (Beckman Coulter) sur la base de l'acquisition de 30.000 cellules viables. Les données obtenues sont analysées à l'aide du logiciel Kaluza.

Microcopie confocale et immunofluorescence

Les cellules RAW264.7 ou A549 ont étéensemencées à $0,1 \times 10^6$ cells/150 μ L sur des lames de verre équipées d'un insert plastique contenant 12 puits de taille identique aux puits d'une plaque 96 puits. Après 1h (RAW264.7) ou 1h30 (A549) d'incubation avec 100 nM EFvenus ou EFscarlet avec ou sans 300 nM PA, les cellules sont lavées au PBS puis fixées avec 4% de formaldéhyde pendant 10 minutes à température ambiante. Après lavage, soit l'insert plastique est démonté et la lamelle montée avec du ProlongGlass/NucBlue, soit l'insert est conservé pour un marquage immunofluorescent.

Le marquage immunofluorescent des endosomes est réalisé comme suit. Les cellules sont incubées avec l'anticorps primaire à 4°C sur la nuit : anti-EEA1 (endosomes précoces), anti-Rab7 (endosomes tardifs). Les puits sont lavés au PBS, puis incubés avec l'anticorps secondaire 1 h à température ambiante : anti-chèvre AF594 et anti-lapin AF647 respectivement. Les puits sont lavés, l'insert retiré et la lame montée au ProlongGlass/NucBlue. Les images sont acquises par microscopie confocale puis traitées à l'aide du logiciel ImageJ.

Pour les expérimentations sur transwells (24 puits, membrane PET, pores 0.4 μ m), les cellules épithéliales A549, CHOK1, MDCK ou Calu-3 sontensemencées la veille à $0,1 \times 10^6$ cells/200 μ L dans le compartiment supérieur, et le compartiment inférieur complété en milieu de culture. Le lendemain, les cellules sont incubées avec 100 nM EFvenus ou EFscarlet avec ou sans 300 nM PA pendant 1h30 par dépôt au pôle apical dans le compartiment supérieur (150 μ l) ou au pôle basolateral dans le compartiment inférieur (450 μ l). Les cellules sont ensuite lavées 2 fois au PBS pour chaque compartiment, puis fixées avec 4% de formaldéhyde pendant 10 minutes à température ambiante. Après lavage au PBS, les membranes sont montées sur lame de verre à l'aide de ProlongGlass/NucBlue et de lamelles.

Dosage de EF

Les protéines purifiées ou des lysats cellulaires obtenus par lyse en tampon (50mM Tris pH7,5, 150mM NaCl, 1mM EGTA, 1mM EDTA, 1% NP40 10X, 50mM NaF, Complete EDTA-free) constituent les échantillons à doser.

Le mélange réactionnel contenant 100 μ L d'échantillon, 54 mM ATP et 250 mM de calmoduline est incubé 30 minutes à 30°C sous agitation à 250 rpm. Sur glace, 45 μ L de périodate de sodium sont ajoutés suivi d'une incubation 5 minutes à 37°C 250 rpm ; puis 20 μ L de rhamnose suivi d'une incubation 20 minutes à 37°C 250 rpm. L'acétylation permettant d'augmenter la sensibilité de détection est réalisée par ajout de 33 μ L d'hydroxyde de potassium et 8 μ L d'acide acétique anhydre vortexé 15 secondes, puis par un nouvel ajout de 8 μ L d'hydroxyde de potassium.

Le dosage de l'AMPc est réalisé par ELISA en plaques 96 puits dans lesquelles 100 μ L d'un anticorps monoclonal de souris anti-AMPc dilué dans du tampon phosphate 0,05M pH7,4 sur la nuit à 4°C sont ajoutés. Une gamme de EF de 0 à 50 pg/mL est réalisée en tampon de réaction (BSA 555 μ g/mL, Hepes 20 mM, MgCl₂ 10 mM, CaCl₂ 10 μ M, pH7,2). Les plaques sont lavées en tampon de lavage (tampon phosphate 0,01M, pH7,4, Tween20 0,05%). 50 μ L échantillons sont déposés, ainsi que 50 μ L de tampon ELISA (tampon phosphate 0,1M, pH7,4, NaCl 0,15M, BSA 0,1%, EDTA 1mM, azide de sodium 0,01%), 50 μ L de traceur et 50 μ L d'antisérum. La plaque est incubée 2h à température ambiante sans agitation. Après lavages, 200 μ L de réactif d'Ellman sont ajouté puis la plaque incubée sur la nuit à température ambiante, 100rpm à l'abri de la lumière. L'absorbance est mesurée à 405 nm et 620 nm afin de calculer la concentration en protéine EF.

Dosage de l'AMPc

Les cellules sontensemencées en plaques 6 puits à 1.10⁶ cellules par puits à J-2. A J0, elles sont incubées en présence de 100 nM EF (List Laboratory), EFvenus ou EFscarlet, avec ou sans 300 nM PA. Au temps indiqué, les cellules sont lavées au PBS puis lysées avec 150 μ L de HCl 0,1M. Les cellules sont grattées, collectées, dissociées par pipetage et incubées 10 minutes sur glace. Après centrifugation 10 minutes, 12.000rpm à 4°C, le surnageant est utilisé pour analyse. La quantité de protéines totales est estimée par la méthode de Bradford.

La concentration d'AMPc intracellulaire est mesurée dans le surnageant de lyse par technique ELISA comme décrit dans le dosage de EF ci-dessus. Une gamme étalon allant de 0.3 pmol/mL à 250 pmol/mL d'AMPc est préparée en utilisant le surnageant de cellules non traitées. L'interférence ATP est éliminée par réaction chimique et l'acétylation de l'AMPc est effectuée afin d'augmenter la sensibilité de détection. L'absorbance est mesurée à 405 nm et permet de déterminer la concentration en AMPc en pmol/mL dans les surnageants à partir des valeurs de la gamme étalon. Cette valeur est rapportée à la quantité de protéines totales de l'échantillon afin de normaliser les résultats.

Résultats

1/ Obtention de facteurs EF et LF fluorescents solubles.

1.1/ Clonage : constructions géniques codant pour des facteurs fluorescents.

Les séquences nucléotidiques et protéiques des toxines de *B. anthracis*, de *B. cereus anthracis-like* G9241 et Bcbva Côte d'Ivoire (Bcbva CI), présentent de fortes identités de séquences (**Tableau E**). Nous faisons l'hypothèse que les caractéristiques de chacun des facteurs pourraient être identiques pour l'ensemble de ces souches. Les séquences codant les facteurs EF de la souche G9241 et LF de la souche Bcbva CI ont été amplifiées et utilisées comme base pour les manipulations de biologie moléculaire. Lors de la traduction du facteur odémateux EF et du facteur létal LF par la bactérie, chacune de ces protéines est produite sous forme immature. Suite au clivage du peptide signal, la protéine mûre est sécrétée. Les clonages réalisés comportent donc la séquence codant pour le facteur mûre.

Tableau E. Pourcentage d'identité de séquence nucléotidique et protéique des toxines de 3 souches de Bacillus responsables de la maladie du charbon (*B. anthracis*) ou de pathologies similaires (*B. cereus* G9241, *B. cereus anthracis-like* Côte d'Ivoire).

Alignement nucléotidique		G9241	Bcbva CI
B. anthracis	PA	99,80%	99,80%
	EF	99,60%	99,70%
	LF	98,50%	99,50%
G9241	PA		100%
	EF		99,90%
	LF		98,50%

Alignement protéique		G9241	Bcbva CI
B. anthracis	PA	99,70%	99,70%
	EF	99,50%	99,25%
	LF	98,40%	99,10%
G9241	PA		100%
	EF		100%
	LF		98,50%

Design de la fusion

Les étapes de clonage visent à construire **une fusion transcriptionnelle** (même cadre de lecture) entre le gène codant pour le facteur et celui codant pour la protéine fluorescente. Le gène codant pour la protéine fluorescente a été ajouté à l'extrémité 3' du gène *cya* (EF) ou *lef* (LF) (**Figure 1**). La protéine fluorescente est donc du côté du domaine catalytique C-terminal de EF ou LF afin de prévenir une interférence avec le domaine N-terminal de fixation à PA. Le clonage de cette fusion dans le plasmide pQE60 permet une expression sous le contrôle d'un promoteur T5 inductible à l'IPTG après transformation dans les bactéries *E. coli*. Une étiquette poly-histidine (6his) est ajoutée afin de faciliter la purification ultérieure de ces protéines recombinantes fluorescentes. Le passage du 6his en N-terminal de la protéine a été réalisé pour quelques constructions, puisque décrit comme facilitant la translocation à travers le pore lors de l'infection (Neumeyer *et al.*, 2006).

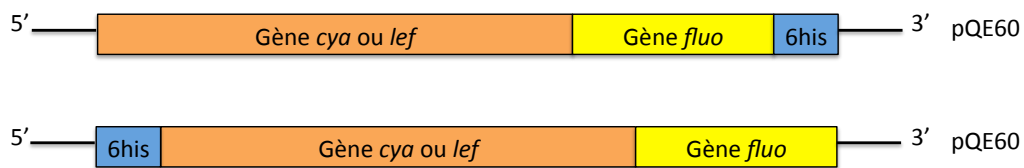


Figure 1. Représentation schématique de la séquence codant les protéines fluorescentes.
 Le plasmide pQE60 contient le gène *cya* ou *lef* (orange) fusionné au gène codant la protéine fluorescente (jaune). Une étiquette polyhistidines 6His (bleu) est ajoutée en 3' ou en 5'.

L'optimisation de la technique de clonage compatible avec l'exploitation des identités de séquence terminales des gènes codant les protéines fluorescentes employées, a permis l'obtention simultanée de 3 constructions distinctes pour une unique réaction de ligation. La liste des plasmides contenant les diverses fusions entre EF ou LF et une protéine fluorescente est indiquée dans le **Tableau F**.

Construction d'un mutant bactérien exprimant un facteur fluorescent.

Il s'agit d'obtenir des souches bactériennes ayant intégré au sein de leur génome, de façon stable, une copie de la fusion toxine fluorescente. Ainsi, chaque nouvelle souche exprimera de façon « naturelle » la toxine fluorescente au moment opportun et en quantité physiologique.

Des expérimentations pour la construction de mutants *Bacillus cereus* biovar anthracis (Bcbva) toxigène non capsulés (souche CAR-H) ont été initiées. La technique employée vise à minimiser toute marque d'insertion afin de rester au plus proche de la séquence initiale (Janes et Stibitz, 2006) et éviter l'ajout de gènes d'antibiorésistance comme cela peut être observé lors d'utilisation d'autres protocoles de recombinaison. Cependant, afin d'obtenir une expression optimale, il a été nécessaire d'adapter la séquence codante des protéines fluorescentes « *fluoOpt* » aux contraintes liées à Bcbva. En effet, l'usage de codons diffère lors d'une expression en système bactérien à Gram- (*E. coli*) et en système bactérien à Gram+ à faible taux de guanosine et cytosine (*B. anthracis* et *Bacillus cereus* biovar anthracis) (Sastalla *et al.*, 2009). Les constructions plasmidiques ont été conçues dans le but d'effectuer une conjugaison hétérogramique à partir d'une souche donneuse *E. coli* porteuse d'un plasmide conjugatif pBKJ236 adapté contenant les gènes *cya-fluoOpt* (Janes et Stibitz, 2006) (**Figure 2A**). Ce plasmide possède un site de restriction sensible à une enzyme produite par un plasmide suicide qui sera introduit par la suite afin d'éliminer tout contenu plasmidique.

Les premiers résultats montrent une expression de la protéine EF-GFPopt lors de la première étape du processus de conjugaison hétérogramique (**Figure 2B**). Toutefois, le protocole requiert des adaptations expérimentales et n'a pu être poursuivi pour le moment.

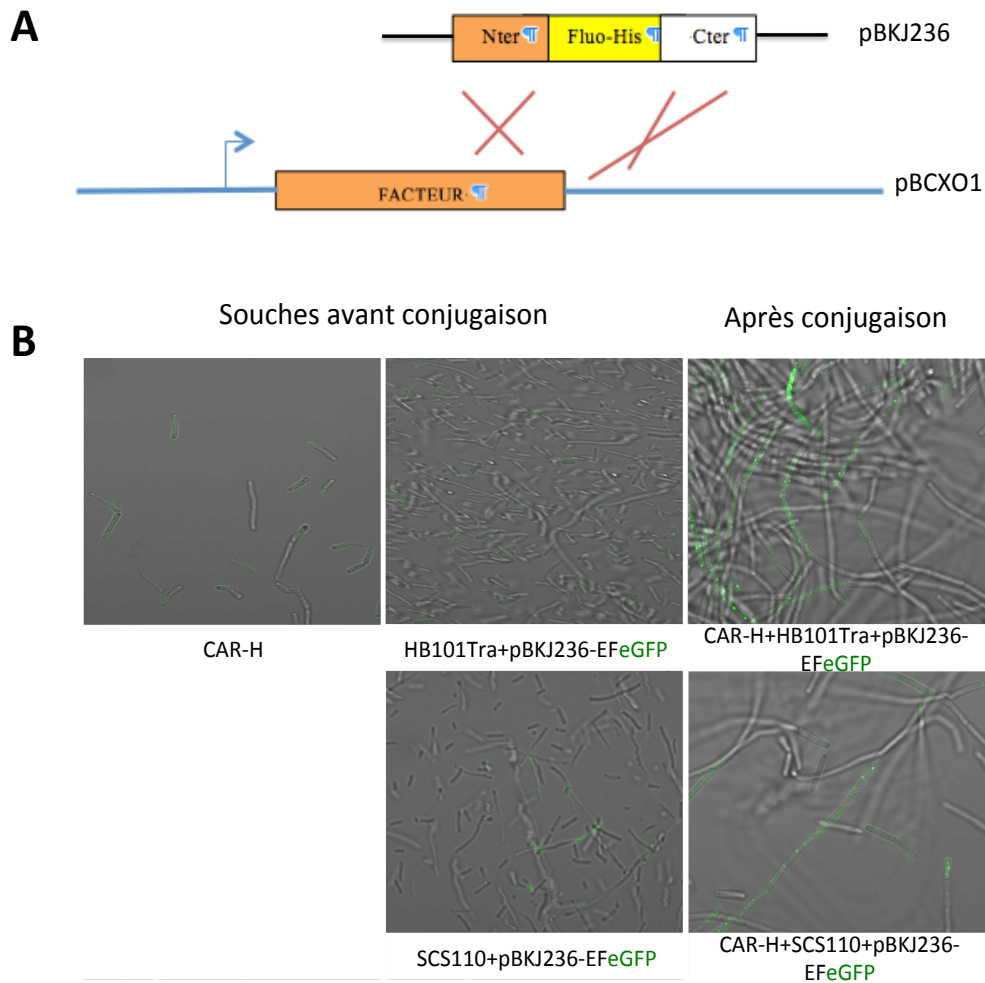


Figure 2. Conjugaison hétérogramique des souches Bcbva CAR-H pour l'intégration du gène codant EF-eGFP. (A) Représentation schématique de la recombinaison homologue pour la création de mutants exprimant le facteur fluorescent. La fusion génique à intégrer possède des homologies de séquence en C-terminal (Cter) et N-terminal (Nter) avec la séquence cible endogène située sur le plasmide pBCXO1 de la souche CAR-H. (B) Les bactéries CAR-H toxigènes non capsulées ont été conjuguées avec les bactéries *E.coli* HB101Tra ou SCS110 transformés par le plasmide pBKJ236-EFeGFP codant le facteur EF-eGFP. Les bactéries conjuguées ont été observées en microscopie confocale.

Plusieurs protéines fluorescentes ont été individuellement fusionnées afin de disposer d'un panel de couleur pouvant être combiné à souhait avec les contraintes expérimentales futures (suivi du trafic intracellulaire, combinaison de marquage immunofluorescents, cytométrie, microscopie confocale ou bi-photonique).

L'étude de différents aspects a été envisagée à partir des caractéristiques particulières des protéines fluorescentes :

- Une caractérisation spatiale grâce à une protéine fluorescente utilisable en Western Blot, cytométrie de flux, microscopie confocale.
- Une caractérisation temporelle dynamique avec une protéine dont la fluorescence dépend de son environnement. Ces protéines dont la fluorescence dépend du pH permettent de suivre le trafic endosomal (pHluorin, pHuji) (Sankaranarayanan *et al* 2000 ; Shen *et al.*, 2014) ; ou d'estimer la translocation et la présence d'une activité enzymatique de EF pour une fluorescence variant en fonction du taux d'AMPc (Flamindo2, Pink Flamindo) (Odaka *et al.*, 2014 ; Harada *et al.*, 2017).
- Une caractérisation physiopathologique en suivant l'expression et la localisation de la protéine ou encore son internalisation *in vitro* et *in vivo*, par utilisation du facteur fluorescent purifié ou du mutant bactérien exprimant le facteur fluorescent de façon endogène.

Tableau F. Liste des plasmides construits contenant les fusions géniques des gènes codant les facteurs EF ou LF, avec les gènes codant les protéines fluorescentes. Une étiquette polyhistidine (His) est ajoutée en N-terminal (Nter) ou C-terminal (Cter) de la fusion afin de permettre de faciliter la purification des protéines recombinantes. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission de chaque protéine fluorescente est indiqué, et associé au code couleur correspondant.

Insert Cya – étiquette polyhistidines en Cter	Insert cya – étiquette polyhistidines en Nter	Insert Lef – étiquette polyhistidines en Cter	Fluorescence (excitation/émission)
Fluorescence classique			
pQE60-Cya-His		pQE60-Lef-His	
pQE60-Cya-mTurquoise2-His			434nm/474nm
pQE60-Cya-eCFP-His	pQE60-His-EF-eCFP	pQE60-Lef-eCFP-His	434nm/477nm
pQE60-Cya-eGFP-His	pQE60-His-EF-eGFP	pQE60-Lef-eGFP-His	488nm/507nm
pQE60-Cya-mAmetrine-His			406nm/526nm
pQE60-Cya-mVenus-HisTag	pQE60-His-EF-mVenus	pQE60-Lef-mVenus-His	515nm/527nm
pQE60-Cya-eYFP-His		pQE60-Lef-eYFP-His	513nm/527nm
pQE60-Cya-LSSmOrange-His			437nm/572nm
pQE60-Cya-mCyRFP1-His			528nm/594nm
pQE60-Cya-mApple-His			568nm/592nm
pQE60-Cya-mScarlet-His			569nm/593nm
pQE60-Cya-mStrawberry-His			574nm/596nm
pQE60-Cya-mCherry-His		pQE60-Lef-mCherry-His	587nm/610nm
pQE60-Cya-mKate2-His			588nm/633nm
pQE60-Cya-mNeptune2.5-His			599nm/643nm
pQE60-Cya- mMaroon1-His			609nm/657nm
Fluorescence fonctionnelle			
pQE60-Cya-pHuji -His			566nm/598nm
pQE60-Cya-Flamindo2-His			504nm/523nm
Fluorescence optimisée pour les genomes à bas %GC			
pQE60-Cya-CFPopt-His		pQE60-Lef-CFPopt-His	434nm/477nm
pQE60-Cya-GFPopt-His		pQE60-Lef-GFPopt-His	488nm/507nm
pQE60-Cya-YFPopt-His		pQE60-Lef-YFPopt-His	513nm/527nm

1.2/ Optimisation des conditions d'expression en système bactérien *E. coli*

L'expression de la protéine, suite à transformation dans les bactéries du plasmide pQE60 contenant la fusion génique, est permise par l'induction à l'IPTG en phase exponentielle de croissance. Afin de déterminer si l'expression de la protéine est bien induite en présence d'IPTG, la collecte d'échantillons de culture avant et après induction permet de contrôler la capacité d'induction des conditions expérimentales sélectionnées. La protéine est produite et séquestrée dans la bactérie, il est donc nécessaire de procéder à une étape de lyse bactérienne en condition native, permettant de collecter une fraction dite soluble (le surnageant) et une fraction insoluble (le culot). L'analyse par western blot permet d'identifier la localisation de la protéine d'intérêt, et de définir si la protéine est soluble en fonction des conditions testées.

L'induction de l'expression par l'IPTG est validée puisque que l'on observe bien une bande à la taille attendue pour chaque protéine lors de la détection en western blot avec un anticorps dirigé contre l'étiquette 6his et par coloration des protéines totales (EF non fluorescent 89kDa, EF fluorescent 116kDa) (**Figure 3, Figure 4**). Afin d'optimiser la production d'une protéine soluble et fluorescente, les conditions optimales d'induction de l'expression ont été déterminées. L'induction est observée pour les différentes conditions d'induction étudiées (température et durée d'induction). Cependant, aucune coloration des culots n'est observable lors de l'induction 2h à 37°C ou 3h à 30°C, ni lors de l'analyse de l'induction en cinétique de 2h à 6h à 30°C et 25°C (données non montrées). Seules les inductions sur la nuit à 16°C et 20°C ont permis d'obtenir un facteur chimérique soluble et coloré (**Figure 5**). Ces protéines sont exprimées dans la fraction soluble (surnageant, SN) ainsi que dans la fraction insoluble (culot, pur-1^e ou dilué au 10^e) (**Figure 3**). Par ailleurs, le culot résiduel contient encore des protéines solubles puisque sa lyse permet de réextraire des protéines dans les fractions solubles dans toutes les conditions d'induction étudiées (données non montrées).

Néanmoins, l'expression des chimères LF est fortement réduite comparée à celle de chimères EF, puisque l'induction de LF-eGFP-his et LF-mVenus-his n'est visible qu'en western blot et non par coloration au bleu de Coomassie. Etant donné la faible quantité de protéines chimériques LF exprimée, leur expression nécessite d'être optimisée avant de pouvoir les purifier et les utiliser.

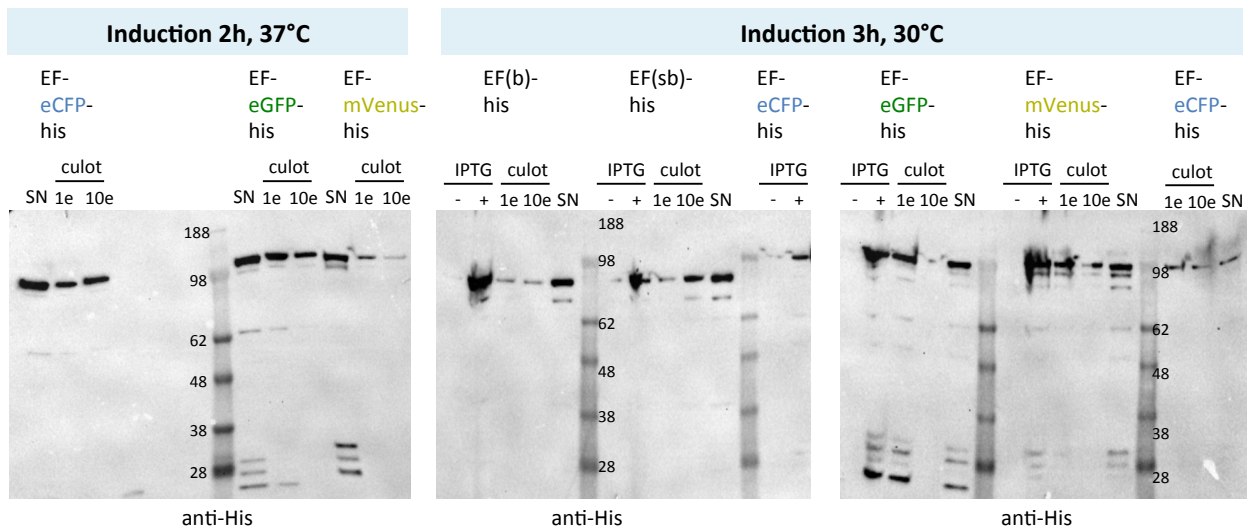


Figure 3. Expression des protéines chimériques EF par induction à 37°C/2h et 30°C/3h et solubilité. Des cultures de bactéries NEB expressIq possédant un des plasmides codant les protéines EF(b)-his, EF(sb)-his, EF-eCFP-his, EF-eGFP-his et EF-mVenus-his, ont été induites à l'IPTG pendant 2h à 37°C ou 3h à 30°C. Un échantillon est prélevé avant induction (-IPTG) et après induction (+IPTG). La culture induite par l'IPTG a ensuite été lysée puis centrifugée afin de dissocier le surnageant (SN) et le culot. Les échantillons sont dénaturés et analysés par SDS-PAGE et western blot anti-histidine.

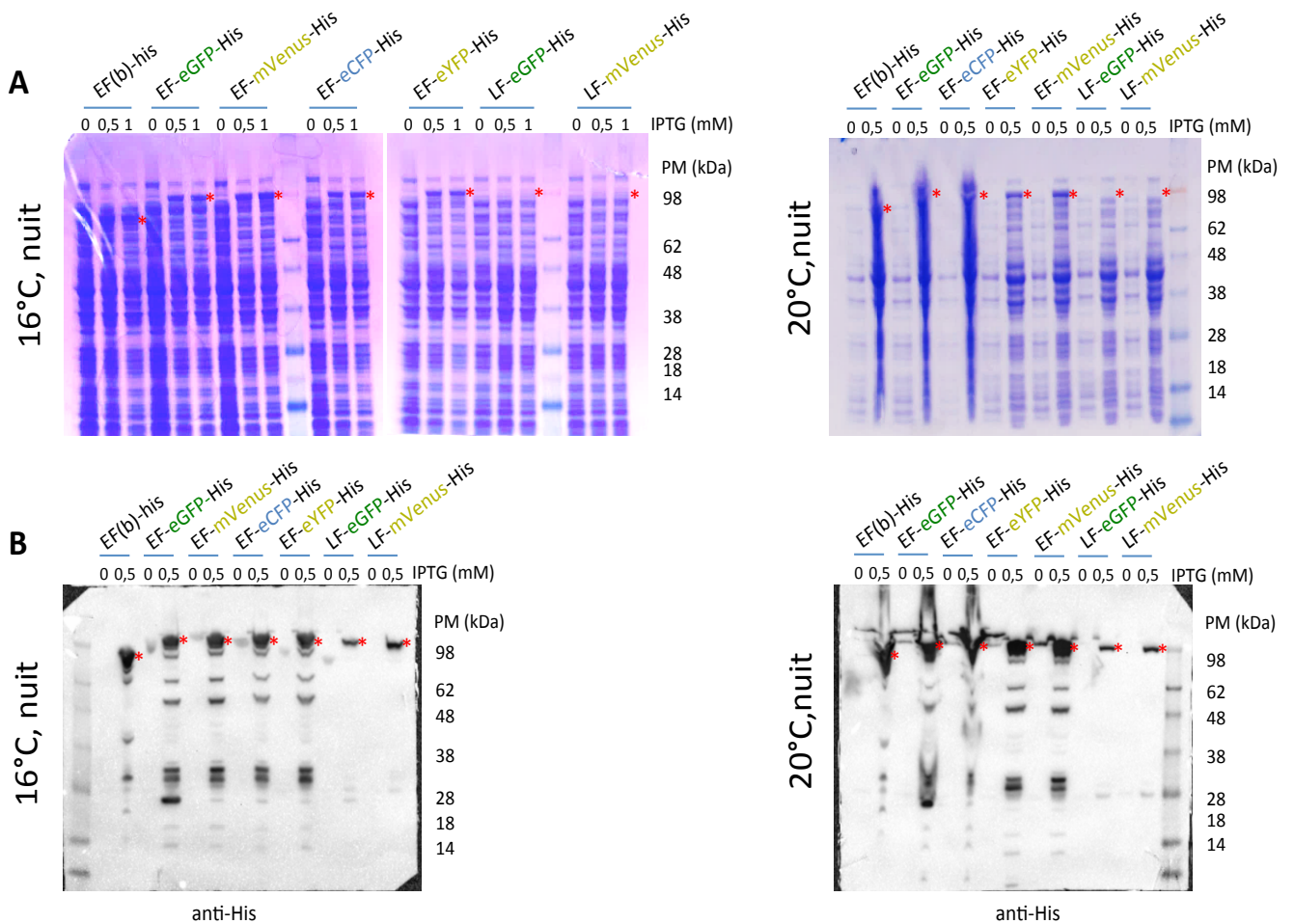


Figure 4. Expression des protéines chimériques EF et LF par induction sur la nuit à 16°C et 20°C. Les bactéries NEB expressIq transformées avec les plasmides pQE60-cya(b)-his, pQE60-cya(sb)-his, pQE60-cya-eCFP-his, pQE60-cya-eGFP-his, pQE60-cya-mVenus-his, pQE60-lef-eGFP-his ou pQE60-lef-

mVenus-his codant respectivement les protéines *EF(b)-his*, *EF(sb)-his*, *EF-eCFP-his*, *EF-eGFP-his*, *EF-mVenus-his*, *LF-eGFP-his* et *LF-mVenus-his*. Un échantillon de culture bactérienne est prélevé avant induction (0 mM) et après induction de l'expression des protéines à l'IPTG (0,5 mM ou 1 mM) sur la nuit à 16°C ou 20°C. Les culots bactériens sont dénaturés et analysés par SDS-PAGE puis (A) coloration au bleu de Coomassie ou (B) western blot anti-his. La bande correspondante à la protéine d'intérêt est indiquée (*).



Figure 5. Culots obtenus suite à l'induction de l'expression des facteurs EF fluorescents recombinants. L'induction a été faite sur la nuit à 20°C avec 0,5 mM d'IPTG, en bactéries *E.coli* NEB express Iq.

2/ Purification et pureté des EF fluorescents solubles

2.1/ Une double purification des facteurs fluorescents est nécessaire.

Suite à la lyse des bactéries contenant les protéines chimériques exprimées par induction à 20°C sur la nuit, une purification de ces protéines présentes dans la fraction soluble (le surnageant) en deux étapes est nécessaire. Ces purifications sont réalisées sur un système AKTA (GE HealthCare) équipé d'un détecteur triple longueur d'onde permettant de suivre simultanément les protéines (280 nm) et la fluorescence (longueur d'onde d'excitation indiquée dans le **Tableau F**). Le couplage de l'analyse sur l'AKTA (**Figure 6A, B**) et de l'identification de la protéine EF fluorescente par western blot (**Figure 6C**) permet de contrôler la qualité de la purification.

Une première sélection est effectuée par chromatographie d'affinité sur résine de nickel (**Figure 6A**). L'affinité du nickel permet la rétention de protéines porteuses de l'étiquette 6his. Un gradient d'imidazole décroche les protéines EF fluorescentes entre 70 et 170 mM d'imidazole correspondant au pic à 10 mL (**Figure 6A**) et aux fractions A8, A11 et A15 de la **Figure 6C**. Des protéines contaminantes étant présentes, une seconde sélection est effectuée en fonction de la taille par filtration sur gel à partir du produit de purification précédent (**Figure 6B**). De la même manière, les fractions A6 et A11 situées au début et à la fin du pic à 12 mL permettent la sélection de fractions d'intérêt et dépourvues de protéines contaminantes.

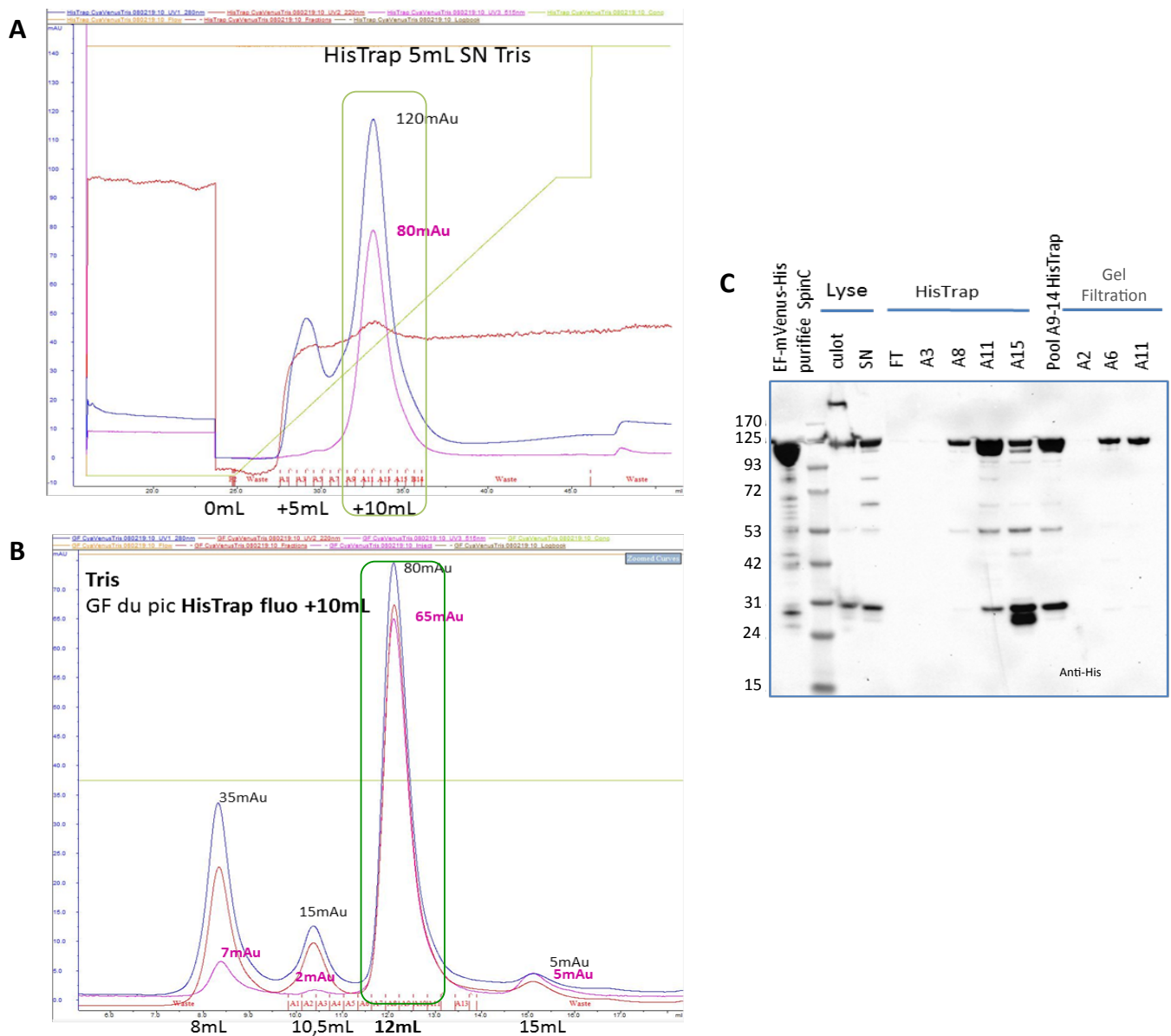


Figure 6. Purification de la protéine EF-venus-his. (A) chromatographie d'affinité sur résine de nickel HisTrap selon un gradient d'imidazole (courbe verte), le pic correspondant à la protéine est indiquée par le cadre vert clair, (B) filtration sur gel des fractions sélectionnées lors de la chromatographie d'affinité, le pic correspondant à la protéine est indiquée par le cadre vert foncé. Absorbance à 280 nm (courbe bleue), à 220 nm (courbe rouge) et à 515nm (courbe rose). (C) Western blot anti-histidine des fractions des deux purifications précédemment mentionnées, Après lyse, le surnageant SN suit les 2 étapes de purification, FT correspond aux protéines éliminées lors du lavage après chargement du surnageant sur la colonne HisTrap, A correspond aux fractions collectées dans chaque étape de purification.

2.2/ Présence de clivages au cours de la purification de certains EF fluorescents.

La qualité des protéines purifiées a été estimée par coloration des protéines totales au bleu de Coomassie (Figure7A) ou au nitrate d'argent (Figure7B), ainsi que par Western Blot à l'aide d'anticorps dirigés

contre EF (anti-EF), contre la protéine fluorescente (anti-GFP) ou contre l'étiquette histidine 6his (anti-His) afin de vérifier l'absence de protéolyse (**Figure 8**).

La purification des protéines fluorescentes est satisfaisante pour les technologies qui seront utilisées par la suite. Les contaminants protéiques sont en quantité négligeable, bien que certaines contiennent un contaminant présent en plus grande quantité : EF-mApple-His, EF-pHuji-His, EF-mScarlet-His, et EF List Lab (**Figure 7***). De plus, les protéines produites sont plus pures que le EF issu du commerce (EF List Lab), contaminé par une protéine dont la masse apparente est inférieure à 72 kDa (**Figure 7**). Par ailleurs, la qualité du EF commercial semble dépendre du lot, puisque la présence du contaminant est variable, de même que la qualité de l'activité enzymatique (observations non montrées).

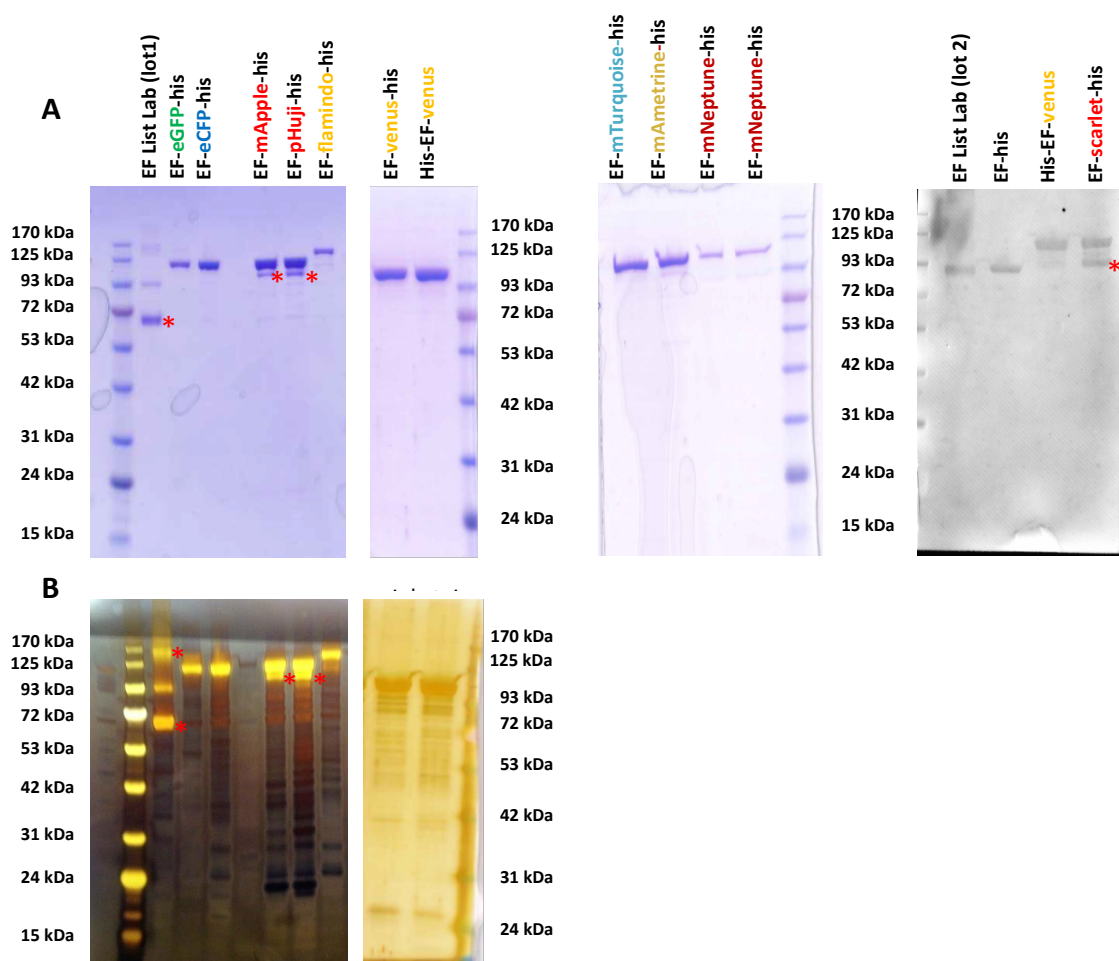


Figure 7. Pureté des EF fluorescents purifiés. Un μg de protéine purifiée est dénaturé et déposé sur gel SDS-PAGE. (A) Coloration du gel au bleu de Coomassie, ou marquage stain free Biorad pour le blot de droite (B) Coloration au nitrate d'argent. Les astérisques rouges indiquent les bandes contaminantes majeures. Tailles attendues : EF List Lab et EFhis (89 kDa), EF fusionné à une protéine fluorescente (115 kDa) excepté la fusion avec Flamindo (135 kDa).

Des formes tronquées de certaines protéines purifiées sont visibles en western blot (**Figure 8**). En effet, l'analyse sur gel SDS-PAGE puis la détection des protéines par un anticorps dirigé contre le 6his, montre un clivage d'une partie des protéines EF-mTurquoise-His, EF-mAmetrine-His, EF-mApple-His, EF-pHuji-His, EF-mCherry-His, EF-mStrawberry-His, EF-mCyRFP1-His et EF-mMaroon1-His, à différents sites y compris à proximité de la fusion entre EF et la protéine fluorescente (bande à environ 24 kDa). Il en est de même pour EF-eGFP-His et EF-eCFP-His lors de l'analyse western blot avec un anticorps dirigé contre la protéine fluorescente. Une optimisation des conditions de purification et de conservation est nécessaire pour l'obtention de facteurs EF fluorescents de meilleure qualité et stables.

Les protéines EF-mVenus-His et His-EF-mVenus sont suffisamment pures avec une protéolyse restreinte, de même que la protéine EF-Flamindo-His.

La protéine EF-mScarlet-His représente la seule protéine chimérique émettant une fluorescence dans la longueur d'onde « rouge » non contaminée par une protéine fluorescente clivée d'environ 24 kDa (étiquette 6his en C-terminal de la protéine fluorescente) (**Figure 8**). Le fragment de protéolyse correspond à une protéine dont la taille est supérieure à 90 kDa et reconnue par l'anticorps dirigé contre EF et non par celui dirigé contre le 6his. Le produit de purification de EF-mScarlet-His est donc contaminé par une protéine EF non fluorescente tronquée au niveau de la protéine mScarlet. Le choix d'un facteur EF fluorescent « rouge » est par conséquent orienté vers EF-mScarlet-his dont le signal de fluorescence sera spécifique de la protéine chimérique.

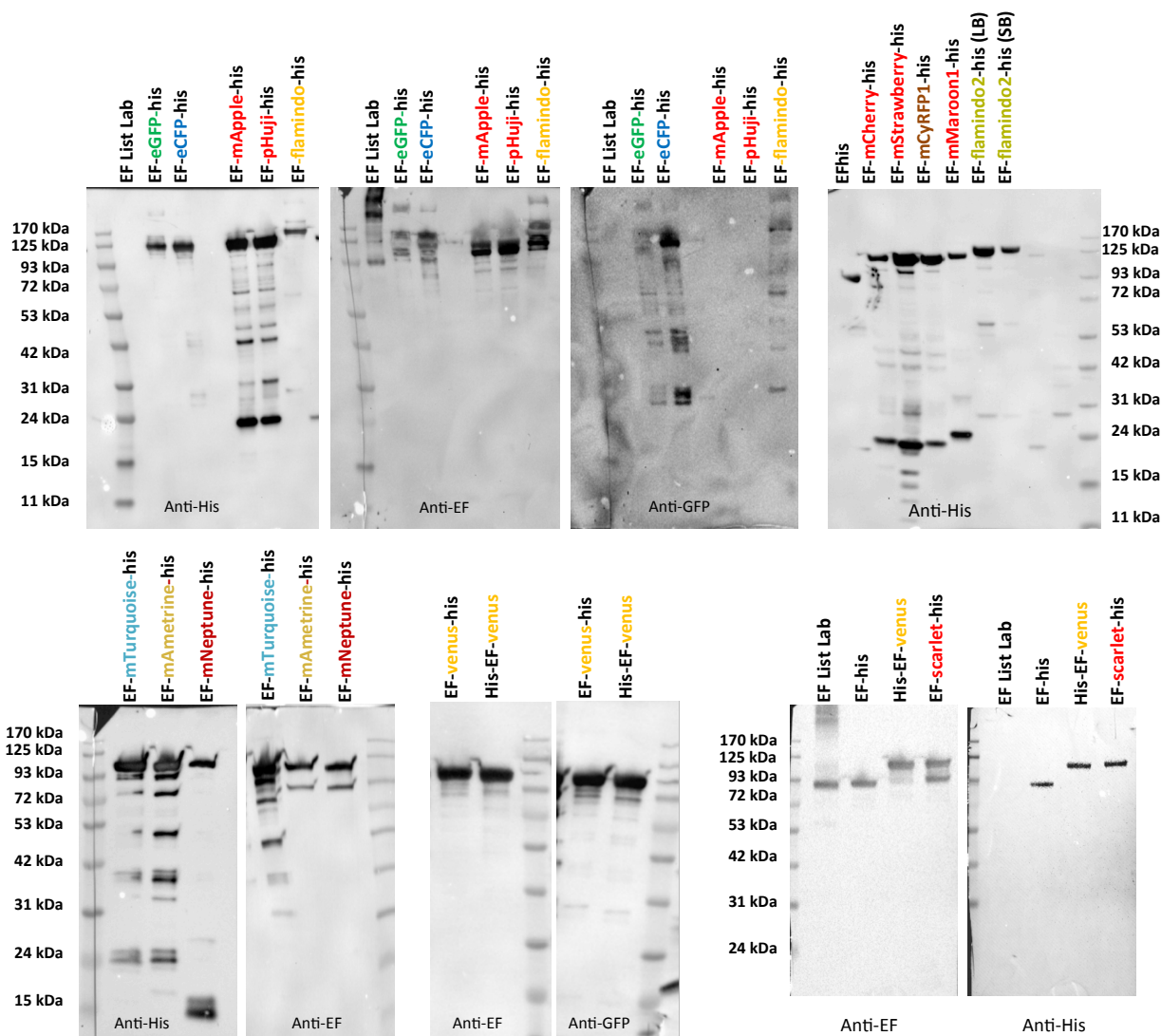


Figure 8. Détection de formes clivées des EF fluorescents purifiés. Un μg de protéine purifiée est dénaturé et déposé sur gel SDS-PAGE puis analysé par Western blot. Anticorps anti-EF (#773L, 1/2000), anti-His (#631212, 1/5000), anti-GFP (#6556, 1/2000). Aucun anticorps n'est disponible pour les protéines fluorescentes dans les longueurs d'onde « rouge ». L'induction de l'expression de EF-Flamindo2-His, a été comparée en milieu Luria Bertani (LB) et milieu Superior Broth (SB).

3/ Caractérisation des EF fluorescents solubles purifiés.

3.1/ Influence de la position de l'étiquette histidine.

L'étiquette 6his classiquement ajoutée en C-terminal des protéines recombinantes a été placée en N-terminal pour certaines constructions. Le comportement des chimères EF-GFP et EF-venus a été comparé en fonction de la position de l'étiquette, puisque une étude montre que la présence du 6His en N-terminal favorise la translocation (Neumeyer *et al.*, 2006).

L'endocytose de EF-GFP et EF-venus n'est que peu modifiée (Figure 9). L'activité adénylate cyclase est similaire pour la chimère EF-GFP, alors qu'elle est augmentée pour EF-venus lorsque le 6his est en N-

terminal. En combinant les divers résultats, le choix de la protéine His-EF-venus (appelée par la suite EFvenus) semble être le plus approprié.

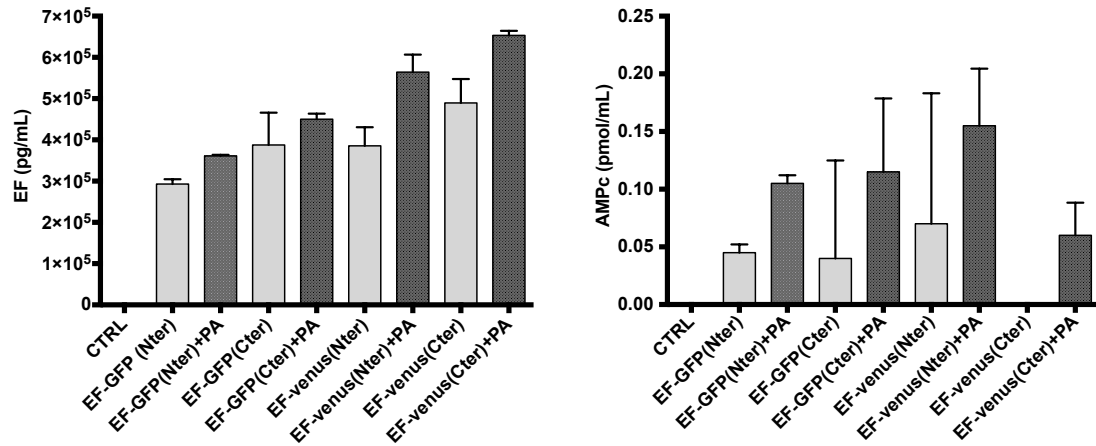


Figure 9. Influence de la position de l'étiquette histidine sur l'entrée et l'activité des EF fluorescents. Les macrophages RAW264.7 sont intoxiqués pendant 1h30 avec EF (*List Laboratories*), EF-GFP et EFvenus à 100 nM avec ou sans PA 300 nM. La position de l'étiquette polyhistidines est en C-terminal (Cter) ou en N-terminal (Nter) de la protéine. Après lavage au PBS et lyse cellulaire, les taux de EF et d'AMPC sont quantifiés dans les surnageants par ELISA. Résultats n=2 en monoplicat.

3.2/ Le signal de fluorescence de EFvenus est spécifique de la protéine chimérique.

Afin de s'assurer que le signal de fluorescence de EFvenus est bien attribuable à l'internalisation de la protéine de fusion et non à sa partie mVenus, ni à la présence du DMSO (solvant de dissolution des inhibiteurs d'endocytose), des contrôles ont été réalisés. Les cellules seules (CTRL) ou exposées à EFvenus+PA (ETvenus) correspondent respectivement aux contrôles négatif et positif de fluorescence, un signal étant attendu lorsque EFvenus est en présence de PA.

La protéine de fusion EFvenus ou la protéine fluorescente mVenus purifiée ont été mises en présence des cellules et leur internalisation permise pendant 1h à 37°C, le signal de fluorescence a été analysé dans les conditions d'excitation de mVenus. Un signal de fluorescence est observé en microscopie confocale (Figure 10) et en cytométrie de flux (Figure 11) lors de l'incubation de EFvenus en présence de PA, comme attendu. Aucun signal significatif n'est observé pour les deux techniques employées lors d'une incubation des cellules avec la protéine mVenus.

Par ailleurs, la concentration en DMSO utilisée (1/10⁶ du volume du puits au maximum) n'influe pas sur les résultats de fluorescence en cytométrie de flux lors de l'ajout d'inhibiteurs (Figure 11). Ce contrôle

est réalisé au regard des expérimentations visant à définir les voies endocytaires empruntées par EFVenus, les inhibiteurs d'endocytose étant dissous en DMSO.

De fait, la détection d'un signal de fluorescence dans les conditions d'excitation de la protéine EFVenus est spécifique de EFVenus, témoignant que sa présence en intracellulaire n'est pas provoquée par une reconnaissance de sa partie fluorescente, mais bien de celle du facteur EF lui-même.

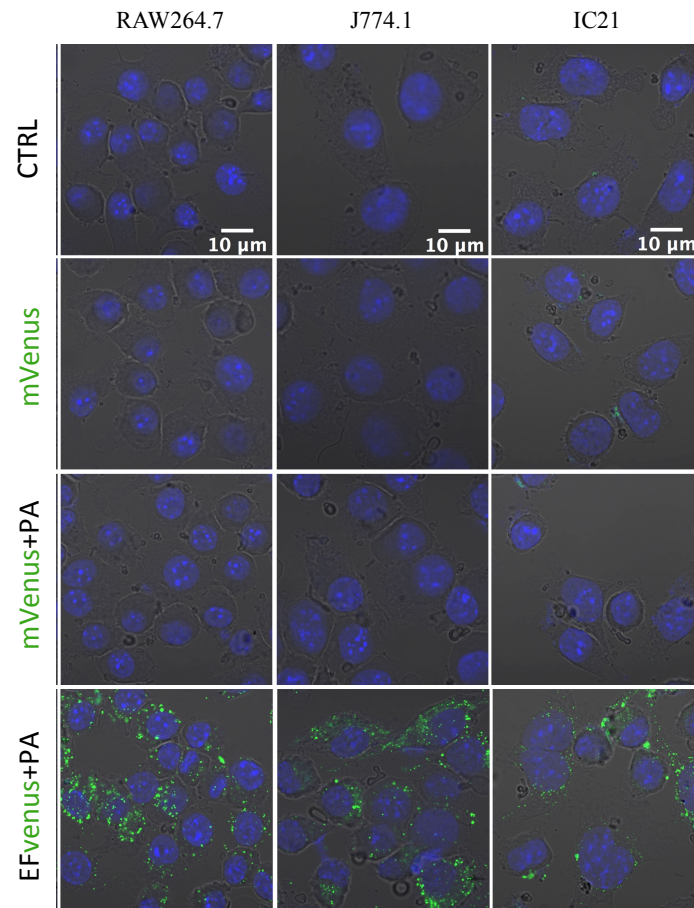


Figure 10. Le signal fluorescent est spécifique de EFVenus lors de l'internalisation cellulaire. Différentes lignées de macrophages murins ont été incubées en présence de la protéine mVenus 100 nM +/- PA 300nM, ou de EFVenus 100 nM + PA 300 nM, 1h à 37°C. Les cellules seules (CTRL) sont utilisées comme contrôle négatif. Après lavage et fixation, la fluorescence est observée par microscopie confocale. Les noyaux sont colorés au DAPI (bleu), les protéines mVenus et EFVenus apparaissent en vert.

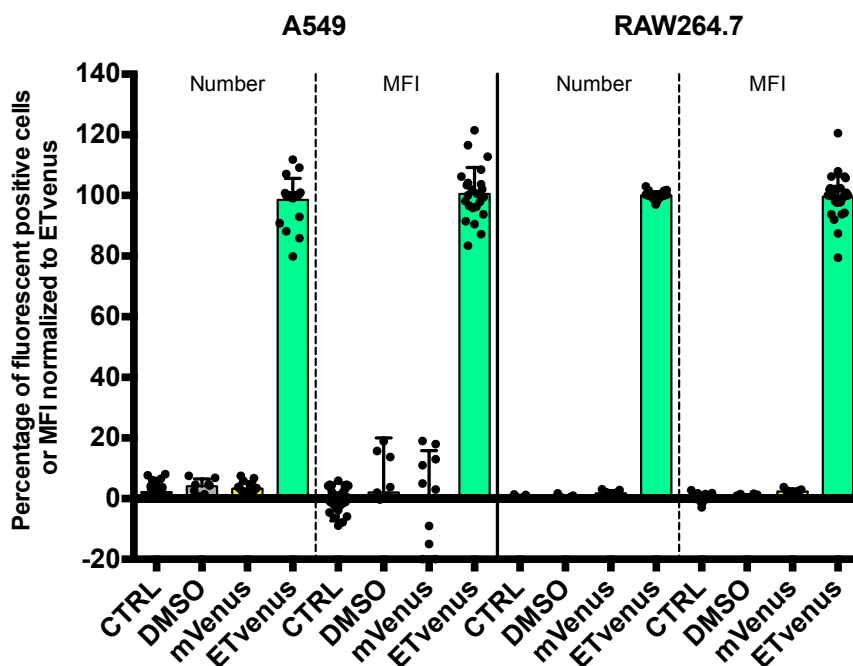


Figure 11. Spécificité de fluorescence intracellulaire de EFVenus *in vitro* en cytométrie de flux. Les cellules A549 ou RAW264.7 sont mises en présence de DMSO, mVenus-His, ou ETVenus (EFVenus 100 nM + PA 300 nM) durant 1h à 37°C. Les cellules seules (CTRL) sont utilisées comme contrôle négatif. Le nombre de cellules vivantes positives en fluorescence est normalisé par rapport à la fluorescence de ETVenus.

3.3/ Les EF fluorescents sont internalisés en présence de PA et enzymatiquement actifs.

L'activité des facteurs EF fluorescents purifiés est ensuite mesurée afin de déterminer si le processus de purification n'a pas altéré sa fonctionnalité.

Un dosage ELISA indirect permet d'estimer la quantité de protéines EF fluorescentes, à partir du taux d'AMPc produit par une gamme étalon de EF commercial. Ainsi ce dosage procure deux informations : la présence de EF dans l'échantillon purifié et l'existence d'une activité enzymatique.

Le dosage des protéines EF dans leur tampon de purification valide leur présence et leur activité en solution après leur purification (Figure 12). Lorsque les EF fluorescents en présence de PA sont incubés avec des macrophages murins J774.1 ou RAW264.7, les valeurs de dosages de EF témoignent d'une part de l'entrée des EF fluorescents en présence de PA dans les cellules, et d'autre part que le EF fluorescent contenu dans les cellules conserve son activité enzymatique (Figure 13). On remarque toutefois que les valeurs de EF mesurées dans les RAW264.7 à 1h pour le contrôle positif, EF commercial en présence de PA, varient avec environ 700pg/mL pour le premier dosage et environ 5000 pour le second (Figure 13). Cette disparité sera anticipée en rapportant les valeurs obtenues à la quantité de protéines totales pour les dosages ultérieurs.

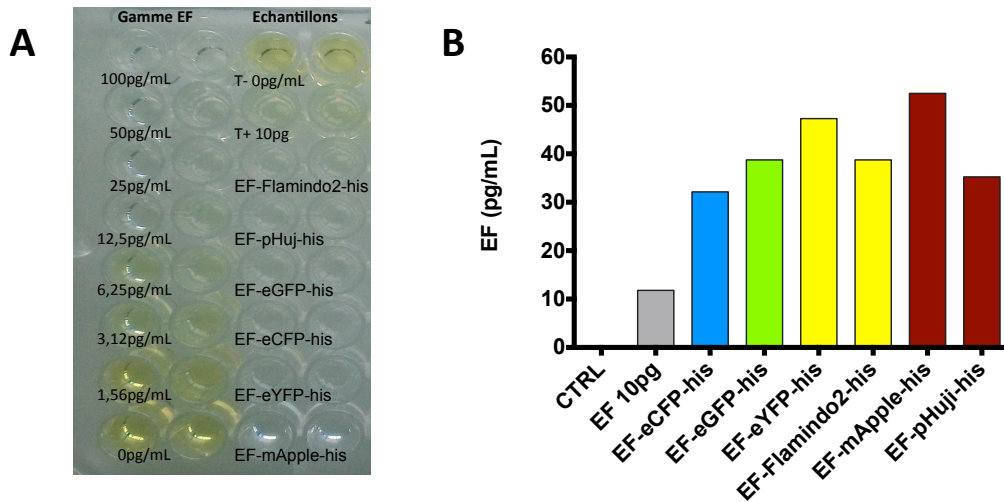


Figure 12. Les protéines fluorescentes purifiées sont actives en tampon de purification. 50µL de protéines purifiées sont utilisées pour le dosage ELISA de l'AMPc. (A) Coloration observée lors du dosage de l'AMPc : une gamme de concentrations connues de la protéine EF commerciale permet d'estimer la concentration en EF dans l'échantillon. (B) Résultats du dosage de l'AMPc : CTRL et EF 10pg correspondent respectivement au tampon seul ou contenant 10pg de la protéine EF commerciale. N=1, monoplicat.

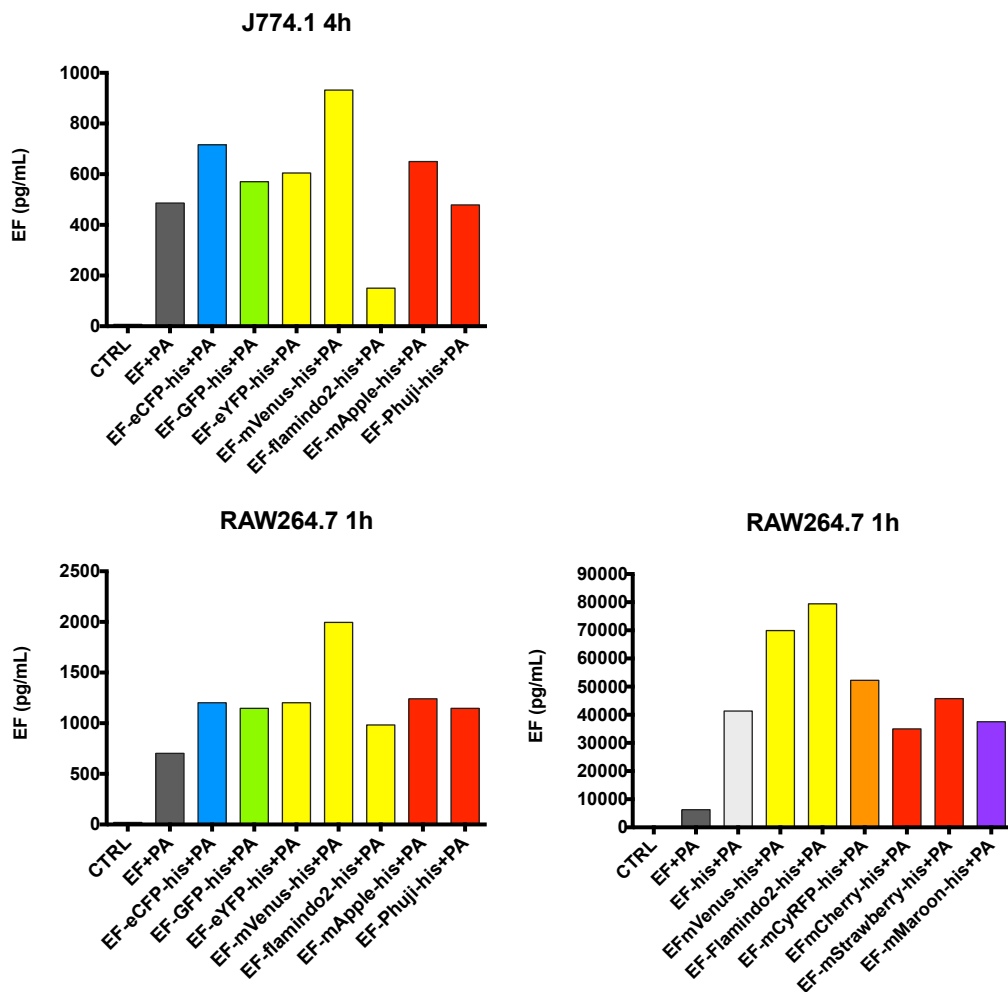


Figure 13. Les protéines fluorescentes internalisées par les macrophages sont actives. Les cellules J774.1 et RAW264.7 ont été incubées à 37°C pendant 4h ou 1h respectivement avec 500ng/mL EF fluorescent ou 100ng/mL EF en présence de PA 1µg/mL. Après lavages et lyse cellulaire, la concentration en EF dans l'échantillon est estimée par dosage de l'AMPc rapportée à une gamme de concentration

connue en protéine EF commerciale. N=1 en monoplicat, hormis pour EF-mVenus-his et EF-flamindo2-his dans les RAW264.7 n=2 en monoplicat.

4/ Etude de l'internalisation des EF fluorescents.

4.1/ Internalisation de EF en absence de PA.

4.1.1/ Internalisation de EFvenus en absence de PA dans les macrophages.

L'internalisation de la protéine EFvenus dans les macrophages a été observée. En se plaçant dans les mêmes conditions expérimentales ayant permis la validation de l'outil fluorescent, on observe la présence intracellulaire de EFvenus en présence de PA, mais aussi en absence de PA (**Figure 14**). Cette entrée n'est pas dépendante de la lignée cellulaire puisque le signal de fluorescence est présent dans les macrophages RAW264.7, J774.1 et IC21.

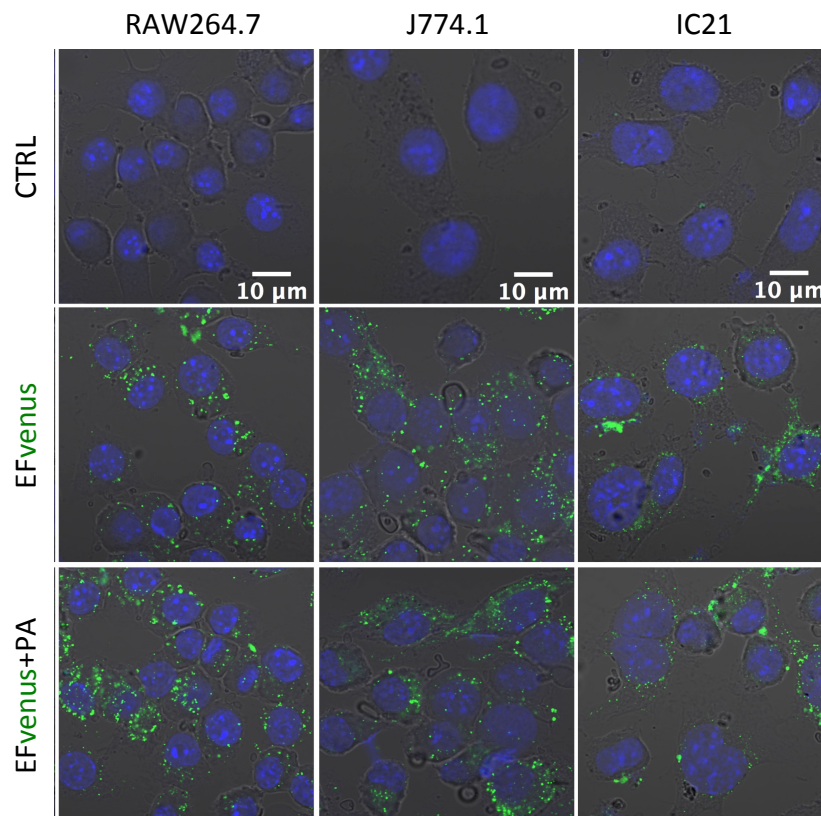


Figure 14. Internalisation de EFvenus en absence de PA dans les macrophages. Les lignées cellulaires de macrophages murins RAW264.7, J774.1 et IC21 ont été incubées avec EFvenus 100 nM avec ou sans PA 300 nM, 1h à 37°C. Les cellules seules (CTRL) sont utilisées comme contrôle négatif. Après lavage et fixation, la fluorescence est observée par microscopie confocale. Les noyaux sont colorés au DAPI (bleu), les protéines mVenus et EFvenus émettent un signal vert.

4.1.2/ Internalisation de EF dans différents types cellulaires en absence de PA.

Lors de l'intoxication de différents types cellulaires, macrophages RAW264.7, et cellules épithéliales CHOK1 ou A549, la détection du signal de fluorescence indique une internalisation de EFvenus en absence et en présence de PA (Figure 15). De plus, la même concentration initiale de EFvenus conduit à un signal détectable en absence comme en présence de PA.

Le seuil de détection en microscopie confocale varie en fonction du type cellulaire. Il est inférieur dans les macrophages RAW264.7 (12,5 nM) comparé aux fibroblastes CHOK1 et cellules épithéliales alvéolaires A549 (50 nM) (Figure 15). Ce seuil est abaissé à 10 nM lors d'une détection par western blot pour tous les types cellulaires (Figure 16). Les cellules phagocytaires professionnelles sont donc capables d'internaliser de plus grandes quantités de facteur que les autres types cellulaires.

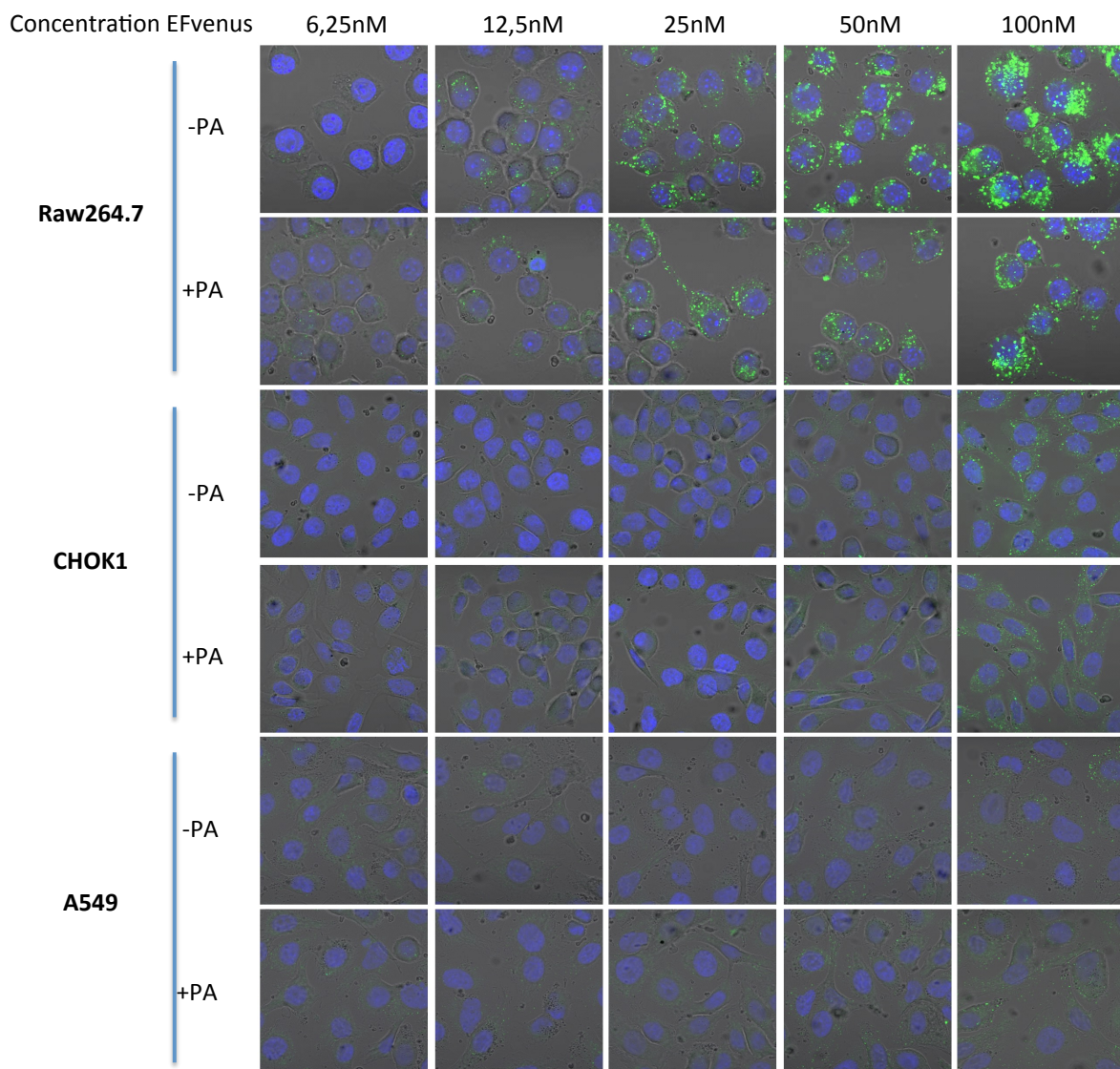


Figure 15. Gamme de concentration de EFvenus et endocytose. Les cellules RAW264.7, CHOK1 et A549 ont été intoxiquées avec une concentration variable de EFvenus en présence ou absence de PA 300 nM, incubées à 37°C pendant 1h. Après lavages et fixation, la présence de EFvenus (vert) est observée en microscopie confocale, les noyaux sont marqués au DAPI (bleu).

4.1.3/ L'internalisation, en absence ou en présence de PA, de EFvenus est représentative de l'endocytose du EF natif du commerce.

La présence de la protéine fluorescente au sein de la protéine chimérique ne modifie pas la capacité d'endocytose puisque EFvenus et le facteur EFhis non fluorescent sont détectés dans les lysats cellulaires dès 5 minutes en western blot (Figure 16). De même le EF commercial, sans étiquette 6his, est détecté dans les lysats en absence comme en présence de PA. La présence de l'étiquette 6his n'empêche donc pas l'internalisation depuis la membrane plasmique. L'entrée de EFvenus dans chaque type cellulaire étudié est donc propre à la protéine EF et non provoquée par la présence de l'étiquette poly-histidines ni par celle de la protéine mVenus à laquelle elle a été fusionnée.

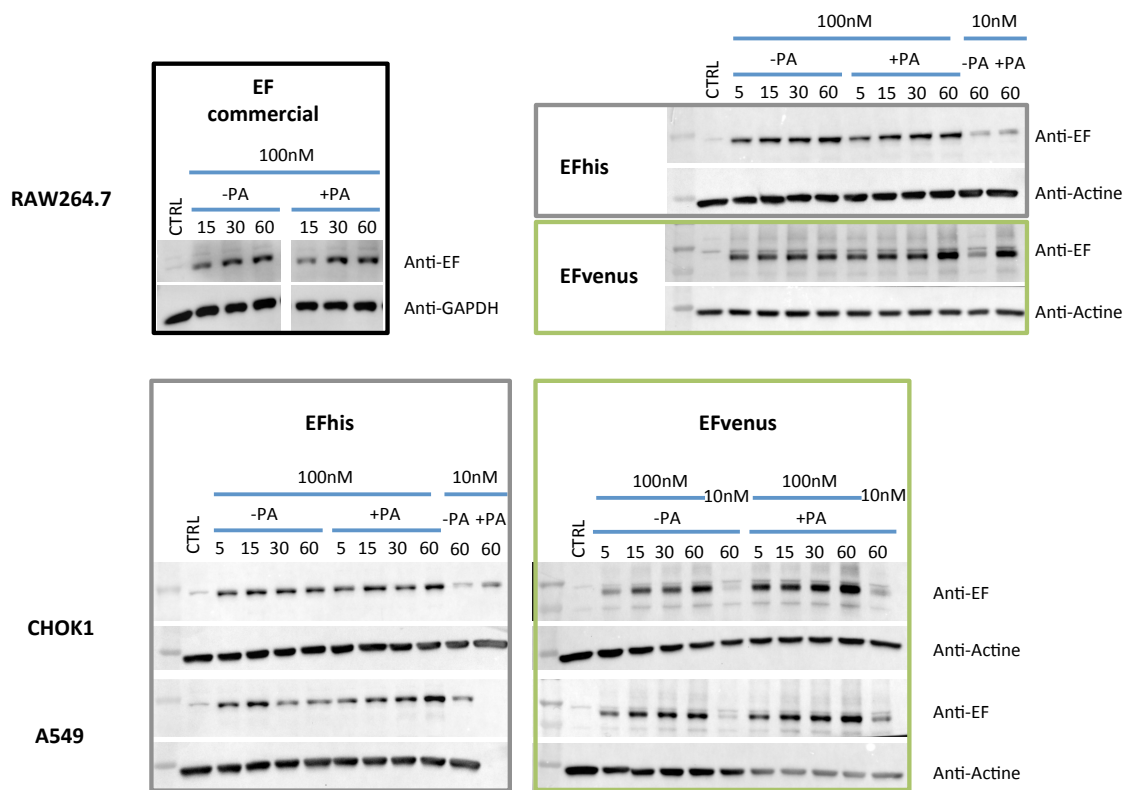


Figure 16. Cinétique d'entrée du facteur EF en présence ou absence de PA. Les cellules RAW264.7, CHOK1 ou A549 ont été intoxiquées à 37°C avec 100 nM ou 10 nM de EF commercial (List Laboratories), ou de EF cloné et purifié au laboratoire EFhis et EFvenus. Lorsqu'indiqué, PA est co-intoxiné à 300 nM. Les cellules sont collectées et lysées à 5, 15, 30 ou 60 minutes post-intoxication. Après centrifugation, les surnageants sont déposés sur un gel SDS-PAGE, puis un western blot est réalisé pour l'identification de EF et des protéines de ménage (actine ou GAPDH).

4.1.4/ Internalisation dépendante du pôle des cellules épithéliales en présence et en absence de PA.

L'épithélium étant une structure polarisée, on distingue deux pôles au niveau des cellules épithéliales : un pôle apical en contact avec la lumière et un pôle basolatéral en contact avec la lame basale. L'utilisation de transwells permet l'ajout des facteurs au pôle d'intérêt uniquement, l'épithélium constituant une barrière suffisamment imperméable pour éviter une diffusion entre les compartiments situés de part et d'autre.

Les cellules CHOK1 et les A549 internalisent le facteur fluorescent par le pôle apical, tandis que le pôle basolatéral est impliqué pour les cellules MDCK et Calu-3 (Figure 17). Aucun signal n'est détecté en microscopie confocale lors de l'ajout des facteurs fluorescents au pôle opposé. L'entrée de EFvenus est permise en présence et en absence de PA par un unique pôle, spécifique de chaque lignée cellulaire.

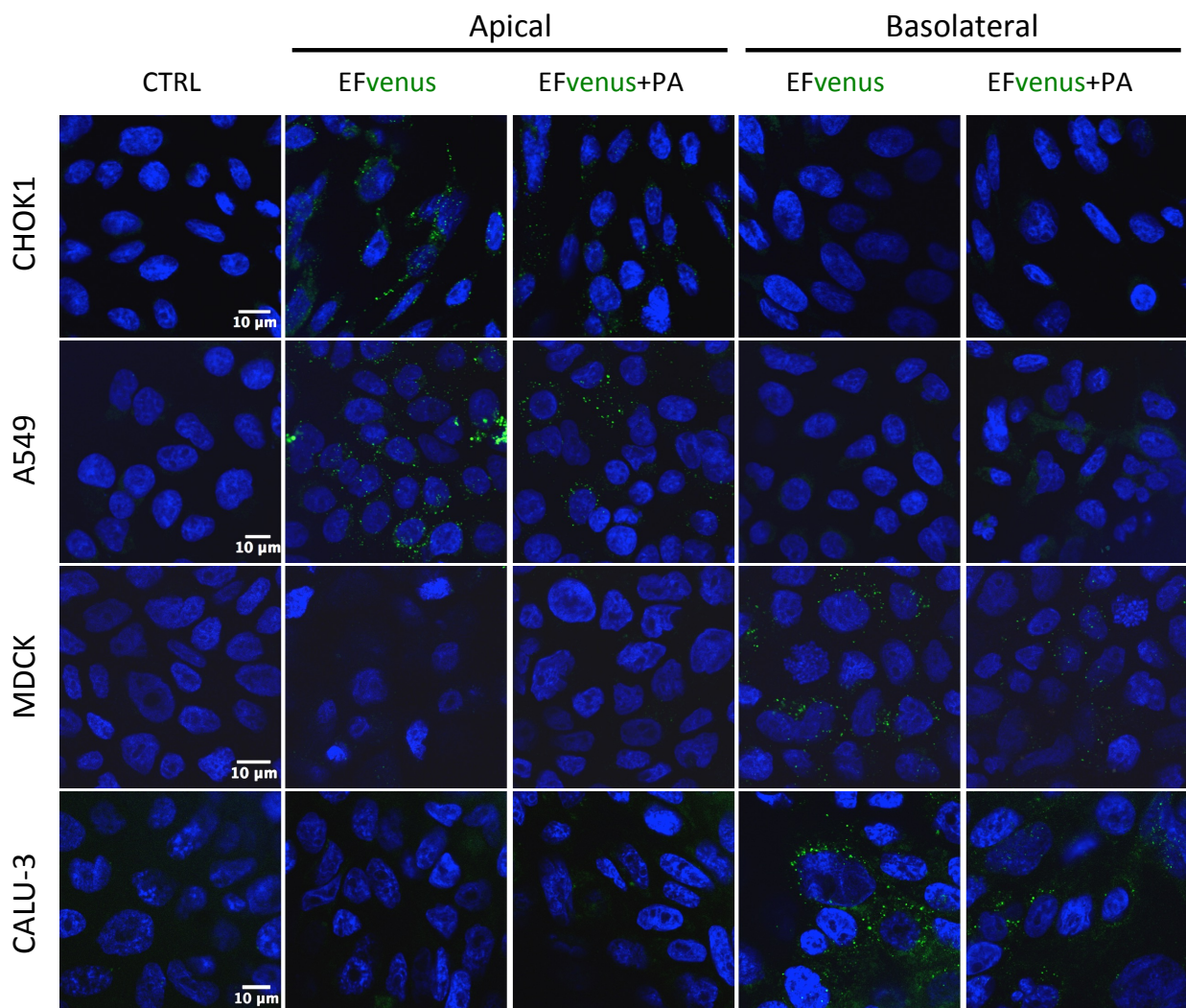


Figure 17. L'internalisation de EFvenus dans les cellules épithéliales dépend du pôle. Les cellules ont étéensemencées dans des transwells. Elles sont incubées en présence de EFvenus 100 nM avec ou sans PA 300 nM au pôle apical ou au pôle basolatéral, 1h à 37°C. Les cellules seules (CTRL) sont utilisées comme contrôle négatif. Après lavage et fixation, la fluorescence est observée par microscopie confocale. Les noyaux sont colorés au DAPI (bleu), les protéines mVenus et EFvenus émettent un signal vert.

4.1.5/ Observation dynamique de l'entrée de EFvenus et EFscarlet dans les cellules RAW264.7 et les A549.

Les cinétiques d'entrée de EFvenus et EFscarlet, en présence et en absence de PA, ont été suivies dans les macrophages RAW264.7 et les cellules épithéliales A549 (**Figure 18**).

Le facteur EFvenus présente un profil d'entrée similaire dans les 2 lignées, où le nombre de cellules ayant internalisé du EF est corrélé à la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) avec ou sans PA (**Figure 18C, D, G, H**). Cependant les profils diffèrent pour EFscarlet. Le nombre de cellules fluorescentes et la MFI évoluent similairement dans les A549, de façon linéaire sans atteindre de saturation après 2h d'incubation (**Figure 18A, B**). Pour les RAW264.7, bien que le nombre de cellules fluorescentes atteigne un plateau dès 1h, la MFI de EFscarlet reste linéaire (**Figure 18E, F**). L'endocytose de EFscarlet dans les 2 types cellulaires est un processus actif mais ralenti comparé à celui de EFvenus. Dans les RAW264.7, 50% des cellules ont internalisé EFvenus en 5 minutes contre 10 à 20 minutes pour EFscarlet. Dans les A549, 10 minutes permettent l'endocytose de EFvenus par 50% des cellules contre 50 à 70 minutes pour EFscarlet. Pour une même protéine EF fluorescente, l'endocytose est ralentie dans les cellules épithéliales A549 comparé aux macrophages RAW264.7.

On observe un profil d'endocytose absolument identique avec ou sans PA dans les macrophages, pour EFvenus comme pour EFscarlet (**Figure 18E à H**), mais une entrée plus restreinte de EFvenus et EFscarlet en absence de PA à partir de 40 minutes en A549 (**Figure 18A à D**). Les données obtenues par western blot indiquent également une entrée quantitativement similaire dans les macrophages RAW264.7 en présence et en absence de PA, et légèrement augmentée en présence de PA dans les cellules épithéliales CHOK1 et A549 (**Figure 16**). Les mécanismes d'endocytose de EF fluorescent en absence de PA semblent différents entre les 2 lignées : dans les macrophages l'endocytose dépend moins de la présence de PA que dans les A549, où PA semble jouer un rôle plus important en surface cellulaire.

4.1.6/ Synthèse des résultats

L'usage de différentes techniques montre que :

- Le facteur EFvenus est retrouvé dans les macrophages et les cellules épithéliales en présence et en absence de PA par différentes techniques: dosage ELISA de EF (**Figure 9**), microscopie confocale (**Figures 15 et 17**), western blot (**Figure 16**) et cytométrie de flux (**Figure 18**).
- L'internalisation de EFvenus en absence de PA n'est pas provoquée par l'étiquette poly-histidines ni la protéine fluorescente (**Figure 16**).
- L'internalisation de EFvenus en présence et en absence de PA dans les cellules épithéliales a lieu par le même pôle, et ce pôle est spécifique de la lignée cellulaire (**Figure 17**).

- La capacité d'endocytose dépend du type cellulaire en faveur des macrophages RAW264.7 comparé aux cellules épithéliales A549 (**Figures 15 et 18**).
- Les quantités internalisées concordent avec une indépendance à PA dans les macrophages et avec une augmentation en présence de PA dans les cellules épithéliales (**Figures 16 et 18**).
- La vitesse d'endocytose dans une même lignée cellulaire dépend de la chimère EF fluorescente où l'entrée de EFscarlet est ralentie comparée à EFvenus en présence et en absence de PA (**Figure 18**).

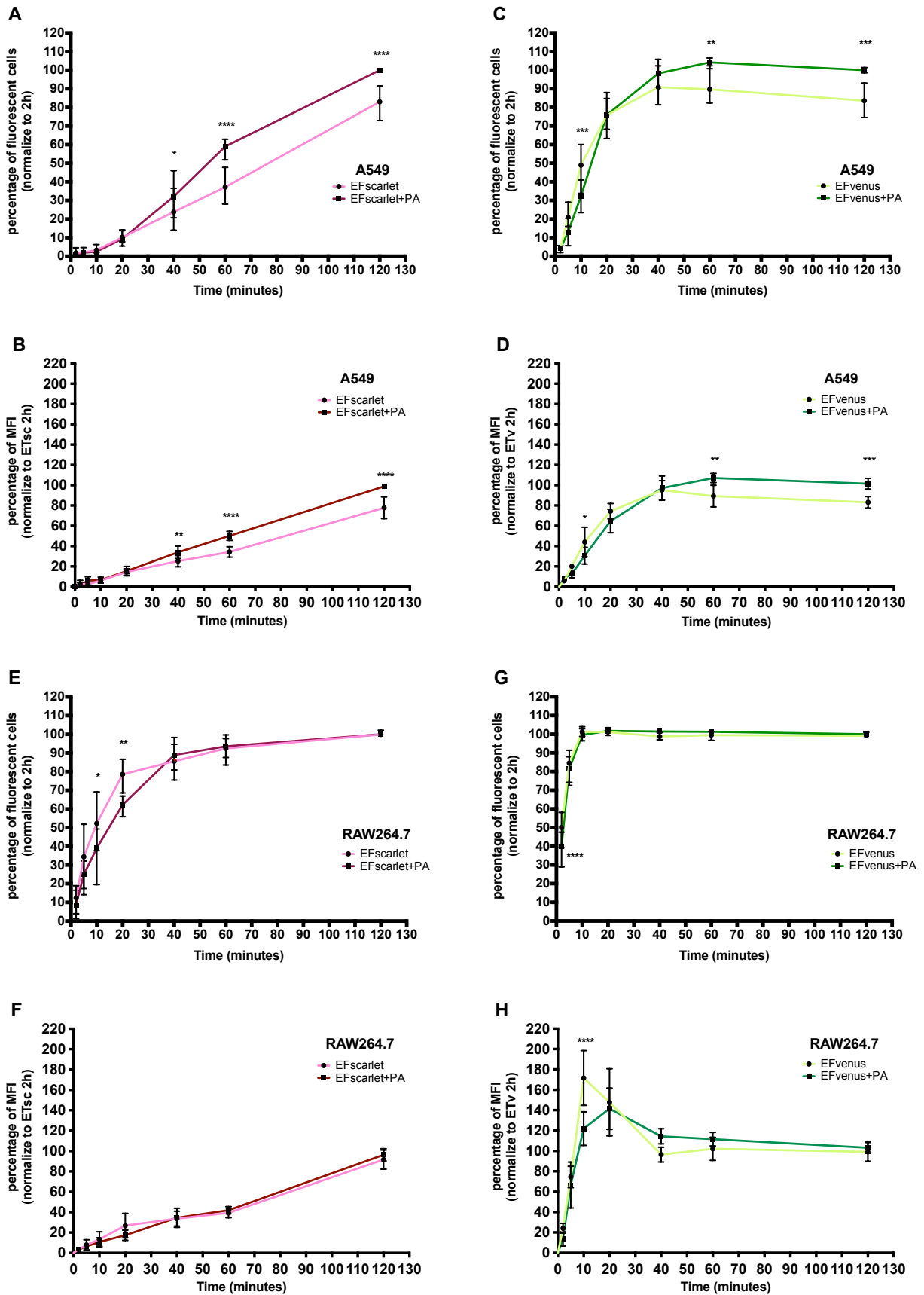


Figure 18. Cinétique d'endocytose de EFvenus et EFscarlet. Les cellules épithéliales A549 (A, B, C, D) et les macrophages Raw264.7 (E, F, G, H) ont été intoximés durant 2, 5, 10, 20, 40, 60 ou 120 minutes avec 100 nM EF fluorescent, +/- PA (300 nM) à 37°C. EFscarlet (rose), EFscarlet+PA (rouge), EFvenus (vert), EFvenus+PA (vert foncé).

(vert clair) et EFvenus+PA (vert foncé). Le pourcentage du nombre de cellules vivantes fluorescentes (A, C, E, G) ou de MFI (B, D, F, H) a été normalisé par rapport à la condition EF+PA à 120 minutes. Les expérimentations ont été réalisées 3 fois en duplicat, l'écart-type représentant la moyenne. Les analyses statistiques entre EF et EF+PA, ont été réalisées à l'aide du test two-way ANOVA, test de comparaison multiple Bonferroni, avec $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$.

4.2/ Etude des voies d'endocytose des EF fluorescents, en présence et en absence de PA.

4.2.1/ L'endocytose de EFvenus dépend d'un processus cellulaire actif.

Afin de déterminer si l'entrée de EFvenus au sein de la cellule en absence de PA dépend de l'énergie cellulaire, les cellules ont été incubées à 4°C de manière à inhiber les processus nécessitant une machinerie cellulaire active. Le dextran 70kDa, molécule utilisée classiquement comme contrôle d'entrée par voie macropinocytaire, dépendante d'une machinerie active donc d'une incubation à 37°C, est ajouté comme contrôle interne. L'entrée de EFvenus en absence et en présence de PA n'est observée en microscopie confocale qu'à 37°C (**Figure 19**). L'absence de signal à 4°C indique que l'entrée ne se produit pas par diffusion passive à travers la membrane cellulaire. L'internalisation de EFvenus en absence de PA requiert donc l'énergie cellulaire, tout comme en présence de PA.

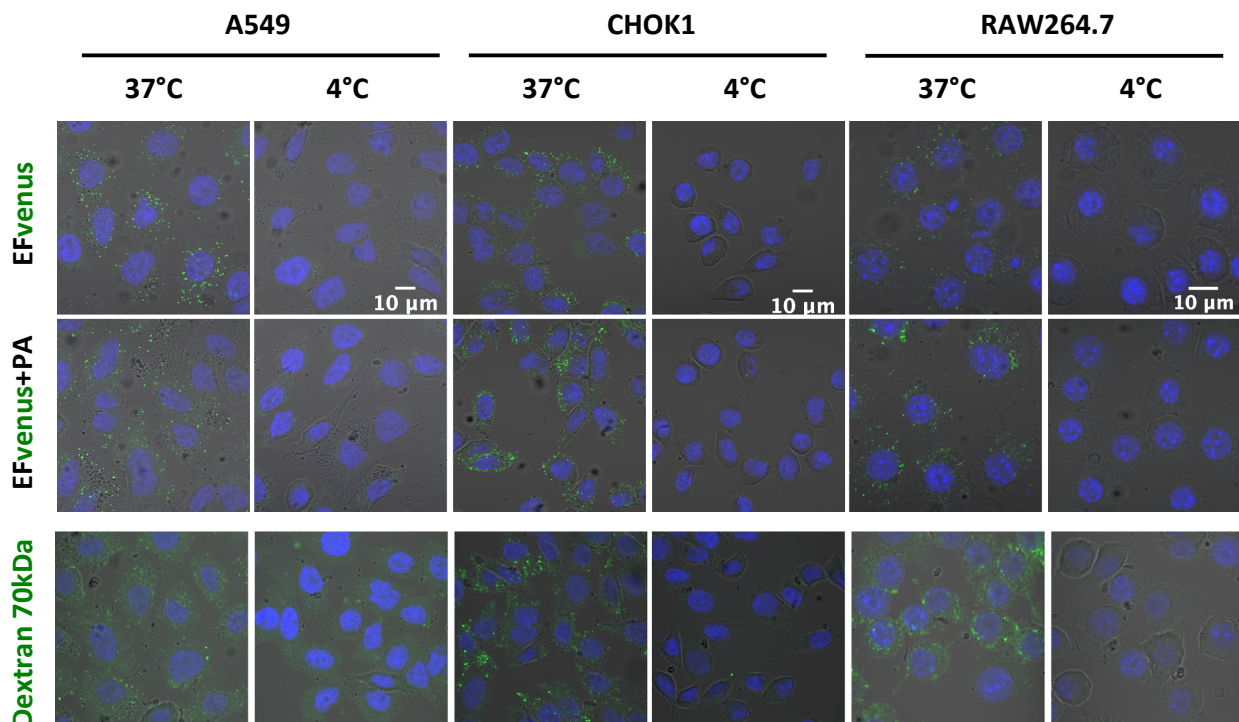
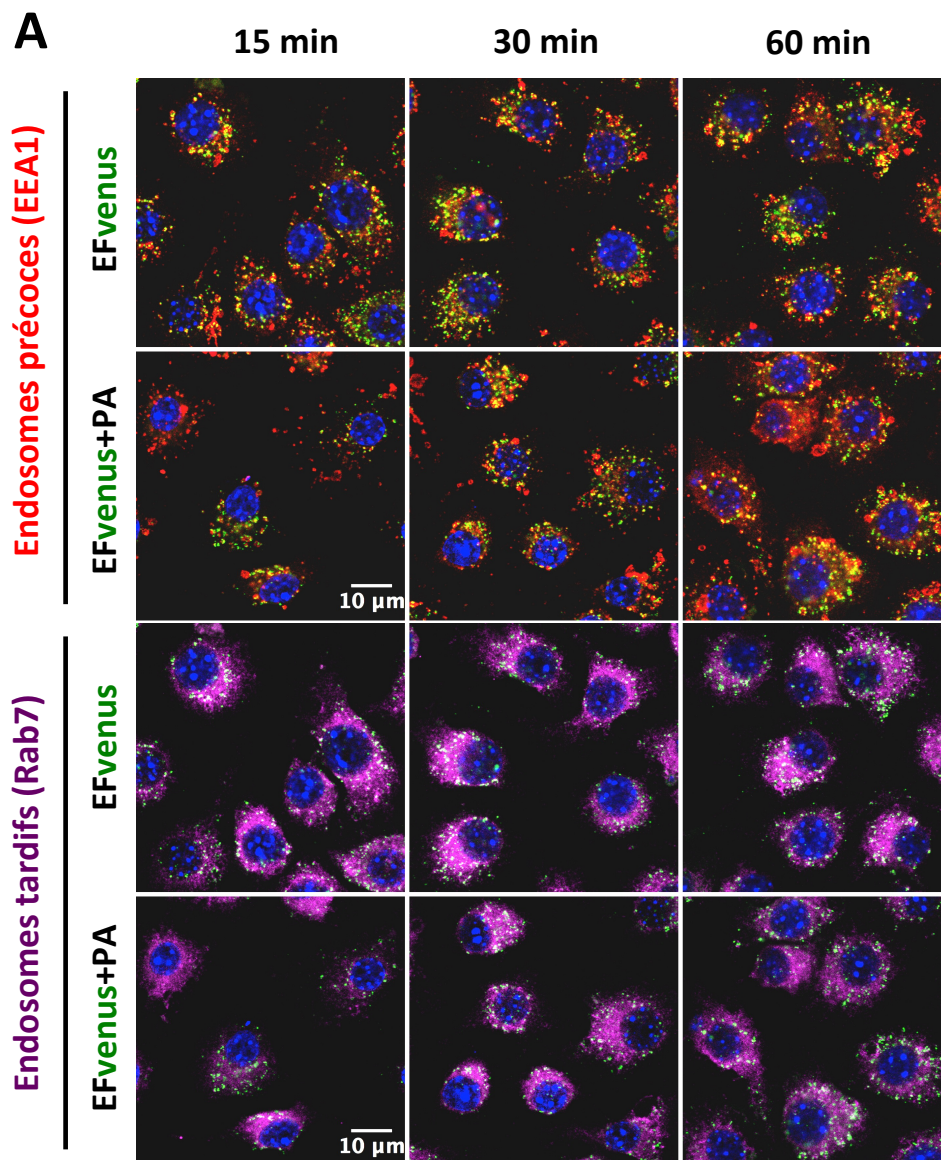


Figure 19. L'endocytose de EFvenus est dépendante de l'énergie cellulaire. Les cellules préalablement préincubées à 4°C pendant 15min sont ensuite incubées 1h à 4°C (diffusion passive) ou 37°C (processus actif) avec EFvenus 100 nM avec ou sans PA 300 nM, ou avec du dextran 70 kDa. Après lavage et fixation, la fluorescence est observée par microscopie confocale. Les noyaux sont colorés au DAPI (bleu), les protéines mVenus et EFvenus émettent un signal vert.

4.2.2/ Les EF fluorescents sont présents dans les endosomes an absence et en présence de PA.

L'internalisation de EFvenus en présence et en absence de PA étant un processus actif, la localisation intracellulaire a été étudiée. Un immunomarquage des endosomes précoces par un anticorps dirigé contre EEA1 et des endosomes tardifs par un anticorps dirigé contre Rab7, montre une colocalisation de EFvenus avec les deux types d'endosomes dès 15 minutes et jusqu'à 60 minutes (**Figure 20A**). Les endosomes utilisent le réseau de microtubules dans leur processus de maturation d'endosomes précoces en endosomes tardifs. L'inhibition de l'activité des microtubules par le nocodazole permet d'observer une distribution en périphérie cellulaire de EFvenus en présence et en absence de PA dans les A549. Un résultat similaire est obtenu dans les RAW264.7 (**Figure 20B**).



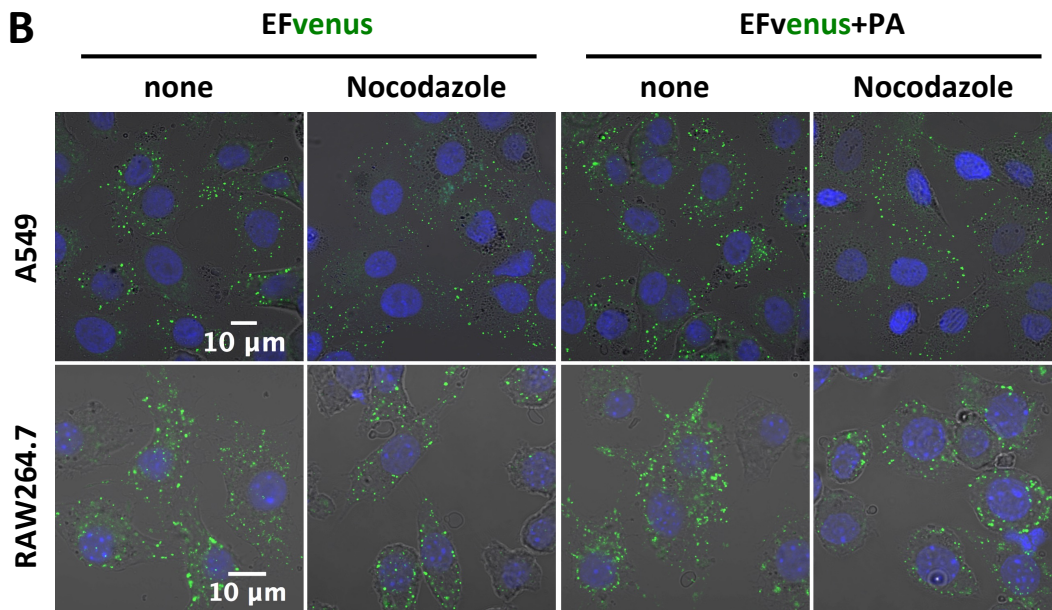


Figure 20. EFvenus colocalise avec les endosomes en absence et en présence de PA. (A) Les macrophages RAW264.7 ont été incubés avec EFvenus 100 nM avec ou sans PA 300 nM pendant 15min, 30 min ou 60min à 37°C. Après lavages et fixation, les endosomes précoces (anti-EEA1, rouge) et les endosomes tardifs (anti-Rab7, violet) ont été immunomarqués. Le noyau est marqué au DAPI (bleu), EFvenus émet une fluorescence dans le canal vert. La colocalisation EFvenus/EEA1 est représentée en jaune et EFvenus/Rab7 en blanc. (B) Les cellules préincubées 30 min avec le nocodazole (inhibiteur de microtubules) ont été ensuite incubées avec EFvenus 100 nM avec ou sans PA 300 nM 1h à 37°C. Après lavage et fixation, la fluorescence est observée par microscopie confocale. Les noyaux sont colorés au DAPI (bleu), la protéine EFvenus émet un signal vert.

4.2.3/ Utilisation d'inhibiteurs pour l'étude des voies endocytaires.

4.2.3.1/ Inhibiteurs et viabilité cellulaire.

Les inhibiteurs utilisés et leurs cibles sont listés dans le **Tableau D**. La viabilité cellulaire a été analysée par marquage au cristal violet en réalisant une gamme de concentration pour chaque inhibiteur et chaque ligné cellulaire (données non montrées). Le temps d'incubation de 1h30 correspond au temps total de présence de l'inhibiteur lors des expériences qui seront présentées par la suite. La concentration maximale permettant de conserver une viabilité supérieure à 75% est sélectionnée pour chaque inhibiteur pour les cellules RAW264.7 ou A549 (**Figure 21**).

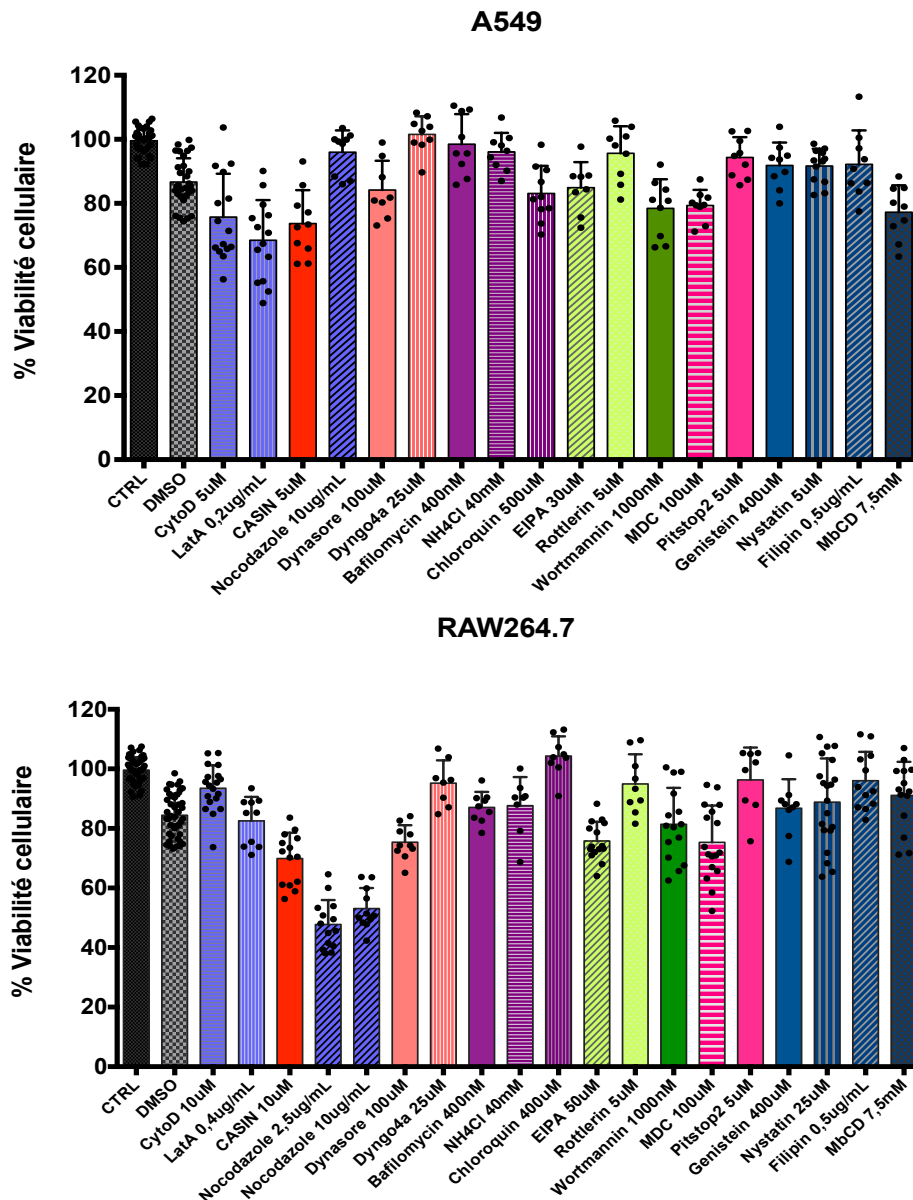


Figure 21. Concentration d'inhibiteurs d'endocytose et maintien de viabilité cellulaire. Les cellules RAW264.7 et A549 ont été incubées avec le DMSO ou avec les concentrations indiquées pour chaque inhibiteur, 1h30 à 37°C. Après lavage, les cellules sont marquées au cristal violet. La viabilité cellulaire est rapportée aux cellules non traitées (CTRL) et exprimée en pourcentage. Cytochalasin D (CytoD), Latrunculin A (LatA), Chloroquine (CQ), ethyl-isopropyl amiloride (EIPA), monodansylcadaverin (MDC), methyl- β -cyclodextrin (M β CD).

4.2.3.2/ Limites de l'utilisation de EFvenus en cytométrie de flux en présence d'inhibiteurs d'endocytose dans les RAW264.7.

La comparaison de la détection de signaux de fluorescence de EFvenus obtenus en microscopie confocale et cytométrie montre clairement une différence de sensibilité entre les 2 techniques dans les macrophages. Le seuil de signal détectable est plus bas en cytométrie de flux qu'en microscopie confocale. En effet, pour l'ensemble des inhibiteurs présentés en **Figure 22**, la cytométrie indique que la

quasi totalité des cellules (plus de 80%) possède une fluorescence EFvenus dont l'intensité équivaut au minimum à 60% de celle observable en absence d'inhibiteur (**Figure 22A**). Ces observations sont à l'opposé de celles faites en microscopie confocale où de rares cellules possèdent un signal fluorescent, et de moindre intensité (**Figure 22B**).

Par ailleurs, de nombreux inhibiteurs produisent une autofluorescence dans le canal de détection de EFvenus, celle-ci est difficile à dissocier du signal de EFvenus en macrophages rendant les données de cytométrie non interprétables. La protéine EFscarlet est donc employée pour la cytométrie de flux en macrophages RAW264.7.

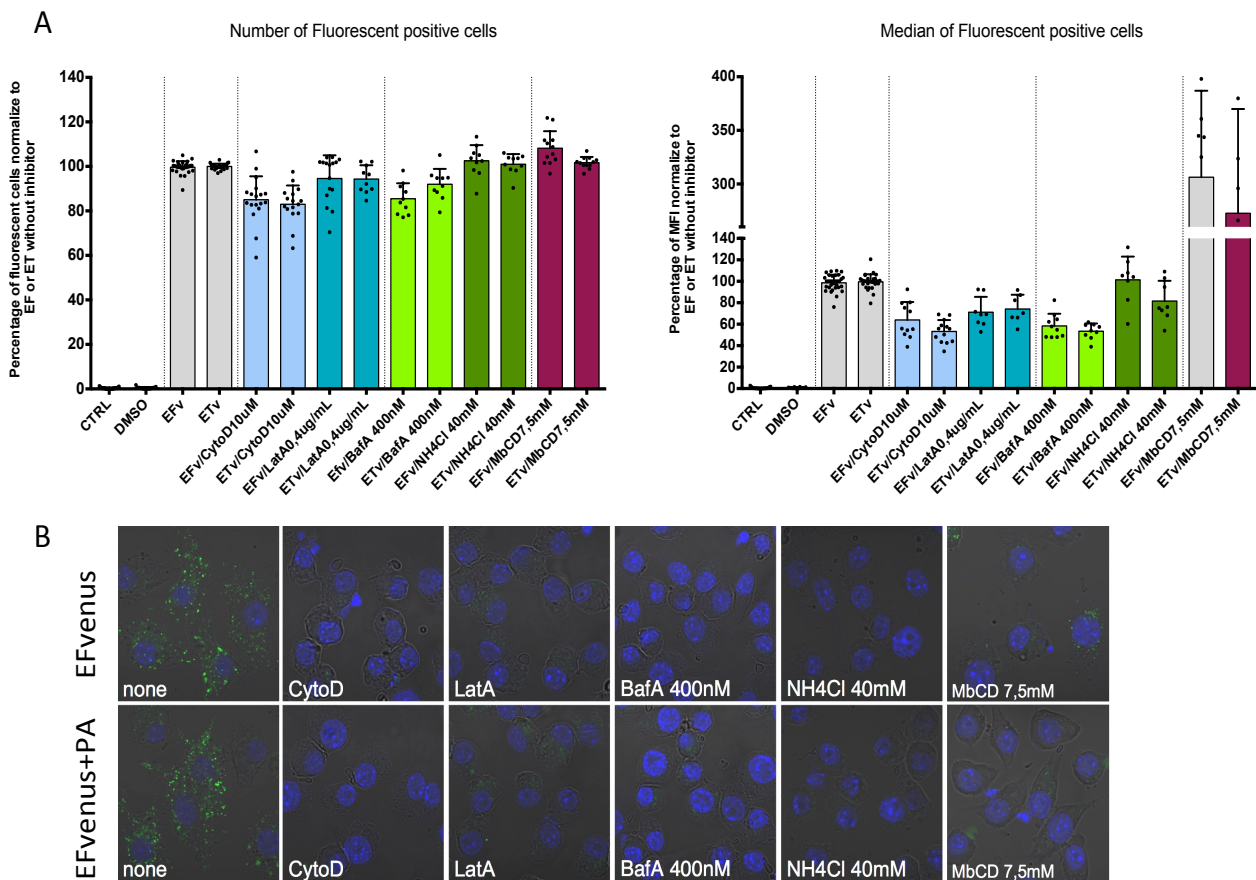


Figure 22. Comparatif de détection du signal EFvenus dans les macrophages RAW264.7. Les macrophages ont été intoxiqués avec 100 nM EFvenus avec PA 300 nM (ETv) ou sans PA (EFv), 1h à 37°C. Après lavages, les cellules sont fixées et analysées par (A) cytométrie de flux, pour chaque inhibiteur les données ont été normalisées par rapport à la condition EFv ou ETv en l'absence d'inhibiteur représentant 100% ou (B) microscopie confocale. CytoD, cytochalasin D à 5µM en A549 et 10 µM en RAW264.7 ; LatA, latrunculin A à 0,2 µg/mL en A549 et 0,4 µg/mL en RAW264.7 ; BafA, bafilomycine A à 400 nM ; NH4Cl à 40 mM ; MβCD, méthyl-β-cyclodextrine à 7,5 mM.

Afin de s'assurer que les EF fluorescents sont distribués de façon similaire au sein des cellules, les macrophages RAW264.7 ont été exposés à EFvenus et EFscarlet simultanément pendant 1h à 37°C (**Figure 23**). Le signal de fluorescence de chacun des EF fluorescents est bien présent. Une

colocalisation est observée témoignant d'un processus endocyttaire commun aux deux protéines EF fluorescentes en présence comme en absence de PA dans les RAW264.7. On note toutefois une localisation intracellulaire distincte de ces protéines fluorescentes, malgré leur exposition simultanée, qui pourrait résulter d'un échantillonnage aléatoire au moment de l'endocytose ou de l'internalisation *via* des vésicules endocytaires différentes selon l'identité de la protéine fluorescente fusionnée à EF. La sensibilité de la cytométrie de flux ne permettant pas d'exploiter les données relatives à EFvenus dans les RAW264.7, nous ne pouvons statuer sur ces hypothèses concernant une différence de distribution lors de l'endocytose.

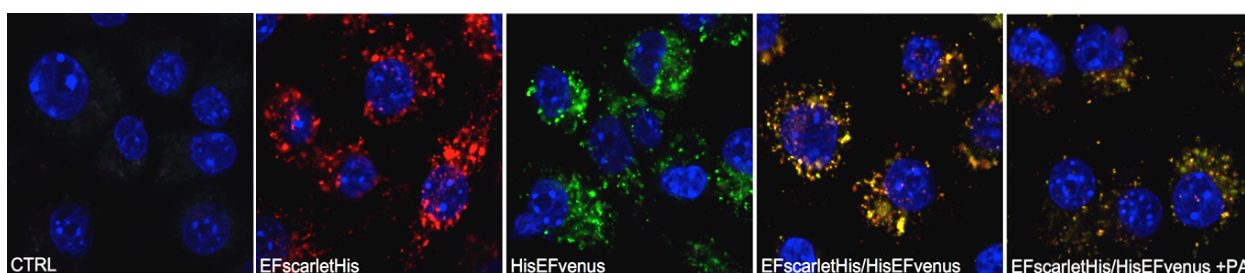


Figure 23. Endocytose simultanée de EFvenus et EFscarlet dans les macrophages. Les RAW264.7 ont été exposées à EFvenus 100 nM (vert) et EFscarlet 100 nM (rouge) avec ou sans PA 300 nM pendant 1h à 37°C. Après lavages et fixation, la fluorescence est observée au microscope confocal. La colocalisation de EFvenus et EFscarlet est visualisée en jaune.

4.2.4/ Endocytose de protéines habituellement utilisées comme contrôles.

Afin de compléter l'étude des mécanismes endocytaires dans les deux types cellulaires, l'internalisation de protéines contrôles, dont les voies d'entrée sont décrites, a été suivie dans les mêmes conditions expérimentales (**Figure 24**). La transferrine est employée comme protéine contrôle de l'endocytose par la voie clathrine, la toxine cholérique par la voie cavéole et le dextran par macropinocytose. Cependant, une étude a montré que selon la taille du dextran, celui-ci était capable d'emprunter la macropinocytose mais également une voie clathrine dans les cellules HeLa (Li *et al.*, 2015). Les dextrans 10 kDa et 70 kDa ont donc été inclus parmi les protéines et molécules contrôles. Ces conditions expérimentales ont également été observées par microscopie confocale (données non montrées).

Les données présentées résultent d'expérimentations par cytométrie de flux. Quel que soit l'inhibiteur utilisé dans les cellules RAW264.7 ou A549, le nombre de cellules ayant endocyté la toxine cholérique, la transferrine ou le dextran 10 kDa, n'est pas modifié en comparaison à l'entrée en absence d'inhibiteur (données non montrées). Une légère diminution de l'entrée du dextran 70 kDa est observée avec les inhibiteurs d'acidification BafA (-20%), CQ (-10%) et de cholestérol M β CD (-20%) dans les RAW264.7 ; et avec BafA (-60%) et CQ (-20%) dans les A549. Les moyennes de fluorescence (MFI) montrent quant à elles des variations notables.

Dans les macrophages RAW264.7 (Figure 24A) :

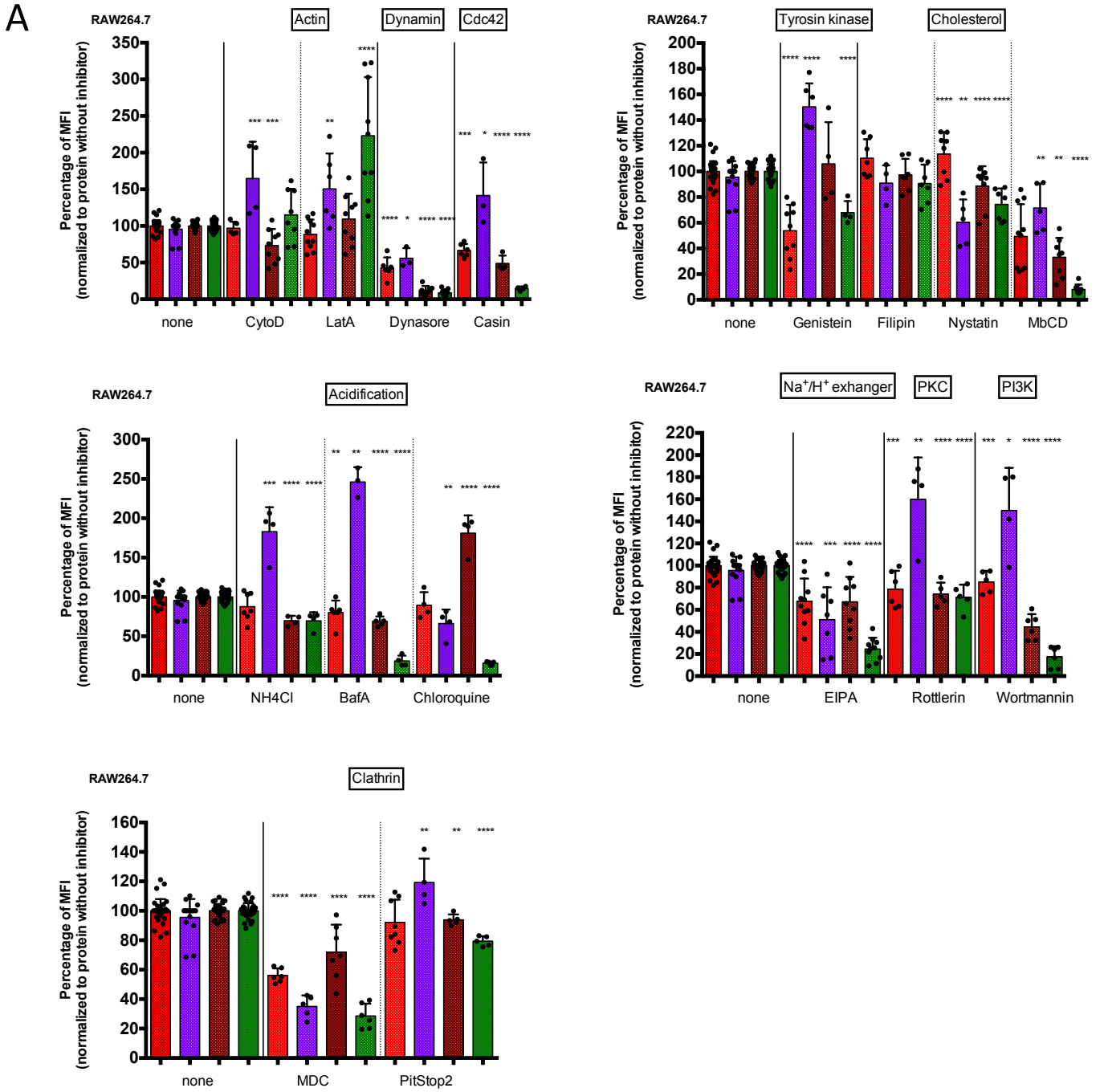
L'entrée de la transferrine dépend en partie de la dynamine, de la clathrine (MDC), du cholestérol (nystatin et M β CD) et des échangeurs Na⁺/H⁺ indiquant une voie CME et une voie macropinocytaire. L'internalisation de la toxine cholérique nécessite en partie la dynamine, Cdc42, les tyrosines kinase, la clathrine (MDC) et dans une moindre mesure, la PI3K, PKC et les échangeurs NA⁺/H⁺ : l'endocytose a lieu par une voie dépendante de la dynamine par la voie cavéole et éventuellement la voie clathrine, et par une voie indépendante par macropinocytose ou voie CLIC/GEEC. Les dextrans 10 kDa et 70 kDa empruntent majoritairement une voie dépendante de la dynamine. L'implication de Cdc42, des échangeurs Na⁺/H⁺, de la PI3K, du cholestérol (M β CD), de la clathrine (MDC) et de l'acidification est plus prononcée pour l'entrée du dextran 70 kDa, pour lequel l'inhibition des tyrosines kinase impacte également l'endocytose contrairement à ce qui est observé pour le dextran 10 kDa. L'endocytose du dextran 70 kDa emploie la macropinocytose et la voie clathrine, tandis que le dextran 10 kDa utilise la voie clathrine de façon réduite en faveur d'une autre voie dépendante de la dynamine et de la macropinocytose.

Dans les cellules épithéliales A549 (Figure 24B) :

Lorsque l'on suit l'entrée de la transferrine, on observe une forte augmentation de la MFI pour toutes les conditions. Ceci correspond à un problème technique de configuration du laser de détection qui n'a pas été identifié à temps, rendant ces données inexploitable (données en violet). L'entrée de la toxine cholérique n'est pas impactée par l'inhibition de la dynamine, mais en partie par l'inhibition de Cdc42, des tyrosines kinase, et du cholestérol (M β CD en confocal, données non montrées). Cette internalisation indépendante de la dynamine oriente vers une macropinocytose ou une voie CLIC/GEEC. L'entrée du dextran 10 kDa est en partie dépendante de la dynamine, l'acidification, et d'acteurs impliqués dans la macropinocytose (échangeurs Na⁺/H⁺, PI3K et PKC). Celle du dextran 70 kDa est similaire, avec une diminution de l'entrée également lors de l'inhibition de la clathrine (MDC) et des tyrosines kinase (genistein); ce dextran emprunterait donc la macropinocytose ainsi que la voie clathrine.

Bilan

La caractérisation des voies endocytaires de protéines contrôles mettent en évidence l'existence de plusieurs voies empruntables dans les conditions expérimentales d'étude de l'endocytose des facteurs EF fluorescents. Chacune peut être internalisée par une voie alternative à celle décrite initialement.



B

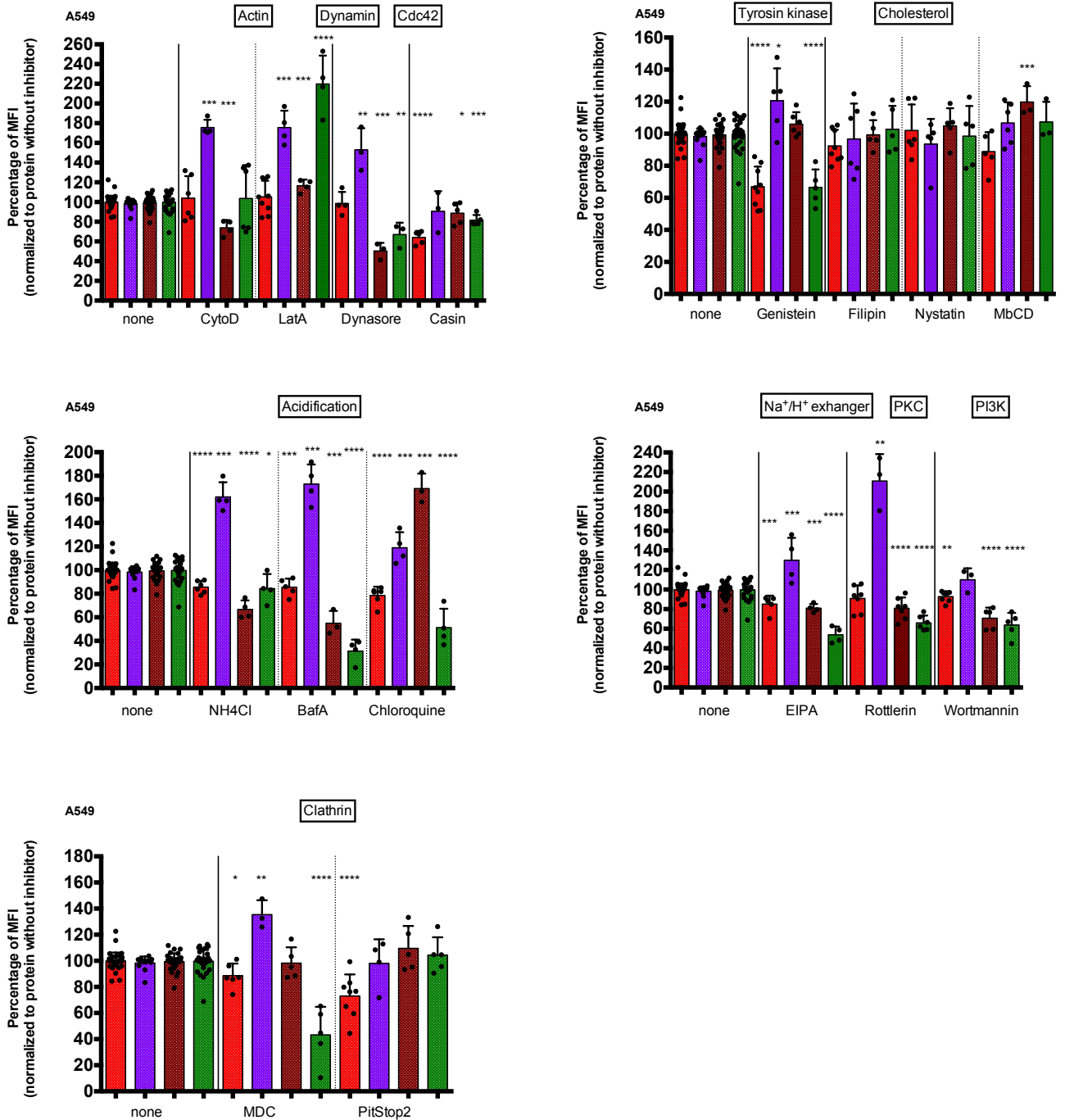


Figure 24. Voies endocytaires empruntées par les protéines contrôles dans les cellules A549 et RAW264.7. Après 30 minutes de préincubation avec l'inhibiteur indiqué, les cellules (A) RAW264.7 ou (B) A549, ont été intoxiquées avec la toxine cholérique AF594 (rouge) et la transferrine AF647 (violet) ou le dextran 10 kDa AF549 (rouge foncé) et le dextran 70 kDa AF488 (vert) pendant 1h à 37°C. Après analyse en cytométrie de flux, la moyenne d'intensité de fluorescence des cellules est présentée, où 100% correspond à l'endocytose en absence d'inhibiteur. None, sans inhibiteur ; CytoD, cytochalasinD à 5 µM en A549 et 10 µM en RAW264.7 ; LatA, latrunculine A à 0,2 µg/mL en A549 et 0,4 µg/mL en RAW264.7 ; Dynasore à 100 µM ; Casin 5 µM en A549 et 10 µM en RAW264.7 ; BafA, bafilomycine A à 400 nM ; NH4Cl à 40 mM ; ; Chloroquine, 500 nM en A49 et 400 nM en RAW264.7 ; MDC, monodansylcadaverine à 100 µM ; Pitstop2 à 5µM ; Génisteine 40 µM ; Filipine à 0,5 µg/mL ; Nystatine à 5 µM en A549 et 25 µM en RAW264.7 ; MbCD à 7,5 mM ; EIPA 30 µM en A549 et 50 µM en RAW264.7 ; Rottlerin, 5 µM ; Wort, wortmannine à 1 µM ; les concentrations des autres inhibiteurs sont indiqués dans l'article. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test Mann-Whitney, non paramétrique et non apparié, l'écart-type représentant la moyenne avec * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

4.2.4/ Endocytose des facteurs EF fluorescents en absence et en présence de PA.

L'étude des voies endocytaires empruntées par les EF fluorescents est réalisée en préincubant les cellules avec les inhibiteurs afin de bloquer certaines voies. Les protéines EFvenus et EFscarlet sont utilisées dans les cellules épithéliales A549, tandis que seule EF scarlet est utilisée dans les macrophages RAW264.7 pour la raison évoquée précédemment. Les résultats de cytométrie de flux sont présentés dans la **Figure 25**. Ces conditions expérimentales ont également été complétées par microscopie confocale (données non montrées).

L'actine (cytochalasin D -CytoD et latrunculine A) et l'acidification (bafilomycine A -BafA, chloroquine -CQ, NH₄Cl) sont principalement impliquées pour les deux lignées dans l'entrée de EFscarlet et EFvenus. Le nombre de cellules fluorescentes associé à la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) indique une diminution globale d'environ 80% comparé au signal en absence d'inhibiteurs (**Figure 25 A, B, C**). L'inhibition de l'entrée des protéines EFvenus et EFscarlet en absence de PA est significativement plus marquée qu'en présence de PA pour les 2 types cellulaires.

- L'actine et l'acidification endosomale sont majoritairement nécessaires à l'internalisation de EFvenus et EFscarlet dans les A549 et les RAW264.7. Leur implication est légèrement plus marquée en absence de PA.

L'inhibition de la dynamine (dynasore et dyngo4a) diminue l'entrée de EFscarlet dans les RAW264.7 et les A549. Cependant, cette inhibition est plus forte dans les A549 avec en moyenne 75% d'inhibition du nombre de cellules qui sont fluorescentes (**Figure 25 B1**), tandis que dans les RAW264.7 l'inhibition est observée uniquement par une réduction de 40% de la MFI (**Figure 25 C2**). L'entrée de EFvenus dans les A549 est indépendante de la dynamine puisqu'aucune modification du nombre de cellules et de la MFI n'est observée (**Figure 25 A1, A2**).

- La dynamine est majoritairement nécessaire à l'entrée de EFscarlet dans les A549 indépendamment de la présence de PA. L'entrée de EFscarlet dans les RAW264.7 est partiellement dépendante de la dynamine, avec une implication plus marquée en absence de PA. L'entrée de EFvenus dans les A549 est strictement indépendante de la dynamine, indépendamment de la présence de PA.

L'inhibition de Cdc42 (Casin) provoque une diminution du nombre de cellules fluorescentes de 60% de l'entrée de EFscarlet dans les A549 (**Figure 25 B1**) contre seulement 20% dans les RAW264.7 (**Figure 25 C1**) avec une réduction de 75% de la MFI (**Figure 25 C2**). Le nombre de cellules A549 ayant internalisé EFvenus est réduit de 20% (**Figure 25 A1**) avec une réduction de 35% de la MFI (**Figure 25 A2**).

- L'entrée de EFscarlet dans les A549 est majoritairement dépendante de la protéine Cdc42, qui est sensiblement plus impliquée en absence de PA. L'entrée de EFscarlet dans les RAW264.7 est partiellement dépendante de Cdc42, indépendamment de la présence de PA. L'entrée de EFvenus dans les A549 est majoritairement indépendante de Cdc42, indépendamment de la présence de PA.

L'inhibition des échangeurs Na^+/H^+ (EIPA) n'induit pas de modification du nombre de cellules RAW264.7 fluorescentes (**Figure 25 C1**) mais provoque une diminution de la MFI EFscarlet de 40% en absence de PA uniquement (**Figure 25 C2**). L'entrée de EFscarlet dans les A549 est réduite de 60% en présence et en absence de PA (**Figure 25 B1**), une baisse significative de la MFI de 45% n'est observée qu'en absence de PA (**Figure 25 B2**). L'entrée de EFvenus est inchangée dans les A549 (**Figure 25 A**).

- L'entrée de EFscarlet dans les RAW264.7 est indépendante des échangeurs Na^+/H^+ en présence de PA, qui sont impliqués en partie dans l'entrée en absence de PA. L'entrée de EFscarlet dans les A549 nécessite majoritairement les échangeurs Na^+/H^+ , en particulier en absence de PA. L'entrée de EFvenus dans les A549 est strictement indépendante des échangeurs Na^+/H^+ en présence et en absence de PA.

L'inhibition de la protéine kinase C (rottlerin) induit une diminution du nombre de cellules fluorescentes EFvenus et de la MFI d'environ 65% dans les A549, qui est toutefois significativement plus prononcée en absence de PA (**Figure 25 A**). L'entrée de EFscarlet dans les A549 est réduite de 80% (**Figure 25 B1**), avec une baisse de la MFI en absence de PA de 85% contre 60% en présence de PA (**Figure 25 B2**). L'entrée de EFscarlet ne modifie pas le nombre de cellules RAW264.7 fluorescentes (**Figure 25 C1**), mais réduit la MFI de 50% avec un effet plus marqué en absence de PA (**Figure 25 C2**).

- L'entrée de EFvenus et EFscarlet dans les A549 dépend majoritairement de la protéine kinase C en absence et en présence de PA, avec une implication plus marquée en absence de PA. L'entrée de EFscarlet dans les RAW264.7 est partiellement dépendante de la protéine kinase C.

L'inhibition de la PI3K (wortmannin) réduit la MFI de EFscarlet de 40% sans modification du nombre de cellules RAW264.7 fluorescentes (**Figure 25 C**). L'entrée de EFscarlet diminue le nombre de cellules A549 fluorescentes d'environ 60% et la MFI de 40%, avec toutefois une inhibition significativement plus forte en absence de PA (**Figure 25 B**). L'entrée de EFvenus ne modifie pas le nombre de cellules A549 fluorescentes et provoque une baisse de MFI de 20% (**Figure 25 A**).

- L'entrée de EFscarlet dans les RAW264.7 est partiellement dépendante de la PI3K, indépendamment de la présence de PA. L'entrée de EFscarlet dans les A549 utilise majoritairement une voie dépendante de la PI3K, en particulier en absence de PA. L'entrée de EFvenus dans les A549 est majoritairement indépendante de la PI3K.

L'inhibition des tyrosines kinases (genistein) diminue le nombre de cellules A549 fluorescentes EFvenus et la MFI d'environ 20%, sans différence significative en fonction de la présence de PA (**Figure 25 A**). Le nombre de cellules fluorescentes EFscarlet est diminué de 80% (**Figure 25 B1**) et la MFI de 40% en présence de PA et de 65% en absence de PA dans les A549 (**Figure 25 B2**) ; une diminution significative étant observée en absence de PA. Aucune modification du nombre de cellules RAW264.7 fluorescentes EFscarlet n'est observée, cependant on note une baisse de 30% de la MFI indépendamment de la présence de PA (**Figure 25 C**).

- L'entrée de EFvenus dans les A549 est majoritairement indépendante des tyrosines kinases, indépendamment de la présence de PA. L'entrée de EFscarlet dans les A549 est majoritairement dépendante des tyrosines kinases, en particulier en absence de PA. L'entrée de EFscarlet dans les RAW264.7 est majoritairement indépendante des tyrosines kinases, indépendamment de la présence de PA.

La séquestration ou la déplétion du cholestérol (filipin, nystatin, M β CD) ne modifie pas le nombre de cellules RAW264.7 fluorescentes EFscarlet (**Figure 25 C1**), une légère baisse de MFI de 20% est observée en absence de PA. Cette baisse est significativement différente de la MFI en présence de PA (**Figure 25 C2**). Dans les A549, l'entrée de EFscarlet est inchangée en présence de M β CD, peu inhibée par la nystatin (-20%) (**Figure 25 B**). La filipin réduit le nombre de cellules fluorescentes EFscarlet de 30% en présence de PA et 50% en absence de PA et la MFI de 15% et 30% respectivement (**Figure 25 B**). L'entrée de EFvenus dans les A549 n'est pas inhibée par les inhibiteurs utilisés en présence et en absence de PA (**Figure 25 A**).

- L'entrée de EFscarlet dans les RAW264.7 est majoritairement indépendante du cholestérol, bien qu'en absence de PA celui-ci soit plus impliqué. L'entrée de EFscarlet dans les A549 est majoritairement indépendante du cholestérol, excepté en absence de PA lors de l'utilisation de la filipin. L'entrée de EFvenus dans les A549 est strictement indépendante du cholestérol, indépendamment de la présence de PA.

L'inhibition de la voie clathrine (MDC, Pitstop2) ne modifie pas le nombre de cellules RAW264.7 fluorescentes EFscarlet (**Figure 25 C1**), la MFI est diminuée d'environ 15% en présence de PA et de 20 à 35% en absence de PA selon l'inhibiteur (**Figure 25 C2**). Dans les A549, l'inhibition par le MDC réduit le nombre de cellules EFscarlet fluorescentes de 80% et la MFI de 50% indépendamment de la présence de PA ; tandis que l'inhibition par Pitstop2 réduit globalement l'entrée en présence de PA de 15-20%, l'entrée en absence de PA réduit le nombre de cellules fluorescentes de 60% et la MFI de 40% (**Figure 25 B**). L'entrée de EFvenus avec ou sans PA dans les A549 n'est pas modifiée en présence de Pitstop2. En présence de MDC, aucun effet n'est observé sur l'entrée de EFvenus en présence de PA mais le nombre de cellules fluorescentes et la MFI sont réduites de 40% environ en absence de PA (**Figure 25 A**).

- L'entrée de EFscarlet dans les RAW264.7 est majoritairement indépendante de la clathrine, qui est toutefois impliquée partiellement en absence de PA. L'entrée de EFscarlet dans les A549 implique la clathrine majoritairement. L'entrée de EFvenus dans les A549 est indépendante de la clathrine en présence de PA mais en dépend partiellement en absence de PA.

4.2.5/ Bilan des résultats d'endocytose des EF fluorescents.

On observe donc une dépendance à divers acteurs moléculaires en fonction de la protéine EF fluorescente utilisée ainsi que du type cellulaire (**Figure 25**).

L'actine et l'acidification des endosomes sont les principaux acteurs de l'endocytose de EFvenus et EFscarlet dans les deux types cellulaires. La protéine kinase C est un acteur majoritaire dans les A549, tandis que l'entrée dans les RAW264.7 en est partiellement dépendante.

La voie utilisée par EFscarlet implique Cdc42, la dynamine et la PI3K dans les deux lignées. Dans les A549, l'entrée de EFvenus est indépendante de la dynamine et implique minoritairement Cdc42 et PI3K ; contrairement à celle empruntée par EFscarlet qui est partiellement dépendant de la dynamine, de Cdc42, de la PI3K et implique également la clathrine (MDC), les échangeurs Na^+/H^+ (EIPA) et les tyrosines kinase (genistein). L'entrée de EFscarlet est peu dépendante de la clathrine (MDC) dans les RAW264.7.

Des différences sont également observées en fonction de PA. En effet, en absence de PA, l'entrée du facteur fluorescent utilise des voies similaires avec une dépendance toutefois plus marquée.

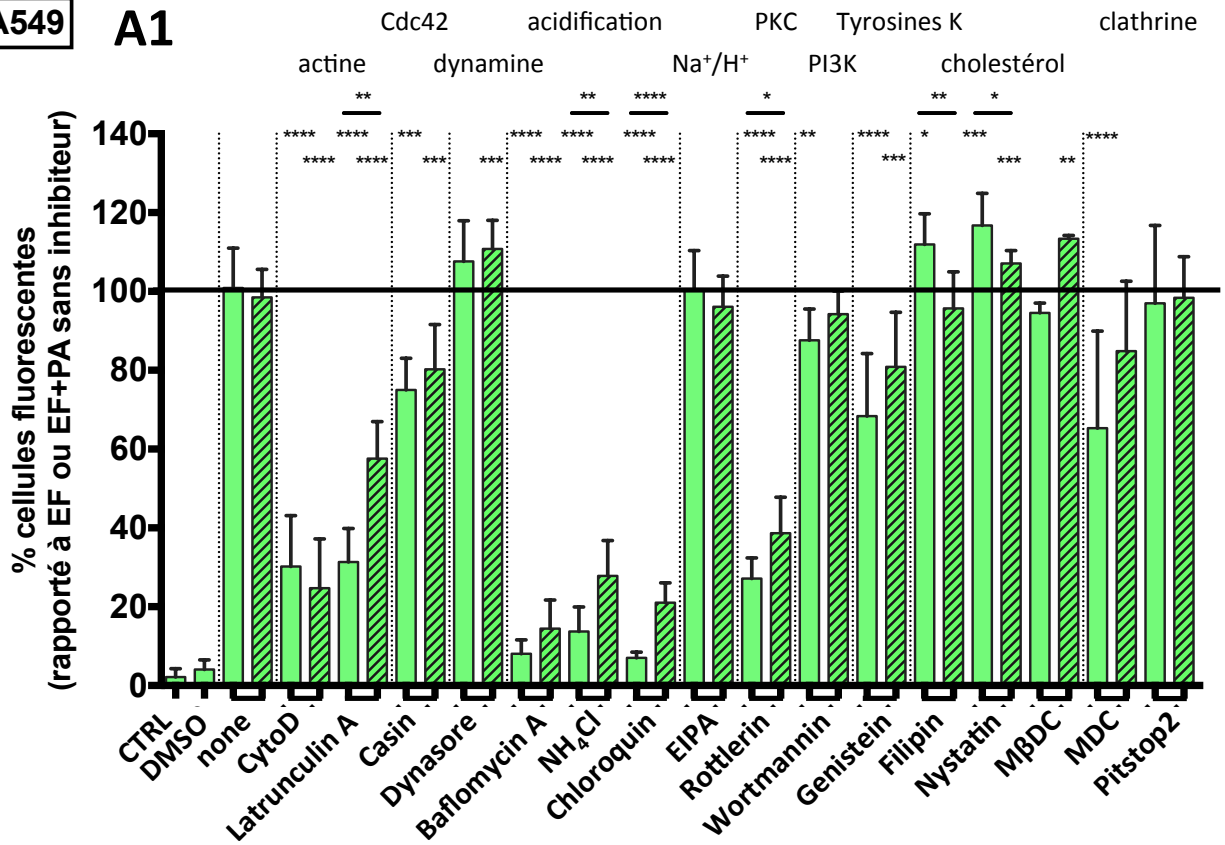
Dans les A549, l'internalisation de EFvenus nécessite majoritairement l'actine, l'acidification, la PKC ; minoritairement Cdc42, PI3K, la clathrine, le cholestérol, les tyrosine kinase ; et indépendante de la dynamine. L'entrée de EFscarlet nécessite l'actine, l'acidification, la PKC, Cdc42, PI3K, dynamine, les tyrosine kinase, la clathrine ; minoritairement le cholestérol. Dans les A549, EFscarlet utiliserait une voie clathrine et des voies indépendantes de la clathrine, probablement la voie CLIC/GEEC, la macropinocytose ou la voie cavéole ; tandis que EFvenus utiliserait des voies indépendantes de la dynamine, la macropinocytose constituant la voie majoritaire. Dans les A549 et en absence de PA, EFvenus serait endocyté de façon similaire à la présence de PA, tandis que EFscarlet entrerait de façon plus prononcée par voie macropinocytaire impliquant la PI3K, la PKC et les échangeurs Na^+/H^+ .

Dans les RAW264.7 et en présence de PA, l'entrée de EFscarlet nécessite majoritairement l'actine, l'acidification, Cdc42 ; avec une plus faible implication de la dynamine, la PI3K et la PKC ; minoritairement le cholestérol, les tyrosines kinases, les échangeurs Na^+/H^+ ; indépendant de la clathrine. Les voies CLIC/GEEC et macropinocytose semblent être les voies majoritaires, et une voie minoritaire indépendante de la clathrine impliquant la dynamine, le cholestérol et la PI3K orientant vers une voie endophiline. En absence de PA, et de façon plus marquée qu'en présence de PA, l'entrée de

EFscarlet implique les échangeurs NA^+/H^+ , la clathrine (MDC), le cholestérol et la dynamine orientant vers des endocytoses telles que la voie clathrine et la macropinocytose.

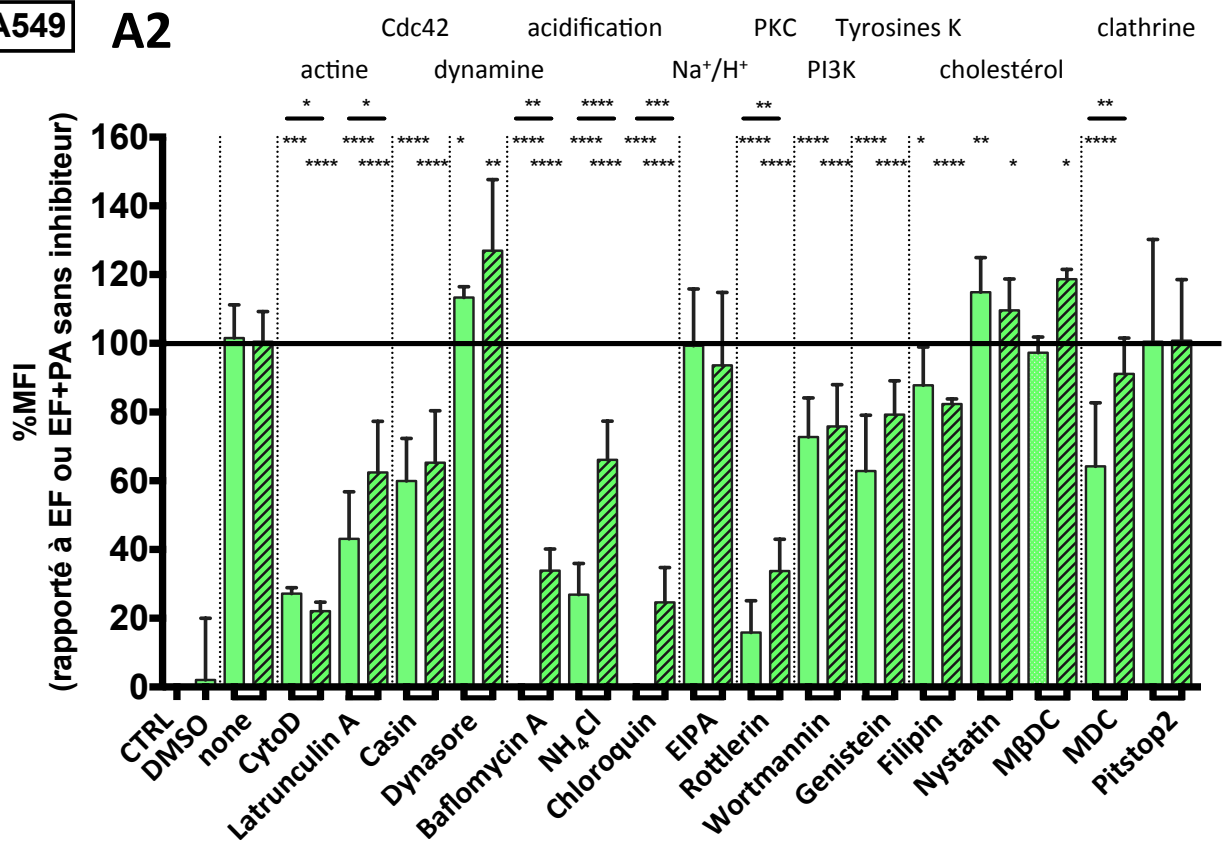
A549

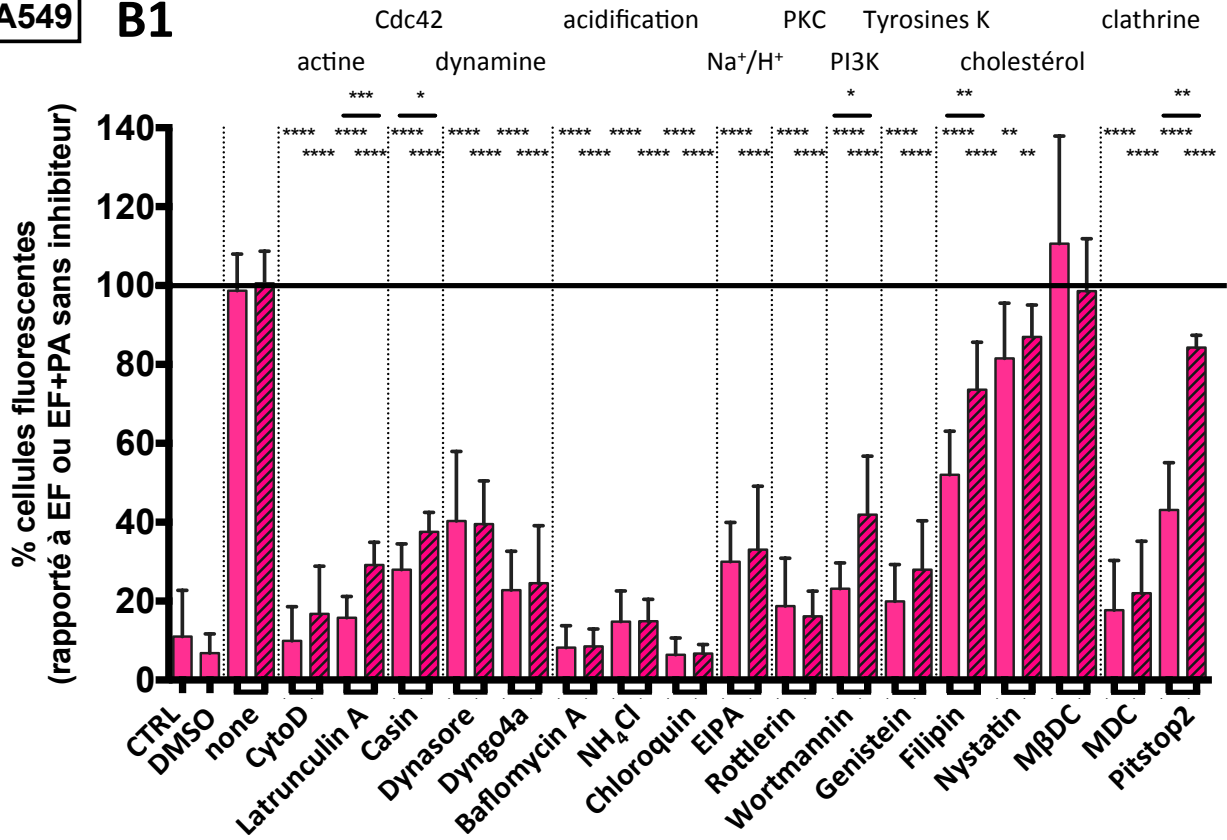
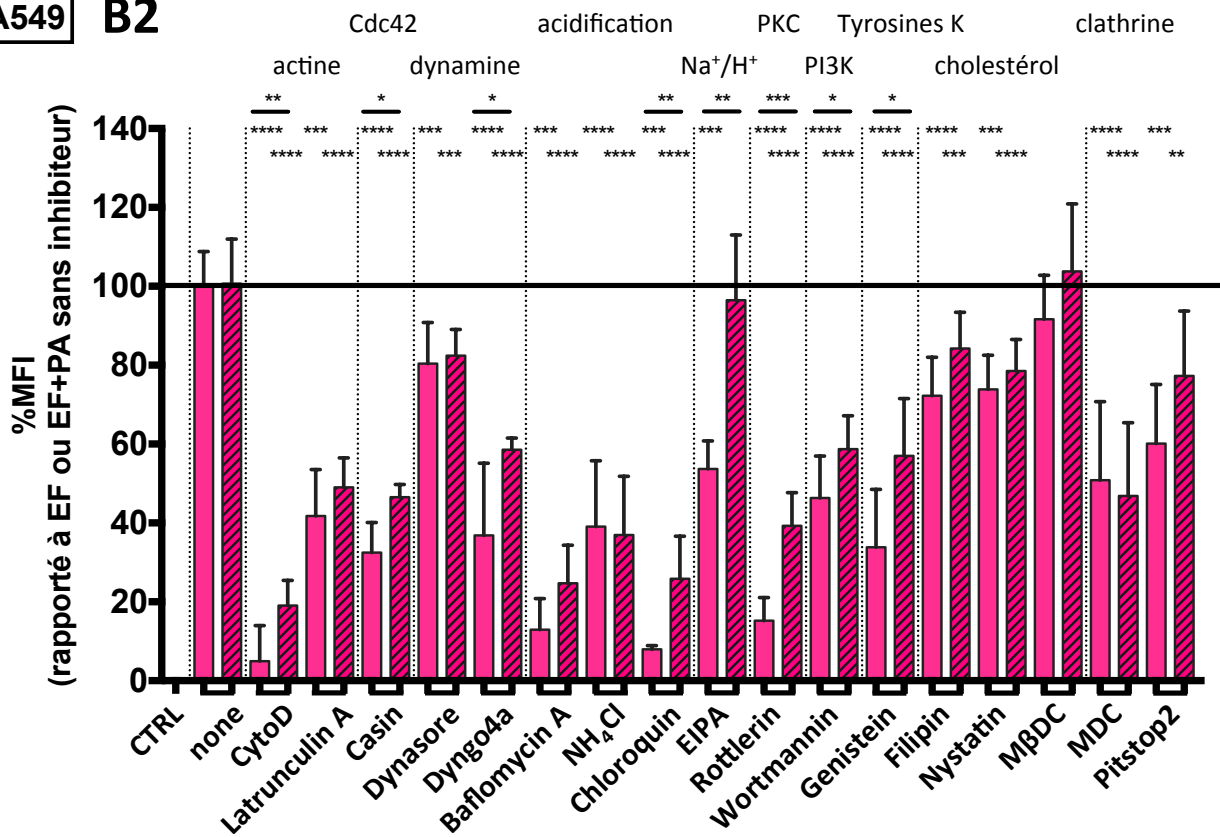
A1



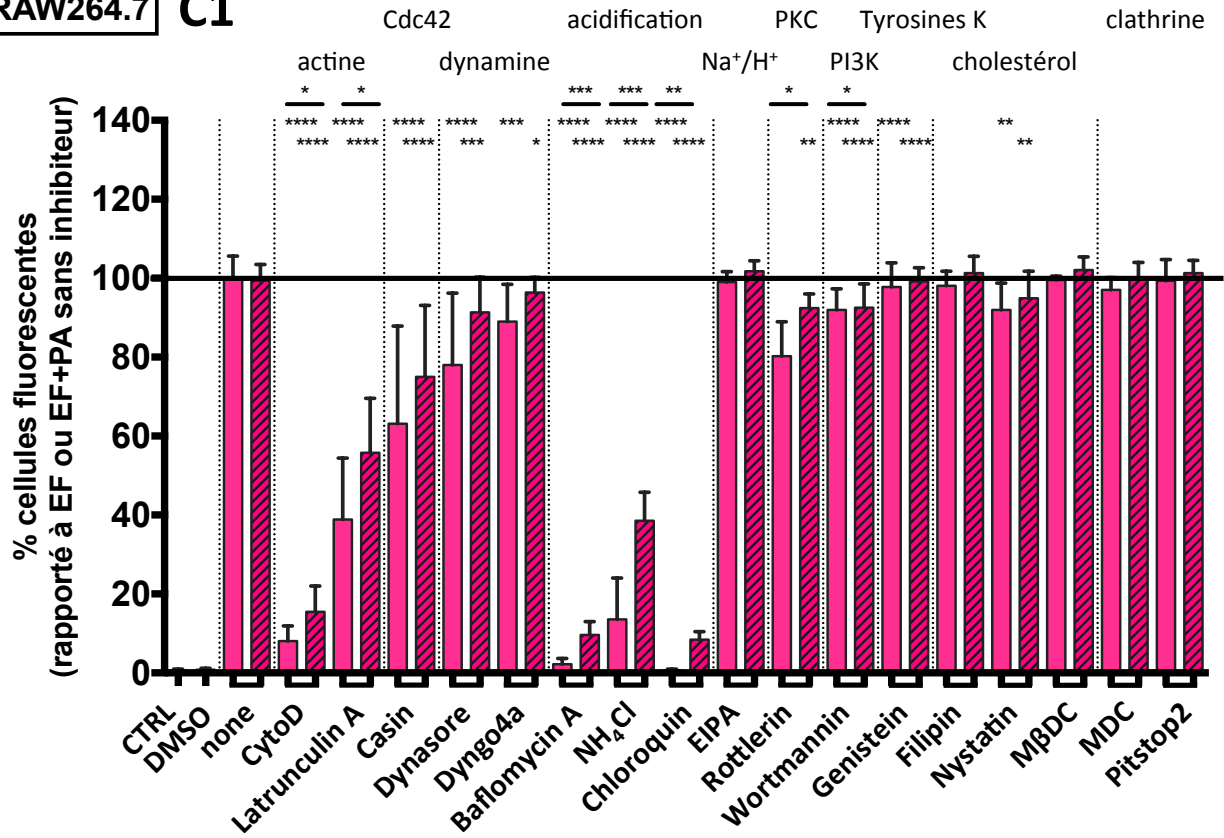
A549

A2



A549**B1****A549****B2**

RAW264.7 C1



RAW264.7 C2

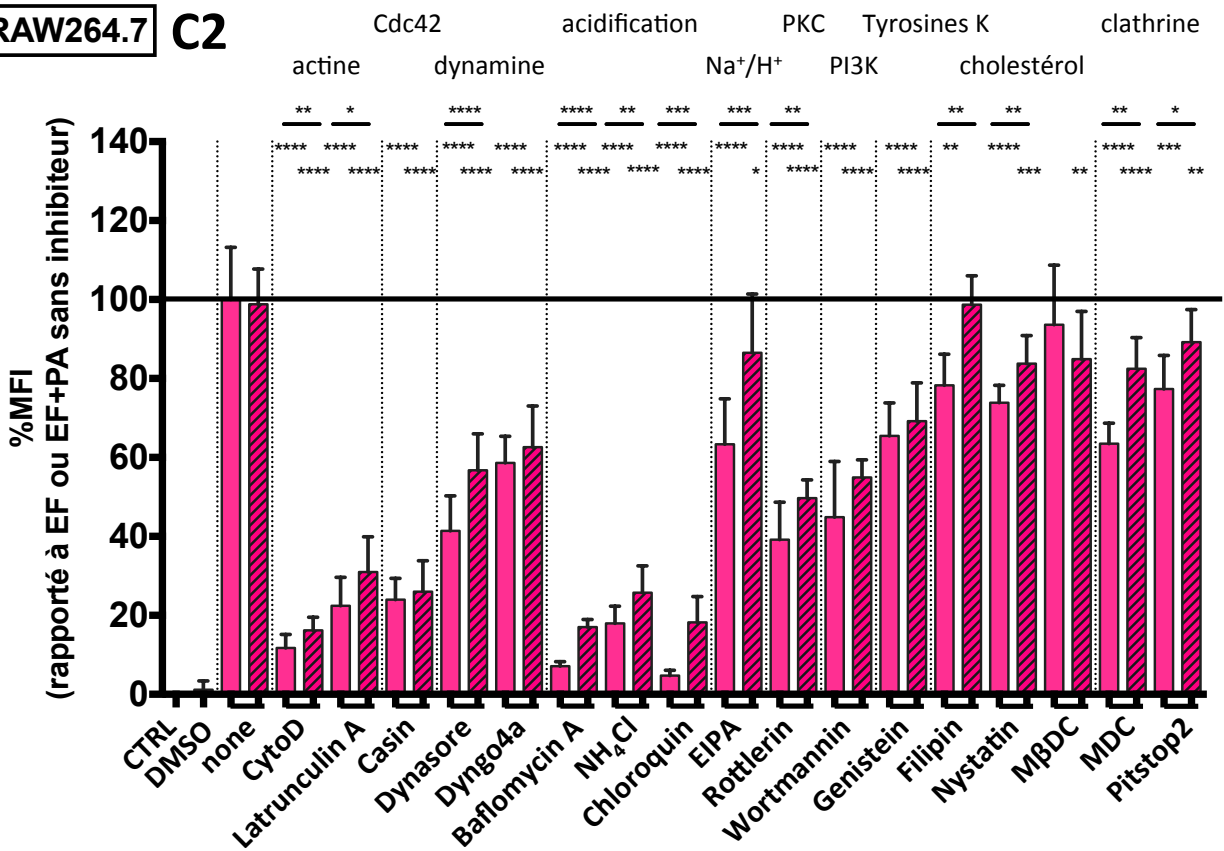


Figure 25. Endocytose de EFvenus et EFscarlet dans les cellules A549 et RAW264.7. Après 30 minutes de préincubation avec l'inhibiteur indiqué, les cellules ont été intoxiquées avec 100 nM de EF fluorescents (EFvenus ou EFscarlet) en absence de PA (EF, barres unies) ou en présence de 300 nM de PA (ET, barres à motifs) pendant 1h à 37°C. (A) A549, EFvenus, (B) A549, EFscarlet, (C) RAW264.7, EFscarlet. L'analyse par cytométrie de flux indique le pourcentage de cellules vivantes émettant un signal de fluorescence (A1, B1, C1) et la moyenne d'intensité de fluorescence des cellules présentant une fluorescence (A2, B2, C2). Pour chaque inhibiteur, les données ont été normalisées par rapport à la condition EFv, EFsc ou EFv+PA, EFsc+PA en l'absence d'inhibiteur représentant 100%. LatA, latrunculin A à 0,2 µg/mL en A549 et 0,4 µg/mL en RAW264.7 ; BafA, bafilomycine A à 400 nM ; Wort, wortmannine à 1µM ; NH4Cl à 40 mM ; Filipine à 0,5 µg/mL ; Nystatine à 5µM en A549 et 25 µM en RAW264.7 ; Pitstop2 à 5 µM. La significativité des résultats est indiquée en comparant EF en présence d'inhibiteur avec EF sans inhibiteur (étoiles), idem pour EF+PA (étoiles) ou en comparant EF et EF+PA pour un même inhibiteur (étoiles soulignées). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test Mann-Whitney, non paramétrique et non apparié, l'écart-type représentant la moyenne avec * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

5/ Activité des facteurs EF fluorescents en absence de PA.

5.1/ Les facteurs EF fluorescents sont inactifs en absence de PA.

Les résultats obtenus indiquent que EF et les EF fluorescents EFvenus et EFscarlet sont internalisés en absence de PA. Le mécanisme d'endocytose décrit jusqu'alors indique que EF nécessite PA pour exercer son activité enzymatique et physiopathologique.

L'activité enzymatique est mesurée par dosage ELISA de l'AMPc produit par EF ou les EF fluorescents (**Figure 26**). Le facteur EF natif (issu du commerce) n'induit l'augmentation de l'AMPc qu'en présence de PA dans les lignées de cellules épithéliales MDCK, A549 et CHOK1, et la lignée macrophagique RAW264.7. Les facteurs EFvenus et EFscarlet augmentent le taux d'AMPc en présence de PA dans toutes les lignées. Les cinétiques et le taux de production de l'AMPc par EF en présence de PA varient en fonction de la lignée cellulaire. Les cellules CHOK1 permettent de multiplier en 1h30 par 3,5 le taux d'AMPc en réponse à EF en présence de PA, le taux maximal atteint un facteur 2,5 en 3h dans les A549, 1,6 dans les MDCK en 1h30 et 2,5 dans les RAW264.7 en 2h.

Le taux d'AMPc mesuré en présence de PA est similaire lors d'une incubation avec EFscarlet ou avec EF. Cependant, EFvenus en présence de PA produit une quantité moindre d'AMPc que EFscarlet en présence de PA. Les mesures d'AMPc montrent parfois une très faible activité de EFvenus ou EFscarlet en absence de PA.

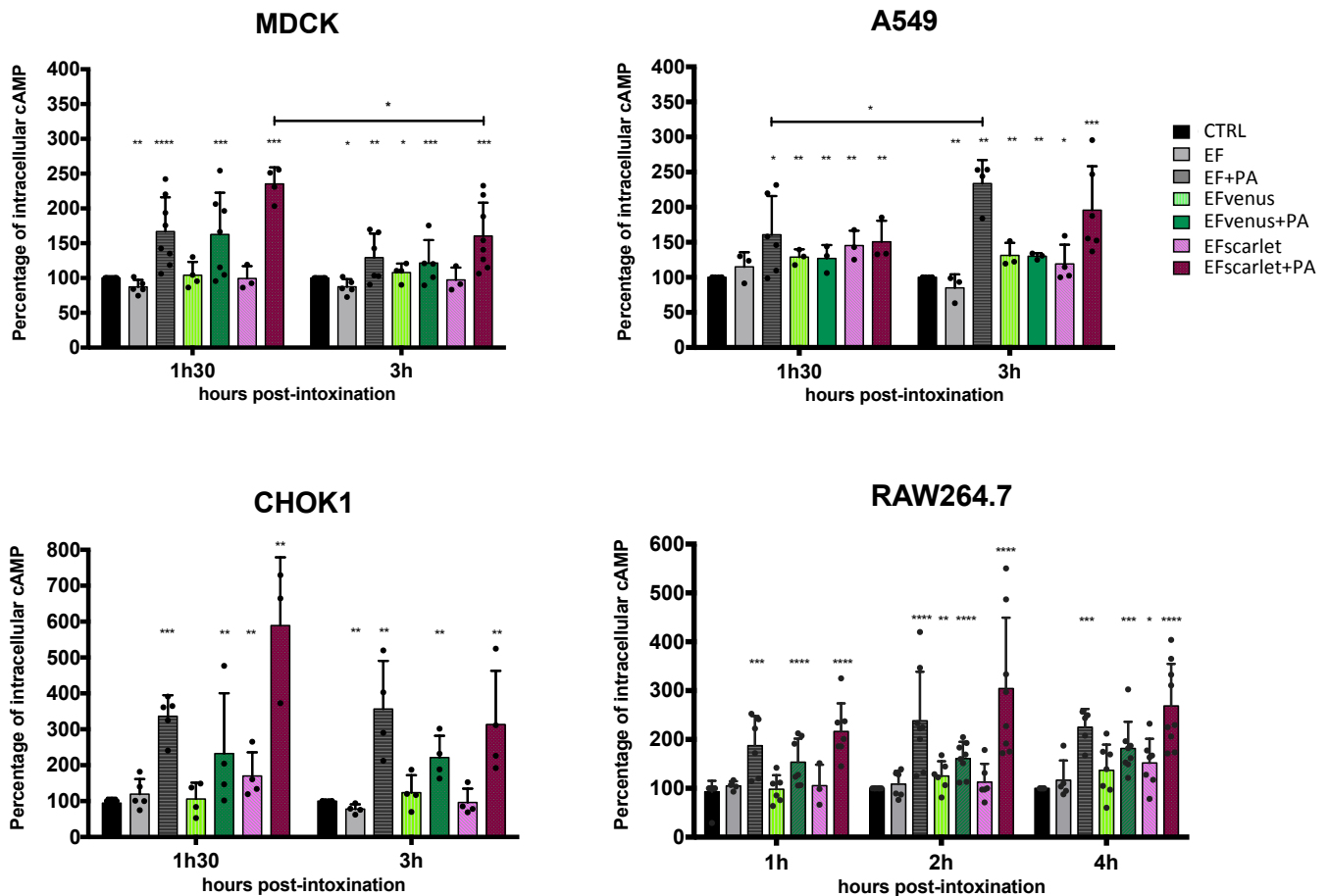


Figure 26. L'activité enzymatique de EF et des EF fluorescents est dépendante de PA. Les cellules MDCK, A549, CHOK1 et RAW264.7 ont été incubées à 37°C pendant les temps indiqués avec 100 nM de EF (gris), EFvenus (vert) ou EFscarlet (rose) sans PA ; ou avec PA 300 nM, . Les cellules seules sont utilisées comme contrôle négatif (CTRL). Le taux d'AMPC a été suivi par dosage ELISA. Chaque point est associé à une expérimentation individuelle en monoplicat. Les données ont été normalisées par rapport au CTRL représentant 100% AMPC. La significativité des résultats est indiquée en comparaison avec la condition contrôle (étoiles), ou en comparant une même condition à deux temps différents (étoiles avec barres). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test Mann-Whitney, non paramétrique et non apparié (étoiles), du test de comparaison multiple de Dunnett, non paramétrique one-way ANOVA (étoiles avec barre) l'écart-type représentant la moyenne avec * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

5.2/ Un intoxication séquentielle permet d'augmenter le taux d'AMPC intracellulaire.

Le facteur EF est internalisé en absence de PA mais n'est pas actif. Afin de déterminer le point critique à l'obtention de l'activité enzymatique dépendante de la présence de PA, un dosage de l'AMPC a été effectué suite à une incubation en deux temps avec EF et PA. Soit EF est incubé avec les cellules 1h, puis avec PA après lavage de l'excès de EF, ou inversement.

Lors des mesures de l'activité enzymatique de EF par dosage de l'AMPC, nous avons effectué des expérimentations en soumettant les cellules à une exposition séquentielle à EF puis PA, ou à PA puis EF. Afin de nous assurer de l'absence de PA résiduel en surface cellulaire avant d'exposer les cellules à

EF, le nombre de cellules vivantes CHOK1 possédant PA a été quantifié par cytométrie de flux, que ce soit en surface uniquement ou également en intracellulaire (**Figure 27**). Le but est d'écarter la possibilité d'une augmentation de l'AMPc suite à la reconstitution du complexe PA+EF à la membrane plasmique.

On observe une efficacité du lavage lorsque les cellules sont lavées 2 fois au PBS, puisque moins de 0,5% des cellules possèdent du PA détectable en surface cellulaire à 15 minutes comme à 1 heure. Environ 6% des cellules contiennent du PA en intracellulaire, stable de 15 à 60 minutes. La présence simultanée de PA et EF augmente l'internalisation de PA à 60 minutes où 20% de cellules contiennent du PA en intracellulaire.

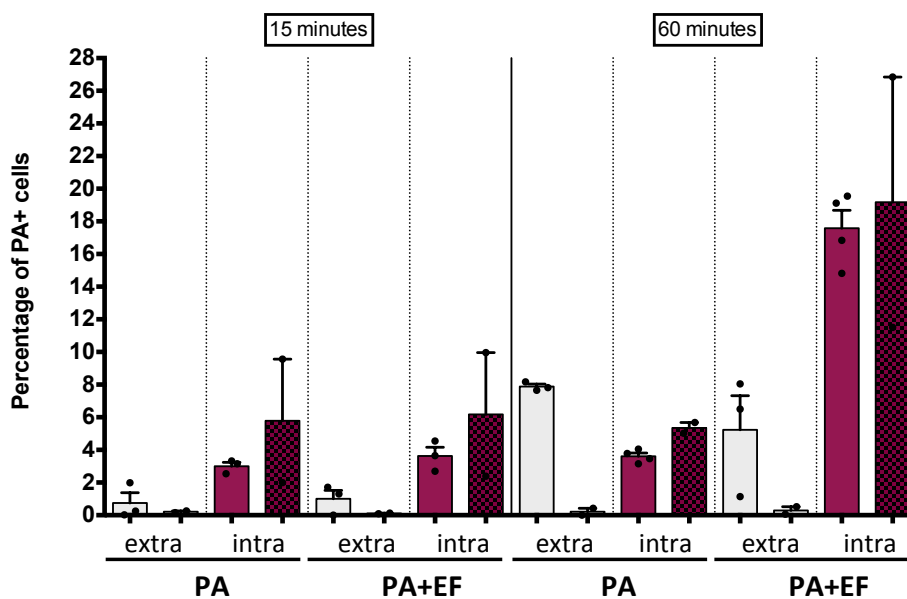


Figure 27. Distribution cellulaire de PA, effets des lavages et de la présence de EF. Les cellules CHOK1 sont mises en présence de PA 300 nM avec ou sans EF 100 nM (List Laboratories #178) pendant 15 ou 60 minutes à 37°C. Les cellules sont ensuite lavées 1 fois ou 2 fois au PBS avant d'être analysées en cytométrie de flux. La présence de PA en cellules CHOK1 est observée en condition non perméabilisée extracellulaire (extra), ou en condition perméabilisée soit extracellulaire et intracellulaire (intra). Lavage au PBS 1 fois (barres unies) ou 2 fois (barres à carreaux), PA (gris), PA+EF (rose foncé).

Lorsque les cellules sont soumises à une incubation avec PA puis avec EF, une augmentation de l'AMPc est détectée dans les RAW264.7 après 1h et dans les CHOK1 après 1h et 2h d'incubation avec EF (**Figure 28**). Aucune augmentation n'est mesurée dans les MDCK. Les cellules incubées avec EF puis PA induisent une augmentation de l'AMPc après 2h d'incubation avec PA dans les MDCK, et dès 1h dans les RAW264.7 et les CHOK1.

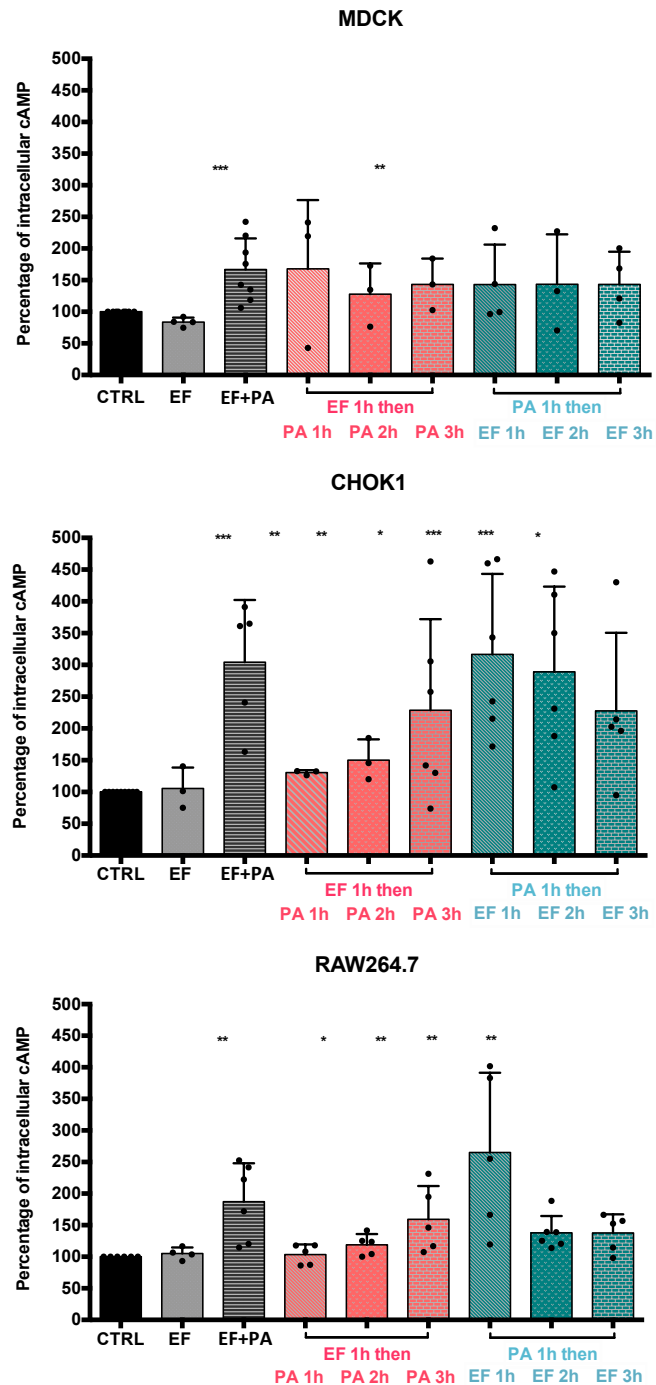


Figure 28. Le taux d'AMPC augmente suite à une entrée séquentielle de EF et PA. Les cellules MDCK, CHOK1 et RAW264.7 ont été incubées avec 100 nM EF ou 300 nM PA, 1h à 37°C. Après lavages, les cellules sont incubées 1h, 2h ou 3h avec PA ou EF respectivement. Les cellules seules (CTRL) et incubées 1h30 avec EF sont utilisées comme contrôles négatifs, les cellules incubées 1h30 avec EF+PA de contrôle positif. Le taux d'AMPC est mesuré par ELISA et normalisé par rapport au CTRL représentant 100% d'AMPC. Chaque point est associé à une expérimentation individuelle en monoplicat. Les données ont été normalisées AMPC. La significativité des résultats est indiquée en comparaison avec la condition CTRL (étoiles). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test Mann-Whitney, non paramétrique et non apparié, l'écart-type représentant la moyenne avec * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

5.3/ Bilan de l'activité de EF et des EF fluorescents

- Le EF natif est actif en présence de PA uniquement. Les EF fluorescents EFvenus et EFscarlet sont actifs en présence de PA.
- Un très faible taux d'AMPc peut être produit par les EF fluorescents en absence de PA.
- Le EF natif internalisé en l'absence de PA est actif suite à une exposition ultérieure à PA ; ou lorsque EF est ajouté ultérieurement à l'entrée de PA.

ARTICLE

En cours de remaniement pour soumission dans le journal Toxins

Anthrax edema factor is able to traffic inside cells in the absence of protective antigen

Emilie Tessier^{1*}, Clarisse Vigne¹, Laurence Cheutin¹, Annabelle Garnier¹, Jean-Nicolas Tournier^{1,2,3}, and Clémence Rougeaux^{1*}

¹ Unité Biothérapies anti-Infectieuses et Immunité, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Département Maladies Infectieuses et Immunité, Brétigny-sur-Orge, France

² Ecole du Val-de-Grâce, Paris, France

³ Centre National de Référence-Laboratoire Expert Charbon, Brétigny-sur-Orge, France

* Correspondence:

Emilie Tessier, Clémence Rougeaux

emilie.tessier@intradef.gouv.fr, clemence.rougeaux2@gmail.com

Keywords: anthrax toxins₁, edema factor₂, endocytosis₃, trafficking₄, cells₅, enzymatic activity₆, cAMP₇.

Abstract

Anthrax toxins are critical virulence factors of *Bacillus anthracis* and certain strains of *Bacillus cereus anthracis* like. They are composed of a common binding factor, protective antigen (PA), and two enzymatic proteins, lethal factor (LF) and edema factor (EF). PA is known to be necessary for endocytosis and LF and EF activity. However, a recent study highlighted blood dissemination of these factors in the absence of PA after intranasal infection, raising questions about the mechanism of dissemination of the enzymatic moiety. Here, we demonstrate, for the first-time, the endocytosis of EF in the absence of PA in various cell lines, with no lag, using a fluorescent EF chimera. There were no differences in the initial cellular EF endocytosis pathways in the absence of PA up to the late endosome stage. However, PA was still required for EF to reach its target and induce an increase in intracellular cAMP levels. Interestingly, pre-exposure to PA, or the sequential delivery of EF and then PA, rescued the increase in cAMP levels, indicating that PA and EF may functionally associate in the late endosome, as well as at the cell surface. Our data shed new light on EF trafficking and the location of PA and EF association for optimal cytosolic delivery.

1. Introduction

At the beginning of the 21st century, atypical strains of *Bacillus cereus* were described in America and Africa that provoke anthrax-like diseases in humans and great apes (Baldwin, 2020; Hoffmaster *et al.*, 2004; Klee *et al.*, 2006; Leendertz *et al.*, 2006, 2004). Thus far, anthrax has been shown to be caused by *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* biovar *anthracis* (Hoffmann *et al.*, 2017). As does *B. anthracis*,

certain atypical strains of *B. cereus* and *B. cereus* biovar *anthracis* produce the two A and B toxins: edema toxin (ET) and lethal toxin (LT). These two major virulence factors are composed of a common binding (B) factor, protective antigen (PA), and two factors with enzymatic activity (A), edema factor (EF) and lethal factor (LF). PA, LF, and EF of the atypical strains share more than 95% protein identity with the factors produced by *B. anthracis* (Hoffmaster *et al.*, 2004). EF, a calmodulin-calcium-dependent adenylyl cyclase, catalyzes the conversion of ATP to cAMP (Drum *et al.*, 2002; Leppla, 1982). LF, a zinc-dependent metalloprotease, cleaves and inactivates most mitogen-activated protein kinase kinases (Duesbery *et al.*, 1998; Vitale *et al.*, 1998). The actions of EF and LF induce cellular dysfunction (Kim *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2005; Puhar *et al.*, 2008; Raymond *et al.*, 2007; Tonello and Montecucco, 2009), leading to paralysis of the immune system at the early stage of infection, whereas at the late stage, they induce multiorgan failure (Liu *et al.*, 2014; Moayeri *et al.*, 2015).

PA (83 kDa) recognizes two major cell transmembrane receptors, tumor endothelial marker 8 (TEM8) (Bradley *et al.*, 2001) and capillary morphogenesis gene 2 (CMG2) (Scobie *et al.*, 2003). After binding, PA83 is cleaved by furin-like proteases (Klimpel *et al.*, 1992), producing PA63, which forms heptamers or octamers to which EF and/or LF bind. PA63 oligomerization leads to its localization to lipid rafts rich in cholesterol and glycosphingolipid but not caveolae (Abrami *et al.*, 2010, 2003; Young and Collier, 2007). Such partitioning triggers anthrax toxin receptor internalization through clathrin-mediated endocytosis (Abrami *et al.*, 2003). The acidification of endosomes allows a conformational change of PA from the pre-pore to pore form (Miller *et al.*, 1999). LF from early endosomes can either finish in the lumen of endosomal intraluminal vesicles (ILVs), in which it either remains or is released into the cytosol (Abrami *et al.*, 2013), or be released into the cytosol following fusion with late endosomes (Abrami *et al.*, 2004).

The initial path of LF and EF entry are common, up to their delivery to the cytosol (Zornetta *et al.*, 2010). The difference in their destiny occurs after this final step, as EF remains associated with the endosomal membranes. According to study, EF can exercise its activity from early (Guidi-Rontani *et al.*, 2000) or (Dal Molin *et al.*, 2006) late endosome membranes, explaining the cAMP concentration gradient observed from the center of the cell to the periphery (Dal Molin *et al.*, 2006).

Since the identification of the toxin components in the 1950s, EF has been known to be ineffective in the absence of PA (Leppla, 1982), which is necessary for its entry into cells and subsequent activity (Friebe *et al.*, 2016). However, circulating LF and EF have been detected earlier than PA in various animal models of anthrax infection (Lins *et al.*, 2019; Rougeaux *et al.*, 2020; Solano *et al.*, 2019; Tournier and Rougeaux, 2020). As the detection threshold of PA is higher than those of LF and EF, these results do not exclude the earlier presence of PA, which could be circulating or sequestered in tissues. We also previously demonstrated that the diffusion of LF and EF after intranasal infection is partially independent of PA (Rougeaux *et al.*, 2020). This raises questions about the mechanisms of passage of these factors across the lung epithelial barrier and the existence of a possible relevant effect of LF and EF when PA is not or minimally present.

Here, we investigated the cellular trafficking of EF, that it has been less studied. We assessed the entry and trafficking capacity of EF in the absence of PA by producing various EF-fluorescent protein chimeras with either monomeric Venus or Scarlet proteins. We compared the uptake and trafficking of fluorescent EF in the presence or absence of PA. We observed that EF entered cells independently of PA. The cellular mechanisms for entry and initial trafficking were very similar to those in the presence of PA, with a few small differences. PA was still a major factor for EF cytosolic activity but a sequential-entry experiment with these two factors suggests that EF or PA capture alone may contribute to an intracellular reservoir. The association of PA and EF may occur in several sites of the cell. The endocytosis of EF in the absence of PA in the various cells studied could also explain the early dissemination of EF in the infected host.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Cell lines and bacterial strains

The murine macrophage cell lines RAW264.7 (ECACC 91062702) and J774.1 (kind gift from Pierre Goossens) were cultivated in DMEM GlutaMAX supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). The macrophage cell line IC21 (kindly gift from P. Goossens) was maintained in RPMI supplemented with 10% FBS and GlutaMAX. Madin-Darby canine kidney cells (MDCK, CCL_34) and A549 cells (CCL-185) were maintained in DMEM GlutaMAX + 10% FBS + pyruvate. The human pulmonary cell line Calu-3 (HTB55) was maintained in advanced-MEM + 5% FBS + GlutaMAX and Chinese hamster ovary cells (CHOK1, CCL_61) in RPMI+ 10% FBS + GlutaMAX.

The bacterial strains *Escherichia coli* NEB5alpha (NEB C2987H) and NEBexpressIq competent *E. coli* (NEB C3037H) were grown in LB medium with the antibiotics ampicillin (100 µg/mL) or kanamycin (50 µg/mL), as required.

2.2 Reagents and antibodies

Endocytosis inhibitors were all purchased from Sigma Aldrich. EIPA (A3085), nocodazole (SML1665), dynasore (D7693), monodansylcadaverin (D4008), rottlerin (557310), genistein (345834), CASIN (SML1253), chloroquine (C6628), and cytochalasin D (250255) were purchased from Merck. Inhibitors were prepared according to the manufacturers' instructions.

The following antibodies were used: monoclonal anti-His (Clontech, 631212), goat anti-EF (List Laboratory, 773L), goat anti-EEA1 (Santa Cruz, sc6415), rabbit anti-Rab7 (PA5-78238, rabbit anti-CMG2 (Abcam, ab129004), rabbit anti-TEM8 (Abcam, ab19387), donkey anti-rabbit AF568 (Invitrogen, A10042), chicken anti-goat AF594 (ThermoFisher, A21468), and chicken anti-rabbit AF647 (ThermoFisher, A21443). All slides and coverslips were mounted using ProlongGlass with NucBlue (ThermoFisher P36981).

Q5 DNA polymerase (M0491) and HiFi cloning MasterMix (E2621) for cloning purposes were purchased from New England Biolabs. Plasmid pQE60 was purchased from Qiagen and pET28-*mVenus* and plasmid 85043 with the *mScarlet* gene from Addgene.

Recombinant EF and PA were purchased from Clinisciences (Nanterre, France). Cyclic adenosine 3', 5' cyclic monophosphate (cAMP) antiserum, cAMP acetylcholinesterase enzymatic tracer, Ellman's reagent, cAMP standard, and acetic anhydride used in the enzyme immunoassay (EIA) were all purchased from BertinTechnologies (Montigny-Le-Bretonneux, France).

2.3 Cloning, expression, and purification of fluorescent edema factor

Cloning. The *cya* gene from the strain G9241 was used for the construction of fluorescent EF. PCR amplification of plasmid pQE60, and the *cya*, *mVenus*, and *mScarlet* genes was performed using Q5 high-fidelity DNA polymerase with designed oligonucleotides (Table 1). The PCR products consisted of an open version of pQE60 with a C-terminal poly-histidine tag (poly-his), a *cya* gene, and a *mScarlet* gene for pQE60-*cya*-*mScarlet*-His cloning or an open form of pQE60 with an N-terminal poly-his, and a *cya*-*mVenus* gene for pQE60-His-*cya*-*mVenus* cloning. Cloning was performed following the instructions of the HiFi strategy from NEB, with a 1-h incubation in a thermocycler at 50°C. After transformation of NEB5alpha and selection on LB agar plus ampicillin, the sequences were confirmed by sequencing.

Purification. EF_{venus} and EF_{scarlet} were expressed in *E. coli* NEB express Iq grown in LB broth + ampicillin at 37°C with shaking at 220 rpm until reaching an optical density at 600 nm of 0.6. Following an overnight induction with 0.5 mM isopropyl-1-thio- α -D-galactopyranoside at 20°C, with shaking at

200 rpm, the bacteria were pelleted by centrifugation and the pellets stored at -80°C before purification. Pellets were then thawed on ice and suspended in lysis buffer (20 mM Tris, 100 mM NaCl, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DNase, 2.5 mM MgCl_2 , 0.1 mg/mL lysozyme, 10 mM imidazole, complete EDTA-free, pH 7.7). Bacterial cells were disrupted by sonication and incubated on ice for 90 min. The supernatants were loaded onto a HisTrapHP column equilibrated with buffer A (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 7.7). The column was washed with buffer A and the protein eluted with a 10-400 mM imidazole gradient in buffer A. Fractions containing fluorescent EF were selected after analysis by SDS-PAGE, western blotting (anti-His, anti-EF), and Coomassie staining. They were then concentrated using a spin concentrator 30 MWCO centrifugation unit. A supplemental purification was carried out by gel filtration using a Superdex S200increase 10/300GL column with buffer B (20 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 7.7). Fractions were selected as described above and concentrated using a spin concentrator 50 MWCO centrifugation unit. The protein concentration was calculated by measuring the absorbance at 280 nm.

2.4 Effect of inhibitors on cell viability and endocytosis pathways

The optimal concentration of various inhibitors was determined and their specific action verified (Table 2). A549 cells and RAW254.7 macrophages were treated with various concentrations of the compounds for 190 min at 37°C . Cytotoxicity was tested by crystal violet assay. Briefly, cells were incubated with a 0.2% crystal violet solution for 15 min and washed with water until all excess colorant was removed. Any remaining water in the wells was eliminated, and 200 μL 0.5% Triton X-100 added to release the stain from the cells. The absorbance at 595 nm was measured using a Biorad spectrophotometer. Cytotoxicity was calculated from the absorbance values normalized to the negative control (100% viability) and are expressed as the percentage of cell viability. Each experiment was carried out at least in triplicate.

A list of inhibitors and their known modes of action are presented in Table 2.

The effect of the pharmacological inhibitors (cytochalasin D [cytoD], nocodazole, dynasore [dyn], CASIN, EIPA, rottlerin, genistein, chloroquine [CQ], and monodansylcadaverin [MDC]) on the entry and trafficking of EF \pm PA in RAW264.7 and A549 cells was determined by pretreating the cells in 96-well plates (0.1×10^6 cells/150 μL) with each compound. After 30 min, cells were exposed to 100 nM EF \pm 300 nM PA. After 1 h of challenge, cells were treated for FACS analysis.

2.5 Confocal microscopy

Cells were plated at 0.1×10^6 cells/150 μL on glass slides equipped with a 96-well chamber and allowed to attach overnight. After a 1-h (macrophages) or 90-min (epithelial cells) incubation with 100 nM fluorescent EF \pm 300 nM PA in the appropriate medium, wells were washed with PBS, fixed with 4% formaldehyde, and washed again before mounting with ProlongGlass/NucBlue and a coverslip. For transwell experiments, epithelial cells (0.1×10^6 cells/200 μL) were seeded in the upper chamber of a 24-well transwell plate (PET, 0.4 μm). Cells were then incubated with 100 nM fluorescent EF \pm 300 nM PA in the appropriate medium for 90 min on the apical (150 μl) or basolateral side (450 μl). Then, cells were washed twice with PBS, fixed in 4% formaldehyde and the membranes mounted on glass slides. Depending on the experimental conditions (imaging of early or late endosomes), cells were then incubated with fluorescent primary antibodies overnight at 4°C and secondary antibodies for 1 h at room temperature. Images were acquired by confocal microscopy and processed using ImageJ software.

2.6 Flow cytometry analysis

RAW264.7 and A549 cells were seeded in 96 well-plates and allowed to attach overnight. Cells were treated with various inhibitors (30 min, 37°C) and incubated with EFscarlet (100 nM) \pm PA (300 nM) at 37°C for 1 h. Cells were collected by trypsinization, washed with PBS, stained with LiveDead blue (30 min, 4°C), washed again with PBS + 2% BSA, and fixed in 4% formaldehyde (10 min, room

temperature). Cells, finally in PBS + 2% BSA, were subjected to flow cytometry analysis on a CytoFlex LX instrument. Data were analyzed using Kaluza software.

2.7 cAMP assay

Intracellular cAMP concentrations in cell lysates was measured by EIA following the manufacturer's instructions (Cayman. Chemical, Michigan). Briefly, the standard curve ranged from 0.3 pmol/mL to 250 pmol/mL and was prepared using untreated cell lysates. ATP interference was eliminated by chemical reaction and acetylation of cAMP was performed to increase the sensitivity of detection. Absorbance was recorded at 405 nm using a spectrophotometer microplate reader iMark (Bio-Rad).

2.8 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software (version 4.0; GraphPad Software, San Diego, CA). Depending on the experiment, statistical significance was determined by the Mann-Whitney test or two-way ANOVA, Bonferroni multiple comparison test. The threshold for significance was set to $P < 0.05$.

3. RESULTS

EFvenus enters cells in the absence of PA and displays pole-dependent entry in epithelial cell lines

We followed the entry of EF in the presence or absence of PA by producing fluorescent EFvenus with a 6xHis tag at the N-terminus. The His tag allows easier purification and was previously shown to be associated with increased affinity of EF for the PA63 channel (Beitzinger *et al.*, 2012; Neumeyer *et al.*, 2006).

Various cell lines of macrophages and epithelial cells used in previous studies on anthrax toxins (Abrami *et al.*, 2003; Fujikura *et al.*, 2016; Guichard *et al.*, 2017; Powell *et al.*, 2015) were exposed for 1 h at 37°C to EFvenus ± PA (100 nM EFvenus ± 300 nM PA). Fluorescence was observed in all macrophage cell lines (Figure 1). It was previously shown in the T84 cell line that ET entry depends on the cellular pole (Beauregard *et al.*, 1999). Thus, we used transwell plates for epithelial cell lines, with access to either pole allowed. The addition of EFvenus ± PA (100 nM EFvenus ± 300 nM PA) to the upper chamber followed by incubation for 1 h at 37°C resulted in fluorescence for EFvenus and ETvenus in CHOK1 and A549 cells only (Figure 2), whereas no signal was detected for Calu-3 or MDCK cells. Conversely the addition of EFvenus ± PA to the bottom chamber (access to the basolateral side) resulted in fluorescence in MDCK and Calu-3 cells only (Figure 2) and not in CHOK1 or A549 cells. Thus, PA appears to not be required for the entry of EFvenus for various cell types and the pole of entry for EF is the same as that for ET: the apical side for CHOK1 and A549 cells and the basolateral side for MDCK and Calu-3 cells.

We verified that endocytosis was due to specific recognition of EF by exposing cells to the fluorescent Venus protein associated with a His tag, in the presence or absence of PA (Supplementary Figure 1). Under this condition, we observed no fluorescence, suggesting that the entry of EF may be mediated by specific recognition by the cell.

Entry of the fluorescent EFvenus chimera is mediated by a dynamic process

Flow cytometry analysis of RAW264.7 macrophages and A549 epithelial cells exposed to the EFvenus chimera, in the presence or absence of PA (100 nM EF ± 300 nM PA), confirmed that EF enters cells independently of PA (Figure 3). EFvenus and ETvenus were detected in A549 cells from 2 min (Figure

3A). The median fluorescence intensity (MFI) normalized to the control (referred to as normalized MFI) increased during the first 40 min and then remained at a plateau. The normalized MFI was higher for EFvenus at 10 min, whereas it was higher for ETvenus at 60 and 120 min. In RAW264.7 cells, EFvenus and ETvenus were detected from 2 min onward. The normalized MFI strongly and very quickly increased in the first 10 min, followed by a slight decrease from 10 to 40 min and then a plateau until 120 min (Figure 3B). The normalized MFI was higher for EFvenus at 10 min and the same for EFvenus \pm PA for the other timepoints. These results indicate that EF entered the cells rapidly, despite the addition of a fluorescent tag. The profile of endocytosis was similar for both cell lines, in the presence or absence of PA, with a plateau after 40 min.

We also monitored endocytosis by confocal microscopy. In-vitro time lapse microscopy showed the trapping of EFvenus by RAW264.7 cells, which was faster in the presence of PA (Supplementary movie).

Although the rapid entry of ET has been previously described (Gordon *et al.*, 1989; Leppla, 1982; Zornetta *et al.*, 2010), it has never been documented for EF alone.

The entry of fluorescent EF chimeras depends on several molecular players involved in various mechanisms of endocytosis

A549, CHOK1, and RAW264.7 cells expressed receptors for anthrax toxins, TEM8 and CMG2, under our experimental conditions (Figure 4A). We ruled out the passive uptake of EFvenus by treating the cells with either EFvenus or ETvenus at 4°C, which avoids endocytosis, or at 37°C. As for ETvenus, EFvenus entry required membrane trafficking, as no fluorescence was observed when cells were treated at 4°C (Figure 4B).

We assessed the key factors used by EF to enter cells in the absence of PA versus the entry of ET using a panel of inhibitors for two cell types, RAW264.7 macrophages and A549 alveolar epithelial cells, that bacillus toxin may encounter. Fluorescence was analyzed by flow cytometry. Cells were treated for 30 min with the inhibitors and then 1 h with EFvenus \pm PA (100 nM EF \pm 300 nM PA). Many of the inhibitors used on the RAW264.7 macrophages were brightly auto-fluorescent and the fluorescence overlapped with that of EFvenus. Thus, the analysis was conducted using EFscarlet \pm PA (100 nM \pm 300 nM).

Previous studies highlighted the involvement of actin in the endocytosis of *B. anthracis* toxins (Abrami *et al.*, 2010; Friebe *et al.*, 2016; Gordon *et al.*, 1988a; Jeong *et al.*, 2013). Exposure of both cell lines to cytochalasin D (CytoD), which prevents actin polymerization by binding to the ends of growing filaments, drastically reduced the normalized MFI (Figure 5A-B), with a slightly higher effect for ETvenus on A549 cells (Figure 5A). Conversely, the effect was higher for EFscarlet on RAW264.7 macrophages.

We assessed the involvement of dynamin II, required for clathrin-, caveolin-, and cholesterol-dependent endocytosis pathways and phagocytosis, using dynasore (Table 2). In A549 cells, we observed an increase in the normalized MFI for EFvenus \pm PA (Figure 5A), whereas dynasore decreased the normalized MFI of RAW264.7 macrophages, with a higher effect for EFscarlet than ETscarlet (Figure 5B). This suggests that dynamin II is not involved in the endocytosis of EF \pm PA in A549 cells or that another factor can take over to allow endocytosis. In RAW264.7 macrophages, dynamin II may be more highly involved in EF entry than ET entry.

Cdc42, a Rho GTPase, is involved in non-clathrin non-caveolae raft-dependent endocytosis, such as macropinocytosis and GRAF1-dependent endocytosis (Doherty and Lundmark, 2009; Kühling and Schelhaas, 2014). Treatment with CASIN, a Cdc42 inhibitor, decreased the normalized MFI of A549 cells, without a significant difference between EFvenus and ETvenus (Figure 5A). We also observed such a decrease in RAW264.7 macrophages, with no difference between EFscarlet and ETscarlet (Figure 5B).

Nocodazole, which disrupts the trafficking of vesicles from early to late endosomes by interfering with microtubule polymerization, appeared to reorganize the localization of EFvenus and ETvenus in A549 epithelial cells, leading to a fluorescent crown of dots at the periphery of the cells (Figure 5C). In RAW264.7 macrophages, the effect of nocodazole on the distribution of the fluorescence was less obvious. Despite the optimal concentration chosen, the effect on the cells was too harmful to draw any conclusions.

Fluorescent EF chimeras non-specifically use various endocytosis mechanisms

Previous studies highlighted partial co-localization of ET with caveolin-1 (Abrami *et al.*, 2008; Zornetta *et al.*, 2010). We investigated the role of caveolae in the endocytosis of EF in the two cell lines by treating cells with genistein, an inhibitor of caveolin-mediated endocytosis that acts on tyrosine phosphorylation (Kühling and Schelhaas, 2014) (Table 1). Genistein induced a decrease in the normalized MFI of A549 cells (Figure 5A) and RAW264.7 macrophages (Figure 5B), without a significant difference between fluorescent EF chimeras in the presence or absence of PA.

A study suggested that macropinocytosis could be involved in PA internalization in certain cell types, such as resting human airway and alveolar-resident phagocytes and leukocytes (Patel *et al.*, 2020). Macropinocytosis is an actin-dependent process of pinocytosis that requires PI3K activity, Na^+/H^+ exchange at the plasma membrane, and protein kinase C (Lin *et al.*, 2020; Renard and Boucrot, 2021). We assessed its involvement in the entry of the EF chimeras using EIPA and rottlerin, which target Na^+/H^+ exchange and protein kinases, respectively (Table 1). In A549 cells, the normalized MFI was reduced by rottlerin, with a greater decrease for EFvenus, whereas EIPA had no significant effect (Figure 5A). In RAW264.7 macrophages, we observed a decrease in the normalized MFI with both rottlerin and EIPA, with a greater effect for the fluorescent EF chimeras in the absence of PA (Figure 5B). The reduction induced by rottlerin in both cell lines was confirmed by confocal microscopy (Supplementary Figure 3).

We evaluated the involvement of clathrin-mediated endocytosis (CME) in the endocytosis of EF, as observed before for PA and ET (Abrami *et al.*, 2010, 2003), by applying MDC (Table 1) to A549 cells and RAW264.7 macrophages. MDC decreased the normalized MFI for EFvenus in A549 cells, but not that of ETvenus (Figure 5A). In RAW264.7 macrophages, there was a significant decrease in the normalized MFI that was greater for EFscarlet than ETscarlet (Figure 5A). Hence, CME appears to be more highly involved in the endocytosis of EF than that of ET in both cell lines.

Finally, our inhibitor-based experiments show that EF and ET entry utilize caveolae-mediated endocytosis in both cell lines. Macropinocytosis and CME were more involved in EF entry than in ET entry in A549 cells and RAW264.7 macrophages.

Acidification is critical for the endocytosis of fluorescent EF chimeras

Previous studies have highlighted the importance of acidification for ET entry into cells (Beauregard *et al.*, 1999; Gordon *et al.*, 1988b). Treatment of A549 cells and RAW264.7 macrophages with chloroquine (CQ), a lysosomotropic drug, markedly reduced the normalized MFI for EF fluorescent chimeras in the presence or absence of PA, with a higher effect for fluorescent EF chimeras in the absence of PA (Figure 5A-B). This marked decrease was also observed by confocal microscopy for both cell lines (Supplementary Figure 3). Thus, acidification is crucial for the internalization of fluorescent EF chimeras.

EFvenus undergoes the same endosomal trafficking as ETvenus

According to previous studies, ET associates with early or late endosome membranes (Guidi-Rontani *et al.*, 2000; Zornetta *et al.*, 2010). Under our conditions, we observed that both EFvenus and ETvenus co-localize in RAW264.7 macrophages with EEA1, an early endosome marker, 15, 30, and 60 min after

their addition (Figure 6). Co-localization with Rab7, a late endosome marker, was also observed from 15 min, for EFvenus in the presence or absence of PA.

Fluorescent EF chimeras require PA for optimal cellular activity

As fluorescent EF chimeras can enter cells, we assessed their activity by monitoring cAMP production in several cell lines at various times after their addition. The level of cAMP was compared to that induced by commercial EF in the presence or absence of PA.

In MDCK cells, we observed an increase in cAMP levels by 90 min for both ETvenus and ETscarlet, as for commercial ET (Figure 7A). At the 3-h timepoint, cAMP levels remained higher than the control for all three, with a tendency to decline.

In A549 epithelial cells, in which endocytosis was observed on the apical side, there was a small increase in cAMP levels after 90 min for ET, ETvenus, and ETscarlet (Figure 7B). At 3 h, the increase in cAMP levels was higher than at 90 min for ET. The increase in cAMP levels induced by ETvenus was in the same range as after 90 min. In the presence of ETscarlet, cAMP levels were not significantly higher than at 90 min but they tended to increase.

CHOK1 cells were the most susceptible to intoxication in our study, showing a more than 500% increase in cAMP levels after 90 min for ETscarlet relative to non-intoxicated cells, while commercial ET induced an increase of $\approx 350\%$. ETvenus also resulted in an increase in cAMP levels (Figure 7C). Although EFscarlet induced an increase in cAMP levels after 90 min, there was no longer a significant effect after 3 h, whereas cAMP levels were still higher with commercial ET, ETvenus, and ETscarlet, with a trend towards decreasing for ETscarlet.

In RAW264.7 macrophages, cAMP levels increased 1 h after challenge with commercial ET, ETvenus, and ETscarlet (Figure 7). After 2 h, the level was still higher for all three, with a tendency to increase between 1 and 2 h. At the 4 h time point, the level remained higher than that of non-intoxicated cells for all three.

The cAMP response varied depending on the type of cell and the timepoint post-treatment. ETscarlet and ETvenus showed enzymatic activity in the different cell lines.

Sequential entry of EF and PA allows the increase in cAMP levels

We observed that EF and ET could traffic up to the late endosome. We therefore investigated whether EF could be rescued by adding PA one to several hours later and display activity. We also monitored cAMP levels when cells were pre-treated with PA and then exposed one to several hours later to EF.

Epithelial cells sensitive to intoxication by the apical or basolateral pole and RAW264.7 macrophages were challenged for 1 h with EF (100 nM), washed to remove EF possibly bound to the cell surface, and exposed for 1, 2, or 3 h with PA (300 nM). Under these conditions, the increase in cAMP levels was significant for MDCK cells when they were exposed for 3 h with PA, for CHOK1 cells after 1, 2, or 3 h of PA exposition, and for macrophages after 2 and 3 h (Figure 8).

We tested whether the addition of PA before the challenge with EF could give similar results. Cells were first incubated for 1 h with PA. After washing the cells to remove unbound PA, they were challenged for 1, 2, or 3 h with EF. Under these conditions, MDCK cells did not significantly respond to the challenge. For CHOK1 cells, an increase in cAMP levels was induced 1, 2, and 3 h after exposition to EF (Figure 8), with the increase as large as when EF and PA were simultaneously added. For RAW264.7 macrophages, an increase was observed 1 and 2 h after EF challenge (Figure 8).

Overall, these results show that EF can be endocytosed independently of PA and its enzymatic activity can be subsequently rescued if PA is endocytosed later. Less surprisingly, the increase in cAMP levels was also observed when cells were first exposed to PA and then EF.

4. DISCUSSION

Anthrax toxins play a major role in the disease associated with *B. anthracis*. Depending on the atypical strain *B. cereus*, they are presumably also involved in anthrax-like diseases. Previous studies have highlighted the importance of the PA/LF/EF complex to enter cells and exert their actions. However, the levels of PA, LF, and EF produced by bacteria and the kinetics of dissemination of these factors in infected hosts has raised questions about the true requirement of this complex. For the first time, we demonstrate that EF can enter cells without PA. The entry and trafficking of EF involved specific mechanisms, with very little difference from those used by ET. The fluorescent EF chimeras used in this study were enzymatically active in cells, inducing an increase in cAMP levels. The capacity of EF to independently enter and traffic in cells could present several advantages for the bacteria.

We developed several fluorescent EF proteins to monitor the paths of EF entry, allowing their specific and sensitive analysis. Indeed, EGFP chimeras of EF and LF were previously used to demonstrate that ET and LT share the same internalization pathway and follow the same time-course in BHK cells (Zornetta *et al.*, 2010). Our constructions were sufficiently fluorescent to be directly observed, whereas in the aforementioned study, anti-GFP antibody amplification was used to detect the fluorescence, preventing the observation of live tracking (Zornetta *et al.*, 2010). As observed and expected for ETvenus, we show that EFvenus actively enters different cell types: macrophage and epithelial cell lines. Interestingly, entry into epithelial cell lines was pole-dependent in the presence or absence of PA: EFvenus and ETvenus used the apical side for CHOK1 and A549 cells and the basolateral side for MDCK and Calu-3 cells. As demonstrated in T84 cells (Beauregard *et al.*, 1999), this may be due to the specific distribution of the anthrax receptor, which is cell-type dependent. It may also be due to different levels of endocytosis processes (Lin *et al.*, 2020) and the internalization machinery available (Rennick *et al.*, 2021), depending on the cell line and/or cell pole. Indeed, in certain studies, for example, macropinocytosis in MDCK cells is active at the apical side but not the basolateral surface (Lin *et al.*, 2020).

Several studies have reported a range of times for ET entry into cells (ranging from a few minutes to almost 1 h) (Beauregard *et al.*, 1999; Dal Molin *et al.*, 2006; Gordon *et al.*, 1989; Leppla, 1982; Zornetta *et al.*, 2010). In our study, the addition of a fluorescent tag by creating a chimera did not prevent the rapid endocytosis of ET. Intriguingly, the EF chimera could enter A549 cells and RAW264.7 macrophages just as quickly in the absence of PA. The dynamics and entry profile of EF in the absence of PA was similar to those of EF in the presence of PA, strongly suggesting that the dynamics of the processes of endocytosis are independent of PA binding. Differences were mainly observed for A549 cells, with greater entry in the presence of PA at late timepoints. The addition of a His-tag at the N-terminus of EF has been shown to increase its affinity to PA (Beitzinger *et al.*, 2012; Neumeyer *et al.*, 2006). This could explain the higher entry of EF in the presence of PA. However, entry into A549 cells and RAW264.7 macrophages was greater for EF in the absence of PA at 10 min, ruling out this possibility. These differences need to be explained. For both cell types, the rapid entry of EF and EF+PA was followed by a plateau, suggesting an overload of saturable endocytosis pathways.

We demonstrate that the endocytosis of EF involves active cellular cytoskeletal processes, as for ET. Abrami *et al.* previously showed that actin is essential for efficient PA heptamerization in HeLa cells when bound to TEM8 and is required for the endocytosis of heptameric PA (Abrami *et al.*, 2010). More particularly, inhibition of the microfilament function blocked the entry of ET into CHO cells and inhibited the cAMP accumulation induced by ET by 93% (Gordon *et al.*, 1988a). In our study, in A549 cells and RAW264.7 macrophages, actin was involved in the entry of EF in the presence or absence of PA, with the level of involvement in the endocytosis of EF versus EF+PA varying depending on the cell type. In previous studies, the involvement of microtubules appeared to depend on the cell line. Thus, there was inhibition of the ET-induced rise of cAMP levels in HeLa cells treated with nocodazole (Dal Molin *et al.*, 2006) that was not observed in RAW264.7 macrophages (Guidi-Rontani *et al.*, 2000). In particular, these results suggest that EF is mainly associated with late endosomes in HeLa cells (Dal

Molin *et al.*, 2006), whereas it was associated with early endosomes in RAW264.7 macrophages (Guidi-Rontani *et al.*, 2000). Our results shed a slightly different light. Nocodazole induced a different topological distribution of EFvenus and ETvenus in A549 cells, suggesting the trafficking of EFvenus in the presence or absence of PA between early and late endosomes. Nocodazole toxicity on RAW264.7 macrophages interfered with the experiments and made it impossible to draw any conclusions on the role of microtubules in the trafficking of EF ± PA. However, in macrophages, we observed significant co-localization of EFvenus ± PA with EEA1, a marker of early endosomes, and with Rab7, a marker of late endosomes. These observations differ from previous results (Guidi-Rontani *et al.*, 2000), and could be explained by different cell culture conditions, which may have modified a number of physiological parameters. Indeed, we observed a reasonable level of CMG2 and TEM8 expression by RAW264.7 macrophages, whereas in earlier studies, both receptors were poorly, or not, expressed (Dal Molin *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2020). We can thus hypothesize that, in our cell culture conditions, both EFvenus and ETvenus trafficked through early and late endosomes in RAW264.7 macrophages, as well as in A549 epithelial cells.

Anthrax toxins can use multiple endocytosis pathways to enter cells, as already shown for other A-B toxins, such as cholera and Shiga toxins (Chinnapen *et al.*, 2007; Sandvig *et al.*, 2010). In HeLa, CHO, and BHK cells, the entry of anthrax toxins primarily involves lipid rafts via clathrin-dependent endocytosis and noncaveolar cholesterol and sphingolipid-rich domains (Abrami *et al.*, 2010, 2003; Boll *et al.*, 2004; Young and Collier, 2007). Other studies have highlighted predominant caveolin-mediated endocytosis of ET in CHOK1 cells (Abrami *et al.*, 2003; Zornetta *et al.*, 2010), with poor co-localization of ET with clathrin light chain in BHK cells. As mentioned previously, this discrepancy is not very surprising, as active uptake into cells involves multiple and complex mechanisms that may require common factors (Basturea, 2019; Rennick *et al.*, 2021). Moreover, the mechanisms of endocytosis may also differ from one cell line to another for the same molecule (Apodaca, 2001; Sandvig *et al.*, 2018). In our study, the endocytosis of EF and ET in A549 cells and RAW264.7 macrophages relied on several mechanisms. In A549 cells, EFvenus and ETvenus endocytosis required at least macropinocytosis, which is a rapid and non-saturable pathway, and CME and caveolin-mediated endocytosis, which are two mechanisms that involve receptors. Our results show slightly greater involvement of macropinocytosis and CME for EFvenus, whereas the involvement of caveolin-mediated endocytosis was the same for EFvenus in the presence or absence of PA. Macropinocytosis also appeared to be more crucial than the two other pathways for the entry of EFvenus in the presence or absence of PA. In accordance with these results, key factors, such as Cdc42 and actin, were more or less required for the endocytosis of EFvenus, whereas Dynamin II, involved in CME and caveolin-mediated endocytosis, did not appear to affect the endocytosis of EFvenus or ETvenus. In RAW264.7 macrophages, EFscarlet and ETscarlet used caveolae-mediated endocytosis equally during the initial phase of intracellular trafficking, whereas macropinocytosis and CME were more highly involved in EFscarlet entry. The key factor cdc42, involved in macropinocytosis, dynamin-independent endocytosis, endophilin A2-dependent endocytosis, and phagocytosis (Kühling and Schelhaas, 2014; Sandvig *et al.*, 2018) was equally important for the endocytosis of EFscarlet and ETscarlet. Dynamin-II was slightly more important for EFscarlet than ETscarlet endocytosis. This result suggests that EFscarlet may use another dynamin-dependent pathway, different from the clathrin and caveolae machinery, such as in phagocytosis (Gold *et al.*, 1999).

In HeLa and RAW264.7 cells, the use of bafilomycin A1, an inhibitor of the vacuolar ATPase proton pump, was shown to completely abolish or markedly reduce EF activity (Dal Molin *et al.*, 2006; Guidi-Rontani *et al.*, 2000). In CHO cells, ammonium chloride and chloroquine were reported to inhibit the cAMP response to ET (Gordon *et al.*, 1988a). We obtained similar results with the use of chloroquine in A549 cells and RAW264.7 macrophages. The fluorescence associated with EF and ET was markedly reduced in both cell types. Acidification appears to be primordial for the entry of EF into the cell, and even more so in the absence of PA.

Despite slight differences, especially in RAW264.7 macrophages, we can hypothesize that the plasma membrane is not the critical meeting place for EF and PA. The endosomal localization of EF, similar to that of ET, may be the site at which EF associates with PA, critical for the enzymatic activity of EF.

Indeed, although EF can enter cells alone, PA still plays an important role in the increase in intracellular cAMP levels. ETscarlet and ETvenus were at least or even more efficient than commercial ET in increasing the level of cAMP. This is not surprising, as a previous study showed that in-house EF was more biologically active than commercial EF (Hong *et al.*, 2005). The fluorescent chimeras used in our study were purified twice and had far fewer impurities than commercial EF (not shown). This could explain why we were able to observe a greater increase in cAMP levels with our constructs.

In accordance with our hypothesis of a new cellular interaction site between EF and PA, the simultaneous entry of EF and PA into the cells was not necessary to increase cAMP levels, a response that reflects their entry into the cytosol. CHOK1 cells, RAW264.7 macrophages, and, to a lesser extent, MDCK cells responded to the sequential entry of EF and PA. Initial delivery of PA, followed by a wash and later delivery of EF was more effective in inducing an increase of intracellular cAMP levels in CHOK1 cells and RAW264.7 macrophages. This result is not surprising, as a proportion of PA can remain on the cell surface after washing, although PA heptamers were found in endosomes within one hour (Abrami *et al.*, 2010). However, these results may indicate that EF and PA can traffic separately within cells. This could present a number of advantages for bacteria. As observed for LF, which can be retained in cells for several days, allowing long-term activity (Abrami *et al.*, 2013), EF and/or PA could also constitute a reservoir, waiting for the other component to act.

More globally, the separate trafficking of EF could also take part in transcytosis. This could explain the presence of EF in the blood circulation in animal experiments using a strain deleted for PA, whereas no bacteria were detected (Rougeaux *et al.*, 2020). Transcytosis has been demonstrated for other toxins, such as Shiga and cholera toxin in T84 cells (Lencer *et al.*, 1995; Malyukova *et al.*, 2009; Saslowsky *et al.*, 2013) and botulinum neurotoxin A through intestinal cell lines (Coesnon *et al.*, 2008).

Overall, we describe the effects and trafficking of EF, with or without PA, which could take part in various aspects of the role of toxins in the pathogenesis of anthrax. In accordance with most studies, PA is still required for EF to reach the cytosol and induce an increase in intracellular cAMP levels. Interestingly, pre-exposure to PA or the sequential delivery of EF and then PA rescued the increase in cAMP levels, signifying that the association of PA and EF may functionally occur in the late endosome, as well as on the cell surface. Such late association may help rescue non-loaded PA prepores, as well as EF molecules not associated with PA. This could explain the high efficiency of this toxin.

Our data provide a new picture of EF trafficking and the location of PA and EF association for alternative cytosolic delivery.

5. Funding

This work was supported by the Direction Générale de l'Armement, Biomedef NBC-4-B-4109.

6. Acknowledgments

We thank Pierre L. Goossens for kindly providing a number of the macrophage cell lines and the EF DNA from the strain G9241 and Florent Raffin for help in accessing the flow cytometry.

7. REFERENCES

- Abrami, L., Bischofberger, M., Kunz, B., Groux, R., van der Goot, F.G., 2010. Endocytosis of the anthrax toxin is mediated by clathrin, actin and unconventional adaptors. *PLoS Pathog.* 6, e1000792. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000792>
- Abrami, L., Brandi, L., Moayeri, M., Brown, M.J., Krantz, B.A., Leppla, S.H., van der Goot, F.G., 2013. Hijacking multivesicular bodies enables long-term and exosome-mediated long-distance action of anthrax toxin. *Cell Rep.* 5, 986–996. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.019>
- Abrami, L., Kunz, B., Deuquet, J., Bafico, A., Davidson, G., van der Goot, F.G., 2008. Functional interactions between anthrax toxin receptors and the WNT signalling protein LRP6. *Cell. Microbiol.* 10, 2509–2519. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01226.x>
- Abrami, L., Lindsay, M., Parton, R.G., Leppla, S.H., van der Goot, F.G., 2004. Membrane insertion of anthrax protective antigen and cytoplasmic delivery of lethal factor occur at different stages of the endocytic pathway. *J. Cell Biol.* 166, 645–651. <https://doi.org/10.1083/jcb.200312072>
- Abrami, L., Liu, S., Cosson, P., Leppla, S.H., van der Goot, F.G., 2003. Anthrax toxin triggers endocytosis of its receptor via a lipid raft-mediated clathrin-dependent process. *J. Cell Biol.* 160, 321–328. <https://doi.org/10.1083/jcb.200211018>
- Apodaca, G., 2001. Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton. *Traffic Cph. Den.* 2, 149–159. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2001.020301.x>
- Baldwin, V.M., 2020. You Can't B. cereus - A Review of Bacillus cereus Strains That Cause Anthrax-Like Disease. *Front. Microbiol.* 11, 1731. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01731>
- Basturea, G.N., 2019. Biological Condensates. *Mater. Methods* 9. <https://doi.org/10.13070/mm.en.9.2794>
- Beauregard, K.E., Wimer-Mackin, S., Collier, R.J., Lencer, W.I., 1999. Anthrax toxin entry into polarized epithelial cells. *Infect. Immun.* 67, 3026–3030. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.6.3026-3030.1999>
- Beitzinger, C., Stefani, C., Kronhardt, A., Rolando, M., Flatau, G., Lemichez, E., Benz, R., 2012. Role of N-terminal His6-Tags in binding and efficient translocation of polypeptides into cells using anthrax protective antigen (PA). *PloS One* 7, e46964. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046964>
- Boll, W., Ehrlich, M., Collier, R.J., Kirchhausen, T., 2004. Effects of dynamin inactivation on pathways of anthrax toxin uptake. *Eur. J. Cell Biol.* 83, 281–288. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00373>
- Bradley, K.A., Mogridge, J., Mourez, M., Collier, R.J., Young, J.A., 2001. Identification of the cellular receptor for anthrax toxin. *Nature* 414, 225–229. <https://doi.org/10.1038/n35101999>
- Chinnapen, D.J.-F., Chinnapen, H., Saslowsky, D., Lencer, W.I., 2007. Rafting with cholera toxin: endocytosis and trafficking from plasma membrane to ER. *FEMS Microbiol. Lett.* 266, 129–137. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00545.x>
- Couesnon, A., Pereira, Y., Popoff, M.R., 2008. Receptor-mediated transcytosis of botulinum neurotoxin A through intestinal cell monolayers. *Cell. Microbiol.* 10, 375–387. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01051.x>
- Dal Molin, F., Tonello, F., Ladant, D., Zornetta, I., Zamparo, I., Di Benedetto, G., Zaccolo, M., Montecucco, C., 2006. Cell entry and cAMP imaging of anthrax edema toxin. *EMBO J.* 25, 5405–5413. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601408>

Doherty, G.J., Lundmark, R., 2009. GRAF1-dependent endocytosis. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 1061–1065. <https://doi.org/10.1042/BST0371061>

Drum, C.L., Yan, S.-Z., Bard, J., Shen, Y.-Q., Lu, D., Soelaiman, S., Grabarek, Z., Bohm, A., Tang, W.-J., 2002. Structural basis for the activation of anthrax adenyl cyclase exotoxin by calmodulin. *Nature* 415, 396–402. <https://doi.org/10.1038/415396a>

Duesbery, N.S., Webb, C.P., Leppla, S.H., Gordon, V.M., Klimpel, K.R., Copeland, T.D., Ahn, N.G., Oskarsson, M.K., Fukasawa, K., Paull, K.D., Vande Woude, G.F., 1998. Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor. *Science* 280, 734–737. <https://doi.org/10.1126/science.280.5364.734>

Dutta, D., Donaldson, J.G., 2012. Search for inhibitors of endocytosis: Intended specificity and unintended consequences. *Cell. Logist.* 2, 203–208. <https://doi.org/10.4161/cl.23967>

Friebe, S., van der Goot, F.G., Bürgi, J., 2016. The Ins and Outs of Anthrax Toxin. *Toxins* 8, E69. <https://doi.org/10.3390/toxins8030069>

Fujikura, D., Toyomane, K., Kamiya, K., Mutoh, M., Mifune, E., Ohnuma, M., Higashi, H., 2016. ANTXR-1 and -2 independent modulation of a cytotoxicity mediated by anthrax toxin in human cells. *J. Vet. Med. Sci.* 78, 1311–1317. <https://doi.org/10.1292/jvms.15-0727>

Gold, E.S., Underhill, D.M., Morrisette, N.S., Guo, J., McNiven, M.A., Aderem, A., 1999. Dynamin 2 is required for phagocytosis in macrophages. *J. Exp. Med.* 190, 1849–1856. <https://doi.org/10.1084/jem.190.12.1849>

Gordon, V.M., Leppla, S.H., Hewlett, E.L., 1988a. Inhibitors of receptor-mediated endocytosis block the entry of *Bacillus anthracis* adenylate cyclase toxin but not that of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *Infect. Immun.* 56, 1066–1069. <https://doi.org/10.1128/iai.56.5.1066-1069.1988>

Gordon, V.M., Leppla, S.H., Hewlett, E.L., 1988b. Inhibitors of receptor-mediated endocytosis block the entry of *Bacillus anthracis* adenylate cyclase toxin but not that of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *Infect. Immun.* 56, 1066–1069. <https://doi.org/10.1128/iai.56.5.1066-1069.1988>

Gordon, V.M., Young, W.W., Lechler, S.M., Gray, M.C., Leppla, S.H., Hewlett, E.L., 1989. Adenylate cyclase toxins from *Bacillus anthracis* and *Bordetella pertussis*. Different processes for interaction with and entry into target cells. *J. Biol. Chem.* 264, 14792–14796.

Guichard, A., Jain, P., Moayeri, M., Schwartz, R., Chin, S., Zhu, L., Cruz-Moreno, B., Liu, J.Z., Aguilar, B., Hollands, A., Leppla, S.H., Nizet, V., Bier, E., 2017. Anthrax edema toxin disrupts distinct steps in Rab11-dependent junctional transport. *PLoS Pathog.* 13, e1006603. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006603>

Guidi-Rontani, C., Weber-Levy, M., Mock, M., Cabiaux, V., 2000. Translocation of *Bacillus anthracis* lethal and oedema factors across endosome membranes. *Cell. Microbiol.* 2, 259–264. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2000.00057.x>

Hoffmann, C., Zimmermann, F., Biek, R., Kuehl, H., Nowak, K., Mundry, R., Agbor, A., Angedakin, S., Arandjelovic, M., Blankenburg, A., Brazolla, G., Corogenes, K., Couacy-Hymann, E., Deschner, T., Dieguez, P., Dierks, K., Dux, A., Dupke, S., Eshuis, H., Formenty, P., Yuh, Y.G., Goedmakers, A., Gogarten, J.F., Granjon, A.-C., McGraw, S., Grunow, R., Hart, J., Jones, S., Junker, J., Kiang, J., Langergraber, K., Lapuente, J., Lee, K., Leendertz, S.A., Léguillon, F., Leinert, V., Löhrich, T., Marrocoli, S., Mätz-Rensing, K., Meier, A., Merkel, K., Metzger, S., Murai, M., Niedorf, S., De Nys, H., Sachse, A., van Schijndel, J., Thiesen, U., Ton, E., Wu, D., Wieler, L.H., Boesch, C., Klee, S.R., Wittig, R.M., Calvignac-Spencer, S., Leendertz, F.H., 2017. Persistent anthrax as a major driver of wildlife mortality in a tropical rainforest. *Nature* 548, 82–86. <https://doi.org/10.1038/nature23309>

Hoffmaster, A.R., Ravel, J., Rasko, D.A., Chapman, G.D., Chute, M.D., Marston, C.K., De, B.K., Sacchi, C.T., Fitzgerald, C., Mayer, L.W., Maiden, M.C.J., Priest, F.G., Barker, M., Jiang, L., Cer, R.Z., Rilstone, J., Peterson, S.N., Weyant, R.S., Galloway, D.R., Read, T.D., Popovic, T., Fraser, C.M., 2004. Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 8449–8454. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402414101>

Hong, J., Beeler, J., Zhukovskaya, N.L., He, W., Tang, W.-J., Rosner, M.R., 2005. Anthrax edema factor potency depends on mode of cell entry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335, 850–857. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.07.132>

Jeong, S.-Y., Martchenko, M., Cohen, S.N., 2013. Calpain-dependent cytoskeletal rearrangement exploited for anthrax toxin endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E4007-4015. <https://doi.org/10.1073/pnas.1316852110>

Kim, C., Wilcox-Adelman, S., Sano, Y., Tang, W.-J., Collier, R.J., Park, J.M., 2008. Antiinflammatory cAMP signaling and cell migration genes co-opted by the anthrax bacillus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 6150–6155. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800105105>

Klee, S.R., Ozel, M., Appel, B., Boesch, C., Ellerbrok, H., Jacob, D., Holland, G., Leendertz, F.H., Pauli, G., Grunow, R., Nattermann, H., 2006. Characterization of *Bacillus anthracis*-like bacteria isolated from wild great apes from Cote d'Ivoire and Cameroon. *J. Bacteriol.* 188, 5333–5344. <https://doi.org/10.1128/JB.00303-06>

Klimpel, K.R., Molloy, S.S., Thomas, G., Leppla, S.H., 1992. Anthrax toxin protective antigen is activated by a cell surface protease with the sequence specificity and catalytic properties of furin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 10277–10281. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.21.10277>

Kühling, L., Schelhaas, M., 2014. Systematic analysis of endocytosis by cellular perturbations. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1174, 19–46. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0944-5_2

Leendertz, F.H., Ellerbrok, H., Boesch, C., Couacy-Hymann, E., Mätz-Rensing, K., Hakenbeck, R., Bergmann, C., Abaza, P., Junglen, S., Moebius, Y., Vigilant, L., Formenty, P., Pauli, G., 2004. Anthrax kills wild chimpanzees in a tropical rainforest. *Nature* 430, 451–452. <https://doi.org/10.1038/nature02722>

Leendertz, F.H., Yumlu, S., Pauli, G., Boesch, C., Couacy-Hymann, E., Vigilant, L., Junglen, S., Schenk, S., Ellerbrok, H., 2006. A new *Bacillus anthracis* found in wild chimpanzees and a gorilla from West and Central Africa. *PLoS Pathog.* 2, e8. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020008>

Lencer, W.I., Moe, S., Rufo, P.A., Madara, J.L., 1995. Transcytosis of cholera toxin subunits across model human intestinal epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 10094–10098. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.22.10094>

Leppla, S.H., 1982. Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentrations of eukaryotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 3162–3166. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.10.3162>

Lin, X.P., Mintern, J.D., Gleeson, P.A., 2020. Macropinocytosis in Different Cell Types: Similarities and Differences. *Membranes* 10, E177. <https://doi.org/10.3390/membranes10080177>

Lins, R.C., Boyer, A.E., Kuklenyik, Z., Woolfitt, A.R., Goldstein, J., Hoffmaster, A.R., Gallegos-Candela, M., Leysath, C.E., Chen, Z., Brumlow, J.O., Quinn, C.P., Bagarozzi, D.A., Leppla, S.H., Barr, J.R., 2019. Zeptomole per milliliter detection and quantification of edema factor in plasma by LC-MS/MS yields insights into toxemia and the progression of inhalation anthrax. *Anal. Bioanal. Chem.* 411, 2493–2509. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01730-4>

Liu, S., Moayeri, M., Leppla, S.H., 2014. Anthrax lethal and edema toxins in anthrax pathogenesis. *Trends Microbiol.* 22, 317–325. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.02.012>

Malyukova, I., Murray, K.F., Zhu, C., Boedeker, E., Kane, A., Patterson, K., Peterson, J.R., Donowitz, M., Kovbasnjuk, O., 2009. Macropinocytosis in Shiga toxin 1 uptake by human intestinal epithelial cells and transcellular transcytosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 296, G78-92. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.90347.2008>

Miller, C.J., Elliott, J.L., Collier, R.J., 1999. Anthrax protective antigen: prepore-to-pore conversion. *Biochemistry* 38, 10432–10441. <https://doi.org/10.1021/bi990792d>

Moayeri, M., Leppla, S.H., Vrentas, C., Pomerantsev, A.P., Liu, S., 2015. Anthrax Pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* 69, 185–208. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104523>

Neumeyer, T., Tonello, F., Dal Molin, F., Schiffler, B., Orlik, F., Benz, R., 2006. Anthrax lethal factor (LF) mediated block of the anthrax protective antigen (PA) ion channel: effect of ionic strength and voltage. *Biochemistry* 45, 3060–3068. <https://doi.org/10.1021/bi0524316>

Park, J.M., Greten, F.R., Wong, A., Westrick, R.J., Arthur, J.S.C., Otsu, K., Hoffmann, A., Montminy, M., Karin, M., 2005. Signaling pathways and genes that inhibit pathogen-induced macrophage apoptosis--CREB and NF-kappaB as key regulators. *Immunity* 23, 319–329. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.08.010>

Patel, V.I., Booth, J.L., Dozmorov, M., Brown, B.R., Metcalf, J.P., 2020. Anthrax Edema and Lethal Toxins Differentially Target Human Lung and Blood Phagocytes. *Toxins* 12, E464. <https://doi.org/10.3390/toxins12070464>

Powell, J.D., Hutchison, J.R., Hess, B.M., Straub, T.M., 2015. *Bacillus anthracis* spores germinate extracellularly at air-liquid interface in an in vitro lung model under serum-free conditions. *J. Appl. Microbiol.* 119, 711–723. <https://doi.org/10.1111/jam.12872>

Puhar, A., Dal Molin, F., Horvath, S., Ladant, D., Ladants, D., Montecucco, C., 2008. Anthrax edema toxin modulates PKA- and CREB-dependent signaling in two phases. *PloS One* 3, e3564. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003564>

Raymond, B., Leduc, D., Ravaux, L., Le Goffic, R., Candela, T., Raymondjean, M., Goossens, P.L., Touqui, L., 2007. Edema toxin impairs anthracidal phospholipase A2 expression by alveolar macrophages. *PLoS Pathog.* 3, e187. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030187>

Renard, H.-F., Boucrot, E., 2021. Unconventional endocytic mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol.* 71, 120–129. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2021.03.001>

Rennick, J.J., Johnston, A.P.R., Parton, R.G., 2021. Key principles and methods for studying the endocytosis of biological and nanoparticle therapeutics. *Nat. Nanotechnol.* 16, 266–276. <https://doi.org/10.1038/s41565-021-00858-8>

Rougeaux, C., Becher, F., Goossens, P.L., Tournier, J.-N., 2020. Very Early Blood Diffusion of the Active Lethal and Edema Factors of *Bacillus anthracis* After Intranasal Infection. *J. Infect. Dis.* 221, 660–667. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz497>

Sandvig, K., Bergan, J., Dyve, A.-B., Skotland, T., Torgersen, M.L., 2010. Endocytosis and retrograde transport of Shiga toxin. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology* 56, 1181–1185. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.11.021>

Sandvig, K., Kavaliauskiene, S., Skotland, T., 2018. Clathrin-independent endocytosis: an increasing degree of complexity. *Histochem. Cell Biol.* 150, 107–118. <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1678-5>

- Sarkar, K., Kruhlak, M.J., Erlandsen, S.L., Shaw, S., 2005. Selective inhibition by rottlerin of macropinocytosis in monocyte-derived dendritic cells. *Immunology* 116, 513–524. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02253.x>
- Saslowky, D.E., Te Welscher, Y.M., Chinnapen, D.J.-F., Wagner, J.S., Wan, J., Kern, E., Lencer, W.I., 2013. Ganglioside GM1-mediated transcytosis of cholera toxin bypasses the retrograde pathway and depends on the structure of the ceramide domain. *J. Biol. Chem.* 288, 25804–25809. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.474957>
- Scobie, H.M., Rainey, G.J.A., Bradley, K.A., Young, J.A.T., 2003. Human capillary morphogenesis protein 2 functions as an anthrax toxin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 5170–5174. <https://doi.org/10.1073/pnas.0431098100>
- Solano, M.I., Woolfitt, A.R., Boyer, A.E., Lins, R.C., Isbell, K., Gallegos-Candela, M., Moura, H., Pierce, C.L., Barr, J.R., 2019. Accurate and selective quantification of anthrax protective antigen in plasma by immunocapture and isotope dilution mass spectrometry. *The Analyst* 144, 2264–2274. <https://doi.org/10.1039/c8an02479k>
- Tonello, F., Montecucco, C., 2009. The anthrax lethal factor and its MAPK kinase-specific metalloprotease activity. *Mol. Aspects Med.* 30, 431–438. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.07.006>
- Tournier, J.-N., Rougeaux, C., 2020. Anthrax Toxin Detection: From in Vivo Studies to Diagnostic Applications. *Microorganisms* 8, E1103. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081103>
- Vitale, G., Pellizzari, R., Recchi, C., Napolitani, G., Mock, M., Montecucco, C., 1998. Anthrax lethal factor cleaves the N-terminus of MAPKs and induces tyrosine/threonine phosphorylation of MAPKs in cultured macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248, 706–711. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9040>
- Young, J.A.T., Collier, R.J., 2007. Anthrax toxin: receptor binding, internalization, pore formation, and translocation. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 243–265. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142728>
- Zornetta, I., Brandi, L., Janowiak, B., Dal Molin, F., Tonello, F., Collier, R.J., Montecucco, C., 2010. Imaging the cell entry of the anthrax oedema and lethal toxins with fluorescent protein chimeras. *Cell. Microbiol.* 12, 1435–1445. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01480.x>

Table 1. Oligonucleotides used for cloning.

Name	Sequence	Matrix	Target
HisTag Cter			
Fwd-pQE60	GGATCTCATCACCATCACC	pQE60	pQE60 open
Rev-pQE60	CATGGTTAATTTCTCCTCTTTAATGAATTCTGTG		with His-tag Cter
Fwd-(pQE60)-Cya	AAGAGGAGAAATTAACCATGAATGAACATTACTG AGAG	<i>B. cereus</i> G9241	Cya gene
Rev-Cya-(Fluo+)	TGCTCACCATGAGCTCTTTTTCATCAATAATTTTTG GAAG	genomic DNA	
Fwd-(Cya)-Fluo+	TGATGAAAAAGAGCTCATGGTGAGCAAGGGCGAG	pET28- mVenus	<i>mVenus</i> or <i>mScarlet</i> genes
Rev-Fluo+-(pQE60)	ATGGTGATGGTGATGAGATCCCTGTACAGCTCGTC CATGC		
HisTag Nter			
Fwd-pQE60Fluo	GCTGTACAAGTAAGCTTAATTAGCTGAGC	pQE60- EFmVenusHis	pQE60 open
Rev-pQE60Cya NterHis	AATGTTCAATTGTGATGGTGATGGTGATGCATGGTTA ATTTCTCCTCTTTAATG		with His-Tag Nter
Fwd-EFvenus- NterHis	ATTAACCATGCATCACCATCACCATCACAATGAACAT TACTGAGAGTG	pQE60- EFmVenusHis	Cya-mVenus
Rev-EFvenus- Nter	ATTAAGCTTACTTGTACAGCTCGTCCATG		with His-Tag Nter, without His-Tag Cter

Table 2. Inhibitors of endocytosis and key factors of endocytosis. Their targets and actions have been previously described (Dutta and Donaldson, 2012; Rennick *et al.*, 2021; Sarkar *et al.*, 2005). Their concentrations for use on RAW264.7 macrophages and A549 cells were determined according to their known action and the percentage cell viability.

Inhibitors	Targets and actions	Endocytosis pathway targeted	Optimal concentrations in RAW264.7 and A549 cells (μM)	Percentage of cell viability in RAW264.7 and A549 cells
Casin	GTPase Cdc42	Clathrin and dynamin-independent endocytosis	10 - 5	69.9 – 73.7
Chloroquine (CQ)	Endosomal acidification function of clathrin and clathrin-coated vesicles	Autophagy, clathrin-mediated endocytosis	400 - 500	104.3 – 83.1
CytochalasinD (CytD)	Actin polymerization	Phagocytosis; macropinocytosis; most endocytic pathways	10 - 5	93.5 – 75.7
Dynasore (Dyn)	Dynamin II	Caveolae -, cholesterol-and clathrin- mediated endocytosis	100 - 100	75.4 – 84.1
EIPA	Na^+/H^+ exchange;	Macropinocytosis	50 - 30	75.7 – 84.9
Genistein	Tyrosine kinases	Caveolae-mediated endocytosis	400 - 400	86.7 – 91.8
Monodansylcadaverin (MDC)	Transglutaminase activity	Clathrin-mediated endocytosis	100 - 100	75.3 – 79.3
Nocodazole	Microtubules depolymerization	Trafficking from early to late endosomes	16,6 - 33,2	51.2 – 95.9
Rottlerin	Mitochondria (reduces cellular ATP levels); protein kinase C	Macropinocytosis	5 - 5	94.9 – 95.6

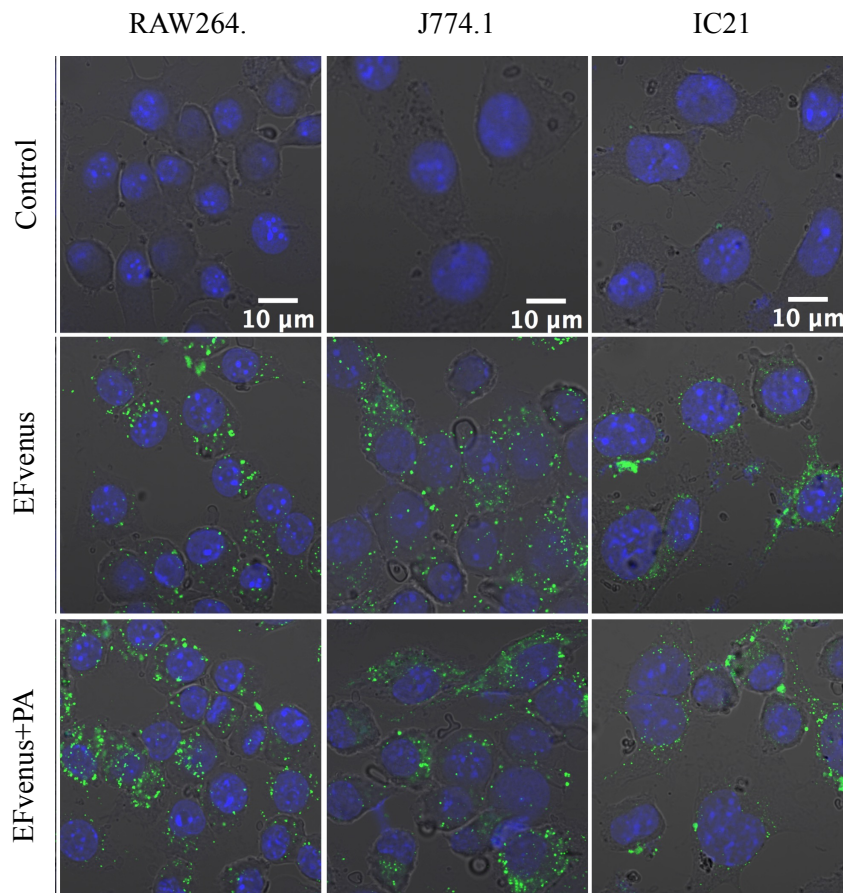


Figure 1. EFvenus entry into macrophages. The RAW264.7, J774.1, and IC21 macrophage cell lines were exposed for 1 h to EFvenus (100 nM), with or without PA (300 nM), at 37°C. Fluorescence was observed by confocal microscopy, with the nucleus in blue and EFvenus in green.

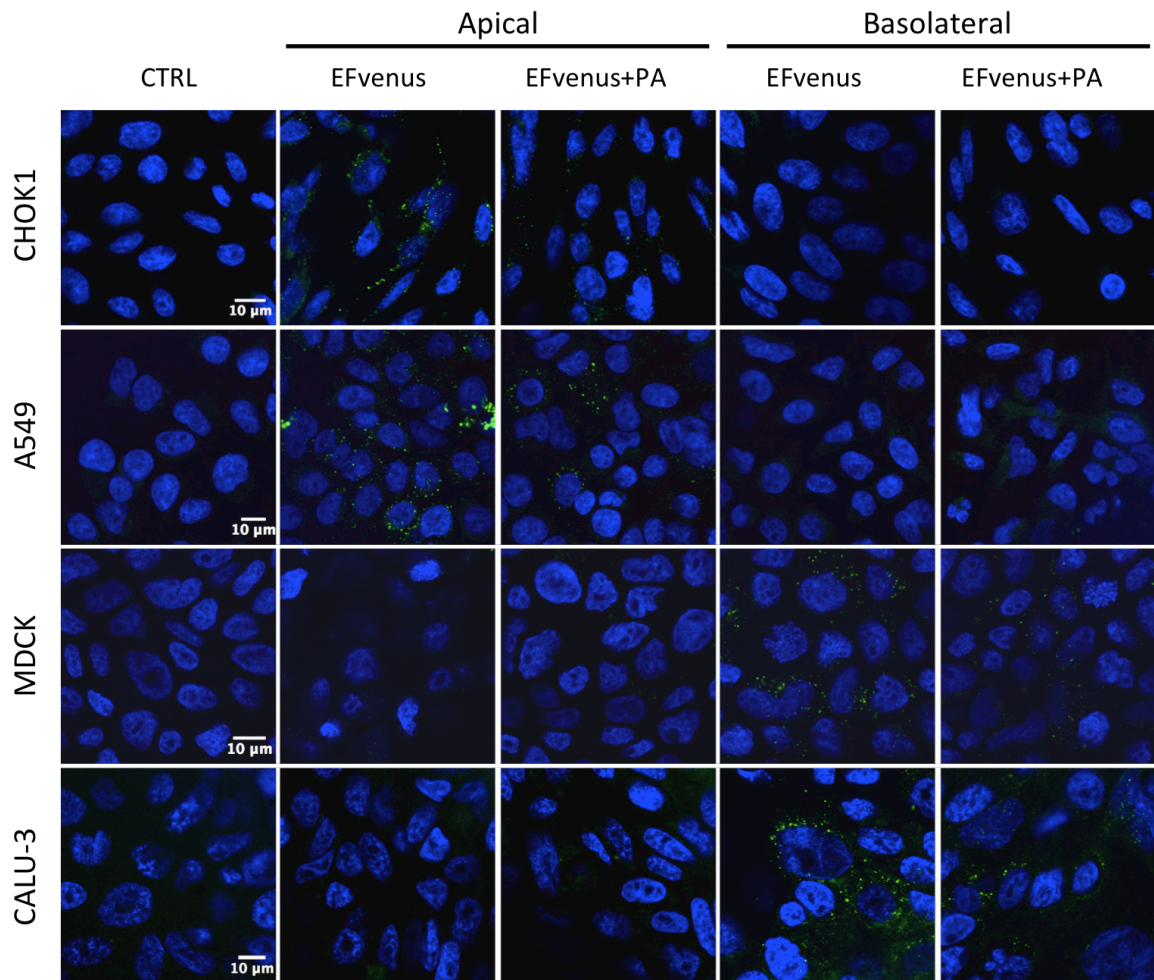


Figure 2. EFvenus entry into epithelial cells is pole dependent. The CHOK1, A549, MDCK, and Calu-3 epithelial cell lines were exposed for 1 h at 37°C to EFvenus (100 nM), with or without PA (300 nM), at the apical or basolateral side. Fluorescence was observed by confocal microscopy, with the nucleus in blue and EFvenus in green and compared to that of non-treated cells (CTRL for control).

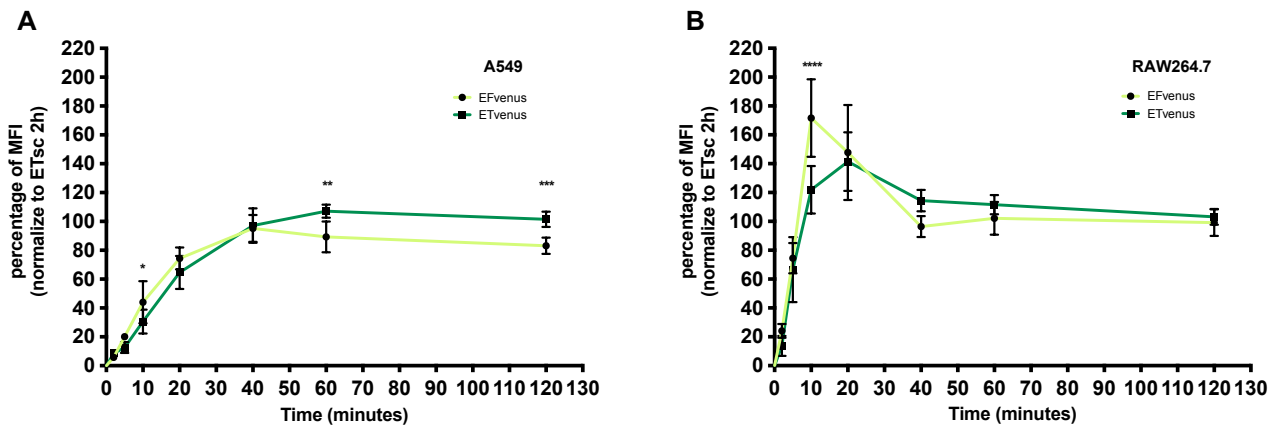


Figure 3. EFvenus shows rapid kinetics of endocytosis in cells. The A549 epithelial cell line (A) and RAW264.7 macrophages (B) were exposed for 2, 5, 10, 20, 40, 60, and 120 min to fluorescent EFvenus (100 nM), with or without PA (300 nM), at 37°C. The light green line represents the fluorescence associated with EFvenus. The dark green line represents the fluorescence associated with EFvenus+PA. The MFI (percentage) for each timepoint was normalized to the MFI of the fluorescent for EF+PA, representing 100% MFI. Experiments were performed three times in duplicate and the results are represented as the mean. Statistical analysis between fluorescent EF and fluorescent EF+PA, was performed by two-way ANOVA followed by the Bonferroni multiple comparisons test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

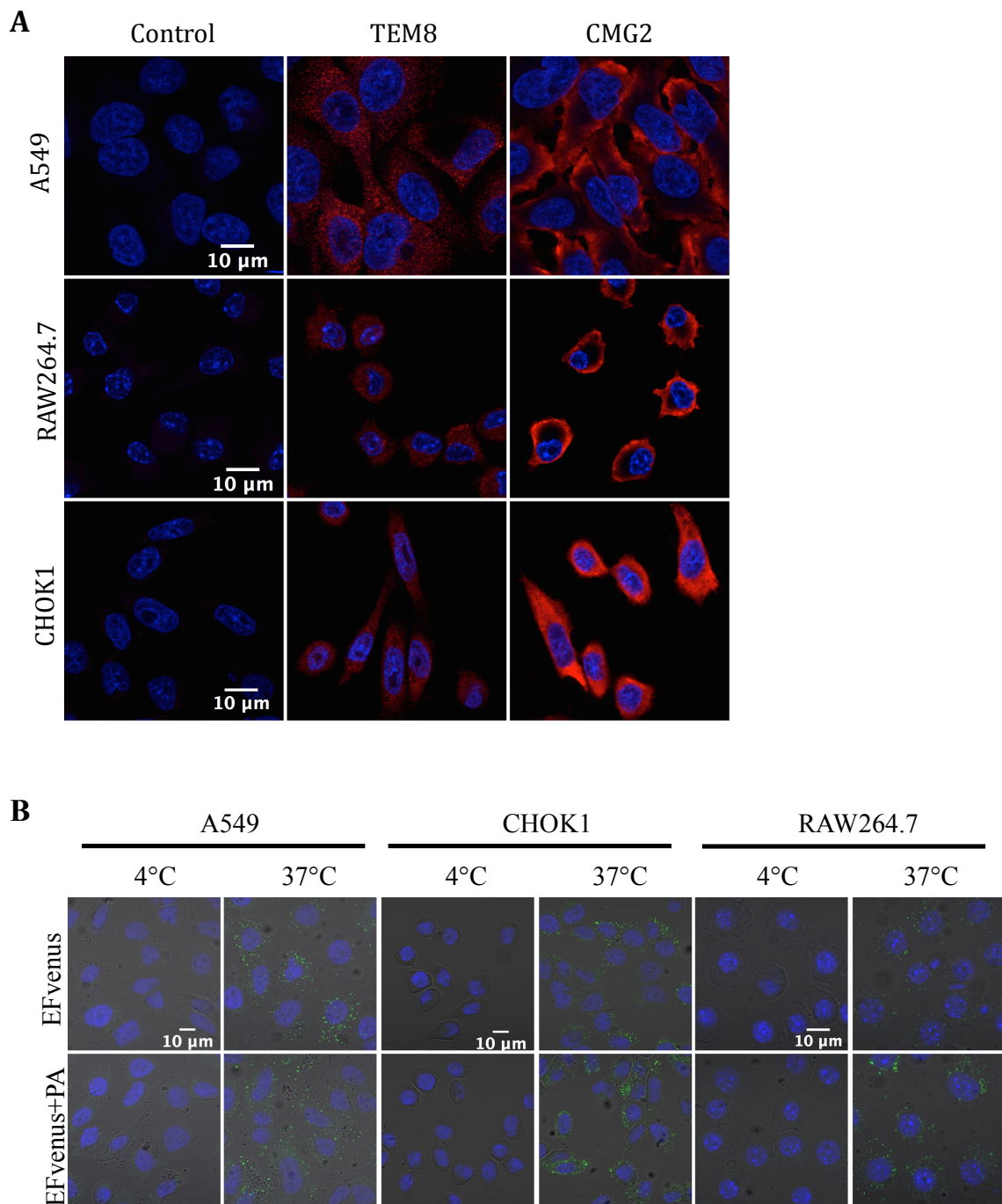


Figure 4. EFvenus entry into cells expressing TEM8 and CMG2 depends on an active cellular process. (A) Assessment of the expression of TEM8 and CMG2 (in red) by the A549 and CHOK1 epithelial cell lines and RAW264.7 macrophages. (B) A549, CHOK1, and RAW264.7 cells were exposed for 1 h to EFvenus (100 nM), with or without PA (300 nM), at 37°C (active entry) or 4°C (passive diffusion). Fluorescence was observed by confocal microscopy, with the nucleus in blue and EFvenus in green.

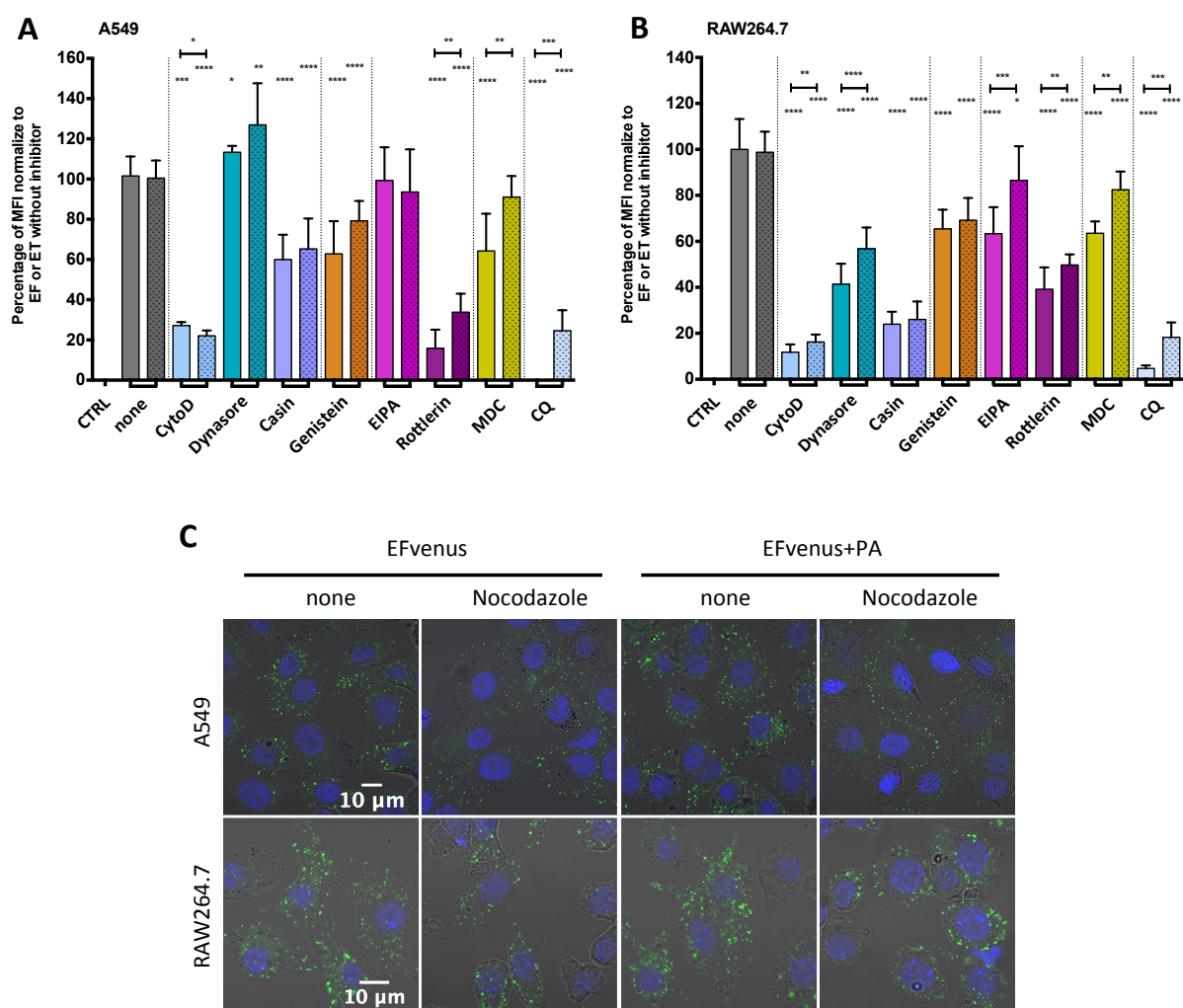


Figure 5. Endocytosis pathways and key factors involved in EFscarlet entry into cells. (A) A549 and (B) RAW264.7 were incubated with specific concentrations of inhibitors for 30 minutes at 37°C. Negative control (CTRL) and positive control (none) correspond to cells without inhibitor, without or with toxin respectively. EFscarlet was used in RAW264.7 and EFvenus in A549. Fluorescent EF (100 nM) (clear bars) or fluorescent EF (100 nM) +PA (300 nM) (motif bars) were then added for 1 h, at 37°C. MFI was monitored for each condition by cytometry analysis ($n \geq 3$, in duplicate). Each colors correspond to a specific inhibitor. Data were represented as mean with SD. Values were normalized to fluorescent EF +PA as 100% endocytosis. Stars alone indicated the result of the Mann-Whitney non parametric test, compared respectively to EF or EF+PA. Stars underlined with bar indicated a significative difference between EFscarlet and EFscarlet +PA using the Mann-Whitney non parametric test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. (C) Raw264.7 and A549 cells were incubated for 30 min at 37°C with nocodazole, and then exposed for 1h with EFvenus (100 nM) +/-PA (300 nM). Distribution of endocytosed EFvenus was then observed under confocal microscopy with nucleus in blue and EFvenus in green.

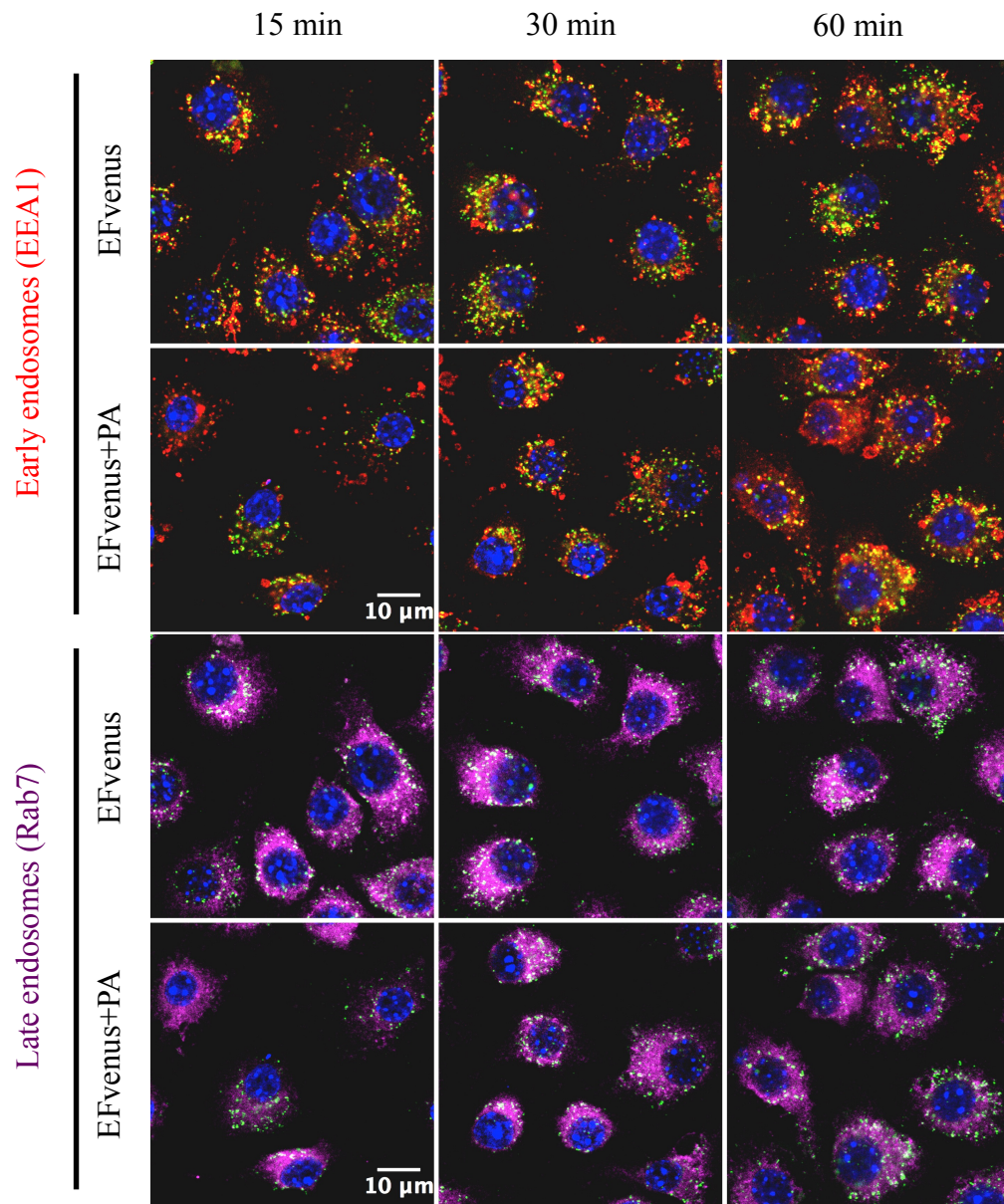


Figure 6. EFvenus undergoes the same endosomal trafficking as EFvenus+PA in RAW264.7 cells. RAW264.7 macrophages were exposed to EFvenus (green, 100 nM) \pm PA (300 nM) for 15, 30, or 60 min at 37°C. Cells were then stained for the nucleus (blue), early endosomes (anti-EEA1, red), and late endosomes (anti-Rab7, purple).

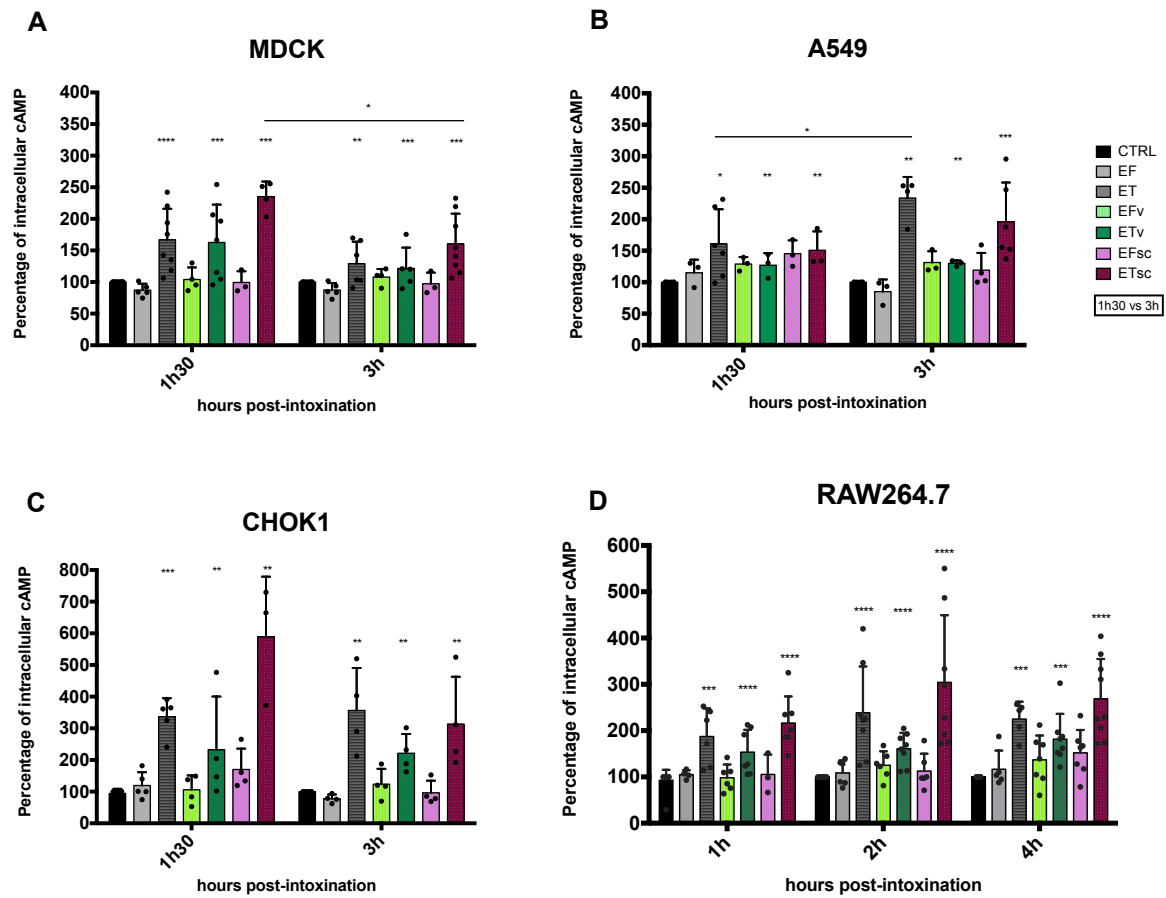


Figure 7. PA is important for the enzymatic activity of EF and fluorescent EF chimeras. MDCK, A549, CHOK1, and RAW264.7 cells were incubated with 100 nM EF (gray), EFvenus (green), EFscarlet (red) \pm PA (300 nM) for various times at 37°C. The level of intracellular cAMP was monitored by ELISA. Results are shown as the mean with the SD ($n \geq 3$). Each dot refers to a single experiment. Values were normalized to the control as 100% of the cAMP level. Stars alone indicate the results of the one-way ANOVA nonparametric Dunnett's multiple comparisons test compared to control. Stars indicate a significant difference between the control (CTRL, untreated cells) and a condition for the same timepoint and between the same conditions at different timepoints (nonparametric Mann-Whitney test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

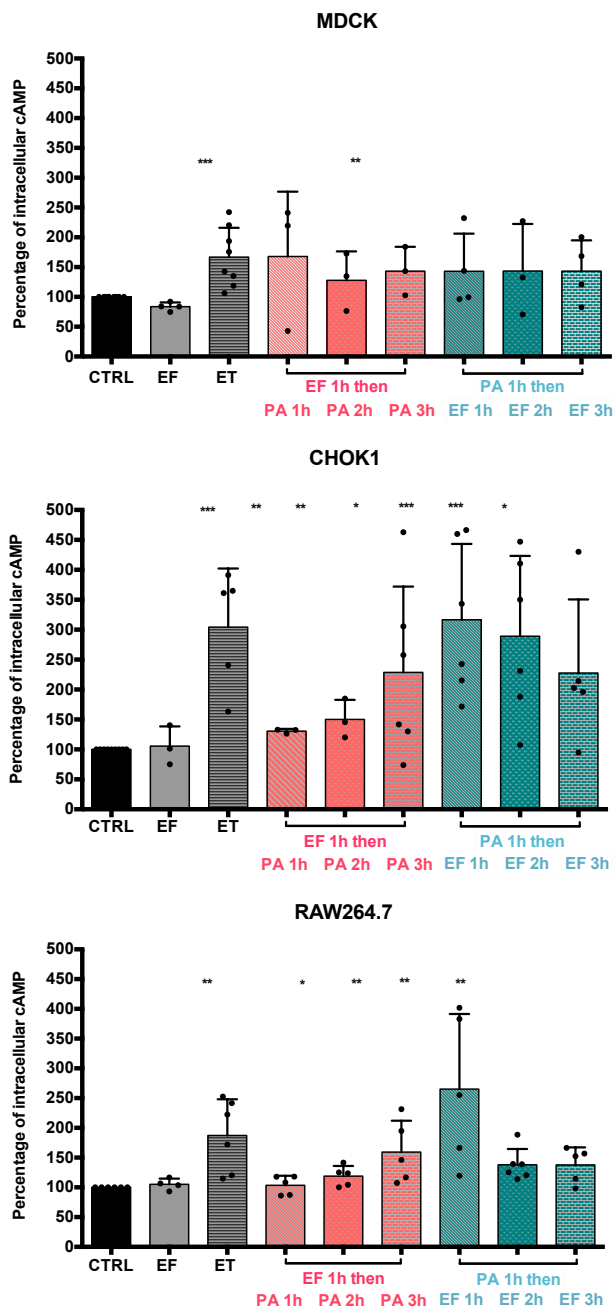
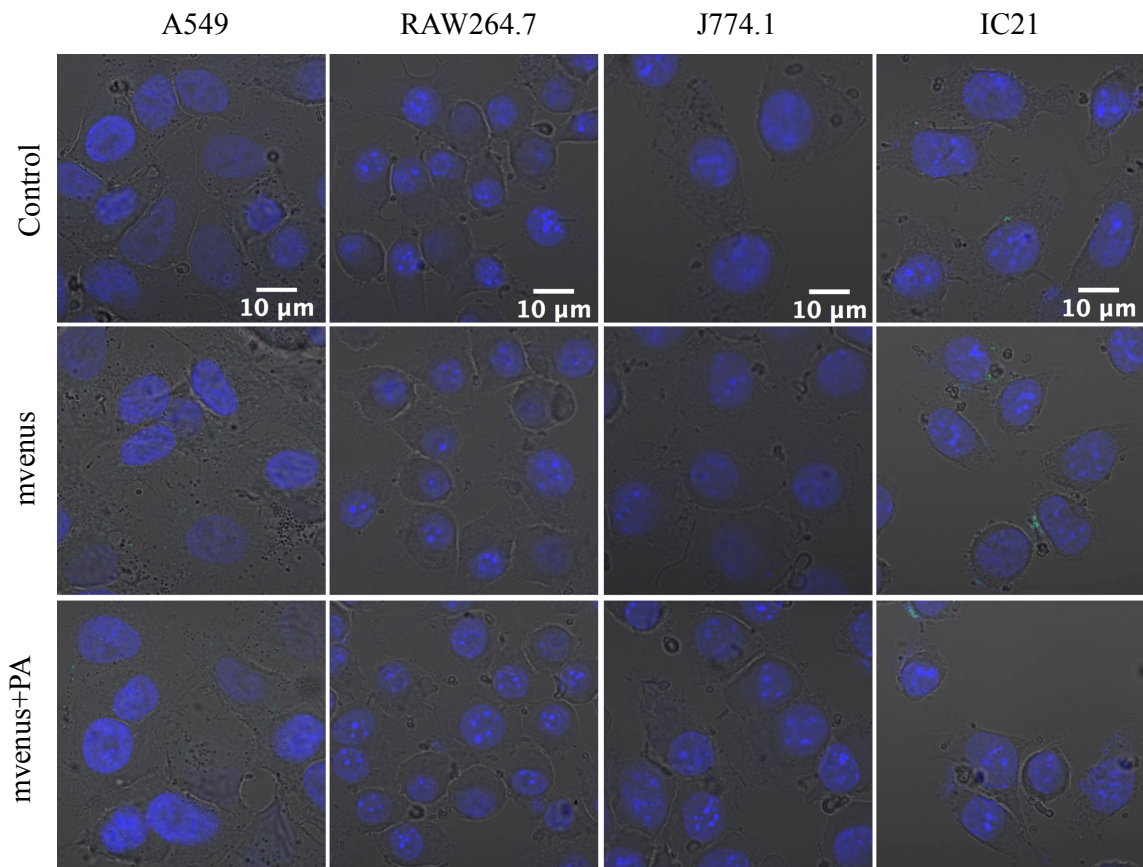
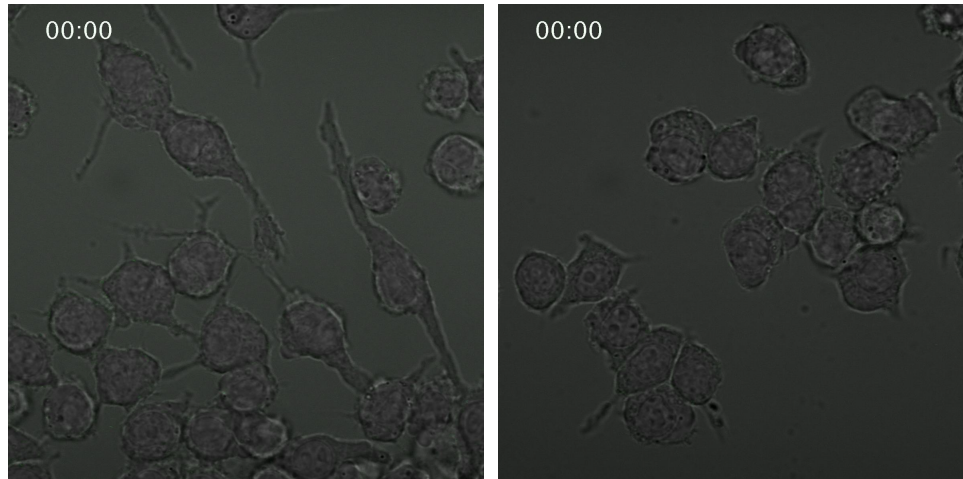


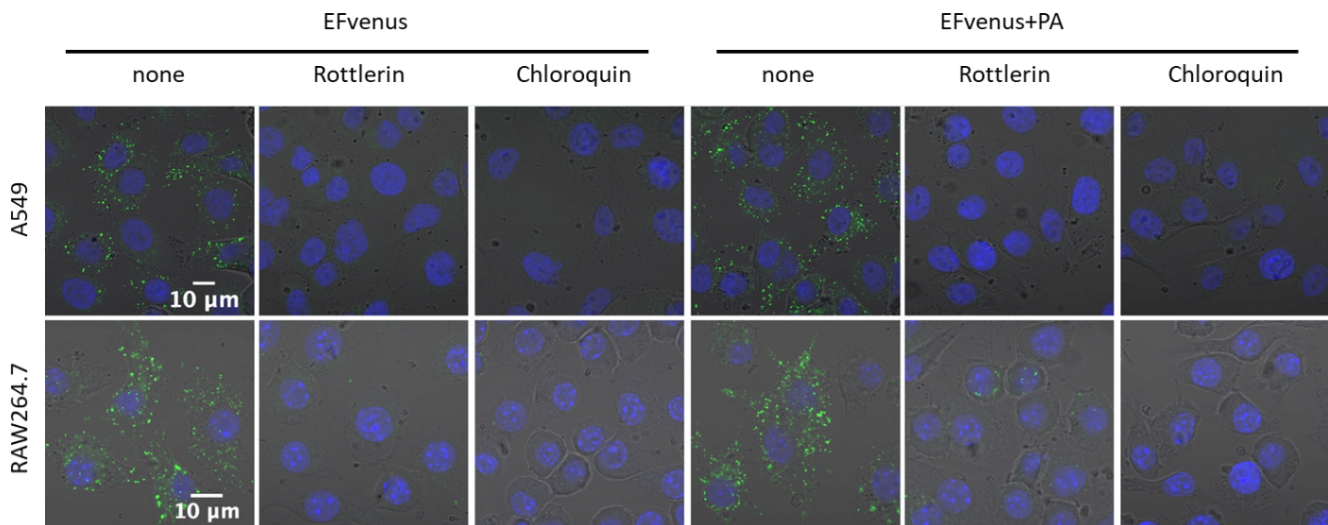
Figure 8. cAMP levels increase after the sequential entry of EF and PA. MDCK, CHOK1, and RAW264.7 cells were incubated with EF (100 nM) or PA (300 nM) for 1 h at 37°C and then washed and incubated again for 1, 2, or 3 h with PA or EF, respectively. The level of intracellular cAMP was monitored by ELISA and compared to that of cells treated with 100 nM EF \pm 300 nM PA after 90 min of exposition at 37°C. Results are shown as the mean with the SD ($n \geq 3$). Each dot refers to a single experiment. Values were normalized to control as 100% of the cAMP level. Stars indicate a significant difference between the control (CTRL, untreated cells) and one of the conditions of cell intoxication (nonparametric Mann-Whitney test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).



Supplementary Figure 1. The fluorescent protein mVenus is unable to enter cells. The RAW264.7, J774.1, and IC21 macrophage cell lines and A549 epithelial cell line were exposed for 1 h to mVenus (100 nM), with or without PA (300 nM). The negative control (Control) correspond to untreated cells. Fluorescence was observed by confocal microscopy with transillumination, with the nucleus in blue and mVenus in green.



Supplementary Figure 2. Time lapse of EFvenus entry \pm PA into RAW264.7 macrophages. RAW264.7 cells were exposed to EFvenus (100 nM) alone (left panel) or in the presence of PA (300 nM) (right panel) and observed by confocal microscopy under live cell imaging conditions. Images were captured every minute, with transillumination and a fluorescence laser for EFvenus (green). The clock at the upper left indicates the time in hours and minutes.



Supplementary Figure 3. Effect of rottlerin and chloroquine on EFvenus entry. RAW264.7 macrophages and A549 cells were incubated for 30 min at 37°C with rottlerin or chloroquine and then exposed for 1 h to EFvenus (100 nM) \pm PA (300 nM). The positive control (none) correspond to cells without inhibitor and with EFvenus (100 nM) \pm PA (300 nM). The distribution of endocytosed EFvenus was then observed by confocal microscopy, with the nucleus in blue and EFvenus in green.

DISCUSSION

La maladie du charbon est une zoonose touchant des hôtes divers, de l'animal à l'Homme. L'émergence de souches présentant les caractéristiques de virulence de *Bacillus anthracis* sur fond *Bacillus cereus*, et responsables de pathologies semblables à l'anthrax, a eu comme conséquence une augmentation de la susceptibilité d'hôtes et une extension des zones endémiques. Les animaux de la faune africaine sont touchés, et par extension, la population et les forces armées françaises positionnées au sein de divers théâtres d'opération en Afrique de l'Ouest y sont exposés. Mieux comprendre les mécanismes responsables de la virulence est donc crucial pour protéger ces personnes.

Les études menées sur modèles animaux avaient mis en lumière des effets pathologiques dus au facteur EF en présence de PA, rendant dysfonctionnel le système immunitaire et provoquant une défaillance de multiples organes. Les objectifs multiples : i) étudier la dissémination *in vivo* des toxines lors d'une infection intranasale, ii) déterminer leur distribution tissulaire et leur effet sur les barrières épithéliales rencontrées, puis iii) identifier l'atteinte cellulaire. Afin de réaliser ces études, la construction d'outils fluorescents a été développée. Celles-ci seront visualisées par des techniques de cytométrie de flux, d'immunohistochimie, ou encore de microscopie biphotonique. Contrairement au dogme établi et grâce à l'utilisation *in vitro* de ces outils, il a été montré que le facteur EF est capable d'être internalisé au sein de différents types cellulaires en absence de PA. Ainsi il a paru intéressant de comprendre et caractériser les processus d'endocytose de EF en absence de PA et de préciser comment le facteur EF seul dans la cellule pouvait avoir un rôle physiopathologique afin de préciser son impact dont il faudrait tenir compte au cours des études futures *in vivo*.

Les toxines, facteurs de virulence reconnus, sont produites et sécrétées par les souches *B. anthracis* et *B. cereus* anthracis-like. Les séquences protéiques des toxines des souches de *B. anthracis*, *B. cereus* G9241 et Bcbva Côte d'Ivoire (**Tableau E**) ont une identité avoisinant les 99%. De fait, les résultats obtenus avec le facteur EF de la souche G9241 peuvent être transposés aux facteurs EF d'un grand nombre de souches. Ces toxines agissent sur l'hôte en perturbant le fonctionnement des cellules immunitaires, la signalisation intra et intercellulaire, et engendrent une détérioration des épithéliums et endothéliums. Ce cumul d'action est responsable des effets pathologiques. Il est donc nécessaire de comprendre comment les toxines interagissent avec les différents types cellulaires ainsi que les étapes initiales permettant leur entrée au sein des cellules.

Études de l'internalisation et de la translocation : développement d'outils fluorescents

Différentes techniques ont été employées afin de suivre la présence des facteurs, la majorité permettant principalement l'étude de leur localisation cytosolique finale. Suite à son endocytose, la détection de EF est classiquement réalisée par dosage de l'AMPc. Un système rapporteur de l'endocytose de LF est utilisé

dans de nombreuses études : la fusion du domaine N-terminal de LF, LFn, avec la sous-unité catalytique de la toxine diphtérique provoquant l'arrêt de la synthèse protéique induisant la mort cellulaire.

Des facteurs EF fluorescents, produits sous forme de protéines recombinantes et purifiées, permettent de visualiser les processus endocytaires. Des facteurs EF ou LF exprimés en tandem avec des protéines fluorescentes ont déjà été utilisés (Zornetta *et al.*, 2010). Contrairement à ce qui a été observé dans cette précédente étude, les protéines EF fluorescentes purifiées dans ce travail de thèse ont, *in vitro*, à une concentration moindre et sans immunomarquage, un signal suffisamment fort pour être suivi en microscopie confocale. Ceci permet notamment d'utiliser EFvenus pour la vidéo-microscopie.

La quantité minimale de toxine permettant d'observer un signal en microscopie confocale dépend toutefois de la lignée cellulaire, sa détection étant plus sensible dans les macrophages que dans les CHOK1 ou les A549 (Figure 15). De plus, une quantité importante de EFvenus est présente dans les macrophages, phagocytes professionnels, contrairement à celle observée dans les cellules épithéliales ne pratiquant pas un même niveau de macropinocytose.

Par ailleurs, il est nécessaire de s'assurer lors de l'étude de l'endocytose, que les vésicules sont bien fermées et non ouvertes, exposant encore leur contenu vers le milieu extracellulaire, et profondément enfouies dans le cytosol (notamment les cavéoles). L'inhibition de la dynamine provoque l'accumulation d'invaginations revêtues de clathrine de forme « omega » ou « U », dont la fermeture n'est pas achevée (Kirchhausen *et al.*, 2014). La présence de cargos en cours d'endocytose ou bloqués dans des vésicules qui ne peuvent pas se fermer peut conduire à une détection erronée du cargo en cytométrie et démontre l'importance et la complémentarité de l'apport d'une approche en microscopie afin de mieux caractériser la distribution du cargo et mieux interpréter les données de cytométrie de flux. Un marquage des membranes mettra en évidence les structures connectées à la surface cellulaire.

Bien qu'un marquage fluorescent n'impacte généralement pas l'activité enzymatique en solution, cette dernière peut être atténuée en modèle cellulaire. En effet, la protéine fluorescente, exprimée en fusion avec EF, peut limiter artificiellement sa capacité à transloquer et ainsi diminuer artificiellement l'activité enzymatique détectée. Ceci est bien illustré par les études de Zheng *et al.*, 2014 et Zornetta *et al.*, 2010. En effet, les fusions des facteurs EF ou LF avec des protéines fluorescentes présentent une activité retardée (eGFP) ou un défaut de translocation (mCherry) (Zornetta *et al.*, 2010 ; Zheng *et al.*, 2014). En revanche, le couplage chimique d'un fluorophore à une position bien déterminée du facteur LF n'altère ni sa dynamique ni son activité ; c'est d'ailleurs le seul marquage fluorescent obtenu à ce jour qui n'engendre aucune modification des caractéristiques du facteur LF natif (Zheng *et al.*, 2014).

Dans notre étude, malgré la présence de la protéine fluorescente, EFvenus et EFscarlet induisent une augmentation de l'AMPC en présence de PA et sont donc capables de se transloquer depuis l'endosome

dans les macrophages et les cellules épithéliales. La protéine de fusion EFscarlet suit une cinétique similaire au EF commercial tandis EFvenus présente un retard d'activité. Par ailleurs, en absence de PA, le facteur EF peut être introduit directement dans le cytosol *via* lyse osmotique de pinosomes (Kumar *et al.*, 2002). Il serait alors intéressant de vérifier l'efficacité de conversion de l'ATP en AMPc en contexte cellulaire afin de déterminer si chaque protéine fluorescente module l'activité dans le cytosol, avant de caractériser l'activité dépendante de la translocation endosomale.

La présence de la protéine fluorescente pourrait impacter l'activité de EF en altérant le processus de dépliement/repliement nécessaire à la translocation ; la fusion avec mCherry en serait incapable contrairement à celle fusionnée à eGFP (Zornetta *et al.*, 2010 ; Zheng *et al.*, 2014). Ainsi, en présence de PA, EFvenus pourrait être maintenu sur des temps plus longs que EFscarlet dans les endosomes, limitant alors la disponibilité du domaine C-terminal de EF en partie cytosolique. Les cinétiques d'entrée des autres fusions protéiques EF fluorescents (**Tableau F**) restent à être déterminées afin d'identifier des protéines dont le trafic et l'activité pourraient être comparables au EF natif. De plus, les EF ont été fusionnés à des protéines fluorescentes possédant des spécificités fonctionnelles particulièrement intéressantes pour l'exploration endocytaire et enzymatique. Celles-ci pourront donner en temps réel par imagerie au vidéomicroscope, après synchronisation du moment d'internalisation, le temps de trafic endosomal et d'atteinte du cytosol (pHluorin et pHuji), ou le temps requis pour la production d'AMPc (Flamindo et Pink Flamindo). Bien que cette protéine n'ai pas été employée en fusion avec une protéine pour la création de protéine chimérique fluorescente, la création de la protéine EF-Flamindo2 constituerai un nouvel outil pour la mise en évidence de l'activité intracellulaire du facteur oedémateux.

Les facteurs LF et EF suivent un mécanisme de dégradation répondant à la règle « N-end rule », où l'acide aminé N-terminal détermine sa stabilité face à la dégradation par le protéasome après ubiquitinylation (Leysath *et al.*, 2013 ; Gupta *et al.*, 2008). La présence d'une histidine favorise la dégradation réduisant l'activité enzymatique des facteurs *in vitro* et *in vivo* en présence de PA. Dans cette thèse, EF commercial et EFvenus possèdent 1 et 6 histidines respectivement en N-terminal, tandis que EFscarlet possède la méthionine native non déstabilisatrice en N-terminal et 6 histidines en C-terminal. Les résultats d'activité obtenus par mesure de l'AMPc montrent que EFscarlet est plus actif que EFvenus dans plusieurs lignées. On peut présumer que suite à la translocation *via* le pore, la demi-vie de EFscarlet permet d'obtenir une conversion de l'ATP plus efficace qu'avec EFvenus qui serait plus rapidement adressé au protéasome.

Les cinétiques d'entrée en A549 et RAW264.7 présentent des différences en fonction de la protéine fluorescente fusionnée à EF (**Figure 18**). La moyenne de l'intensité de fluorescence (MFI) de EFscarlet au cours de son endocytose est linéaire sans atteindre de plateau à 2 heures, contrairement à ce qui est observé avec EFvenus où l'endocytose est rapide jusqu'à atteindre un plateau dans les 2 types cellulaires.

Il est possible que tous les macrophages aient internalisé le facteur EFscarlet mais sans avoir encore atteint la saturation de leur capacité endocytaire. L'étude à des temps plus tardifs en A549 pourrait indiquer si une saturation est possible ou si l'entrée est macropinocytaire non saturable, comme semblent l'indiquer les résultats obtenus en cytométrie de flux (**Figure 25**). Il est également possible que la fluorescence de la protéine mScarlet soit moins intense que celle de mVenus ou que son signal soit plus sensible conduisant à sa photoextinction lors de son excitation pendant l'acquisition en cytométrie de flux ou microscopie confocale. Ce profil linéaire de MFI lors de l'exposition à EFscarlet peut également être expliqué au regard de la qualité de purification (**Figures 7 et 8**), où le EF tronqué non fluorescent entrerait en compétition avec le EFscarlet fluorescent non clivé, diminuant la concentration en protéine fluorescente internalisée. Le suivi de l'endocytose d'autres protéines EF fluorescentes, non protéolysées et à l'origine de la présence d'une protéine EF non fluorescente, permettra de déterminer les chimères les plus adaptées.

EF est capable d'être internalisé en absence de PA à la surface de la cellule

L'endocytose des toxines de *B. anthracis* a été étudiée dans différents types cellulaires : macrophages murins J774A.1 et RAW264.7, lymphocytes T humains Jurkat, fibroblastes rénaux de hamster (BHK), cellules épithéliales ovariennes de hamster (CHOK1), cellules épithéliales humaines utérines HeLa et intestinales T84. La majorité des études s'est intéressée à l'endocytose du facteur LF, dont la réputation létale précède celle du facteur EF. Ces travaux de thèse ont été menés sur l'endocytose de EF dans différentes lignées de cellules épithéliales : les cellules CHOK1, MDCK, et les cellules épithéliales de l'arbre respiratoire humain bronchique Calu-3 *et* alvéolaire A549.

Il est admis que l'endocytose des facteurs LF et EF (partie A) requiert PA (partie B), étant des toxines de type AB, puisque PA est nécessaire pour fixer le récepteur cellulaire et permettre l'internalisation de ces facteurs enzymatiques. Jusqu'à présent, aucune étude ne s'était focalisée sur une exposition à EF seul puisqu'enzymatiquement inactif en absence de PA, n'induisant pas d'effet pathologique en modèle animal. Les résultats obtenus dans ce projet de thèse permettent de démontrer, pour la première fois, que l'internalisation du facteur EF ne requiert pas la présence de PA. Seul, EF est retrouvé au sein de chacun des types cellulaires étudiés : macrophages et cellules épithéliales. Des expériences complémentaires de microscopie confocale et de cytométrie de flux permettent d'exclure une influence de la fusion avec la protéine fluorescente mVenus (article **Supplementary figure 1** et **Figure 11**). De plus, l'entrée des facteurs EF non fluorescents, commercial ou EFhis, dans les macrophages RAW264.7, dans les cellules CHOK1 ou A549 est similaire à celle de EF en présence de PA (**Figure 16**).

Certaines fusions de LFn avec différentes protéines sont endocytées dans les cellules HeLa, COS et les cellules présentatrices d'antigènes et atteignent le cytosol indépendamment de la présence de PA ([Cao et](#)

al., 2002 ; Kushner *et al.*, 2003). Ceci suggère une indépendance à PA lors de l'endocytose et concorde avec les résultats obtenus. Il a également été observé que contrairement à EF natif, le EF délété de son domaine N-terminal est capable d'entrer dans les CHO et d'induire une augmentation de l'AMPc intracellulaire dans les macrophages RAW264.7 en absence de PA (cité par Kochi *et al.*, 1994 ; Guidi-Rontani *et al.*, 2000). Une interaction avec un partenaire pourrait ainsi être envisagée, permettant une endocytose sans PA. Des expériences complémentaires par immunoprécipitation pourront aider à éclaircir ce point.

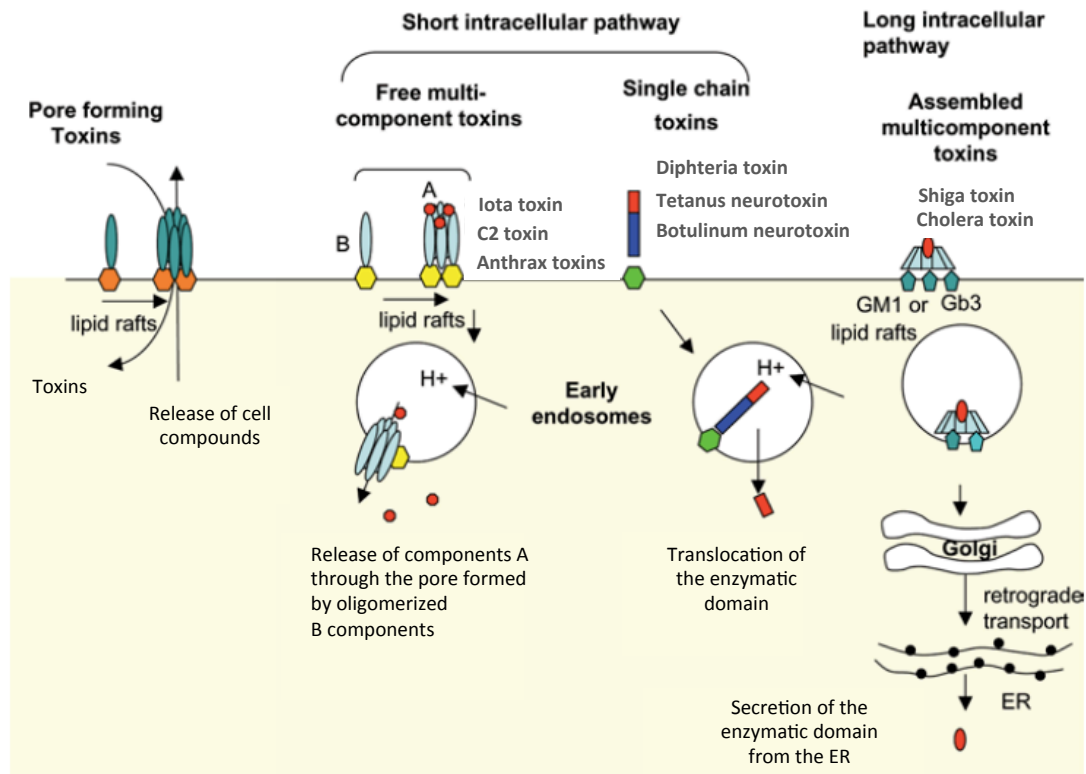


Figure 29. Modes d'entrée des toxines bactériennes. *Toxines formant des pores. Voies intracellulaires courtes empruntées par les toxines à chaîne unique et les toxines de type AB. L'acidification induit un clivage protéolytique ou un changement de conformation pour la translocation du domaine catalytique ; pour les toxines AB, B forme un pore à travers lequel A passe. Dans les voies intracellulaires longues, la toxine internalisée en endosome suit un adressage au Golgi puis au réticulum endoplasmique à partir duquel il est transloqué (adapté de Geny et Popoff, 2012).*

Les toxines bactériennes emploient diverses stratégies pour leur endocytose depuis la membrane plasmique et leur translocation vers le cytosol à partir de différents compartiments intracellulaires (Figure 29, Geny et Popoff, 2012). De nombreuses toxines de type AB utilisent les lipides membranaires (gangliosides) pour entrer dans la cellule : toxine cholérique, toxine pertussique, ricine, shiga toxine, entérotoxine labile à la chaleur d'*E. coli* (Tableau G) (Odumusu *et al.*, 2010). EF est capable de fixer les lipides membranaires quel que soit le pH (Wang *et al.*, 1997). L'adénylate cyclase de *B. pertussis* CyaA

est internalisée par les cellules épithéliales par association avec les lipides membranaires, indépendamment d'un récepteur cellulaire (Eby *et al.*, 2010). L'endocytose est un phénomène qui peut être provoqué par des particularités membranaires, comme c'est le cas de la réticulation de protéines ou de structures de surface qui peut provoquer une endocytose spontanée. Cette endocytose est employée par la shiga toxine et la toxine cholérique lors de la réticulation de glycolipides, provoquant la formation de structures tubulaires qui se détachent de façon dépendante de la dynamine et de l'endophiline (Sandvig *et al.*, 2018). Par ailleurs, il a été démontré récemment, pour la toxine diphtérique, que la formation d'un canal n'est pas un prérequis à la traversée de la membrane endosomale, le domaine de translocation assiste l'insertion du domaine catalytique devenu partiellement hydrophobe (Ladokhin *et al.*, 2017). L'interaction lipidique de EF ou d'un oligomère de EF fluorescent possédant une étiquette histidine pourrait contribuer à l'internalisation en absence de PA. Il serait donc intéressant d'établir si un récepteur lipidique ou une interaction avec des domaines membranaires particuliers peuvent être à l'origine de l'endocytose de EF seul.

Tableau G. Les toxines AB : fonction, cibles et récepteurs cellulaires (Odumosu *et al.*, 2010).

	A Subunit(s)	B Subunit(s)	Enzymatic Activity	Target	Receptor(s)
Cholera toxin	A1: 22 kDa A2: 5 kDa	(×5) 10.6 kDa	ADP-ribosyl transférase	Adenylate cyclase G-protein (G _{sa})	GM1 ganglioside
<i>E. coli</i> (LT)	A1: 22 kDa A2: 5 kDa	(×5) 11.6 kDa	ADP-ribosyl transférase	G-protein (G _{sa})	GM1 ganglioside Asialoganglioside
Shiga toxin	A1: 28 kDa A2: 4 kDa	(×5) 7.7 kDa	N-glycosylase (Cleaves adenine 4324)	rRNA (28S)	Gb3 glycolipid
Pertussis toxin	S1: 28 kDa	S2: 23 kDa S3: 22 kDa S4: (×2) 11.7 kDa S5: 9.3 kDa	ADP-ribosyl transférase	G-protein (G _{sa})	GD1a ganglioside
Anthrax	(LF): 90 kDa (EF): 89 kDa	(PA): (×7) 83 kDa	Zn metalloprotease Adenylate cyclase	MAPKK Protein kinases	ANTXR 1 ANTXR 2
Ricin	30 kDa	29 kDa	N-glycosylase (Cleaves adenine 4324)	rRNA (28S)	Glycoprotein Glycolipid

L'endocytose de EF en cellules épithéliales dépend du pôle cellulaire

Les toxines bactériennes peuvent n'être endocytées que par un seul pôle dans les cellules épithéliales polarisées (pôle apical du côté de la lumière, pôle basolatéral à l'opposé). La toxine diphtérique et l'exotoxine A de *P. aeruginosa* sont préférentiellement internalisées par le pôle basolatéral, tandis que la ricine et la shiga toxine sont internalisées indépendamment du pôle (Melby *et al.*, 1993). La iota toxine de

Clostridium perfringens et la toxine C2 de *Clostridium botulinum* sont des toxines AB formant des pores, comme celles de *B. anthracis*. Dans les cellules épithéliales intestinales Caco-2, la iota toxine est internalisée par le pôle basolatéral tandis que la toxine C2 peut utiliser les 2 pôles (Blöcker *et al.*, 2001).

L'endocytose de ET dans les cellules épithéliales intestinales T84 se fait par le pôle basolatéral uniquement (Beauregard *et al.*, 1999). Les résultats obtenus avec EFvenus, en présence et en absence de PA, sont complémentaires quant à l'existence d'une spécificité de pôle. En effet, avec les cellules MDCK et Calu-3, seule une endocytose par le pôle basolatéral est détectée en microscopie confocale. En revanche, avec les CHOK1 et A549, celle-ci n'est observée qu'au pôle apical. Bien que le récepteur TEM8 ne soit exprimé qu'au pôle basolatéral des cellules T84, pôle d'entrée de ET (Beauregard *et al.*, 1999), aucune spécificité de distribution de TEM8/ATXR1 et CMG2/ATXR2 n'a été identifiée pour les lignées cellulaires employées. La spécificité d'endocytose peut s'expliquer par une différence de régulation des processus d'internalisation puisqu'une cellule polarisée régule les phénomènes endocytaires apicaux et basolatéraux de façon différente. Par exemple, l'activité de macropinocytose des cellules MDCK diffère en fonction du pôle (Lin *et al.*, 2020). Dans cette lignée, les cavéoles ne sont présentes qu'au pôle basolatéral. Par ailleurs, l'endocytose apicale de la ricine indépendante de la clathrine peut être régulée sans interférer avec les processus endocytaires au pôle basolatéral (Sandvig *et al.*, 2018).

Accès apical ou basolatéral

Les spores de *B. anthracis* peuvent germer à la surface de l'épithélium pulmonaire, tissu exposé en première ligne lors d'infections respiratoires. Ceci a été observé lors de cultures à l'interface air-liquide pour des cellules primaires, ainsi que pour les cellules Calu-3 et A549 (Powell *et al.*, 2015). Après germination, les bactéries sont alors aptes à produire les toxines disponibles au pôle apical. Le système alvéolaire représente la majeure surface d'interaction entre l'épithélium pulmonaire et l'air ; l'intoxination alvéolaire par le pôle apical directement accessible favorise l'infection. De plus, les spores et bacilles peuvent traverser l'épithélium de diverses façons : perméabilisation par l'anthrolysine ou InhA1, capture par les phagocytes, ou encore transcytose (Weiner et Glomski, 2012).

La toxine létale a été impliquée dans la détérioration de la barrière épithéliale (Langer *et al.*, 2012 ; Lehman *et al.*, 2009), cependant les données relatives à ET manquent.

L'activité délétère principale de l'adénylate cyclase de *B. pertussis* est localisée au pôle basolatéral des cellules intestinales et bronchiques humaines (Eby *et al.*, 2010). Néanmoins, avant d'y être localisée, une activité minimale au pôle apical déstructure partiellement l'épithélium, pour accéder et avoir un fort effet au pôle basolatéral (Hasan *et al.*, 2017). De même, la toxine diphtérique peut induire un effet lors d'une exposition au pôle apical dans certaines lignées (Melby *et al.*, 1993). La question d'un effet minoritaire similaire de ET sur le pôle opposé au pôle d'entrée dans l'épithélium pulmonaire se pose alors. Il sera

donc intéressant de doser l'AMPc lors de l'exposition de EF en présence de PA au pôle opposé, apical ou basolatéral, du pôle identifié pour chaque lignée utilisée dans les mêmes expérimentations que celles ayant permis l'identification du pôle d'internalisation. L'effet de la toxine oedémateuse sur la fonctionnalité de l'épithélium pourra être explorée à l'aide de modèles de barrières *in vitro* sur transwell, afin de définir si elle peut contribuer à leur déstabilisation.

Internalisé par l'épithélium pulmonaire, *B. anthracis* possède une aptitude à la transcytose sans compromettre l'intégrité de la barrière épithéliale alvéolaire (Russell *et al.*, 2008). Ainsi la traversée épithéliale permet l'intoxination par EF des cellules dont le pôle basolatéral n'est pas accessible. Les toxines sont également aptes à la transcytose. En effet, bien que l'entrée se fasse par le pôle basolatéral, l'intoxination par la iota toxine est possible par le pôle apical par transcytose du composant B depuis le pôle basolatéral (Richard *et al.*, 2002). La toxine cholérique peut induire une réponse des cellules intestinales depuis le pôle basolatéral, ou à partir du pôle apical après transcytose de la toxine vers le pôle basolatéral où se trouve sa cible (Lencer *et al.*, 1992). De fait, il sera intéressant d'étudier plus avant la capacité de la toxine EF à réaliser une transcytose d'un pôle à l'autre en fonction des lignées épithéliales.

Dès la phase précoce de l'infection, les toxines diffusent dans la circulation sanguine (Rougeaux *et al.*, 2016) pour atteindre les organes à distance du point d'infection avant même que les bactéries ne disséminent. La barrière air/sang est constituée de cellules épithéliales en contact avec l'air et de cellules endothéliales en contact avec le sang. La toxine ET est responsable de perturbations et de macro-ouvertures transcellulaires de l'endothélium (Guichard *et al.*, 2010 ; Maddugoda *et al.*, 2011), ce qui pourrait lui donner un accès au pôle basolatéral des cellules épithéliales depuis la circulation sanguine. Il serait intéressant de caractériser l'endocytose de EF, en présence et absence de PA dans les cellules endothéliales, ainsi que d'établir un modèle de coculture mimant la barrière air/sang *in vitro* afin d'observer la traversée du facteur EF dans un modèle complexe (Hasan *et al.*, 2018). L'ajout d'une population de cellules immunitaires circulantes compléterait le système afin d'observer la capacité à franchir la barrière et de capture par des phagocytes.

PA serait majoritairement impliqué dans la translocation endosomale

Le résultat des mesures d'AMPc intracellulaire en réponse à EF place PA comme élément requis à la détection de l'activité enzymatique. Une forte augmentation du taux d'AMPc intracellulaire est obtenue pour le EF commercial comme pour les EF fluorescents en présence de PA, selon une cinétique propre à chaque lignée cellulaire (Figure 26). Ainsi la présence de PA n'est pas requise à l'internalisation de EF, mais reste critique pour exercer son activité enzymatique. Cependant une activité résiduelle est parfois observée lors de l'intoxination par EFvenus ou EFscarlet en absence de PA. Quelques protéines recombinantes pourraient donc être présentes dans le cytosol par fuite depuis l'endosome ou la membrane

plasmique. Cette activité est probablement due à un artefact expérimental lié à la présence de l'étiquette poly-histidines située respectivement en N-terminal et C-terminal des protéines EFvenus et EFscarlet. L'étiquette poly-histidines en N-terminal, décrite initialement comme favorisant la translocation (Neumeyer *et al.*, 2006), pourrait engendrer plusieurs phénomènes interconnectés : un échappement endosomal, une sensibilité au protéasome.

En effet, les polymères cationiques et l'ajout d'étiquettes poly-histidines sont utilisés en nanomédecine pour délivrer diverses molécules thérapeutiques par endocytose puis échappement endosomal. Ces processus ont été démontrés lors de l'ajout d'étiquettes poly-histidines sur la GFP ou encore sur le domaine catalytique de l'exotoxine de *P. aeruginosa* en thérapie cancéreuse (Ferrer-Miralles *et al.*, 2011 ; Sanchez-Garcia *et al.*, 2018). De nombreuses études utilisent ces facteurs, ou leur domaine N-terminal tel que LFn, possédant une étiquette poly-histidine en N-terminal. L'utilisation d'un EF natif, dépourvu de modification des acides aminés N-terminaux, permettrait d'aborder de façon plus physiologique son entrée et son devenir intracellulaire. Pour cela, la protéine EFscarlet dont le N-terminal n'est pas modifié, peut servir de modèle. Son activité est plus efficace que celle de EFvenus (6 histidines en N-terminal) ou du EF commercial (1 histidine en N-terminal), bien que sa capacité de translocation puisse être restreinte par la protéine fluorescente. La persistance et l'activité des protéines EF fluorescentes pourront être comparées en fonction de la présence de l'étiquette poly-histidines en N-terminal ou C-terminal pour une même couleur. Ceci a été abordé lors de 2 expérimentations sans réplicat sur EF fusionné à eGFP ou mVenus, et nécessiterait une étude plus approfondie et plus robuste (Figure 11).

Parmi les mécanismes d'échappement endosomal, deux hypothèses sont envisageables (Varkouhi *et al.*, 2011). La première est la théorie d'éponge à protons, où la protonation des histidines à pH acide entraîne un influx d'ions Cl⁻ et une augmentation de la pression osmotique conduisant à un éclatement de l'endosome, libérant ainsi son contenu. La seconde consiste en la perturbation de la membrane endosomale par interactions électrostatiques entre les résidus protonés à pH acide et les lipides LBPA de charge négative. Par ailleurs, en absence de PA, il a été décrit que EF et LF sont capables d'interagir électrostatiquement avec des liposomes puis de s'insérer dans ces membranes lipidiques et de les déstabiliser lors de l'acidification (Kochi *et al.*, 1994), sans toutefois engendrer la formation de canaux (Blaustein *et al.*, 1989). On peut faire l'hypothèse que l'étiquette poly-histidines ainsi que l'insertion du facteur EF dans la membrane endosomale peuvent conduire à un faible taux d'échappement des EF fluorescents vers le cytosol, responsable de l'activité observée en absence de PA. Par ailleurs, au sein des endosomes, des vésicules intraluminales chargées en EF fluorescents pourraient procéder à quelques évènements de « back fusion », relarguant le facteur dans le cytosol.

Comme évoqué précédemment, EF et LF sont sensibles à la dégradation « N-end rule ». Par ailleurs, suite à l'endocytose de protéines fusionnées à LFn en absence de PA, on observe une présence cytosolique et une colocalisation majoritairement avec le protéasome (Kushner *et al.*, 2003). Il serait donc possible que

les EF fluorescents colocalisent également avec le protéasome, responsable d'une dégradation à l'origine de l'absence ou de la faible activité observée en absence de PA. Ces données peuvent suggérer deux modes d'entrée et deux devenir selon l'implication de PA dans l'entrée de EF. En absence de PA, le facteur serait adressé au protéasome ; tandis qu'en présence de PA, le facteur serait davantage préservé de la dégradation et conserverait son activité enzymatique.

Complexité de la dissection des voies endocytaires

L'étude des mécanismes d'internalisation du facteur EF seul a mis en évidence l'utilisation de plusieurs voies, similaires à celles de EF en présence de PA et dépendantes du type cellulaire. Comme décrit plus haut, un cargo peut emprunter plusieurs voies. L'endocytose de la transferrine, protéine modèle de l'entrée par voie clathrine (CME), peut emprunter une voie indépendante de la dynamine (Boll *et al.*, 2004). Le virus influenza peut entrer par macropinocytose ou par CME (Lin *et al.*, 2020). L'identité d'un récepteur peut influencer la voie d'entrée, comme démontré pour le FGF (fibroblast growth factor) alternant entre la CME et une voie indépendante de la clathrine (CIE) et de la dynamine (Thottacherry *et al.*, 2019). La toxine cholérique, bien que décrite comme modèle de la voie cavéole, est également endocytée par CME et CIE indépendante de la cavéole dans plusieurs lignées (Torgersen *et al.*, 2001). L'emprunt de différentes voies est également observé pour les molécules « contrôle » incluant la transferrine et la toxine cholérique (Figure 24). L'entrée du facteur EF peut également se faire par différentes voies endocytaires comme montré dans les macrophages RAW264.7 et les cellules épithéliales A549 (Figure 25).

L'endocytose dépend notamment de la densité et du type cellulaire, et de la concentration en cargo (Sandvig *et al.*, 2018). L'implication de l'actine dans la voie clathrine dépend du type cellulaire et des conditions de croissance ; elle peut également dépendre de la tension membranaire (Sandvig *et al.*, 2018). La densité des cavéoles diffère selon le type cellulaire, ainsi qu'au sein de différents tissus pour un même type cellulaire (Mayor *et al.*, 2014). La composition du milieu extracellulaire peut provoquer une translocation de EF en présence de PA depuis la membrane plasmique en cas d'acidité (Wesche *et al.*, 1998). Le sérum composant le milieu de culture peut diminuer l'effet de l'inhibiteur (Preta *et al.*, 2015 ; Francia *et al.*, 2019). La concentration du cargo peut également jouer sur la voie empruntée, puisqu'en cellules HeLa une faible concentration en facteur de croissance épidermique déclenche la CME, tandis que son augmentation entraîne une voie CIE dépendante du cholestérol (Thottacherry *et al.*, 2019). La saturation de la voie initiale peut également conduire à une réorientation de la voie endocytaire. Ainsi, l'internalisation par voie cavéole du virus SV40 conduit à 5% d'entrée par voie clathrine (Pelkmans *et Helenius*, 2002). Par ailleurs, une petite quantité de Lucifer Yellow, majoritairement macropinocytée, peut être retrouvée dans les cavéosomes lors d'une incubation prolongée (Kiss, 2012). Afin d'évaluer

l'impact de la variation de concentration en protéines EF fluorescentes sur les voies d'internalisation utilisées, il serait intéressant d'étudier pour les trois lignées (RAW264.7, A549 et CHOK1) l'effet de plusieurs concentrations de EFvenus, sur l'utilisation de ces voies.

Il faut toutefois rester précautionneux quant à l'identification des voies d'endocytose du fait de la pluralité des voies actives au sein d'une même cellule et de leurs interconnexions. La multiplicité des voies d'endocytose utilisées implique une complexité de l'observation du phénomène. Deux souches de virus proches de la Vaccine entrent dans les cellules HeLa par macropinocytose, soit par un mécanisme dépendant de PI3K/Rac1, soit par un mécanisme indépendant de la PI3K mais dépendant de Cdc42 (Lin *et al.*, 2020). Une même protéine est souvent impliquée dans différentes voies, et peut conduire à une mésinterprétation d'expériences lors de l'utilisation d'inhibiteurs qui peuvent impacter plusieurs voies en même temps. Cdc42 est un bon exemple de facteur impliqué dans plusieurs mécanismes d'entrée. Il est impliqué dans la voie endophiline (FEME), la macropinocytose et la voie CLIC/GEEC. Bien qu'impliquées dans la voie cavéole, la cavéoline et la cavine peuvent moduler les voies CLIC/GEEC et macropinocytose, dépendantes de Cdc42. L'inhibition de Cdc42 peut augmenter la FEME (Sandvig *et al.*, 2018).

Afin d'étudier les voies endocytaires en jeu dans l'internalisation de EF, les cellules ont été pré-incubées avec divers inhibiteurs chimiques. Cependant, un inhibiteur peut avoir des effets pléiotropes (Rennick *et al.*, 2021). La FEME est inhibée par des inhibiteurs non spécifiques notamment utilisés pour inhiber la voie CME ou encore la polymérisation d'actine (Boucrot *et al.*, 2015). L'amiloride et son analogue EIPA inhibent l'activité des échangeurs Na^+/H^+ provoquant l'acidification du cytosol par influx de protons en sous-membranaire, empêchant l'activation des petites GTPases Rac1 et Cdc42 à la membrane (Koivusalo *et al.*, 2010). L'amiloride inhibe la macropinocytose mais aussi la formation des vésicules associées à l'endophiline (Sandvig *et al.*, 2018). La voie CLIC/GEEC se distingue de la macropinocytose par sa résistance à l'amiloride (Mayor *et al.*, 2014). La génistéine inhibe les tyrosines kinases, or elles sont impliquées dans la voie cavéole, l'entrée du facteur EGF par la voie CME, et les protrusions induites par des facteurs de croissance (Sandvig *et al.*, 2018). La déplétion en cholestérol par les cyclodextrines impacte la voie cavéole mais aussi la CME, la macropinocytose par défaut de recrutement de Rac, la voie CLIC/GEEC et l'endocytose dépendante de RhoA (Sandvig *et al.*, 2018). La wortmannine inhibe de façon irréversible la PI3K, ainsi que la PI4K et la MLCK (*Myosin Light Chain Kinase*) à forte concentration, mais n'impacte ni le cytosquelette ni la micropinocytose dépendante de récepteurs (Araki *et al.*, 1996). La dynasore est un inhibiteur de la dynamine, qui peut affecter l'actine, le cholestérol membranaire par inhibition des v-ATPase, les protrusions membranaires, ainsi que la dispersion des radeaux lipidiques (Preta *et al.*, 2015).

L'inhibition des voies naturellement dominantes par l'utilisation de molécule chimiques ou par invalidation de gène par génie génétique peut favoriser une voie sous-jacente, naturellement peu ou pas

utilisée (Sandvig *et al.*, 2018 ; Rennick *et al.*, 2021). Ainsi, la déplétion en flotilline réoriente la toxine cholérique vers une voie dépendante de la dynamine et diminue l'effet toxique (Mayor *et al.*, 2014). Pour la shiga toxine et la ricine, cette déplétion augmente leur toxicité intracellulaire en facilitant leur transport rétrograde sans modification apparente du mécanisme endocytaire (Pust *et al.*, 2010). De plus, l'inhibition d'une voie spécifique peut en réguler une autre, et ceci en fonction de la lignée cellulaire étudiée. L'entrée de fluides est réduite par inhibition de la CME ou de la dynamine dans les cellules HeLa, pourtant augmentée dans d'autres lignées cellulaires (Thottacherry *et al.*, 2019). La perte de la dynamine peut augmenter la voie CLIC/GEEC, celle de la cavéoline peut affecter la fluidité membranaire et le taux de cholestérol membranaire régulant les voies CIE (Thottacherry *et al.*, 2019). Le niveau d'inhibition du cholestérol a un effet variable sur les voies CIE, CLIC/GEEC (via Cdc42) et impacte la CME lors d'une forte déplétion (Thottacherry *et al.*, 2019). La bafilomycine A interfère également avec le parcours endocytaire en induisant la tubulation des endosomes précoces qui peut rediriger le cargo vers le recyclage en cas de dissociation avec son récepteur (Huotari et Helenius, 2011). Jouer sur l'acidification des endosomes peut ainsi engendrer une modification du trafic intracellulaire et conduire, dans ce cas, à une présence prolongée par défaut d'adressage au système endolysosomal.

Ainsi, l'identification des voies endocytaires prises par les facteurs EF fluorescents nécessite de multiplier les méthodes d'inhibition. Il sera intéressant de compléter les résultats obtenus par l'utilisation de lignées génétiquement modifiées, mutées pour un gène cible ou inhibées par exposition à des petits ARN interférents : dynamine, AP-2, endophiline, cavéoline, etc... Ceci permettra de cibler plus spécifiquement une protéine particulière et de limiter les effets collatéraux. La combinaison d'inhibiteurs, à des concentrations n'affectant pas la viabilité cellulaire, peut également donner une indication supplémentaire tout comme le couplage entre inhibition et mesure de l'activité enzymatique.

Entrée de EF en absence de PA et effet physiopathologique

Deux hypothèses pourraient expliquer en quoi l'entrée de EF en absence de PA aurait un rôle dans l'établissement de la pathologie.

i) Rencontre endosomale ultérieure

Les expérimentations d'intoxication séquentielle par EF puis PA et *vice versa*, montrent qu'une activité enzymatique peut être restaurée malgré l'absence d'exposition simultanée aux facteurs. Ceci peut trouver une explication dans les interconnexions reliant les différentes voies endocytaires. En effet, des communications entre la CME et la voie cavéole existent en intracellulaire notamment lors de la fusion avec les endosomes précoces (Kiss, 2012). Chez la drosophile, deux voies se trouvent être complémentaires, où le ligand Wingless et son récepteur sont indépendamment endocytés par les voies

CLIC/GEEC et CME respectivement, permettant une interaction ultérieure lors de la fusion des deux compartiments endosomaux avec l'endosome précoce (Thottacherry *et al.*, 2019). Le système endosomal étant dynamique, recevant et exportant constamment ses cargos, l'éventualité d'une fusion de vésicules endocytaires pour la rencontre de leur cargo ne semble pas incongrue. Les premiers résultats, indiquant une restauration de l'activité enzymatique de EF, nécessitent d'explorer plus avant ce phénomène notamment par purification des endosomes et analyse de leur contenu par Western blot. Le facteur LF est retrouvé de façon persistante dans les endosomes tardifs et constitue un réservoir pour son action à long terme (Abrami *et al.*, 2013). On peut envisager que le facteur EF puisse suivre le même modèle, pour une libération dans le temps en attente de rencontrer un nouvel endosome contenant PA.

ii) Les cellules présentatrices d'antigène

Les macrophages possèdent une forte capacité à l'endocytose de EF avec ou sans PA, supérieure à celle observée dans les cellules épithéliales. Les phagocytes se positionnent donc comme étant un vecteur capable de véhiculer de fortes quantités de facteurs. Par ailleurs, l'état d'activation des cellules dendritiques détermine le devenir intracellulaire du cargo : dans les cellules immatures, l'ubiquitinylation envoie vers les ILVs et la dégradation, tandis qu'en cellules matures, ces ILVs produisent des exosomes (Huotari et Helenius, 2011). Le EF internalisé seul, sujet à ubiquitinylation, pourrait donc être chargé sur le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ou permettre l'intoxication inter-cellules à mesure du trajet des phagocytes *via* la circulation sanguine et lors de la rencontre de nouveaux types cellulaires.

La fusion d'antigènes à LFn est utilisée comme vecteur d'immunisation pour la stimulation des lymphocytes T *in vitro* et *in vivo* via les cellules présentatrices d'antigènes (Cao *et al.*, 2002 ; Kushner *et al.*, 2003 ; Shaw *et al.*, 2008). Elle montre que la réponse des lymphocytes T est activée en présence mais aussi en absence de PA *in vivo* (Shaw *et al.*, 2008). Le facteur EF pourrait de façon similaire être endocyté en absence de PA par les macrophages et cellules dendritiques et induire une réponse immune.

Certaines cellules épithéliales ont des récepteurs impliqués dans la reconnaissance des pathogènes et expriment le CMHII (Figure 30), leur permettant d'assurer des fonctions de cellules présentatrices d'antigènes (Wosen *et al.*, 2018). Le facteur EF suit la règle de dégradation « N-end rule » et est sensible à la dégradation par le protéasome *via* l'ubiquitinylation des lysines qui représentent 13,2% des acides aminés de la protéine mature (Leysath *et al.*, 2013). L'ubiquitine est un signal d'adressage vers une voie de dégradation conduisant à la production de peptides présentés par le CMHII (Moffat *et al.*, 2013). Par ailleurs, les cellules alvéolaires de type II et bronchiques (BEAS-2B et primaires épithéliales bronchiques PBEC) n'expriment pas les molécules de co-stimulation CD80 et CD86 nécessaires à l'activation des lymphocytes, ceux-ci adoptant un état anergique notamment lors de leur interaction avec les cellules alvéolaires type II (Kurosawa *et al.*, 2003 ; Lo *et al.*, 2008 ; Corbière *et al.*, 2011). Ainsi, le EF présent

dans les endosomes pourrait être présenté par le CMHII des cellules épithéliales pulmonaires et induire une tolérance des lymphocytes T vis-à-vis de EF. Ceci pourrait contribuer à une meilleure préservation et diffusion du EF circulant.

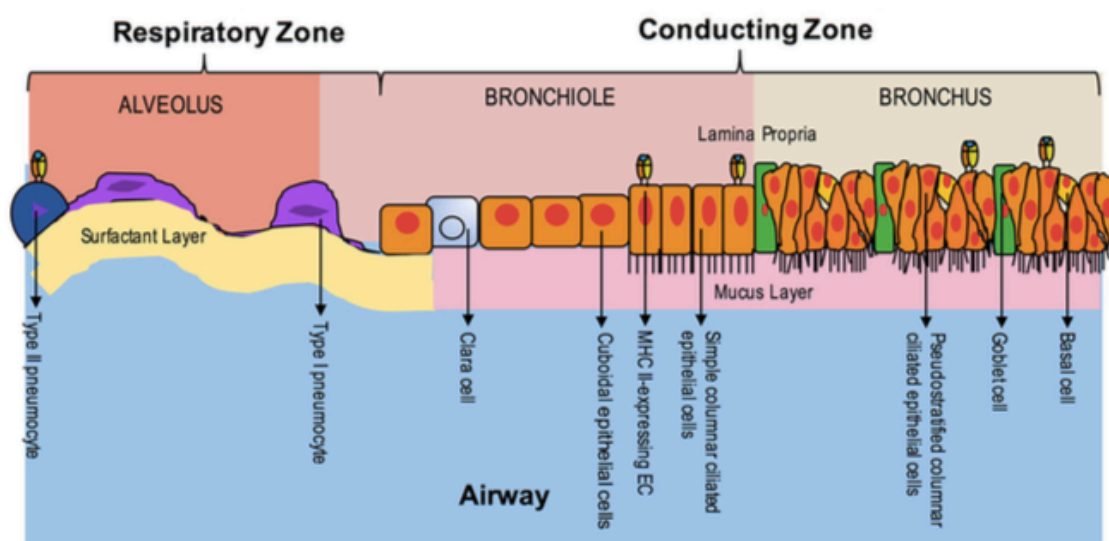


Figure 30. Expression du CMHII par les cellules de l'épithélium pulmonaire. L'épithélium inférieur (bronchioles et alvéoles) assure principalement les échanges gazeux, l'épithélium supérieur (bronches et bronchioles) est chargé d'évacuer les particules inhalées. (Adapté de Wosen et al., 2018).

Perspectives

Le développement d'outils fluorescents est essentiel à une meilleure compréhension des interactions entre l'hôte et les agents pathogènes. Les facteurs EF fluorescents utilisés ont une activité enzymatique dans différents types cellulaires, en présence de PA. Une caractérisation *in vitro* approfondie des capacités du facteur EF, en absence de PA, à interagir avec PA dans un second temps, à fragiliser la barrière épithéliale pulmonaire ou à perturber la réponse immunitaire, reste à étudier. Ceci permettra de déterminer si un nouveau rôle de EF existe suite à son entrée en absence de PA, notamment lors de sa dissémination précoce dans la circulation sanguine en absence de bactériémie.

Les facteurs EF fluorescents n'ont pas encore été testés *in vivo* afin de s'assurer de leur capacité à induire un effet pathophysiologique, et ainsi de valider définitivement ces outils pour de futures expérimentations en modèle animal. Les toxines fluorescentes produites au cours de ce travail de thèse permettront à très court terme d'étudier la diffusion des toxines sur modèle murin, que ce soit après instillation intranasale ou après injection dans le coussinet de la patte d'une souris. En combinaison avec PA, ce facteur fluorescent devrait pouvoir induire un œdème lors de l'injection dans le coussinet. La distribution du EF fluorescent, lors de l'infection intranasale, pourra être observée au niveau des voies aériennes supérieures

(NALT, trachée, bronches) et inférieures (bronchioles *et* alvéoles). Afin de simuler une infection plus physiologique, la conception de souches bactériennes modifiées exprimant le facteur fluorescent a été initiée. Celles-ci permettront, à plus long terme, d'identifier les lieux de germination par production et sécrétion de la toxine fluorescente, à la surface tissulaire comme au sein de cellules ayant internalisé la bactérie modifiée. Différentes souches sont à notre disposition, comportant diverses combinaisons de facteurs de virulence (PA, EF, LF et capsule). Il sera intéressant d'intégrer le EF fluorescent dans ces différents contextes, en l'associant également avec du LF fluorescent lors d'études *in vitro* et *in vivo*. L'utilisation de facteurs fluorescents permettra par la suite de suivre la cinétique de dissémination et l'atteinte des ganglions et organes, et la prise en charge par le système immunitaire.

Curriculum Vitae

Communications orales

Bacillus ACT International Conference 2021 (visioconférence) – « Entry and trafficking of *Bacillus anthracis* edema factor », Emilie Tessier¹, Clarisse Vigne¹, Laurence Cheutin¹, Annabelle Garnier¹, Jean-Nicolas Tournier^{1,2,3}, and Clémence Rougeaux¹

Journée de l'Ecole doctorale 569 2021 (visioconférence) - « Entry and trafficking of *Bacillus anthracis* edema factor », Emilie Tessier^{1*}, Clarisse Vigne¹, Laurence Cheutin¹, Annabelle Garnier¹, Jean-Nicolas Tournier^{1,2,3}, and Clémence Rougeaux^{1*}

Journée des doctorants IRBA 2022 (Brétigny-Sur Orge, FRANCE) – « Etude de la toxine oedémateuse de *Bacillus anthracis* et *Bacillus cereus* anthracis-like », thèse 4^e année.

Journée des doctorants IRBA 2021 (Brétigny-Sur Orge, FRANCE) - « Etude de la toxine oedémateuse de *Bacillus anthracis* et *Bacillus cereus* anthracis-like », thèse 3^e année.

Journée des doctorants IRBA 2020 (Brétigny-Sur Orge, FRANCE) - « Etude de la toxine oedémateuse de *Bacillus anthracis* et *Bacillus cereus* anthracis-like », thèse 2^e année.

Journée des doctorants IRBA 2019 (Brétigny-Sur Orge, FRANCE) - « Etude de la toxine oedémateuse de *Bacillus anthracis* et *Bacillus cereus* anthracis-like », thèse 1^e année.

Posters

Bacillus ACT International Conference 2022 (Paris, FRANCE) – « Anthrax edema factor is able to traffic inside cells in the absence of protective antigen » Emilie Tessier¹, Clarisse Vigne¹, Laurence Cheutin¹, Annabelle Garnier¹, Jean-Nicolas Tournier^{1,2,3}, and Clémence Rougeaux¹

The biology of Anthrax International Conference 2019 (Bari, ITALIE) – « New toxin fluorescent tools to follow *Bacillus cereus* biovars anthracis infection in vitro and in vivo », Emilie Tessier¹, Jean-Nicolas Tournier^{1,2,3} and Clémence Rougeaux¹

Bacillus ACT International Conference 2017 (Victoria, CANADA) – « Intergrin CD11c, an emerging biomarker of *Bacillus anthracis* edema toxin intoxication », Emilie Tessier¹, Florent Raffin¹, Belinda Desrues¹, Clarisse Vigne¹, Yannick Trescos¹ and Jean-Nicolas Tournier^{1,2,3}

CBRNE International Conference 2017(Lyon, FRANCE) - « Intergrin CD11c, an emerging biomarker of *Bacillus anthracis* edema toxin intoxication », Emilie Tessier¹, Florent Raffin¹, Belinda Desrues¹, Clarisse Vigne¹, Yannick Trescos¹ and Jean-Nicolas Tournier^{1,2,3}

¹ Unité Biothérapies anti-Infectieuses et Immunité, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Département Maladies Infectieuses et Immunité, Brétigny-sur-Orge, France

² Ecole du Val-de-Grâce, Paris, France

³ Centre National de Référence-Laboratoire Expert Charbon, Brétigny-sur-Orge, France

Publications

Trescos, Y., Tessier, E., Rougeaux, C., Goossens, P. L., & Tournier, J. N. (2015). Micropatterned macrophage analysis reveals global cytoskeleton constraints induced by *Bacillus anthracis* edema toxin. *Infection and immunity*, 83(8), 3114–3125. <https://doi.org/10.1128/IAI.00479-15>

Brossier, F., Cambau, E., Tessier, E., Jarlier, V., & Sougakoff, W. (2016). The in vitro mechanisms of isoniazid and ethionamide resistance poorly reflect those in vivo in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 101, 144–145. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2016.09.028>

Billon-Denis, E., Ferrier-Rembert, A., Garnier, A., Cheutin, L., Vigne, C., Tessier, E., Denis, J., Badaut, C., Rougeaux, C., Depeille Wuille, A., Timera, H., Boutin, L. I., Drouet, I., Verguet, N., Nolent, F., Gorgé, O., Ferraris, O., & Tournier, J. N. (2021). Differential serological and neutralizing antibody dynamics after an infection by a single SARS-CoV-2 strain. *Infection*, 49(4), 781–783. <https://doi.org/10.1007/s15010-020-01556-8>

REFERENCES

A

- Abrami, L., Liu, S., Cosson, P., Leppla, S. H., & van der Goot, F. G. (2003). Anthrax toxin triggers endocytosis of its receptor via a lipid raft-mediated clathrin-dependent process. *The Journal of cell biology*, *160*(3), 321–328. <https://doi.org/10.1083/jcb.200211018>
- Abrami, L., Lindsay, M., Parton, R. G., Leppla, S. H., & van der Goot, F. G. (2004). Membrane insertion of anthrax protective antigen and cytoplasmic delivery of lethal factor occur at different stages of the endocytic pathway. *The Journal of cell biology*, *166*(5), 645–651. <https://doi.org/10.1083/jcb.200312072>
- Abrami, L., Leppla, S. H., & van der Goot, F. G. (2006). Receptor palmitoylation and ubiquitination regulate anthrax toxin endocytosis. *The Journal of cell biology*, *172*(2), 309–320. <https://doi.org/10.1083/jcb.200507067>
- Abrami, L., Kunz, B., & van der Goot, F. G. (2010). Anthrax toxin triggers the activation of src-like kinases to mediate its own uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(4), 1420–1424. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910782107>
- Abrami, L., Brandi, L., Moayeri, M., Brown, M. J., Krantz, B. A., Leppla, S. H., & van der Goot, F. G. (2013). Hijacking multivesicular bodies enables long-term and exosome-mediated long-distance action of anthrax toxin. *Cell reports*, *5*(4), 986–996. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.019>
- Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentaire, de l'Environnement et du Travail (ANSES). <https://respe.net/wp-content/uploads/2018/12/8-Avis-ANSES-relatif-à-la-fièvre-charbonneuse.pdf>
- Alileche, A., Serfass, E. R., Muehlbauer, S. M., Porcelli, S. A., & Brojatsch, J. (2005). Anthrax lethal toxin-mediated killing of human and murine dendritic cells impairs the adaptive immune response. *PLoS pathogens*, *1*(2), e19. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0010019>
- Antonation, K. S., Grützmacher, K., Dupke, S., Mabon, P., Zimmermann, F., Lankester, F., Peller, T., Feistner, A., Todd, A., Herbinger, I., de Nys, H. M., Muyembe-Tamfun, J. J., Karhemere, S., Wittig, R. M., Couacy-Hymann, E., Grunow, R., Calvignac-Spencer, S., Corbett, C. R., Klee, S. R., & Leendertz, F. H. (2016). *Bacillus cereus* Biovar Anthracis Causing Anthrax in Sub-Saharan Africa-Chromosomal Monophyly and Broad Geographic Distribution. *PLoS neglected tropical diseases*, *10*(9), e0004923. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004923>
- Araki, N., Johnson, M. T., & Swanson, J. A. (1996). A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *The Journal of cell biology*, *135*(5), 1249–1260. <https://doi.org/10.1083/jcb.135.5.1249>
- Arms Control Association. <https://www.armscontrol.org/factsheets/bwcsig>
- Arora, N., Klimpel, K. R., Singh, Y., & Leppla, S. H. (1992). Fusions of anthrax toxin lethal factor to the ADP-ribosylation domain of *Pseudomonas* exotoxin A are potent cytotoxins which are translocated to the cytosol of mammalian cells. *The Journal of biological chemistry*, *267*(22), 15542–15548.
- Arora, N., & Leppla, S. H. (1993). Residues 1-254 of anthrax toxin lethal factor are sufficient to cause cellular uptake of fused polypeptides. *The Journal of biological chemistry*, *268*(5), 3334–3341.
- Arora N. (1997). Site directed mutagenesis of histidine residues in anthrax toxin lethal factor binding domain reduces toxicity. *Molecular and cellular biochemistry*, *177*(1-2), 7–14. <https://doi.org/10.1023/a:1006815306876>
- Avashia, S. B., Riggins, W. S., Lindley, C., Hoffmaster, A., Drumgoole, R., Nekomoto, T., Jackson, P. J., Hill, K. K., Williams, K., Lehman, L., Libal, M. C., Wilkins, P. P., Alexander, J., Tvaryanas, A., & Betz, T. (2007). Fatal pneumonia among metalworkers due to inhalation exposure to *Bacillus cereus* Containing *Bacillus anthracis* toxin genes. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, *44*(3), 414–416. <https://doi.org/10.1086/510429>
- Averette, K. M., Pratt, M. R., Yang, Y., Bassilian, S., Whitelegge, J. P., Loo, J. A., Muir, T. W., & Bradley, K. A. (2009). Anthrax lethal toxin induced lysosomal membrane permeabilization and cytosolic

cathepsin release is Nlrp1b/Nalp1b-dependent. *PloS one*, 4(11), e7913. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007913>

B

- Baldwin V. M. (2020). You Can't *B. cereus* - A Review of *Bacillus cereus* Strains That Cause Anthrax-Like Disease. *Frontiers in microbiology*, 11, 1731. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01731>
- Banks, D. J., Barnajian, M., Maldonado-Arocho, F. J., Sanchez, A. M., & Bradley, K. A. (2005). Anthrax toxin receptor 2 mediates *Bacillus anthracis* killing of macrophages following spore challenge. *Cellular microbiology*, 7(8), 1173–1185. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00545.x>
- Bann J. G. (2012). Anthrax toxin protective antigen--insights into molecular switching from prepore to pore. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 21(1), 1–12. <https://doi.org/10.1002/pro.752>
- Bardwell, A. J., Abdollahi, M., & Bardwell, L. (2004). Anthrax lethal factor-cleavage products of MAPK (mitogen-activated protein kinase) kinases exhibit reduced binding to their cognate MAPKs. *The Biochemical journal*, 378(Pt 2), 569–577. <https://doi.org/10.1042/BJ20031382>
- Barth, H., Aktories, K., Popoff, M. R., & Stiles, B. G. (2004). Binary bacterial toxins: biochemistry, biology, and applications of common *Clostridium* and *Bacillus* proteins. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 68(3), 373–402. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.3.373-402.2004>
- Bartkus, J. M., & Leppla, S. H. (1989). Transcriptional regulation of the protective antigen gene of *Bacillus anthracis*. *Infection and immunity*, 57(8), 2295–2300. <https://doi.org/10.1128/iai.57.8.2295-2300.1989>
- Battisti, L., Green, B. D., & Thorne, C. B. (1985). Mating system for transfer of plasmids among *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. *Journal of bacteriology*, 162(2), 543–550. <https://doi.org/10.1128/jb.162.2.543-550.1985>
- Beall FA, Taylor MJ, Thorne CB. (1962). Rapid lethal effect in rats of a third component found upon fractionating the toxin of *Bacillus anthracis*. *Journal of bacteriology*, 83(6), 1274–1280. <https://doi.org/10.1128/jb.83.6.1274-1280.1962>
- Beauregard, K. E., Wimer-Mackin, S., Collier, R. J., & Lencer, W. I. (1999). Anthrax toxin entry into polarized epithelial cells. *Infection and immunity*, 67(6), 3026–3030. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.6.3026-3030.1999>
- Beauregard, K. E., Collier, R. J., & Swanson, J. A. (2000). Proteolytic activation of receptor-bound anthrax protective antigen on macrophages promotes its internalization. *Cellular microbiology*, 2(3), 251–258. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2000.00052.x>
- Benson EL, Huynh PD, Finkelstein A, Collier RJ. (1998) Identification of residues lining the anthrax protective antigen channel. *Biochemistry*, 37 (11), 3941-3948. <https://doi.org/10.1021/bi972657b>
- Berger, T., Kassirer, M., & Aran, A. A. (2014). Injectional anthrax - new presentation of an old disease. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 19(32), 20877. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2014.19.32.20877>
- Bergsbaken, T., Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2009). Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nature reviews. Microbiology*, 7(2), 99–109. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2070>
- Bishop, B. L., Lodolce, J. P., Kolodziej, L. E., Boone, D. L., & Tang, W. J. (2010). The role of anthrolysin O in gut epithelial barrier disruption during *Bacillus anthracis* infection. *Biochemical and biophysical research communications*, 394(2), 254–259. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.091>
- Blaustein, R. O., Koehler, T. M., Collier, R. J., & Finkelstein, A. (1989). Anthrax toxin: channel-forming activity of protective antigen in planar phospholipid bilayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(7), 2209–2213. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.7.2209>

- Blöcker, D., Behlke, J., Aktories, K., & Barth, H. (2001). Cellular uptake of the *Clostridium perfringens* binary iota-toxin. *Infection and immunity*, *69*(5), 2980–2987. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.5.2980-2987.2001>
- Bohdanowicz, M., Schlam, D., Hermansson, M., Rizzuti, D., Fairn, G. D., Ueyama, T., Somerharju, P., Du, G., & Grinstein, S. (2013). Phosphatidic acid is required for the constitutive ruffling and macropinocytosis of phagocytes. *Molecular biology of the cell*, *24*(11), 1700–S7. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-11-0789>
- Boll, W., Ehrlich, M., Collier, R. J., & Kirchhausen, T. (2004). Effects of dynamin inactivation on pathways of anthrax toxin uptake. *European journal of cell biology*, *83*(6), 281–288. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00373>
- Bonuccelli, G., Sotgia, F., Frank, P. G., Williams, T. M., de Almeida, C. J., Tanowitz, H. B., Scherer, P. E., Hotchkiss, K. A., Terman, B. I., Rollman, B., Alileche, A., Brojatsch, J., & Lisanti, M. P. (2005). ATR/TEM8 is highly expressed in epithelial cells lining *Bacillus anthracis*' three sites of entry: implications for the pathogenesis of anthrax infection. *American journal of physiology. Cell physiology*, *288*(6), C1402–C1410. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00582.2004>
- Boucrot, E., Ferreira, A. P., Almeida-Souza, L., Debard, S., Vallis, Y., Howard, G., Bertot, L., Sauvonnet, N., & McMahon, H. T. (2015). Endophilin marks and controls a clathrin-independent endocytic pathway. *Nature*, *517*(7535), 460–465. <https://doi.org/10.1038/nature14067>
- Bourdeau, R. W., Malito, E., Chenal, A., Bishop, B. L., Musch, M. W., Villereal, M. L., Chang, E. B., Mosser, E. M., Rest, R. F., & Tang, W. J. (2009). Cellular functions and X-ray structure of anthrolysin O, a cholesterol-dependent cytolysin secreted by *Bacillus anthracis*. *The Journal of biological chemistry*, *284*(21), 14645–14656. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807631200>
- Bourgogne, A., Drysdale, M., Hilsenbeck, S. G., Peterson, S. N., & Koehler, T. M. (2003). Global effects of virulence gene regulators in a *Bacillus anthracis* strain with both virulence plasmids. *Infection and immunity*, *71*(5), 2736–2743. <https://doi.org/10.1128/iai.71.5.2736-2743.2003>
- Boyden, E. D., & Dietrich, W. F. (2006). Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nature genetics*, *38*(2), 240–244. <https://doi.org/10.1038/ng1724>
- Boyer, A. E., Quinn, C. P., Hoffmaster, A. R., Kozel, T. R., Saile, E., Marston, C. K., Percival, A., Plikaytis, B. D., Woolfitt, A. R., Gallegos, M., Sabourin, P., McWilliams, L. G., Pirkle, J. L., & Barr, J. R. (2009). Kinetics of lethal factor and poly-D-glutamic acid antigenemia during inhalation anthrax in rhesus macaques. *Infection and immunity*, *77*(8), 3432–3441. <https://doi.org/10.1128/IAI.00346-09>
- Bradley, K. A., Mogridge, J., Mourez, M., Collier, R. J., & Young, J. A. (2001). Identification of the cellular receptor for anthrax toxin. *Nature*, *414*(6860), 225–229. <https://doi.org/10.1038/n35101999>
- Bradley, K. A., Mogridge, J., Jonah, G., Rainey, A., Batty, S., & Young, J. A. (2003). Binding of anthrax toxin to its receptor is similar to alpha integrin-ligand interactions. *The Journal of biological chemistry*, *278*(49), 49342–49347. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307900200>
- Bragg, T. S., & Robertson, D. L. (1989). Nucleotide sequence and analysis of the lethal factor gene (*lef*) from *Bacillus anthracis*. *Gene*, *81*(1), 45–54. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(89\)90335-1](https://doi.org/10.1016/0378-1119(89)90335-1)
- Brézillon, C., Haustant, M., Dupke, S., Corre, J. P., Lander, A., Franz, T., Monot, M., Couture-Tosi, E., Jouvion, G., Leendertz, F. H., Grunow, R., Mock, M. E., Klee, S. R., & Goossens, P. L. (2015). Capsules, toxins and AtxA as virulence factors of emerging *Bacillus cereus* biovar anthracis. *PLoS neglected tropical diseases*, *9*(4), e0003455. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003455>
- Brown, M. J., Thoren, K. L. & Krantz, B. A. (2011). Charge requirements for proton gradient- driven translocation of anthrax toxin *The Journal of biological chemistry* *286*, 23189–23199. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.231167>
- Bruckner, V., Kovács, J. & Dénes, G. Structure of Poly-D-glutamic Acid isolated from Capsulated Strains of *B. anthracis*. *Nature* *172*, 508 (1953). <https://doi.org/10.1038/172508a0>

C

Candela, T., Mock, M., & Fouet, A. (2005). CapE, a 47-amino-acid peptide, is necessary for *Bacillus anthracis* polyglutamate capsule synthesis. *Journal of bacteriology*, *187*(22), 7765–7772. <https://doi.org/10.1128/JB.187.22.7765-7772.2005>

Candela, T., & Fouet, A. (2005). *Bacillus anthracis* CapD, belonging to the gamma-glutamyltranspeptidase family, is required for the covalent anchoring of capsule to peptidoglycan. *Molecular microbiology*, *57*(3), 717–726. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04718.x>

Canton, J., Schlam, D., Breuer, C., Gütschow, M., Glogauer, M., & Grinstein, S. (2016). Calcium-sensing receptors signal constitutive macropinocytosis and facilitate the uptake of NOD2 ligands in macrophages. *Nature communications*, *7*, 11284. <https://doi.org/10.1038/ncomms11284>

Cao, H., Agrawal, D., Kushner, N., Touzjian, N., Essex, M., & Lu, Y. (2002). Delivery of exogenous protein antigens to major histocompatibility complex class I pathway in cytosol. *The Journal of infectious diseases*, *185*(2), 244–251. <https://doi.org/10.1086/338448>

Cao, S., Guo, A., Wu, G., Liu, Z., Chen, W., Feng, C., Zhang, C. C., & Chen, H. (2010). Residue histidine 669 is essential for the catalytic activity of *Bacillus anthracis* lethal factor. *Journal of bacteriology*, *192*(21), 5799–5805. <https://doi.org/10.1128/JB.00485-10>

Carlson, C.J., Getz, W.M., Kausrud, K.L., Cizauskas, C.A., Blackburn, J.K., Bustos Carrillo, F.A., Colwell, R., Easterday, W.R., Ganz, H.H., Kamath, P.L., Økstad, O.A., Turner, W.C., Kolstø, A.-B. and Stenseth, N.C. (2018). Spores and soil from six sides: interdisciplinarity and the environmental biology of anthrax (*Bacillus anthracis*). *Biological Reviews*, *93*, 1813–1831. doi:10.1111/brv.12420

Carlson, C.J., Kracalik, I.T., Ross, N., Alexander K.A, Hugh-Jones M.E., Fega, M., Elkin, B.T., Epp, T., Shury, T.K., Zhang, W., Bagirova, M., Getz, W.M., Blackburn, J.K. (2019). The global distribution of *Bacillus anthracis* and associated anthrax risk to humans, livestock and wildlife. *Nature Microbiology* *4*, 1337–1343. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0435-4>

Cataldi, A., Labruyère, E., & Mock, M. (1990). Construction and characterization of a protective antigen-deficient *Bacillus anthracis* strain. *Molecular microbiology*, *4*(7), 1111–1117. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1990.tb00685.x>

Cataldi, A., Fouet, A., & Mock, M. (1992). Regulation of pag gene expression in *Bacillus anthracis*: use of a pag-lacZ transcriptional fusion. *FEMS microbiology letters*, *77*(1-3), 89–93. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(92\)90137-d](https://doi.org/10.1016/0378-1097(92)90137-d)

Center of Disease Control and Prevention (CDC). A History of Anthrax <https://www.cdc.gov/anthrax/resources/history/index.html>

Center of Disease Control and Prevention (CDC). https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/25/5/18-0867_article

Chand, H. S., Drysdale, M., Lovchik, J., Koehler, T. M., Lipscomb, M. F., & Lyons, C. R. (2009). Discriminating virulence mechanisms among *Bacillus anthracis* strains by using a murine subcutaneous infection model. *Infection and immunity*, *77*(1), 429–435. <https://doi.org/10.1128/IAI.00647-08>

Château, A., van Schaik, W., Six, A., Aucher, W., & Fouet, A. (2011). CodY regulation is required for full virulence and heme iron acquisition in *Bacillus anthracis*. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *25*(12), 4445–4456. <https://doi.org/10.1096/fj.11-188912>

Chavarría-Smith J, Vance RE. (2013). Direct Proteolytic Cleavage of NLRP1B Is Necessary and Sufficient for Inflammasome Activation by Anthrax Lethal Factor. *PLoS Pathog* *9*(6): e1003452. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003452>

Chekanov, A. V., Remacle, A. G., Golubkov, V. S., Akatov, V. S., Sikora, S., Savinov, A. Y., Fugere, M., Day, R., Rozanov, D. V., & Strongin, A. Y. (2006). Both PA63 and PA83 are endocytosed within an anthrax protective antigen mixed heptamer: a putative mechanism to overcome a furin deficiency. *Archives of biochemistry and biophysics*, *446*(1), 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.11.013>

- Chitlaru, T., Gat, O., Gozlan, Y., Ariel, N., & Shafferman, A. (2006). Differential proteomic analysis of the *Bacillus anthracis* secretome: distinct plasmid and chromosome CO₂-dependent cross talk mechanisms modulate extracellular proteolytic activities. *Journal of bacteriology*, *188*(10), 3551–3571. <https://doi.org/10.1128/JB.188.10.3551-3571.2006>
- Chitlaru, T., Gat, O., Grosfeld, H., Inbar, I., Gozlan, Y., & Shafferman, A. (2007). Identification of in vivo-expressed immunogenic proteins by serological proteome analysis of the *Bacillus anthracis* secretome. *Infection and immunity*, *75*(6), 2841–2852. <https://doi.org/10.1128/IAI.02029-06>
- Chopra, A. P., Boone, S. A., Liang, X., & Duesbery, N. S. (2003). Anthrax lethal factor proteolysis and inactivation of MAPK kinase. *The Journal of biological chemistry*, *278*(11), 9402–9406. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211262200>
- Chung, M. C., Popova, T. G., Millis, B. A., Mukherjee, D. V., Zhou, W., Liotta, L. A., Petricoin, E. F., Chandhoke, V., Bailey, C., & Popov, S. G. (2006). Secreted neutral metalloproteases of *Bacillus anthracis* as candidate pathogenic factors. *The Journal of biological chemistry*, *281*(42), 31408–31418. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605526200>
- Chung, M. C., Popova, T. G., Jorgensen, S. C., Dong, L., Chandhoke, V., Bailey, C. L., & Popov, S. G. (2008). Degradation of circulating von Willebrand factor and its regulator ADAMTS13 implicates secreted *Bacillus anthracis* metalloproteases in anthrax consumptive coagulopathy. *The Journal of biological chemistry*, *283*(15), 9531–9542. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705871200>
- Chung, M. C., Jorgensen, S. C., Tonry, J. H., Kashanchi, F., Bailey, C., & Popov, S. (2011). Secreted *Bacillus anthracis* proteases target the host fibrinolytic system. *FEMS immunology and medical microbiology*, *62*(2), 173–181. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00798.x>
- Cinquetti, G., Banal, F., Dupuy, A. L., Girault, P. Y., Couderc, A., Guyot, P., Alauzet, C., Oddoux, O., Ragot, C., Puyhardy, J. M., Graffin, B., & Veran, Y. (2009). Three related cases of cutaneous anthrax in France: clinical and laboratory aspects. *Medicine*, *88*(6), 371–375. <https://doi.org/10.1097/MD.0b013e3181c202fa>
- Cole, L.A. (2010). Anthrax as a Weapon of War and Terrorism. In *Bacillus anthracis and Anthrax*, N.H. Bergman (Ed.). doi:10.1002/9780470891193.ch15
- Corbière, V., Dirix, V., Norrenberg, S. *et al.* Phenotypic characteristics of human type II alveolar epithelial cells suitable for antigen presentation to T lymphocytes. *Respir Res* **12**, 15 (2011). <https://doi.org/10.1186/1465-9921-12-15>
- Cossaboom, C. M., Khaibeb, S., Haufiku, B., Katjuwanjo, P., Kannyinga, A., Mbai, K., Shuro, T., Hausiku, J., Likando, A., Shikesho, R., Nyarko, K., Miller, L. A., Agolory, S., Vieira, A. R., Salzer, J. S., Bower, W. A., Campbell, L., Kolton, C. B., Marston, C., Gary, J., ... Walke, H. (2019). Anthrax Epizootic in Wildlife, Bwabwata National Park, Namibia, 2017. *Emerging infectious diseases*, *25*(5), 947–950. <https://doi.org/10.3201/eid2505.180867>
- Cote, C. K., Rossi, C. A., Kang, A. S., Morrow, P. R., Lee, J. S., & Welkos, S. L. (2005). The detection of protective antigen (PA) associated with spores of *Bacillus anthracis* and the effects of anti-PA antibodies on spore germination and macrophage interactions. *Microbial pathogenesis*, *38*(5-6), 209–225. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2005.02.001>
- Cote, C. K., & Welkos, S. L. (2015). Anthrax Toxins in Context of *Bacillus anthracis* Spores and Spore Germination. *Toxins*, *7*(8), 3167–3178. <https://doi.org/10.3390/toxins7083167>
- Cui, X., Nolen, L. D., Sun, J., Booth, M., Donaldson, L., Quinn, C. P., Boyer, A. E., Hendricks, K., Shadomy, S., Bothma, P., Judd, O., McConnell, P., Bower, W. A., & Eichacker, P. Q. (2017). Analysis of Anthrax Immune Globulin Intravenous with Antimicrobial Treatment in Injection Drug Users, Scotland, 2009-2010. *Emerging infectious diseases*, *23*(1), 56–65. <https://doi.org/10.3201/eid2301.160608>
- Cullen, P. J., & Steinberg, F. (2018). To degrade or not to degrade: mechanisms and significance of endocytic recycling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *19*(11), 679–696. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0053-7>

D

Dai, Z., Sirard, J. C., Mock, M., & Koehler, T. M. (1995). The atxA gene product activates transcription of the anthrax toxin genes and is essential for virulence. *Molecular microbiology*, 16(6), 1171–1181. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02340.x>

Dai, Z., & Koehler, T. M. (1997). Regulation of anthrax toxin activator gene (atxA) expression in *Bacillus anthracis*: temperature, not CO₂/bicarbonate, affects AtxA synthesis. *Infection and immunity*, 65(7), 2576–2582. <https://doi.org/10.1128/iai.65.7.2576-2582.1997>

Dal Molin, F., Tonello, F., Ladant, D., Zornetta, I., Zamparo, I., Di Benedetto, G., Zaccolo, M., & Montecucco, C. (2006). Cell entry and cAMP imaging of anthrax edema toxin. *The EMBO journal*, 25(22), 5405–5413. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601408>

Dal Molin, F., Fasanella, A., Simonato, M., Garofolo, G., Montecucco, C., & Tonello, F. (2008). Ratio of lethal and edema factors in rabbit systemic anthrax. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 52(7), 824–828. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.08.011>

Dale, J. L., Raynor, M. J., Ty, M. C., Hadjifrangiskou, M., & Koehler, T. M. (2018). A Dual Role for the *Bacillus anthracis* Master Virulence Regulator AtxA: Control of Sporulation and Anthrax Toxin Production. *Frontiers in microbiology*, 9, 482. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00482>

Davies D. G. (1960). The influence of temperature and humidity on spore formation and germination in *Bacillus anthracis*. *The Journal of hygiene*, 58(2), 177–186. <https://doi.org/10.1017/s0022172400038250>

Dey, R., Hoffman, P. S., & Glomski, I. J. (2012). Germination and amplification of anthrax spores by soil-dwelling amoebas. *Applied and environmental microbiology*, 78(22), 8075–8081. <https://doi.org/10.1128/AEM.02034-12>

Doganay, M. and Demiraslan, H. (2015). Human Anthrax as a Re-Emerging Disease. Recent patents on anti-infective drug discovery. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 10, 10. <https://doi.org/10.2174/1574891X10666150408162354>

Dragon, D. C., and Rennie, R. P. (1995). The ecology of anthrax spores: tough but not invincible. *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne*, 36(5), 295–301.

Dragon, D. C., Elkin, B. T., Nishi, J. S., & Ellsworth, T. R. (1999). A review of anthrax in Canada and implications for research on the disease in northern bison. *Journal of applied microbiology*, 87(2), 208–213. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00872.x>

Drum, C. L., Yan, S. Z., Bard, J., Shen, Y. Q., Lu, D., Soelaiman, S., Grabarek, Z., Bohm, A., & Tang, W. J. (2002). Structural basis for the activation of anthrax adenyl cyclase exotoxin by calmodulin. *Nature*, 415(6870), 396–402. <https://doi.org/10.1038/415396a>

Drysdale, M., Bourgogne, A., Hilsenbeck, S. G., & Koehler, T. M. (2004). atxA controls *Bacillus anthracis* capsule synthesis via acpA and a newly discovered regulator, acpB. *Journal of bacteriology*, 186(2), 307–315. <https://doi.org/10.1128/jb.186.2.307-315.2004>

Drysdale, M., Bourgogne, A., & Koehler, T. M. (2005). Transcriptional analysis of the *Bacillus anthracis* capsule regulators. *Journal of bacteriology*, 187(15), 5108–5114. <https://doi.org/10.1128/JB.187.15.5108-5114.2005>

Drysdale, M., Heninger, S., Hutt, J., Chen, Y., Lyons, C. R., & Koehler, T. M. (2005b). Capsule synthesis by *Bacillus anthracis* is required for dissemination in murine inhalation anthrax. *The EMBO journal*, 24(1), 221–227. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600495>

Duesbery, N. S., Webb, C. P., Leppla, S. H., Gordon, V. M., Klimpel, K. R., Copeland, T. D., Ahn, N. G., Oskarsson, M. K., Fukasawa, K., Paull, K. D., & Vande Woude, G. F. (1998). Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor. *Science (New York, N.Y.)*, 280(5364), 734–737. <https://doi.org/10.1126/science.280.5364.734>

Dumetz, F., Jouvion, G., Khun, H., Glomski, I. J., Corre, J. P., Rougeaux, C., Tang, W. J., Mock, M., Huerre, M., & Goossens, P. L. (2011). Noninvasive imaging technologies reveal edema toxin as a key

virulence factor in anthrax. *The American journal of pathology*, 178(6), 2523–2535. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.02.027>

Dupke, S., Barduhn, A., Franz, T., Leendertz, F. H., Couacy-Hymann, E., Grunow, R., & Klee, S. R. (2019). Analysis of a newly discovered antigen of *Bacillus cereus* biovar anthracis for its suitability in specific serological antibody testing. *Journal of applied microbiology*, 126(1), 311–323. <https://doi.org/10.1111/jam.14114>

E

Eby, J. C., Ciesla, W. P., Hamman, W., Donato, G. M., Pickles, R. J., Hewlett, E. L., & Lencer, W. I. (2010). Selective translocation of the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin across the basolateral membranes of polarized epithelial cells. *The Journal of biological chemistry*, 285(14), 10662–10670. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.089219>

Ehling-Schulz, M., Lereclus, D., & Koehler, T. M. (2019). The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* Species with Pathogenic Potential. *Microbiology spectrum*, 7(3), 10.1128/microbiolspec.GPP3-0032-2018. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0032-2018>

Elkin, S. R., Lakoduk, A. M., & Schmid, S. L. (2016). Endocytic pathways and endosomal trafficking: a primer. *Wiener medizinische Wochenschrift (1946)*, 166(7-8), 196–204. <https://doi.org/10.1007/s10354-016-0432-7>

Escuyer, V., Dufлот, E., Sezer, O., Danchin, A., & Mock, M. (1988). Structural homology between virulence-associated bacterial adenylate cyclases. *Gene*, 71(2), 293–298. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90045-5](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90045-5)

Escuyer, V., & Collier, R. J. (1991). Anthrax protective antigen interacts with a specific receptor on the surface of CHO-K1 cells. *Infection and immunity*, 59(10), 3381–3386. <https://doi.org/10.1128/iai.59.10.3381-3386.1991>

Ezzell, J. W., Jr, & Abshire, T. G. (1992). Serum protease cleavage of *Bacillus anthracis* protective antigen. *Journal of general microbiology*, 138(3), 543–549. <https://doi.org/10.1099/00221287-138-3-543>

F

Feld, G. K., Thoren, K. L., Kintzer, A. F., Sterling, H. J., Tang, I. I., Greenberg, S. G., Williams, E. R., & Krantz, B. A. (2010). Structural basis for the unfolding of anthrax lethal factor by protective antigen oligomers. *Nature structural & molecular biology*, 17(11), 1383–1390. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1923>

Feld, G. K., Brown, M. J., & Krantz, B. A. (2012). Ratcheting up protein translocation with anthrax toxin. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 21(5), 606–624. <https://doi.org/10.1002/pro.2052>

Ferrer-Miralles, N., Corchero, J. L., Kumar, P., Cedano, J. A., Gupta, K. C., Villaverde, A., & Vazquez, E. (2011). Biological activities of histidine-rich peptides; merging biotechnology and nanomedicine. *Microbial cell factories*, 10, 101. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-101>

Firoved, A. M., Miller, G. F., Moayeri, M., Kakkar, R., Shen, Y., Wiggins, J. F., McNally, E. M., Tang, W. J., & Leppla, S. H. (2005). *Bacillus anthracis* edema toxin causes extensive tissue lesions and rapid lethality in mice. *The American journal of pathology*, 167(5), 1309–1320. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61218-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61218-7)

Francia, V., Reker-Smit, C., Boel, G., & Salvati, A. (2019). Limits and challenges in using transport inhibitors to characterize how nano-sized drug carriers enter cells. *Nanomedicine (London, England)*, 14(12), 1533–1549. <https://doi.org/10.2217/nmm-2018-0446>

Frazier, A. A., Franks, T. J., & Galvin, J. R. (2006). Inhalational anthrax. *Journal of thoracic imaging*, 21(4), 252–258. <https://doi.org/10.1097/01.rti.0000213570.71161.84>

Friedlander A. M. (1986). Macrophages are sensitive to anthrax lethal toxin through an acid-dependent process. *The Journal of biological chemistry*, 261(16), 7123–7126. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)38364-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)38364-3)

Friedlander, A. M., Bhatnagar, R., Leppla, S. H., Johnson, L., & Singh, Y. (1993). Characterization of macrophage sensitivity and resistance to anthrax lethal toxin. *Infection and immunity*, 61(1), 245–252. <https://doi.org/10.1128/iai.61.1.245-252.1993>

Friedman TC, Gordon VM, Leppla SH, Klimpel KR, Birch NP, Loh YP (1995) In vitro processing of anthrax toxin protective antigen by recombinant PC1 (SPC3) and bovine intermediate lobe secretory vesicle membranes. *Arch Biochem Biophys* 316:5–13. <https://doi.org/10.1006/abbi.1995.1002>

G

Ganz, H. H., Turner, W. C., Brodie, E. L., Kusters, M., Shi, Y., Sibanda, H., Torok, T., & Getz, W. M. (2014). Interactions between *Bacillus anthracis* and plants may promote anthrax transmission. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(6), e2903. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002903>

Gee, J. E., Marston, C. K., Sammons, S. A., Burroughs, M. A., & Hoffmaster, A. R. (2014). Draft Genome Sequence of *Bacillus cereus* Strain BcFL2013, a Clinical Isolate Similar to G9241. *Genome announcements*, 2(3), e00469-14. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00469-14>

Geny, B., & Popoff, M. R. (2006). Bacterial protein toxins and lipids: pore formation or toxin entry into cells. *Biology of the cell*, 98(11), 667–678. <https://doi.org/10.1042/BC20050082>

Gladstone G. P. (1946). Immunity to anthrax: protective antigen present in cell-free culture filtrates. *British journal of experimental pathology*, 27(6), 394–418.

Glaser, P., Elmaoglou-Lazaridou, A., Krin, E., Ladant, D., Bâzu, O., & Danchin, A. (1989). Identification of residues essential for catalysis and binding of calmodulin in *Bordetella pertussis* adenylate cyclase by site-directed mutagenesis. *The EMBO journal*, 8(3), 967–972.

Gohar, M., Økstad, O. A., Gilois, N., Sanchis, V., Kolstø, A. B., & Lereclus, D. (2002). Two-dimensional electrophoresis analysis of the extracellular proteome of *Bacillus cereus* reveals the importance of the PlcR regulon. *Proteomics*, 2(6), 784–791. [https://doi.org/10.1002/1615-9861\(200206\)2:6<784::AID-PROT784>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/1615-9861(200206)2:6<784::AID-PROT784>3.0.CO;2-R)

Gohar, M., Faegri, K., Perchat, S., Ravnum, S., Okstad, O. A., Gominet, M., et al. (2008). The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*. *PLoS One* 3:e2793. doi: 10.1371/journal.pone.0002793

Goyard, S., Orlando, C., Sabatier, J. M., Labruyere, E., d'Alayer, J., Fontan, G., van Rietschoten, J., Mock, M., Danchin, A., & Ullmann, A. (1989). Identification of a common domain in calmodulin-activated eukaryotic and bacterial adenylate cyclases. *Biochemistry*, 28(5), 1964–1967. <https://doi.org/10.1021/bi00431a002>

Gonzalez, M. R., Bischofberger, M., Pernot, L., van der Goot, F. G., & Frêche, B. (2008). Bacterial pore-forming toxins: the (w)hole story?. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 65(3), 493–507. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7434-y>

Gordon, V. M., Leppla, S. H., & Hewlett, E. L. (1988). Inhibitors of receptor-mediated endocytosis block the entry of *Bacillus anthracis* adenylate cyclase toxin but not that of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *Infection and immunity*, 56(5), 1066–1069. <https://doi.org/10.1128/iai.56.5.1066-1069.1988>

Gordon, V. M., Rehemtulla, A., & Leppla, S. H. (1997). A role for PACE4 in the proteolytic activation of anthrax toxin protective antigen. *Infection and immunity*, 65(8), 3370–3375. <https://doi.org/10.1128/iai.65.8.3370-3375.1997>

Green, B. D., Battisti, L., Koehler, T. M., Thorne, C. B., & Ivins, B. E. (1985). Demonstration of a capsule plasmid in *Bacillus anthracis*. *Infection and immunity*, *49*(2), 291–297. <https://doi.org/10.1128/iai.49.2.291-297.1985>

Gruenberg J. (2001). The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *2*(10), 721–730. <https://doi.org/10.1038/35096054>

Guidi-Rontani, C., Pereira, Y., Ruffie, S., Sirard, J. C., Weber-Levy, M., & Mock, M. (1999). Identification and characterization of a germination operon on the virulence plasmid pXO1 of *Bacillus anthracis*. *Molecular microbiology*, *33*(2), 407–414. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01485.x>

Guidi-Rontani, C., Weber-Levy, M., Labruyère, E., & Mock, M. (1999). Germination of *Bacillus anthracis* spores within alveolar macrophages. *Molecular microbiology*, *31*(1), 9–17. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01137.x>

Guidi-Rontani, C., Weber-Levy, M., Mock, M., & Cabiaux, V. (2000). Translocation of *Bacillus anthracis* lethal and oedema factors across endosome membranes. *Cellular microbiology*, *2*(3), 259–264. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2000.00057.x>

Guignot J, Mock M, Fouet A. (1997). AtxA activates the transcription of genes harbored by both *Bacillus anthracis* virulence plasmids. *FEMS Microbiology Letters*, *147*(2), 203-7. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10242.x>

Gupta PK, Moayeri M, Crown D, Fattah RJ, Leppla SH. (2008). Role of N-Terminal Amino Acids in the Potency of Anthrax Lethal Factor. *PLOS ONE* *3*(9): e3130. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003130>

H

Hahn, B. L., Sharma, S., & Sohnle, P. G. (2005). Analysis of epidermal entry in experimental cutaneous *Bacillus anthracis* infections in mice. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, *146*(2), 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.lab.2005.04.003>

Hammamieh, R., Ribot, W.J., Abshire, T.G. *et al.* Activity of the *Bacillus anthracis* 20 kDa protective antigen component. *BMC Infect Dis* *8*, 124 (2008). <https://doi.org/10.1186/1471-2334-8-124>

Hammond, S. E., & Hanna, P. C. (1998). Lethal factor active-site mutations affect catalytic activity in vitro. *Infection and immunity*, *66*(5), 2374–2378. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.5.2374-2378.1998>

Hao, M., & Maxfield, F. R. (2000). Characterization of rapid membrane internalization and recycling. *The Journal of biological chemistry*, *275*(20), 15279–15286. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.20.15279>

Hardenbrook, N. J., Liu, S., Zhou, K., Ghosal, K., Hong Zhou, Z., & Krantz, B. A. (2020). Atomic structures of anthrax toxin protective antigen channels bound to partially unfolded lethal and edema factors. *Nature communications*, *11*(1), 840. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14658-6>

Hasan, S., Kulkarni, N. N., Asbjarnarson, A., Linhartova, I., Osicka, R., Sebo, P., & Gudmundsson, G. H. (2018). *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Toxin Disrupts Functional Integrity of Bronchial Epithelial Layers. *Infection and immunity*, *86*(3), e00445-17. <https://doi.org/10.1128/IAI.00445-17>

Head, B. M., Rubinstein, E., & Meyers, A. F. (2016). Alternative pre-approved and novel therapies for the treatment of anthrax. *BMC infectious diseases*, *16*(1), 621. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1951-y>

Heffernan, B. J., Thomason, B., Herring-Palmer, A., Shaughnessy, L., McDonald, R., Fisher, N., Huffnagle, G. B., & Hanna, P. (2006). *Bacillus anthracis* phospholipases C facilitate macrophage-associated growth and contribute to virulence in a murine model of inhalation anthrax. *Infection and immunity*, *74*(7), 3756–3764. <https://doi.org/10.1128/IAI.00307-06>

Heffernan, B. J., Thomason, B., Herring-Palmer, A., & Hanna, P. (2007). *Bacillus anthracis* anthrolysin O and three phospholipases C are functionally redundant in a murine model of inhalation anthrax. *FEMS microbiology letters*, *271*(1), 98–105. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00713.x>

- Hilmas, C. J., & Anderson, J. (2015). Anthrax. *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*, 387–410. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800159-2.00029-4>
- Hoffmann, C., Zimmermann, F., Biek, R., Kuehl, H., Nowak, K., Mundry, R., Agbor, A., Angedakin, S., Arandjelovic, M., Blankenburg, A., Brazolla, G., Corogenes, K., Couacy-Hymann, E., Deschner, T., Dieguez, P., Dierks, K., Dux, A., Dupke, S., Eshuis, H., Formenty, P., ... Leendertz, F. H. (2017). Persistent anthrax as a major driver of wildlife mortality in a tropical rainforest. *Nature*, 548(7665), 82–86. <https://doi.org/10.1038/nature23309>
- Hoffmaster, A. R., & Koehler, T. M. (1997). The anthrax toxin activator gene atxA is associated with CO₂-enhanced non-toxin gene expression in *Bacillus anthracis*. *Infection and immunity*, 65(8), 3091–3099. <https://doi.org/10.1128/iai.65.8.3091-3099.1997>
- Hoffmaster, A. R., & Koehler, T. M. (1999). Autogenous regulation of the *Bacillus anthracis* pag operon. *Journal of bacteriology*, 181(15), 4485–4492. <https://doi.org/10.1128/JB.181.15.4485-4492.1999>
- Hoffmaster, A. R., Ravel, J., Rasko, D. A., Chapman, G. D., Chute, M. D., Marston, C. K., De, B. K., Sacchi, C. T., Fitzgerald, C., Mayer, L. W., Maiden, M. C., Priest, F. G., Barker, M., Jiang, L., Cer, R. Z., Rilstone, J., Peterson, S. N., Weyant, R. S., Galloway, D. R., Read, T. D., Fraser, C. M. (2004). Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(22), 8449–8454. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402414101>
- Hoffmaster, A. R., Hill, K. K., Gee, J. E., Marston, C. K., De, B. K., Popovic, T., Sue, D., Wilkins, P. P., Avashia, S. B., Drumgoole, R., Helma, C. H., Ticknor, L. O., Okinaka, R. T., & Jackson, P. J. (2006). Characterization of *Bacillus cereus* isolates associated with fatal pneumonias: strains are closely related to *Bacillus anthracis* and harbor *B. anthracis* virulence genes. *Journal of clinical microbiology*, 44(9), 3352–3360. <https://doi.org/10.1128/JCM.00561-06>
- Hu, X., Van der Auwera, G., Timmerly, S., Zhu, L., & Mahillon, J. (2009). Distribution, diversity, and potential mobility of extrachromosomal elements related to the *Bacillus anthracis* pXO1 and pXO2 virulence plasmids. *Applied and environmental microbiology*, 75(10), 3016–3028. <https://doi.org/10.1128/AEM.02709-08>
- Hugh-Jones, M. E., & de Vos, V. (2002). Anthrax and wildlife. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 21(2), 359–383. <https://doi.org/10.20506/rst.21.2.1336>
- Hugh-Jones, M., & Blackburn, J. (2009). The ecology of *Bacillus anthracis*. *Molecular aspects of medicine*, 30(6), 356–367. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.08.003>
- Humphries, A. C., & Way, M. (2013). The non-canonical roles of clathrin and actin in pathogen internalization, egress and spread. *Nature reviews. Microbiology*, 11(8), 551–560. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3072>
- Huotari, J., & Helenius, A. (2011). Endosome maturation. *The EMBO journal*, 30(17), 3481–3500. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.286>
- Hurley, J. H., Boura, E., Carlson, L. A., & Rózycki, B. (2010). Membrane budding. *Cell*, 143(6), 875–887. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.11.030>
- Hutt, J. A., Lovchik, J. A., Drysdale, M., Sherwood, R. L., Brasel, T., Lipscomb, M. F., & Lyons, C. R. (2014). Lethal factor, but not edema factor, is required to cause fatal anthrax in cynomolgus macaques after pulmonary spore challenge. *The American journal of pathology*, 184(12), 3205–3216. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.08.008>

I

Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS). Documents pour le médecin du travail N° 88 4^e trimestre 2001. Le charbon : une maladie professionnelle « oubliée » devenue menace bioterroriste. www.inrs.fr > dms > inrs > CataloguePapier > DMT > TI-TC-84

Ireland, J. A., & Hanna, P. C. (2002). Amino acid- and purine ribonucleoside-induced germination of *Bacillus anthracis* DeltaSterne endospores: gerS mediates responses to aromatic ring structures. *Journal of bacteriology*, *184*(5), 1296–1303. <https://doi.org/10.1128/jb.184.5.1296-1303.2002>

Ivins, B. E., & Welkos, S. L. (1986). Cloning and expression of the *Bacillus anthracis* protective antigen gene in *Bacillus subtilis*. *Infection and immunity*, *54*(2), 537–542. <https://doi.org/10.1128/iai.54.2.537-542.1986>
López-Laguna, H., Cubarsi, R., Unzueta, U. *et al.* Endosomal escape of protein nanoparticles engineered through humanized histidine-rich peptides. *Sci. China Mater.* *63*, 644–653 (2020). <https://doi.org/10.1007/s40843-019-1231-y>

J

Janes, B. K., & Stibitz, S. (2006). Routine markerless gene replacement in *Bacillus anthracis*. *Infection and immunity*, *74*(3), 1949–1953. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.3.1949-1953.2006>

Janowiak, B. E., Finkelstein, A., & Collier, R. J. (2009). An approach to characterizing single-subunit mutations in multimeric prepores and pores of anthrax protective antigen. *Protein science : a publication of the Protein Society*, *18*(2), 348–358. <https://doi.org/10.1002/pro.35>

Jernigan, D. B., Raghunathan, P. L., Bell, B. P., Brechner, R., Bresnitz, E. A., Butler, J. C., Cetron, M., Cohen, M., Doyle, T., Fischer, M., Greene, C., Griffith, K. S., Guarner, J., Hadler, J. L., Hayslett, J. A., Meyer, R., Petersen, L. R., Phillips, M., Pinner, R., Popovic, T., ... National Anthrax Epidemiologic Investigation Team (2002). Investigation of bioterrorism-related anthrax, United States, 2001: epidemiologic findings. *Emerging infectious diseases*, *8*(10), 1019–1028. <https://doi.org/10.3201/eid0810.020353>

Jiang, J., Pentelute, B., Collier, R. *et al.* Atomic structure of anthrax protective antigen pore elucidates toxin translocation. *Nature* **521**, 545–549 (2015). <https://doi.org/10.1038/nature14247>

Johannes, L., & Mayor, S. (2010). Induced domain formation in endocytic invagination, lipid sorting, and scission. *Cell*, *142*(4), 507–510. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.08.007>

K

Kaksonen, M., & Roux, A. (2018). Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *19*(5), 313–326. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.132>

Kami, D., & Gojo, S. (2020). From Cell Entry to Engraftment of Exogenous Mitochondria. *International journal of molecular sciences*, *21*(14), 4995. <https://doi.org/10.3390/ijms21144995>

Kim, J., Gedi, V., Lee, S. C., Cho, J. H., Moon, J. Y., & Yoon, M. Y. (2015). Advances in Anthrax Detection: Overview of Bioprobes and Biosensors. *Applied biochemistry and biotechnology*, *176*(4), 957–977. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1625-z>

King, J. S., & Kay, R. R. (2019). The origins and evolution of macropinocytosis. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, *374*(1765), 20180158. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0158>

Kintzer, A. F., Thoren, K. L., Sterling, H. J., Dong, K. C., Feld, G. K., Tang, I. I., Zhang, T. T., Williams, E. R., Berger, J. M., & Krantz, B. A. (2009). The protective antigen component of anthrax toxin forms functional octameric complexes. *Journal of molecular biology*, *392*(3), 614–629. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.07.037>

Kintzer, A. F., Sterling, H. J., Tang, I. I., Abdul-Gader, A., Miles, A. J., Wallace, B. A., Williams, E. R., & Krantz, B. A. (2010). Role of the protective antigen octamer in the molecular mechanism of anthrax lethal toxin stabilization in plasma. *Journal of molecular biology*, *399*(5), 741–758. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.04.041>

- Kirchhausen, T., Owen, D., & Harrison, S. C. (2014). Molecular structure, function, and dynamics of clathrin-mediated membrane traffic. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(5), a016725. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016725>
- Kiss A. L. (2012). Caveolae and the regulation of endocytosis. *Advances in experimental medicine and biology*, 729, 14–28. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1222-9_2
- Klee, S. R., Ozel, M., Appel, B., Boesch, C., Ellerbrok, H., Jacob, D., Holland, G., Leendertz, F. H., Pauli, G., Grunow, R., & Nattermann, H. (2006). Characterization of Bacillus anthracis-like bacteria isolated from wild great apes from Cote d'Ivoire and Cameroon. *Journal of bacteriology*, 188(15), 5333–5344. <https://doi.org/10.1128/JB.00303-06>
- Klee, S. R., Brzuszkiewicz, E. B., Nattermann, H., Brüggemann, H., Dupke, S., Wollherr, A., Franz, T., Pauli, G., Appel, B., Liebl, W., Couacy-Hymann, E., Boesch, C., Meyer, F. D., Leendertz, F. H., Ellerbrok, H., Gottschalk, G., Grunow, R., & Liesegang, H. (2010). The genome of a Bacillus isolate causing anthrax in chimpanzees combines chromosomal properties of B. cereus with B. anthracis virulence plasmids. *PLoS one*, 5(7), e10986. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010986>
- Klichko, V. I., Miller, J., Wu, A., Popov, S. G., & Alibek, K. (2003). Anaerobic induction of Bacillus anthracis hemolytic activity. *Biochemical and biophysical research communications*, 303(3), 855–862. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)00440-6](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)00440-6)
- Klimpel, K. R., Molloy, S. S., Thomas, G., & Leppla, S. H. (1992). Anthrax toxin protective antigen is activated by a cell surface protease with the sequence specificity and catalytic properties of furin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(21), 10277–10281. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.21.10277>
- Klimpel, K. R., Arora, N., & Leppla, S. H. (1994). Anthrax toxin lethal factor contains a zinc metalloprotease consensus sequence which is required for lethal toxin activity. *Molecular microbiology*, 13(6), 1093–1100. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00500.x>
- Kobiler, D., Weiss, S., Levy, H., Fisher, M., Mechaly, A., Pass, A., & Altboum, Z. (2006). Protective antigen as a correlative marker for anthrax in animal models. *Infection and immunity*, 74(10), 5871–5876. <https://doi.org/10.1128/IAI.00792-06>
- Koch R. (1877). The aetiology of anthrax based on the ontogeny of the anthrax bacillus. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen*. 2, 277–282.
- Kochi, S. K., Martin, I., Schiavo, G., Mock, M., & Cabiaux, V. (1994). The effects of pH on the interaction of anthrax toxin lethal and edema factors with phospholipid vesicles. *Biochemistry*, 33(9), 2604–2609. <https://doi.org/10.1021/bi00175a032>
- Koehler, T. M., & Collier, R. J. (1991). Anthrax toxin protective antigen: low-pH-induced hydrophobicity and channel formation in liposomes. *Molecular microbiology*, 5(6), 1501–1506. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb00796.x>
- Koehler, T. M., Dai, Z., & Kaufman-Yarbray, M. (1994). Regulation of the Bacillus anthracis protective antigen gene: CO₂ and a trans-acting element activate transcription from one of two promoters. *Journal of bacteriology*, 176(3), 586–595. <https://doi.org/10.1128/jb.176.3.586-595.1994>
- Koivusalo, M., Welch, C., Hayashi, H., Scott, C. C., Kim, M., Alexander, T., Touret, N., Hahn, K. M., & Grinstein, S. (2010). Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling. *The Journal of Cell Biology*, 189(2), 385. <https://doi.org/10.1083/jcb.20090808620100331c>
- Kolstø, A. B., Tourasse, N. J., & Økstad, O. A. (2009). What sets Bacillus anthracis apart from other Bacillus species?. *Annual review of microbiology*, 63, 451–476. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073255>
- Kozel, T. R., Murphy, W. J., Brandt, S., Blazar, B. R., Lovchik, J. A., Thorkildson, P., Percival, A., & Lyons, C. R. (2004). mAbs to Bacillus anthracis capsular antigen for immunoprotection in anthrax and

detection of antigenemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(14), 5042–5047. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401351101>

Krantz, B. A., Trivedi, A. D., Cunningham, K., Christensen, K. A., & Collier, R. J. (2004). Acid-induced unfolding of the amino-terminal domains of the lethal and edema factors of anthrax toxin. *Journal of molecular biology*, 344(3), 739–756. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.09.067>

Krantz, B. A., Melnyk, R. A., Zhang, S., Juris, S. J., Lacy, D. B., Wu, Z., Finkelstein, A., & Collier, R. J. (2005). A phenylalanine clamp catalyzes protein translocation through the anthrax toxin pore. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5735), 777–781. <https://doi.org/10.1126/science.1113380>

Krantz BA, Finkelstein A, Collier RJ (2006) Protein translocation through the anthrax toxin transmembrane pore is driven by a proton gradient. *Journal of molecular biology*, 355(5), 968–979. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.11.030>

Kumar, P., Ahuja, N., & Bhatnagar, R. (2001). Purification of anthrax edema factor from *Escherichia coli* and identification of residues required for binding to anthrax protective antigen. *Infection and immunity*, 69(10), 6532–6536. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.10.6532-6536.2001>

Kumar, P., Ahuja, N., & Bhatnagar, R. (2002). Anthrax edema toxin requires influx of calcium for inducing cyclic AMP toxicity in target cells. *Infection and immunity*, 70(9), 4997–5007. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.9.4997-5007.2002>

Kurosawa, S., Myers, A. C., Chen, L., Wang, S., Ni, J., Plitt, J. R., Heller, N. M., Bochner, B. S., & Schleimer, R. P. (2003). Expression of the costimulatory molecule B7-H2 (inducible costimulator ligand) by human airway epithelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 28(5), 563–573. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2002-0199OC>

Kushner, N., Zhang, D., Touzjian, N., Essex, M., Lieberman, J., & Lu, Y. (2003). A fragment of anthrax lethal factor delivers proteins to the cytosol without requiring protective antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(11), 6652–6657. <https://doi.org/10.1073/pnas.1131930100>

L

Labruyère, E., Mock, M., Ladant, D., Michelson, S., Gilles, A. M., Laoide, B., & Bârză, O. (1990). Characterization of ATP and calmodulin-binding properties of a truncated form of *Bacillus anthracis* adenylate cyclase. *Biochemistry*, 29(20), 4922–4928. <https://doi.org/10.1021/bi00472a024>

Lacy, D. B., Wigelsworth, D. J., Melnyk, R. A., Harrison, S. C., & Collier, R. J. (2004). Structure of heptameric protective antigen bound to an anthrax toxin receptor: a role for receptor in pH-dependent pore formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(36), 13147–13151. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405405101>

Ladokhin, A. S., Vargas-Urbe, M., Rodnin, M. V., Ghatak, C., & Sharma, O. (2017). Cellular Entry of the Diphtheria Toxin Does Not Require the Formation of the Open-Channel State by Its Translocation Domain. *Toxins*, 9(10), 299. <https://doi.org/10.3390/toxins9100299>

Lajoie, P., & Nabi, I. R. (2010). Lipid rafts, caveolae, and their endocytosis. *International review of cell and molecular biology*, 282, 135–163. [https://doi.org/10.1016/S1937-6448\(10\)82003-9](https://doi.org/10.1016/S1937-6448(10)82003-9)

Langer, M., Duggan, E. S., Booth, J. L., Patel, V. I., Zander, R. A., Silasi-Mansat, R., Ramani, V., Veres, T. Z., Prenzler, F., Sewald, K., Williams, D. M., Coggeshall, K. M., Awasthi, S., Lupu, F., Burian, D., Ballard, J. D., Braun, A., & Metcalf, J. P. (2012). *Bacillus anthracis* lethal toxin reduces human alveolar epithelial barrier function. *Infection and immunity*, 80(12), 4374–4387. <https://doi.org/10.1128/IAI.01011-12>

Le Point, journal. https://www.lepoint.fr/societe/les-hautes-alpes-touchees-par-une-epidemie-d-anthrax-20-08-2018-2244575_23.php

- Leendertz, F. H., Ellerbrok, H., Boesch, C., Couacy-Hymann, E., Mätz-Rensing, K., Hakenbeck, R., Bergmann, C., Abaza, P., Junglen, S., Moebius, Y., Vigilant, L., Formenty, P., & Pauli, G. (2004). Anthrax kills wild chimpanzees in a tropical rainforest. *Nature*, *430*(6998), 451–452. <https://doi.org/10.1038/nature02722>
- Leendertz, F. H., Lankester, F., Guislain, P., Néel, C., Drori, O., Dupain, J., Speede, S., Reed, P., Wolfe, N., Loul, S., Mpoudi-Ngole, E., Peeters, M., Boesch, C., Pauli, G., Ellerbrok, H., & Leroy, E. M. (2006). Anthrax in Western and Central African great apes. *American journal of primatology*, *68*(9), 928–933. <https://doi.org/10.1002/ajp.20298>
- Lehmann, M., Noack, D., Wood, M., Perego, M., & Knaus, U. G. (2009). Lung epithelial injury by *B. anthracis* lethal toxin is caused by MKK-dependent loss of cytoskeletal integrity. *PLoS one*, *4*(3), e4755. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004755>
- Lencer, W. I., Delp, C., Neutra, M. R., & Madara, J. L. (1992). Mechanism of cholera toxin action on a polarized human intestinal epithelial cell line: role of vesicular traffic. *The Journal of cell biology*, *117*(6), 1197–1209. <https://doi.org/10.1083/jcb.117.6.1197>
- Leppla S. H. (1982). Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentrations of eukaryotic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *79*(10), 3162–3166. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.10.3162>
- Levin, Robert. (2015). Anthrax: History, Biology, Global Distribution, Clinical Aspects, Immunology, and Molecular Biology. Bentham Science Publishers, 2015. Levinsohn JL, Newman ZL, Hellmich KA, Fattah R, Getz MA, Liu S, et al. (2012) Anthrax Lethal Factor Cleavage of Nlrp1 Is Required for Activation of the Inflammasome. *PLoS Pathog* *8*(3): e1002638. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002638>
- Levy, H., Weiss, S., Altboum, Z., Schlomovitz, J., Rothschild, N., Glinert, I., Sittner, A., & Kobiler, D. (2012). The effect of deletion of the edema factor on *Bacillus anthracis* pathogenicity in guinea pigs and rabbits. *Microbial pathogenesis*, *52*(1), 55–60. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2011.10.002>
- Leysath, C. E., Phillips, D. D., Crown, D., Fattah, R. J., Moayeri, M., & Leppla, S. H. (2013). Anthrax edema factor toxicity is strongly mediated by the N-end rule. *PLoS one*, *8*(8), e74474. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074474>
- Li, L., Wan, T., Wan, M., Liu, B., Cheng, R., & Zhang, R. (2015). The effect of the size of fluorescent dextran on its endocytic pathway. *Cell biology international*, *39*(5), 531–539. <https://doi.org/10.1002/cbin.10424>
- Liang, X., Zhang, E., Zhang, H., Wei J., Li, W., Zhu, J., Wang, B., Dong, S. (2016). Involvement of the pagR gene of pXO2 in anthrax pathogenesis. *Scientific Reports* *6*, 28827. <https://doi.org/10.1038/srep28827>
- Lin, X. P., Mintern, J. D., & Gleeson, P. A. (2020). Macropinocytosis in Different Cell Types: Similarities and Differences. *Membranes*, *10*(8), 177. <https://doi.org/10.3390/membranes10080177>
- Lindeque, P. & Turnbull, P. (1994). Ecology and epidemiology of anthrax in the Etosha National Park, Namibia. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, *61*(1), 71–83.
- Little, S. F., Leppla, S. H., & Cora, E. (1988). Production and characterization of monoclonal antibodies to the protective antigen component of *Bacillus anthracis* toxin. *Infection and immunity*, *56*(7), 1807–1813. <https://doi.org/10.1128/iai.56.7.1807-1813.1988>
- Little SF, Leppla SH, Burnett JW, Friedlander AM (1994) Structure-function analysis of *Bacillus anthracis* edema factor by using monoclonal antibodies. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *199*:676–82. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.1281>
- Little, S. F., Novak, J. M., Lowe, J. R., Leppla, S. H., Singh, Y., Klimpel, K. R., Lidgerding, B. C., & Friedlander, A. M. (1996). Characterization of lethal factor binding and cell receptor binding domains of protective antigen of *Bacillus anthracis* using monoclonal antibodies. *Microbiology (Reading, England)*, *142* (Pt 3), 707–715. <https://doi.org/10.1099/13500872-142-3-707>

- Liu, S., Crown, D., Miller-Randolph, S., Moayeri, M., Wang, H., Hu, H., Morley, T., & Leppla, S. H. (2009). Capillary morphogenesis protein-2 is the major receptor mediating lethality of anthrax toxin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(30), 12424–12429. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905409106>
- Liu, S., Zhang, Y., Hoover, B., & Leppla, S. H. (2012). The receptors that mediate the direct lethality of anthrax toxin. *Toxins*, *5*(1), 1–8. <https://doi.org/10.3390/toxins5010001>
- Liu, S., Zhang, Y., Moayeri, M., Liu, J., Crown, D., Fattah, R. J., Wein, A. N., Yu, Z. X., Finkel, T., & Leppla, S. H. (2013). Key tissue targets responsible for anthrax-toxin-induced lethality. *Nature*, *501*(7465), 63–68. <https://doi.org/10.1038/nature12510>
- Liu, S., Moayeri, M., & Leppla, S. H. (2014). Anthrax lethal and edema toxins in anthrax pathogenesis. *Trends in microbiology*, *22*(6), 317–325. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.02.012>
- Lo, B., Hansen, S., Evans, K., Heath, J. K., & Wright, J. R. (2008). Alveolar epithelial type II cells induce T cell tolerance to specific antigen. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *180*(2), 881–888. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.2.881>
- Lovchik, J. A., Drysdale, M., Koehler, T. M., Hutt, J. A., & Lyons, C. R. (2012). Expression of either lethal toxin or edema toxin by *Bacillus anthracis* is sufficient for virulence in a rabbit model of inhalational anthrax. *Infection and immunity*, *80*(7), 2414–2425. <https://doi.org/10.1128/IAI.06340-11>
- Lowe, D., and Glomski, I. (2012). Cellular and physiological effects of anthrax exotoxin and its relevance to disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00076>
- Luu, H., Akoachere, M., Patra, M., & Abel-Santos, E. (2011). Cooperativity and interference of germination pathways in *Bacillus anthracis* spores. *Journal of bacteriology*, *193*(16), 4192–4198. <https://doi.org/10.1128/JB.05126-11>

M

- Mabry, R., Brasky, K., Geiger, R., Carrion, R., Jr, Hubbard, G. B., Leppla, S., Patterson, J. L., Georgiou, G., & Iverson, B. L. (2006). Detection of anthrax toxin in the serum of animals infected with *Bacillus anthracis* by using engineered immunoassays. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, *13*(6), 671–677. <https://doi.org/10.1128/CVI.00023-06>
- Machen, A.J., Fisher, M.T. & Freudenthal, B.D. Anthrax toxin translocation complex reveals insight into the lethal factor unfolding and refolding mechanism. *Sci Rep* **11**, 13038 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91596-3>
- Maddugoda, M. P., Stefani, C., Gonzalez-Rodriguez, D., Saarikangas, J., Torrino, S., Janel, S., Munro, P., Doye, A., Prodon, F., Aurrand-Lions, M., Goossens, P. L., Lafont, F., Bassereau, P., Lappalainen, P., Brochard, F., & Lemichez, E. (2011). cAMP signaling by anthrax edema toxin induces transendothelial cell tunnels, which are resealed by MIM via Arp2/3-driven actin polymerization. *Cell host & microbe*, *10*(5), 464–474. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.09.014>
- Maldonado-Arocho, F. J., Fulcher, J. A., Lee, B., & Bradley, K. A. (2006). Anthrax oedema toxin induces anthrax toxin receptor expression in monocyte-derived cells. *Molecular microbiology*, *61*(2), 324–337. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05232.x>
- Makino, S., Sasakawa, C., Uchida, I., Terakado, N., & Yoshikawa, M. (1988). Cloning and CO₂-dependent expression of the genetic region for encapsulation from *Bacillus anthracis*. *Molecular microbiology*, *2*(3), 371–376. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1988.tb00041.x>
- Makino, S., Uchida, I., Terakado, N., Sasakawa, C., & Yoshikawa, M. (1989). Molecular characterization and protein analysis of the cap region, which is essential for encapsulation in *Bacillus anthracis*. *Journal of bacteriology*, *171*(2), 722–730. <https://doi.org/10.1128/jb.171.2.722-730.1989>

- Makino, S., Watarai, M., Cheun, H. I., Shirahata, T., & Uchida, I. (2002). Effect of the lower molecular capsule released from the cell surface of *Bacillus anthracis* on the pathogenesis of anthrax. *The Journal of infectious diseases*, 186(2), 227–233. <https://doi.org/10.1086/341299>
- Manchee, R., Broster, M., Melling, J. Henstridge, R.M., Stagg, A.J. (1981). *Bacillus anthracis* on Gruinard Island. *Nature* 294, 254–255. <https://doi.org/10.1038/294254a0>
- Manchee, R., Broster, M., Anderson, I. Henstridge, R.M., Melling, J. (1983). Decontamination of *Bacillus anthracis* on Gruinard Island?. *Nature* 303, 239–240. <https://doi.org/10.1038/303239a0>
- Martchenko, M., Jeong, S. Y., & Cohen, S. N. (2010). Heterodimeric integrin complexes containing beta1-integrin promote internalization and lethality of anthrax toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(35), 15583–15588. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010145107>
- Martinez, I. (2002). The History of the Use of Bacteriological and Chemical Agents during Zimbabwe's Liberation War of 1965-80 by Rhodesian Forces. *Third World Quarterly*, 23(6), 1159-1179. Retrieved March 21, 2020, from www.jstor.org/stable/3993569
- Martínez, L., Malliavin, T. E., & Blondel, A. (2011). Mechanism of reactant and product dissociation from the anthrax edema factor: a locally enhanced sampling and steered molecular dynamics study. *Proteins*, 79(5), 1649–1661. <https://doi.org/10.1002/prot.22991>
- Mayor, S., Parton, R. G., & Donaldson, J. G. (2014). Clathrin-independent pathways of endocytosis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(6), a016758. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016758>
- Matthaeus, C., & Taraska, J. W. (2021). Energy and Dynamics of Caveolae Trafficking. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 614472. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.614472>
- Melby, E. L., Jacobsen, J., Olsnes, S., & Sandvig, K. (1993). Entry of protein toxins in polarized epithelial cells. *Cancer research*, 53(8), 1755–1760.
- Ménard, A., Altendorf, K., Breves, D., Mock, M., & Montecucco, C. (1996). The vacuolar ATPase proton pump is required for the cytotoxicity of *Bacillus anthracis* lethal toxin. *FEBS letters*, 386(2-3), 161–164. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00422-x](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00422-x)
- Merritt, C., Chun, E. M., Fattah, R. J., Silva, L. M., Ma, Q. Q., Moayeri, M., Paliga, D., Neumann, S., Heumann, R., Leppla, S. H., & Bugge, T. H. (2022). Imaging of anthrax intoxication in mice reveals shared and individual functions of surface receptors CMG-2 and TEM-8 in cellular toxin entry. *The Journal of biological chemistry*, 298(1), 101467. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101467>
- Mikesell, P., Ivins, B. E., Ristroph, J. D., & Dreier, T. M. (1983). Evidence for plasmid-mediated toxin production in *Bacillus anthracis*. *Infection and immunity*, 39(1), 371–376. <https://doi.org/10.1128/iai.39.1.371-376.1983>
- Meselson, M., Guillemin, J., Hugh-Jones, M., Langmuir, A., Popova, I., Shelokov, A., & Yampolskaya, O. (1994). The Sverdlovsk anthrax outbreak of 1979. *Science (New York, N.Y.)*, 266(5188), 1202–1208. <https://doi.org/10.1126/science.7973702>
- Meynell, E., & Meynell, G. G. (1964). The Roles of Serum and Carbon Dioxide in Capsule Formation by *Bacillus anthracis*. *Journal of general microbiology*, 34, 153–164. <https://doi.org/10.1099/00221287-34-1-153>
- Meynell, G. G., & Meynell, E. (1966). The Biosynthesis of Poly D-Glutamic Acid, the Capsular Material of *Bacillus anthracis*. *Journal of General Microbiology*, 43(1), 119–138. <https://doi.org/10.1099/00221287-43-1-119>
- Migone, T. S., Bolmer, S., Zhong, J., Corey, A., Vasconcelos, D., Buccellato, M., & Meister, G. (2015). Added benefit of raxibacumab to antibiotic treatment of inhalational anthrax. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(2), 1145–1151. <https://doi.org/10.1128/AAC.04606-14>

- Mikesell, P., Ivins, B. E., Ristroph, J. D., & Dreier, T. M. (1983). Evidence for plasmid-mediated toxin production in *Bacillus anthracis*. *Infection and immunity*, *39*(1), 371–376. <https://doi.org/10.1128/iai.39.1.371-376.1983>
- Miller, J. M., Hair, J. G., Hebert, M., Hebert, L., Roberts, F. J., Jr, & Weyant, R. S. (1997). Fulminating bacteremia and pneumonia due to *Bacillus cereus*. *Journal of clinical microbiology*, *35*(2), 504–507. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.2.504-507.1997>
- Miller, C. J., Elliott, J. L., & Collier, R. J. (1999). Anthrax protective antigen: prepore-to-pore conversion. *Biochemistry*, *38*(32), 10432–10441. <https://doi.org/10.1021/bi990792d>
- Milne, J. C., & Collier, R. J. (1993). pH-dependent permeabilization of the plasma membrane of mammalian cells by anthrax protective antigen. *Molecular microbiology*, *10*(3), 647–653. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb00936.x>
- Milne, J. C., Furlong, D., Hanna, P. C., Wall, J. S., & Collier, R. J. (1994). Anthrax protective antigen forms oligomers during intoxication of mammalian cells. *The Journal of biological chemistry*, *269*(32), 20607–20612. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)32036-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)32036-7)
- Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation. <https://agriculture.gouv.fr/des-cas-de-fievre-charbonneuse-identifies-dans-les-hautes-alpes>.
- Mitscherlich E., Marth E.H. (1984) Special Part Bacteria Considered in Alphabetical Order: Vide index. In: *Microbial Survival in the Environment*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-69974-0_1
- Moayeri, M., & Leppla, S. H. (2009). Cellular and systemic effects of anthrax lethal toxin and edema toxin. *Molecular aspects of medicine*, *30*(6), 439–455. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.07.003>
- Moayeri, M., Sastalla, I., & Leppla, S. H. (2012). Anthrax and the inflammasome. *Microbes and infection*, *14*(5), 392–400. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.12.005>
- Moayeri, M., Leppla, S. H., Vrentas, C., Pomerantsev, A. P., & Liu, S. (2015). Anthrax Pathogenesis. *Annual review of microbiology*, *69*, 185–208. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104523>
- Mock, M., Labruyère, E., Glaser, P., Danchin, A., & Ullmann, A. (1988). Cloning and expression of the calmodulin-sensitive *Bacillus anthracis* adenylate cyclase in *Escherichia coli*. *Gene*, *64*(2), 277–284. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90342-3](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90342-3)
- Mock, M., & Fouet, A. (2001). Anthrax. *Annual review of microbiology*, *55*, 647–671. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.647>
- Moffat, J. M., Mintern, J. D., & Villadangos, J. A. (2013). Control of MHC II antigen presentation by ubiquitination. *Current opinion in immunology*, *25*(1), 109–114. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.10.008>
- Mogridge, J., Mourez, M., & Collier, R. J. (2001). Involvement of domain 3 in oligomerization by the protective antigen moiety of anthrax toxin. *Journal of bacteriology*, *183*(6), 2111–2116. <https://doi.org/10.1128/JB.183.6.2111-2116.2001>
- Mogridge, J., Cunningham, K., & Collier, R. J. (2002). Stoichiometry of anthrax toxin complexes. *Biochemistry*, *41*(3), 1079–1082. <https://doi.org/10.1021/bi015860m>
- Molloy, S. S., Bresnahan, P. A., Leppla, S. H., Klimpel, K. R., & Thomas, G. (1992). Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen. *The Journal of biological chemistry*, *267*(23), 16396–16402. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)42016-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)42016-9)
- Morens D. M. (2003). Characterizing a "new" disease: epizootic and epidemic anthrax, 1769-1780. *American journal of public health*, *93*(6), 886–893. <https://doi.org/10.2105/ajph.93.6.886>
- Mosser, E. M., & Rest, R. F. (2006). The *Bacillus anthracis* cholesterol-dependent cytolysin, Anthrolysin O, kills human neutrophils, monocytes and macrophages. *BMC microbiology*, *6*, 56. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-56>

Mourez, M., Yan, M., Lacy, D. B., Dillon, L., Bentsen, L., Marpoe, A., Maurin, C., Hotze, E., Wigelsworth, D., Pimental, R. A., Ballard, J. D., Collier, R. J., & Tweten, R. K. (2003). Mapping dominant-negative mutations of anthrax protective antigen by scanning mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(24), 13803–13808. <https://doi.org/10.1073/pnas.2436299100>

Muehlbauer, S. M., Evering, T. H., Bonuccelli, G., Squires, R. C., Ashton, A. W., Porcelli, S. A., Lisanti, M. P., & Brojatsch, J. (2007). Anthrax lethal toxin kills macrophages in a strain-specific manner by apoptosis or caspase-1-mediated necrosis. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, *6*(6), 758–766. <https://doi.org/10.4161/cc.6.6.3991>

Mukherjee, D. V., Tonry, J. H., Kim, K. S., Ramarao, N., Popova, T. G., Bailey, C., Popov, S., & Chung, M. C. (2011). Bacillus anthracis protease InhA increases blood-brain barrier permeability and contributes to cerebral hemorrhages. *PLoS one*, *6*(3), e17921. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017921>

Murphy FD, La Boccetta AC, Lockwood JS. (1944). Treatment of human anthrax with penicillin: report of three cases. *JAMA*, *126*(15), 948–950. doi:10.1001/jama.1944.02850500020005

Mylvaganam, S., Freeman, S. A., & Grinstein, S. (2021). The cytoskeleton in phagocytosis and macropinocytosis. *Current biology : CB*, *31*(10), R619–R632. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.01.036>

N

Nabi, I. R., & Le, P. U. (2003). Caveolae/raft-dependent endocytosis. *The Journal of cell biology*, *161*(4), 673–677. <https://doi.org/10.1083/jcb.200302028>

Naslavsky, N., Caplan, S., (2018). The enigmatic endosome – sorting the ins and outs of endocytic trafficking. *Journal of Cell Science*, *131*(13), 216499–216513. <https://doi.org/10.1242/jcs.216499>

Nassi, S., Collier, R. J., & Finkelstein, A. (2002). PA63 channel of anthrax toxin: an extended beta-barrel. *Biochemistry*, *41*(5), 1445–1450. <https://doi.org/10.1021/bi0119518>

National Institute for Communicable Diseases (NICD) <http://www.nicd.ac.za/anthrax-outbreak-in-lesotho-and-measures-to-prevent-human-exposure-in-south-africa/Lesotho>

Neumeyer, T., Tonello, F., Dal Molin, F., Schiffler, B., & Benz, R. (2006). Anthrax edema factor, voltage-dependent binding to the protective antigen ion channel and comparison to LF binding. *The Journal of biological chemistry*, *281*(43), 32335–32343. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606552200>

New D, Elkin B, Armstrong T, Epp T. (2017). Anthrax in the mackenzie wood bison (bison bison athabasca) population: 2012 anthrax outbreak and historical exposure in nonoutbreak years. *Journal of wildlife diseases*, *53*(4), 769–780. <https://doi.org/10.7589/2016-11-257>

Newman, Z. L., Printz, M. P., Liu, S., Crown, D., Breen, L., Miller-Randolph, S., Flodman, P., Leppla, S. H., & Moayeri, M. (2010a). Susceptibility to anthrax lethal toxin-induced rat death is controlled by a single chromosome 10 locus that includes rNlrp1. *PLoS pathogens*, *6*(5), e1000906. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000906>

Newman, Z. L., Crown, D., Leppla, S. H., & Moayeri, M. (2010b). Anthrax lethal toxin activates the inflammasome in sensitive rat macrophages. *Biochemical and biophysical research communications*, *398*(4), 785–789. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.07.039>

Novak, J. M., Stein, M. P., Little, S. F., Leppla, S. H., & Friedlander, A. M. (1992). Functional characterization of protease-treated Bacillus anthracis protective antigen. *The Journal of biological chemistry*, *267*(24), 17186–17193. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)41911-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)41911-4)

O

- Odumosu, O., Nicholas, D., Yano, H., & Langridge, W. (2010). AB toxins: a paradigm switch from deadly to desirable. *Toxins*, 2(7), 1612–1645. <https://doi.org/10.3390/toxins2071612>
- Oh, S. Y., Budzik, J. M., Garufi, G., & Schneewind, O. (2011). Two capsular polysaccharides enable *Bacillus cereus* G9241 to cause anthrax-like disease. *Molecular microbiology*, 80(2), 455–470. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07582.x>
- Okinaka, R. T., Cloud, K., Hampton, O., Hoffmaster, A. R., Hill, K. K., Keim, P., Koehler, T. M., Lamke, G., Kumano, S., Mahillon, J., Manter, D., Martinez, Y., Ricke, D., Svensson, R., & Jackson, P. J. (1999). Sequence and organization of pXO1, the large *Bacillus anthracis* plasmid harboring the anthrax toxin genes. *Journal of bacteriology*, 181(20), 6509–6515. <https://doi.org/10.1128/JB.181.20.6509-6515.1999>
- Okinaka R, Pearson T, Keim P. (2006). Anthrax, but Not *Bacillus anthracis*?. *PLOS Pathogens* 2(11), e122. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020122>

P

- Panchal, R. G., Halverson, K. M., Ribot, W., Lane, D., Kenny, T., Abshire, T. G., Ezzell, J. W., Hoover, T. A., Powell, B., Little, S., Kasianowicz, J. J., & Bavari, S. (2005). Purified *Bacillus anthracis* lethal toxin complex formed in vitro and during infection exhibits functional and biological activity. *The Journal of biological chemistry*, 280(11), 10834–10839. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412210200>
- Pannifer, A. D., Wong, T. Y., Schwarzenbacher, R., Renatus, M., Petosa, C., Bienkowska, J., Lacy, D. B., Collier, R. J., Park, S., Leppla, S. H., Hanna, P., & Liddington, R. C. (2001). Crystal structure of the anthrax lethal factor. *Nature*, 414(6860), 229–233. <https://doi.org/10.1038/n35101998>
- Pannucci, J., Okinaka, R.T., Williams, E. *et al.* DNA sequence conservation between the *Bacillus anthracis* pXO2 plasmid and genomic sequence from closely related bacteria. *BMC Genomics* 3, 34 (2002). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-3-34>
- Pannucci, J., Okinaka, R. T., Sabin, R., & Kuske, C. R. (2002). *Bacillus anthracis* pXO1 plasmid sequence conservation among closely related bacterial species. *Journal of bacteriology*, 184(1), 134–141. <https://doi.org/10.1128/jb.184.1.134-141.2002>
- Park, J. M., Greten, F. R., Li, Z. W., & Karin, M. (2002). Macrophage apoptosis by anthrax lethal factor through p38 MAP kinase inhibition. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5589), 2048–2051. <https://doi.org/10.1126/science.1073163>
- Park, J. M., Ng, V. H., Maeda, S., Rest, R. F., & Karin, M. (2004). Anthrolysin O and other gram-positive cytolysins are toll-like receptor 4 agonists. *The Journal of experimental medicine*, 200(12), 1647–1655. <https://doi.org/10.1084/jem.20041215>
- Parton, R. G., & Howes, M. T. (2010). Revisiting caveolin trafficking: the end of the caveosome. *The Journal of cell biology*, 191(3), 439–441. <https://doi.org/10.1083/jcb.201009093>
- Pasteur, L., Chamberland, & Roux (2002). Summary report of the experiments conducted at Pouilly-le-Fort, near Melun, on the anthrax vaccination, 1881. *The Yale journal of biology and medicine*, 75(1), 59–62.
- Patiño-Navarrete R, Sanchis V. (2017). Evolutionary processes and environmental factors underlying the genetic diversity and lifestyles of *Bacillus cereus* group bacteria. *Research in Microbiology*, 168(4), 309–318. DOI: 10.1016/j.resmic.2016.07.002.
- Pelkmans, L., & Helenius, A. (2002). Endocytosis via caveolae. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 3(5), 311–320. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2002.30501.x>
- Pellizzari, R., Guidi-Rontani, C., Vitale, G., Mock, M., & Montecucco, C. (2000). Lethal factor of *Bacillus anthracis* cleaves the N-terminus of MAPKKs: analysis of the intracellular consequences in

- macrophages. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 290(4-5), 421–427. [https://doi.org/10.1016/S1438-4221\(00\)80056-9](https://doi.org/10.1016/S1438-4221(00)80056-9)
- Pena-Gonzalez, A., Marston, C. K., Rodriguez-R, L. M., Kolton, C. B., Garcia-Diaz, J., Theppote, A., Frace, M., Konstantinidis, K. T., & Hoffmaster, A. R. (2017). Draft Genome Sequence of *Bacillus cereus* LA2007, a Human-Pathogenic Isolate Harboring Anthrax-Like Plasmids. *Genome announcements*, 5(16), e00181-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00181-17>
- Pentelute, B. L., Barker, A. P., Janowiak, B. E., Kent, S. B., & Collier, R. J. (2010). A semisynthesis platform for investigating structure-function relationships in the N-terminal domain of the anthrax Lethal Factor. *ACS chemical biology*, 5(4), 359–364. <https://doi.org/10.1021/cb100003r>
- Petosa, C., Collier, R. J., Klimpel, K. R., Leppla, S. H., & Liddington, R. C. (1997). Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen. *Nature*, 385(6619), 833–838. <https://doi.org/10.1038/385833a0>
- Pezard, C., Berche, P., & Mock, M. (1991). Contribution of individual toxin components to virulence of *Bacillus anthracis*. *Infection and immunity*, 59(10), 3472–3477. <https://doi.org/10.1128/iai.59.10.3472-3477.1991>
- Pflughoeft, K. J., Swick, M. C., Engler, D. A., Yeo, H. J., & Koehler, T. M. (2014). Modulation of the *Bacillus anthracis* secretome by the immune inhibitor A1 protease. *Journal of bacteriology*, 196(2), 424–435. <https://doi.org/10.1128/JB.00690-13>
- Popov, S. G., Villasmil, R., Bernardi, J., Grene, E., Cardwell, J., Wu, A., Alibek, D., Bailey, C., & Alibek, K. (2002). Lethal toxin of *Bacillus anthracis* causes apoptosis of macrophages. *Biochemical and biophysical research communications*, 293(1), 349–355. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00227-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00227-9)
- Popov, S. G., Popova, T. G., Hopkins, S., Weinstein, R. S., MacAfee, R., Fryxell, K. J., Chandhoke, V., Bailey, C., & Alibek, K. (2005). Effective antiprotease-antibiotic treatment of experimental anthrax. *BMC infectious diseases*, 5, 25. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-5-25>
- Popova, A.Y., Demina, Y.V., Ezhlova, E.B., Kulichenko, A.N., Ryazanova, A.G., Maleev, V.V., Ploskireva, A.A., Dyatlov, I.A., Timofeev, V.S., Nechepurenko, L.A., Khar'kov, V.V. (2016). Outbreak of Anthrax in the Yamalo-Nenets Autonomous District in 2016, Epidemiological Peculiarities. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 42-46. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-4-42-46>.
- Powell, J. D., Hutchison, J. R., Hess, B. M., & Straub, T. M. (2015). *Bacillus anthracis* spores germinate extracellularly at air-liquid interface in an in vitro lung model under serum-free conditions. *Journal of applied microbiology*, 119(3), 711–723. <https://doi.org/10.1111/jam.12872>
- Preta, G., Cronin, J. G., & Sheldon, I. M. (2015). Dynasore - not just a dynamin inhibitor. *Cell communication and signaling : CCS*, 13, 24. <https://doi.org/10.1186/s12964-015-0102-1>
- Puhar, A., & Montecucco, C. (2007). Where and how do anthrax toxins exit endosomes to intoxicate host cells?. *Trends in microbiology*, 15(11), 477–482. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.10.003>
- Puhar, A., Dal Molin, F., Horvath, S., Ladant, D., & Montecucco, C. (2008). Anthrax edema toxin modulates PKA- and CREB-dependent signaling in two phases. *PloS one*, 3(10), e3564. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003564>
- Pust, S., Dyve, A. B., Torgersen, M. L., van Deurs, B., & Sandvig, K. (2010). Interplay between toxin transport and flotillin localization. *PloS one*, 5(1), e8844. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008844>
- Puziss, M., & Howard, M. B. (1963). Studies on immunity in anthrax. XI. Control of cellular permeability by bicarbonate ion in relation to protective antigen elaboration. *Journal of bacteriology*, 85(1), 237–243. <https://doi.org/10.1002/path.1700850123>

Q

Quinn, C. P., Singh, Y., Klimpel, K. R., & Leppla, S. H. (1991). Functional mapping of anthrax toxin lethal factor by in-frame insertion mutagenesis. *The Journal of biological chemistry*, 266(30), 20124–20130.

Quinn, S. E., Huang, L., Kerkvliet, J. G., Swanson, J. A., Smith, S., Hoppe, A. D., Anderson, R. B., Thiex, N. W., & Scott, B. L. (2021). The structural dynamics of macropinosome formation and PI3-kinase-mediated sealing revealed by lattice light sheet microscopy. *Nature communications*, 12(1), 4838. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25187-1>

R

Radio-télévision belge de la Fédération Wallonie-Bruxelles. <https://www.rtb.be/article/poudre-blanche-et-anthrax-une-psychose-qui-remonte-aux-attentats-du-11-septembre-2001-10405033>

Rainey, G. J., Wigelsworth, D. J., Ryan, P. L., Scobie, H. M., Collier, R. J., & Young, J. A. (2005). Receptor-specific requirements for anthrax toxin delivery into cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(37), 13278–13283. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505865102>

Rasko, D. A., Rosovitz, M. J., Økstad, O. A., Fouts, D. E., Jiang, L., Cer, R. Z., Kolstø, A. B., Gill, S. R., & Ravel, J. (2007). Complete sequence analysis of novel plasmids from emetic and periodontal *Bacillus cereus* isolates reveals a common evolutionary history among the *B. cereus*-group plasmids, including *Bacillus anthracis* pXO1. *Journal of bacteriology*, 189(1), 52–64. <https://doi.org/10.1128/JB.01313-06>

Rennick, J.J., Johnston, A.P.R. & Parton, R.G. Key principles and methods for studying the endocytosis of biological and nanoparticle therapeutics. *Nat. Nanotechnol.* 16, 266–276 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41565-021-00858-8>

Reddy, A., Battisti, L., & Thorne, C. B. (1987). Identification of self-transmissible plasmids in four *Bacillus thuringiensis* subspecies. *Journal of bacteriology*, 169(11), 5263–5270. <https://doi.org/10.1128/jb.169.11.5263-5270.1987>

Richard, J-F., Mainguy, G., Gibert, M., Marvaud, J-C., Stiles, B. G., Popoff, M. R. (2002). Transcytosis of iota-toxin across polarized CaCo-2 cells. *Molecular Biology*, 43(4), 907–917. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02806.x>

Riedel S. (2004). Biological warfare and bioterrorism: a historical review. *Proceedings (Baylor University Medical Center)*, 17(4), 400–406. <https://doi.org/10.1080/08998280.2004.11928002>

Ringertz, S. H., Høiby, E. A., Jensenius, M., Maehlen, J., Caugant, D. A., Myklebust, A., & Fossum, K. (2000). Injectional anthrax in a heroin skin-popper. *Lancet (London, England)*, 356(9241), 1574–1575. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(00\)03133-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(00)03133-0)

Ristroph, J. D., & Ivins, B. E. (1983). Elaboration of *Bacillus anthracis* antigens in a new, defined culture medium. *Infection and immunity*, 39(1), 483–486.

Rivera, J., Cordero, R. J., Nakouzi, A. S., Frases, S., Nicola, A., & Casadevall, A. (2010). *Bacillus anthracis* produces membrane-derived vesicles containing biologically active toxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(44), 19002–19007. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008843107>

Robertson, D. L., & Leppla, S. H. (1986). Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the lethal factor gene of *Bacillus anthracis*. *Gene*, 44(1), 71–78. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(86\)90044-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(86)90044-2)

Robertson, D. L., Tippetts, M. T., & Leppla, S. H. (1988). Nucleotide sequence of the *Bacillus anthracis* edema factor gene (*cya*): a calmodulin-dependent adenylate cyclase. *Gene*, 73(2), 363–371. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90501-x](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90501-x)

Romero-Alvarez, D., Peterson, A. T., Salzer, J. S., Pittiglio, C., Shadomy, S., Traxler, R., Vieira, A. R., Bower, W. A., Walke, H., & Campbell, L. P. (2020). Potential distributions of *Bacillus anthracis* and

Bacillus cereus biovar anthracis causing anthrax in Africa. *PLoS neglected tropical diseases*, 14(3), e0008131. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008131>

Rougeaux, C., Becher, F., Ezan, E. *et al.* In vivo dynamics of active edema and lethal factors during anthrax. *Sci Rep* 6, 23346 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep23346>

Rougeaux, C., Becher, F., Goossens, P. L., & Tournier, J. N. (2020). Very Early Blood Diffusion of the Active Lethal and Edema Factors of Bacillus anthracis After Intranasal Infection. *The Journal of infectious diseases*, 221(4), 660–667. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz497>

S

Saile, E., & Koehler, T. M. (2002). Control of anthrax toxin gene expression by the transition state regulator abrB. *Journal of bacteriology*, 184(2), 370–380. <https://doi.org/10.1128/jb.184.2.370-380.2002>

Saile, E., & Koehler, T. M. (2006). Bacillus anthracis multiplication, persistence, and genetic exchange in the rhizosphere of grass plants. *Applied and environmental microbiology*, 72(5), 3168–3174. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3168-3174.2006>

Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., & Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *The Journal of experimental medicine*, 182(2), 389–400. <https://doi.org/10.1084/jem.182.2.389>

Sánchez-García, L., Serna, N., Álamo, P., Sala, R., Céspedes, M. V., Roldan, M., Sánchez-Chardi, A., Unzueta, U., Casanova, I., Mangues, R., Vázquez, E., & Villaverde, A. (2018). Self-assembling toxin-based nanoparticles as self-delivered antitumoral drugs. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 274, 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.01.031>

Sandvig, K., Kavaliauskiene, S., & Skotland, T. (2018). Clathrin-independent endocytosis: an increasing degree of complexity. *Histochemistry and cell biology*, 150(2), 107–118. <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1678-5>

Santelli, E., Bankston, L. A., Leppla, S. H., & Liddington, R. C. (2004). Crystal structure of a complex between anthrax toxin and its host cell receptor. *Nature*, 430(7002), 905–908. <https://doi.org/10.1038/nature02763>

Sastalla, I., Chim, K., Cheung, G. Y., Pomerantsev, A. P., & Leppla, S. H. (2009). Codon-optimized fluorescent proteins designed for expression in low-GC gram-positive bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 75(7), 2099–2110. <https://doi.org/10.1128/AEM.02066-08>

Sastalla, I., Maltese, L. M., Pomerantseva, O. M., Pomerantsev, A. P., Keane-Myers, A., & Leppla, S. H. (2010). Activation of the latent PlcR regulon in Bacillus anthracis. *Microbiology (Reading, England)*, 156(Pt 10), 2982–2993. <https://doi.org/10.1099/mic.0.041418-0>

Sastalla, I., Tang, S., Crown, D., Liu, S., Eckhaus, M. A., Hewlett, I. K., Leppla, S. H., & Moayeri, M. (2012). Anthrax edema toxin impairs clearance in mice. *Infection and immunity*, 80(2), 529–538. <https://doi.org/10.1128/IAI.05947-11>

Scarff, J. M., Raynor, M. J., Seldina, Y. I., Ventura, C. L., Koehler, T. M., & O'Brien, A. D. (2016). The roles of AtxA orthologs in virulence of anthrax-like Bacillus cereus G9241. *Molecular microbiology*, 102(4), 545–561. <https://doi.org/10.1111/mmi.13478>

Scarff, J. M., Seldina, Y. I., Vergis, J. M., Ventura, C. L., & O'Brien, A. D. (2018). Expression and contribution to virulence of each polysaccharide capsule of Bacillus cereus strain G9241. *PloS one*, 13(8), e0202701. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202701>

Schmid, G., & Kaufmann, A. (2002). Anthrax in Europe: its epidemiology, clinical characteristics, and role in bioterrorism. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 8(8), 479–488. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2002.00500.x>

- Schuch R, Fischetti VA (2009) The Secret Life of the Anthrax Agent *Bacillus anthracis*: Bacteriophage-Mediated Ecological Adaptations. *PLOS ONE* 4(8): e6532. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006532>
- Schwartz M. (2001). The life and works of Louis Pasteur. *Journal of applied microbiology*, 91(4), 597–601. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01495.x>
- Scobie, H. M., Rainey, G. J., Bradley, K. A., & Young, J. A. (2003). Human capillary morphogenesis protein 2 functions as an anthrax toxin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(9), 5170–5174. <https://doi.org/10.1073/pnas.0431098100>
- Scobie, H. M., Wigelsworth, D. J., Marlett, J. M., Thomas, D., Rainey, G. J., Lacy, D. B., Manchester, M., Collier, R. J., & Young, J. A. (2006). Anthrax toxin receptor 2-dependent lethal toxin killing in vivo. *PLoS pathogens*, 2(10), e111. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020111>
- Scobie HM, Marlett JM, Rainey GJA, Lacy DB, Collier RJ, Young JA (2007) Anthrax Toxin Receptor 2 Determinants that Dictate the pH Threshold of Toxin Pore Formation. *PLoS ONE* 2(3): e329. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000329>
- Scott, C. C., Vacca, F., & Gruenberg, J. (2014). Endosome maturation, transport and functions. *Seminars in cell & developmental biology*, 31, 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.03.034>
- Sejvar, J. J., Tenover, F. C., & Stephens, D. S. (2005). Management of anthrax meningitis. *The Lancet Infectious Diseases*, 5(5), 287–295. doi:10.1016/s1473-3099(05)70113-4
- Sellman, B. R., Mourez, M., & Collier, R. J. (2001a). Dominant-negative mutants of a toxin subunit: an approach to therapy of anthrax. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5517), 695–697. <https://doi.org/10.1126/science.109563>
- Sellman, B. R., Nassi, S., & Collier, R. J. (2001b). Point mutations in anthrax protective antigen that block translocation. *The Journal of biological chemistry*, 276(11), 8371–8376. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008309200>
- Setlow P. (2014). Spore Resistance Properties. *Microbiology spectrum*, 2(5), 10.1128/microbiolspec.TBS-0003-2012. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBS-0003-2012>
- Shafaq-Zadah, M., Dransart, E., & Johannes, L. (2020). Clathrin-independent endocytosis, retrograde trafficking, and cell polarity. *Current opinion in cell biology*, 65, 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.05.009>
- Shannon, J. G., Ross, C. L., Koehler, T. M., & Rest, R. F. (2003). Characterization of anthrolysin O, the *Bacillus anthracis* cholesterol-dependent cytolysin. *Infection and immunity*, 71(6), 3183–3189. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.6.3183-3189.2003>
- Shaw, C. A., & Starnbach, M. N. (2008). Both CD4+ and CD8+ T cells respond to antigens fused to anthrax lethal toxin. *Infection and immunity*, 76(6), 2603–2611. <https://doi.org/10.1128/IAI.01718-07>
- Shen, Y., Lee, Y. S., Soelaiman, S., Bergson, P., Lu, D., Chen, A., Beckingham, K., Grabarek, Z., Mrksich, M., & Tang, W. J. (2002). Physiological calcium concentrations regulate calmodulin binding and catalysis of adenylyl cyclase exotoxins. *The EMBO journal*, 21(24), 6721–6732. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf681>
- Shen, Y., Zhukovskaya, N. L., Guo, Q., Florián, J., & Tang, W. J. (2005). Calcium-independent calmodulin binding and two-metal-ion catalytic mechanism of anthrax edema factor. *The EMBO journal*, 24(5), 929–941. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600574>
- Siberian Times Journal. <http://siberiantimes.com/other/others/features/f0253-deadly-anthrax-infection-spread-250-kilometres-in-15-days-due-to-mosquitoes/>
- Singh, Y., Chaudhary, V. K., & Leppla, S. H. (1989). A deleted variant of *Bacillus anthracis* protective antigen is non-toxic and blocks anthrax toxin action in vivo. *The Journal of biological chemistry*, 264(32), 19103–19107. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)47273-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)47273-6)

- Singh Y, Klimpel KR, Quinn CP, Chaudhary VK, Leppla SH (1991) The carboxyl- terminal end of protective antigen is required for receptor binding and anthrax toxin activity. *The Journal of biological chemistry* 266:15493–15497. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)98643-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)98643-6)
- Sirard, J. C., Mock, M., & Fouet, A. (1994). The three *Bacillus anthracis* toxin genes are coordinately regulated by bicarbonate and temperature. *Journal of bacteriology*, 176(16), 5188–5192. <https://doi.org/10.1128/jb.176.16.5188-5192.1994>
- Smith, H.; Stanley, J. L. (1962). Purification of the Third Factor of Anthrax Toxin. *Journal of General Microbiology*, 29(3), 517–521. <https://doi.org/10.1099/00221287-29-3-517>
- Solano, M. I., Woolfitt, A. R., Boyer, A. E., Lins, R. C., Isbell, K., Gallegos-Candela, M., Moura, H., Pierce, C. L., & Barr, J. R., (2019). Accurate and selective quantification of anthrax protective antigen in plasma by immunocapture and isotope dilution mass spectrometry. *The Analyst*, 144(7), 2264–2274. <https://doi.org/10.1039/c8an02479k>
- Song, L., Hobaugh, M. R., Shustak, C., Cheley, S., Bayley, H., & Gouaux, J. E. (1996). Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science (New York, N.Y.)*, 274(5294), 1859–1866. <https://doi.org/10.1126/science.274.5294.1859>
- Sorkin, A., & Puthenveedu, M.A. (2013). *Clathrin-Mediated Endocytosis Vesicle Trafficking in Cancer (Chapter 1)*, 1–31. [doi:10.1007/978-1-4614-6528-7_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6528-7_1)
- Sprenkle, M. D., Griffith, J., Marinelli, W., Boyer, A. E., Quinn, C. P., Pesik, N. T., Hoffmaster, A., Keenan, J., Juni, B. A., & Blaney, D. D. (2014). Lethal factor and anti-protective antigen IgG levels associated with inhalation anthrax, Minnesota, USA. *Emerging infectious diseases*, 20(2), 310–314. <https://doi.org/10.3201/eid2002.130245>
- Stanley, J. L., & Smith, H. (1961). Purification of factor I and recognition of a third factor of the anthrax toxin. *Journal of general microbiology*, 26, 49–63. <https://doi.org/10.1099/00221287-26-1-49>
- Stapler T, Caneuscu V, Voiculescu M. (1965). Bronchopneumonia with lethal evolution determined by a microorganism of the genus *Bacillus* (*B.cereus*). *Rumanian medical review*, 19, 7–9.
- Steinman, R. M., Brodie, S. E., & Cohn, Z. A. (1976). Membrane flow during pinocytosis. A stereologic analysis. *The Journal of cell biology*, 68(3), 665–687. <https://doi.org/10.1083/jcb.68.3.665>
- Sterne M. (1937). Variation in *Bacillus anthracis*. *Onderstepoort J. vet. Sci* 8:271
- Sterne, M. (1939). The use of anthrax vaccines prepared from avirulent (unencapsulated) variants of *Bacillus anthracis*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Science*, 13, 307–312.
- Storm, L., Bikker, F. J., Nazmi, K., Hulst, A. G., der Riet-Van Oeveren, D. V., Veerman, E., Hays, J. P., & Kaman, W. E. (2018). Anthrax protective antigen is a calcium-dependent serine protease. *Virulence*, 9(1), 1085–1091. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1486139>
- Strange, R. E., & Thorne, C. B. (1958). Further purification studies on the protective antigen of *Bacillus anthracis* produced in vitro. *Journal of bacteriology*, 76(2), 192–202. <https://doi.org/10.1128/jb.76.2.192-202.1958>
- Sue, D., Hoffmaster, A. R., Popovic, T., & Wilkins, P. P. (2006). Capsule production in *Bacillus cereus* strains associated with severe pneumonia. *Journal of clinical microbiology*, 44(9), 3426–3428. <https://doi.org/10.1128/JCM.00873-06>
- Sutherland, M. D., Thorkildson, P., Parks, S. D., & Kozel, T. R. (2008). In vivo fate and distribution of poly-gamma-D-glutamic acid, the capsular antigen from *Bacillus anthracis*. *Infection and immunity*, 76(3), 899–906. <https://doi.org/10.1128/IAI.01176-07>
- Swanson J. A. (2008). Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(8), 639–649. <https://doi.org/10.1038/nrm2447>
- Sweeney, D. A., Hicks, C. W., Cui, X., Li, Y., & Eichacker, P. Q. (2011). Anthrax infection. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 184(12), 1333–1341. <https://doi.org/10.1164/rccm.201102-0209CI>

T

- Takahashi, H., Keim, P., Kaufmann, A. F., Keys, C., Smith, K. L., Taniguchi, K., Inouye, S., & Kurata, T. (2004). Bacillus anthracis incident, Kameido, Tokyo, 1993. *Emerging infectious diseases*, 10(1), 117–120. <https://doi.org/10.3201/eid1001.030238>
- Tang, W. J., & Guo, Q. (2009). The adenylyl cyclase activity of anthrax edema factor. *Molecular aspects of medicine*, 30(6), 423–430. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.06.001>
- Terra, J. K., Cote, C. K., France, B., Jenkins, A. L., Bozue, J. A., Welkos, S. L., LeVine, S. M., & Bradley, K. A. (2010). Cutting edge: resistance to Bacillus anthracis infection mediated by a lethal toxin sensitive allele of Nalp1b/Nlrp1b. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184(1), 17–20. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903114>
- Thoren, K. L., Worden, E. J., Yassif, J. M., & Krantz, B. A. (2009). Lethal factor unfolding is the most force-dependent step of anthrax toxin translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(51), 21555–21560. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905880106>
- Thorne, C. B., Gomez, C. G., & Housewright, R. D. (1952). Synthesis of glutamic acid and glutamyl polypeptide by Bacillus anthracis. II. The effect of carbon dioxide on peptide production on solid media. *Journal of bacteriology*, 63(3), 363–368. <https://doi.org/10.1128/jb.63.3.363-368.1952>
- Thorne, C. B., D. M. Molnar. and R. E. Strange. (1960). Production of toxin in vitro by Bacillus anthracis and its separation into two components. *Journal of bacteriology*, 79(3), 450–455. <https://doi.org/10.1128/jb.79.3.450-455.1960>
- Thottacherry, J. J., Sathe, M., Prabhakara, C., & Mayor, S. (2019). Spoiled for Choice: Diverse Endocytic Pathways Function at the Cell Surface. *Annual review of cell and developmental biology*, 35, 55–84. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100617-062710>
- Thouret, J. M., Rogeaux, O., Beaudouin, E., Levast, M., Ramiise, V., Biot, F. V., Valade, E., Thibault, F., Gorgé, O., & Tournier, J. N. (2020). Case Report of an Injectional Anthrax in France, 2012. *Microorganisms*, 8(7), 985. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8070985>
- Thwaite, J. E., Hibbs, S., Titball, R. W., & Atkins, T. P. (2006). Proteolytic degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by Bacillus anthracis may contribute to virulence. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(7), 2316–2322. <https://doi.org/10.1128/AAC.01488-05>
- Tigertt W. D. (1980). Anthrax. William Smith Greenfield, M.D., F.R.C.P., Professor Superintendent, the Brown Animal Sanatory Institution (1878-81). Concerning the priority due to him for the production of the first vaccine against anthrax. *The Journal of hygiene*, 85(3), 415–420. <https://doi.org/10.1017/s0022172400063488>
- Tippetts, M. T., & Robertson, D. L. (1988). Molecular cloning and expression of the Bacillus anthracis edema factor toxin gene: a calmodulin-dependent adenylate cyclase. *Journal of bacteriology*, 170(5), 2263–2266. <https://doi.org/10.1128/jb.170.5.2263-2266.1988>
- Titball R. W. (1998). Bacterial phospholipases. *Symposium series (Society for Applied Microbiology)*, 27, 127S–137S.
- Tonry, J., Nichol, B., Ramarao, N., Chertow, D., Kim, K., Stibitz, S., Scheewind, O., Kashanchi, F., Bailey, C., Popov, S., Chung, M-C. (2012). Bacillus anthracis protease InhA regulates BslA-mediated adhesion in human endothelial cells. *Cellular Microbiology* 14(8):1219-30. DOI:10.1111/j.1462-5822.2012.01791.x
- Torgersen, M. L., Skretting, G., van Deurs, B., & Sandvig, K. (2001). Internalization of cholera toxin by different endocytic mechanisms. *Journal of cell science*, 114(Pt 20), 3737–3747. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.20.3737>
- Tourasse, N. J., Helgason, E., Økstad, O. A., Hegna, I. K., & Kolstø, A. B. (2006). The Bacillus cereus group: novel aspects of population structure and genome dynamics. *Journal of applied microbiology*, 101(3), 579–593. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03087.x>

Tournier, J. N., Rossi Paccani, S., Quesnel-Hellmann, A., & Baldari, C. T. (2009). Anthrax toxins: a weapon to systematically dismantle the host immune defenses. *Molecular aspects of medicine*, 30(6), 456–466. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.06.002>

Tournier, J. N., Rougeaux, C., Biot, F. V., & Goossens, P. L. (2019). Questionable Efficacy of Therapeutic Antibodies in the Treatment of Anthrax. *mSphere*, 4(3), e00282-19. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00282-19>

Traub L. M. (2009). Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(9), 583–596. <https://doi.org/10.1038/nrm2751>

Traub L. M. (2011). Regarding the amazing choreography of clathrin coats. *PLoS biology*, 9(3), e1001037. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001037>

Tu, Y., Zhao, L., Billadeau, D. D., & Jia, D. (2020). Endosome-to-TGN Trafficking: Organelle-Vesicle and Organelle-Organelle Interactions. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 163. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00163>

Turnbull, P.C.B. and Shadomy, S.V. (2010). Anthrax from 5000 BC to AD 2010. In *Bacillus anthracis and Anthrax*, N.H. Bergman (Ed.). doi:10.1002/9780470891193.ch1

Turner, W. C., P. Imologhome, Z. Havarua, G. P. Kaaya, J. K. E. Mfunu, I. D. T. Mpofo, and W. M. Getz. (2013). Soil ingestion, nutrition and the seasonality of anthrax in herbivores of Etosha National Park. *Ecosphere*, 4(1), 13. <http://dx.doi.org/10.1890/ES12-00245.1>

Turner, W. C., Kausrud, K. L., Krishnappa, Y. S., Crowsigt, J. P., Ganz, H. H., Mapaure, I., Cloete, C. C., Havarua, Z., Küsters, M., Getz, W. M., & Stenseth, N. C. (2014). Fatal attraction: vegetation responses to nutrient inputs attract herbivores to infectious anthrax carcass sites. *Proceedings. Biological sciences*, 281(1795), 20141785. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.1785>

U

Uchida, I., Makino, S., Sasakawa, C., Yoshikawa, M., Sugimoto, C., & Terakado, N. (1993). Identification of a novel gene, dep, associated with depolymerization of the capsular polymer in *Bacillus anthracis*. *Molecular microbiology*, 9(3), 487–496. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01710.x>

Uchida, I., Hornung, J. M., Thorne, C. B., Klimpel, K. R., & Leppla, S. H. (1993b). Cloning and characterization of a gene whose product is a trans-activator of anthrax toxin synthesis. *Journal of bacteriology*, 175(17), 5329–5338. <https://doi.org/10.1128/jb.175.17.5329-5338.1993>

Uchida, I., Makino, S., Sekizaki, T., & Terakado, N. (1997). Cross-talk to the genes for *Bacillus anthracis* capsule synthesis by atxA, the gene encoding the trans-activator of anthrax toxin synthesis. *Molecular microbiology*, 23(6), 1229–1240. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.3041667.x>

Ulmer, T. S., Soelaiman, S., Li, S., Klee, C. B., Tang, W. J., & Bax, A. (2003). Calcium dependence of the interaction between calmodulin and anthrax edema factor. *The Journal of biological chemistry*, 278(31), 29261–29266. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302837200>

Uribe-Querol, E., & Rosales, C. (2020). Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process. *Frontiers in immunology*, 11, 1066. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01066>

V

Van den Enden, E., Van Gompel, A., & Van Esbroeck, M. (2006). Cutaneous anthrax, Belgian traveler. *Emerging infectious diseases*, 12(3), 523–525. <https://doi.org/10.3201/eid1203.051407>

- Van der Auwera, G. A., Andrup, L., & Mahillon, J. (2005). Conjugative plasmid pAW63 brings new insights into the genesis of the *Bacillus anthracis* virulence plasmid pXO2 and of the *Bacillus thuringiensis* plasmid pBT9727. *BMC genomics*, *6*, 103. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-6-103>
- Van der Auwera, G. A., Timmerly, S., & Mahillon, J. (2008). Self-transfer and mobilisation capabilities of the pXO2-like plasmid pBT9727 from *Bacillus thuringiensis* subsp. *konkukian* 97-27. *Plasmid*, *59*(2), 134–138. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2007.11.007>
- Varkouhi, A. K., Scholte, M., Storm, G., & Haisma, H. J. (2011). Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, *151*(3), 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.11.004>
- Varughese, M., Teixeira, A. V., Liu, S., & Leppla, S. H. (1999). Identification of a receptor-binding region within domain 4 of the protective antigen component of anthrax toxin. *Infection and immunity*, *67*(4), 1860–1865. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.4.1860-1865.1999>
- Viaud, J. and Payrastré, B. (2015). Les phosphoinositides. Ces lipides qui coordonnent la dynamique cellulaire. *Med Sci (Paris)* 2015 ; 31 : 996–1005. <https://doi.org/10.1051/medsci/20153111014>
- Vietri, N. J., Marrero, R., Hoover, T. A., & Welkos, S. L. (1995). Identification and characterization of a trans-activator involved in the regulation of encapsulation by *Bacillus anthracis*. *Gene*, *152*(1), 1–9. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)00662-c](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)00662-c)
- Vitale, G., Pellizzari, R., Recchi, C., Napolitani, G., Mock, M., & Montecucco, C. (1998). Anthrax lethal factor cleaves the N-terminus of MAPKs and induces tyrosine/threonine phosphorylation of MAPKs in cultured macrophages. *Biochemical and biophysical research communications*, *248*(3), 706–711. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9040>
- Vitale, G., Bernardi, L., Napolitani, G., Mock, M., & Montecucco, C. (2000). Susceptibility of mitogen-activated protein kinase family members to proteolysis by anthrax lethal factor. *The Biochemical journal*, *352 Pt 3*(Pt 3), 739–745.
- Vodkin, M. H., & Leppla, S. H. (1983). Cloning of the protective antigen gene of *Bacillus anthracis*. *Cell*, *34*(2), 693–697. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90402-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90402-6)

W

- Walsh, J. J., Pesik, N., Quinn, C. P., Urdaneta, V., Dykewicz, C. A., Boyer, A. E., Guarner, J., Wilkins, P., Norville, K. J., Barr, J. R., Zaki, S. R., Patel, J. B., Reagan, S. P., Pirkle, J. L., Treadwell, T. A., Messonnier, N. R., Rotz, L. D., Meyer, R. F., & Stephens, D. S. (2007). A case of naturally acquired inhalation anthrax: clinical care and analyses of anti-protective antigen immunoglobulin G and lethal factor. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, *44*(7), 968–971. <https://doi.org/10.1086/512372>
- Wang, X. M., Wattiez, R., Mock, M., Falmagne, P., Ruyschaert, J. M., & Cabiliaux, V. (1997). Structure and interaction of PA63 and EF (edema toxin) of *Bacillus anthracis* with lipid membrane. *Biochemistry*, *36*(48), 14906–14913. <https://doi.org/10.1021/bi971661k>
- Wang, S., Hu, C., Wu, F., & He, S. (2017). Rab25 GTPase: Functional roles in cancer. *Oncotarget*, *8*, 64591 - 64599. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19571>
- Weiner, Z. P., & Glomski, I. J. (2012). Updating perspectives on the initiation of *Bacillus anthracis* growth and dissemination through its host. *Infection and immunity*, *80*(5), 1626–1633. <https://doi.org/10.1128/IAI.06061-11>
- Welkos, S. L., Lowe, J. R., Eden-McCutchan, F., Vodkin, M., Leppla, S. H., & Schmidt, J. J. (1988). Sequence and analysis of the DNA encoding protective antigen of *Bacillus anthracis*. *Gene*, *69*(2), 287–300. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90439-8](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90439-8)

Welkos, S. L., Vietri, N. J., & Gibbs, P. H. (1993). Non-toxigenic derivatives of the Ames strain of *Bacillus anthracis* are fully virulent for mice: role of plasmid pX02 and chromosome in strain-dependent virulence. *Microbial pathogenesis*, *14*(5), 381–388. <https://doi.org/10.1006/mpat.1993.1037>

Welkos, S., Little, S., Friedlander, A., Fritz, D., & Fellows, P. (2001). The role of antibodies to *Bacillus anthracis* and anthrax toxin components in inhibiting the early stages of infection by anthrax spores. *Microbiology (Reading, England)*, *147*(Pt 6), 1677–1685. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-6-1677>

Wesche, J., Elliott, J. L., Falnes, P. O., Olsnes, S., & Collier, R. J. (1998). Characterization of membrane translocation by anthrax protective antigen. *Biochemistry*, *37*(45), 15737–15746. <https://doi.org/10.1021/bi981436i>

Williams, A. S., Lovell, S., Anbanandam, A., El-Chami, R., & Bann, J. G. (2009). Domain 4 of the anthrax protective antigen maintains structure and binding to the host receptor CMG2 at low pH. *Protein science : a publication of the Protein Society*, *18*(11), 2277–2286. <https://doi.org/10.1002/pro.238>

Williamson, C. D., & Donaldson, J. G. (2019). Arf6, JIP3, and dynein shape and mediate macropinocytosis. *Molecular biology of the cell*, *30*(12), 1477–1489. <https://doi.org/10.1091/mbc.E19-01-0022>

Wilson, M. K., Vergis, J. M., Alem, F., Palmer, J. R., Keane-Myers, A. M., Brahmabhatt, T. N., Ventura, C. L., & O'Brien, A. D. (2011). *Bacillus cereus* G9241 makes anthrax toxin and capsule like highly virulent *B. anthracis* Ames but behaves like attenuated toxigenic nonencapsulated *B. anthracis* Sterne in rabbits and mice. *Infection and immunity*, *79*(8), 3012–3019. <https://doi.org/10.1128/IAI.00205-11>

Wilson, J. M., Brediger, W., Albright, T. P., & Smith-Gagen, J. (2016). Reanalysis of the anthrax epidemic in Rhodesia, 1978-1984. *PeerJ*, *4*, e2686. <https://doi.org/10.7717/peerj.2686>

Wimalasena, D. S., Cramer, J. C., Janowiak, B. E., Juris, S. J., Melnyk, R. A., Anderson, D. E., Kirk, K. L., Collier, R. J., & Bann, J. G. (2007). Effect of 2-fluorohistidine labeling of the anthrax protective antigen on stability, pore formation, and translocation. *Biochemistry*, *46*(51), 14928–14936. <https://doi.org/10.1021/bi701763z>

Wimalasena, D. S., Janowiak, B. E., Lovell, S., Miyagi, M., Sun, J., Zhou, H., Hajduch, J., Pooput, C., Kirk, K. L., Battaile, K. P., & Bann, J. G. (2010). Evidence that histidine protonation of receptor-bound anthrax protective antigen is a trigger for pore formation. *Biochemistry*, *49*(33), 6973–6983. <https://doi.org/10.1021/bi100647z>

World Health Organization (WHO). Anthrax in Humans and Animals. 4th edition. Geneva; 2008. Annex 1, Laboratory procedures for diagnosis of anthrax, and isolation and identification of *Bacillus anthracis*. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK310485/>

Wosen, J. E., Mukhopadhyay, D., Macaubas, C., & Mellins, E. D. (2018). Epithelial MHC Class II Expression and Its Role in Antigen Presentation in the Gastrointestinal and Respiratory Tracts. *Frontiers in immunology*, *9*, 2144. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02144>

Wright, A. M., Beres, S. B., Consamus, E. N., Long, S. W., Flores, A. R., Barrios, R., Richter, G. S., Oh, S. Y., Garufi, G., Maier, H., Drews, A. L., Stockbauer, K. E., Cernoch, P., Schneewind, O., Olsen, R. J., & Musser, J. M. (2011). Rapidly progressive, fatal, inhalation anthrax-like infection in a human: case report, pathogen genome sequencing, pathology, and coordinated response. *Archives of pathology & laboratory medicine*, *135*(11), 1447–1459. <https://doi.org/10.5858/2011-0362-SAIR.1>

X/Y/Z

Xia, Z. G., & Storm, D. R. (1990). A-type ATP binding consensus sequences are critical for the catalytic activity of the calmodulin-sensitive adenylyl cyclase from *Bacillus anthracis*. *The Journal of biological chemistry*, *265*(12), 6517–6520.

Yamamoto, B. J., Shadiack, A. M., Carpenter, S., Sanford, D., Henning, L. N., O'Connor, E., Gonzales, N., Mondick, J., French, J., Stark, G. V., Fisher, A. C., Casey, L. S., & Serbina, N. V. (2016). Efficacy

- Projection of Obiltoximab for Treatment of Inhalational Anthrax across a Range of Disease Severity. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(10), 5787–5795. <https://doi.org/10.1128/AAC.00972-16>
- Yoshida, S., Hoppe, A. D., Araki, N., & Swanson, J. A. (2009). Sequential signaling in plasma-membrane domains during macropinosome formation in macrophages. *Journal of cell science*, 122(Pt 18), 3250–3261. <https://doi.org/10.1242/jcs.053207>
- Zasada A. A. (2018). Injectional anthrax in human: A new face of the old disease. *Advances in clinical and experimental medicine : official organ Wroclaw Medical University*, 27(4), 553–558. <https://doi.org/10.17219/acem/68380>
- Zasada A. A. (2020). Detection and Identification of *Bacillus anthracis*: From Conventional to Molecular Microbiology Methods. *Microorganisms*, 8(1), 125. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010125>
- Zhang, S., Finkelstein, A., & Collier, R. J. (2004). Evidence that translocation of anthrax toxin's lethal factor is initiated by entry of its N terminus into the protective antigen channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(48), 16756–16761. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405754101>
- Zhang, X., Odom, D. T., Koo, S. H., Conkright, M. D., Canettieri, G., Best, J., Chen, H., Jenner, R., Herbolsheimer, E., Jacobsen, E., Kadam, S., Ecker, J. R., Emerson, B., Hogenesch, J. B., Unterman, T., Young, R. A., & Montminy, M. (2005). Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(12), 4459–4464. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501076102>
- Zheng, S., Zhang, G., Li, J., & Chen, P. R. (2014). Monitoring endocytic trafficking of anthrax lethal factor by precise and quantitative protein labeling. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 53(25), 6449–6453. <https://doi.org/10.1002/anie.201403945>
- Zornetta, I., Brandi, L., Janowiak, B., Dal Molin, F., Tonello, F., Collier, R. J., & Montecucco, C. (2010). Imaging the cell entry of the anthrax oedema and lethal toxins with fluorescent protein chimeras. *Cellular microbiology*, 12(10), 1435–1445. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01480.x>

Titre : Endocytose du facteur oedémateux de *Bacillus anthracis* et des *Bacillus cereus* anthracis-like.

Mots clés : toxine, endocytose, anthracis.

Résumé : La maladie du charbon est une zoonose responsable d'épidémies affectant le bétail depuis le 17^e siècle. Causée par une bactérie sporulante, capable d'avoir des effets pathogènes selon la voie d'infection, elle a été employée lors de guerres et d'attaques bioterroristes.

Les toxines oedémateuse (ET) et létale (LT) sont des facteurs de virulence sécrétés par la bactérie, capables de dérouter les fonctions cellulaires hôtes suite à leur endocytose. Ces toxines de type AB sont composées d'un facteur B commun l'antigène protecteur (PA) et de deux facteurs enzymatiques A : le facteur oedémateux (EF) et le facteur létal (LF).

Le mécanisme d'action décrit jusqu'alors implique une oligomérisation de PA à la surface de la membrane, puis la fixation de EF et LF, avant d'être internalisé. La maturation endosomale permet ensuite à EF et LF d'atteindre leurs cibles cytosoliques.

Dans le cadre de ces travaux, des protéines EF fluorescentes ont été conçues et purifiées. Elles servent d'outils pour caractériser l'entrée et le trafic intracellulaire.

L'étude de l'endocytose de ET au sein des cellules épithéliales démontre une spécificité de pôle d'entrée. Nous avons également montré que la présence de PA n'est pas un prérequis à l'internalisation de EF dans les macrophages et en cellules épithéliales. Cependant PA reste nécessaire à l'obtention de l'activité adénylate cyclase intracellulaire de EF. La rencontre de EF et PA à l'intérieur de la cellule représenterait l'étape limitante du processus d'endocytose pour la production de l'AMPc responsable des perturbations cellulaires et tissulaires. L'étude comparative des mécanismes d'endocytose ne montre cependant pas de différences majeures des voies utilisées par EF en présence ou en absence de PA.

Title : Endocytosis of the edema factor of *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* anthracis-like.

Keywords : toxin, endocytosis, anthracis.

Abstract : Anthrax is a zoonotic disease responsible of epidemics among livestock since 17th. Caused by a sporulating bacteria, able to show pathogenic effects from different infection routes, it has been employed during wars and for bioterrorist purposes. Edema toxin (ET) and lethal toxin (LT) are virulence factors secreted by the bacteria that are able to interfere with cellular host functions after their endocytosis. This AB type toxins are composed by a common B factor, the protective antigen (PA) and two A enzymatic components : edema factor (EF) and lethal factor (LF).

The current action mechanism involves oligomerization of PA on the cell surface, followed by the fixation EF and LF, before being internalized. Endosomal maturation further allow EF and LF to locate with their cytosolic targets.

In this work, fluorescent EF proteins have been created and purified ; and used as tools to characterize the entry and intracellular trafic.

The endocytic study of ET in epithelial cells showed a pole entry specificity. We also demonstrated that PA is not a prerequisite for the internalisation of EF in macrophages and epithelial cells. Besides, PA is still required to obtain an intracellular adenylate cyclase activity of EF. An intracelular meeting place of PA and EF, would represent the limiting step of the endocytosis process in order to produce cAMP which generate cellular and tissular disorders. However comparison between endocytic mechanisms didn't show major differences in the pathways involved in the entry of EF with or without PA.