

UNIVERSITE LOUIS PASTEUR – STRASBOURG I

**UFR DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

N° 0671712X

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR

Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Bactériologie

Présentée et soutenue publiquement
par

Olivier JOUBERT

Le 23 novembre 2005

Identification, stabilisation et inhibition de l'interaction
monomère S – monomère F des leucotoxines à deux composés
de *Staphylococcus aureus*

JURY

Dr Mamadou Daffé

Pr Daniel Kern

Pr Bertrand Rihn

Pr Yves Piémont

Dr Gilles Prévost

Rapporteur externe

Rapporteur interne

Rapporteur externe

Examineur

Directeur de thèse

Je dédie ce manuscrit

A mes parents, qui m'ont donné les moyens financiers pour poursuivre mes (longues) études, et pour leur soutien moral de tous les instants

A mon frère, pour m'avoir montré le chemin à suivre

A toutes les personnes que j'ai croisées à Strasbourg, et qui m'ont aidé à passer ces trois ans ...

Docteur Mamadou Daffé

C'est un grand honneur pour moi que vous ayez accepté de siéger dans ce jury, je vous en remercie chaleureusement.

Professeur Daniel Kern

Je vous remercie de l'intérêt que vous avez porté à ce travail, et d'avoir accepté d'être mon rapporteur interne pour ce jury de thèse.

Professeur Bertrand Rihn

Je vous sais gré pour votre disponibilité à juger cette thèse, soyez assuré de ma sincère gratitude.

Professeur Yves Piémont

Je vous remercie d'avoir pris le temps d'examiner ce travail, malgré vos nombreuses occupations et récentes responsabilités.

Docteur Gilles Prévost

J'espère avoir modestement contribué à la vie du laboratoire. Tu m'as appris que seuls rigueur et travail acharné étaient le salut dans ce monde de la Recherche. Tu m'as également transmis ta passion pour les toxines bactériennes. Je te remercie pour ton soutien, et ta disponibilité de tous les instants.

Je remercie le Professeur Henri Monteil de m'avoir accueilli durant ces trois ans à l'Institut de Bactériologie.

Nadine Loreau et Denis Blache

Vous avez guidé mes premiers pas dans la Recherche. Le petit marche désormais tout seul, mais il sait tout ce qu'il vous doit.

Daniel Keller

Ce travail est en grande partie le tien. La synthèse des dimères est effectivement « Keller patented ». J'ai apprécié ton extrême rigueur et ces longues heures passées à la paillasse en ta compagnie, durant lesquelles tu as expliqué à l'aliboron que je suis les secrets des purif^r de protéines ... ou refait le monde enfin, surtout les règles du foot...

Les toxines ne seraient rien si on ne pouvait les tester sur des cellules. Aussi, je tiens à exprimer toute ma gratitude envers Didier Colin et Raymonde Girardot pour m'avoir formé sur le cytomètre et le spectrofluorimètre. Je les remercie pour tous les échanges fructueux que nous avons eu durant ce travail de thèse et leur perpétuelle gentillesse.

Gabriella Viero, Cristina Potrich, Maura Dalla Serra, « l'équipe Italienne » que je remercie pour toutes les discussions prolifiques *via* Internet et durant nos trop rares rencontres, collaboration initiée par Gianfranco Menestrina. J'espère que là où tu es, tu es satisfait de ce travail.

Jean-Michel Scheftel, je te remercie de m'avoir donné l'occasion de faire les TP de Bactériologie médicale, ce qui a fait un petit plus non négligeable dans mon modeste train de vie, et m'a enrichi personnellement.

Eric Martinez

Ton soutien et ton aide me furent précieux durant cette dernière ligne droite ! Le gabatx te souhaite bon courage pour la suite et tous mes vœux de réussite.

Je souhaiterais également remercier toutes les stagiaires qui sont passées dans le labo, Anne P, Nathalie F, Isabelle D, Mélanie C et ont contribué à féminiser un tantinet le labo.

A Elodie Etienne et Emmanuel Forestier, j'espère être étranger au fait que vous n'ayez pas persisté dans la Recherche. Tous mes vœux vous accompagnent.

Pierre Zachary, tu as su te faire un ami d'un Bourguignon en sachant lui parler du meilleur des sujets : c'est-à-dire de vin.

A Lamine Baba-Moussa, j'espère que, quand je viendrai te rendre visite, je donnerai du « Monsieur le Ministre »...

Merci aux secrétaires, Catherine et Martine...

Merci aux « gens d'en bas », Sandi, Florent, Freddy, Vincent...

A l'ensemble du personnel de l'Institut de Bactériologie pour son accueil.

A tous les amis de l'Harmonie Bischheim, Damien, Aimé, Myriam, Pierre, Audrey, Fritz, André, Marcel... merci pour votre accueil et tous ces moments musicaux de qualité !!

Last but not least, je remercie tous les collègues de l'Association des Doctorants et Docteurs d'Alsace, association à laquelle je souhaite bon vent. Parmi eux, je remercie surtout Cécile, Benoît et Alice qui ont su être présent dans les moments difficiles. Soyez assurés de ma reconnaissance éternelle.

Table des matières

Liste des figures et des tables.....	ix
Abréviations	xii
CHAPITRE I – INTRODUCTION	15
A. LES TOXINES FORMANT DES PORES	17
1. Les différentes classes de toxines bactériennes formant des pores.....	17
1.1. Les toxines à hélices α	19
1.1.1. Les colicines d' <i>E. coli</i>	21
1.1.2. La toxine diphtérique	23
1.1.3. La delta hémolysine de <i>S. aureus</i>	25
1.1.4. L'exotoxine A de <i>P. aeruginosa</i>	27
1.1.5. δ -endotoxine insecticide Cry	29
1.1.6. L'hémolysine E de <i>E. coli</i> – une nouvelle PFT	31
1.2. Les toxines à brin β	32
1.2.1. Aérolyisine	33
1.2.2. PA de <i>B. anthracis</i>	39
1.2.3. Les cytolysines dépendantes du cholestérol – La perfringolysine O ..	41
1.2.4. δ -endotoxine insecticide Cyt.....	45
1.2.5. Cytolysine de <i>Vibrio cholerae</i>	45
1.2.6. L'alpha-toxine de <i>S. aureus</i>	49
2. Les leucotoxines de Staphylocoque	55
2.1. Historique	55
2.2. Définition	56
2.3. La Leucocidine de Panton et Valentine (LPV)	58
2.4. La gamma-hémolysine	60
2.5. La leucocidine R	61
2.6. LukM-LukF'-PV like	61
2.7. LukS-I-LukF-I.....	61
2.8. LukE-LukD	63
2.9. Organisation génétique et caractères biochimiques des leucotoxines à 2 composés	63
2.10. Structure tridimensionnelle des monomères solubles de leucotoxine... 65	
2.10.1. Structure tridimensionnelle de LukF-PV	67
2.10.2. Structure tridimensionnelle de HlgB	69
2.10.3. Structure tridimensionnelle de LukS-PV	69
2.11. Fixation des leucotoxines.....	72
2.12. Formation du pré-pore.....	73
2.13. Formation du pore.....	75
2.14. Réponse cellulaire aux leucotoxines	76
3. Conclusion sur les toxines formant des pores.....	77
B. OBJECTIFS DE LA THESE	80
CHAPITRE II – MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	83

A. MATERIELS	83
1. Les souches bactériennes	83
2. Le vecteur d'expression pGEX6P-1 (figure 2.1)	83
3. Les milieux de culture.....	84
4. Solutions et tampons	84
B. METHODES RELATIVES A L'ETUDE DE L'ADN.....	87
1. Les méthodes de préparation de l'ADN.....	87
1.1. Maxipréparation d'ADN par la méthode chromatographique (Plasmid combi kit, Qiagen).....	87
1.2. Maxi-préparation d'ADN plasmidique sur gradient de chlorure de césium	88
2. Modifications enzymatiques de l'ADN	88
2.1. Hydrolyses de restriction.....	88
2.2. Déphosphorylation des extrémités 5'-phosphate d'un plasmide	89
2.3. Ligation de deux fragments d'ADN.....	89
3. Electrophorèse de fragments d'ADN.....	89
Séparation des fragments d'ADN sur gel d'agarose	89
4. Amplification d'un fragment d'ADN par la méthode de PCR.....	90
4.1. Principe de la méthode	90
4.2. La réaction.....	90
5. Mutagenèse dirigée par la méthode « Quick Change™ Site Directed Mutagenesis »	90
5.1. Principe de la Méthode.....	90
5.2. La réaction.....	93
5.3. Le criblage des mutants.....	93
6. Séquençage d'un ADN par la méthode de Sanger (T7 sequencing kit, Amersham-Biosciences)	94
6.1. Principe et application de la méthode (Sanger et coll., 1977).....	94
6.2. Gel de séquence selon Sanger (Sanger et coll., 1977)	94
6.3. Séquençage automatique par électrophorèse capillaire.....	94
7. Transformation des bactéries	95
7.1 Transformation de cellules Epicurian coli XL-1 Blue super-compétentes	95
7.2. Transformation de <i>E. coli</i> BL21.....	95
C. METHODES RELATIVES A L'ETUDE DES PROTEINES.....	97
1. Purification des leucotoxines sous forme de protéines fusion à partir d' <i>E. coli</i> BL21	97
1.1. Principe de la méthode	97
1.2. Obtention du lysat bactérien.....	97
1.3. Dosage de l'activité enzymatique de la GST	98
1.4. Purification de la protéine de fusion sur colonne de Glutathion Sépharose 4B	99
1.5. Clivage de la protéine de fusion par la PreScission® Protease.....	99

1.6. Purification des composés leucotoxiques (LukS-PV et LukF-PV, HlgA) par chromatographie échangeuse d'ions	100
1.6.1. Purification de LukS-PV et ses mutants	100
1.6.2. Purification de LukF-PV et ses mutants	101
1.6.3. Purification de HlgA et ses mutants	101
1.7. Purification de HlgB+8 et de ses mutants par chromatographie d'interaction hydrophobe	102
2. Obtention d'hétérodimères de leucotoxines	103
2.1. Synthèse des hétérodimères	103
2.2 Purification des hétérodimères	104
3. Techniques d'analyse des protéines	104
3.1. Immunoréplique (Western Blot) sur membrane de nitrocellulose	104
3.1.1. Séparation et transfert sur membrane de nitrocellulose	104
3.1.2. Détection des protéines	104
3.2. Le SDS- PAGE : PhastSystem™	105
3.3. Immunoprécipitation des leucotoxines par une diffusion radiale en gel des protéines	106
3.4. Dosage de protéines par la méthode de Bradford	106
3.5. Détection de la présence d'un résidu cystéine en surface d'une protéine mutée	107
3.5.1. Principe de la réaction	107
3.5.2. Mode opératoire	107
3.5.3. Réaction d'oxydation : formation de ponts disulfures	107
3.6. Marquage de protéine contenant une cystéine à la fluorescéine	108
3.7. Activités biologiques des leucotoxines de <i>S. aureus</i>	108
3.7.1. Activité leucocytotoxique sur les polynucléaires humains	108
3.7.1.1. Préparation des polynucléaires humains	108
3.7.1.2. Analyse par cytométrie en flux	109
3.7.1.3. Analyse par spectrofluorimétrie	114
3.7.2. Activité hémolytique sur les hématies d'homme et de lapin	115
3.7.3. Cinétique d'hémolyse sur les hématies d'homme	116
CHAPITRE III : Etude du rôle de la partie N-terminale des leucotoxines LukS-PV/LukF-PV au cours de la formation du pore	117
A. Introduction	118
Article n°1 :	120
B. Discussion de l'article n°1	151
CHAPITRE IV : Stabilisation et purification d'hétérodimères biologiquement actifs de leucotoxines. Identification d'acides aminés en interactions.	157
A. Introduction	158
Article n°2 :	160
B. Discussion de l'article n°2	194
C. Conclusion - Perspectives	198
CHAPITRE V : Impact des calixarènes sur l'activité des leucotoxines	201
A. Introduction	202

B. Résultats.....	207
C. Discussion	213
Conclusion générale	217
Références bibliographiques	223
Annexe 1 : Homologous versus heterologous interactions in the bicomponent staphylococcal gamma-hemolysins pore <i>Biochemical Journal</i>.....	248
Annexe 2 : Staphylococcal leucotoxins: Tribute to Gianfranco Menestrina to their study <i>International Journal of Medical Microbiology</i>	249

Liste des figures et des tables

I. Figures

Chapitre I. Introduction

- Figure 1.1 :** Représentation schématique du mécanisme d'intoxication cellulaire par les toxines bactériennes dont la cible est intracellulaire. **p. 16**
- Figure 1.2 :** Principales étapes de la formation du pore par les PFTs. D'après Parker et Feil, 2005. **p. 18**
- Figure 1.3 :** Structure tridimensionnelle de la colicine Ia (code PDB : 1CII). **p. 20**
- Figure 1.4 :** Schéma de formation des pores par les colicines. D'après Lesieur et coll., 1997. **p. 22**
- Figure 1.5 :** Structure tridimensionnelle de la toxine diphtérique (code PDB : 1DDT). **p. 24**
- Figure 1.6 :** Structure tridimensionnelle de l'exotoxine A de *P. aeruginosa* (code PDB : 1IKQ). **p. 26**
- Figure 1.7 :** Structure tridimensionnelle de la δ -endotoxine insecticide Cry2Aa de *Bacillus thuringiensis* (code PDB = 1I5P). **p. 28**
- Figure 1.8 :** Structure tridimensionnelle de l'hémolysine E de *E. coli* (code PDB : 1QOY). **p. 30**
- Figure 1.9 :** Structure tridimensionnelle du monomère de la proaérolysine. **p. 34**
- Figure 1.10 :** Dimère de la proaérolysine d'*Aeromonas*, montrant les interactions des domaines N-terminaux. D'après Parker et Feil, 2005. **p. 36**
- Figure 1.11 :** Schéma du mode d'action de la toxine du charbon (Moayeri et Leppla, 2004). **p. 38**
- Figure 1.12 :** Structure tridimensionnelle de l'antigène de protection de la toxine du charbon code PDB : 1ACC). **p. 40**
- Figure 1.13 :** **A.** Modèle d'un pore de CDC. **p. 42**
B. Structure tridimensionnelle de la perfringolysine O de *Clostridium perfringens* (code PDB : 1PFO).
- Figure 1.14 :** Structure tridimensionnelle de la δ -endotoxine insecticide Cyt de *Bacillus thurigiensis* (code PDB : 1CBY). **p. 44**

Figure 1.15 :	Structure tridimensionnelle de la cytolysine de <i>Vibrio cholerae</i> (code PDB : 1XEZ).	p. 46
Figure 1.16 :	A. Structure tridimensionnelle du pore heptamérique formé par l' α -toxine de <i>S. aureus</i> (code PDB : 7AHL). B. Structure d'un monomère de l' α -toxine de <i>S. aureus</i> extraite de l'heptamère.	p. 50
Figure 1.17 :	Spectre d'action des leucotoxines de <i>S. aureus</i> .	p. 59
Figure 1.18 :	La famille des leucotoxines de Staphylocoque. Schéma des différentes combinaisons des gènes chromosomiques codants et leur fréquence.	p. 62
Figure 1.19 :	Structure tridimensionnelle de LukF-PV (code PDB : 1PVL).	p. 64
Figure 1.20 :	Alignement des séquences de l' α -toxine (α -HL), de la LPV, de LukE-LukD, de la γ -hémolysine de <i>S. aureus</i> , et de la leucocidine de <i>S. intermedius</i> .	p. 66
Figure 1.21 :	Structure tridimensionnelle de HlgB (code PDB : 1LKF).	p. 70
Figure 1.22 :	Structure tridimensionnelle de LukS-PV (code PDB : 15TR).	p. 71
Figure 1.23 :	Illustration du mode d'action des leucotoxines de <i>S. aureus</i> .	p. 74
 Chapitre II. Matériels et méthodes		
Figure 2.1 :	Le vecteur d'expression pGEX 6P-1.	p. 82
Figure 2.2 :	Principe de la mutagenèse dirigée selon le protocole Quick Change TM Mutagenesis Kit (Stratagene).	p. 92
Figure 2.3 :	Représentation schématique des différentes étapes conduisant à la purification des protéines mutées par la méthode des protéines de fusion.	p. 96
Figure 2.4 :	Schéma de principe d'un cytomètre en flux.	p. 110
 Chapitre IV. Stabilisation et purification d'hétérodimères biologiquement actifs de leucotoxines		
Figure 4.1 :	Structure tridimensionnelle de l'hétérodimère HlgA T28C~HlgB N156C, obtenue avec une résolution de 2,4 Å.	p. 197

Chapitre V. <i>Impact des calixarènes sur l'activité des leucotoxines</i>		
Figure 5.1 :	Structure chimique des calixarènes (CXXX) utilisés.	p. 202
Figure 5.2 :	Inhibition de l'hémolyse des GRL induite par 1 nM de γ -hémolysine par les CXXX-4, -6 et -8.	p. 204
Figure 5.3 :	Action des CXXX-6 et -8 sur la lyse des PNs induites par différentes leucotoxines (A-G) ou par un hétérodimère de leucotoxine HlgA T28C~HlgB N156C (H), par cytométrie en flux.	p. 206
Figure 5.4 :	Impact du lavage des PNs sur l'inhibition de l'activité de la γ -hémolysine par les CXXX.	p. 210
Figure 5.5 :	Inhibition de la fixation de LukS-PV* et de HlgB* par des concentrations croissantes de CXXX-6.	p. 212
Figure 5.6 :	Inhibition de l'activité pro-inflammatoire de la LPV par le CXXX-6 après injection dans le vitré de lapin.	p. 214

II. Tables

Chapitre I. *Introduction*

Table 1.1 :	Caractéristiques biochimiques des leucotoxines à deux composés.	p. 57
--------------------	---	--------------

Chapitre V. *Impact des calixarènes sur l'activité des leucotoxines*

Table 5.1 :	Concentrations (μ M) de CXXX nécessaires pour obtenir une inhibition complète de l'activité des leucotoxines.	p. 208
Table 5.2 :	Intensité de la réponse inflammatoire observée au niveau de l'œil de lapin après injection intra-vitréenne de toxine sans et avec CXXX-6.	p. 208

Abréviations

A :	Absorbance
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ARN :	Acide ribonucléotidique
AS :	Sulfate d'Ammonium
ATP :	Adénosine triphosphate
Bet :	Bromure d'éthidium
CaCl ₂ :	dichlorure de calcium
CNDB :	Chloro-1, 2, 4 dinitrobenzène
DEAE :	Diethylamino éthanol
ddNTP :	didésoxynucléotide triphosphate
dNTP :	désoxynucléotide triphosphate
Dpn I :	Endonucléase de restriction <i>D pneumoniae</i>
DTDP :	DiThioDiPyridine
DTNB :	5-5' DiThio 2 NitroBenzène
DTT :	Dithiothréitol
EDTA :	Ethylène diamino tétra acétique acide
EGTA :	Ethylène glycol-bis (β-amino éthyl éther) N, N, N', N' tétracetate
FPLC :	Fast Protein, peptide and polynucleotide Liquid Chromatography
FSC:	Forward Scatter
GR :	Globule Rouge
GRH:	Globules rouges humain
GRL:	Globules rouges humains
GSH:	Gluthation réduit
GST :	Gluthation S-Transférerase
HEPES :	N-[2-hydroxyéthyl] pipérazine-N'-[2-ethanesulfonate]
<i>hlg</i> :	Locus codant la γ-hémolysine

HlgA :	Composé de classe S de la γ -hémolysine
HlgB :	Composé de classe F de la γ -hémolysine
IPTG :	Isopropyl- β -D-thiogalactoside
kB :	Kilobase
kDa :	Kilodalton
LPV :	Leucocidine de Panton et Valentine
<i>luk-PV</i> :	Locus codant pour la LPV
LukF-PV :	Composé de classe F de la LPV
LukS-PV :	Composé de classe S de la LPV
LTB4 :	Leucotriène B4
MOPS :	Morpholino propane sulfonate
NaCl :	Chlorure de sodium
PA :	Protective Antigen de <i>Bacillus anthracis</i>
PAGE :	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
PEG :	Polyéthylèneglycol
PFO :	Perfringolysine O
PFT :	Pore-Forming Toxin
PN :	Polynucléaires neutrophiles
PBS :	Phosphate Buffered Saline
RNase :	Ribonucléase
SDS-PAGE :	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
SSC :	Side Scatter
SDS :	Sodium dodécyl sulfate
TE :	Tris EDTA
TEB :	Tris-borate-EDTA
TEMED :	N, N, N', N'-tétraméthyl éthylène diamine
Tris :	Tris (hydroxyméthyl) aminométhane
TY Amp :	Tryptone Yeast-Ampicilline
VCC :	<i>Vibrio cholerae</i> cytotoxin

CHAPITRE I – INTRODUCTION

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) est une bactérie à Gram positif appartenant à la famille des *Micrococcaceae* (Avril et coll., 1992). C'est une espèce saprophyte, ubiquiste et présente chez l'homme à l'état commensal. Vingt-cinq à 50 % des individus sont des porteurs sains de celle-ci dans leurs fosses nasales, leur flore cutanée ou muqueuse. Avec *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* est la bactérie la plus fréquemment isolée dans les prélèvements à l'hôpital. A l'occasion d'une rupture de la barrière cutanéomuqueuse ou d'une rupture d'équilibre entre la bactérie et l'hôte, elle peut coloniser les organes profonds tels que les os, les valves cardiaques, les poumons, le liquide céphalo-rachidien, etc.... Elle est la deuxième responsable d'infections nosocomiales (après *E. coli*) et la multirésistance de nombre de ses souches aux différentes familles d'antibiotiques est une cause d'échecs thérapeutiques et de morbidité en milieu hospitalier. Cependant, des souches résistantes d'origine communautaire sont de plus en plus fréquentes.

En se multipliant, *S. aureus* exprime sa pathogénicité en sécrétant des facteurs d'adhésion et plus de quarante composés toxiques classés comme des superantigènes, des toxines formant des pores, des protéases plus ou moins spécialisées et des toxines ADP-ribosylantes (Prévost, 2005). Les toxines formant des pores ou « Pore-Forming Toxins » suscitent un grand intérêt du fait de leur mode d'action complexe et des réponses cellulaires associées. La détermination de leurs structures tridimensionnelles permet l'étude approfondie de leur mode d'action et la comparaison de leur micro-évolution, conduisant à l'explication de leurs spécificités. Nous présenterons tout d'abord dans la revue qui suit cette famille des « Pore-Forming Toxins » et en second lieu, nous nous attacherons à décrire plus avant les leucotoxines de *S. aureus*.

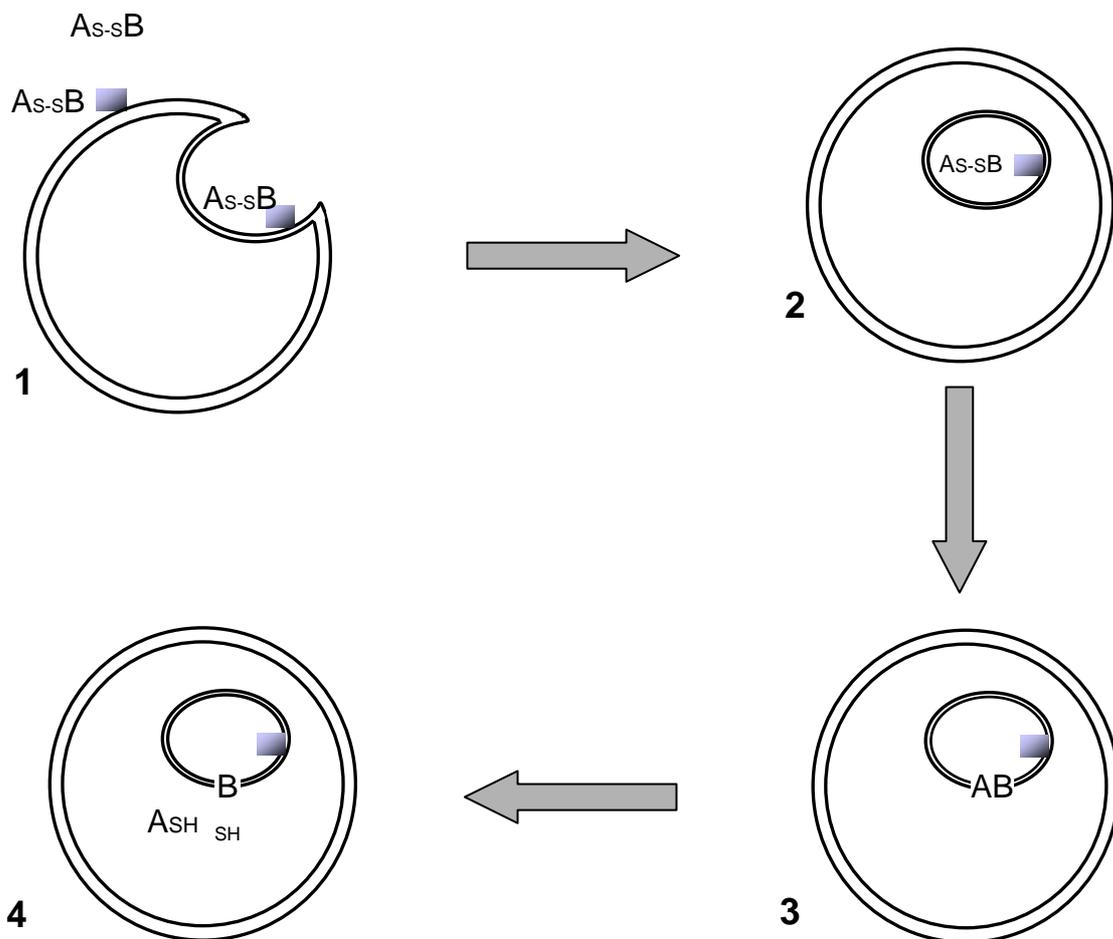


Figure 1.1 : Représentation schématique du mécanisme d'intoxication cellulaire par les toxines bactériennes dont la cible est intracellulaire. Ce mécanisme peut être divisé en quatre étapes :
 (1) Fixation à la cellule par le protomère B qui reconnaît un élément protéique ou lipidique de la surface cellulaire,
 (2) Ensuite, internalisation par endocytose,
 (3) Afin d'atteindre le cytosol, la sous-unité A catalytique doit traverser la membrane de la vésicule,
 (4) La sous-unité A accomplit son activité catalytique sur sa cible spécifique, induisant l'intoxication cellulaire.

A. LES TOXINES FORMANT DES PORES

Les toxines cytolytiques sont produites par de nombreux organismes vivants : bactéries, certains insectes, des reptiles venimeux et des invertébrés marins piqueurs. Ces toxines, en tant qu'armes « offensives », peuvent conduire à la digestion et à la dégénérescence de l'hôte tandis qu'en tant qu'armes « défensives », elles protègent en détruisant les cellules de la défense passive ou active de l'hôte (Parker et Feil, 2005). Ces toxines doivent être sécrétées en tant que protéines hydrosolubles. Une fois leur cible atteinte, elles deviennent des protéines membranaires.

Plus de 330 toxines bactériennes sont identifiées à ce jour, et un tiers restent à la surface cellulaire pour modifier l'intégrité membranaire (Alouf, 2005). La plupart forment des pores, détruisent la barrière de perméabilité et conduisent éventuellement à la mort cellulaire. Les autres expriment leur toxicité en activant ou neutralisant les voies de transduction du signal.

Les toxines dont la cible finale est intracellulaire (enzymes,...) doivent traverser la membrane pour atteindre leurs cibles cytosoliques, c'est la translocation (**Figure 1.1**). Ces toxines sont composées de 2 protomères, A (partie active) et B (partie qui va reconnaître la cible cellulaire) qui suffisent à leur activité cytotoxique en 4 étapes : 1) le protomère B se lie aux récepteurs (lipidiques ou protéiques) situés à la surface cellulaire ; 2) le complexe toxine-récepteur est ensuite internalisé dans les compartiments intracellulaires ; 3) elles doivent ensuite pénétrer dans le cytosol pour atteindre leurs cibles – elles le font grâce à la translocation du domaine A à travers la membrane intracellulaire à l'aide du protomère B ; 4) le domaine A peut ainsi cheminer en modifiant enzymatiquement des cibles spécifiques, critiques pour le métabolisme cellulaire (Rossetto et coll., 2000).

1. Les différentes classes de toxines bactériennes formant des pores

Les toxines formant des pores ou Pore-Forming Toxins (PFTs) peuvent être classées de différentes manières, selon l'organisme qui les produit ou selon certaines caractéristiques spécifiques nécessaires à leur activité. On peut également les classer selon leur structure :

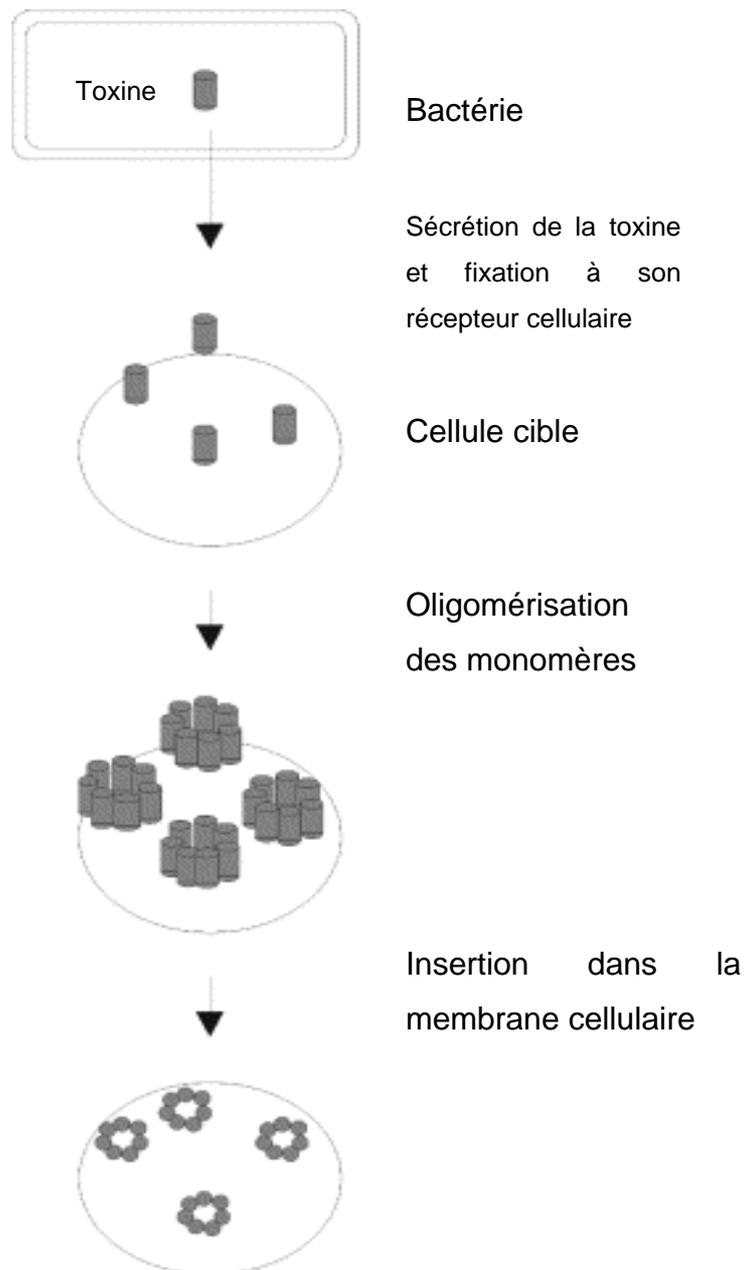


Figure 1.2 : Principales étapes de la formation du pore par les PFTs. D’après Parker et Feil, 2005.

- Les α -PFTs qui forment des pores avec des hélices hydrophobes et amphipathiques
- Les β -PFTs dont le repliement en brins β conduit à la formation de pores appelés tonneaux β .

Ces toxines sont souvent sécrétées sous forme de monomères (Lesieur et coll., 1997). Cette étape peut être accomplie de différentes manières : la proaérollysine semble être sécrétée par un système complexe de sécrétion protéique (Howard et coll., 1996) tandis que les colicines sont sécrétées à l'aide de porines situées dans la membrane externe de la bactérie productrice (Lakey et Slatin, 2001). Les toxines sont ensuite dirigées vers la cellule cible par un motif présent à la surface cellulaire (protéine par ex) jouant le rôle de récepteur. De nombreux changements conformationnels sont nécessaires pour que la protéine expose ses groupements hydrophobes, afin que ces protéines hydrosolubles puissent interagir avec la membrane. Les monomères se concentrent à la surface cellulaire grâce au récepteur (**Figure 1.2**). Ceci conduit la plupart du temps à une oligomérisation à la surface cellulaire. Certaines toxines toutefois s'oligomérisent une fois associées/insérées dans la membrane (Parker et Feil, 2005). Les pores sont formés par l'insertion transmembranaire d'une structure présentant une surface hydrophobe. Ces monomères peuvent être identiques comme pour l' α -toxine de *S. aureus*, ou hétérologues comme dans le cas des leucotoxines sécrétées par la même bactérie.

1.1. Les toxines à hélices α

A première vue, ces α -PFTs ont peu en commun, hormis leur structure secondaire en hélice α . Les organismes producteurs et les cellules-cibles sont différents. Les colicines d'*Escherichia coli* et la δ -endotoxine insecticide de *Bacillus thuringiensis* lysent les cellules en formant un canal dans la membrane plasmique. La toxine diphtérique de *Corynebacterium diphtheriae* et l'exotoxine A de *Pseudomonas aeruginosa* ADP-ribosylent, après la translocation d'une sous-unité dans la cellule, le facteur d'élongation EF-2 impliqué dans la synthèse protéique. Néanmoins, elles ont beaucoup de similitude dans leur manière de former le pore (Parker et Pattus, 1993; Parker et Feil, 2005). Elles sont associées en faisceaux de 6 à 10 hélices α disposées en 3 couches. Chaque couche est formée d'au moins deux hélices antiparallèles. Ces faisceaux constituent une forme hydrosoluble de repliement pour les hélices hydrophobes et

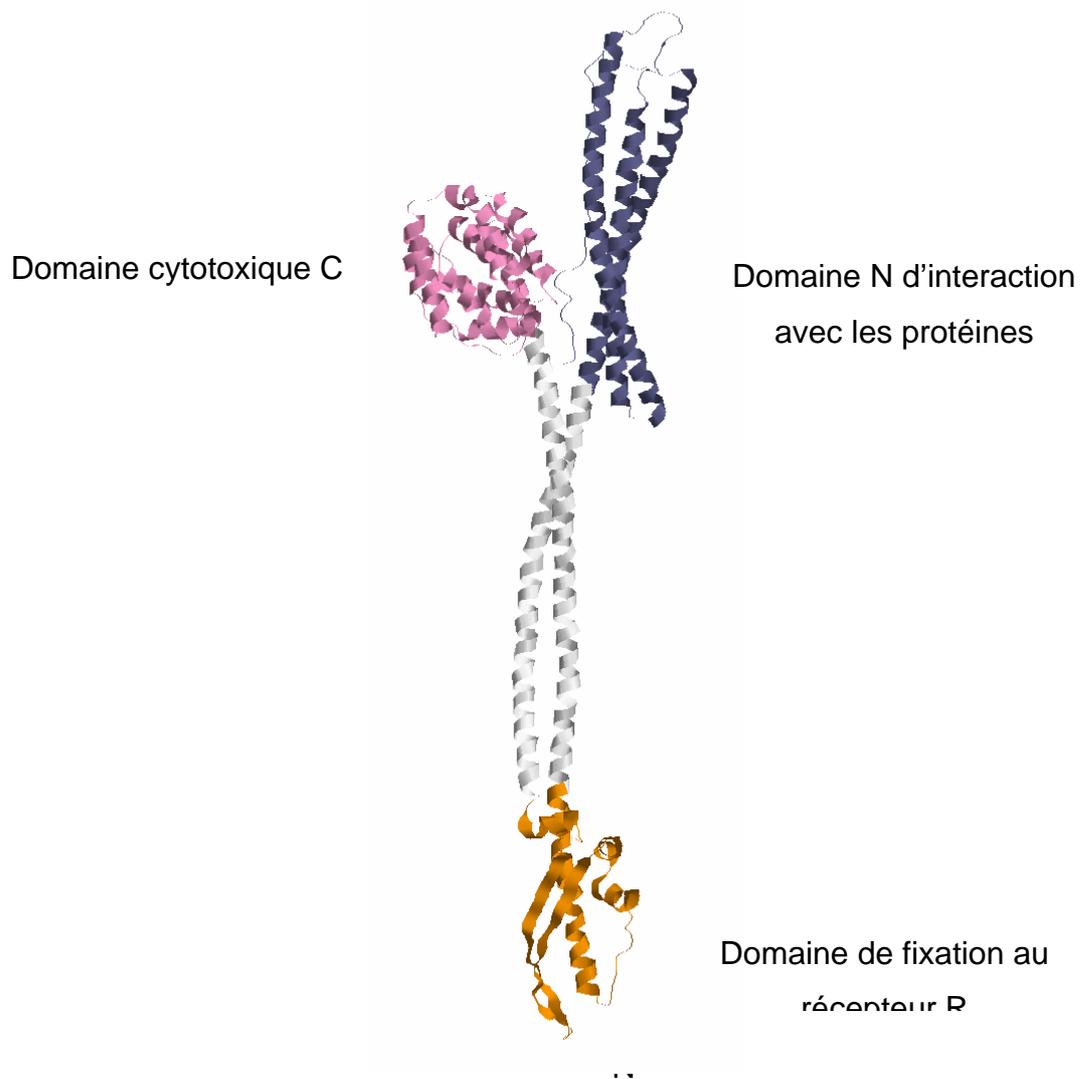


Figure 1.3 : Structure tridimensionnelle de la colicine Ia (code PDB : 1CII).

amphipathiques qui sont ultérieurement utilisées pour l'insertion membranaire de la toxine. La plupart des α -PFTs fonctionnent mieux à bas pH, conditions rencontrées au voisinage de membranes contenant des lipides négativement chargés (Jiang et London, 1990; van der Goot et coll., 1992). Malgré ces points communs, elle n'ont pas d'identité de séquence entre elles. La conversion de la forme hydrosoluble à celle en interaction avec la membrane nécessite d'importants changements conformationnels qui ne sont pas encore totalement compris. Néanmoins, il apparaît que la première étape consiste en un déploiement des hélices hydrophobes à l'intérieur de la bicouche lipidique.

1.1.1. Les colicines d'*E. coli*

Les colicines sont des molécules antibiotiques produites par différentes souches d'*E. coli*. Elles agissent sur d'autres souches, mais aussi sur des bactéries d'espèces voisines comme *Shigella* et *Salmonella* (Lakey et Slatin, 2001). Les colicines sont exprimées en grande quantité dans le milieu extracellulaire avec l'aide d'une protéine codée par un plasmide qui lyse la membrane externe de la cellule productrice. Les cellules contenant ce plasmide sont protégées de leur propres colicines par une protéine codée par le même plasmide (Slatin et Kienker, 2003). Les colicines se lient d'abord aux récepteurs protéiques de la membrane externe de la cellule cible. Elles sont transportées dans le périplasma en pénétrant par les systèmes bactériens de translocation Tol ou Ton. Une fois dans l'espace périplasmique, les colicines peuvent agir de diverses manières. Elles peuvent dépolariser la membrane cytoplasmique en formant des pores, entrer dans le cytoplasme et inhiber la synthèse protéique ou agir comme DNase ou RNase (Parker et Feil, 2005).

Les colicines sont classées en deux groupes distincts, selon qu'elles utilisent la voie Tol (Groupe A, colicines A, N, E1, K, E2-E9) ou la voie Ton (Groupe B, avec les colicines B, Ia, Ib, D, M, V, 10, 5) (Parker et Feil, 2005). Les colicines sont composées de 3 domaines : le domaine R qui se lie au récepteur de la membrane externe de la cellule-cible, le domaine N, situé à la partie N-terminale interagit avec des protéines périplasmiques, et le domaine C situé en C-terminal porte, quant à lui, la toxicité cellulaire (Slatin et Kienker, 2003) (**Figure 1.3**). Ce dernier domaine est très variable d'une colicine à l'autre. Il présente des homologies avec de nombreuses protéines, notamment la famille Bcl-2 des protéines apoptotiques (Muchmore et

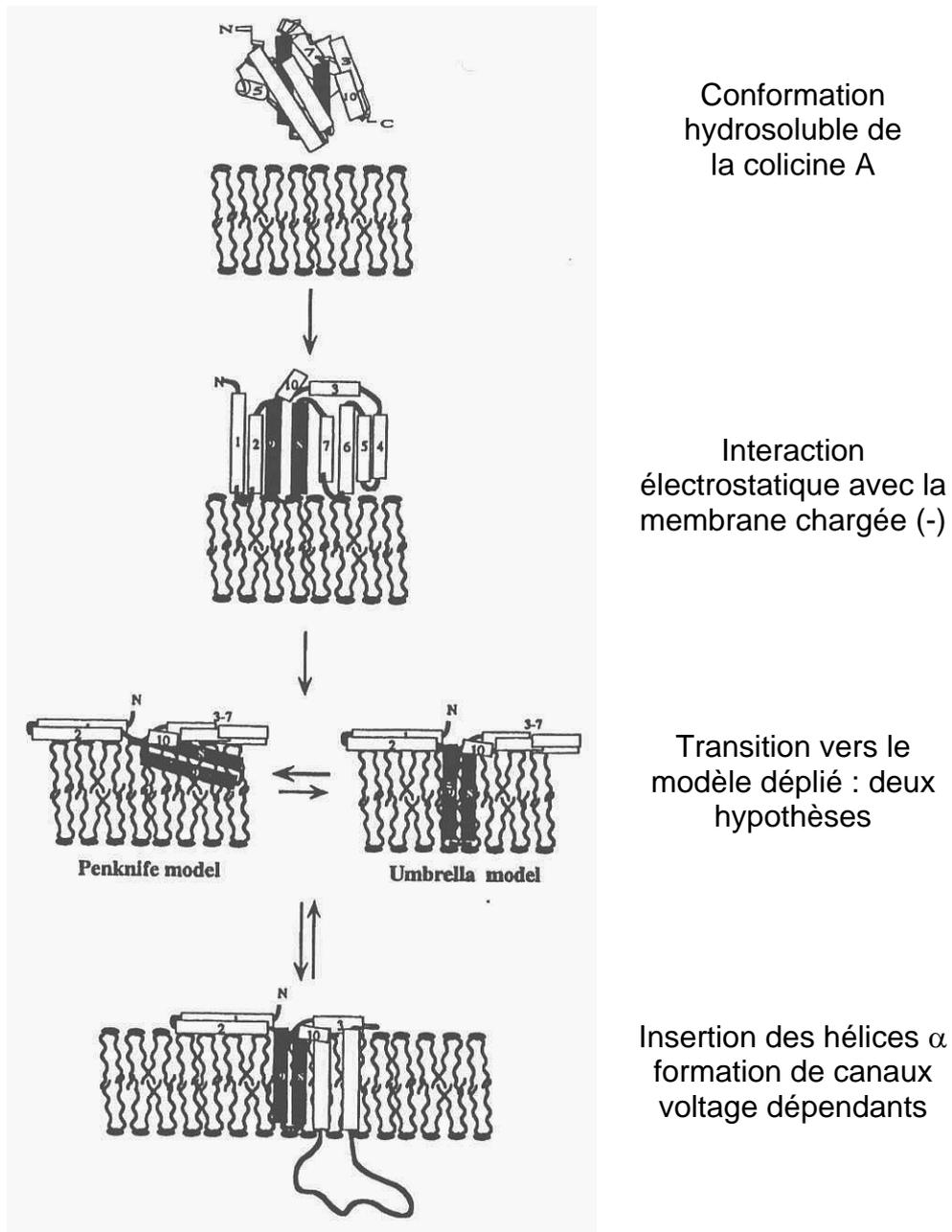


Figure 1.4 : Schéma de formation des pores par les colicines. D'après Lesieur et coll., 1997.

coll., 1996), les δ -endotoxines et aussi la toxine diphtérique (Choe et coll., 1992). C'est lui qui définit la manière dont la toxine va agir, soit enzymatique, soit par la formation d'un pore. Dans le dernier cas, la mort cellulaire est due à une perte d'ions et de petits métabolites à travers ce pore.

D'une forme hydrosoluble, les hélices doivent se reconfigurer pour que des zones hydrophobes interagissent avec les lipides de la membrane (**Figure 1.4**). Avant que la structure de la colicine ne soit résolue, on pensait que seules les hélices 8 et 9 jouaient un rôle (Cleveland et coll., 1983). Des expériences de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) suggèrent le modèle du « parapluie » : alors que les hélices amphipathiques s'étalent en surface de la membrane, les hélices 8 et 9 s'insèrent perpendiculairement à ce plan (Parker et coll., 1990). Cependant, des travaux ultérieurs suggèrent plutôt le modèle du canif (« penknife ») où les hélices 8 et 9 s'insèrent parallèlement (Lakey et coll., 1993). Ce dernier modèle a été confirmé par l'utilisation de cystéines permettant de créer des ponts disulfures, des liaisons covalentes entre des hélices adjacentes dans la structure cristallisée (Duché et coll., 1994). Hélas, les différentes équipes n'ont pas utilisé les mêmes colicines et les mêmes compositions lipidiques membranaires, rendant ainsi difficiles les comparaisons (Slatin et Kienker, 2003). De nombreux mystères demeurent au sujet de cette toxine : par exemple, la taille du pore est beaucoup trop importante pour la quantité de protéine disponible sur la membrane. De nombreuses études suggèrent que le pore de 10 Å de diamètre est formé par un seul monomère (Parker et Feil, 2005). Est-il possible, qu'à l'instar des équinatoxines (Anderluh et coll., 2003), elles forment un pore constitué de lipides et de protéines (Zakharov et coll., 2004) ? De plus, la même quantité de protéine constitue une voie de translocation protéique, de taille supérieure au pore ionique (Slatin et Kienker, 2003).

1.1.2. La toxine diphtérique

La toxine diphtérique est une protéine de 535 résidus sécrétée par une *Corynebacterium diphtheriae* infectée par un phage qui porte le gène de la toxine. Elle détruit les cellules des mammifères en transférant la partie adénosine diphosphate ribose du NAD sur le facteur d'élongation 2 (« elongation factor 2 » ou EF-2) (Honjo et coll., 1969). Cela inactive ce facteur impliqué dans la synthèse protéique (Collier, 1975). Il apparaît qu'une seule molécule de toxine

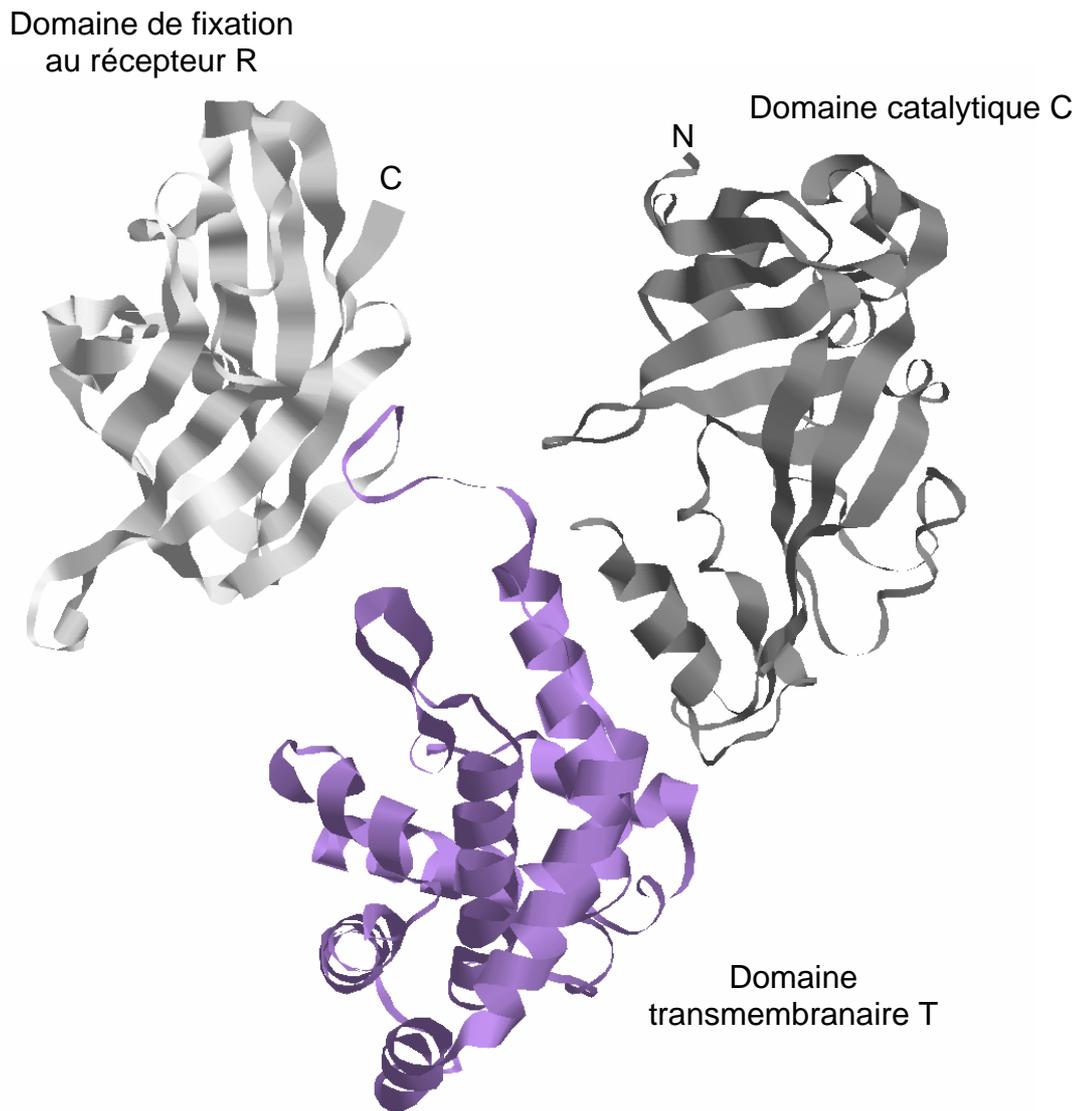


Figure 1.5 : Structure tridimensionnelle de la toxine diphtérique (code PDB : 1DDT).

est suffisante pour tuer une cellule, ce qui fait de la toxine diphtérique l'une des plus toxiques de la nature (Yamaizumi et coll., 1978). Elle est sécrétée sous une forme inactive et son activation par protéolyse permet à la toxine de passer dans le cytosol de la cellule cible.

Les premières données cristallographiques (Choe et coll., 1992) révèlent 3 parties (**Figure 1.5**). Pour la partie N-terminale, le domaine catalytique C est en forme de haricot constitué d'hélices et de feuillet β . Le domaine C induit l'ADP-ribosylation du facteur d'élongation EF-2, stoppant ainsi complètement la synthèse protéique et détruisant la cellule. Le domaine central T, entièrement composé d'hélices alpha, est le domaine de translocation membranaire. L'activation de la toxine est provoquée par la protéolyse d'une boucle reliant les domaines C et T. C'est la furine endosomale qui entraîne son clivage. La furine est une endoprotéase présente à la surface cellulaire et dans les compartiments endosomaux (Gordon et coll., 1995). Le domaine C peut désormais pénétrer le cytosol et catalyser le transfert de l'ADP-ribose du NAD vers le facteur d'élongation EF-2, ce qui inhibe la synthèse protéique. En C-terminal, le domaine R a une forme de tonneau β . C'est un domaine de liaison au récepteur et une boucle bêta (résidus 514-525) semble être importante dans cette liaison au récepteur (Shen et coll., 1994). Ce dernier a été identifié comme étant le précurseur de « l'heparin-binding epidermal growth factor-like » et sa liaison induit l'endocytose (Parker et Feil, 2005).

L'insertion du domaine T dans la membrane de l'endosome est déclenchée par un changement conformationnel pH-dépendant, environ 5,0. Ceci induit une augmentation de l'hydrophobicité de la toxine et une capacité de former des canaux ioniques. Le rôle de ces canaux dans la translocation de la toxine demeure obscur.

1.1.3. La delta hémolysine de *S. aureus*

La delta hémolysine staphylococcique est une alpha hélice de 26 aminoacides qui s'associe en octamères (Dufourcq et coll., 1999) ou en trimères (Pokorny et coll., 2002) à la surface membranaire. Chaque monomère a une structure amphipatique, ce qui permet des interactions avec les phospholipides pendant la formation du pore. Cette toxine lyse un large spectre de cellules sanguines ainsi que certaines vésicules synthétiques de préférence aux bactéries. Les peptides cytolytiques des différents organismes portent en général une charge nette positive à

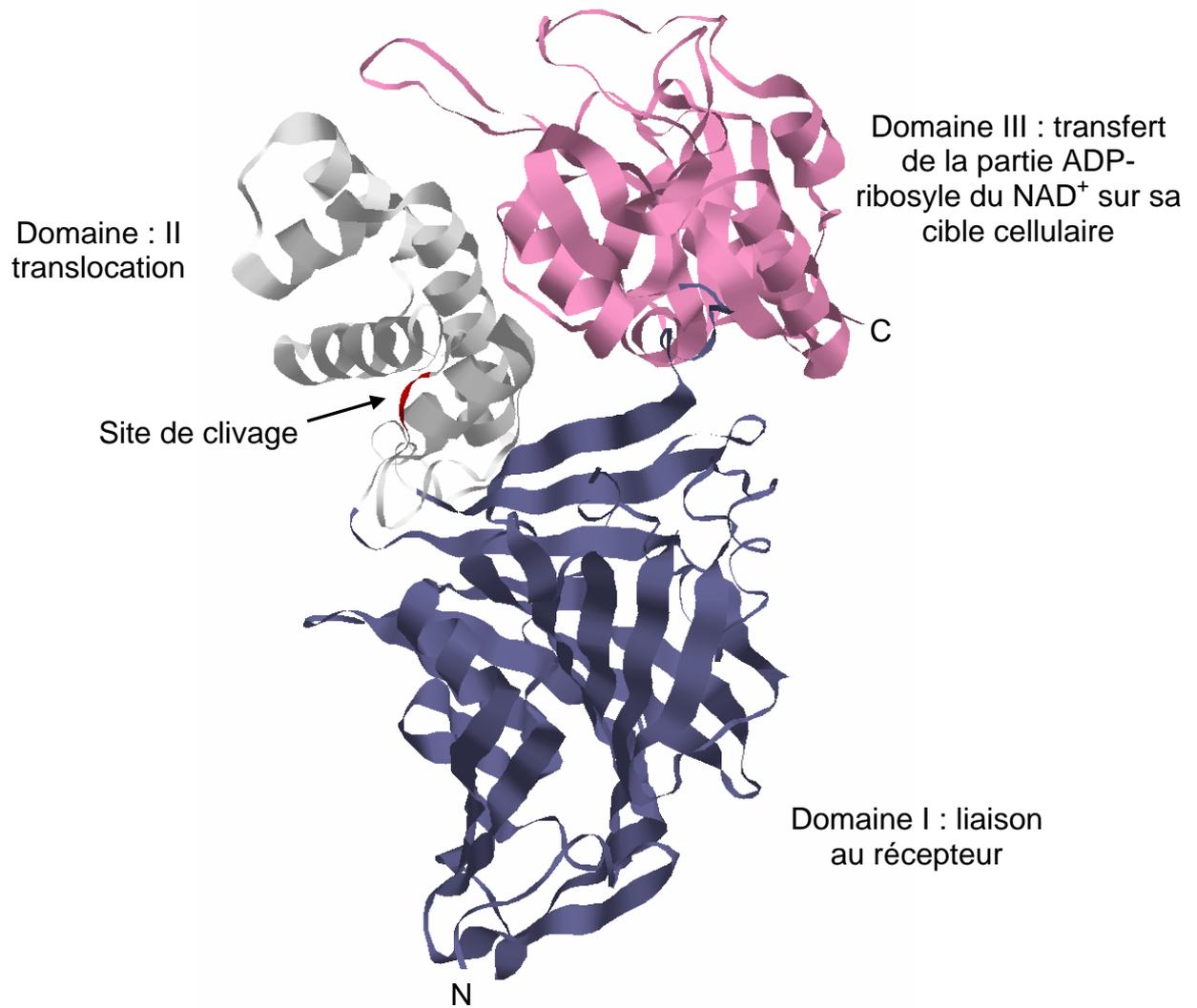


Figure 1.6 : Structure tridimensionnelle de l'exotoxine A de *P. aeruginosa* (code PDB : 1IKQ).

pH neutre. La δ -hémolysine est particulière dans le sens où, à pH neutre, elle ne porte aucune charge, ce qui facilite son agrégation en solution aqueuse (Pokorny et coll., 2002). Une charge nette positive est nécessaire à la toxine pour se lier à la membrane négativement chargée des bactéries. L'absence de charge nette de la toxine peut expliquer son inactivité contre nombre de bactéries (Pokorny et coll., 2002). La δ -hémolysine est produite en fin de phase exponentielle et le gène codant son expression fait partie du locus *agr* (accessory gene regulator) (Peng et coll., 1988), dont l'expression dépend essentiellement de la concentration extracellulaire en molécules signaux, comme des petits peptides. Le niveau d'expression, dépendant d'un facteur de régulation, n'est jamais élevé (Prévost et coll., 2005). Cependant, l'absence d'expression d'*agr* peut conduire à une résistance aux antibiotiques, lié généralement à une perte de virulence (Sakoulas et coll., 2002; Schwan et coll., 2003).

1.1.4. L'exotoxine A de *P. aeruginosa*

L'exotoxine A de *Pseudomonas aeruginosa* est une toxine de 66 kDa. Ce facteur de virulence est sécrété en réponse à un environnement pauvre en fer (Frank et Iglewski, 1988). Elle agit comme un inhibiteur de la synthèse protéique. *In vivo*, la translocation de la toxine suit les étapes suivantes. Tout d'abord, elle lie le récepteur de l' α 2-macroglobuline des cellules eucaryotes et est ensuite internalisée dans les endosomes. A faible pH, la toxine change sa conformation et découvre un site de clivage accessible à la furine. Cette dernière hydrolyse la protéine entre l'arginine 279 et la glycine 280. La réduction du pont disulfure entre les cystéines 265 et 287 est également indispensable à l'activité de la toxine (Wedekind et coll., 2001). La partie carboxy-terminale de 37 kDa est dirigée via le réticulum endoplasmique dans le cytoplasme où le domaine catalytique ADP-ribosyle le facteur d'élongation EF-2 (Wedekind et coll., 2001).

Elle est composée de 3 domaines (**Figure 1.6**). Le domaine I est constitué de 13 brins β et forme le domaine de liaison au récepteur. Le domaine III, responsable du transfert de la partie ADP-ribosyle du NAD^+ sur sa cible cellulaire, possède des repliements α et β . Le domaine II, central, est composé de 6 hélices α et est impliqué dans la translocation membranaire par un mécanisme qui demeure inconnu à ce jour (Wedekind et coll., 2001). On peut penser que le

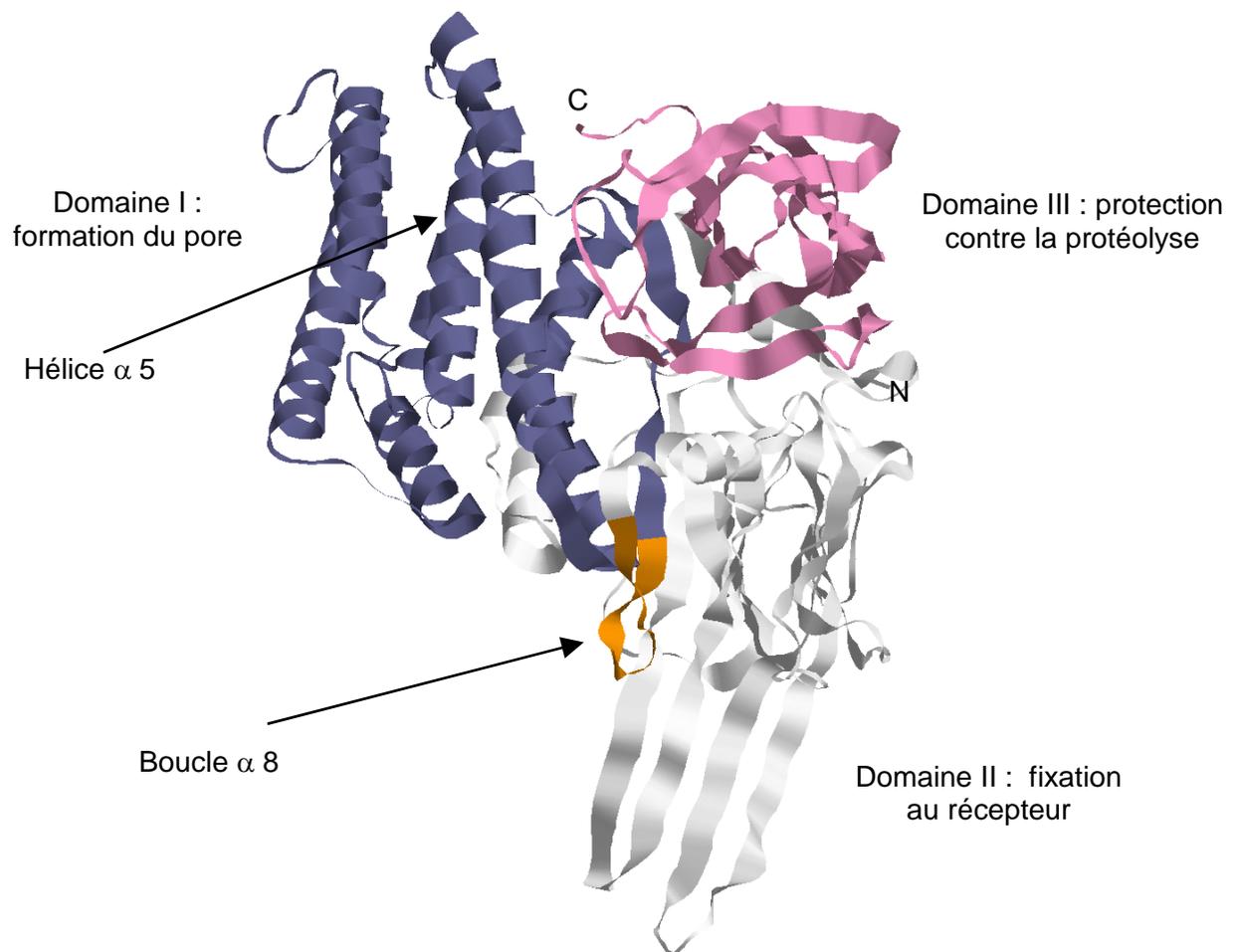


Figure 1.7 : Structure tridimensionnelle de la δ -endotoxine insecticide Cry2Aa de *Bacillus thuringiensis* (code PDB : 1I5P).

domaine II de l'exotoxine A se déplie de la même manière que les autres α -PFTs en exposant la partie hydrophobe de ces hélices amphipatiques à la membrane (Parker et Feil, 2005).

1.1.5. δ -endotoxine insecticide Cry

Durant la sporulation, *Bacillus thuringiensis* consacre plus de 30% de ses protéines cellulaires à synthétiser des protéines insecticides appelées δ -endotoxines (Cry et Cyt). Elles forment des corps d'inclusion qui sont libérés par la lyse cellulaire à la fin de la sporulation. Une fois ingérés par les insectes, les corps d'inclusions se dissolvent dans l'intestin et les protéases de l'insecte activent les toxines qui vont former des pores. Elles induisent la lyse cellulaire menant à la septicémie ou à la mort par inanition. Ces toxines revêtent donc un intérêt majeur dans l'industrie de biopesticides. Les toxines Cry représentent actuellement une famille de 89 membres. Elles sont synthétisées sous forme de protoxines de 70 kDa ou 130 kDa et leurs formes actives ont une masse moléculaire de 66 kDa. L'étape principale est la fixation de la toxine à ses récepteurs. Ces derniers sont soit des N aminopeptidases avec un « pied » glycosylphosphatidylinositol (Gill et coll., 1995), soit des cadhérines (Gomez et coll., 2002). La fixation au récepteur cadhérine est nécessaire à l'activation de la toxine (Gomez et coll., 2002), événement essentiel pour l'agrégation de la toxine et la formation du pore (Xie et coll., 2005). L'activité se situe dans la partie N-terminale. Elles sont classées en fonction de leur séquence et de leur cible : les toxines de la classe Cry1 sont spécifiques des lépidoptères, Cry2 des lépidoptères et des diptères, Cry3 des coléoptères et Cry4 des diptères. Les toxines Cry forment des pores dans la membrane de 10-20 Å de diamètre (Parker et Feil, 2005).

Elles sont composées de 3 domaines (**Figure 1.7**). Le domaine I, en N-terminal, est un faisceau de 7 hélices où l' $\alpha 5$ est très conservée et occupe un domaine central entouré par les autres hélices. Il s'agit de la partie impliquée dans la formation du pore. Le domaine II est composé de 3 feuilletts β anti-parallèles. Il porte la spécificité d'action (Soberon et coll., 2003). En effet, la boucle α -8 du domaine II paraît essentielle à la fixation de Cry11Aa sur la cellule-cible (Fernandez et coll., 2005). Le domaine III est impliqué dans la spécificité, mais aussi dans la protection contre la protéolyse à l'intérieur de l'intestin (Soberon et coll., 2003).

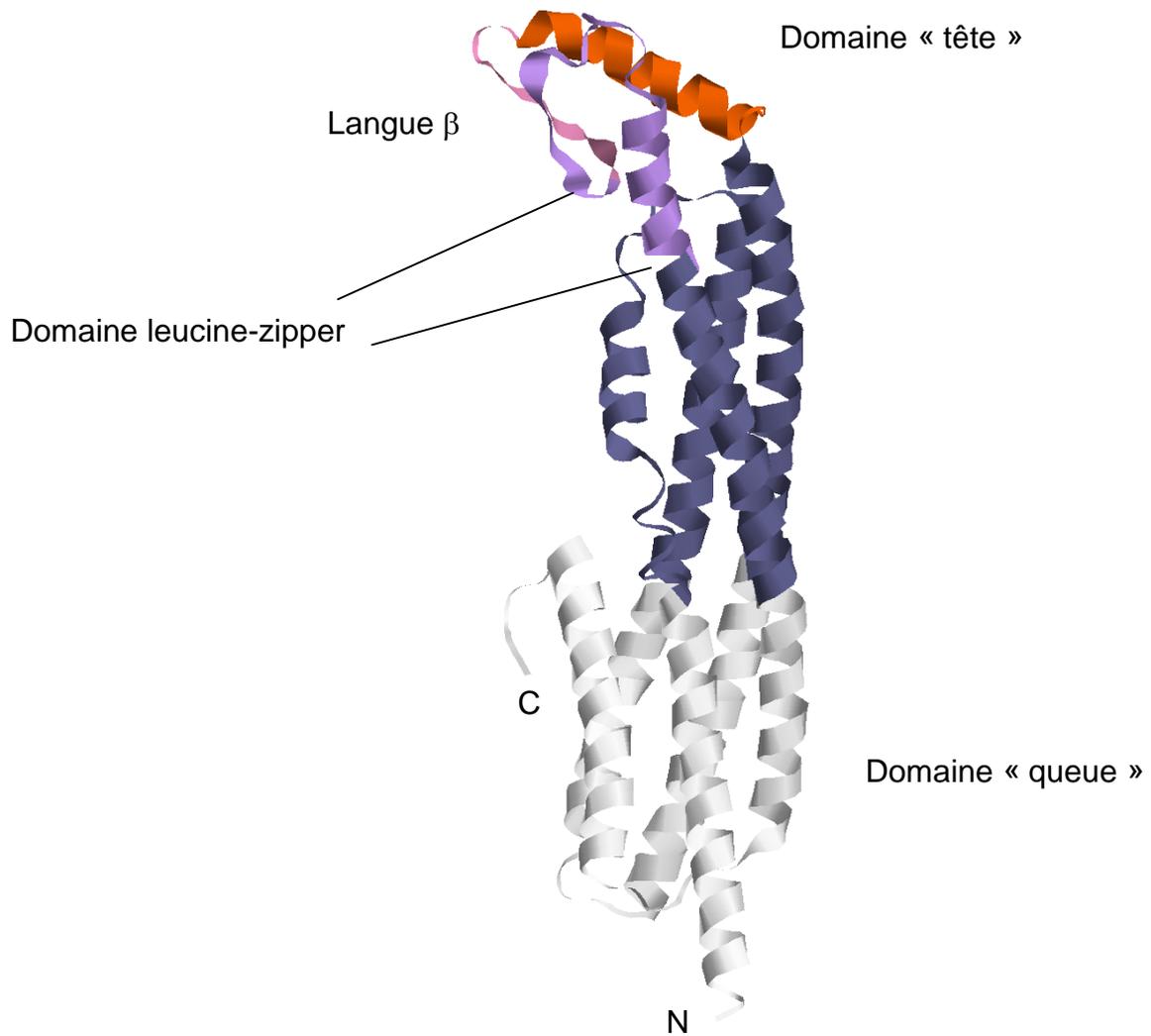


Figure 1.8 : Structure tridimensionnelle de l'hémolysine E de *E. coli* (code PDB : 1QOY).

Deux modes d'action de la δ -endotoxine ont été proposés. Le modèle « canif » et le modèle du « parapluie », à l'instar de la colicine A (**Figure 1.4**). Le modèle canif propose l'insertion de la boucle β dans la membrane du côté du domaine I, parallèlement à la membrane, ce qui implique un minimum de réarrangements structuraux du reste du domaine I. Cependant, les études faites sur les mécanismes d'action de la toxine correspondent mieux au modèle « parapluie ». Après la liaison au récepteur, le domaine I pivote, s'oligomérisse et se lie à la membrane. Il s'ensuit un important réarrangement conformationnel, durant lequel la boucle β formée par un motif hélice-boucle-hélice (α 4-boucle- α 5) s'enfonce dans la membrane. Les autres hélices du domaine 1 s'étalent à la surface de la membrane, tout comme les baleines d'un parapluie (Gerber et Shai, 2000, , 2003).

1.1.6. L'hémolysine E de *E. coli* – une nouvelle PFT

Une toxine de *Escherichia coli* a été découverte et nommée hémolysine E (HlyE) (Ludwig et coll., 1995). Elle possède des analogues chez *Salmonella* et *Shigella* (Wallace et coll., 2000). C'est une protéine de 34 kDa qui forme des pores de 30 Å de diamètre dont la sélectivité est faiblement cationique (Oscarsson et coll., 1999). Cristallisée par Wallace et coll en 2000, sa forme hydrosoluble révèle une molécule riche en hélices (**Figure 1.8**). Le cœur de la molécule est constitué d'un faisceau de 4 hélices, chacune mesurant 80-90 Å. A une extrémité, l'ajout d'une hélice de 35 Å (α_G) constitue un faisceau de 5 hélices : la « queue ». L'ajout d'une boucle β forme la « langue β ». A l'autre extrémité, le faisceau de 4 hélices est encadré par deux courtes hélices : la « tête ». La structure globale ne ressemble à aucune autre protéine, mise à part les très longues hélices qui peuvent rappeler les hélices de 200 Å de la colicine Ia. La « langue β » est supposée prendre part à la région transmembranaire, alors que le domaine de « queue » jouerait un rôle dans la stabilisation du pore oligomérique en découvrant une face hydrophobe quand l'hélice α_G s'éloigne du corps de la protéine (Wallace et coll., 2000).

La microscopie électronique montre que l'hémolysine E forme un pore de diamètre de 50 Å. Il est constitué de 8 protomères. De nombreuses questions restent ouvertes : comment la toxine régule son activité ? Wai et coll. (Wai et coll., 2003), montrent que HlyE est exportée depuis

les bactéries via des vésicules de la membrane externe dans lesquelles la toxine est déjà dans un état de pore oligomérique. Quelle structure adopte la « langue β » dans la membrane ? Sa classification en α -PFT est basée sur l'hypothèse que l'hélice C-terminale α_G forme le pore (Atkins et coll., 2000). Il apparaît peu probable que la « langue β » puisse former un tonneau β transmembranaire typique des β -PFTs. De plus, il n'y a pas, le long de la protéine, d'alternance de résidus hydrophile/hydrophobe nécessaire à la formation de brins β transmembranaires typiques des β -PFTs (Wallace et coll., 2000). Un motif « leucine-zipper » a été récemment identifié et caractérisé (aminoacide 205-234) (Yadav et coll., 2003). Il jouerait un rôle important dans la fixation et l'assemblage de la toxine sur la membrane de la cellule-cible. Il serait également impliqué dans la destruction de cette membrane (Yadav et coll., 2003).

1.2. Les toxines à brin β

Ce groupe inclut par exemple l'aérolysine d'*Aeromonas hydrophila*, la cytolysine de *Vibrio cholerae* les leucotoxines de *Staphylococcus aureus* et de *Clostridium septicum*, la cytotoxine de *Pseudomonas aeruginosa* ; les toxines se liant au cholestérol comme la streptolysine O, la perfringolysine O, la pneumolysine ; la δ -endotoxine insecticide Cyt B de *Bacillus thuringiensis*. Cette famille inclut également les sous-unités de translocation des toxines qui ont une activité enzymatique comme l'antigène de protection (PA) de la toxine du charbon de *Bacillus anthracis* et la toxine iota de *Clostridium perfringens*.

Les β -PFTs, tout comme les α -PFTs, sont dissemblables entre elles au niveau de leur structure primaire, tertiaire et quaternaire. Elles ont cependant trois choses en commun. Elles sont riches en feuillets β , ne contiennent pas de segment hydrophobe et doivent s'ordonner très précisément en oligomères pour former le pore. Cependant, il n'est pas aisé de dresser un schéma commun d'insertion membranaire. L'apparition des surfaces hydrophobes peut se faire par protéolyse (aérolysine, antigène de protection de la maladie du charbon, les cytolysines dépendantes du cholestérol, la δ -endotoxine insecticide Cyt B), par le réarrangement de certains domaines (aérolysine, antigène de protection de l'anthrax, les cytolysines dépendantes du cholestérol) et par dissociation d'un dimère (aérolysine, δ -endotoxine insecticide Cyt B).

Un alignement de séquence des régions transmembranaires de chaque toxine souligne l'alternance de résidus hydrophiles et hydrophobes nécessaires à la constitution de tonneaux β . Ces derniers ont une face hydrophobe en interaction avec la partie hydrophobe de la bicouche lipidique et une surface hydrophile constituant la lumière du pore (Parker, 2003). Chaque monomère apporte sa contribution à l'édification d'un tonneau β transmembranaire. L'oligomérisation, qui est pré-requise pour la formation d'un canal, semble se produire près de la surface ou à la surface de la membrane avant l'insertion, plutôt que par une diffusion latérale des monomères déjà insérés. Plusieurs groupes ont établi que l' α -toxine de staphylocoque forme un pré-pore non lytique avant de subir des changements conformationnels conduisant à la formation d'un pore (Thelestam et coll., 1991; Vécsey-Sémjen et coll., 1996; Vécsey-Sémjen et coll., 1997; Walker et coll., 1992). Ce pré-pore a été aussi caractérisé pour l' α -toxine de *Clostridium septicum*, pour l'antigène de protection de la toxine du charbon, pour la toxine de *Vibrio cholerae* et récemment pour la perfringolysine O (Hotze et coll., 2001b; Miller et coll., 1999; Sellman et coll., 1997). La nécessité de former un pré-pore peut s'expliquer par le besoin de délimiter des surfaces hydrophobes suffisamment importantes via l'accumulation de boucles β amphipathiques. La formation du tonneau β est justifiée par la nécessité de masquer les zones polaires des boucles qui rencontrent à l'intérieur de la bicouche hydrophobe des conditions énergétiques défavorables.

Un élément intéressant est la propension à la formation d'heptamères parmi ces toxines, relativement rares dans les autres familles de protéines.

1.2.1. Aérolyisine

L'aérolyisine est probablement un facteur majeur de la virulence du genre *Aeromonas*, bactéries à Gram-négatif présentes en eaux douces et saumâtres. *Aeromonas* est pathogène pour de nombreux animaux et est à l'origine d'infections de plaies ouvertes chez l'homme. La toxine ou des variants structuraux ont été caractérisés dans 5 espèces au moins d'*Aeromonas* : *A. caviae*, *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. salmonicida* et *A. veronii*. Elles ont toutes les trois 470 acides aminés et ont une identité de séquence de plus de 80 % (Parker et coll. 2005). La protoxine de 52 kDa est synthétisée sous forme de pré-proprotéine avec une séquence signal classique qui est clivée durant le transit au travers de la membrane interne de la bactérie. La

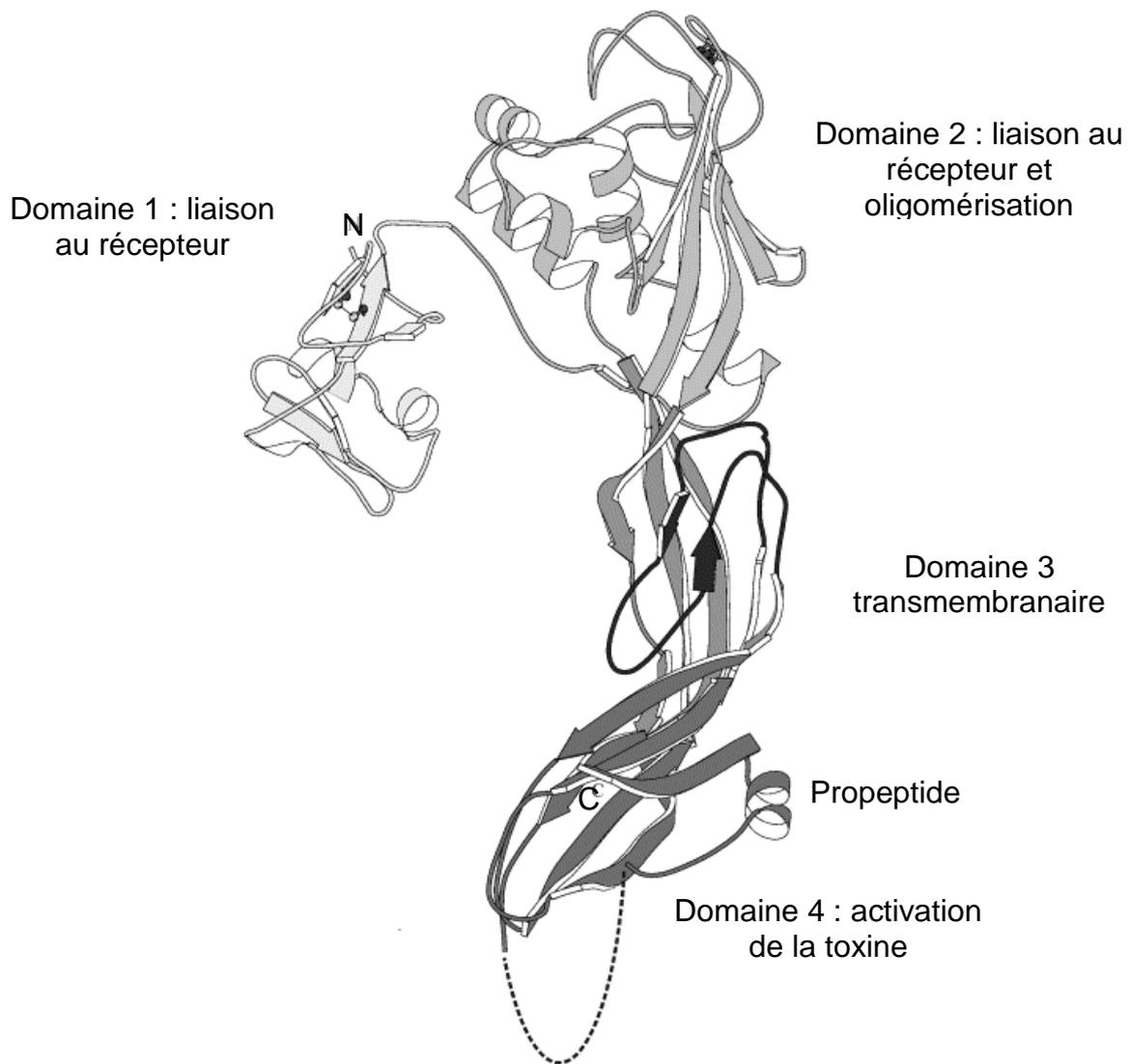


Figure 1.9 : Structure tridimensionnelle du monomère de la pro-aérolysine. La ligne pointillée représente une séquence non résolue dans le cristal et comprenant le site d'activation protéolytique. La région supposée transmembranaire est figurée en noir. D'après Parker et Feil, 2005.

protoxine se replie et se dimérise dans le périplasme. L'étape suivante consiste en la sécrétion de la protoxine (Howard et coll., 1996). Une fois à l'extérieur de la cellule, la proaérolysine est activée par un clivage protéolytique en C-terminal de 40 aminoacides, réalisée par la furine (Abrami et coll., 1998a). La toxine peut alors se fixer à son récepteur cellulaire qui initie l'oligomérisation de la toxine. Les oligomères s'insèrent ensuite dans la membrane pour former des canaux voltage-dépendants qui conduisent à la lyse osmotique et à la mort cellulaire.

La structure de la proaérolysine a été résolue par Parker et coll en 1994 (Parker et coll., 1994) (**figure 1.9.**). Elle est composée principalement de brins β (42% de la molécule avec 23 brins et 8 feuilletts anti-parallèles) et une proportion significative d'hélices α (17%). La proaérolysine est bilobée. Elle est composée d'un petit domaine globulaire N-terminal (résidus 1-82) constitué de deux feuilletts β et de deux hélices avec un pont disulfure entre les cystéines 19 et 75. De récents résultats de résonance plasmonique de surface suggèrent que ce domaine joue un rôle dans la liaison de haute affinité au récepteur (MacKenzie et coll., 1999). Le reste de la molécule peut être séparé en trois domaines (2 à 4), bien qu'un brin β (résidus 289 à 322) de 94 Å parcourt ces trois domaines. Ce feuillet subit une torsion, ainsi la face hydrophile du domaine 2 tourne à 180° quand il atteint le domaine 4. Le domaine 2 (aminoacides 83 à 178, 311 à 398) est replié en cinq brins et cinq hélices formant un sandwich. Ce domaine serait impliqué dans la liaison au récepteur, mais aussi dans l'oligomérisation (Green et Buckley, 1990; van der Goot et coll., 1993; Wilmsen et coll., 1991). Le domaine 3 (aminoacides 179 à 195, 224 à 274, 299 à 310, 399 à 409) a la forme d'une boîte, avec à l'avant un feuillet de 5 brins β et à l'arrière une longue boucle composée de feuilletts à 2 brins. Le domaine 4 (aminoacides 196 à 223, 275 à 298, 410 à 470) est constitué d'un β sandwich avec une petite hélice α au voisinage de l'extrémité C-terminale. Ce domaine renferme également le peptide C-terminal qui doit être clivé pour activer la toxine. Le clivage peut être effectué par des protéases comme la trypsine (Howard et Buckley, 1985) ou la furine (Abrami et coll., 1998a). Ce site n'est pas visible dans la structure à cause de la grande mobilité de la longue boucle du domaine 4 dans lequel il réside. La région C-terminale, après clivage du peptide présente une large surface hydrophobe. Ce peptide ne joue pas d'autre rôle dans la formation du pore (van der Goot et coll., 1994).

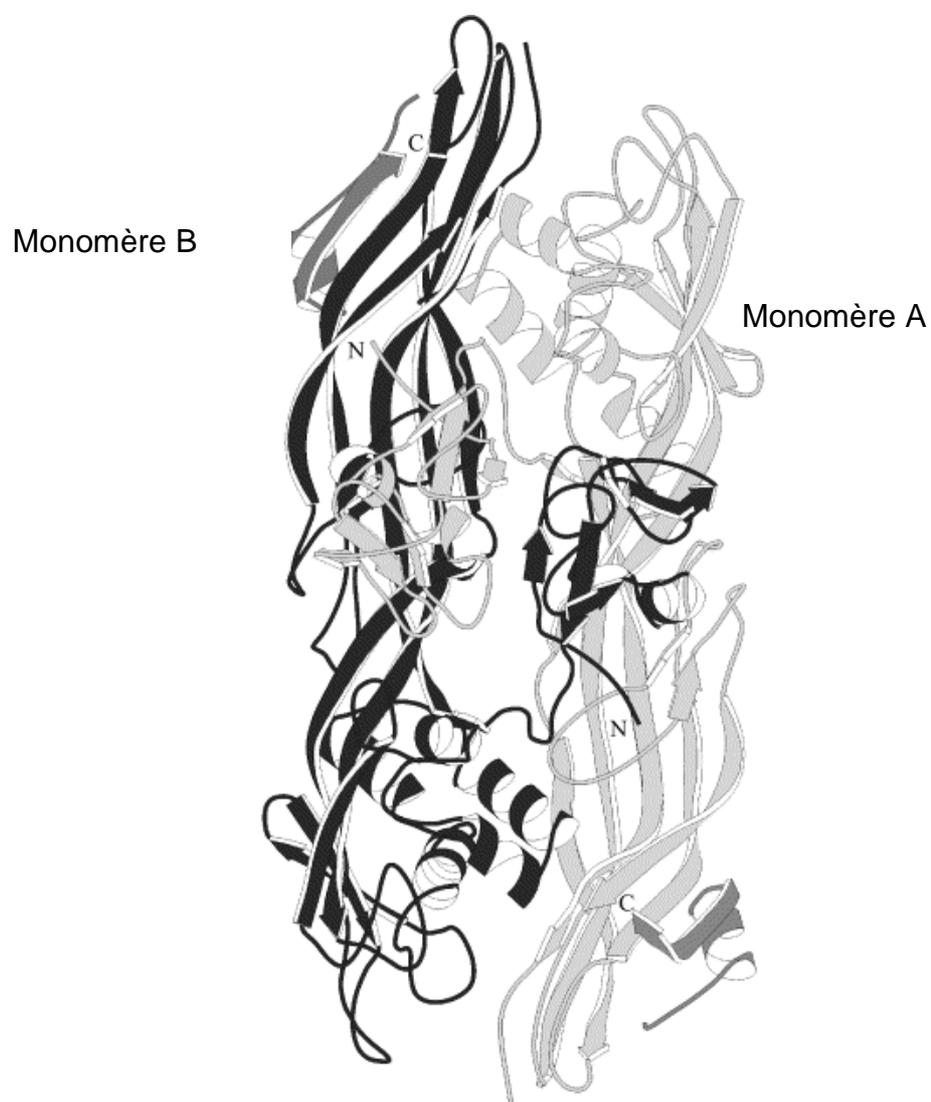


Figure 1.10 : Dimère de la proaérolysine d'*Aeromonas*, montrant les interactions des domaines N-terminaux. D'après Parker et Feil, 2005.

L'aérolysine native est un dimère dans le cristal (Parker et coll., 1994), mais aussi en solution (van der Goot et coll., 1993) (**Figure 1.10**). La stabilité et l'hydrosolubilité de la toxine sont en partie dues à sa capacité de dimérisation. Il y a dix cavités à l'interface du dimère qui peuvent jouer un rôle dans la déstabilisation de l'état hydrosoluble et dans les changements conformationnels nécessaires pour passer à la forme membranaire. Quand le dimère est dissocié, les interactions tertiaires rigides disparaissent et les protéines deviennent sensibles à l'action des protéases (van der Goot et coll., 1994). La toxine mature ne subit pas ensuite de changements conformationnels majeurs (van der Goot et coll., 1992).

L'oligomérisation de l'aérolysine doit précéder son insertion dans la membrane, et la formation de l'heptamère n'est pas due à une diffusion latérale des monomères insérés dans le plan de la membrane (van der Goot et coll., 1993). L'aérolysine est capable d'oligomériser spontanément en solution quand sa concentration est suffisamment élevée. Le rôle du récepteur serait alors de favoriser l'heptamérisation en augmentant la concentration locale de la toxine. Plusieurs récepteurs ont été récemment identifiés pour l'aérolysine : le récepteur Thy-1 sur les lymphocytes et la contactine dans les cellules de cerveau de souris (Diep et coll., 1998; Nelson et coll., 1997), un récepteur de 80 kDa identifié sur des cellules de rein de bébé hamster (Abrami et coll., 1998b) et une protéine de 47 kDa à la surface des érythrocytes de rat (Cowell et coll., 1997). Tous ces récepteurs sont ancrés à la membrane via le glycosyl phosphatidylinositol (GPI), une molécule impliquée dans la communication cellulaire. Ces protéines ancrées au GPI sont capables de se regrouper dans des domaines de la membrane riches en cholestérol augmentant ainsi la concentration locale en récepteur (Fielding et Fielding, 2003).

L'aérolysine constitue des canaux dans les bicouches lipidiques planes légèrement anioniques et restant ouverts entre -70 et 70 mV (Wilmsen et coll., 1990). La microscopie électronique a fourni un modèle à faible résolution du canal, révélant une forme de champignon avec un diamètre externe de 46 \AA entourant un canal hydrophile de 17 \AA de diamètre interne (Wilmsen et coll., 1992). La base est surmontée de 7 bras, chacun constitué de deux domaines de tailles

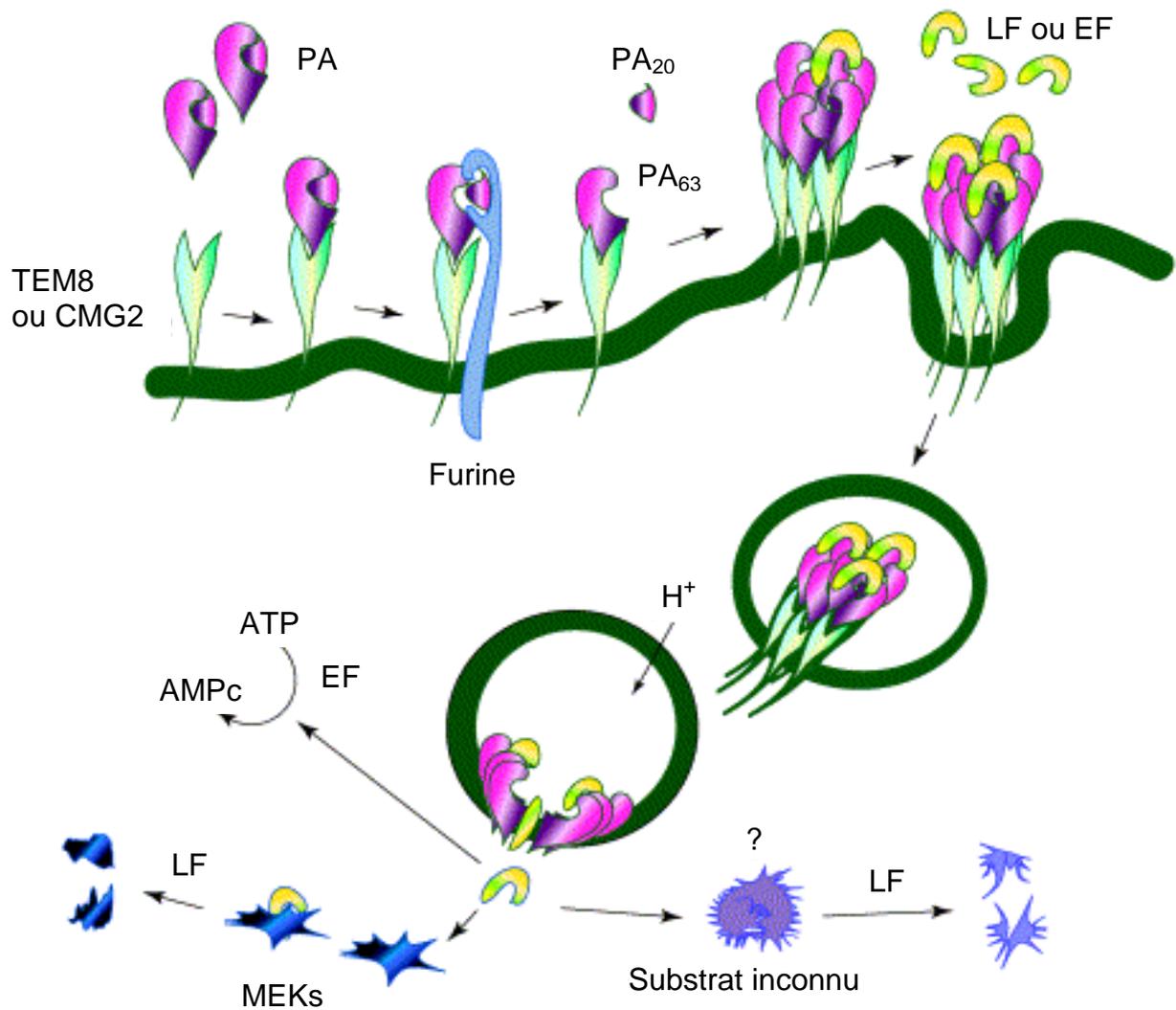


Figure 1.11 : Schéma du mode d'action de la toxine du charbon (Moayeri et Leppla, 2004).

L'antigène de protection (PA) se fixe sur le récepteur à la toxine du charbon TEM8 ou CMG2 et est clivé par la furine. PA clivé s'oligomérisent et fournissent des sites de fixation pour EF ou LF. Il y a ensuite endocytose du complexe, LF et EF sont dirigés dans le cytosol après acidification du compartiment intracellulaire. EF catalyse la conversion de l'ATP en AMPc. LF clive les membres de la famille des MAP Kinase kinases (MEK) et d'autres cibles potentielles.

différentes, qui constituent la « tête » du champignon. Le diamètre total de la tête est de 140 Å. La tête dépasse de la surface membranaire de 20 Å.

La formation du canal conduit à la lyse osmotique des érythrocytes, mais des mécanismes plus complexes semblent intervenir chez les cellules nucléées. En effet, il n'y a pas de rupture de la membrane plasmique, mais une perméabilisation aux cations monovalents de faible taille comme le K^+ , causant une dépolarisation membranaire. Dans certaines cellules épithéliales, la toxine provoque également une vacuolisation du réticulum endoplasmique, induisant une sévère désorganisation de la néosynthèse membranaire (Abrami et coll., 1998b). Dans les granulocytes humains, l'aérolysine induit une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire par un influx à travers les pores formés par la toxine et un relargage de protéine fixant le GTP (protéine G) dépendant du contenu des stocks intracellulaires au niveau du réticulum endoplasmique. Ces événements seraient la conséquence de la formation du pore et non de la fixation au récepteur d'un monomère de l'aérolysine (Krause et coll., 1998).

1.2.2. PA de *B. anthracis*

La maladie du charbon est provoquée par *Bacillus anthracis*, bactérie à Gram-positif. La virulence dépend de la présence de deux plasmides pXO1 et pXO2. Le plasmide pXO2 renferme les gènes nécessaires à la synthèse d'une capsule qui protège la bactérie de la phagocytose. pXO1 contient les gènes qui codent la toxine du charbon (anthrax pour les anglo-saxons), composée de 3 protéines : le facteur oedémateux (« edema factor » ou EF) ; le facteur létal (« lethal factor » ou LF) et l'antigène de protection (« protective antigen » ou PA) (Singh et coll., 2005). Les toxines agissent en combinaisons binaires avec PA. La combinaison PA – LF constitue la LT (« lethal toxin ») et PA – EF la ET (« edema toxin ») (Moayeri et Leppla, 2004).

La toxine fonctionne ainsi : alors que PA se lie au macrophage en formant un heptamère et permet à la protéine comparse (EF ou LF) de passer dans le cytosol pour qu'elle exprime son activité enzymatique (**Figure 1.11**). PA se fixe d'abord sur au moins un récepteur cellulaire (tumor endothelial marker 8 soit TEM8 ou capillary morphogenesis protein 2 CMG2) (Moayeri et Leppla, 2004). Il s'ensuit un clivage par la furine qui conduit à l'élimination d'un fragment N-terminal de 20 kDa (PA₂₀). La partie activée restante de 63 kDa (PA₆₃) constitue un pré-pore

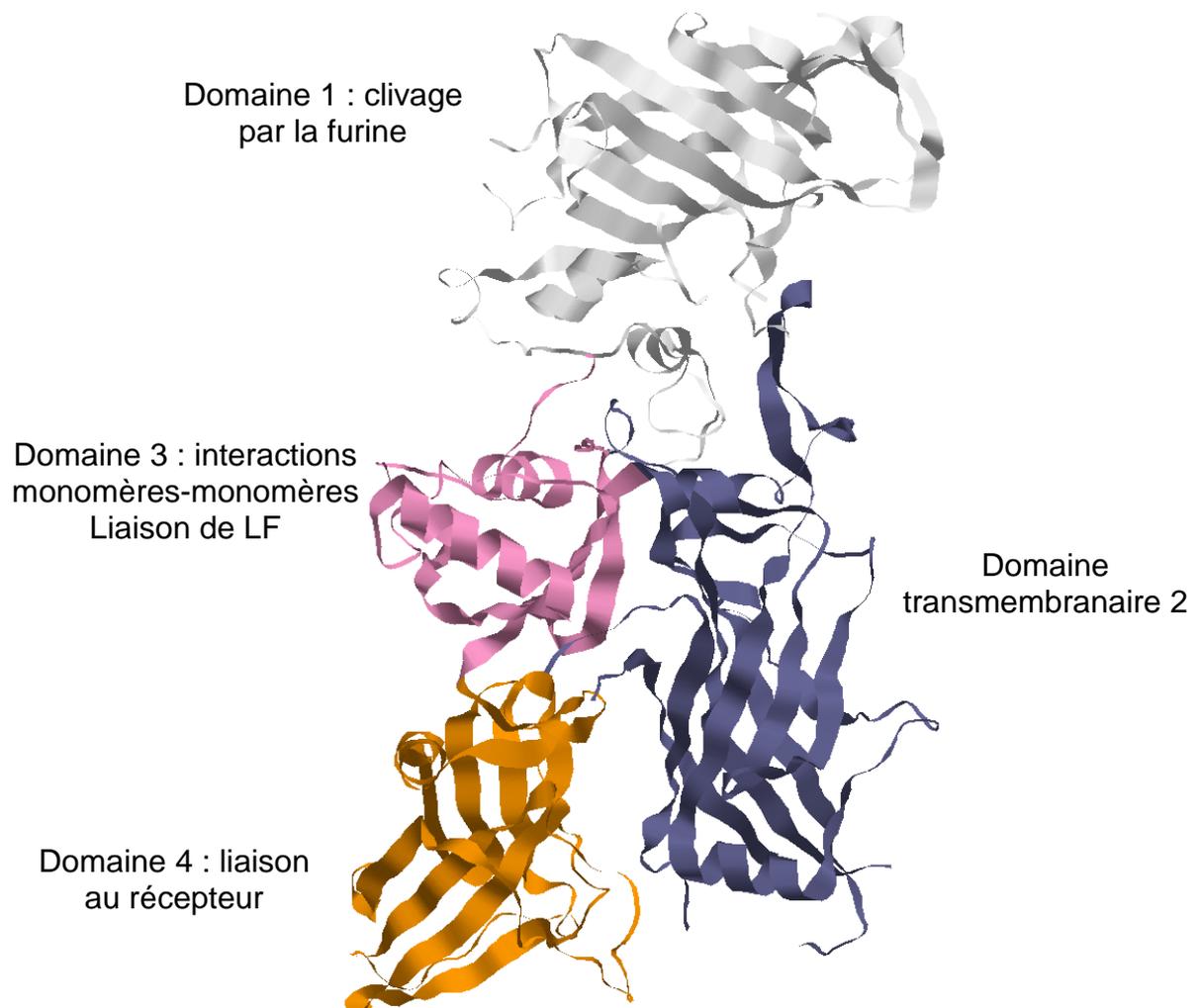


Figure 1.12 : Structure tridimensionnelle de l'antigène de protection de la toxine du charbon (code PDB : 1ACC).

heptamérique qui lie EF ou LF. Ce complexe est ensuite internalisé via les radeaux lipidiques (Abrami et coll., 2003) et véhiculé vers les endosomes où l'environnement acide déclenche la transformation du pré-pore PA en un pore membranaire. Ce pore permet le passage de EF ou LF dans le cytosol. EF agit comme une adénylate-cyclase calmoduline-dépendante causant une élévation de l'AMP cyclique intracellulaire et LF est une métalloprotéase à zinc qui clive la MAP Kinase kinase (Duesbery et coll., 1998).

La structure tridimensionnelle de PA monomère (83 kDa) a été résolue par diffraction aux rayons X (Petosa et coll., 1997). C'est une molécule allongée (100 x 50 x 30 Å) de 735 résidus organisés en feuilletts β anti-parallèles qui forme un pré-pore heptamérique. Elle est organisée en 4 domaines (**Figure 1.12**). Le domaine 1 (aminoacides 1-258) lie 2 ions calcium et possède une large boucle flexible (aminoacides 162-175) qui contient le motif reconnu et clivé par la furine. Le clivage conduit à l'élimination de PA₂₀. La partie restante de 63 kDa (PA₆₃) sert de site de liaison à LF ou EF. Le domaine 2 (aminoacides 259-487) renferme de nombreux longs brins β et forme le core du pore transmembraire. La boucle (aminoacides 303-319) est aussi impliquée dans l'insertion membranaire. Le domaine 3 (aminoacides 488-595) est le plus petit domaine et serait impliqué dans les interactions monomère-monomère durant l'oligomérisation et/ou dans la liaison de LF. Les trois premiers domaines sont intriqués les uns avec les autres au contraire du domaine 4 (aminoacides 596-735) qui est plutôt séparé du reste de la molécule. Ce dernier domaine participe à la liaison au récepteur (Singh et coll., 2005).

1.2.3. Les cytolysines dépendantes du cholestérol – La perfringolysine O

Les cytolysines dépendantes du cholestérol (« Cholesterol-dependant cytolysins » ou CDCs) sont des toxines présentes dans cinq genres bactériens : *Clostridium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Listeria* et *Arcanobacterium* (Tweten et coll., 2001). Ces toxines ne dépendent que de la présence de cholestérol membranaire et pas d'autres récepteurs de surface, ainsi elles pourraient lyser la membrane cytoplasmique de toutes les cellules animales. Elles forment des pores de très grande taille, d'un diamètre interne supérieur à 30 nm (Palmer, 2001). Il s'agit des plus grands pores décrits (**Figure 1.13A**) ; ils permettent le passage d'ions, de métabolites et de macromolécules. Ce dernier caractère rend intéressant leur usage comme outils de biologie cellulaire (Palmer, 2001).

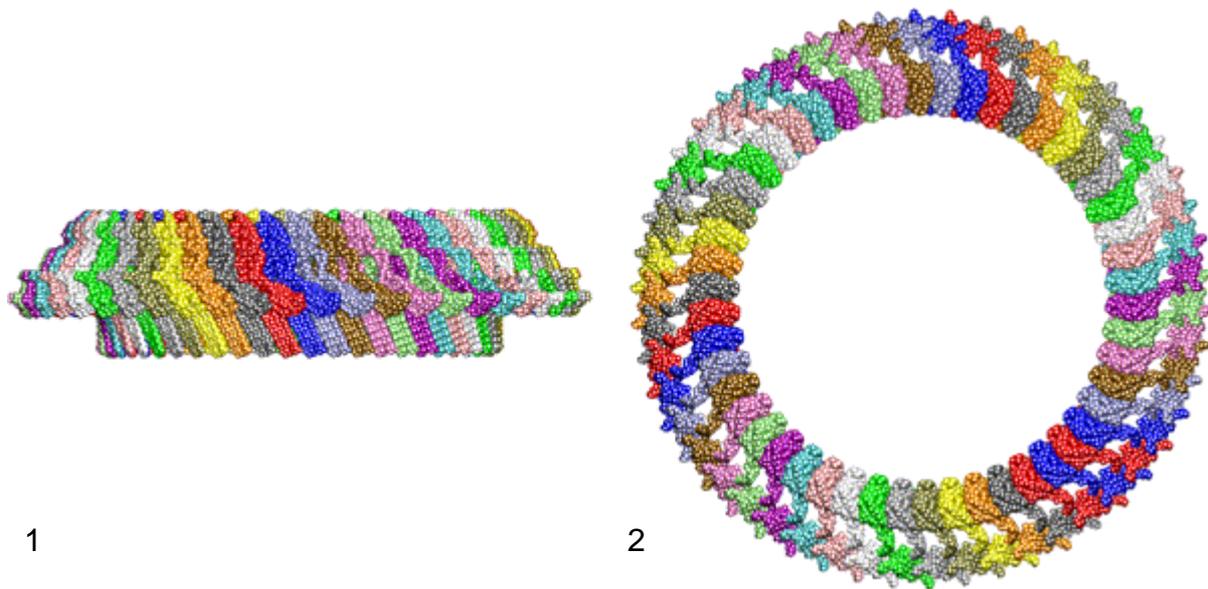


Figure 1.13A : Modèle d'un pore de CDC. (1) vue de profil (2) vue du dessus du pore.

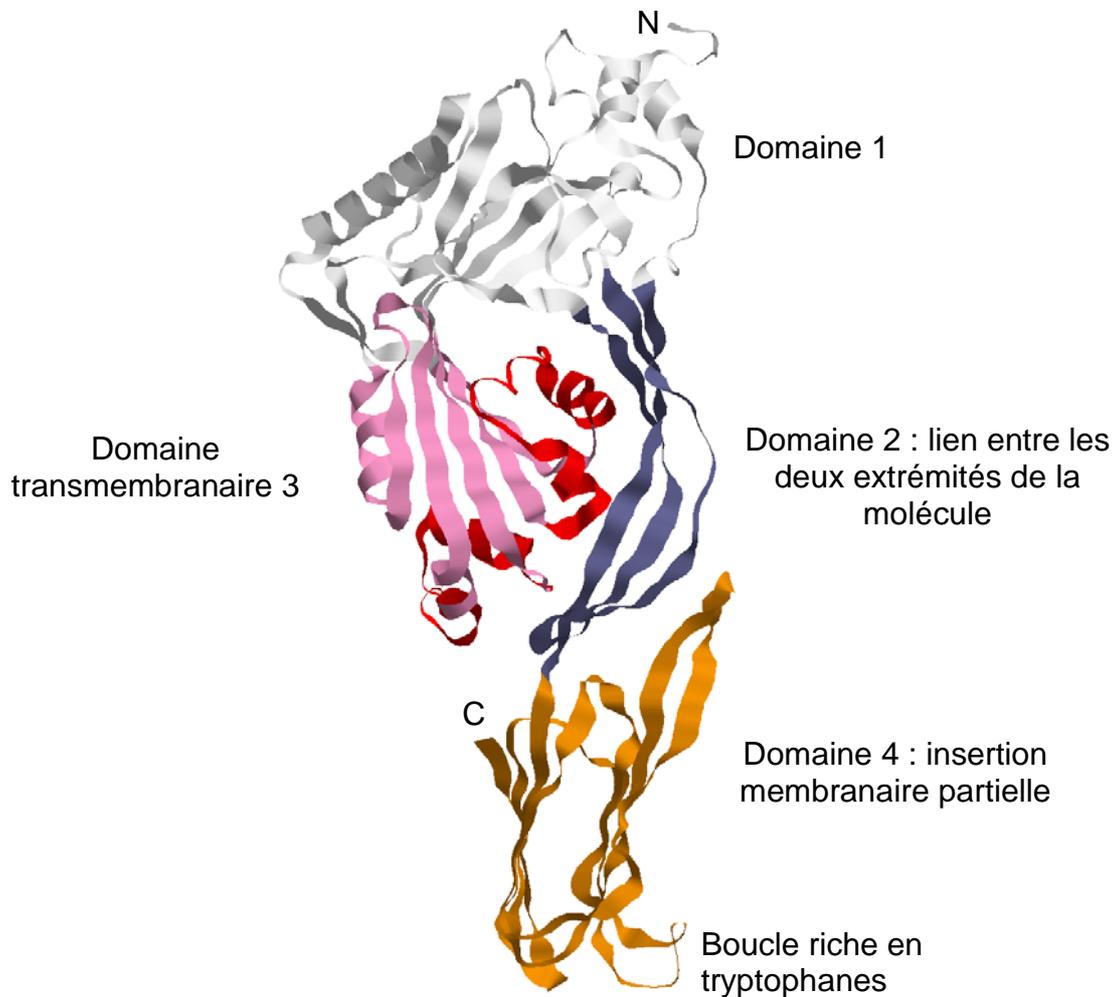


Figure 1.13B : Structure tridimensionnelle de la perfringolysine O (code PDB : 1PFO). En rouge, les hélices transmembranaires.

Plus de vingt CDCs ont été identifiées et leurs séquences montrent une grande homologie (40-80%) suggérant des activités et des structures 3D similaires. L'étude de la structure primaire de 11 CDCs montre une région protéique conservée de 11 aminoacides, au voisinage de l'extrémité C-terminale. Cette région serait impliquée dans la liaison à la membrane (Sekino-Suzuki et coll., 1996). Les oligomères de CDCs ont été identifiés par électrophorèse sur gel d'agarose – SDS. Ils sont homogènes et sont composés de 30 à 50 monomères (Shepard et coll., 2000). Ce dernier auteur suggère la formation d'un pré-pore avant l'insertion membranaire de l'oligomère. Cependant, des pores incomplets en forme d'arc ont été observés, ce qui ouvre la possibilité d'une insertion membranaire avant une oligomérisation complète (Palmer, 2001).

La perfringolysine O (PFO) de *Clostridium perfringens* est la première CDC à avoir été cristallisée en 1997 (**Figure 1.13B**) (Rossjohn et coll., 1997). Il s'agit d'une molécule en forme d'un bâton de 100 Å de long, riche en feuillets β et composée de quatre domaines. Le domaine N-terminal adopte une topologie α/β avec une longue hélice enserrée contre un cœur de feuillets β anti-parallèles. Le domaine 2 est un simple feuillet β antiparallèle liant les deux extrémités de la molécule. Le domaine 3 adopte une topologie α/β avec un cœur de feuillets β anti-parallèles entouré par des couches d'hélices. Certaines de ces hélices sont transmembranaires. Le domaine 4 est un β sandwich, repliement trouvé dans un grand nombre de ces protéines. Ce dernier domaine renferme une boucle riche en tryptophanes. Il génère une « dague » hydrophobe capable de s'insérer dans la membrane.

L'étude de la PFO a permis de détailler un modèle commun d'insertion des CDCs. Dans la première étape, la toxine lie la membrane *via* le domaine 4. La boucle riche en tryptophanes se dégage de ce domaine pour prendre la forme d'une « dague » hydrophobe qui va pénétrer la membrane et ancrer la protéine à la membrane. L'insertion partielle du domaine 4 amène le domaine 3 à proximité de la surface membranaire ; la toxine peut alors s'oligomériser (Abdel Ghani et coll., 1999). Le pré-pore se forme à la surface membranaire par diffusion latérale des monomères déjà liés à la membrane. Ensuite, les hélices transmembranaires du domaine 3 se déroulent et forment deux boucles β par monomère. Ces dernières s'insèrent dans la membrane et forment un tonneau β . Chez la pneumolysine, les lipides expulsés par cette insertion, forment des vésicules (Bonev et coll., 2001).

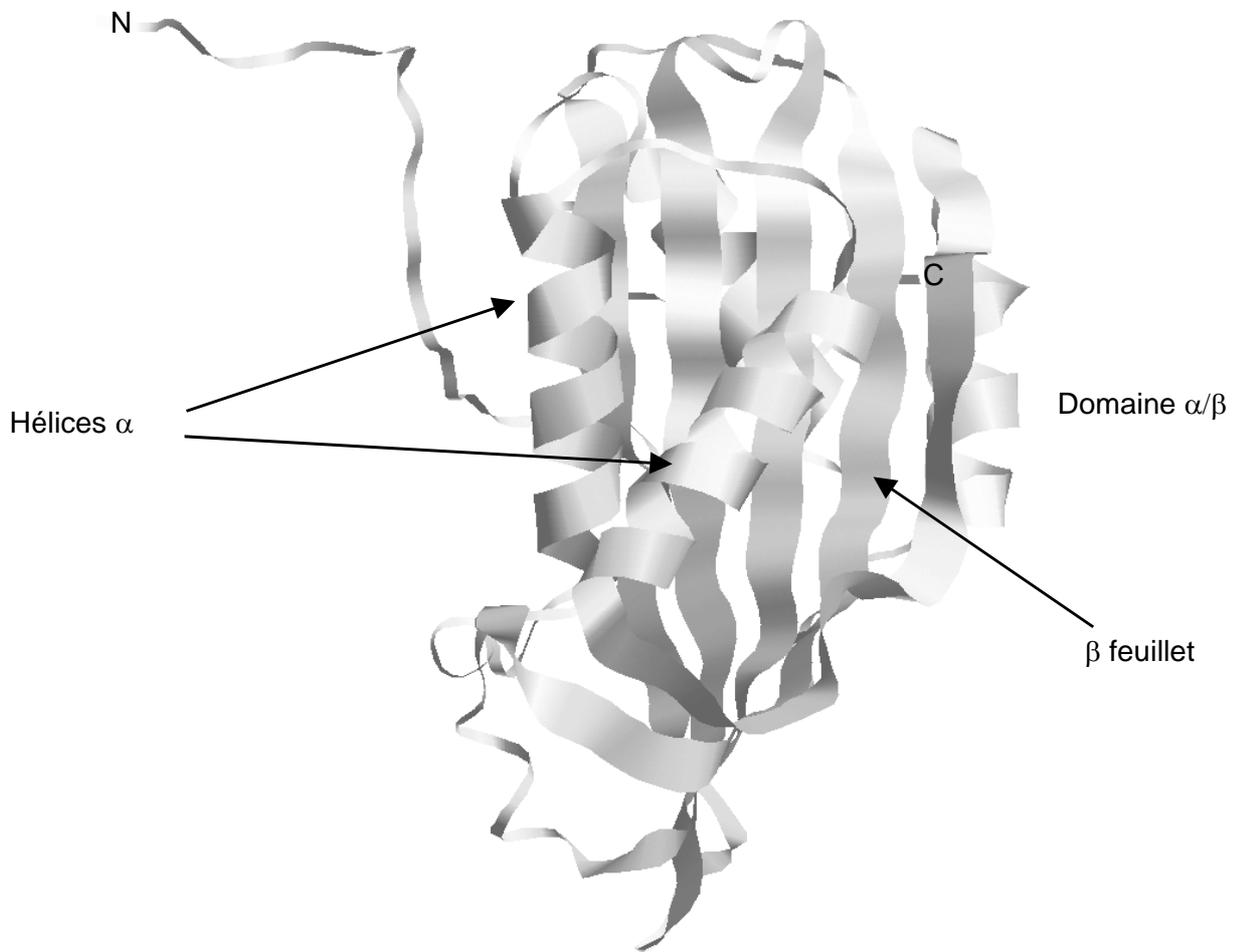


Figure 1.14 : Structure tridimensionnelle de la δ -endotoxine insecticide Cyt de *Bacillus thuringiensis* (code PDB : 1CBY).

1.2.4. δ -endotoxine insecticide Cyt

Comme mentionné en 1.1.5., *Bacillus thuringiensis* produit deux familles multigéniques majeures de δ -endotoxines, *cry* et *cyt*. Les δ -endotoxines Cyt, pour lesquelles neuf membres ont été identifiés, sont spécifiques des larves de diptères. Ces toxines peuvent s'insérer dans des membranes synthétiques sans recourir à des cofacteurs protéiques. Comme les toxines Cry, les toxines Cyt suivent les mêmes étapes de solubilisation, activation protéolytique, liaison au récepteur et insertion membranaire pour former des pores de 10-20 Å de diamètre. Deux δ -endotoxines Cyt ont été séquencées : CytA et CytB qui ont 39% d'identité. La toxine CytB de 29 kDa est sécrétée comme protoxine et est activée par les protéases de l'intestin. Sa structure cristallisée (**Figure 1.14**) révèle un domaine unique α/β avec deux couches externes d'hélices α enveloppant un feuillet β de cinq brins. La protoxine s'assemble en dimère reliés par des brins β entremêlés générant ainsi un feuillet β continu de 12 brins (Li et coll., 1996). On a peu d'éléments sur l'insertion membranaire de la toxine. On sait que l'activation de la protoxine conduit à la dissociation du dimère et à des changements conformationnels importants conduisant à l'exposition des faces hydrophobes du feuillet β (Koni et Ellar, 1994). Li et coll ont proposé que la toxine s'oligomériser pour former une structure en tonneau β similaire au pore de l' α -hémolysine staphylococcique. De récents travaux indiquent que la toxine s'insère dans la membrane sous forme de monomère avant de s'oligomériser pour former un pore. Le pore lui-même est prédit être composé de 4 à 6 monomères, sur la base de la taille du pore et par comparaison avec les autres modèles de β -PFT (Parker et Feil, 2005).

1.2.5. Cytolysine de *Vibrio cholerae*

Les souches pathogènes de *Vibrio cholerae* induisent des infections au niveau du petit intestin et sécrètent de nombreux facteurs de virulence. Parmi ceux-ci, la cytolysine de *V. cholerae* (VCC) est une PFT active contre les érythrocytes de lapins (Zitzer et coll., 1995), mais aussi contre les cellules intestinales humaines (Zitzer et coll., 1997).

VCC est transcrite à partir du gène *hlyA* (Manning et coll., 1984) et est sécrétée sous forme d'une protoxine de 80 kDa (Yamamoto et coll., 1990) après la perte du peptide signal. L'activation de la protoxine se fait par protéolyse (Hall et Drasar, 1990). Elle se fait par une

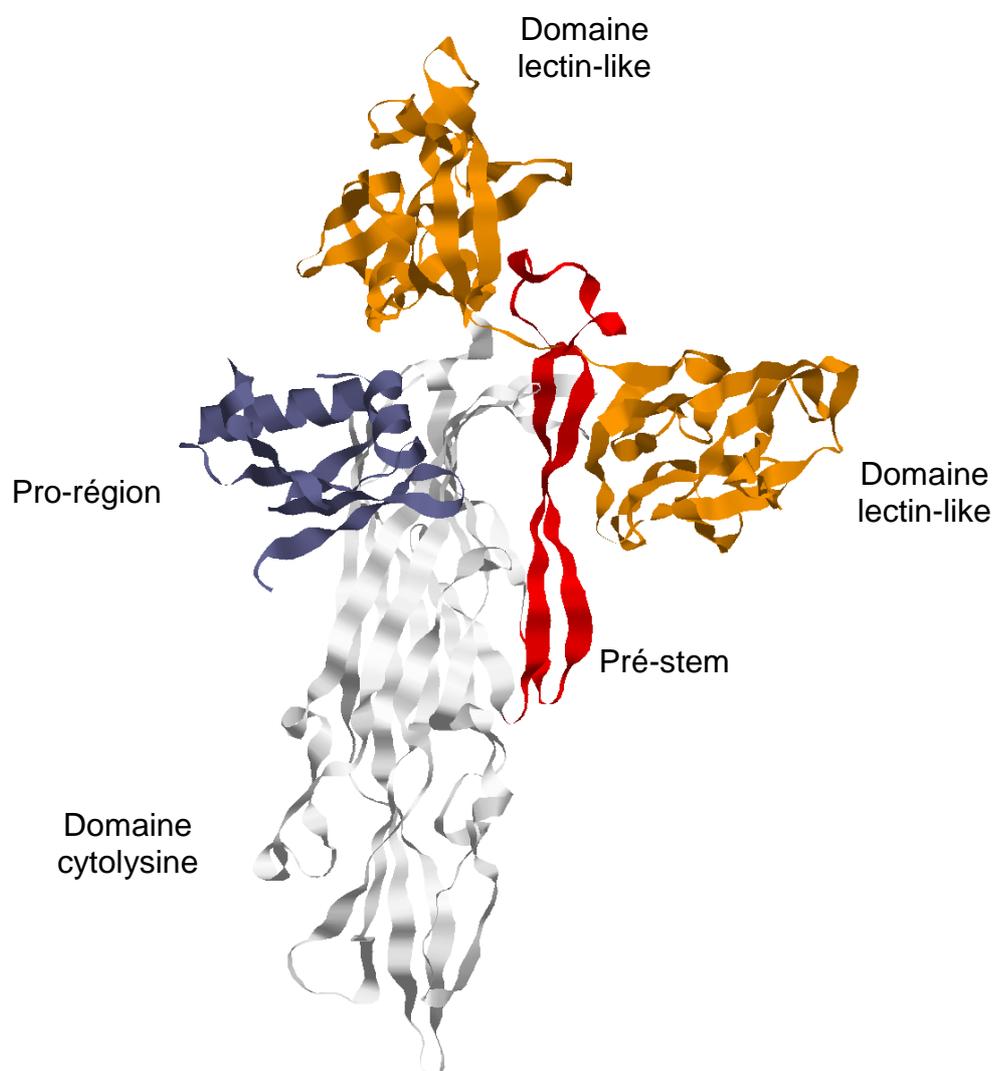


Figure 1.15 : Structure tridimensionnelle de la cytolysine de *Vibrio cholerae* (code PDB : 1XEZ).

métalloprotéase (ADAM-17, A Disintegrin And Metalloproteinase domain 17) et non par la furine comme c'est le cas pour d'autres PFTs (toxine diphtérique, exotoxine A de *P. aeruginosa*, aérolysine, PA de *Bacillus anthracis*) (Valeva et coll., 2004). La région amino terminale de 15 kDa joue le rôle de chaperon pour la sécrétion de VCC, et a une identité de séquence avec la famille des protéines de choc thermique (Hsp) (Nagamune et coll., 1997). La toxine mature de 65 kDa a des identités de séquence avec les PFTs de staphylocoque (Olson et Gouaux, 2003). Même si ce niveau d'identité de séquence est faible, un cluster de résidus conservés à l'intérieur du cœur hydrophobe suggère que ses protéines ont une structure similaire (Chen et Stites, 2001) et peut-être aussi des mécanismes d'assemblage proches. L'alignement de séquences souligne aussi que la région « pré-Stem » de VCC a une alternance de résidus hydrophobes et hydrophiles et possède des glycines comme les toxines staphylococques (Olson et Gouaux, 2005).

Les études biochimiques indiquent que VCC est très active sur les membranes contenant du cholestérol (Chen et Stites, 2001) et des sphingolipides (Zitzer et coll., 1999), ces deux composés sont abondants dans l'épithélium muqueux de l'intestin grêle. Le monomère VCC lie la membrane de manière température dépendante et forme un pore heptamérique (Harris et coll., 2002) selon un processus inhibé par les faibles températures (Zitzer et coll., 2000). Le pore formé est légèrement anionique et a un diamètre compris entre 1,4 et 3,2 nm (Menzl et coll., 1996; Yuldasheva et coll., 2001).

La pro-toxine a été récemment cristallisée par Olson et Gouaux (2005). Le monomère hydrosoluble a une forme de croix de 120 Å x 80 Å x 40 Å (**Figure 1.15**). Autour du noyau central « cytolysine » d'environ 325 aminoacides viennent se greffer trois domaines globulaires de 15 kDa. La comparaison des structures de VCC et de HlgB montre que le pro-domaine de VCC occupe une position similaire à l' amino-latch de HlgB et empêche l'oligomérisation. La situation du pro-domaine explique ainsi pourquoi la protoxine est inactive et pourquoi le clivage du pro-domaine par protéolyse est nécessaire à l'activation de la toxine. Ce clivage protéique se retrouve également chez l'aérolysine, la toxine diphtérique et la toxine du charbon (Olson et Gouaux, 2005).

La partie cytolysine constitue la partie fonctionnelle de la molécule et a un repliement similaire au monomère de HlgB ou au protomère de l'alpha-hémolysine. Ceci est étonnant du fait de la faible identité de séquence (Olson et Gouaux, 2005). Tout comme HlgB et l'alpha-hémolysine, le domaine cytolysine de VCC est composé de deux sous-domaines, analogues au β sandwich et au domaine « Rim » des toxines de staphylocoque. Les structures les plus proches sont les régions β sandwich de HlgB et de VCC (Olson et Gouaux, 2005). Les plus grandes disparités concernent les boucles, qui ont tendance à être plus longues dans le « Rim » de VCC, et dans la partie « pré-Stem ». Ce dernier est un feuillet β à deux brins qui est en contact avec une seule boucle du sandwich β . Chez HlgB, le « pré-Stem » est un feuillet à trois brins β . La proline présente dans la région triangle de HlgB et de l'alpha-hémolysine est conservée en position 272 chez VCC. HlgB et l'alpha-hémolysine ont une poche de liaison aux lipides composée d'une paire tryptophane/arginine sur une boucle du « Rim ». Cette poche est primordiale pour la liaison de la toxine à la membrane des érythrocytes et aux phosphatidylcholines. Une telle boucle est absente chez VCC, ce qui expliquerait les différences de cellules cibles (Olson et Gouaux, 2005).

VCC a trois domaines (**Figure 1.15**) qui ne sont pas présents dans les PFTs de Staphylocoque. Deux se replient comme les protéines lectine et le troisième est le pro-domaine aux propriétés de protéines chaperones qui a des identités de séquence avec la famille Hsp90 des protéines de choc thermique (Olson et Gouaux, 2005).

Le monomère VCC se fixe de façon réversible à la membrane cellulaire via des récepteurs glucidiques (glycoprotéines et glycolipides). Dans l'intestin, VCC pourrait se lier aux glucides de la muqueuse qui recouvrent l'épithélium, ou les glycolipides et les glycoprotéines couvrent la surface cellulaire. Après leur fixation, les monomères diffusent latéralement sur la membrane et s'assemblent en un intermédiaire pré-pore qui ensuite permet l'insertion température-dépendante du domaine « Stem ». Le pro-domaine est à la place de la partie amino-latch et empêche, par encombrement stérique, l'assemblage des monomères. C'est la protéolyse au niveau de la boucle de clivage qui lève la dernière barrière de l'interaction entre monomères (Olson et Gouaux, 2005).

Des mutants cystéine ont été utilisés pour identifier la région impliquée dans la formation du pore. Les résultats indiquent que, comme c'est le cas pour les PFT de staphylocoque, VCC et plus généralement les cytolysines des bactéries à Gram négatif forment un tonneau β pour perforer la membrane des cellules cibles (Valeva et coll., 2005).

1.2.6. L'alpha-toxine de *S. aureus*

1.2.6.1. Eléments généraux sur l'alpha-toxine

Cette toxine est sécrétée par presque toutes les souches de *S. aureus*. Elle est hémolytique chez de nombreux mammifères et tout particulièrement sur les globules rouges de lapin (Prévost et coll., 2005). Elle est aussi active sur d'autres cellules : lymphocytes T (Jonas et coll., 1994), plaquettes (Bhakdi et coll., 1988), kératinocytes (Walev et coll., 1993) et fibroblastes (Walev et coll., 1994). L' α -toxine induit une vasoconstriction des capillaires d'aorte de rat en ciblant les cellules endothéliales par l'intermédiaire de la P-sélectine, une protéine de surface présente sur les PNs humains (Buerke et coll., 2002). L'interleukine-1 est sécrétée par des monocytes traités à cette toxine, bien que ces cellules soient peu sensibles à la lyse (Bhakdi et coll., 1989). L' α -toxine augmente le métabolisme de l'acide arachidonique consécutif à l'activation calcique et induit ainsi la sécrétion de prostacycline et de leucotriène et aussi de NO dans les cellules endothéliales (Suttorp et coll., 1985; Suttorp et coll., 1987; Suttorp et coll., 1993). Des sécrétions de thromboxane, d'IL-8 et aussi l'activation de la voie de transduction du signal NF- κ B ont été montrés lors de l'action de la toxine (Rose et coll., 2002).

Après le clivage du peptide signal de 26 aminoacides, la protéine sécrétée de 293 résidus est alcaline (pI 8,11) (Gray et Kehoe, 1984). Sa masse moléculaire est de 33 kDa. A l'instar des autres leucotoxines, elle est sécrétée en fin de phase exponentielle. Les monomères s'agrègent en solution ou forment des oligomères fonctionnels en présence de déoxycholate de sodium (Bhakdi et coll., 1981), quelle que soit la température (4°C-45°C) (Belmonte et coll., 1987), mais dans des conditions précises de pH (Forti et Menestrina, 1989). Cette lipostabilité a été exploitée pour déterminer la structure du pore. Il s'agit d'un heptamère (**Figure 1.16A**) qui a la forme d'un champignon de 100 Å de diamètre et de 100 Å de hauteur, formant un canal de 26 Å de diamètre (Song et coll., 1996). L'oligomérisation en heptamère a été confirmée par électrophorèse (Gouaux et coll., 1994) et par microscopie à force atomique (Malghani et coll.,

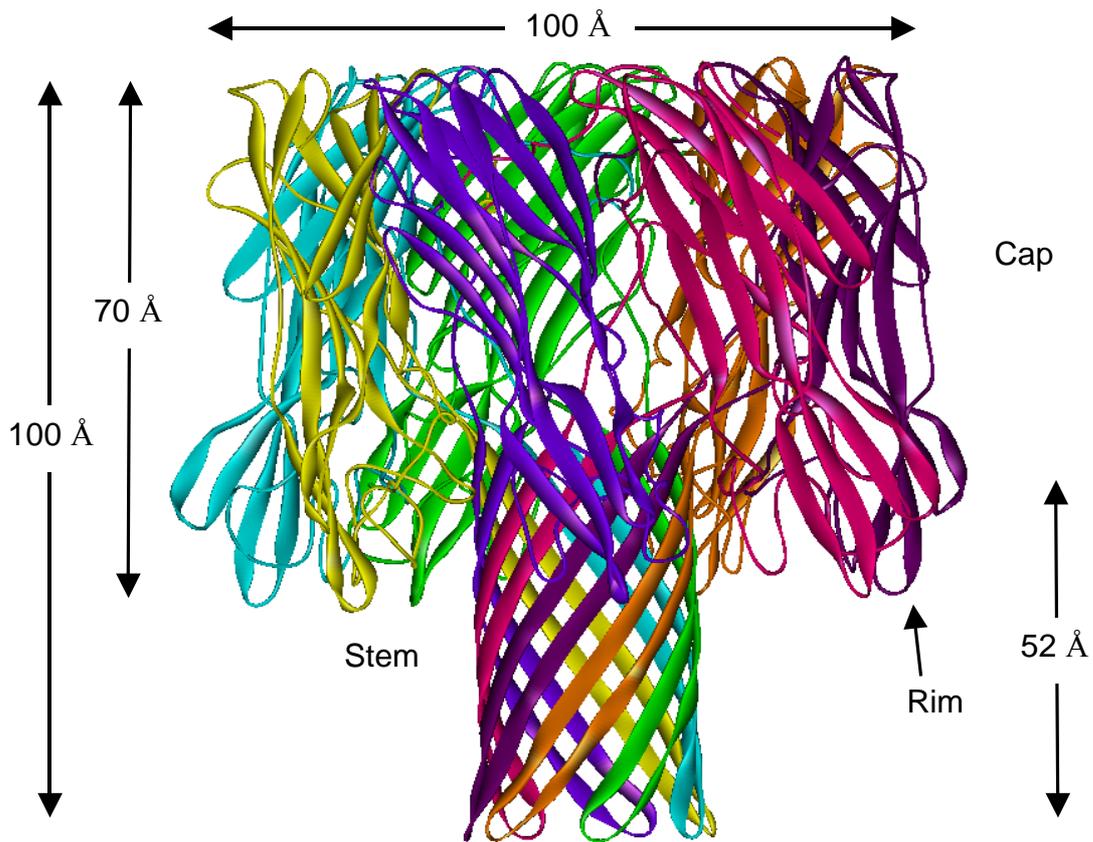


Figure 1.16A : Structure tridimensionnelle du pore heptamérique formé par l' α -toxine de *S. aureus* (code PDB : 7AHL).

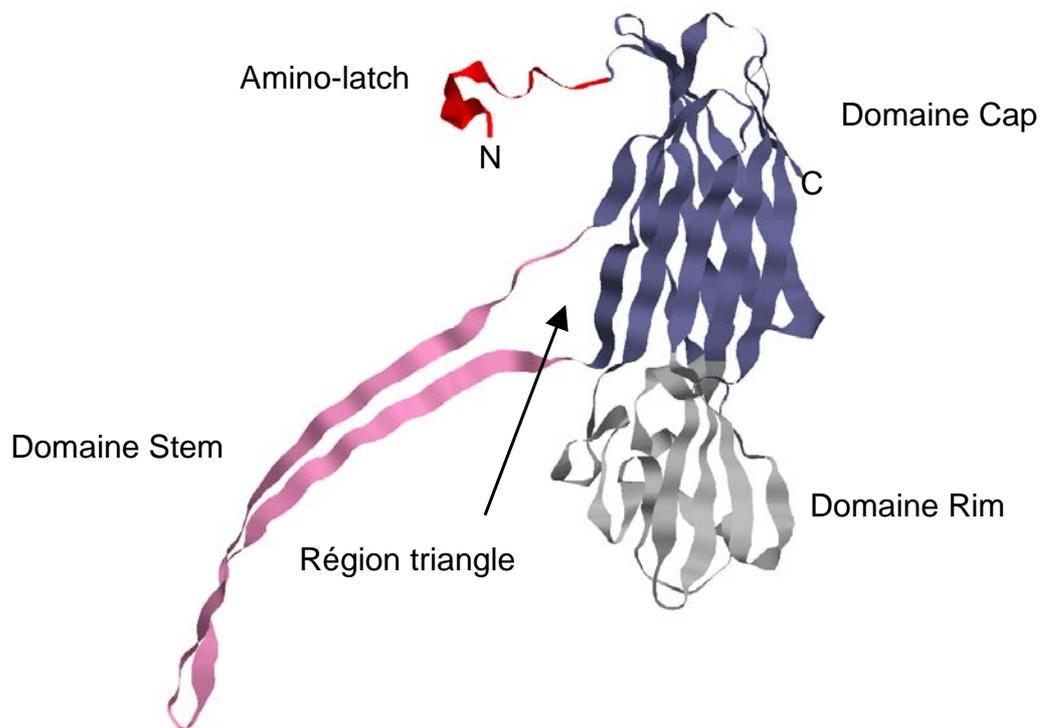


Figure 1.16B : Structure d'un monomère de l' α -toxine de *S. aureus* extraite de l'heptamère.

1999), bien que Czajkowski et coll. eussent détecté ensuite, mais par la même technique la présence d'hexamères avec les heptamères et dans un environnement lipidique différent (Czajkowski et coll., 1998). La structure d'un protomère est extraite de la structure de l'heptamère (**Figure 1.16B**). Il est constitué de deux régions séparées par une boucle riche en glycines (Lys 110 – Tyr 148). Cette structure est formée de 16 brins β (52,9 %), de 4 hélices α ou 3_{10} (4,3 %) et le reste est constitué de « random coil » (7,9 %) et d'éléments non α et non β (34,9 %) (Song et coll., 1996). La structure de l'heptamère peut être décomposée en plusieurs domaines : le domaine « Cap » pour le chapeau, le domaine « Rim » pour la couronne, le domaine « Stem » pour le pied. Entre le « Stem » et le core de la molécule se trouve la région triangle.

1.2.6.2. Le domaine « Cap »

Le « Cap » a un diamètre de 100 Å et une hauteur de 70 Å. Il est composé de l'association d'un β sandwich de sept feuillets β et des 20 premiers résidus de la partie N-terminale de chaque protomère. Cette partie, appelée « amino-latch », est importante dans la formation de l'heptamère et la lyse cellulaire (Walker et coll., 1992). Dans l'heptamère, cet « amino-latch » entre en contact avec le feuillet β de deux protomères adjacents (Song et coll., 1996) : l'Asp2 et l'Asp4 du protomère 1 forment des interactions polaires avec l'Arg104 et l'Arg56 du protomère 2, respectivement, l'Asn6 et la Lys8 avec l'Ile14 ; l'Asp4 et l'Asn6 du protomère 1 forment des interactions polaires avec la Lys58 du protomère 3. La seule délétion des deux aminoacides N-terminaux suffit pour abolir l'activité hémolytique (Walker et coll., 1992).

L'His35 est localisée dans une région cruciale de contacts entre les β sandwiches des différents monomères. De nombreux travaux de substitution ont montré le rôle crucial de cet aminoacide dans l'oligomérisation de l' α -toxine (Jursch et coll., 1994; Krishnasastri et coll., 1994; Menzies et Kernodle, 1994; Walker et Bayley, 1995). L'étude de la stabilité des oligomères à différentes températures suggère que l'His35 permet la formation du pré-pore (Walker et Bayley, 1995). Durant cette étape intermédiaire, l'His35 serait redéployée d'une manière coopérative dans une poche hydrophobe (Valeva et coll., 1997a). De plus, la structure tridimensionnelle montre que la région environnant l'His35 est une région d'interface des protomères et qu'elle est intimement liée à la région triangle et la partie supérieure du domaine

« Stem ». Une substitution de ce résidu pourrait donc empêcher l'insertion des brins β du protomère muté dans le tonneau. D'autres contacts inter-protomères essentiels sont établis entre les chaînes latérales de His48 et Asp24, et aussi entre Lys37 et Lys58 sur un protomère, et Asp100 sur le protomère voisin. Asp24, His48 et Asp100 influencent également l'activité hémolytique (Walker et Bayley, 1995).

1.2.6.3. La région triangle

La région triangle fait la jonction entre le « Stem » et le reste de la molécule. Elle assure également des contacts entre les protomères. Ces contacts se produisent entre Lys110 et Gln150, Asp152 et Asn173 sur le protomère adjacent (Song et coll., 1996). Des mutations de Lys 110 et Asp152 en cystéine diminuent ou abolissent l'activité hémolytique, respectivement (Walker et Bayley, 1995). D'autres contacts inter-protomères se produisent entre Lys154 et Asn214 (domaine « Rim »), ainsi qu'entre Ile107, Phe153 et Leu219 (domaine « Rim ») (Song et coll., 1996).

1.2.6.4. Le domaine « Stem »

Le « Stem », domaine transmembranaire, est un tonneau β de 14 brins venant de sept boucles β , chacune fournie par un monomère (Song et coll., 1996). La boucle β , riche en glycines, est composée alternativement de résidus hydrophiles et hydrophobes. Ainsi, les résidus hydrophiles forment la lumière du pore tandis que les résidus hydrophobes sont en interaction avec la membrane. On trouve un anneau de résidus acides et basiques à chaque extrémité du tonneau, mais les résidus basiques dominant à l'entrée de celui-ci. Le reste du canal est constitué principalement d'acides aminés neutres. Deux bandes hydrophobes, une formée par les 7 résidus Met113 et l'autre par les 7 résidus Leu135 sont exposées à la lumière du pore et prouvent que des résidus hydrophobes contribuent à la paroi du canal transmembranaire. A l'extérieur du canal, on trouve une ceinture hydrophobe constituée des acides aminés de Tyr118 à Gly126 et de l'Ile132 à 142. Un anneau d'acides aminés aromatiques est composé des 7 résidus Tyr118 et des 7 résidus Phe120. Au-dessous de la ceinture hydrophobe, un collier de résidus chargés et polaires (Asp127 à Lys131) définit la base du « Stem ». Au-dessus se trouve une

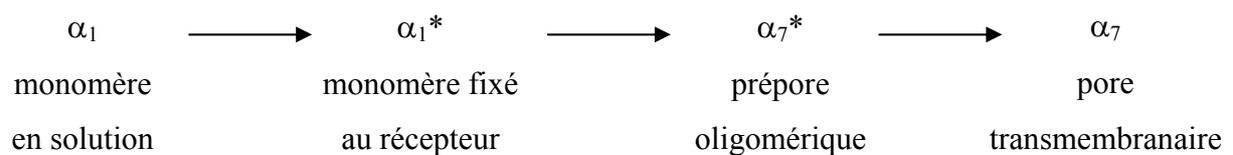
crevasse entre les domaines « Stem » et « Rim » qui contient de nombreux résidus aromatiques ou chargés positivement.

1.2.6.5. Caractéristiques du pore formé par l' α -toxine

Des résultats de microscopie électronique ont tout d'abord donné une longueur du pore de 10 nm pour un diamètre de 1,1 nm (Menestrina, 1986), tandis qu'un diamètre de 2,7 nm était trouvé par des méthodes d'exclusion de sucres (Krasilnikov et coll., 1992). En fait, le pore de l' α -toxine n'est pas un cylindre mais un cône avec un diamètre de 2,8 nm à l'entrée et de 1,4 nm à la base du « Stem » (Song et coll., 1996). Les molécules d'eau (Paula et coll., 1999) et d'autres non chargées (Bashford et coll., 1996) peuvent passer le pore. Le champ électrique induit dépend des charges à l'entrée du pore, qui déterminent la concentration locale en ions, et aussi des charges le long de la lumière du pore. La sélectivité anionique est essentiellement induite par la présence des résidus Asp45, Asn49 et Lys51 qui jouent le rôle de filtre anionique (Song et coll., 1996). La conductance du pore peut varier selon le pH, la tension ou différentes concentrations en cations mono- ou divalents (Kasianowicz et Bezrukov, 1995; Menestrina, 1986; Menestrina et Vécsey-Semjén, 1999).

1.2.6.5. Oligomérisation des monomères de l' α -toxine

Le mécanisme d'assemblage de l' α -toxine est supposé se produire en quatre étapes (Walker et Bayley, 1995) :



L'oligomérisation conduit à la formation d'un intermédiaire heptamérique baptisé « pré-pore » dans lequel le tonneau β n'est pas encore formé et inséré dans la membrane. Il ne forme pas de pore et ne possède donc pas d'activité lytique (Walker et coll., 1995). Ce concept de pré-pore a été confirmé par la résistance d'oligomères au SDS et par l'utilisation de mutants cystéine marqués à l'acrylodan : cette molécule possède des propriétés spectrales particulières dans les environnements hydrophiles et hydrophobes. Cela a aussi permis de confirmer que les résidus Tyr118 et Val140 sont dans un environnement hydrophobe avec une alternance d'un résidu sur

deux (Valeva et coll., 1996). Ces derniers auteurs décomposent, en 1997, la formation du pré-pore en 3 étapes (Valeva et coll., 1997a). L'heptamère α_7^*a , tout juste assemblé, est sensible au SDS. Un changement mineur de l'environnement de l'His35 et aucun changement dans l'environnement du domaine « Stem » inséré dans la membrane sont observés. Dans l'étape de transition α_7^*b , le domaine « Stem » et particulièrement le G130, par des interactions protéine-protéine, passe d'un environnement hydrophile à un environnement plus hydrophobe. En α_7^*c , le résidu His35 se déplace dans un environnement plus hydrophobe. A ce stade, le pré-pore devient résistant au SDS. L'insertion du domaine « Stem » dans la bicouche lipidique, dirigée par l'His35 de chaque protomère, définit la conformation finale α_7 du pore (Walker et coll., 1995). Le déroulement de l'extrémité N-terminale et du domaine « Stem » sont associés et se font en coopération (Cheley et coll., 1997). Les résidus en interaction dans l'oligomère ont été caractérisés par mutagenèse (Panchal et Bayley, 1995). La génération de ponts disulfures intramonomères a permis de bloquer certaines étapes de la formation du pore (Kawate et Gouaux, 2003). Ces changements conformationnels sont similaires à ceux trouvés chez les enzymes allostériques, à ceci près que pour l' α -hémolysine ils sont irréversibles et n'entraînent pas de modifications majeures pour le reste de la structure (Valeva et coll., 2001). L'événement déclencheur de ces transitions concertées reste à être identifié.

1.2.6.6. Le domaine « Rim »

Le domaine « Rim » forme la partie inférieure du chapeau de l'heptamère. Les interactions entre l'heptamère et les lipides de la membrane impliquent à la fois les domaines « Stem » et « Rim ». Plusieurs résultats expérimentaux mettent en évidence cette interaction. Tout d'abord la proximité de la base du « Rim » avec la membrane, puis sa séquence peptidique qui contient de nombreux résidus aromatiques exposés (Tyr68, Trp179, Tyr182, Trp187, Tyr190, Trp260, 265 et 274) et des acides aminés chargés positivement (Arg200, Lys266). Certains de ces résidus sont localisés sur des boucles à l'extrémité du domaine « Rim », définissant des sortes de crevasses capables de fixer la diheptanoyl- et la dipropanoyl-phosphatidyl-choline (Song et coll., 1996). Les études de fluorescence d'un mutant cystéine marqué à l'acrylodan sur la position Lys266 indiquent que ce site est exposé à un environnement plus hydrophobe pendant la formation de l'heptamère, suggérant une insertion membranaire (Valeva et coll., 1996). Le

rôle critique de l'Arg200 dans la fixation de l' α -hémolysine à la membrane des érythrocytes a été montré directement par une stratégie de mutagenèse dite « cystein scanning » et des modifications chimiques ciblées (Walker et Bayley, 1995). La toxine se fixe de façon préférentielle sur les membranes synthétiques constituées de phosphatidyl-choline et de cholestérol, plutôt que sur les autres phospholipides et sphingoglycolipides. Récemment, Pany et coll (Pany et coll., 2004) ont montré que les résidus allant de Trp179 au Trp 187 constituent un motif conservé de liaison à la cavéoline-1. La cavéoline-1 purifiée est capable de réduire fortement la liaison de la toxine et son activité biologique sur globule rouge de lapin, mais elle est située sur la face interne des membranes et a un rôle dans la signalisation cellulaire ; on peut se demander si l'effet observé dans cette compétition est un effet direct.

L'utilisation de la mutagenèse a été cruciale pour déterminer les relations entre la structure et les fonctions de l' α -toxine, ce qui est nécessaire pour comprendre les mécanismes d'assemblage du pore de cette toxine considérée comme un prototype des « pore-forming toxins ». La mutagenèse « cystein scanning » a été utilisée pour substituer 79 résidus chargés de l' α -toxine par une cystéine (aminoacide absent dans la molécule sauvage). Ceci a permis d'identifier les aminoacides exposés au solvant et probablement certains résidus impliqués dans la formation du pore. Il apparaît que la région centrale est impliquée dans l'oligomérisation, la formation du pore et son fonctionnement. Le domaine « Rim » est impliqué dans la fixation au ligand membranaire qu'il soit protéique ou d'une autre nature. Les extrémités N- et C-terminales semblent nécessaires pour une oligomérisation correcte de la molécule (Walker et Bayley, 1995).

2. Les leucotoxines de Staphylocoque

2.1. Historique

En 1894, Van der Velde injecte du staphylocoque dans la cavité pleurale du lapin. Il observe une infection qu'il associe à une activité leucotoxique de la bactérie (Van der Velde, 1894). Plus tard, la titration de l'activité leucotoxique est déterminée par la réduction du bleu de

méthylène par les leucocytes encore viables (Neisser et Wechsberg, 1901). Julianelle montre que l'hémolyse et la leucotoxicité reflètent des activités indépendantes, grâce à des souches ne présentant pas la même activité (Julianelle, 1922). La capacité leucotoxique de certaines souches est ensuite associée aux furoncles (Panton et Valentine, 1932). Ces souches présentent peu d'activité hémolytique. La toxine est nommée leucocidine de Panton et Valentine (LPV) par Wright (Wright, 1936). Des méthodes de culture sont mises au point pour permettre une production en grande quantité de LPV.

Parallèlement, Smith et Price (Smith et Price, 1938) distinguent 4 toxines, appelées α , β , δ et γ -hémolysines, présentant une activité hémolytique différente contre les érythrocytes humains, de lapin, de mouton et de cheval.

2.2. Définition

Le terme « leucotoxine » rassemble l' α -toxine et les toxines à deux composés formant des pores produites par *Staphylococcus aureus*, à savoir la leucocidine de Panton et Valentine, les gamma-hémolysines, LukM-PV+LukF'-PV, LukE+LukD, et LukS-I+LukF-I produites par *Staphylococcus intermedius*. Ce nom leur a été donné, car leurs cibles cellulaires majeures sont les polynucléaires neutrophiles, les monocytes et les macrophages ou les lymphocytes (Prévost, 2005). Ces toxines interagissent avec la membrane des cellules cibles : l'action synergique des deux composés conduit à la formation d'un pore, c'est pourquoi ces toxines sont classées dans la famille des PFTs. Deux protéines différentes, de classe S (31 kDa) et de classe F (34 kDa) sont donc nécessaires pour former un pore actif. Cette dénomination vient de leur comportement en chromatographie échangeuse de cations : les protéines de classe F sont « fast eluted » – éluées rapidement et les protéines de classe S sont « Slow eluted » (Woodin, 1960). Chaque protéine de classe S peut donner une leucotoxine spécifique quand elle est combinée avec une protéine de classe F (Szmigielski et coll., 1998). Ces protéines sont sensibles à la température. Leur solubilité (> 20 mg/mL) dépend du pH et de la force ionique du milieu. Elles ont un point isoélectrique basique compris entre 7,4 et 9,9 (Prévost, 1999) (**Table 1.1**). Aucune de ces protéines ne contient de cystéine. Le composé de classe S se fixe en premier à la membrane, permettant la fixation du composé de classe F avant l'oligomérisation et la formation du pore (Colin et coll., 1994). Ainsi, les protéines sont toujours citées dans le même

Table 1.1 : Caractéristiques biochimiques des leucotoxines à deux composés. Données obtenues par ExPASy proteomic server, ProtParam tool, <http://us.expasy.org>.

Toxines	Protéine	Nb A.A.	P.M.	pI	Souches
LPV	LukS-PV	284	32 314	8,73	V8 (ATCC49775)
	LukF-PV	301	34 445	8,96	V8 (ATCC49775)
γ-hémolysine	HlgA (H _{gII} , H _{gII})	280	31 921	9,53	Mu50 (ATCC700699)
	HlgC (LukS, LukS-R)	286	32 565	9,18	COL
	HlgB (H _{gI} , LukF-R)	299	34 049	9,18	COL
LukM/LukF'-PV	LukM	281	32 162	9,14	P83
	LukF'-PV	296	33 724	8,99	P83
LukE/LukD	LukE	286	32 302	9,85	Newman (NTCC 8178)
	LukD	301	34 204	8,97	Newman (NTCC 8178)
LukS-I/LukF-I	LukS-I	281	32 139	9,37	<i>S. intermedius</i>
	LukF-I	300	33 859	7,25	<i>S. intermedius</i>

ordre S puis F pour décrire une leucotoxine. A l'intérieur de chaque classe, l'identité de séquence varie de 55 à 79% (Prévost, 2005). L'identité de séquence est faible d'une classe à l'autre ou avec l' α -toxine (< 25%). Les homologies sont plus importantes en ce qui concerne la partie centrale formant le pore. Ces homologies concernent aussi la β -toxine de *Clostridium perfringens* (Hunter et coll., 1993), ou encore CytK et HlyII de *Bacillus cereus* (Menestrina et coll., 2001) et le domaine transmembranaire d'autres PFTs. Les loci codants pour Ces toxines sont diversement rencontrés dans les souches isolées à l'hôpital et sont associés à différents tableaux cliniques (Prévost et coll., 2003).

2.3. La Leucocidine de Panton et Valentine (LPV)

La LPV est formée de LukS-PV et de LukF-PV (Woodin, 1960). Sa présence est associée aux furoncles (Couppié et coll., 1994; Cribier et coll., 1992b). Elle est également associée à certaines infections des voies respiratoires : des pneumopathies communautaires de jeunes adultes (Gillet et coll., 2002). Par le passé, les furoncles étaient connus comme pouvant évoluer en septicémie, et la pneumopathie bulleuse du jeune enfant a été cliniquement associée à la présence de furoncle chez le patient ou dans la famille. Des souches de *S. aureus* produisant la LPV peuvent rapidement provoquer des pneumopathies nécrosantes et hémorragiques chez l'enfant en bonne santé et le jeune adulte (Couppié et coll., 1997; Lina et coll., 1999). Cette pneumonie débute avec des symptômes ressemblant à la grippe, et a un fort taux de mortalité (37%) (Gillet et coll., 2002; van der Flier et coll., 2003). Ces infections ont pour conséquence une nécrose tissulaire et une propagation de l'infection bactérienne. La LPV est produite par 2-5% des souches isolées en routine clinique (Prévost et coll., 1995b). Ces souches productrices de la LPV sont clairement associées à des infections cutanées primaires et nécrosantes, en particulier les furoncles (Couppié et coll., 1994; Cribier et coll., 1992b; Prévost et coll., 1995c). En effet, 90 % des souches qui produisent la LPV sont issues de furoncles. A l'inverse, les souches positives sont isolées dans 96 % de cas de furoncles et furonculose. Cette association avec les furoncles est également observée en Guyane française. Par ailleurs, l'incidence des souches productrices de la LPV parmi les souches cliniques en Afrique de l'Ouest est plus importante de 6 à 10 fois par rapport aux souches européennes et guyanaïses (Baba-Moussa et

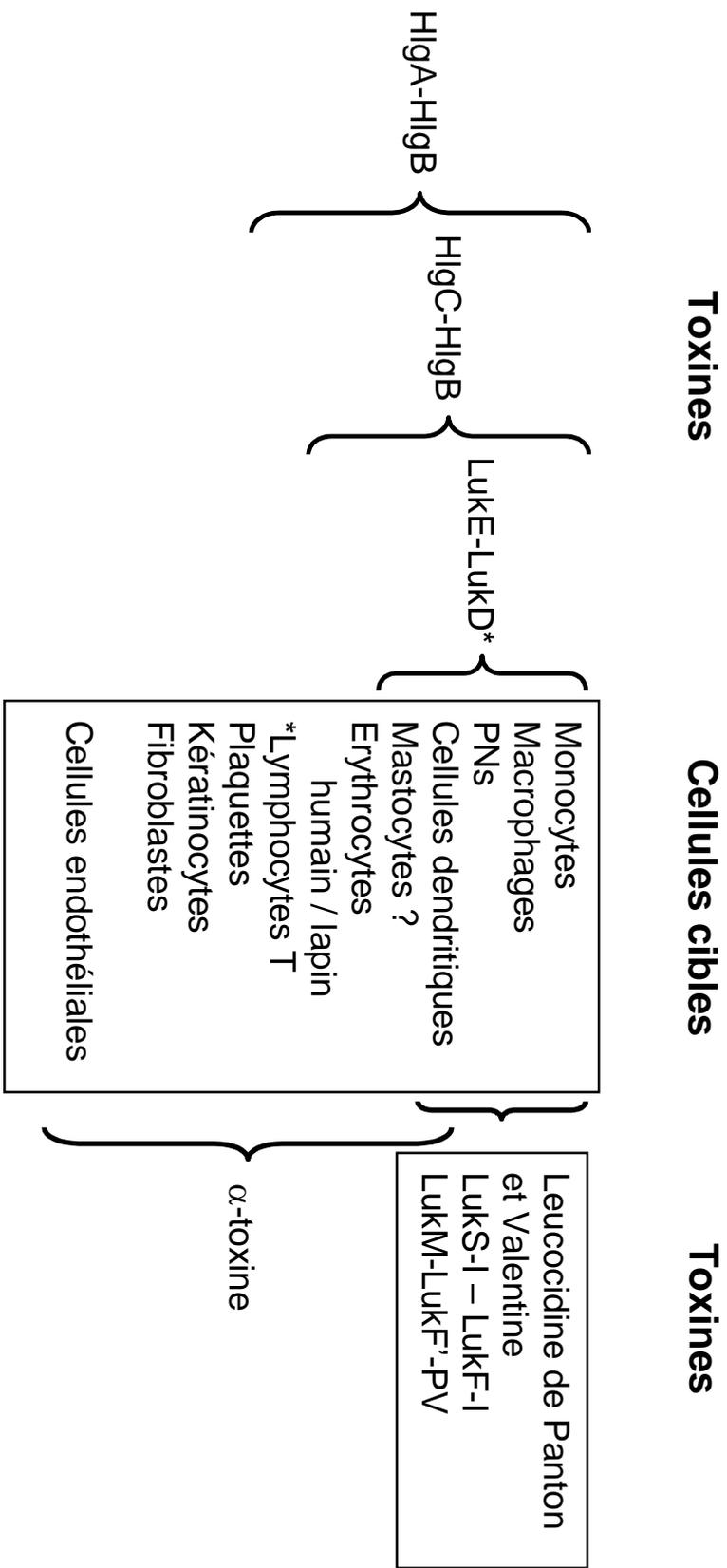


Figure 1.17 : Spectre d'action des leucotoxines de *S.aureus*.

coll., 1999a; Prévost et coll., 1998). Sur 392 isolats de *S. aureus*, 22,4 % étaient producteurs de la LPV.

Le gène codant la LPV est porté par un bactériophage Φ PVL (Kaneko et coll., 1998). L'émergence de souches résistantes à la méthicilline (SAMR) produisant cette toxine constitue un accroissement du risque de morbidité et implique une vigilance accrue dans la thérapeutique (Vandenesch et coll., 2003).

La LPV a une spécificité restreinte aux monocytes, macrophages et polynucléaires neutrophiles humains et de lapins (**Figure 1.17**) (Gladstone et Van Heyningen, 1957). Elle est active sur les métamyélocytes et sa lignée (Meunier et coll., 1995). L'injection intradermique de la LPV provoque une lésion dermonécrotique (Ward et Turner, 1980). Ces auteurs montrent que la LPV est essentiellement active contre les neutrophiles polynucléaires, les monocytes et les macrophages d'homme et de lapin. La LPV a été caractérisée et séquencée au laboratoire (Prévost et coll., 1995c).

2.4. La gamma-hémolysine

La γ -hémolysine rassemble deux toxines distinctes : HlgA-HlgB et HlgC-HlgB (Guyonnet et Plommet, 1970; Kamio et coll., 1993; Prévost et coll., 1995c; Taylor et Bernheimer, 1974). Les deux composés de classe S (HlgA et HlgC) et le composé de classe F (HlgB) sont codés par un locus de 3 gènes dont 2, *hlgC* et *hlgB*, sont co-transcrits (Cooney et coll., 1993). Son locus, *hlg*, a été caractérisé par Cooney (Cooney et coll., 1993). HlgA-HlgB a un large spectre d'activité (**Figure 1.17**) alors que HlgC-HlgB ne lyse pas les lymphocytes T et est moins actif sur les érythrocytes humains (Gauduchon et coll., 2001). De toutes les leucotoxines connues, HlgA-HlgB est la plus active sur membrane synthétique (PC:Cho, 1:1) (Ferrerias et coll., 1998). La γ -hémolysine est produite par 99 % des souches cliniques de *S. aureus* (Mahoudeau et coll., 1997). Supersac et coll., ont montré qu'une souche déficiente en *hlg* se multiplie plus lentement et produit une inflammation moindre dans un modèle d'endophtalmie chez le lapin (Supersac et coll., 1998). Ceci a été également confirmé par Dajcs et coll. (Dajcs et coll., 2002). La paire HlgC-HlgB est aussi cytolytique pour une grande variété de PNs et hémolytique pour les hématies de lapin seulement (Nariya et coll., 1997; Prévost et coll., 1995c; Tomita et Kamio,

1997). Sa capacité à former un pore dans les vésicules lipidiques est réduite par rapport au couple HlgA-HlgB (Ferrerias et coll., 1998).

2.5. La leucocidine R

Cette toxine est produite par la souche *S. aureus* P83 isolée d'une mammite bovine. Par rapport à la LPV, la leucocidine R a une activité leucotoxique dix fois inférieure sur les granulocytes humains, mais cette dernière est cent fois supérieure sur les granulocytes de bovins. Les activités hémolytiques et leucotoxiques de la leucotoxine R sont comparables à celles de la gamma-hémolysine. Elle a initialement été décrite en 1973 par Soboll et collaborateurs (Soboll et coll., 1973), mais pourrait correspondre à la gamma-hémolysine, LukM-LukF' ou une combinaison secondaire de ces toxines génériques.

2.6. LukM-LukF'-PV like

En 1995, Choorit et collaborateurs purifient une protéine, LukM produite par la souche *S. aureus* P83 (Choorit et coll., 1995). La séquence protéique montre une identité de séquence de 62 % à 67 % avec les autres protéines de classe S. En 1997, les mêmes auteurs ont caractérisé une protéine LukF-PV-like (ou LukF'-PV) qui possède 79 % d'identité de séquence avec LukF-PV (Kaneko et coll., 1997). Cette toxine n'est pas produite par des souches de *S. aureus* isolées en pathologie humaine (Kaneko et coll., 1997). Elle a été produite par deux souches de *S. aureus* isolées de mammites bovines. Le couple LukM-LukF' est faiblement leucotoxique sur les PMNs d'homme et de lapin (**Figure 1.17**). Aucune des 27 souches testées à partir d'isolats humains ne produit cette toxine (Gravet et coll., 1998). Seuls deux spécimens sur 21 testés provenant de mammite bovine produisent ce couple toxique (Gravet et coll., 1998).

2.7. LukS-I-LukF-I

Le gène codant pour LukS-I-LukF-I est présent dans probablement toutes les souches de *S. intermedius* (Prévost et coll., 1995a). La présence de cette toxine dans une autre espèce bactérienne, même très proche de *S. aureus* révèle le possible transfert et l'évolution de l'information génétique pour ces toxines. Cette leucotoxine est active sur les PN et les cellules dendritiques (**Figure 1.17**). *S. intermedius* est considéré comme un pathogène de la peau des

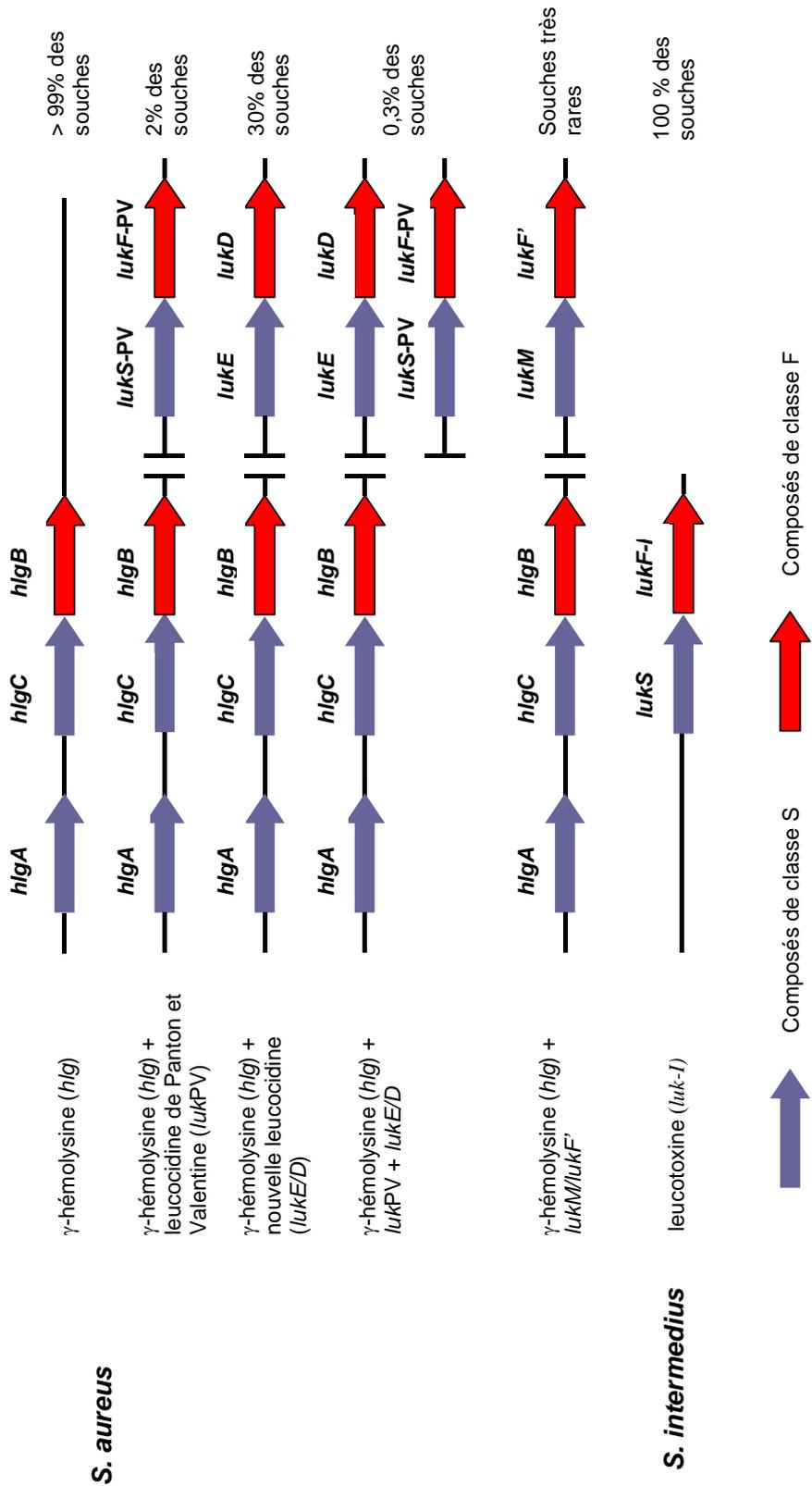


Figure 1.18 : La famille des leucotoxines de Staphylocoque. Schéma des différentes combinaisons des gènes chromosomiques codants et leur fréquence.

petits carnivores et rarement isolée chez l'homme (Prévost et coll., 1995a).

2.8. LukE-LukD

Cette toxine a été identifiée dans la souche Newman (NTCC 8178), à cause de l'activité leucotoxique résiduelle dans les surnageants de culture d'un double mutant ne sécrétant ni la LPV, ni l'alpha et la gamma hémolysine (Gravet et coll., 1998). Elle est produite par environ 30 % des souches hospitalières de *S. aureus*. Elle est active sur les lymphocytes T en plus des PNs (**Figure 1.17**). LukE-LukD est isolée chez plus de 75 % des souches de *S. aureus* responsables d'impétigo bulleux, elles-mêmes productrices d'épidermolysines A ou B (Gravet et coll., 2001). Elle est aussi isolée de 93,6 % des souches de *S. aureus* associées à une diarrhée post-antibiothérapie elles-mêmes productrices d'entérotoxine (>80% pour l'entérotoxine A) (Gravet et coll., 2001).

2.9. Organisation génétique et caractères biochimiques des leucotoxines à 2 composés

Les protéines constitutives des leucotoxines sont réparties en deux classes : les protéines de classe S et les protéines de classe F. Tous les gènes correspondants ont été clonés en utilisant des sondes oligonucléotidiques dont la séquence a été déduite du séquençage de l'extrémité N-terminale, ou de peptides générés par une digestion à la trypsine des protéines purifiées (Gravet et coll., 1998; Prévost et coll., 1995a; Supersac et coll., 1993).

Tous les gènes codant les protéines de classe F sont localisés en aval de ceux codant les protéines de classe S et ne sont séparés que par une seule base, une thymine, formant un opéron (**Figure 1.18**). La seule leucotoxine présentant une organisation différente des autres est la γ -hémolysine qui est en fait constituée de deux entités leucotoxiques, HlgA+HlgB et HlgC+HlgB. Les gènes correspondants sont organisés en un locus, où *hlgA* précède de 400 pb *hlgC* et *hlgB*, qui sont contigus et co-transcrits. Pour tous les gènes codant les protéines de classe F, un site rbs (site de fixation des ribosomes) potentiel peut être observé. Il sert probablement à améliorer l'efficacité de la traduction en réduisant le temps de pause des ribosomes. Cela peut être également la trace d'une fusion ancestrale de deux gènes. Les

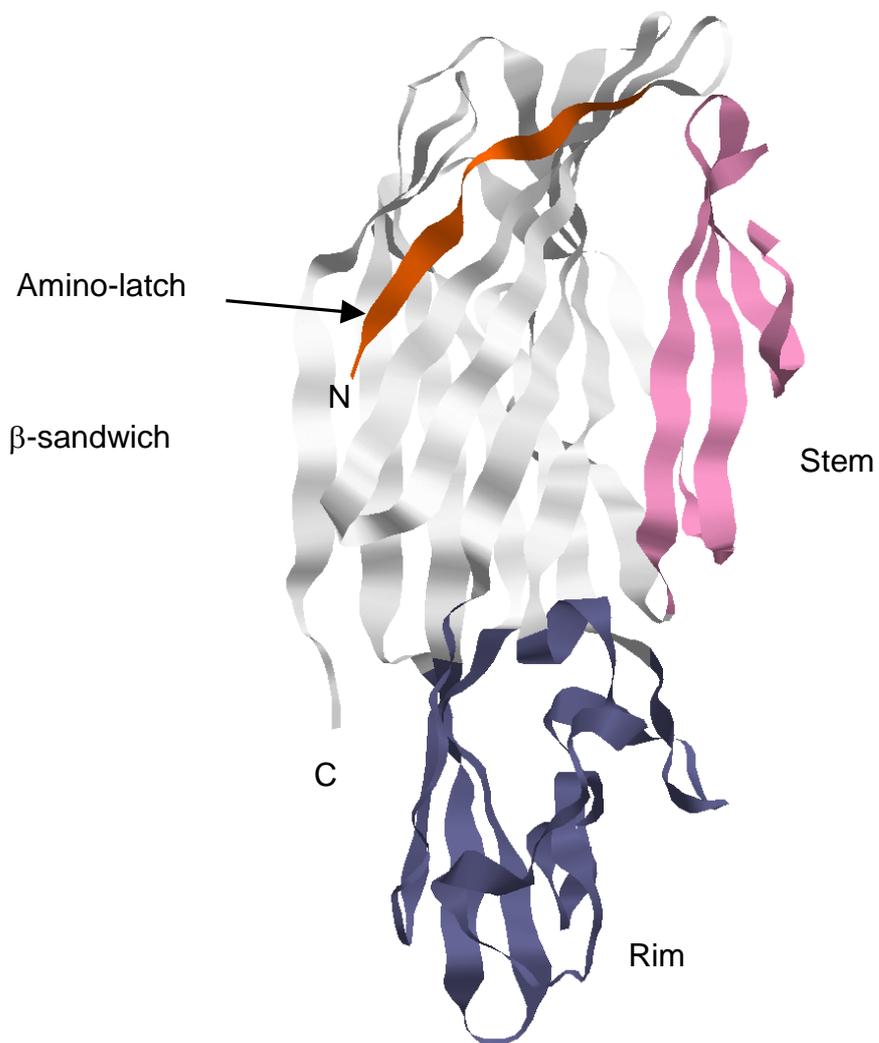


Figure 1.19 : Structure tridimensionnelle de LukF-PV (code PDB : 1PVL).

séquences promotrices sont généralement différentes, exceptée une séquence conservée, GN(T)TAAAA, localisée 31 à 35 bases en amont des codons initiateurs ATG (Prévost, 1999).

L'expression de ces gènes de virulence est régulée par des systèmes complexes, où les systèmes *agr* (accessory gene regulator) et *sarA* (staphylococcal accessory regulator) sont les deux principaux (Bronner et coll., 2004). Effectivement, l'expression des leucotoxines est réduite dans les souches défectives en gènes *agr* et *sar* (Bronner et coll., 2000).

Les leucotoxines sont maturées et sécrétées après la délétion d'acides aminés dans la portion N-terminale (Finck-Barbançon et coll., 1991). Ces protéines ont une structure globulaire, sont hydrosolubles et non liées en solution aqueuse. Elles sont sensibles aux faibles forces ioniques et agrègent aux pH inférieurs à 5,5. Elles sont thermolabiles ; par exemple, un chauffage de 10 min à 110°C inactive LukF-PV. Les mesures de la teneur en azote et l'absorption des UV ont montré que ces molécules sont de nature entièrement protéique et qu'elles ne contiennent aucun groupement glucidique (Gladstone et coll., 1962; Woodin, 1959, , 1960). Les deux composés S et F sont sensibles au formaldéhyde, utilisé pour la production d'anatoxines servant à immuniser les lapins (Cribier et coll., 1992a).

2.10. Structure tridimensionnelle des monomères solubles de leucotoxine

Les structures de LukF-PV (Pédelacq et coll., 1999), HlgB (Olson et coll., 1999), et LukS-PV (Guillet et coll., 2004a; Guillet et coll., 2004b) ont été résolues par cristallographie aux rayons X (**Figures 1.19, 1.21 et 1.22**). Ces structures mettent en évidence la parenté structurale entre les leucotoxines à deux composés et l' α -toxine (Song et coll., 1996). Cela accrédite l'hypothèse d'un ancêtre commun à toutes ces toxines. Comparée à la structure de l' α -toxine (**Figure 1.16**), celles des leucotoxines montrent une nécessaire modification conformationnelle du domaine central (Prévost et coll., 2005). Dans la forme hydrosoluble, il est replié en 3 brins β . Sa forme lipostable consiste en une longue boucle β . Comme toutes les β -PFTs décrites précédemment, les leucotoxines sont riches en brins β . Le plus grand domaine rassemble plus de la moitié de la séquence en un β sandwich de deux fois six brins β antiparallèles. Après association des monomères ces feuillettes forment le domaine « Cap » du pore heptamérique (Song et coll., 1996). Le domaine « Rim » est constitué de quatre brins β antiparallèles, de deux hélices- α et

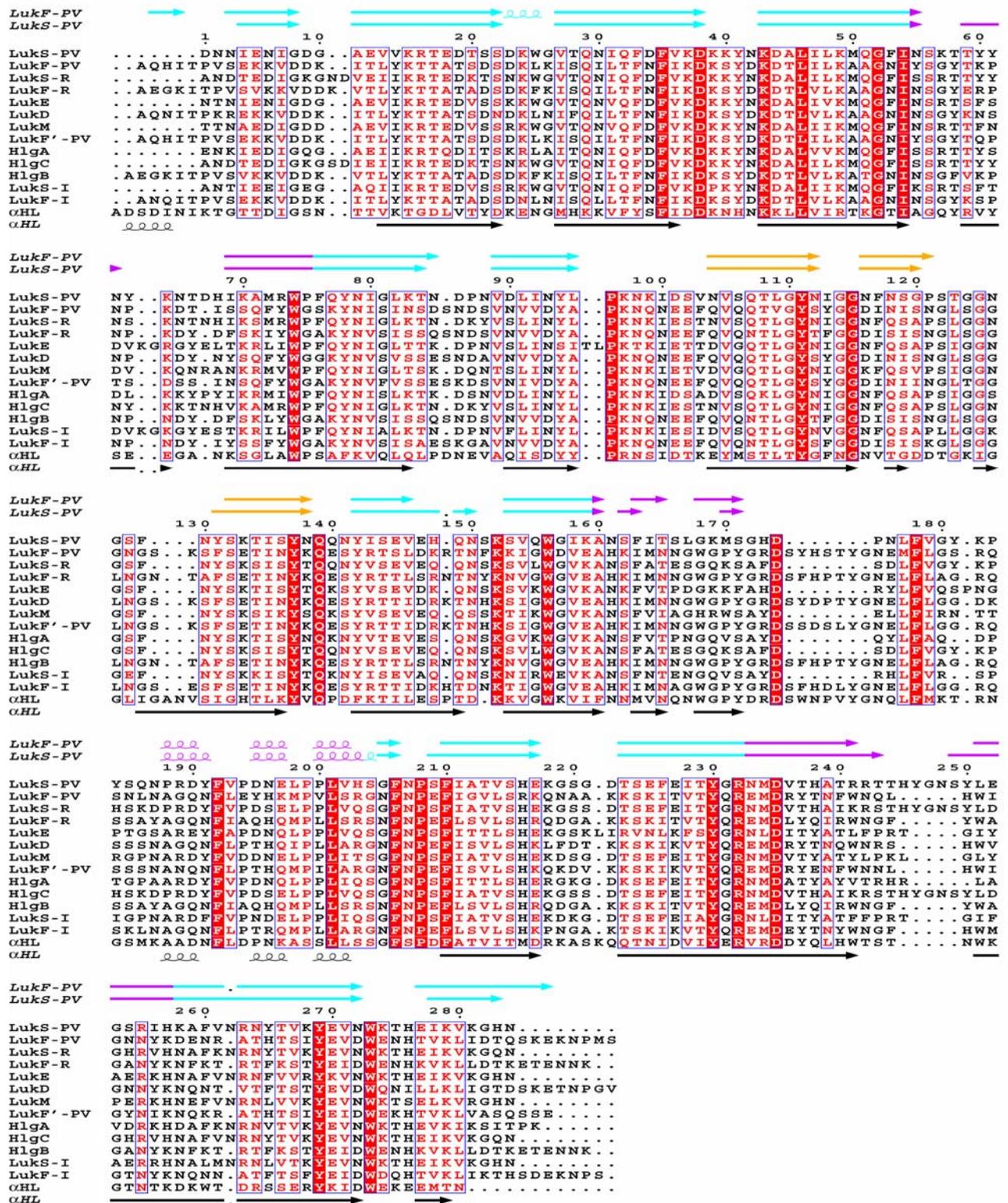


Figure 1.20 : Alignement de séquence basé sur la structure des protéines de classe F et S des leucotoxines à deux composés et de l' α -toxine (α -HL). Les protéines S et F de chaque leucotoxine sont groupées. La numérotation de la séquence est pour LukS-PV. Les homologies de séquence sont en rouge, tandis que les identités sont figurées en lettres blanches sur fond rouge. Les éléments de structure secondaires (flèches pour les brins β et spirales pour les hélices α) pour les protéines S et F de la LPV sont indiqués en haut, et ceux de l' α -toxine sont indiqués au-dessous. (D'après Guillet et coll., 2004)

de deux boucles oméga dont l'arrangement dépend de la protéine. Les structures tridimensionnelles des protéines de classe F, LukF-PV et HlgB, sont similaires, ce qui n'est pas étonnant étant donné leur forte homologie (72 % d'identité de séquence). Les variabilités de séquence induisent des différences au niveau des boucles du « Rim » et en C-terminal. Les domaines « Rim » et leurs boucles interagissent avec la membrane et quelques aminoacides sont peut être ancrés dans un environnement lipidique (Valeva et coll., 1997a; Vécsey-Sémjen et coll., 1997). L'organisation des domaines « Rim » est différente pour toutes les toxines dont la structure 3D est connue.

2.10.1. Structure tridimensionnelle de LukF-PV

LukF-PV est une protéine globulaire de forme allongée (**Figure 1.19**). Sa structure tertiaire est constituée de 22 brins β (64,4 %) et de trois courtes structures de type α ou 3_{10} (5,3 %). Elle forme trois domaines sur le modèle de l' α -toxine : le sandwich β qui forme le core de la protéine, le domaine « Rim » et le domaine « Stem » replié contre le sandwich β (Pédelacq et coll., 1999). Le sandwich β (résidus 1-61, 80-102, 154-169, 219-249 et 268-301) est formé de deux feuilletts β antiparallèles à six brins se faisant face et formant un angle moyen de 30° . Le domaine « Rim » (résidus 62-79, 170-218, et 250-267) est formé de quatre brins antiparallèles surmontés par un segment peptidique peu structuré (résidus 182-218). Celui-ci peut être décrit comme deux boucles consécutives suivies par les petits segments hélicaux chez LukF-PV. La superposition du core et du « Rim » de LukF-PV (Pédelacq et coll., 1999) avec celle de l' α -toxine (Song et coll., 1996) montre un certain nombre de différences. Cela est dû à une rotation de la molécule de $10,7^\circ$ suivie par une translation de $0,19 \text{ \AA}$ le long de l'axe de rotation. Ce mouvement peut être relié aux changements conformationnels qui surviennent dans la région du « Stem » pendant l'insertion membranaire (Valeva et coll., 1995; Ward et coll., 1994). Une autre différence se situe au niveau du « Stem » : dans LukF-PV, il est constitué de trois brins β antiparallèles, alors que pour l' α -toxine, il est formé de deux brins β antiparallèles. Ces structures sont en fait représentatives d'étapes différentes de la formation du pore transmembranaire : LukF-PV correspond au monomère soluble sécrété par la bactérie, alors que la structure de l' α -hémolysine représente le pore transmembranaire final. De plus, l'extrémité N-terminale ou « amino latch » est différente dans les deux toxines. Elle fait douze

aminoacides de long chez LukF-PV contre quatorze pour l' α -toxine, et s'intègre parfaitement au β sandwich alors que dans l' α -toxine, cette région contribue à la stabilité de l'édifice heptamérique par le biais d'interactions entre protomères adjacents, proches de la lumière du pore (Song et coll., 1996). Ces interactions paraissent essentielles puisque la délétion des deux aminoacides N-terminaux entraîne une perte de l'activité biologique sur le globule rouge de lapin (Walker et coll., 1992). En revanche, cela n'est pas le cas pour LukF-PV. La partie N-terminale de LukF-PV constitue le brin β le plus externe du domaine β sandwich. L'« aminolatch » de l' α -toxine n'a pas de structure secondaire définie. D'autre part, le pore transmembranaire formé par les leucotoxines résulte d'un assemblage hexamérique présentant des proportions équimolaires en composés F et S (Ferrerias et coll., 1998; Sugawara et coll., 1997). Un modèle de complexe hétéro-hexamérique de la LPV a été construit (Pédelacq et coll., 1999).

L'alignement de séquence de l' α -hémolysine, des protéines de classe F et de classe S révèle que les protéines de classe F partagent 70% d'identité entre elles et celle de classe S de 59 à 75%. Entre les classes, l'identité est de 26 à 30%. Les alignements multiples de séquence (**Figure 1.20**) montrent que de nombreux résidus sont conservés dans l' α -hémolysine, les protéines de classe F ou S. La position de ces résidus et leur contribution au repliement de la protéine ont été analysées en utilisant la structure 3D de LukF-PV. Ces résidus jouent un rôle structural important et peuvent être rassemblés en deux groupes. Le premier groupe comprend 12 résidus : Ile59, Tyr82, Tyr99, Pro101, Tyr149, Leu153, Trp164, Leu216, Phe221, Pro223, Phe225 et Tyr 245. Les chaînes latérales de ses résidus forment une zone hydrophobe continue impliquant tous les brins du sandwich β , excepté les 3 brins N-terminaux et les 2 C-terminaux. Cela induit une conservation du repliement en sandwich β dans toutes les protéines. Le deuxième groupe est localisé à la face inférieure du domaine « Rim » et est composé de huit résidus : Phe76, Trp78, Met192, Phe193, Phe207, Asp250, Tyr252 et Asn265. Leur conservation est importante dans le repliement du « Rim » (Pédelacq et coll., 1999).

La conformation étendue du « Stem » de LukF-PV a été modélisée sur le protomère de l' α -toxine et l'architecture s'appuie sur les caractéristiques géométriques et topologiques d'un tonneau β à 12 brins antiparallèles (Sansom et Kerr, 1995). Le diamètre interne et minimal du

pore modélisé (21 Å) est en accord avec les données expérimentales recueillies sur la γ -hémolysine et la LPV, qui présentent un diamètre fonctionnel compris entre 21 et 24 Å (Meunier et coll., 1997; Sugawara et coll., 1997).

2.10.2. Structure tridimensionnelle de HlgB

La structure de HlgB a été déterminée par Olson et collaborateurs (Olson et coll., 1999) et ne présente pas de grandes différences avec celle de LukF-PV (**Figure 1.21**). L'unique différence est dans l'extrémité N-terminale qui est constituée de deux brins β séparés par un repliement « random ».

2.10.3. Structure tridimensionnelle de LukS-PV

Cette structure a été résolue récemment (Guillet et coll., 2004b). Le repliement de LukS-PV consiste en 19 brins (63,7 % des résidus) formant une ellipse, et 4 feuillets β antiparallèles. Il consiste aussi en 3 courts segments d'hélices 3_{10} (2,6 %) ou α (1,5 %) (**Figure 1.22**). Ce repliement est très similaire à celui trouvé dans les structures cristallines de l' α -hémolysine, LukF-PV et HlgB. Elle est pareillement organisée en β sandwich, « Rim », et « Stem ». La superposition des structures de LukS-PV et LukF-PV est meilleure pour le β sandwich et le domaine « Stem » où presque tous les C α correspondent, que pour le « Rim » où l'on ne trouve que 58 % de correspondance. Les principales différences se trouvent donc dans quatre segments du domaine « Rim » (résidus 60-67, 168-174, 181-191, et 242-251). Les résidus 60-62 forment un brin β absent de la structure de LukF-PV et les résidus 63-67 relient ce brin au brin adjacent du feuillet β du « Rim ». Les résidus 168-171 constituent un court brin du feuillet β périphérique. Leurs positions sont affectées par le raccourcissement de la boucle suivante (172-175), dû à une délétion de sept aminoacides dans la séquence de LukS-PV. Les résidus 181-191 forment une boucle oméga qui est basculée par rapport à celle formée par les résidus 196-206 de LukF-PV. Enfin, les résidus 242-251 participent à une boucle qui relie les deux derniers brins β du feuillet β à quatre brins du « Rim ». Cette boucle est plus longue que celle de LukF-PV en raison de l'insertion de cinq résidus.

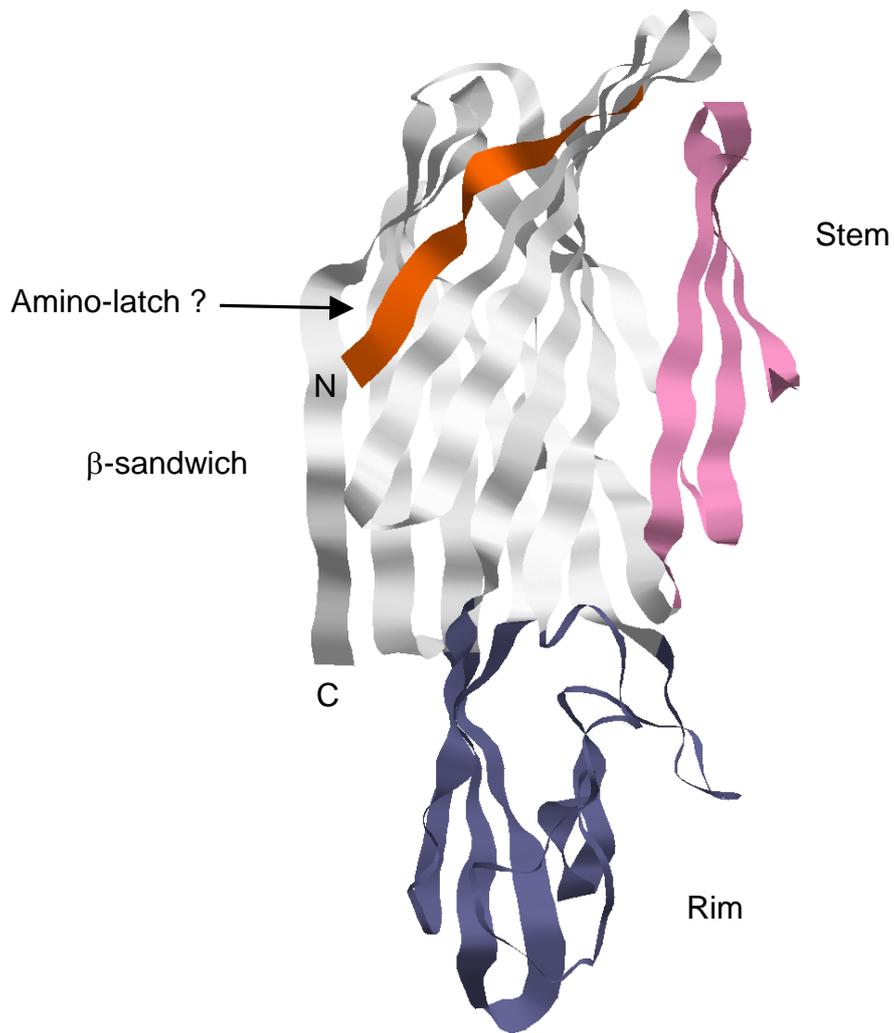


Figure 1.21 : Structure tridimensionnelle de HlgB (code PDB : 1LKf).

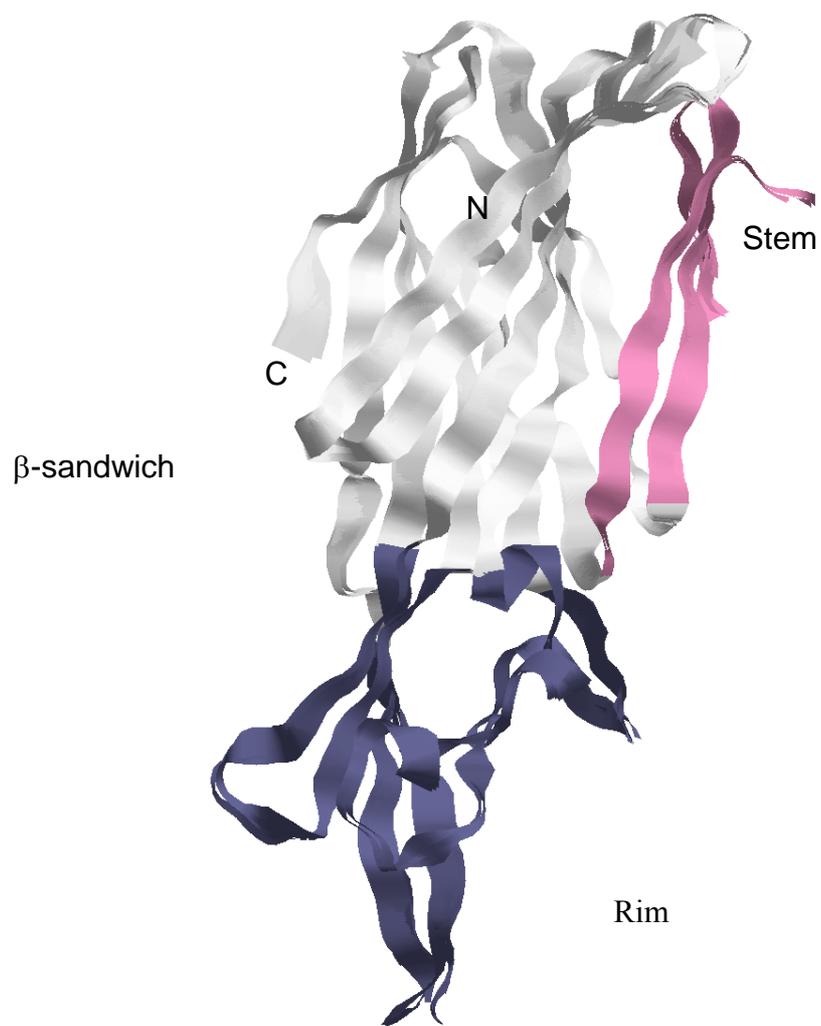


Figure 1.22 : Structure tridimensionnelle de LukS-PV (code PDB : 15TR).

L'alignement de séquence basé sur les structures de S et F (**Figure 1.20**) souligne quatre éléments importants: 1) les parties N- et C-terminales de tous les S séquencés sont identiques et sont plus courtes sur S que sur F ; 2) il y a deux insertions (positions 67 et 262) et deux délétions (positions 86 et 148) sur les composés de classe S ; le « Stem » des protéines S est plus court de deux aminoacides que celui des protéines de classe F ; 3) comme décrit plus haut, il y a une importante délétion (sept résidus) dans tous les composés S séquencés, tandis que l'insertion de cinq résidus n'est observée que dans la moitié des cas ; 4) l'hypervariabilité est concentrée aux extrémités N- et C-terminales du domaine β sandwich et tout le long du « Rim ». Ceci doit avoir une forte influence sur la fonction de la protéine, en particulier la spécificité de LukS-PV d'interagir avec les composés membranaires (Guillet et coll., 2004b).

2.11. Fixation des leucotoxines

Dans la circulation sanguine, il est possible que les leucotoxines lient les protéines solubles avec une faible affinité (Katsumi et coll., 1999). L' α -toxine et HlgB ont été co-cristallisées avec la phosphatidylcholine (PC), LukF-PV avec un tampon MES dont le squelette moléculaire est proche de PC. Pour LukF-PV, HlgB et l' α -toxine, les aminoacides conservés Asn173, Trp176, Tyr179, Glu191, Arg197 (numérotation de LukF-PV) délimitent une crevasse où Trp176 et Arg197 interagissent avec PC ou MES. Cette zone présente une conformation différente chez LukS-PV par rapport aux composés F et à l' α -toxine (**Figure 1.16**). Chez LukS-PV, la surface du domaine « Rim » est aplatie, moins globulaire, et la crevasse liant les phospholipides décrite plus haut est beaucoup plus large. Ainsi, LukS-PV, qui fut aussi co-cristallisé en présence de MES (Guillet et coll., 2004a) ne présente aucun des deux sites de liaison au MES présents chez LukF-PV. Ceci est également lié à des différences dans la séquence peptidique qui induit un environnement chimique différent. C'est pourquoi la liaison de phospholipides observée chez les composés F et l' α -toxine est impossible pour LukS-PV (Guillet et coll., 2004b).

Pany et coll., (2004) ont récemment montré une interaction de la cavéoline-1 avec un motif peptidique de l' α -toxine, incluant des résidus aromatiques (R) : RXXRXXXXR. Les auteurs

proposent que l' α -hémolysine interagit avec la cavéoline-1 des cellules de mammifère pour constituer son pore.

Le phorbol myristyl-acétate active la voie de la protéine kinase C. Gauduchon et coll. (2001) ont montré que cette molécule empêche la liaison de LukS-PV sur les PNs humains, restaurée par l'action de son inhibiteur, la staurosporine. Le nombre de sites de liaison à LukS-PV est d'environ 197000, avec un *Kd* apparent de 0,07 nM et un *Kd* apparent pour LukF-PV voisin de 2 nM. LukS-PV et HlgC entrent en compétition pour le même site de liaison, ce qui n'est pas le cas pour HlgA et LukE. Cependant, HlgA-HlgB est la leucotoxine la plus efficace sur les membranes synthétiques (Meunier et coll., 1997).

Ces observations suggèrent que l'activité de certaines leucotoxines dépend de la présence de récepteurs à la surface de la cellule et de la conductance du pore néoformé.

2.12. Formation du pré-pore

En présence de concentrations physiologiques de calcium, les leucotoxines induisent une entrée de calcium dans les PNs (**Figure 1.23**) (Finck-Barbançon et coll., 1993). Cette entrée de calcium peut être inhibée par l'EGTA, alors que l'entrée d'éthidium est maintenue. Des molécules comme l'éconazole ou le La^{3+} inhibent sélectivement l'entrée de Ca^{+} (Staali et coll., 1998). Certaines modifications dans le domaine « Stem » (mutations ou délétions) induisent un découplage entre les deux phénomènes (Baba-Moussa et coll., 1998 ; Werner et coll., 2002). Enfin, des doubles mutants cystéine ont été engendrés, afin d'empêcher le déploiement du domaine « Stem » et ainsi de bloquer la formation du pore (Nguyen et coll., 2002). Cela provoque un blocage de la formation du pore, mais le pré-pore continue à se former, soutenu par la pérennité de l'entrée de calcium. C'est pourquoi, il a été suggéré que l'entrée de calcium se faisait par une autre voie que celle du pore néoformé.

La stœchiométrie du pore a été étudiée par différentes techniques qui ont conduit à différents résultats. Tout d'abord, des oligomères d'une masse apparente de 200 kDa ont été mis en évidence sur des vésicules unilamellaires et sur des PNs humains, par SDS-PAGE sur des échantillons non chauffés (Ferrerias et coll., 1998; Werner et coll., 2002). Ces oligomères sont révélés par des anticorps anti-S et anti-F. Les deux protéines ayant une différence de masse

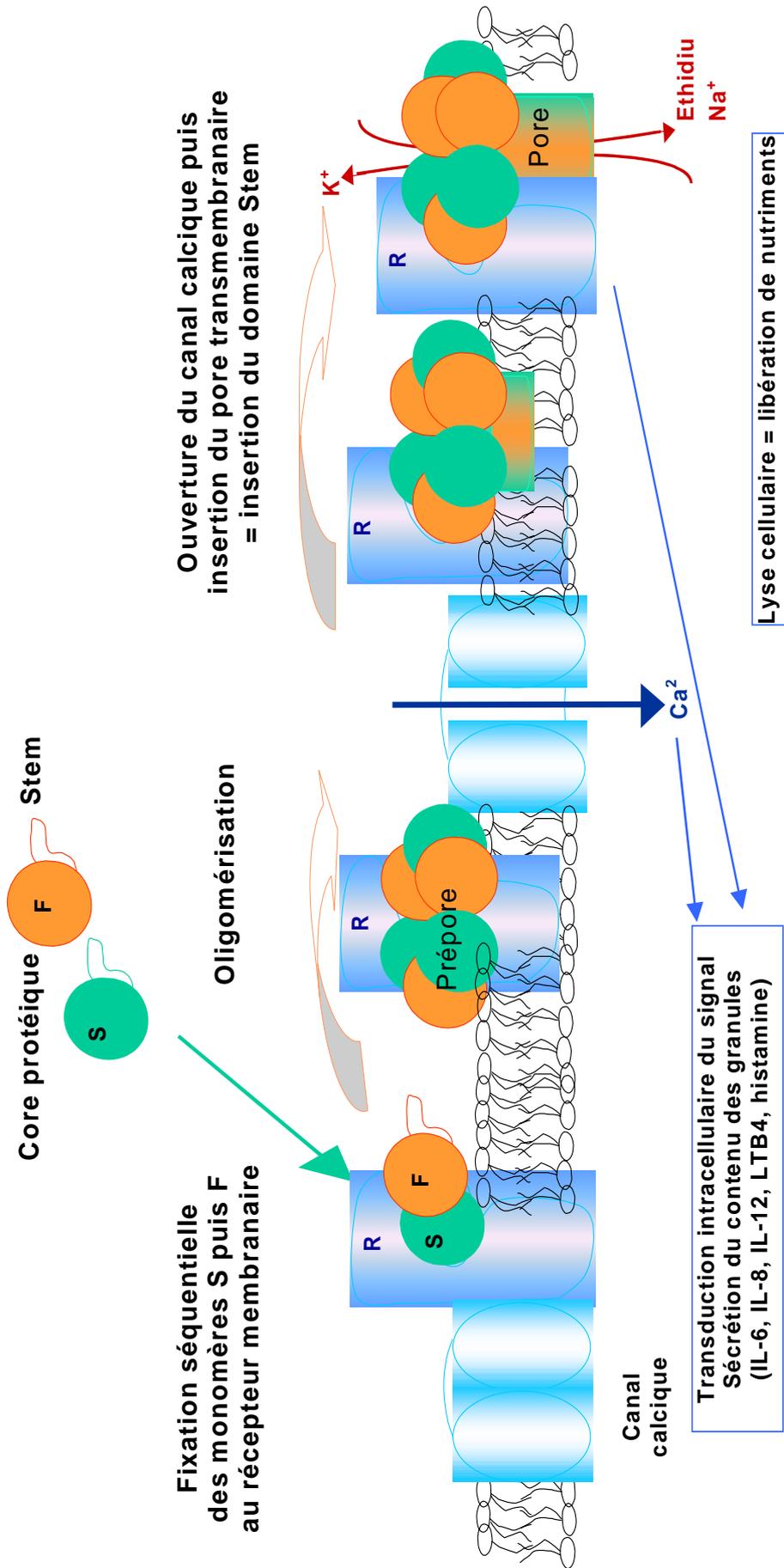


Figure 1.23 : Illustration du mode d'action des leucotoxines de *S. aureus*. **S** : protéine de classe S ; **F** : protéine de classe F ; **R** : récepteur membranaire.

moléculaire de 4 kDa, la formation d'homo-oligomères peut être exclue. La formation d'hexamères a été confirmée par microscopie électronique (Nguyen et coll., 2002) et par des expériences de FRET qui ont montré également l'alternance des monomères S et F dans l'oligomère (Nguyen et coll., 2003). Miles et coll., ont construit des dérivés de HlgC et HlgB avec les parties C-terminales qui conservent les propriétés biologiques des leucotoxines (Miles et coll., 2002). Des expériences de Gel-shift menées à partir de ces constructions plaident en faveur de la formation d'octamères. De plus, la substitution en cystéine de résidus localisés à l'entrée de la lumière du pore dans chacune des deux protéines met en évidence une modification en quatre étapes de la conductance, quand ces résidus sont mis en présence de (2-sulfoethyl) méthane-thiosulfonate. Ceci plaide encore pour la formation d'octamères. Meunier et coll., ont montré le rôle majeur joué par la T28 de LukF-PV (équivalente à H35 de l' α -toxine) dans la formation de l'oligomère (Meunier et coll., 1997).

2.13. Formation du pore

Après la formation du pré-pore, le « Stem » se déroule et forme le tonneau β transmembranaire, par un mécanisme encore indéterminé. Le diamètre du pore néoformé a été estimé par différentes techniques. Sugawara et collaborateurs ont trouvé un diamètre de 19-21 Å par microscopie électronique (Sugawara-Tomita et coll., 2002; Sugawara et coll., 1997). Baba-Moussa et coll. trouvent un diamètre équivalent en évaluant l'exclusion de polyéthylène glycol de pores formés par HlgA-HlgB (Baba-Moussa et coll., 1999b). L'osmoprotection réalisée par des molécules de polyéthylène glycol ou des sucres donnent différentes valeurs, mais sont homogènes quand on compare les différents couples de leucotoxines (Menestrina et coll., 2003). Ces valeurs sont environ 10 % supérieures à celles de l' α -toxine. Ceci peut être dû à la stœchiométrie différente ou aux différences de distribution des charges dans la lumière du pore. Les pores des leucotoxines sont plus sensibles aux cations monovalents (celui de l' α -toxine est légèrement anionique) et leur ouverture rompt le gradient Na^+/K^+ entre les côtés cis et trans de la membrane (**Figure 1.23**). Miles et coll (Miles et coll., 2001) trouvent que la conductance du pore formé par HlgC-HlgB est supérieure à celui de l' α -toxine (190 pS contre 90 pS dans 0,1 M NaCl, et 2,5 nS contre 0,775 nS dans 1M NaCl, respectivement). Les différences de charges dans la lumière du pore et l'effet de leurs combinaisons ont été étudiés par mutagenèse (Comai

et coll., 2002). Tandis que des charges positives sont trouvées à l'entrée du pore de l' α -toxine (Asp45, Asn49, Lys51), elles sont négatives pour les leucotoxines (Asp43, Asp47 ou Asn, Asp49). On peut inverser la sélectivité du pore en introduisant des charges positives à l'entrée du pore formé par HlgA-HlgB. Ce dernier acquiert ainsi une sélectivité comparable à celle de l' α -hémolysine. D'autres différences sont également trouvées à l'intérieur de la lumière du pore ; dans le pore HlgC-HlgB les charges négatives ne sont pas compensées. Il est possible, par substitution d'acides aminés, de générer des pores HlgA-HlgB avec une conductance similaire à celle du pore formé par HlgC-HlgB.

2.14. Réponse cellulaire aux leucotoxines

Les leucotoxines de Staphylocoque induisent nombre de réponses cellulaires liées à l'activation de la voie calcique (**Figure 1.23**) (Wang et coll., 1990). Elles induisent la sécrétion de facteurs chimiotactiques : le leucotriène B4 et d'Il-8 (Hensler et coll., 1994a) et leur expression (König et coll., 1994). L'histamine, molécule vasodilatatrice, est également produite (König et coll., 1995). Le processus inflammatoire est également renforcé par la sécrétion d'espèces réactives de l'oxygène de la part des PNs (Colin et Monteil, 2003). De nombreuses voies cellulaires conduisant à la sécrétion d'Il-6, d'Il-12 et d'enzymes (β -glucuronidase, lysozyme) sont impliquées (König et coll., 1995 ; Prévost et coll., 2003), mais des variations existent selon la leucotoxine (König et coll., 1997). La LPV est le couple le plus actif suivi de LukS-PV-HlgB, mais HlgA-HlgB semble être le couple le moins inducteur. Ces résultats sont en accord avec la forte association de la LPV à des nécroses tissulaires (furoncles). Les leucotoxines pourraient aussi induire l'apoptose (Köller et coll., 1993). Il est évident que la lyse cellulaire augmente la libération de ses médiateurs. Tous ces événements sont cohérents avec ceux observés durant une furonculose ou une pneumopathie d'origine communautaire due à *S. aureus* : influx de leucocytes, vasodilatation et nécrose tissulaire (Cribier et coll., 1992 ; Couppié et coll., 1997). Une injection intradermique de LPV induit des lésions nécrotiques cutanées chez le lapin (Cribier et coll., 1992), mais pas chez la souris. Les recherches menées sur la voie d'une transduction des signaux ont mis en évidence l'implication de protéines G hétérotrimériques (Hensler et coll., 1994b) qui participent à l'activation cellulaire. Ces protéines G seraient différentes selon le couple leucotoxique mis en jeu (Stali et coll., 1998).

3. Conclusion sur les toxines formant des pores.

Les toxines formant des pores ont développé différentes stratégies pour assumer la coexistence de deux conformations différentes et à première vue incompatibles : une forme hydrosoluble dans laquelle la toxine est véhiculée de la bactérie à la cellule cible et une forme membranaire dans laquelle la toxine exprime sa virulence. Les α -PFTs masquent leurs régions transmembranaires par un repliement dans la forme hydrosoluble. Ces régions transmembranaires sont très hydrophobes et ont une conformation en hélices amphipathiques dans les deux formes. En revanche, les β -PFTs sont obligées de s'associer en oligomères pour accumuler suffisamment de surfaces hydrophobes permettant l'insertion membranaire. Les boucles β de chaque monomère s'associent avec leurs voisines venant des autres monomères durant le stade pré-pore. Ainsi, elles ménagent une large surface hydrophobe de la forme d'un tonneau β qui traverse la membrane. De nombreux facteurs, présents dans les membres des deux familles, peuvent déclencher l'interaction de la toxine avec la membrane. Par exemple, un pH bas rend certaines toxines hydrophobes (toxine diphtérique) et/ou déclenche un changement conformationnel (colicine A, toxine diphtérique, exotoxine A de *P. aeruginosa*, PA de *B. anthracis*). La présence de cavités à l'intérieur du repliement tridimensionnel peut aider au changement conformationnel (colicines, PFO). La localisation de résidus aromatiques à la surface de la molécule est un autre élément qui peut faciliter l'ancrage à la membrane (α -hémolysine, PFO). Dans de nombreux cas, les toxines peuvent former des pores sur des membranes artificielles, suggérant par là que les récepteurs jouent un rôle accessoire à l'insertion membranaire. Les CDCs sont une exception évidente à cette règle.

Il reste beaucoup de choses à apprendre des PFTs, par exemple, sur le rôle partagé d'éventuels récepteurs et des lipides membranaires dans la toxicité. Quelques PFTs sont toxiques à des concentrations sublytiques. Les récepteurs liés à la toxine jouent-ils un rôle dynamique - de signalisation ? Comment les toxines modifient leur conformation pour s'insérer à la membrane ? Les pores sont-ils purement protéiques ou les lipides de la membrane ont-ils dans la formation du pore un rôle plus important dans sa structuration que communément admis ?

Contrairement à l' α -toxine et à l'aérolysine qui forment des pores par homo-heptamérisation, les leucotoxines forment des pores grâce à l'action synergique de deux composés

individualisés, l'un dit de « classe S » et l'autre dit de « classe F ». Chacune des deux protéines possède une fonction particulière ne serait-ce que par l'interaction avec des ligands membranaires particuliers, et certainement dans les événements conduisant à la formation des pores. Les spécificités cellulaires des différents couples sont sans doute également à relier aux particularités des composés. De plus, des expériences menées sur des membranes d'érythrocytes laissent penser à la formation d'un hexamère dans lequel les protéines S et F seraient disposées en alternance (Nguyen et coll., 2003).

Une autre particularité des leucotoxines est qu'elles sont à la fois activatrices des fonctions cellulaires par l'intermédiaire d'un flux de calcium, et capables de former des pores lytiques, les deux activités étant indépendantes (Staali et coll., 1998).

Les PFTs pourraient représenter de bonnes cibles pour de nouveaux antibactériens. Dans d'autres cas, elles peuvent être une composante d'une « balle magique » pour attaquer des cellules malades (Pastan et Kreitman, 2002). Une autre application est la création de biosenseurs comme déjà réalisés chez l' α -hémolysine (Bayley et Cremer, 2001). Un unique pore est placé sur une bicouche lipidique plane. Une différence de potentiel électrique est mise en place et le courant passe à travers le pore, porté par les ions présents dans la solution saline qui baigne les deux côtés de la bicouche. Le pore contient un site de liaison à la molécule que l'on étudie. A chaque fois que la molécule se lie au pore, le courant est modifié. La fréquence de l'événement renseigne sur la concentration de la molécule, tandis que le type de courant (durée moyenne et amplitude) est spécifique de son identité (Bayley et Cremer, 2001).

Ainsi, les β -PFTs offrant une certaine robustesse structurale, des toxines modifiées ont été conçues, induisant la formation de pores présentant des conductances variables en fonction de différents environnements, de nouvelles charges à l'intérieur du pore, ... Par exemple, des pores sensibles aux UV (Chang et coll., 1995), ou des pores protéases-sensibles (Panchal et coll., 1996), ont déjà été créés. Une α -toxine modifiée avec 5 histidines produit un pore dont l'activité peut-être supprimée par quelques micromoles d'ions zinc, et restaurée par un agent chélateur comme l'EDTA (Braha et coll., 1997; Walker et coll., 1994a). Ce type de stratégie a été testé pour générer un nombre limité de pores dans des expériences d'osmo-protection de cellules par le thréhalose, permettant leur survie après congélation ou anhydrobiose (Prévost,

2005b). Les expériences de « Biosensing » ont permis notamment le développement de pores permettant la détection de molécules organiques (Gu et coll., 1999).

Ces toxines constituent donc un modèle intéressant à étudier du fait de l'association synergique des deux composés, et de leur mode d'action original. La compréhension de ce mode d'action et de la manière dont les monomères interagissent permettra de développer des stratégies pour inhiber l'action de ces toxines. Ceci passera sans doute par la formulation de molécules inhibitrices de la fixation des monomères et / ou de l'interaction entre eux. L'intérêt thérapeutique de telles molécules serait alors évident.

B. OBJECTIFS DE LA THESE

La compréhension des mécanismes d'action des leucotoxines à deux composés passe par l'étude des relations structure-fonction de ces toxines. Le travail s'articule en trois parties :

- l'étude du rôle de la partie N-terminale des leucotoxines LukS-PV/LukF-PV au cours de la formation du pore. Les structures tridimensionnelles de LukF-PV et de LukS-PV montrent un domaine « Stem » central composé de 3 brins β accolés au domaine central de la protéine. La partie N-terminale fait partie de ce β sandwich dans la formation hydrosoluble des protéines. L'extrémité N-terminale de LukS-PV est sensiblement plus courte que celle des autres composés F ou de l' α -toxine. Chez cette dernière toxine, l'extrémité N-terminale interagit avec deux monomères adjacents dans la partie supérieure de la lumière du pore. L'extrémité N-terminale de l' α -toxine est également très sensible aux substitutions d'acides aminés ou aux délétions. Nous avons testé l'importance du déploiement de la partie N-terminale de LukS-PV/LukF-PV en amarrant cette partie, par des doubles mutants cystéine, au β sandwich adjacent et observé l'évolution de leurs propriétés fonctionnelles.

- la détermination des acides aminés de HlgA/HlgB en interaction lorsque le pore est constitué. L'histidine 35 est essentielle dans l'interaction des monomères de l' α -toxine ; cette position correspond à la T28 de HlgA qui, mutée en acide aspartique, est incapable de lier HlgB. Nous avons ainsi cherché les acides aminés en interaction sur la première interface, et notamment les positions de HlgB pouvant faire face à HlgA T28. La stabilisation de cette interaction HlgA/HlgB par la production d'hétérodimères chimiquement purs et biologiquement actifs est une étape de validation de ce travail

- la dernière partie du travail concerne le mode d'action d'éventuels inhibiteurs des leucotoxines de staphylocoque.

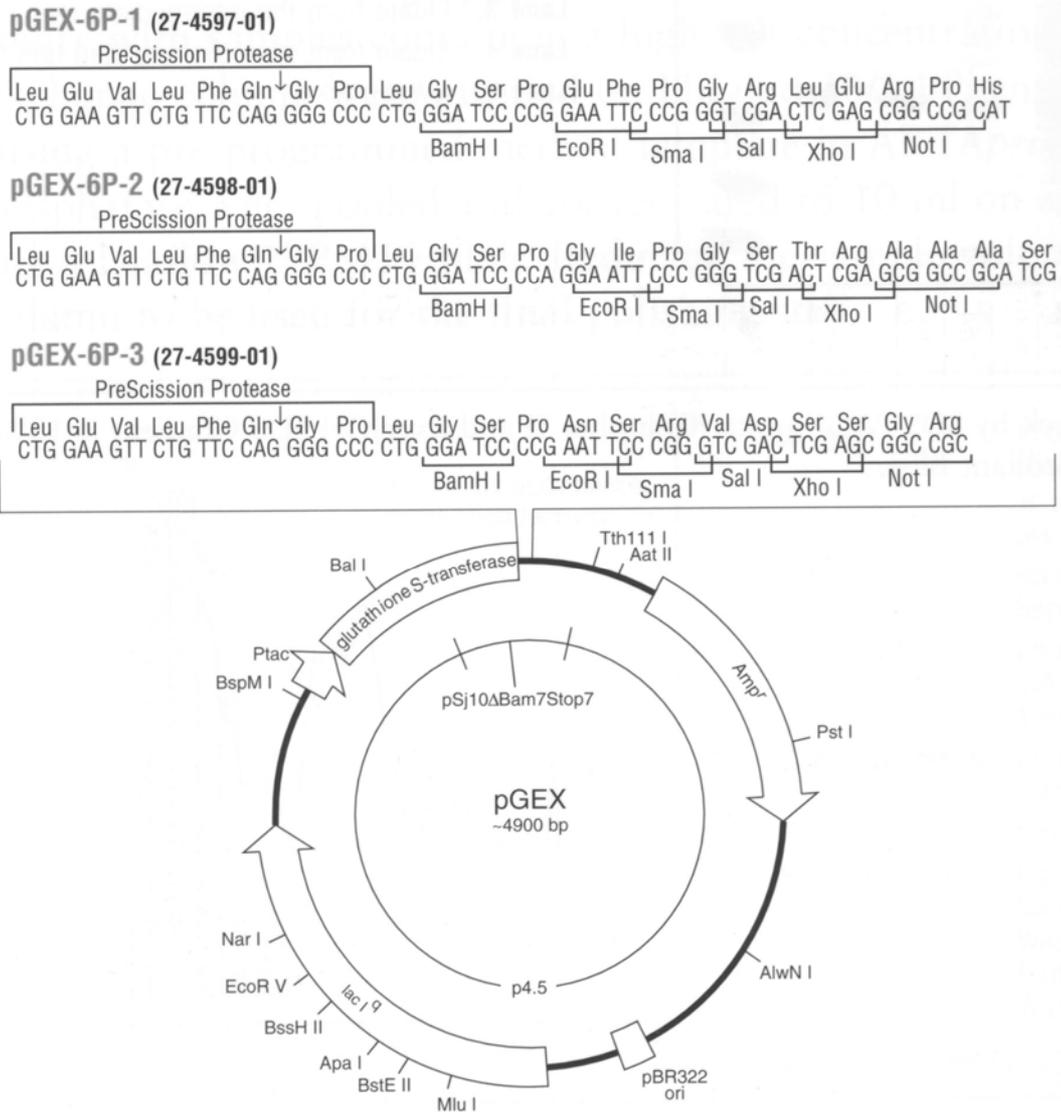


Figure 2.1 : Le vecteur d'expression pGEX 6P-1.

CHAPITRE II – MATÉRIELS ET MÉTHODES

A. MATÉRIELS

1. Les souches bactériennes

- *Escherichia coli* : Epicurian *coli* XL1-Blue supercompetent (Stratagene, Montigny-le-Bretonneux, France). Ces cellules ont une grande aptitude à la transformation, ce qui permet d'obtenir des clones recombinants à partir de faibles quantités d'ADN.

Génotype : *recA1, endA1, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac* [F'*proAB, lacI^qZΔM15, Tn10(Tet')*].

- *Escherichia coli* **BL21**

Cette souche est utilisée pour l'expression des protéines de fusion à partir du plasmide pGEX (Amersham-Biosciences, Orsay). Les cellules compétentes se conservent pendant plusieurs semaines dans du glycérol 10% (v/v) à -80°C.

Génotype : F⁻, *ompT, hsd(r_B⁻, m_B⁻), gal*

2. Le vecteur d'expression pGEX6P-1 (figure 2.1)

C'est un vecteur de 4980 pb contenant le gène codant la glutathion-S-transférase (GST) et une cassette de clonage située en 3' de ce gène. Les séquences clonées dans les multiples sites de clonage du vecteur pGEX6P-1 peuvent être exprimées sous forme de protéines de fusion avec la GST située à leur extrémité N-terminale (Smith et Johnson, 1988). Cette expression est effectuée grâce à l'induction du promoteur *ptac* situé en amont du gène codant la GST. La protéine de fusion exprimée dans le vecteur pGEX6P-1 peut être purifiée facilement par chromatographie d'affinité sur colonne de Glutathion Sepharose 4B (Amersham-Biosciences, Orsay). Ce vecteur contient un site spécifique reconnu par la PreScission™ Protéase

(Amersham-Biosciences, Orsay) et situé entre le gène codant la GST et la cassette de clonage. Il contient également la séquence du gène *lacI*^q.

3. Les milieux de culture

- **Milieu 2 x TY (Trypcase-Yeast extract)** : 1,6% (p/v) bio-trypcase (BioMérieux), 1% (p/v) extrait de levure (Oxoid), 0,5% (p/v) NaCl pH 7,4. Le milieu gélosé contient 1,5% (p/v) d'agar.
- **Milieu 2 x TYA** : milieu 2 x TY dans lequel on rajoute 100 µg/mL d'ampicilline.
- **Milieu M9**: 15 g/L Na₂HPO₄-12H₂O, 3g/L KH₂PO₄, 1g/L NH₄Cl, 0,5 g/L NaCl, 15g/L agar. Après autoclavage rajouter : 1 mL CaCl₂ 0,1 M, 1 mL MgSO₄ 1 M, 1 mL Thiamine-HCl 1 M, 2 mL Glucose 20 %.
- **Milieu de congélation des souches** : 90% (v/v) Brain Heart Infusion (Difco), 10% (v/v) glycérol (87 %).

4. Solutions et tampons

- **TEB 10 x** : 0,89 M Tris-base, 0,89 M acide borique, 25 mM EDTA-Na₂ (Titriplex III), pH 8,3.
- **TE** : 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA-Na₂, pH 8,0.
- **PBS** : 10 mM NaH₂PO₄, 1,5 mM Na₂HPO₄, 0,15 M NaCl pH 7,0.
- **Solutions pour la préparation d'ADN plasmidique (Plasmid-combi-kit, Qiagen)** :
 - **Tampon P1** : 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM EDTA-Na₂; 100 µg/mL RNase A
 - **Tampon P2** : 200 mM NaOH, 1 % (p/v) SDS

- **Tampon P3** : 3.0 M Acétate de potassium, pH 5,5
- **Tampon QC** : 1 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,0, 15 % (v/v) éthanol, [NaOH]
- **Tampon QBT** : 750 mM NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,0, 15 % (v/v) éthanol, 0,15 % (v/v) Triton X100, [NaOH]
- **Tampon QF** : 1,25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8,5, 15 % (v/v) éthanol.

- **Solution dénaturante de l'ADN 5x** : 25 mM EDTA-Na₂ pH 8,0, 20% (p/v) glycérol, 0,5% (p/v) lauroyl sarcosine, 0,1% (p/v) bleu de bromophénol. Cette solution permet de dénaturer l'ADN et sert de témoin de migration lors de l'électrophorèse sur gel d'agarose.

- **Tampon de migration SDS-PAGE** : 0,2 M Tricine, 0,2 M Tris-base, 0,55 % (p/v) SDS, pH 8,0 [HCl].

- **Solution mère de coloration au bleu de Coomassie** : 0,2g de bleu de Coomassie G250 R (Pharmacia), 60% (v/v) méthanol, QSP 200 mL avec H₂O.

- **Solution fille de coloration au bleu de Coomassie** : 50 % (v/v) de solution mère filtrée, 10 % (v/v) acide acétique, 30 % (v/v) méthanol.

- **Tampons utilisés pour la purification des leucotoxines (FPLC, Amersham-Biosciences) :**
 - **Purification de LukS-PV et mutants**
tampon A : 50 mM HEPES, 50 mM NaCl, pH7,5 [NaOH]
tampon B : 50 mM HEPES, 1M NaCl, pH7,5 [NaOH]
 - **Purification de LukF-PV et mutants**
tampon A : 30 mM MES, pH 6,3 [NaOH]
tampon B : 30 mM MES, 1M NaCl, pH 6,3 [NaOH]
 - **Purification de HlgA et mutants**
tampon A : 50 mM NaH₂PO₄, 200 mM NaCl, pH 7,0 [NaOH]
tampon B : 50 mM NaH₂PO₄, 1M NaCl, pH 7,0 [NaOH]

tampon C : 50 mM NaH₂PO₄, pH 7,0 [NaOH]

- **Purification de HlgB et mutants**

tampon A : 50 mM NaH₂PO₄, 1200 mM (NH₄)₂SO₄, pH7,0 [NaOH]

tampon B : 50 mM NaH₂PO₄, pH 7,0 [NaOH]

tampon de dialyse après purification : 20 mM HEPES, 500 mM NaCl, pH 7,5 [NaOH]

- **Purification des hétérodimères**

tampon A : 50 mM NaH₂PO₄, 1,2 M sulfate d'ammonium, pH 7,0 [NaOH]

tampon B : 50 mM NaH₂PO₄, pH 7,0 [NaOH]

tampon C : 50 mM NaH₂PO₄, 200 mM NaCl, pH 7 [NaOH]

tampon D : 50 mM NaH₂PO₄, 1 M NaCl, pH 7,0 [NaOH]

B. METHODES RELATIVES A L'ETUDE DE L'ADN

1. Les méthodes de préparation de l'ADN

1.1. Maxipréparation d'ADN par la méthode chromatographique (Plasmid combi kit, Qiagen)

Cette méthode permet de séparer l'ADN plasmidique de l'ADN génomique et de l'ARN grâce à une résine échangeuse d'anions très résolutive. La taille des pores (100 μm), la haute densité des groupements échangeurs d'anions (groupes DEAE) ainsi qu'une force ionique croissante réalisent cette purification (cf le protocole de Qiagen).

Une culture d'une nuit de bactéries transformées, cultivées dans 100 mL de milieu 2 x TYA, à 37 °C est centrifugée pendant 10 min à 5000 x g. Le culot bactérien est repris dans 6 mL de tampon P1. Le mélange est transféré dans des tubes d'ultracentrifugation. Les bactéries sont ensuite lysées par l'addition de 6 mL de tampon P2. Après 5 min d'incubation, le SDS est précipité par 6 mL de tampon P3 et la suspension devient visqueuse. Le milieu est laissé pendant 5 min à température ambiante puis centrifugé à 25000 x g, à 4 °C, pendant 40 min dans un rotor vertical (Ti 60 - Beckman). Ce surnageant est ensuite passé sur une colonne échangeuse d'anions (groupes DEAE-cellulose) préalablement équilibrée par 10 mL de tampon QBT. La colonne est ensuite lavée avec 2 x 10 mL de tampon QC. L'ADN est alors élué avec 7 mL de tampon QF, puis 20 mL d'éthanol sont ajoutés et le milieu est centrifugé pendant 10 min, à 5000 x g, à 4°C. Le culot est séché et repris dans 350 μl de tampon TE. On y ajoute 350 μL de phénol, on agite et on centrifuge 5 min à 5000 x g. La phase supérieure aqueuse contenant l'ADN est récupérée et l'extraction est renouvelée une fois. Suivent ensuite 4 extractions à l'éther afin d'éliminer le phénol de la phase aqueuse. L'ADN est enfin précipité en ajoutant 15 μL de NaCl 5 M et 1 mL d'éthanol absolu. On lave une fois le culot d'ADN avec de l'éthanol à 80% (v/v). Finalement, on reprend le culot d'ADN dans un volume de tampon TE nécessaire pour avoir une concentration de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

1.2. Maxi-préparation d'ADN plasmidique sur gradient de chlorure de césium

Une culture de 16H de bactéries transformées, cultivées dans 400 mL de milieu 2 x TYA, est centrifugée pendant 10 min à 10000 x g à 4°C. Le culot bactérien est remis en suspension dans 5,8 mL d'une solution 0,05 M Tris-HCl, 25 % (p/v) saccharose, pH 8,0, 5 mg/mL de lysozyme. Après 5 min d'incubation à 0°C sous agitation douce, 2,6 mL de 0,25 M EDTA-Na₂ pH 8,0 sont ajoutés. Ce traitement permet d'obtenir des protoplastes qui seront lysés pendant 20 min à 0°C par l'addition de 0,6 mL de tampon de lyse 2 % (v/v) Triton x 100, 0,05 M Tris-HCl, 0,06 M EDTA-Na₂, pH 8,0. Les lysats bactériens sont ensuite centrifugés à 50000 x g pendant 40 min à 6°C. Pour la purification définitive du plasmide, on ajoute au volume de surnageant 0,4 volume de 0,2 M K₂HPO₄ pH 8,0, 1 g/mL de CsCl, 0,01 volume d'une solution de Bet à 10 mg/mL.

Une centrifugation de 10 min à 3000 x g, à 4°C permet d'éliminer la plupart des débris bactériens et des lipides insolubles. Le surnageant est ensuite transvasé dans un tube scellable (Quick-Seal, Beckman), puis recentrifugé à 85000 x g, à 14°C pendant 18 H dans un rotor vertical (VTi 65, Beckman). Après la centrifugation, à l'équilibre de densité, deux bandes sont visibles. La bande plasmidique majeure, est inférieure (Maniatis et coll., 1989). Le plasmide est aspiré à l'aide d'une seringue. Le Bet est éliminé par 3 extractions dans un volume égal d'isopropanol contenant 15% (v/v) de TE. Trois volumes de tampon TE sont ensuite ajoutés, puis l'ADN plasmidique est précipité par 3 volumes d'éthanol. Le précipité est lavé à l'éthanol à 80%, séché et remis en solution dans 300 µl de tampon TE avant d'être soumis à une extraction au phénol, trois extractions à l'éther, puis une reprécipitation à l'éthanol. Après un dernier séchage, l'ADN plasmidique est resolubilisé à une concentration voisine de 1 µg/µl dans du tampon TE.

2. Modifications enzymatiques de l'ADN

2.1. Hydrolyses de restriction

Les digestions enzymatiques sont effectuées dans les conditions définies par les fournisseurs (New England Biolabs, Stratagene, Gibco-BRL).

2.2. Déphosphorylation des extrémités 5'-phosphate d'un plasmide

La réaction est catalysée par la phosphatase alcaline d'intestin de veau. Cet enzyme hydrolyse les groupements phosphates présents à l'extrémité 5' des ADN, ARN, ribo et désoxyribonucléotides. Cette réaction permet d'éviter la recircularisation des vecteurs sur eux-mêmes lors d'une ligation. Elle est effectuée dans 300 μ L de tampon 10 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,9 et 1 U d'enzyme pour 10 pmoles d'extrémités 5'-phosphate. Une incubation est effectuée pendant 45 min à 37°C, puis la même quantité d'enzyme est rajoutée et la réaction est prolongée pendant 45 min à 37°C. La réaction est stoppée en ajoutant 5 μ L de 0,25 M EDTA- Na_2 pH 8,0. L'enzyme est dénaturé par un chauffage de 10 min à 70°C, puis éliminé par une extraction au phénol à 70°C, par deux extractions au phénol-chloroforme (50/50) et trois extractions à l'éther. Deux volumes d'éthanol et 0,3 M NaCl sont ensuite ajoutés afin de précipiter l'ADN. Ce dernier est lavé à l'éthanol 80 % (v/v), séché et remis en solution dans du tampon TE à une concentration avoisinant 0,03 pmole/ μ L.

2.3. Ligation de deux fragments d'ADN

La réaction est catalysée par la T4 ADN ligase, un enzyme capable de former une liaison phosphodiester entre les extrémités 5'-phosphate et 3'-OH de deux fragments d'ADN. Le vecteur est préalablement linéarisé et déphosphorylé. Dans un volume final de 15 μ L contenant du tampon ligase (20 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 1 mM ATP, pH 7,4), un rapport molaire insert/vecteur égal de 3 à 5, et on ajoute 0,2 unité de T4 ADN ligase. Le milieu est incubé 16 h à 14°C avant d'être utilisé pour la transformation.

3. Electrophorèse de fragments d'ADN

Séparation des fragments d'ADN sur gel d'agarose

Le gel d'agarose (Agarose Type D-5, DNA Grade, Euromedex) est réalisé dans du tampon de migration 0,5 x TEB. Sa concentration varie de 0,8 à 1,5%, en fonction de la taille des fragments à séparer (Maniatis et coll., 1989). Avant le dépôt sur gel, 1/4 du volume de l'échantillon de la solution dénaturante est ajouté. Un marqueur de poids moléculaire est également déposé sur chaque gel. L'électrophorèse s'effectue dans le tampon de migration

pendant 2H à 8V/cm. Le gel est ensuite immergé pendant 10 à 15 min dans du 0,5 x TEB contenant 0,1 µg/mL Bet. Après une exposition aux ultra-violets, une photographie des fragments d'ADN ayant incorporé le BEt est prise.

4. Amplification d'un fragment d'ADN par la méthode de PCR

4.1. Principe de la méthode

L'amplification de fragments de gènes (Saiki et coll., 1988) est fondée sur le fonctionnement cyclique d'une ADN polymérase thermostable capable de copier un brin d'ADN utilisé comme matrice, en un brin complémentaire par élongation à partir de l'extrémité 3'-OH d'une amorce oligonucléotidique. Elle consiste à effectuer n cycles successifs d'amplification en utilisant des amorces de polymérisation complémentaires des extrémités qui encadrent le fragment d'ADN à amplifier. Chaque cycle se déroule en 3 étapes successives : dénaturation de l'ADN à 95°C, refroidissement à une température permettant l'hybridation des amorces, et l'élongation des amorces par la *Taq* ADN polymérase® (Roche) à la température optimale de l'enzyme. Le produit d'un cycle de polymérisation est utilisé pour le cycle suivant, ce qui aboutit à 2ⁿ fragments d'ADN amplifiés en théorie.

4.2. La réaction

La réaction s'effectue dans un milieu contenant 0,2 mM de dNTP, 10 µL de tampon PCR x 10 (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8,0), 6 µL de MgCl₂ 50 mM, 100 pmoles de chaque amorce, 1 µL (500 ng) d'ADN matriciel, 0,6 U d'enzyme, H₂O QSP 50 µL. Les tubes sont ensuite placés dans un thermocycleur programmable (Perkin Elmer 9700).

5. Mutagenèse dirigée par la méthode « Quick Change™ Site Directed Mutagenesis »

5.1. Principe de la Méthode

C'est une technique qui permet l'étude des relations structure-fonction des protéines, l'identification des régions intramoléculaires et des aminoacides importants pour ces fonctions,

l'expression des gènes. Contrairement à d'autres méthodes, cette technique permet d'appliquer la mutagenèse dirigée sur l'ADN double brin cloné de n'importe quel plasmide (jusqu'à 11kb). Elle est rapide et permet d'obtenir des mutants en quatre étapes avec un rendement de 80%. Le protocole est simple et permet d'utiliser l'ADN plasmidique issu de minipréparations ou d'une préparation sur gradient de chlorure de césium.

La technique du Quick Change™ Site directed Mutagenesis peut être utilisée pour faire des mutations ponctuelles, un changement d'acide aminé, une délétion ou une insertion de un ou plusieurs acides aminés. L'enzyme utilisée pour cette technique, la *Pfu* (*Pyrococcus furiosus*) DNA polymerase® est remplacée par l'Arrow *Taq* DNA polymerase®, et la T4 GP32 protein® (QBIogene). L'Arrow *Taq* DNA polymerase® est un mélange de *Taq* (*Thermus aquaticus*) DNA Polymerase® et *Tfu* (*Thermus furiosus*) DNA Polymerase® qui a la capacité de corriger les erreurs après synthèse (édition). La T4 gp32 protein® est une protéine isolée du phage T4 qui lie les simple brins d'ADN de façon non séquence spécifique en déstabilisant l'ADN double brin. Utilisée en combinaison avec l'Arrow *Taq* DNA polymerase®, la protéine gp32 augmente la fidélité de la PCR. Cette combinaison réplique donc les deux brins de l'ADN plasmidique avec une grande fidélité et à la température d'élongation de 68°C, elle ne déplace pas l'amorce oligonucléotidique portant la mutation à insérer. Cette méthode nécessite une faible quantité de matrice d'ADN au départ et un faible nombre de cycles, ce qui augmente le rendement de la mutagenèse dirigée et diminue les risques de mutations additionnelles.

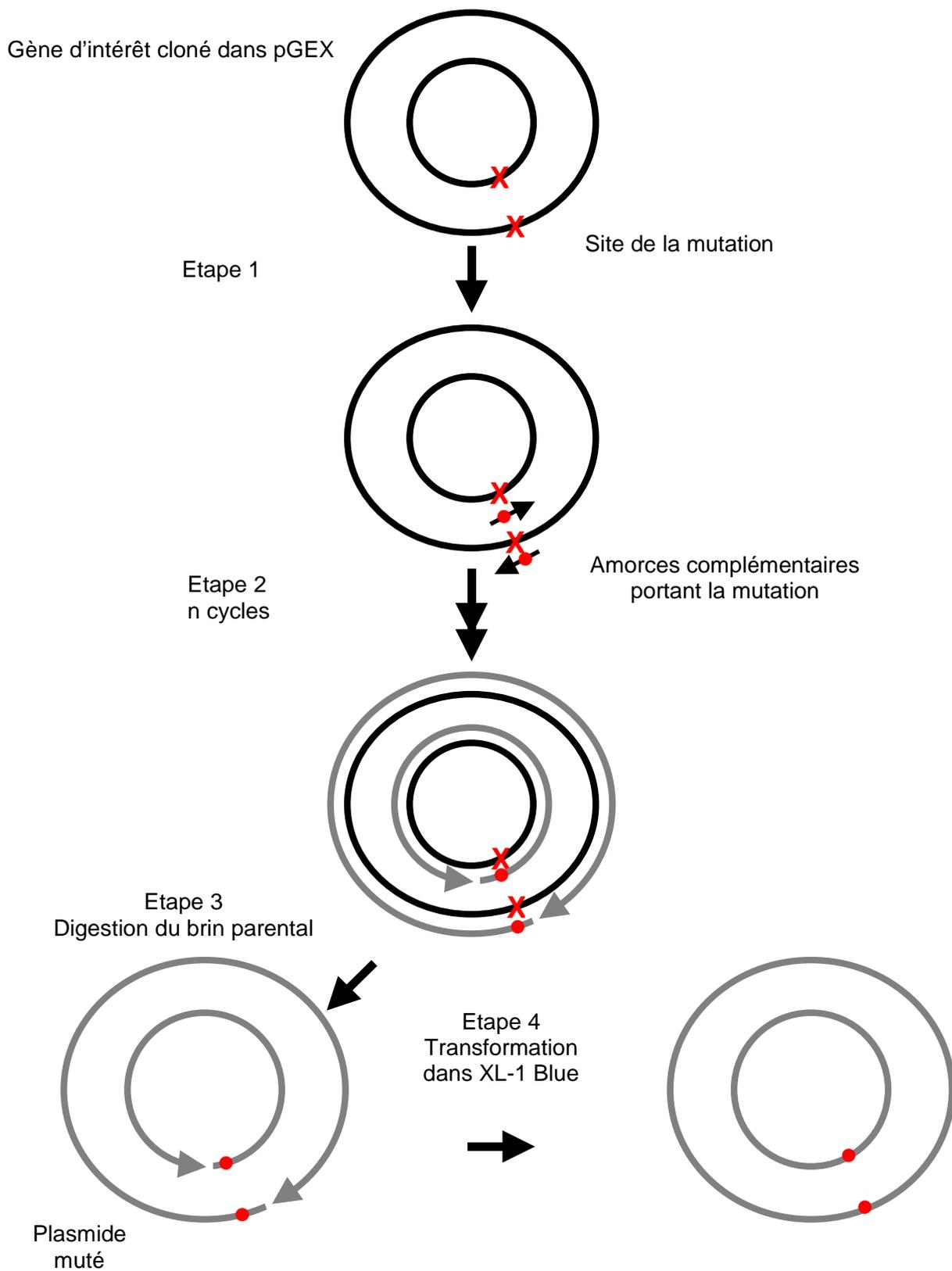


Figure 2.2 : Principe de la mutagenèse dirigée selon le protocole Quick ChangeTM Mutagenesis Kit (Stratagene).

La réaction se déroule en quatre étapes résumées dans la **figure 2.2**. Le plasmide contenant l'insert double brin est hybridé à deux oligonucléotides complémentaires à chacun de ses deux brins et portant la mutation désirée (étape 1). Ces oligonucléotides servent aussi d'amorce à la l'Arrow *Taq* DNA polymerase[®] qui synthétise les brins complémentaires (étape 2). Les brins néosynthétisés ne sont pas méthylés contrairement aux brins parentaux. L'endonucléase de restriction *DpnI* reconnaît alors la séquence 5'-Gm6ATC-3', elle est spécifique des ADN méthylés et hémiméthylés (McClelland et Nelson, 1992) (étape 3). Elle élimine ainsi les ADN parentaux double méthylés et les ADN hybrides hémiméthylés comportant un brin parental et un brin néosynthétisé. Il ne reste en principe dans le milieu que des molécules d'acides nucléiques doubles brins néosynthétisés non méthylés. Ces molécules seront ensuite transformées dans des bactéries supercompétentes de la souche d'*E. coli* XL1 Blue.

5.2. La réaction

La réaction s'effectue dans un milieu : 2,5 mM dNTP, 125 ng de chacune des deux amorces, 5 µL de tampon de mutagenèse x 10 (200 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄, pH 7,5, 1 % (v/v) Triton (x100, 1 mg/mL BSA), 5 à 50 ng de l'ADN matrice, 1 µL de Arrow *Taq* DNA polymerase[®], et 1 µL de T4 GP32 protein[®] (QBIogene) à (2,5 U/µL) et de l'eau QSP 50 µL. Les tubes sont placés dans un thermocycleur programmable (Perkin Elmer 9700). Après la réaction, 0,5 U de *DpnI* (10 U/µL) sont ajoutées et l'ensemble est incubé 1 H à 37°C. Le milieu est ensuite utilisé pour la transformation de cellules d'*E. coli* XL1 Blue supercompétentes (**cf B. 6. 2**).

5.3. Le criblage des mutants

Après transformation les colonies ayant poussé sont sélectionnées pour la préparation d'ADN plasmidique (**cf B. 1. 2. 1**). Les plasmides sont ensuite séquencés selon la méthode de Sanger (**cf B. 4**), afin de vérifier la présence de la mutation et l'absence de modification dans la séquence environnante.

6. Séquençage d'un ADN par la méthode de Sanger (T7 sequencing kit, Amersham-Biosciences)

6.1. Principe et application de la méthode (Sanger et coll., 1977)

L'enzyme utilisé est l'ADN polymérase du bactériophage T7. Cet enzyme est capable de synthétiser un brin d'ADN complémentaire d'une matrice à partir d'une amorce. Des réactions spécifiques (Amersham-Biosciences, sequencing kit) de chacun des quatre dNTP sont réalisées en présence du ddNTP correspondant. Les concentrations des dNTP, dont du [³⁵S] dATP, et des ddNTP permettent un arrêt statistique de la chaîne en cours de synthèse au niveau des 400-500 premiers résidus. Après une électrophorèse sur un gel dénaturant d'acrylamide-urée, les bandes sont visualisées par autoradiographie, c'est à dire par exposition d'un film (Fuji type RX medical) au gel de séquence pendant au moins 16 heures.

6.2. Gel de séquence selon Sanger (Sanger et coll., 1977)

Une solution à 7% (p/v) d'acrylamide-bisacrylamide (19/1), 6 M urée est préparée, désionisée par la résine AG 501-X8 (BioRad) (20 g de résine par litre de solution) à laquelle on ajoute 1 x TEB. Cent mL de cette solution sont ajoutés à 100 µL de TEMED et 600 µL de 10 % (p/v) persulfate d'ammonium puis versés entre deux plaques de verre (40 cm x 50 cm), séparées par des entretoises de 0,4 mm d'épaisseur et un peigne à dents effilées permettant le dépôt. Après 40 min de polymérisation, les plaques de verre sont disposées dans une cuve d'électrophorèse dont les réservoirs sont remplis de 1 x TEB. Les échantillons sont chauffés pendant 5 min à 75°C. La migration s'effectue pendant 2 ou 4 h sous une puissance électrique constante de 80 W. L'ADN contenu dans le gel est ensuite fixé et l'urée éliminée par un trempage de 40 min dans l'acide acétique 10%(v/v), et le gel est ensuite séché sous vide à 80°C avant d'être exposé en autoradiographie contre un film FUJI RX durant 16 H au moins.

6.3. Séquençage automatique par électrophorèse capillaire

Cette méthode est basée sur l'utilisation du kit ABIPRISM Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing KIT (Applied Biosystems) et de l'analyseur ABI3100.

Un à 2 μL de chaque aliquote de fragments amplifiés par PCR est déposé sur un gel d'agarose pour vérifier leur pureté. A 30 μL de mélange réactionnel PCR, 1 volume de 4,5 M d'acétate de sodium est ajouté, puis 6 volumes d'éthanol absolu froid. Après avoir bien mélangé, centrifugé 15 min à 12000 $\times g$ à 4°C, le surnageant est décanté. Le culot est lavé avec 500 μL d'éthanol à 70 % et le surnageant est lentement éliminé. Après séchage, le culot est repris par 10 μL d' H_2O et 1 μL de l'oligonucléotide de séquençage à une concentration finale de 20 μM .

7. Transformation des bactéries

7.1 Transformation de cellules Epicurian coli XL-1 Blue super-compétentes

A 65 μL de bactéries super-compétentes, on ajoute 0,80 μL de 2,5 M β -mercaptoéthanol et les cellules sont incubées 10 min à 4°C. Ensuite, 4 μL du milieu de ligation provenant de la réaction de PCR sont ajoutés et incubés 30 min à 4°C. Les cellules sont soumises à un choc thermique dans un bain-marie à 42°C pendant 45 s, puis remises à 4°C 2 min. On étale la suspension sur une boîte de Pétri contenant du milieu TYA gélosé et la boîte est incubée une nuit à 37°C.

7. 2. Transformation de *E. coli* BL21

Une culture de 100 mL d'*E. coli* BL21 est incubée à 37°C sous une agitation de 200 rpm dans le milieu 2 \times TY à partir d'une préculture de 3 mL dans le même milieu. Lorsque la $A_{600\text{nm}}$ atteint 0,5 à 0,7, on centrifuge 10 min à 2500 $\times g$. Le culot est resuspendu dans 10 mL d'une solution 50 mM de CaCl_2 . Les cellules sont laissées 30 min à 4°C, puis centrifugées à 2500 $\times g$, pendant 10 min à 4°C. Le culot est repris dans 2,5 mL de 50mM CaCl_2 . Ensuite, 2 ng de plasmide transformant sont ajoutés à 150 μL de bactéries. Suivent alors une incubation de 40 min à 4°C, puis un choc thermique de 2 min à 42°C. Après un refroidissement de 2 min à 4°C, les préparations sont étalées sur une boîte de Pétri contenant du milieu gélosé TYA et la boîte incubée une nuit à 37°C.

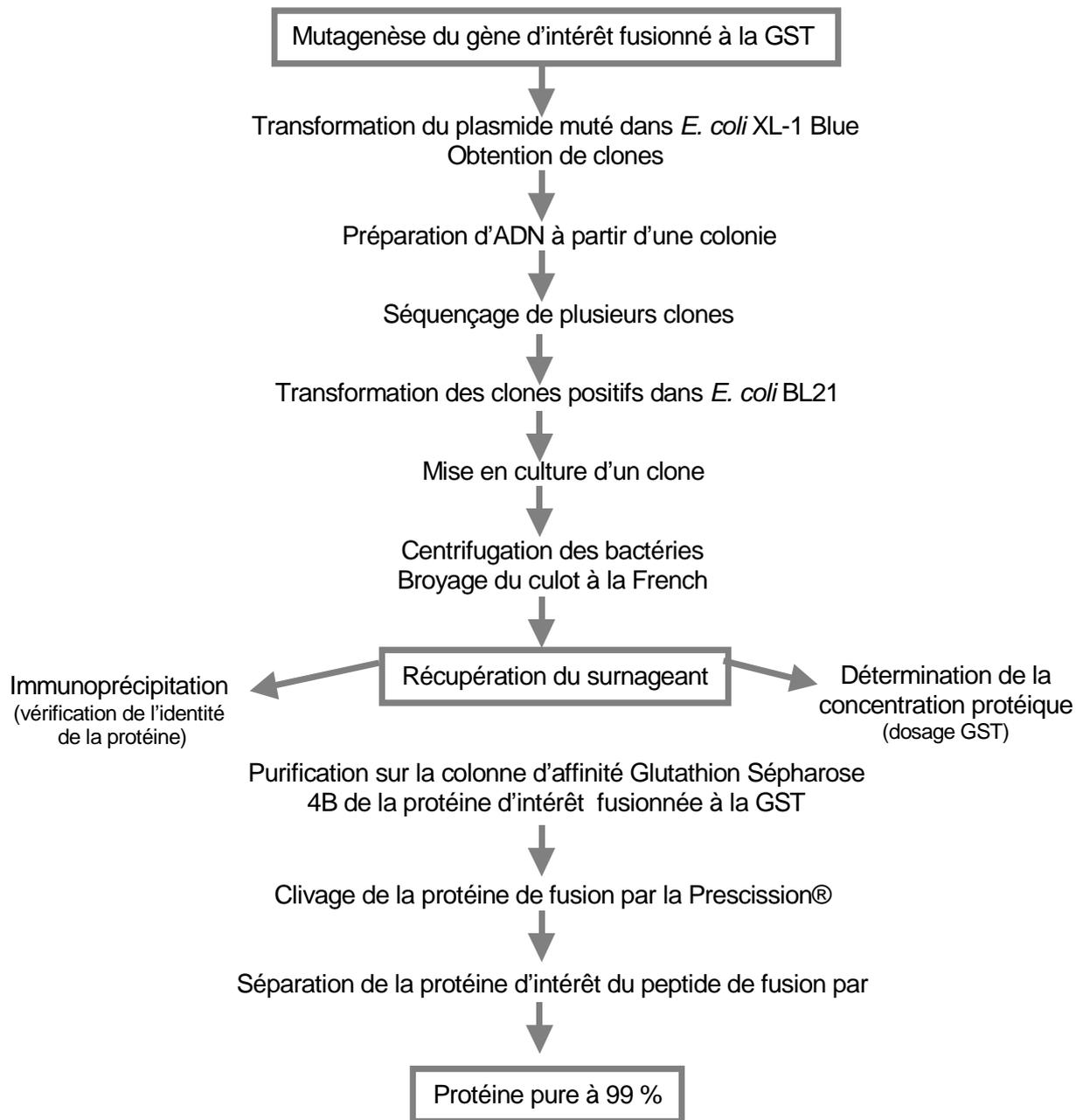


Figure 2.3 : Représentation schématique des différentes étapes conduisant à la purification des protéines mutées par la méthode des protéines de fusion

C. METHODES RELATIVES A L'ETUDE DES PROTEINES

1. Purification des leucotoxines sous forme de protéines de fusion à partir d'*E. coli* BL21

1.1. Principe de la méthode

Le système utilisé ici est la Glutathion-S-Transferase (GST) fusion protein System™ (Pharmacia). C'est un système qui permet la surexpression, la purification et la détection de protéines de fusion produites dans *E. coli*. Ce système consiste en 3 composés majeurs que sont le vecteur d'expression pGEX6P-1, le module de purification de la GST et le module de détection de la GST. La protéine de fusion est facilement purifiée à partir de lysat bactérien par une chromatographie d'affinité à l'aide d'une colonne de Glutathion Sepharose 4B. Le clivage de la protéine d'intérêt est effectué en utilisant la PreScission® Protease qui reconnaît une séquence spécifique (cf. 1.5.) située immédiatement devant la cassette de clonage du plasmide pGEX. La protéine de fusion est détectée par un dosage colorimétrique de la GST. Les différentes étapes, depuis la mutagenèse dirigée du gène d'intérêt cloné dans pGEX jusqu'à l'obtention de la protéine mutée pure, sont résumées dans la **figure 2.3**.

1.2. Obtention du lysat bactérien

Deux Erlenmeyers de 2 L contenant 400 mL de milieu 2 x TYA sontensemencés par 50 mL d'une préculture d'*E. coli* BL21 transformée par le plasmide recombinant pGEX6P-1, et incubés à 37°C sous une agitation de 200 rpm. Lorsque la DO_{600nm} atteint 0,4 à 0,6, l'expression du gène de fusion (*gst-X*) est induite avec 0,2 mM d'IPTG une nuit à 25°C. Le lendemain les bactéries sont centrifugées à 7000 x g pendant 10 min, à 4°C. Le culot est remis en suspension dans 35 mL de tampon PBS – EDTA 1mM. Les bactéries sont ensuite broyées à la French Press (French Pressure Cell Press, SLM AMINCO®) sous une pression de 600 bars. Le lysat bactérien est centrifugé pendant 30 min à 29000 x g, à 4°C dans un rotor Ti60 (Beckman). Le surnageant est récupéré et utilisé pour le dosage de l'activité enzymatique de la GST.

1.3. Dosage de l'activité enzymatique de la GST

La mesure de l'activité enzymatique de la GST permet d'estimer la concentration de la protéine de fusion présente dans le milieu. La GST catalyse une réaction de transfert du GSH sur le CNDB (Chloro-1, 2, 2 Dinitrobenzène) (Habig et coll., 1974). Le produit de cette réaction absorbe à 340 nm alors que le CNDB libre absorbe au maximum à 270 nm. La cinétique s'effectue dans une cuvette spectrophotométrique. Le milieu réactionnel contient :

- Eau distillée	880 µl
- Tampon de réaction x 10 (1 M phosphate de potassium, pH 6,5)	100 µl
- CNDB (100 mM dans de l'éthanol)	10 µl
- Glutathion réduit (100 mM dans de l'eau distillée)	10 µl
- Echantillon ou dilution 1/10, 1/20	10 µl

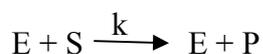
La cuvette est ensuite placée dans le spectrophotomètre et l'évolution de l'absorption est mesurée à 340 nm toutes les minutes pendant 5 min contre un témoin contenant tous les éléments sauf les 10 µl d'échantillon remplacés par 10 µl d'eau distillée (car même en absence de GST on assiste à une dégradation du substrat). Cette réaction est linéaire jusqu'à une $A_{340nm} = 0,8$. La concentration de GST contenue dans l'échantillon doit donc être ajustée en conséquence pour que la réaction reste linéaire au bout de 5 min. Cette concentration de GST est proportionnelle dans ces conditions à la vitesse de réaction ($\Delta A/min$) selon la relation suivante :

$$\Delta A_{340}/min/mL = \frac{A_{340}(t_2) - A_{340}(t_1)}{(t_2-t_1)(mL \text{ d'échantillon ajouté})}$$

où : $A_{340nm}(t_2)$ = densité optique à 340 nm au temps t_2 en min

$A_{340nm}(t_1)$ = densité optique à 340 nm au temps t_1 en min

Or, d'après l'équation de réaction enzymatique :



$V (\Delta A_{340}/\text{min}/\text{mL}) = k [E].[S]$, k constante

avec [E] concentration en enzyme, et [S] concentration en substrat

Lors du dosage, [S] est constante et la dilution (d) de l'enzyme est connue, on a :

$V_i = k'.[E].d$ avec $k' = 1/545 (\text{A}/\text{min}/\mu\text{g}/\text{mL}^{-1})$

On extrait ensuite facilement la concentration en enzyme [E] en $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$.

1.4. Purification de la protéine de fusion sur colonne de Glutathion Sépharose 4B

La résine de Glutathion Sepharose 4BTM (Amersham-Biosciences) est préalablement équilibrée avec 5 volumes de 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA-Na₂ pH 7,2. Le gel est ensuite mélangé avec le surnageant de culture (4 mg d'équivalent GST/2 mL de gel), puis agité doucement pendant 30 min à 4°C. Le mélange est ensuite centrifugé pendant 5 min à 200 x g puis décanté à 2 volumes de gel. Le gel est ensuite coulé dans une colonne PD10 (Amersham-Biosciences, Saclay) et lavé avec 10 volumes de tampon 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA-Na₂, pH 7,2. La protéine de fusion est éluée avec 4 volumes de tampon d'éluion (60 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 30 mM GSH, pH 8,0). Les différentes fractions sont récoltées et la DO_{280nm} est mesurée. La présence de la protéine d'intérêt peut être vérifiée par immunoprécipitation.

1.5. Clivage de la protéine de fusion par la PreScission® Protease

La PreScission® Protease (Amersham-Biosciences, Saclay) est une protéine de fusion constituée par la protéase 3C du Rhinovirus humain de type 14 et la GST de *Shistosoma Japonicum*. Cette protéase a un PM de 46 kDa. La séquence reconnue par la PreScission® Protease est composée de : Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln↓Gly-Pro (Walker et coll., 1994b). Elle coupe entre la Gln et la Gly. Son maximum d'activité se situe entre pH 7,0 et 8,0 et à basse température (5 à 15 °C). La réaction s'effectue dans du tampon 1 x PBS ou dans un tampon : 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA-Na₂, 1 mM DTT, pH 7,0 à 2 °C. Il faut 10 à 100 unités de protéase par mg de protéine de fusion. Elle dure 15 min lorsqu'on utilise 100 U /mg de protéine de fusion à 5°C ou 4 à 16 heures lorsqu'on utilise 10 U/mg à 5°C. Cette étape de digestion a été optimisée ; elle s'effectue sur une nuit à + 2°C avec 5 U d'enzyme par mg de protéine de fusion.

A ce stade, l'échantillon contient environ 40 % de protéine d'intérêt, 40 % de GST et 20 % environ de produits contaminants. Il convient donc de purifier cet échantillon par chromatographie.

1.6. Purification des composés leucotoxiques (LukS-PV et LukF-PV, HlgA) par chromatographie échangeuse d'ions

Un échangeur d'ions est constitué d'une matrice insoluble sur laquelle sont fixés des groupes chargés à caractère acide ou basique. La neutralité électrique est assurée par des ions de signes contraires (contre-ions) qui peuvent être réversiblement échangés avec d'autres ions de même signe électrique apportés par la phase mobile. L'échange d'ions est applicable à toute molécule ionisée. Dans le cas des protéines, une partie des acides aminés qui les composent possède des groupements résiduels acides ou basiques conférant à la molécule un caractère de polyélectrolyte amphotère exploité en chromatographie d'échange d'ions. La somme algébrique de ces charges, la charge nette de la protéine, varie en fonction du pH. Le pH pour lequel la charge nette de la protéine est nulle est le point isoélectrique pI. La variation de l'interaction avec la concentration en ions compétiteurs (contre-ions) et le pH sont exploités pour adsorber puis éluer sélectivement la protéine.

La leucotoxine clivée de sa protéine de fusion est dialysée (excepté pour HlgA+8) contre le tampon de charge. Elle est ensuite capturée à l'aide d'une colonne avec 6 mL de gel ReSource S (Amersham-Biosciences, Saclay) intégré dans un système FPLC puis élue dans un gradient continu de NaCl. Les tampons utilisés contiennent tous 1 mM de DTT lorsqu'une cystéine est présente dans la protéine.

1.6.1. Purification de LukS-PV et ses mutants

La colonne est équilibrée avec 10 mL de tampon A (50 mM HEPES, 50 mM NaCl, pH 7,5 [NaOH]), puis on passe 2 mL de NaOH 0,5 M suivis de 10 mL de tampon A (à 2 mL/min). L'équilibrage se poursuit avec 20 mL de tampon B (50 mM HEPES, 1M NaCl, pH 7,5 [NaOH]) (à 4 mL/min) et finalement 30 mL de tampon A.

L'échantillon est préparé de la façon suivante : il est dilué pour éviter sa précipitation dans le tampon A jusqu'à un volume final de 40 mL, puis il est dialysé ensuite au moins 2 heures

(SpectraPor 1 de 3,3 mL/min) contre 2 L de tampon A. On applique l'échantillon sur la colonne (à 4 mL/min). La GST est éluée dans l'isocratique.

L'élution se fait dans le gradient suivant à 4 mL/min : 1 min 0%B, 12,9 min 18%B, 13 min 100% B, 18 min 100% B. La protéine S+8 est éluée vers 10% à 11% (150 mM NaCl).

1.6.2. Purification de LukF-PV et ses mutants

La colonne est équilibrée avec 10 mL de tampon A (30 mM MES, pH 6,3 [NaOH]), puis on passe 2 mL de 0,5M NaOH suivis de 10 mL de tampon A (à 2 mL/min). L'équilibrage se poursuit avec 20 mL de tampon B (30 mM MES, 1M NaCl, pH 6,3) (à 4 mL/min) et finalement 40 mL de tampon A.

L'échantillon est préparé de la façon suivante : il est dilué dans le tampon de dialyse (10 mM MES, pH 6,2 [NaOH]) pour éviter la précipitation jusqu'à 40 mL. On dialyse au moins 2H (SpectraPor 1 3,3 mL/cm) contre 2 L de tampon de dialyse. Avec un tampon 500 mM MES pH 6,3 on amène la concentration de MES à 30 mM. On applique ensuite l'échantillon sur la colonne (à 4 mL/min). La GST n'est pas retenue par la colonne et est donc éluée dans l'élution isocratique.

L'élution se fait dans le gradient suivant à 4 mL/min : 1 min 0% B, 1,5 min 3% B, 13 min 14% B, 14 min 100% B, 19 min 100% B. La protéine F+8 est éluée vers 10% (100 mM NaCl).

1.6.3. Purification de HlgA et ses mutants

La colonne est équilibrée avec 10 mL de tampon A (50 mM NaH₂PO₄, 200 mM NaCl, pH 7,0 [NaOH]) puis on passe 2 mL de NaOH à 0,5M suivis de 10 mL de tampon A (à 2 mL/min). L'équilibrage se poursuit avec 20 mL de tampon B (50 mM NaH₂PO₄, 1M NaCl, pH 7,0 [NaOH]) (à 4 mL/min) et finalement 40 mL de tampon A. La colonne est prête à recevoir l'échantillon qui est préparé de la façon suivante : il est dilué dans un tampon 50 mM NaH₂PO₄, pH 7,0 [NaOH] (tampon C) pour amener la concentration en NaCl de l'échantillon à 200 mM (concentration initiale environ 500 mM NaCl) puis on augmente le volume à 50 mL avec le tampon A pour éviter la précipitation.

On applique l'échantillon sur la colonne (à 4 mL/min). La GST n'est pas retenue par la colonne, donc elle est éluée dans l'élution isocratique.

L'élution se fait selon le gradient suivant à 4 mL/min : 1 min 0% B, 3,8 min 20% B, 16,4 min 50% B, 17 min 100% B, 22 min 100% B. La protéine A+8 est éluée vers 39% (510 mM NaCl). La pureté est vérifiée en SDS PAGE 10-15% (p/v) PhastSystemTM (Amersham-Biosciences, Saclay) coloré au bleu de Coomassie à 25 µM. L'identité de la protéine ($A_{280\text{nm}} = 0,2$) est confirmée en IP avec des anticorps de lapin purifiés par affinité à $A_{280\text{nm}} = 3,0$. Les protéines purifiées sont stockées à -80°C ou +4°C, dans le tampon d'élution.

1.7. Purification de HlgB+8 et de ses mutants par chromatographie d'interaction hydrophobe

La séparation est ici basée sur l'interaction réversible entre les résidus apolaires d'une protéine et une matrice hydrophobe. La présence, en phase mobile, de sels à effet « salting out » monopolise les molécules d'eau pour leur solvation. Ainsi, ces sels provoquent un déplacement des molécules d'eau entourant les groupements hydrophobes des protéines et du ligand, et conduisent à une interaction ligand-récepteur favorable. L'élution s'effectue dans un gradient décroissant du sel utilisé : le sulfate d'ammonium le plus souvent. La chromatographie hydrophobe est fonction de la nature du ligand, du degré de substitution de la matrice, de la matrice elle-même, des sels utilisés, de leur concentration, du pH, de la température et d'éventuels additifs (solvants organiques, détergents, ...). L'échantillon, dans une phase mobile de force ionique importante, accroche la phase stationnaire dès son application. L'élution s'effectue par retour en phase aqueuse dans un gradient de force ionique décroissant.

La leucotoxine clivée de sa protéine de fusion est amenée à 1,2 M de sulfate d'ammonium (AS) avec une solution (50 mM NaH₂PO₄, 3 M (NH₄)₂SO₄, pH 7,0 [NaOH]). Elle est ensuite capturée à l'aide d'un gel SourceISOTM (Amersham-Biosciences, Saclay) intégré dans un système FPLCTM puis éluée dans un gradient décroissant continu d'AS. Les tampons utilisés contiennent tous 1 mM de DTT s'il y a présence d'une cystéine dans la protéine.

La colonne est équilibrée en passant 10 mL de tampon B (50 mM NaH₂PO₄, pH 7,0 [NaOH]) puis 2 mL de NaOH à 0,5 M suivis de 20 mL tampon B (à 2 mL/min) et finalement 20 mL de tampon A (50 mM NaH₂PO₄, 1200 mM (NH₄)₂SO₄, pH 7,0 [NaOH]) à 4 mL/min.

On applique l'échantillon sur la colonne (à 4 mL/min). La GST est éluée dans cette élution isocratique.

L'élution se fait selon le gradient suivant à 4 mL/min : 1 min 0% B, 2,2 min 20% B, 9,4 min 70% B, 10 min 100% B, 13 min 100% B. La protéine B+8 est éluée vers 45% à 55% (600 mM AS).

La protéine B+8 est dialysée 1 nuit à +4°C dans un tampon 20 mM HEPES, 500 mM NaCl, pH 7,5 [NaOH].

La pureté est vérifiée en SDS PAGE 10-15% coloré au bleu de Coomassie à 25 µM. L'identité HlgB ($DO_{280} = 0,2$) est confirmée en IP avec des anticorps de lapin purifiés par affinité ($A_{280} = 3,0$).

2. Obtention d'hétérodimères de leucotoxines

2.1. Synthèse des hétérodimères

Pour limiter les oxydations des groupements sulfhydriles des protéines mutantes dues à l'oxygène dissout dans les tampons, ces derniers sont tout d'abord saturés en azote (N_2), 30 min.

Les mutants de HlgB sont activés par la 2,2'-Dithiodipyridine (DTDP). Les toxines préalablement purifiées (cf 1.6 et 1.7) sont réduites avec 20 mM de DTT final puis dessalées par gel filtration PD10 (Amersham-Biosciences) contre le tampon 50 mM HEPES, 0,5 M NaCl, 1 mM EDTA- Na_2 , pH 7,5 [NaOH] (+ 0,25 mM DTT après nitrogénéation), puis 2,5 mM de DTDP sont immédiatement ajoutés, et la protéine est incubée 10 min à température ambiante. Pour retirer l'excès de DTDP, on dessale à nouveau sur PD10 contre le tampon 20 mM HEPES, 0,5 M NaCl, 1 mM EDTA- Na_2 , pH 7,5.

Les mutants de HlgA (dans un tampon contenant 20 mM DTT) sont dessalés sur PD10 contre le tampon 20 mM acétate de sodium, 0,5 M NaCl, 1 mM EDTA- Na_2 , pH 5,0 [HCl].

Réaction d'échange thiol/disulfure avec le partenaire HlgA.

Les deux partenaires sont mis en présence (Rapport molaire $R = \text{HlgB CysTP} / \text{HlgA T28C} = 1,5$). Le pH est ajusté à 7,5 par 0,5 M de bicine pH 9,0 (15 mM final). L'incubation dure 3 heures à température ambiante et 0,5 mM DTDP sont alors ajoutés pour bloquer la réaction de dimérisation (blocage des thiols résiduels).

2.2 Purification des hétérodimères

Tous les échantillons sont préalablement ajustés à 1,2 M de sulfate d'ammonium à l'aide d'une solution mère à 3 M, pH 7,0.

Les hétérodimères obtenus sont d'abord purifiés par chromatographie hydrophobe (Resource ISO 1 mL, Amersham) : tampon A 50 mM NaH₂PO₄, 1,2 M sulfate d'ammonium, pH 7,0, tampon B 50 mM NaH₂PO₄, pH 7,0 [NaOH]. Après la chromatographie hydrophobe, on dilue au 1/6^e dans le tampon B. L'étape suivante est la chromatographie par échange d'ions (Resource S 1 mL, Amersham) tampon C : 50 mM NaH₂PO₄, 200 mM NaCl, pH 7,0, tampon D : 50 mM NaH₂PO₄, 1 M NaCl, pH 7,0.

La pureté est évaluée en SDS PAGE, révélée au nitrate d'argent.

3. Techniques d'analyse des protéines

3.1. Immunoréplique (Western Blot) sur membrane de nitrocellulose

3.1.1. Séparation et transfert sur membrane de nitrocellulose

Les échantillons sont repris dans un quart du tampon de charge suivant : 0,5 M Tris-HCl pH 8,5, 8% (p/v) SDS, 0,04% (p/v) BBP, 30% (v/v) glycérol et chauffés 5 min à 100°C . Un volume de 10 µL est ensuite déposé sur gel de polyacrylamide 3-8% (p/v) Tris Acétate, pH 8,1 (Invitrogen). L'électrophorèse dure 75 min à 150V à température ambiante, dans un tampon 50 mM Tris-HCl, 50 mM Tricine, pH 8,2, 0,1% (p/v) SDS. Le gel contenant les protéines est appliqué sur une membrane de nitrocellulose imbibée de tampon de transfert (25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, pH 9,3, 20% (v/v) méthanol). Le tout est placé entre deux feuilles de papier Whatman 3 MM imbibées par le même tampon, et le transfert a lieu dans le Transfer Xcell II Blot module (Invitrogen) dans 500 mL de tampon, la membrane étant située du côté de l'anode. Grâce à leur charge globalement négative, les protéines migrent vers la membrane sous l'effet du champ électrique (11 V/cm pendant 1H) et sont adsorbées sur la membrane.

3.1.2. Détection des protéines

Après le transfert, la membrane est saturée 16 h à 4°C dans 20 mL de tampon TBS-T (20 mM Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 0,05% (v/v) Tween 20, pH 7,5) contenant 5% (p/v) de lait écrémé. La

membrane est ensuite lavée 5 min dans du tampon TBS-T, puis incubée en présence du premier anticorps de lapin anti-S (ou anti-F) dilué à 1 µg/mL dans TBS-T, 1% (p/v) lait écrémé 2H à température ambiante sous agitation. Après 2 lavages de 5 min dans TBS-T, le filtre est incubé en présence d'anticorps de chèvre anti-lapin couplé à la peroxydase (A-6154, Sigma) dilué au 1/2000e dans le tampon TBS-T, 1% (p/v) lait écrémé, durant 2H à température ambiante sous agitation. La membrane est lavée 2 fois 5 min dans du TBS-T, puis l'activité de la peroxydase est révélée par le kit ECL RPN209 (Amersham-Biosciences, Saclay) par autoradiographie (films FUJI type RX médical).

3.2. Le SDS- PAGE : PhastSystem™

Cette méthode est basée sur le principe de Laemmli (Laemmli, 1970). Le PhastSystem™ (Amersham-Biosciences, Saclay) est un système automatisé de séparation en gel de polyacrylamide (PAA), très rapide (30 min) et reproductible. Les protéines sont d'abord dissociées en sous unités polypeptidiques par le SDS et le β mercaptoéthanol. Le SDS est un détergent anionique qui se lie par interaction hydrophobe aux protéines (1,4 g de SDS par gramme de protéine) et leur confère une charge négative nette. Toutes les protéines possèdent ainsi la même densité de charge et ne migrent plus qu'en fonction de leurs masses moléculaires. Le bleu de bromophénol est habituellement ajouté aux échantillons pour suivre la migration. Les gels (PhastGel, Amersham-Biosciences, Saclay) sont constitués d'un « stacking gel » de 13 mm (tampon 0,112 M Tris acétate, pH 6,4, 4 % (p/v) PAA) et d'un « Phastgel gradient » de 32 mm (tampon 0,112 M Tris acétate, pH 6,4) avec un gradient de 10 – 15% (p/v) de polyacrylamide (il existe d'autres types de gradients en fonction de la taille des protéines à séparer). Les échantillons sont préparés dans un volume final de 50 µl contenant 5 à 50 µg de protéines en présence de 2,5 % (p/v) SDS, 5 % (v/v) β-mercaptoéthanol, 10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA-Na₂, pH 8,0 en concentration finale. L'échantillon contenu dans le mélange est porté à 100°C pendant 5 min. On ajoute ensuite 0,01 % (v/v) d'une solution à 4% (p/v) de bleu de bromophénol qui permet de suivre la migration des protéines. Les échantillons ainsi préparés sont déposés avec un mélange de marqueurs de poids moléculaires sur le gel dénaturant. Ce dernier est ensuite placé dans un appareil (PhastSystem™, Amersham-Biosciences, Saclay) programmable pour la migration, la fixation et la coloration des échantillons. Après 30 min les protéines peuvent être visualisées.

3.3. Immunoprécipitation des leucotoxines par une diffusion radiale en gel des protéines

La présence de leucotoxines est recherchée à partir de lysats bactériens dans le cas de souches d'*E. coli* ou à partir de surnageants de culture dans le cas de souches de *S. aureus*. Les anticorps polyclonaux de lapin utilisés pour ce test sont purifiés par affinité et donc spécifiques de chaque leucotoxine, (Gravet et coll., 1998). La formation des complexes antigènes-anticorps s'effectue dans un gel d'agarose 0,6 % (p/v) dans le tampon PBS, contenant des puits d'un volume de 50 μ l, espacés de 7 à 8 mm entre eux, dans lesquels on dépose des anticorps de lapin anti-leucotoxines purifiés par affinité à $A_{280\text{ nm}} = 3$ qui vont réagir avec les surnageants de culture ou les lysats bactériens. Après une diffusion de 16 H à 4°C, les arcs de précipitation sont observés directement à l'œil nu ou après une coloration au bleu de Coomassie et interprétés à l'aide d'un puits adjacent contenant uniquement la toxine recherchée à $DO_{280\text{ nm}} = 0,2$.

3.4. Dosage de protéines par la méthode de Bradford

Cette méthode de détermination des protéines est basée sur la propriété du bleu de Coomassie à se lier spécifiquement aux protéines. C'est un dosage colorimétrique. Le bleu de Coomassie change de couleur en fonction de la concentration de protéine et son absorption maximale passe de 465 nm à 595 nm lorsqu'il est lié à une protéine. C'est une méthode facile à utiliser contrairement aux autres méthodes de dosage de protéines. Elle est rapide (la fixation du colorant est complète après 5 minutes) et la densité optique du complexe colorant-protéine est relativement stable.

A 50 μ l de soude 1 M sont ajoutés 20 μ l d'échantillon protéique (0,2 à 2 μ g), 1 mL de réactif au bleu de Coomassie concentré (pour 1L : 100 mg bleu de Coomassie G-250 (Serva) 50 mL d'éthanol 95%, 100 mL H_3PO_4 85% (p/v)) puis le tout est incubé 5 min à température ambiante. La lecture de la densité optique est ensuite effectuée à 595 nm au spectrophotomètre. Une courbe d'étalonnage est réalisée avec des dilutions différentes d'une solution de sérum albumine bovine contenant de 1 à 25 μ g/mL de protéine.

3.5. Détection de la présence d'un résidu cystéine en surface d'une protéine mutée

3.5.1. Principe de la réaction

Le DTNB ou 5, 5'-dithio bis (2-nitrobenzoate), encore appelé réactif d'Ellman a été décrit par ce dernier comme un réactif spécifique des groupements sulfhydriles, suffisamment sensible pour permettre la détection des résidus cystéine dans les protéines. En effet, il réagit avec des analogues aliphatiques de potentiel redox plus faible, par une réaction d'échange (réaction d'ordre 2 (pseudo monomoléculaire)) pour former un disulfite mixte de protéine et 1 mole de 2-nitro-5-thiobenzoate, par mole de cystéine accessible dans la protéine. Cette méthode consiste donc en un dosage indirect des groupements SH en mesurant A à 412 nm du nitro-mercaptobenzoate qui induit une coloration jaune vif.

3.5.2. Mode opératoire

Tous les groupements SH n'étant pas accessibles à cause de leur position stérique, il convient de dénaturer la protéine, afin d'avoir la même réactivité pour tous les résidus vis à vis du DTNB. La réaction a lieu comme décrit par Habeeb (Habeeb, 1972). Une solution contenant de 7 à 40 μM de protéine, 2% (p/v) SDS, tampon 0,05 M bicine pH 8,0, et 1 mM EDTA- Na_2 . A 3 mL de cette solution est ajouté 0,1 mL d'une solution de DTNB (40 mg DTNB, 10 mL de 0,05 M tampon bicine, pH 8,0). La réaction est développée pendant 15 min et la densité optique à 412 nm est lue contre un témoin constitué par la protéine dans du SDS. La concentration des groupements cystéinyles est déterminée par la formule : $A_{412 \text{ nm}} = \varepsilon \cdot l \cdot C$ avec $l = 1 \text{ cm}$ et $\varepsilon = 13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.5.3. Réaction d'oxydation : formation de ponts disulfures

Cette réaction consiste en l'oxydation de groupements R-SH en vue de créer des ponts disulfures internes à une protéine ou à réaliser une dimérisation de protéine. Elle se déroule comme décrit par (Traut et coll., 1989).

Dix μg de protéine (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) sont placés dans deux tubes de centrifugation. Le premier tube sert de témoin négatif. Le second tube est additionné de 1,5 μl d'une solution 10 mM CuSO_4 , 5 H_2O et 30 mM 1,10-phénanthroline. L'analyse des protéines se fera en SDS-PAGE.

Alternativement, l'oxydation se fait par 0,12 % (v/v) (35,2 mM) de peroxyde d'hydrogène.

3.6. Marquage de protéine contenant une cystéine à la fluorescéine

Les leucotoxines étant naturellement dépourvues de cystéine, la substitution d'un autre acide aminé par ce résidu permet d'obtenir des molécules comportant une cystéine unique. Cette opportunité nous permet d'effectuer des marquages sélectifs avec des traceurs moléculaires soit pour l'étude de la fixation des protéines de classe S et de classe F ou de l'accessibilité de surface d'un résidu, ou encore de son environnement hydrophile ou hydrophobe. Ce marquage spécifique des résidus thiols à pH 7,0 s'effectue grâce à un excès molaire de fluorescéine-5-maléimide (Molecular Probes) (F5M ; M = 427; $\epsilon_{490\text{nm}} = 81900 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) de 5 fois dans un tampon 50 mM PhosphateNa, 0,15 M NaCl, 1 mM EDTA- Na_2 , pH 7,0 et 10 μM de protéine cible. Après 30 min à température ambiante, la réaction est stoppée par l'addition de 10 mM β -mercaptoéthanol final. La F5M est ensuite séparée de la protéine marquée en passant la solution sur une colonne de dessalage PD10 (Amersham-Biosciences, Saclay). Le degré de couplage de la F5M est estimé en rapportant la concentration de fluorescéine ($\text{DO}_{490\text{nm}}$) de la solution à la concentration protéique déterminée par une coloration de Bradford.

3.7. Activités biologiques des leucotoxines de *S. aureus*

3.7.1. Activité leucocytotoxique sur les polynucléaires humains

3.7.1.1. Préparation des polynucléaires humains

Les PN ont été préparés à partir de concentrés cellulaires sanguins ("buffy coat") appauvris en plasma, plaquettes et globules rouges. Ils sont âgés de moins de 24 H et sont fournis par l'Etablissement du Sang Français de Strasbourg.

Trente mL de « buffy coat » dilués au 1/3 dans du sérum physiologique stérile sont déposés à la surface de 12 mL d'un milieu de séparation des lymphocytes J-Prep (TechGen International, France) dans un tube stérile de 50 mL (Falcon[®], France). Après 20 min de centrifugation sans frein à 800 x g, les plaquettes et le plasma se retrouvent dans le surnageant, puis les monocytes et les lymphocytes sont éliminés. Le sédiment qui contient les globules rouges et les PN est repris dans 30 mL de sérum physiologique auxquels on ajoute 10 mL d'une solution à 6 % (p/v) de Dextran (Sigma). Après 30 min de sédimentation à température ambiante, les globules rouges situés au fond du tube sont séparés des PN qui se retrouvent dans le surnageant. Ce

dernier est alors récupéré et centrifugé pendant 5 min à 1200 x g. Le culot est remis en suspension dans 500 µl de sérum physiologique. Les globules rouges résiduels sont éliminés par l'addition de 18 mL d'H₂O qui provoque leur lyse osmotique en 45 s. L'osmolarité est rétablie par l'addition de 2 mL d'une solution NaCl 9 % (p/v). Les PN sont sédimentés par une centrifugation de 5 min à 1200 x g et remis en suspension dans un tampon EGTA [140 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM glucose, 0,1 mM éthylène glycol-bis (β-aminoéthyl éther) N, N, N', N'-acide tétraacétique, 10 mM Hepes, pH 7,3 [tris].

3.7.1.2. Analyse par cytométrie en flux

3.7.1.2.1. Principe du cytomètre en flux

La cytométrie en flux est une méthode d'analyse individuelle rapide de cellules, principalement par la détection de paramètres lumineux. Elle permet d'analyser la lumière diffractée et réfractée par les cellules qui est fonction de leurs propriétés biologiques (taille, contenu cellulaire) et également de détecter la fluorescence provenant des cellules ou d'un marquage artificiel des cellules.

3.7.1.2.2. Description du cytomètre en flux

Le cytomètre en flux FACSort (Becton-Dickinson, Le Pont de Claix, France), est équipé d'une source laser à argon de 15 mW émettant à 488 nm. Les cellules en suspension sont aspirées par un flux continu d'une solution isoosmotique appelée liquide de gaine qui permet le passage cellule à cellule dans le faisceau incident (**Figure 2.4**). Sous l'effet de l'excitation du laser, la cellule réémet des signaux lumineux, filtrés et recueillis par des systèmes optiques spécifiques, positionnés selon des axes précis, aux longueurs d'ondes sélectionnées. Les mesures réalisées sont de plusieurs types :

- La lumière diffractée selon un angle de 3 à 10° par rapport au rayon incident (diffraction à petit angle ou FSC « Forward Scatter ») permet d'avoir une idée de la taille cellulaire
- La lumière réfractée à 90° par rapport au rayon incident (réfraction et réflexion à grand angle ou SSC « Side Scatter ») témoigne de la complexité du contenu cellulaire.

Chaque population de cellules sanguines peut être représentée sur un diagramme dont les coordonnées sont la taille (FSC) et la complexité du contenu cellulaire (SSC).

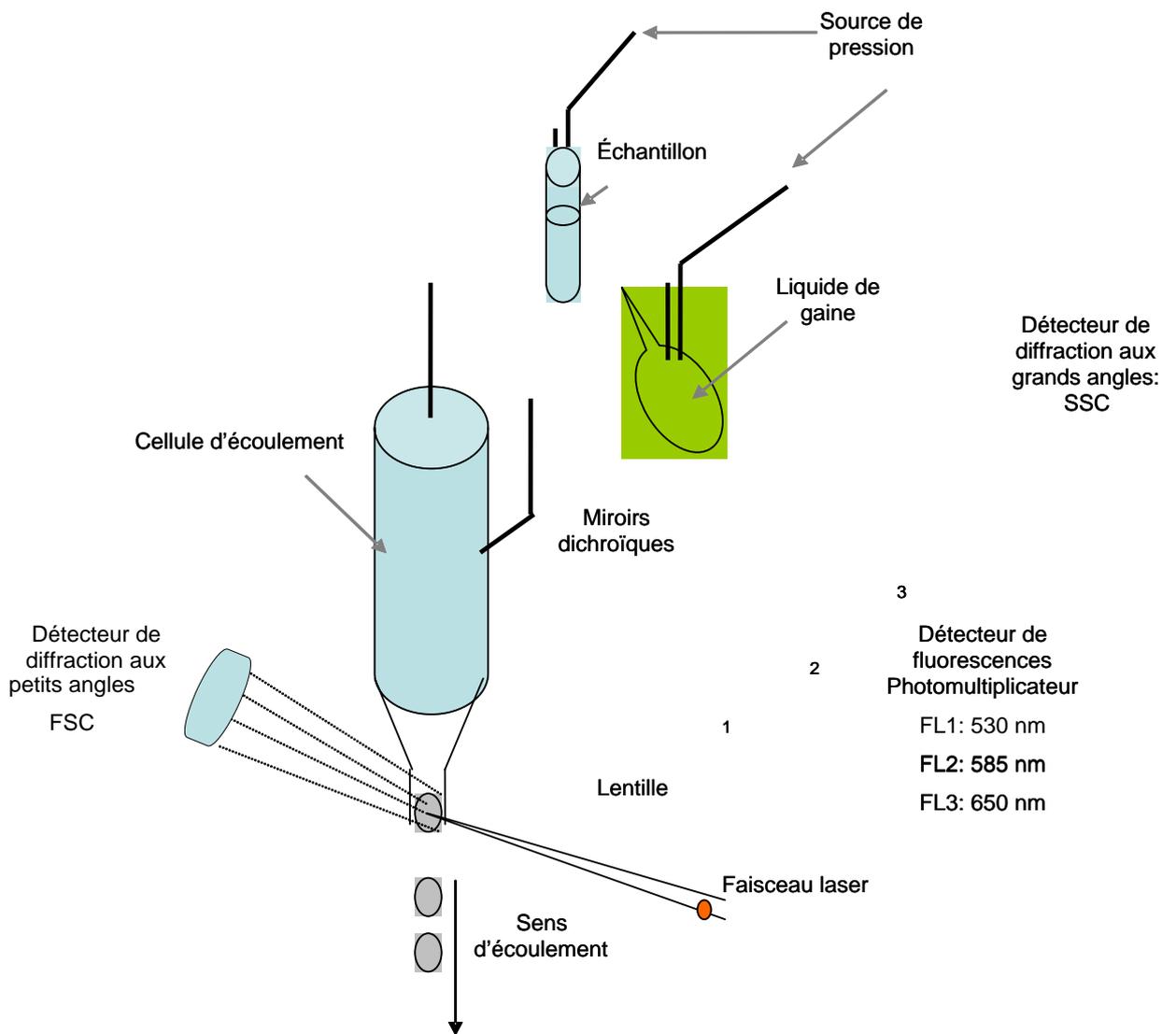


Figure 2.4 : Schéma de principe d'un cytomètre en flux.

- Les mesures de fluorescence : l'excitation des fluorochromes liés à la cellule provoque des émissions de fluorescence de longueur d'onde supérieure à celle de l'excitation, qui sont sélectionnées par des miroirs dichroïques (530, 585, 650 nm). Ces miroirs dirigent les rayonnements vers trois photomultiplicateurs indépendants (FL1, FL2 et FL3). Les signaux lumineux, convertis en signaux électriques par ces photomultiplicateurs, sont représentés sous forme d'histogrammes de fréquence de distribution mono-dimensionnelle (nombre de cellules en fonction de la valeur du paramètre analysé) ou bidimensionnelle (intensité du premier paramètre en fonction du second). Ces derniers sont également nommés « dots plots », pour les cytogrammes représentés sous forme de nuages de points. Une procédure permet de tracer des régions délimitant les populations cellulaires intéressantes sur les « dots plots », à partir desquelles sont générés les histogrammes mono-dimensionnels.

Les données sont traitées par le programme Cell Quest ProTM (Becton-Dickinson). Les résultats figurés sont la moyenne d'expériences répétées quatre fois.

3.7.1.2.3. Détermination de l'activité des canaux calciques par le Fluo-3.

La mise en évidence des variations de concentration de calcium intracellulaire traduisant l'activation du canal calcique par les leucotoxines est réalisée par la mesure des variations d'intensité de fluorescence de Fluo-3 AM, préalablement chargé dans les cellules. Le Fluo-3 AM (FluoProbes®, Interchim S.A., Montluçon) est une sonde moléculaire dont la fluorescence augmente quand elle fixe du calcium ($\lambda_{\text{excitation}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 530 \text{ nm}$). Le Fluo-3 étant peu soluble, il est acéto-méthylé, ce qui facilite son incorporation dans les cellules. La sonde est ajoutée dans la suspension cellulaire à la concentration finale de 5 μM et les PN sont incubés 45 min à température ambiante. Les cellules sont ensuite lavées dans du tampon EGTA avant d'être utilisées pour les analyses de cytométrie en flux (Meunier et coll., 1995).

3.7.1.2.4. Détermination de la formation de pores aspécifiques en présence d'éthidium⁺.

L'éthidium est un cation monovalent qui ne traverse pas la membrane cellulaire. Lorsque des pores membranaires suffisamment grands sont formés, il pénètre dans la cellule, s'intercale entre les plateaux de bases des acides nucléiques et émet une fluorescence rouge ($\lambda_{\text{excitation}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 650 \text{ nm}$). L'augmentation de la fluorescence de l'éthidium est utilisée

comme indicateur de la formation des pores aspécifiques par les leucotoxines. L'éthidium est ajouté au milieu cellulaire à la concentration finale de 4 μM au moins cinq minutes avant le début de la lecture.

3.7.1.2.5. Détermination du diamètre des pores formés par les leucotoxines

Le diamètre des pores créés par les leucotoxines est déterminé grâce à l'évaluation de la variation du FSC des cellules traitées ($5 \cdot 10^5$ cellules/mL) avec les concentrations en leucotoxines adaptées (1 nM LukS-PV et 40 nM LukF-PV, 20 nM HlgA et 0,4 nM HlgB, hétérodimère 20 nM AB) en présence de 30 mM de polymères d'éthylène glycol (PEG) de rayons hydrodynamiques variables (0,94, 1,12, 1,22, 1,44 nm). Les valeurs de FSC sont collectées à 10, 20, 30/40 min après l'addition de toxine (Baba-Moussa et coll., 1999b).

3.7.1.2.6. Observations

En présence de 1mM Ca^{2+} dans le milieu extracellulaire l'observation microscopique montre une augmentation du volume du noyau qui s'arrondit. Dans le même temps, le contenu des granules disparaît et après 10 min d'incubation seulement quelques granules gardent leur intégrité. En absence de Ca^{2+} dans le milieu extracellulaire, l'activité des toxines se traduit au microscope par une augmentation du volume cellulaire, une dispersion des granules et les cellules deviennent claires. Après un quart d'heure, tous ces phénomènes s'amplifient et les noyaux s'arrondissent. Les membranes cellulaires gardent grossièrement toute leur intégrité structurale (Meunier et coll., 1995).

L'observation au cytomètre montre qu'en absence de Ca^{2+} , les deux paramètres morphologiques FSC et SSC augmentent constamment durant l'expérience. Cependant, en présence de 1 mM Ca^{2+} cette augmentation est décalée de 5 min. Le FSC et le SSC sont modifiés dans les mêmes proportions pendant les dix premières minutes où la fluorescence du Fluo-3 augmente puis le SSC diminue tandis que le FSC arrête d'augmenter. Le FSC augmente après l'addition de toxine en présence ou en absence de Ca^{2+} tandis que le SSC augmente en absence de Ca^{2+} et diminue en sa présence (Meunier et coll., 1995).

3.7.1.2.7. Etude de la capacité de fixation des leucotoxines mutantes par la technique de compétition

Les leucotoxines sauvages sont naturellement dépourvues de cystéine. La substitution par mutagenèse dirigée d'un aminoacide par une cystéine permet un marquage sélectif de la toxine par une molécule de fluorescéine. Le remplacement de la G10 permet d'obtenir un composé LukS-PV fonctionnel et fluorescent, et le remplacement de la S27 permet l'obtention de LukF-PV et HlgB fonctionnels et fluorescents. Des études réalisées sur ces toxines fluorescentes ont montré l'inocuité de la mutation sur la fixation et l'activité de ces molécules (Gauduchon et coll., 2001).

L'affinité des toxines mutées pour leur ligand peut alors être appréciée en quantifiant le pouvoir de déplacement de la molécule fluorescente par des concentrations croissantes de la toxine mutée correspondante. L'indice de compétition ou IC50 détermine la concentration en toxine mutée nécessaire pour inhiber 50 % de la fixation du composé fluorescent.

- **fixation des protéines LukS-PV mutées :** une suspension cellulaire estimée à 5×10^5 PN/mL est incubée avec une concentration fixe de LukS-PV G10C (0,1 nM) et des concentrations croissantes (0,003, 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,2, 1, 2 nM) de protéine mutée, pendant 15 min à température ambiante. La fluorescence est alors mesurée en cytométrie en flux.
- **fixation des protéines LukF-PV mutées :** la protéine LukF-PV S27C marquée à la fluorescéine est utilisée à une concentration fixe de 2 nM en présence de concentrations croissantes (0,1, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20 , 100 nM) de protéine mutante. Les cellules sont préalablement mises en présence de 1 mM de LukS-PV. La fluorescence résiduelle en surface des cellules est mesurée 15 min après ajout des cellules dans le tube de cytométrie.
- **fixation des protéines HlgB mutées :** HlgB S27C marqué à la fluorescéine est utilisée à la concentration fixe de 0,04 nM en présence d'une gamme de concentration de 0,001, 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,5, 1 nM de compétiteur. Les protéines sont au préalable mises au contact de 20 nM de HlgA+8.

La courbe représentant la variation de la fluorescence du composé marqué en fonction de la concentration du compétiteur muté froid permet de déterminer la constante d'inhibition apparente (k_{Iapp}) pour chaque mutant. Cette constante est calculée par la formule suivante :

$$k_{Iapp} = \frac{IC50}{1 + \frac{[P*]}{k_D}}$$

IC 50 correspond à la concentration de protéine libre mutée donnant 50 % d'inhibition. Elle est déterminée par calcul, à l'aide d'une régression non linéaire, assistée par ordinateur.

[P*] = concentration de la protéine fluorescente libre

k_D = constante de dissociation apparente de la protéine fluorescente

3.7.1.3. Analyse par spectrofluorimétrie

3.7.1.3.1. Principe

Certaines molécules, après excitation par un rayonnement lumineux de longueur d'onde donnée (λ_{EX}), ont la capacité de réémettre une partie de cette énergie sous forme lumineuse de longueur d'onde supérieure (λ_{EM}). Le principe de la spectrofluorimétrie consiste en l'utilisation de sondes moléculaires fluorescentes comme marqueurs de modifications de paramètres cellulaires.

3.7.1.3.2. Description de l'appareil

L'appareil utilisé est un spectrofluorimètre (PTI, Deltascan TM modèle 4000 Kontron). Une source lumineuse constituée d'une lampe au xénon de 75W génère, grâce à un miroir rotatif (« chopper »), deux faisceaux lumineux envoyés chacun dans un monochromateur d'excitation. (1 et 2).

Transmis par fibre optique, les deux faisceaux traversent une cuve en quartz (trajet optique 1 cm) contenant la suspension cellulaire à étudier. La fluorescence réémise est analysée à un angle de 90° par deux monochromateurs d'émission (A et B) reliés à deux photomultiplicateurs.

Le programme Felix (PTI) assure le pilotage du spectrofluorimètre, l'enregistrement et le retraitement simultané et en temps réel des variations de fluorescence correspondant aux 4 couples excitation-émission : 1A, 1B, 2A, 2B.

3.7.1.3.3. Détermination des variations intracellulaires en cations mono et divalents

Les variations intracellulaires en Ca^{2+} ont été mises en évidence à l'aide du Fluo3-AM (FluoProbes®, Interchim S.A., Montluçon) dans les mêmes conditions qu'en 3.7.1.2.3. La mesure de l'augmentation de fluorescence liée au Fluo3 durant les 50 secondes qui suivent l'ajout de toxine permet d'estimer la vitesse initiale d'entrée du Ca^{2+} dans les cellules.

Pour les variations intracellulaires en éthidium⁺, les cellules sont préparées de la même manière qu'en 3.7.1.2.4 sauf que les concentrations utilisées sont 8 μM d'éthidium et $4 \cdot 10^6$ cellules/mL. La mesure de l'augmentation de fluorescence liée à l'éthidium durant les 50 secondes qui suivent l'ajout de toxine permet d'observer des différences dans le nombre de pores aspécifiques formés. Ici, on ne peut pas parler de vitesse initiale d'entrée de l'éthidium dans les cellules, car la fixation du cation arrive en deuxième lieu après son entrée dans la cellule.

3.7.2. Activité hémolytique sur les hématies d'homme et de lapin

Les globules rouges humains sont récupérés dans le « buffy coat » utilisés pour la préparation des PN. Les globules rouges de lapin sont prélevés stérilement par ponction intracardiaque en présence d'héparine (4U/mL de sang total). Après une centrifugation à $1000 \times g$ pendant 5 min, les hématies sont lavées trois fois dans un tampon PBS, puis remises en suspension dans ce même tampon à une concentration de 1 % (v/v). Les échantillons contenant la toxine sont ensuite successivement dilués d'un facteur 2 dans 100 μL de tampon PBS et déposés dans les puits d'une plaque de microtitration à fond concave. Cent μL de la préparation de globules rouges sont ensuite rajoutés. Après 1 H d'incubation à 37°C , les plaques sont centrifugées 5 min à $1000 \times g$: les globules rouges non lysés sédimentent.

Un contrôle négatif est réalisé avec 100 μL de tampon PBS auxquels sont ajoutés 100 μL de globules rouges. La lecture immédiate de la $\text{DO}_{415\text{nm}}$ du surnageant de la suspension érythrocytaire permet d'évaluer l'activité spécifique qui est déduite de la plus faible concentration des composés induisant encore 50 % d'hémolyse par rapport au témoin positif (HlgA + HlgB).

3.7.3. Cinétique d'hémolyse sur les hématies d'homme

Cette cinétique s'effectue à température ambiante sur des globules rouges humains obtenus en 3.7.2., dilués à 0,1% (v/v) final dans du tampon PBS ce qui correspond à une $DO = 1$ à 650 nm. A 500 μ L d'une suspension érythrocytaire à 0,2% (v/v), on ajoute la toxine (500 μ L). On suit la décroissance de $DO_{650\text{nm}}$ toutes les 30 s au spectrophotomètre durant 15 min. Le 100% d'hémolyse est obtenu par l'action pendant 10 min de 20 nM du couple HlgA/HlgB.

CHAPITRE III

Etude du rôle de la partie N-terminale des leucotoxines LukS-PV/LukF-PV au cours de la formation du pore

A. Introduction

Les leucotoxines de *S. aureus* sont composées de deux types de protéines qui agissent en synergie pour former des pores dans la membrane des cellules-cibles : les protéines de classe S (32 kDa) et de classe F (34 kDa). Elles appartiennent, comme l'alpha-hémolysine, à la famille des β -PFTs. Les structures tridimensionnelles (3D) des formes solubles de LukS-PV (Guillet et coll., 2004b), LukF-PV (Pédelaq et coll., 1999) et HlgB (Olson et coll., 1999) sont déterminées ainsi que celle de l'heptamère de l'alpha-hémolysine (Song et coll., 1996). Cependant, la stœchiométrie du pore leucotoxique demeure inconnue ; une organisation en hexamères (Sugawara et coll., 1997), heptamères (Sugawara-Tomita et coll., 2002) et octamères (Jayasinghe et Bayley, 2005; Miles et coll., 2002) ont été proposées. Les leucotoxines à deux composés provoquent la lyse de cellules sanguines humaines, notamment les globules rouges et les polynucléaires neutrophiles, ce qui participe de la virulence bactérienne. Les composés de classe F et S peuvent se combiner entre eux pour former une leucotoxine spécifique. Cependant, elle ne peuvent se combiner à l'alpha-toxine sur leurs cellules cibles. L'alpha-toxine et les leucotoxines diffèrent également par la sélectivité du pore formé, respectivement anionique et cationique (Prévost et coll., 2001).

La structure 3D du pore de l' α -toxine (Song et coll., 1996) montre que le tonneau β transmembranaire qui forme le pore correspond au domaine « stem » (ped) d'une structure en forme de champignon. Elle révèle également que la partie N-terminale (ou amino-latch) de chaque protomère est en interaction avec les deux protomères adjacents (**Figure 1B** de l'article). Cette partie est essentielle à l'activité lytique de la toxine (Walker et coll., 1992). Les structures 3D des formes hydrosolubles des monomères F (LukF-PV et HlgB) (Olson et coll., 1999; Pédelaq et coll., 1999) montrent que le domaine « stem » central est constitué de trois brins β accolés dans le cœur de la protéine. Ces structures subissent de nombreux changements conformationnels durant l'oligomérisation et la formation du pore transmembranaire (Baba-Moussa et coll., 1999b; Werner et coll., 2002). L'extrémité N-terminale des monomères solubles est partie intégrante du sandwich β . Si l'extrémité N-terminale de LukF-PV est un feuillet β et malgré une structure proche, la partie N-terminale de LukS-PV est un brin β plus court (Guillet et coll., 2004). Ainsi, la question reste ouverte si la partie N-terminale des

leucotoxines interagit avec les monomères adjacents dans le pore constitué durant la formation du pore.

L'approche retenue a consisté à étudier l'activité de leucotoxines modifiées par génération d'un pont disulfure intramoléculaire accolant le brin β N-terminal au β sandwich, ou par fusion de ce brin à la glutathion S-transférase. Les mutants générés sont, pour LukF-PV, LukF-PV T5C-T21C, LukF-PV S8CK20C et LukF-PV~GST, et pour LukS-PV, LukS-PV -1C-R16C, LukS-PV D1C-R16C, LukS-PV N2C-R16C et LukS-PV~GST (**Figure 1 A** de l'article).

B. Article n°1 :

Heterogeneity in the assembly of β -barrel pore-forming toxins: locked N-terminal extremities display functional staphylococcal bipartite leucotoxins

Olivier Joubert¹, Joelle Voegelin¹, Valérie Guillet², Samuel Tranier², Sandra Werner³,
Didier A. Colin¹, Mauro Dalla Serra⁴, Daniel Keller¹, Henri Monteil¹, Lionel Mourey²,
Gilles Prévost^{1*}

¹ Laboratoire de Physiopathologie et d'Antibiologie des Infections Bactériennes Emergentes et Nosocomiales – EA 3432. Institut de Bactériologie de la Faculté de Médecine (Université Louis Pasteur) - Hôpitaux Universitaires de Strasbourg. 3 rue Koeberlé, F-67000 Strasbourg

² Groupe de Biophysique Structurale, Département Mécanismes Moléculaires des Infections Mycobactériennes, CNRS-IPBS UMR 5089, 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse Cedex, France

³ Present address : Société Parogène- Faculté de Médecine et d'Odontologie. 11 rue Humann. 67085 Strasbourg CEDEX

⁴ ITC & CNR-IBF Unit at Trento, Via Sommarive, 18, I-38050 Povo (Trento) Italy

* Corresponding author. Tel : 33 3 90 24 37 57 Fax : 33 3 88 25 11 13.

E-mail : gilles.prevost@medecine.u-strasbg.fr

Running title: Structural location of N-terminal extremities of leucotoxins

Summary (239 words)

The staphylococcal bipartite leucotoxins and the homo-heptameric α -toxin belong to the same family of structurally-related β -barrel pore-forming toxins despite slight differences in variations of frequency, target cell spectra, and ionic selectivity of their pores. In the α -toxin pore, the N-terminal extremity of each protomer interacts as a deployed latch with two adjacent protomers in the vicinity of the pore lumen. The N-terminal extremities of the leucotoxins are heterologous in length and take part in the β -sandwich core of soluble monomers. When extracted from membranes, the oligomers of leucotoxins are instable. Hence, the interaction of these N-terminal extremities within structures of adjacent monomers is questionable. In the present report, we show that fusion proteins with glutathione S-transferase (GST) at their N termini keep biological activity as Wild-Type proteins and that combination of two GST-fusion proteins keeps some toxic activity. In addition, we substituted residues at the LukS-PV and LukF-PV (Panton-Valentine leucocidin) N-termini by cysteines to link the corresponding peptide stretches to the second or the third β -strand of the corresponding protein cores. Amongst combinations, LukS-PV N2C-R16C coupled with LukF-PV S8C-K20C had comparable binding properties onto target cells to Wild-Type proteins. It mediated Ca^{2+} -entry through cell channels and formed octameric pores sensitive to ethidium and with radii similar to the Wild-Type toxin. Therefore, bipartite leucotoxins do not need a large extension of their N-terminal extremities to form functional pores, thus illustrating micro-heterogeneity of the structural organization between bipartite leucotoxins and α -toxin.

Key-words: α -toxin, amino latch, staphylococcal leucotoxins, octamers, β -strands bridging.

1. Introduction

Staphylococcal bipartite leucotoxins and α -toxin belong to a single family of structurally-related β -stranded pore-forming toxins (Fig. 1). Leucotoxins are constituted by a class S protein (32 kDa) that binds to the surface of target cells prior to a class F protein (34 kDa) distinct in sequence [1]. Then, these proteins oligomerise to octamers or hexamers [2-5], induce Ca^{2+} -activation [6], and form monovalent cation-selective β -barrel transmembrane pores [7]. Each protomer contributes to the pore by transforming a central β -sheet domain into a β -hairpin [8,9]. Five loci encoding leucotoxins are characterized [9]. Several of these loci, encoding the Pantone-Valentine leucocidin (PVL), gamma-hemolysin [10] and LukE-LukD [11], may be present together and expressed in a single isolate. The S and F components can then combine to give a specific leucotoxin. However, they do not combine with α -toxin, at least on target cells [12], which is present in almost all isolates. Pantone-Valentine leucocidin, which is composed of LukS-PV and LukF-PV, is associated with furuncles [13] and pneumonia [14]. Bipartite leucotoxins show a complementary spectrum for lytic functions towards human blood cells including lymphocytes and erythrocytes, accounting for the bacterial virulence. Furthermore, leucotoxins and α -toxin differ from each other by the respective cationic and anionic selectivities of their pores [6,15,16].

X-Ray diffraction and other techniques have been used to study the heptameric pore of α -toxin [17-21]. The crystal structure of the assembled α -toxin [20] revealed that the transmembrane β -barrel that forms the pore corresponds to the stem domain of a mushroom-shaped structure. It also revealed that the N-terminal extremity, also called the amino latch, of each protomer interacts with two adjacent protomers in the mouth of the pore lumen. The 3D structures of the soluble form of two F monomers, LukF-PV from the Pantone-Valentine leucocidin [8] and HlgB from gamma-hemolysin [22], have also been determined (Fig 1A). They showed that the central stem domain is prefolded as three β -strands stacked to the core of the soluble proteins. This core is formed of a β -sandwich to which the N-terminal extremity of the soluble F proteins contributes to one strand. Despite

the high similarity between the F and S structures, the N-terminal extremity of LukS-PV appeared shorter [23]. The F and S proteins must undergo a number of conformational modifications during oligomerisation and β -barrel formation to evolve to a functional transmembrane pore [24,25].

For leucotoxins oligomers, the possible unfolding of the N-terminal extremity to interact with adjacent subunits is unclear. Here, we report some biological activity retained by recombinant proteins after Glutathione S-Transferase (GST) fusion and expression in *Escherichia coli*. We also constrained this portion of the proteins to the β -sandwich by engineering disulfide bonds, and investigated the residual functions of new leucotoxins in order to verify whether N-terminal extremities of leucotoxins adopt a large refolding for their pore-forming activity.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and vectors

Escherichia coli XL1 Blue cells [*recA1 endA1 gyrA96 thi1 hsdR17 supE44 relA1 lac* (F' *proAB lacI^qZAM15 Tn10 (tet')*)] (Stratagene, Amsterdam, Netherlands) were used as recipient cells for transformation with recombinant pGEX-6P-1 following site-directed mutagenesis. *E. coli* BL21 [F^- , *ompT*, *hsdS* (*rB⁻*, *mB⁻*), *gal*] was used for over-expression of the glutathione-S-transferase (GST) - leucotoxin fusion genes, according to the manufacturer's instructions (Amersham -Biosciences) [24].

2.2. Choice, construction and purification of modified proteins

We considered LukS-PV and LukF-PV N-terminal sequence alignment and their 3D structures (Fig. 1A) [23]. We chose two pairs of LukF-PV amino acids, T5 and T21, and S8 and K20 for cysteine substitutions due to their respective close locations in the structure (Fig. 1A) [8]. The distance between C β atoms of T5 and T21 (5.7 Å) and angles between thiol groups may allow the formation of disulfide bonds that would bridge the first two β -strands of the protein (SSBond software, [26]). The other pair of amino acids seemed even

more favourable for disulphide bridge formation, with a distance between C β atoms of 4.1 Å.

The situation was less obvious for LukS-PV, which has no counterpart to LukF-PV T5 (Fig. 1A). Furthermore, the first two amino acids of the shorter LukS-PV N-terminal extremity could not be traced in the crystal structures of either wild type [23] or recombinant protein (unpublished results). Therefore, this N-terminal extremity may be poorly structured. To allow bridging with R16, which can be aligned with T21 of LukF-PV, we finally chose to substitute either LukS-PV N2 or D1 by a cysteine, and to introduce another cysteine residue upstream from D1 (called LukS-PV -1C) (Fig. 1A).

Open reading frames corresponding to the secreted LukF-PV and LukS-PV encoding genes were previously cloned into the pGEX-6P-1 expression vector [24]. We further obtained five double mutants, LukS-PV -1C-R16C, D1C-R16C, N2C-R16C and LukF-PV T5C-T21C, S8C-K20C, using dedicated oligonucleotides in a two-step mutagenesis procedure similar to that of Quick Change[®] mutagenesis (Stratagene), except that *Pfu* Turbo[®] DNA polymerase was replaced by Arrow *Taq* DNA polymerase[®], and T4 GP32 protein[®] (QBIogene).

LukS-PV~GST and LukF-PV~GST fusion proteins were purified for functional analysis by chromatography on Glutathione-Sepharose 4B followed by hydrophobic interaction chromatography. LukS-PV~GST and LukF-PV~GST eluted at 0.73 M and 0.78 M (NH₄)₂SO₄, respectively. Mutated proteins were purified by affinity chromatography on Glutathione-Sepharose 4B followed by cation-exchange FPLC[®] chromatography using a NaCl gradient from 0.05 M to 0.7 M [24], after removing the GST-tag with PreScission[®] Protease (Amersham - Biosciences). Hydrophobic interaction chromatography (Ressource ISO — Amersham Biosciences) was further applied using a (NH₄)₂SO₄ gradient from 1.3 M to 0.5 M to improve purifications. LukS-PV mutants eluted at 0.15 M NaCl and 1.02 M (NH₄)₂SO₄, whereas those of LukF-PV eluted at 0.1 M NaCl and 0.95 M (NH₄)₂SO₄. Controls for homogeneity were performed using SDS-PAGE, and the proteins were then stored at -80°C. We labelled two fully functional mutants, LukF-PV S27C and LukS-PV G10C, with fluorescein 5-maleimide (Molecular Probes, Leiden, Netherlands) [24].

2.3. Oxidation and accessible thiol-titration

The cysteine mutants were treated with CuSO₄, 1,10-phenanthroline (Sigma) to ensure the highest oxidation state. Briefly, proteins at a concentration of 20 μM were dialysed in 50 mM Hepes, 0.5 M NaCl, 10 mM DTT pH 7.5, and further equilibrated against 50 mM Hepes, 0.5 M NaCl, pH 7.5. Proteins were then adjusted to 2 mL of the same buffer complemented with 1.5 mM CuSO₄, 5 mM 1,10-phenanthroline and incubated for 2 hours at 4°C. Protein solutions were then equilibrated against 50 mM Hepes, 0.5 M NaCl, 1 mM EDTANa₂, pH 7.5, and could then be frozen without loss of disulfide bonds and biological activity.

For the titration of free thiols, proteins were precipitated in 5% (w/v) trichloroacetic acid and left for 5 min at 0°C, pelleted by centrifugation and washed three times with the same solution. The precipitate was dissolved in 400 μL of N₂-saturated 0.2 M Hepes, 0.2 M NaCl, 1 mM EDTANa₂, 2% (w/v) SDS, pH 8.0. The remaining precipitated material was removed by centrifugation and 300 μL of the supernatant was added to 30 μL of 10 mM 5-5'-di-thio-bis (2-nitro) benzoic acid (DTNB) ($\epsilon = 13,600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). After 10 min of reaction at room temperature, the amount of titrated thiols was estimated by OD at 412 nm and the molarity was compared to the protein concentration determined by the Lowry method.

2.4. Human polymorphonuclear cells (PMNs) and flow cytometry measurements

Human PMNs from healthy donors were purified from buffy coats as previously reported [27], and suspended at 5×10^5 cells/ml in 10 mM Hepes, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM glucose, 0.1 mM EGTA pH 7.3. Flow cytometry measurements from 3000 PMNs were carried out using a FacSort[®] flow cytometer (Becton-Dickinson, Le Pont de Claix, France) equipped with an argon laser tuned to 488 nm [28]. We evaluated the intracellular calcium using flow cytometry of cells previously loaded with 5 μM Fluo-3 (Molecular Probes) in the presence of 1.1 mM extracellular Ca²⁺ by measuring the increase of Fluo-3 fluorescence. Pore formation and monovalent cation influx was revealed by the penetration of ethidium through the pores; cells were incubated 30 min with 4 μM ethidium prior to the addition of toxins in the absence of extracellular Ca²⁺ [24,28]. Fluo-3 and ethidium fluorescence was measured using Cell Quest Pro[™] software (Becton-Dickinson). The results from at least four different donors were averaged and expressed as percentages of a control of human PMNs treated with the wild-type (WT) PVL. Base level values were obtained for each series of data from a control without addition of toxin. These were

systematically subtracted from the other assays. Standard deviations values never exceeded 10% of the obtained values; they were removed from figures for clarity.

The dissociation constant ($k_{D[S]}$) of LukS-PV for the PMN membrane and that of LukF-PV for the PMN membrane-bound LukS-PV ($k_{D[F]}$) were previously reported to be 0.07 nM and 2.5 nM, respectively [29]. LukS-PV and mutants were applied at 1 nM while LukF-PV and derivatives were applied at 10 nM assuming an excess of proteins to their ligands. The binding properties of the modified proteins onto PMNs were estimated through competition experiments carried out in the absence of extracellular Ca^{2+} . Fluorescein-labelled LukS-PV G10C (0.1 nM) and LukF-PV S27C (2 nM), and increasing concentrations of the respective mutants (from 1 to 1000 nM) were added 15 min before measuring the fluorescence retained at the surface of PMNs. For LukF-PV competitions, the PMNs were initially incubated for 10 min with 1 nM of LukS-PV. The IC_{50} value corresponds to the concentration of non-fluorescent competitor needed for 50% cell fluorescence inhibition, and is determined from the best fit of independent triplicates of the residual cell fluorescence [24]. The apparent inhibition constant, k_{Iapp} , was calculated from the following equation:

$$k_{Iapp} = IC_{50} / (1 + [S^* \text{ or } F^*] / k_{D[S] \text{ or } [F]})$$

where $[S^* \text{ or } F^*]$ are the concentrations of fluorescent LukS-PV or LukF-PV, and $k_{D[S] \text{ or } [F]}$ are the dissociation constants of LukS-PV (0.07 nM) or LukF-PV (2.5 nM).

2.5. Determination of pore radius

We assessed the radius of pores formed by native and modified leucotoxins by determining the relative ability of polyethylene glycol (PEG) molecules of various sizes to protect cells from osmotic leakage. If the sizes of the PEG molecules are similar or greater than the diameter of lumen they cannot pass through the pores. The relative variations in PMN size were assessed by measuring the variations in the forward light scatter (FSC) of cells (5×10^5 cells/ml) treated with 20 nM LukS-PV WT or mutants, 100 nM LukF-PV WT or mutants, and 30 mM PEG polymers (1000, 1500, 2000, 3000 Da) of different hydrodynamic radii (0.94, 1.12, 1.22, and 1.44 nm, respectively). FSC values were collected at 15 min after toxin application.

2.6. Identification of oligomers

Denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was carried out on oxidized leucotoxin-treated human PMNs. Preparations at 5×10^7 cells/ml in 10 mM Hepes, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM glucose, 0.1 mM EGTA, pH 7.3, were incubated with 100 nM of LukS-PV and LukF-PV derivatives in the presence of 10 μ L/mL of a mammalian cell-tissue antiprotease cocktail (Sigma). After a 45 min incubation at 22°C, the biological activity was assessed by optical microscopy, the cells were washed twice and then resuspended in 1 mL of the same buffer containing an antiprotease cocktail (1 μ L/mL) as above. The cells were ground in a FastPrep[®] apparatus (QBiogene - Bio101, Illkirch, France) using FastPrep Blue[®] tubes for an orbital centrifugation for 10 s at the fixed speed of 3,600 rpm at room temperature. The membranes were harvested by ultracentrifugation for 20 min at 20,000 $\times g$ at 4°C. The membrane pellets were resuspended in 100 μ L of the same buffer complemented with 2 μ L of antiprotease cocktail containing 1% (w/v) saponin (Sigma), incubated for 30 min at room temperature and then centrifuged for 30 min at 22,000 $\times g$. The supernatants were adjusted to 1 mM glutaraldehyde (in the above buffer) and incubated for 10 min at 50°C. One third volume of loading buffer (0.5M Tris-HCl pH 8.5, 2% (w/v) SDS, 0.04% (w/v) bromophenol blue, 30% (v/v) glycerol), containing 100 mM ethanolamine to block the cross-linking reaction was added and assays were heated to 100°C for 5 min. Finally, 10 μ L of the solution was loaded onto Tris-acetate, pH 8.1 polyacrylamide 3-8% (w/v) gels[®] (Invitrogen). Proteins were subjected to electrophoresis for 75 min at 150 V at room temperature in 50 mM Tris, 50 mM Tricine, pH 8.2, 0.1% (w/v) SDS, and then electroblotted onto nitrocellulose membranes for 1 h at 30 V in 25 mM Tris, 192 mM glycine, pH 9.3, 20% methanol using a transfer Xcell II Blot module (Invitrogen). The leucotoxins oligomers or components were characterized by immunoblot using affinity-purified rabbit polyclonal antibodies and a peroxidase-labeled goat anti-rabbit antibody using ECL[®] detection (Amersham-Biosciences, Saclay, France) as previously described [24]. The apparent molecular masses were estimated from protein migration according to Precision Plus[®] Protein Standards (Bio-Rad).

3. Results

3.1. GST-fusion proteins remain biologically active

LukS-PV~GST and LukF-PV~GST were purified to homogeneity and appeared as homogeneous proteins with an apparent molecular mass corresponding to the fusion with the 26 kDa GST (Fig. 2A). The apparent binding of leucotoxin derivatives with cell membranes was assessed in competition with an increased amount of the functional fluorescein-labelled (*) LukS-PV G10C* or LukF-PV S27C*. Apparent k_I of 0.039 nM was found for the WT LukS-PV binding to membranes and a value of 3.6 nM was found for the WT LukF-PV binding to LukS-PV-membrane complexes (data not shown). In these conditions, values of k_{Iapp} determined for LukS-PV~GST and LukF-PV~GST (0.2 and 3.4 nM, respectively) remained close to the values obtained for the WT proteins. However, when LukF-PV~GST was applied to the bound LukS-PV~GST, a k_{Iapp} of 17.6 nM was recorded, this marked difference may be due to some steric hindrance caused by GST molecules.

Combinations of LukS-PV with LukF-PV~GST or of LukS-PV~GST with LukF-PV led to Ca^{2+} induction in treated cells comparable to the WT proteins (Fig. 2B). However, the combination of both fusion proteins required a longer time, *i.e.*, 4 min instead of 2 min, to reach a fluorescence maximum. Subsequent decrease of fluorescence is mainly due to the release of the fluorescent probe and to other features that are difficult to analyse here.

The permeability to monovalent cations mediated by the pores was measured via the entry of ethidium and its combination with nucleic acids. Despite ethidium fluorescence is less sensitive than Ca^{2+} assay, these two influxes were demonstrated to be independent [7,24]. Ethidium entry showed higher variation than what was observed for calcium, but the fusion proteins retained significant biological activity (Fig. 2C). The activity of LukS-PV~GST + LukF-PV lies between those obtained for PVL and for PVL with a 1:10 dilution of LukS-PV, whereas the activity of LukS-PV + LukF-PV~GST was similar to that of PVL with the 1:10 dilution of LukS-PV (Fig. 2C). The combination of both fusion-proteins showed a considerably reduced ethidium influx, even if compared with the 1:10 dilution of LukS-PV (Fig. 2C). This difference can again be explained by the steric hindrance caused by GST molecules. After osmotic protection with PEG molecules, all couples involving at least one

fusion protein showed decays of the forward light scatter values comparable to those of the WT toxin (Fig. 2D). The inflexion point calculated for each curve clearly indicated permeability to PEG molecules with a hydrodynamic radius cut off between 1.12 and 1.2 nm. Thus, the diameter of the leucotoxin pores was not affected by GST fusion proteins [25].

We aimed at identifying oligomers formed by the fusion proteins (57 and 60 kDa, respectively) within the human PMNs membranes to confirm the pore formation. When retrieved from cell membranes, we noticed that oligomers formed by LukS-PV and LukF-PV, were very sensitive to detergents, as we only detected mixtures of monomers and dimers (Fig. 3A, lane 3). Therefore, we used a cross-linking agent, glutaraldehyde, applied consecutively after the saponin treatment, to help to stabilise the oligomers removed from the membranes in the presence of an excess of cell membrane proteins. Cross-linking proved efficient for both combination of fusion proteins (Fig. 3A, lanes 4-6), but essentially showed tetramers for all, despite hexamers might be suspected for the LukS-PV + LukF-PV~GST combination (Fig.3, lane 4, see arrows). The use of anti-LukS-PV and anti-LukF-PV antibodies, alone or in combination, allowed the detection of similar high molecular mass oligomers containing GST fusion leucotoxins (data not shown). The materials were specific for the leucotoxins, since no immunoreactive product was observed when analysing human PMNs alone (Fig. 3A, lane 2). The intensity of these bands rapidly decreased while the number of subunits increased. The increase of the steric hindrance due to the fusion GST proteins probably contributes to the intrinsic instability of leucotoxins pores when extracted from membranes and may impact on the resolution of the complete oligomers (Fig. 3A, lanes 4 – 6). Therefore, we decided to characterise the oligomers for only WT proteins and double cysteine mutants (see below).

3.2. Integrity of double-cysteine mutants

Double-cysteine mutants were analyzed in their oxidised forms (Fig. 4). Among the LukS-PV and LukF-PV double-cysteine mutants obtained in either reducing or oxidising conditions, only oxidized LukS-PV N2C-R16C and oxidized LukF-PV T5C-T21C contained very small amounts of homodimers (< 8%). The presence of these dimers did not cause a significant loss of biological activity.

Once purified, proteins were kept in 10 mM DTT. After desalting, titration of accessible thiols with DTNB ranged from 85 to 97% of free thiols, depending on the

mutants. After oxidation, accessible thiol residues in oxidized LukS-PV D1C-R16C, N2C-R16C, and LukF-PV T5C-T21C, S8C-K20C mutants decreased to less than 1.5% (1% was the limit of the titration assay). However, despite an excess of Cu^{2+} for oxidation, LukS-PV -1C-R16C only reached a $74 \pm 3\%$ formation of disulfide bonds. LukS-PV -1C-R16C oxidized with 30 mM H_2O_2 was finally used for functional evaluation and then, harbored only 2% of accessible thiols. These four mutants formed internal disulfide bonds (Fig. 4, lanes 6 to 9).

3.3. Binding of double-mutated leucotoxins

Using similar conditions as for the fusion proteins, we determined the apparent binding constants of the different mutants to their respective ligands. For LukS-PV mutants, we found k_{Iapp} values, ranging from 0.052 nM to 0.069 nM, similar to those of WT LukS-PV. Values for the binding of LukF-PV T5C-T21C to the LukS-PV mutants-membrane complexes ($k_{Iapp} = 2.8 - 5.2$ nM) were also close to that of the WT protein ($k_{Iapp} = 2.5$ nM). In contrast, binding of LukF-PV S8C-K20C was more affected. Indeed, binding of LukF-PV S8C-K20C to LukS-PV D1C-R16C and N2C-R16C gave k_{Iapp} of 18.5 ± 2.5 and 12 ± 2 nM, respectively. Binding became even worse with LukS-PV and LukS-PV -1C-R16C with $k_{Iapp} = 37 \pm 5$ and 24 ± 6 nM, respectively.

3.4. Biological activities of the leucotoxin mutants

3.4.1. Ca^{2+} entry.

Staali et al. [6] and Baba Moussa et al. [24] showed that Ca^{2+} influx and ethidium entry promoted by leucotoxins can be selectively inhibited. We evaluated the different oxidized LukS-PV and LukF-PV double mutants for their ability to activate PMNs and provoke Ca^{2+} -channel opening (Fig. 5). In our system, we assayed LukS-PV at 0.1 or 1 nM in combination with LukF-PV at 2 or 20 nM, and compare activity of associations of LukS-PV proteins/mutants at 1 nM and LukF-PV proteins/mutants at 20 nM. Table 1 summarizes kinetics of cell-associated Ca^{2+} fluorescence for different combinations. When mutants were first combined with the heterologous WT protein, kinetics of Ca^{2+} influx comparable with that of the WT toxin were observed for combinations involving LukS-PV -1C-R16C or N2C-R16C and LukF-PV at 20 nM (Fig. 5A). In contrast, the kinetics for 1 nM LukS-PV D1C-R16C combined with LukF-PV was decreased to a lower value than that obtained for WT

combination involving 2 nM of LukF-PV. The same thing was observed for LukS-PV + LukF-PV S8C-K20C whereas the combinations involving LukF-PV T5C-T21C was almost as active as the WT toxin (Fig. 5B, Table 1). Greater variations in Ca^{2+} induction were obtained when associating oxidized mutants each other (Fig. 5C and 5D). Among the combinations involving LukF-PV S8C-K20C, only LukS-PV N2C-R16C significantly induced Ca^{2+} influx. The combinations of LukS-PV (-1C-R16C) and N2C-R16C with LukF-PV T5-T21C produced kinetics almost similar to the WT toxin, and the combination involving LukS-PV D1C-R16C showed a better Ca^{2+} influx than its combination with LukS-PV (Fig. 5D and 5A, Table 1). Altogether, these data indicate that constraining N-terminal extremities might not be detrimental to biological activity.

3.4.2. Ethidium entry induced by pore formation.

Pore-formation and ethidium entry promoted by the oxidized mutated proteins was more variable than Ca^{2+} entry (Fig. 6). Table 2 summarizes kinetics of cell-associated ethidium fluorescence for different combinations. After combining with WT LukF-PV, LukS-PV N2C-R16C remained as active as WT LukS-PV, while LukS-PV -1C-R16C only retained 1:10 of activity (Fig. 6A, Table 2) and kinetics for LukS-PV D1C-R16C was dramatically affected. The kinetics of ethidium entry induced by LukS-PV combined with LukF-PV mutants were intermediate between those produced by a same concentration of LukF-PV and its 1:10 dilution. Combinations of reduced mutants with heterologous WT proteins or mutants did not show high difference in activity than if using oxidized mutants (data not shown). Figures 6C and 6D show the results obtained for combinations of oxidized and reduced mutants. Except for LukS-PV -1C-R16C + LukF-PV T5C-T21C (Fig. 6C), the associations of reduced mutants always induced higher ethidium influxes than those obtained with associations of oxidized mutants (Table 2). From combining oxidized mutants, the pairs involving LukS-PV -1C-R16C, N2C-R16C, combined with LukF-PV T5C-T21C showed intermediate activity (Table 2), while only LukS-PV N2C-R16C combined with LukF-PV S8C-K20C could be considered as significant as the last cited (Fig. 6D). It has to be noticed that all combinations of oxidized mutants less prone to induce Ca^{2+} influx were also less effective in pore formation.

3.4.3. Pore radii.

The pore radii of the most active oxidized leucotoxins were evaluated by osmotic protection induced with calibrated PEG molecules (Fig. 7). PMNs were protected against

osmotic disruption by PEG molecules having a hydrodynamic diameter between 1.12 nm and 1.22 nm. A same value ranging 1.2 nm was obtained for the WT toxin, indicating similar pore radii of these toxins.

3.5. Panton-Valentine leucocidin oligomers

Several experiments were carried out, checking for the recovery, the stability and the occurrence of oligomers formed by PVL. Control of cells without PVL did not evidence any cross-reacting material (Fig. 3B, lane 1). Challenging PVL oligomers with 4 ng of each component in solution was highly dependent on glutaraldehyde concentrations (Fig. 3, lanes 3 and 4), while they show a little tendency to spontaneously form dimers (lane 2). Indeed, the use of 0.3 mM glutaraldehyde allowed to obtain various concatemers containing 2 to 10 units, at least, whereas 3 mM applied on these purified proteins dramatically affected signals (lane 4). Application of 30 ng of PVL per assay to PMNs only allowed to observe few dimers in the described conditions without any glutaraldehyde treatment (Fig. 3, lane 5). It has to be noticed that a non boiled but SDS-containing assay resulted in non denatured materials, despite treated by saponin and glutaraldehyde, that did not give interpretable results (Fig. 3B, lane 6). Saponin treatment of cells largely helped the release of protein-containing oligomers. Whereas the applied toxin represents 100 ng/mL of cells (= 30 ng per load in the immunoblot), the saponin treatment brought about 100 µg/mL of contaminating proteins and the bulk of cell proteins represents 90 µg/mL. Each assay on cells involve an original volume of 1 mL further concentrated to 100 µL. Cells treated with PVL, saponin and with a consecutive cross-linking with 3% (v/v) glutaraldehyde allowed to identify oligomers species provided samples were boiled (Fig. 3B, lane 7-11), whether saponin treatment was carried out at 4°C or 23°C. In fact, the Schiff reaction promoted by glutaraldehyde is not stable in aqueous solution, but cross-linking certainly occurs in our assays through the Michael addition reaction onto hydrazide groups (R-NH₂). Considering the excess of proteins in lysates, the observed oligomers are assumed as preformed oligomers, since the cross-linking reaction cannot be considered to be specific of the PVL proteins. This addition reaction was stopped by ethanolamine introduced in the loading buffer and heating in order to minimize the cross-linking duration. Fig. 3B, lanes 7 and 8 reveal bands corresponding to any intermediates between monomers and

octamers that were recognized by anti-LukS-PV and/or (data not shown) anti-LukF-PV affinity-purified antibodies. In fact, instable oligomers obtained after extraction from membranes with saponin might have been stabilised by using glutaraldehyde cross-linking. The quantity of oligomers recovered was greater for WT toxin and the most biologically active combination of PVL double mutants (Fig. 3B, lanes 10 and 11) than for the less active one (Fig.3B, lane 9) and remained significant compared to PVL concatemers in solution (Fig. 3, lane 3).

4. Discussion

Although staphylococcal α -toxin and bipartite leucotoxins fold in a comparable way, differences exist in the sequences and structures of these two subfamilies of toxins that imply differences in function [30]. Among these differences, the cationic selectivity of leucotoxins was found to be correlated to the presence of negative charges in the lumen of their pore whereas α -toxin pores are globally positively charged [16]. Another example is stoichiometry. Indeed, α -toxin is known to form heptamers in target cells [20] and hexamers in some different membranes [31] whereas the bipartite character of leucotoxins does not easily hold a heptameric axis that would also imply interactions between two proteins of the same class. In fact, the presence of strictly alternating S and F proteins was recently proven in the case of leucotoxin pores [32]. In addition, HlgA and HlgB have been shown to form octamers in di-PhCho (di-phytanoyl-phosphatidylcholine) Planar Lipid Membranes (PLM) bathed with 1 M KCl [3] while hexamers were found in majority in human red blood cells using Fluorescence Resonance Energy Transfer combined with Total Internal Reflection Fluorescence [2]. More recently, octamers were identified in synthetic bilayers by using cross-linking between mutated components of gamma-hemolysin [5]. Considering the sequence alignment of the S and F components of leucotoxins and of α -toxin [23], differences between these proteins are located at the N-termini, at each sides of the central domain and in the last fifty C-terminal residues. Thus, it does not seem possible for S components and not obvious for F components that residues located at the N-termini are involved in subunit-subunit interactions as observed in the α -toxin heptamer [20]. The significance of these differences with α -toxin is not understood, so far. It has been shown that deleting the first two residues or labelling the N-terminal extremity

of α -toxin dramatically reduce its biological activity [33,34]. It is also noteworthy that leucotoxins oligomers are less stable than those of α -toxin, hampering their crystallisation. An investigation using Infrared spectroscopy did not evidenced any significant modification in the β -strands content when passing from the soluble state to the pore formed in planar lipid membranes [4].

In this work, we try to bring out arguments that N-terminal extremities of leucotoxins keeping part of the β -sandwich core during pore-formation leads to functional toxins, and that a large unfolding of these extremities is not obvious. Despite the recombinant expression system used in this study adds a N-terminal octapeptide, the proteins that were produced retain a biological activity comparable to native toxins [24,25]. Moreover, GST fusions of LukS-PV or LukF-PV also proved their binding efficacy. LukS-PV~ GST + LukF-PV was only from 3 to 5 fold less efficient than the corresponding WT proteins, and the LukS-PV + LukF-PV~GST was also a bit less effective than the WT couple. The binding of LukF-PV~GST was affected when tested on its GST fusion counterpart protein, and the resulting biological activity significantly decreased, but remained biologically active. Thus, the decrease in binding might be due to steric hindrance produced by the fusion, especially in the case of the GST couple. Despite a higher sensitivity of the Ca^{2+} entry assay, the decrease of Ca^{2+} influx induced by the GST couple correlated with its lower pore-forming activity. It can be assumed, therefore, that the decrease in pore-forming activity results from the reduced binding of LukF-PV~GST (Fig. 2C). Taking into account all these features, it becomes less realistic that N-terminal extremities of leucotoxins extensively unfold to interact with residues of adjacent monomers located within the lumen of the pore (see Fig. 1).

In the second approach used in this study, N-terminal extremities of both PVL components were locked to the protein core by disulfide bonds via site-directed mutagenesis. Different locations for cysteine substitution were chosen for each protein. The very first residues and R16 of LukS-PV appeared as good candidates for substitution by cysteines and subsequent bridging. Indeed, although the first two N-terminal residues are absent in the three-dimensional structure of LukS-PV [23], three positions were chosen by analogy with LukF-PV which produced internal disulfide bonds in majority. Thus, formation of homodimers during assisted oxidation could not be responsible for a great decrease in the biological activity of the mutated toxins. Oxidation with 30 mM H_2O_2 could alternatively be preferred to Cu^{2+} oxidation for some

mutants, but in any case, excess of oxidant was removed before any biological assays. The binding of oxidized LukS-PV mutants to human PMNs was not affected, but that of LukF-PV S8C-K20C to LukS-PV mutants was diminished from 6 to 15 fold compared to that of WT proteins. This may suggest some modifications in the overall structures and some adverse compatibilities between new structures.

In fact, when combined with LukS-PV LukF-PV S8C-K20C showed diminished both in Ca^{2+} induction (>10 fold) and in pore formation (less than 10 fold), but activities largely decreased for combinations with LukS-PV D1C-R16C or -1C-R16C while they remained significant for the combination with LukS-PV N2C-R16C. Therefore, it can be assumed that LukS-PV N2C-R16C may harbour functionality similar to LukS-PV, and that the decrease in biological activities observed for the couples described above is mainly due to the decrease in binding of LukF-PV S8C-R16C.

In the case of LukF-PV T5C-T21C, the D1C-R16C mutation affects biological activities in any combinations. Nevertheless, LukF-PV T5C-T21C combined with LukS-PV -1C-R16C or LukS-PV N2C-R16C induced Ca^{2+} activations and pore formation that only decreased to 3-5 times those of the WT toxins, and, thus considering the rigidity introduced into structures confers functions comparable to those of PVL.

To complete our study, we investigated the stoichiometry and the hydrodynamic diameter of the pores. One major difference between the pores formed by leucotoxins compared to those formed by α -toxin is their instability when extracted from target membranes [20,25]. The use of a dedicated procedure involving the excised pores from cell membranes and the rapid cross-linking with glutaraldehyde allowed us to identify the variety of possible oligomers and not to re-assemble monomers, because of the 1×100 weight excess of membrane proteins. Hence, a clear indication that octamers are formed by PVL on its target cells has been obtained, whatever the combination of mutated proteins considered. This observation strengthens those published recently about another leucotoxin onto synthetic membranes [5]. Though our data suggest significant amounts of natural octamers, no indication remains available whether hexamers and heptamers are functional. Osmotic protection of pores using PEG molecules evoked hydrodynamic radii of about 1.2 nm, in agreement with previous data [4,24,25], and indicates comparable protections for both WT and mutated toxins.

In conclusion, none of the observations obtained in this work favour a large unfolding of the N-terminal extremities of leucotoxin-constituting proteins, and their structural location for interactions with two adjacent protomers along the lumen of the pore as in the case of the related α -toxin (Fig. 1B). Recent data have suggested that the N-terminal extremity of α -toxin is probably not exclusively required in the oligomer assembly despite the binding of α -toxin truncates onto membranes remains to be quantified [35]. However, we cannot exclude slight conformational modification of these extremities during pore formation by bipartite leucotoxins. Constraints via disulfide bonds actually support functionality of the toxins, according to mutant combinations, and clearly promote octameric bipartite pores comparable to WT ones in target cells, even rigidity brought into molecules by these constraints may have lowered some steps in pore formation process. The next structure determination of assembled S and F proteins may shed new light on the role of the N terminus on the assembly of leucotoxins.

Acknowledgements

This work was granted by the “Direction de la Recherche et des Etudes Doctorales” (EA-3432). We thank Gabriella Viero for comments, Eric Martinez and A. Edelman & associates for English. O. Joubert is supported by grants from a research convention between Provincia Autonoma di Trento (Italy), (project StaWars) and Université Louis Pasteur, and the “Conseil Régional d’Alsace”.

References

- [1] G. Prévost, Toxins in *Staphylococcus aureus* pathogenesis, in: T. Proft (Ed.), Microbial Toxins. Molecular and Cellular Biology, Norfolk, England, 2005, pp 243-284.
- [2] V.T. Nguyen, Y. Kamio, H. Higuchi, Single-molecule imaging of cooperative assembly of gamma-hemolysin on erythrocyte membranes, *Embo J* 22 (2003) 4968-79.
- [3] G. Miles, L. Movileanu, H. Bayley, Subunit composition of a bicomponent toxin: staphylococcal leukocidin forms an octameric transmembrane pore, *Protein Sci* 11 (2002) 894-902.
- [4] M. Ferreras, F. Hoper, M. Dalla Serra, D.A. Colin, G. Prévost, G. Menestrina, The interaction of *Staphylococcus aureus* bi-component gamma-hemolysins and leucocidins with cells and lipid membranes, *Biochim Biophys Acta* 1414 (1998) 108-26.
- [5] L. Jayasinghe, H. Bayley, The leukocidin pore: Evidence for an octamer with four LukF subunits and four LukS subunits alternating around a central axis, *Protein Sci* 14 (2005) 2550-61.
- [6] G. Prévost, L. Mourey, D.A. Colin, G. Menestrina, Staphylococcal pore-forming toxins, in: F.G.v.d. Goot (Ed.), Current Topics in Microbiology and Immunology: Pore-forming toxins, Springer Verlag, Berlin, 2001, pp 53-83.
- [7] L. Staali, H. Monteil, D.A. Colin, The staphylococcal pore-forming leukotoxins open Ca²⁺ channels in the membrane of human polymorphonuclear neutrophils, *J Membr Biol* 162 (1998) 209-16.
- [8] J.D. Pédelacq, L. Maveyraud, G. Prévost, L. Baba-Moussa, A. Gonzalez, E. Courcelle, W. Shepard, H. Monteil, J.P. Samama, L. Mourey, The structure of a *Staphylococcus aureus* leucocidin component (LukF-PV) reveals the fold of the water-soluble species of a family of transmembrane pore-forming toxins, *Structure Fold Des* 7 (1999) 277-87.
- [9] G. Menestrina, M. Dalla Serra, G. Prévost, Mode of action of beta-barrel pore-forming toxins of the staphylococcal alpha-hemolysin family, *Toxicon* 39 (2001) 1661-72.
- [10] G. Prévost, B. Cribier, P. Couppié, P. Petiau, G. Supersac, V. Finck-Barbançon, H. Monteil, Y. Piémont, Panton-Valentine leucocidin and gamma-hemolysin from

- Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities, *Infect Immun* 63 (1995) 4121-9.
- [11] A. Gravet, M. Rondeau, C. Harf-Monteil, F. Grunenberger, H. Monteil, J.M. Scheftel, G. Prévost, Predominant *Staphylococcus aureus* isolated from antibiotic-associated diarrhea is clinically relevant and produces enterotoxin A and the bicomponent toxin LukE-lukD, *J Clin Microbiol* 37 (1999) 4012-9.
- [12] M. Coraiola, G. Viero, M. Comai, C. Potrich, M. Ferreras, L. Baba-Moussa, D.A. Colin, G. Prévost, G. Menestrina, S. Bhadki, M. Dalla Serra, *Staphylococcus aureus* bicomponent γ -hemolysins, HlgA, HlgB, and HlgC, can form mixed pores containing all components, *J Chem Inf Model* In press (2005).
- [13] P. Couppié, B. Cribier, G. Prévost, Leukocidin from *Staphylococcus aureus* and cutaneous infections: an epidemiologic study, *Arch Dermatol* 130 (1994) 1208-9.
- [14] Y. Gillet, B. Issartel, P. Vanhems, J.C. Fournet, G. Lina, M. Bes, F. Vandenesch, Y. Piémont, N. Brousse, D. Floret, J. Etienne, Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients, *Lancet* 359 (2002) 753-9.
- [15] G. Menestrina, Ionic channels formed by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin: voltage-dependent inhibition by divalent and trivalent cations, *J Membr Biol* 90 (1986) 177-90.
- [16] M. Comai, M. Dalla Serra, M. Coraiola, S. Werner, D.A. Colin, H. Monteil, G. Prévost, G. Menestrina, Protein engineering modulates the transport properties and ion selectivity of the pores formed by staphylococcal gamma-haemolysins in lipid membranes, *Mol Microbiol* 44 (2002) 1251-67.
- [17] O.V. Krasilnikov, P.G. Merzlyak, L.N. Yuldasheva, C.G. Rodrigues, S. Bhakdi, A. Valeva, Electrophysiological evidence for heptameric stoichiometry of ion channels formed by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin in planar lipid bilayers, *Mol Microbiol* 37 (2000) 1372-8.
- [18] A. Valeva, R. Schnabel, I. Walev, F. Boukhallouk, S. Bhakdi, M. Palmer, Membrane insertion of the heptameric staphylococcal alpha-toxin pore. A domino-like structural transition that is allosterically modulated by the target cell membrane, *J Biol Chem* 276 (2001) 14835-41.

- [19] J.E. Gouaux, O. Braha, M.R. Hobaugh, L. Song, S. Cheley, C. Shustak, H. Bayley, Subunit stoichiometry of staphylococcal alpha-hemolysin in crystals and on membranes: a heptameric transmembrane pore, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994) 12828-31.
- [20] L. Song, M.R. Hobaugh, C. Shustak, S. Cheley, H. Bayley, J.E. Gouaux, Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore, *Science* 274 (1996) 1859-66.
- [21] A. Valeva, J. Pongs, S. Bhakdi, M. Palmer, Staphylococcal alpha-toxin: the role of the N-terminus in formation of the heptameric pore - a fluorescence study, *Biochim Biophys Acta* 1325 (1997) 281-6.
- [22] R. Olson, H. Nariya, K. Yokota, Y. Kamio, E. Gouaux, Crystal structure of staphylococcal LukF delineates conformational changes accompanying formation of a transmembrane channel, *Nat Struct Biol* 6 (1999) 134-40.
- [23] V. Guillet, P. Roblin, S. Werner, M. Coraiola, G. Menestrina, H. Monteil, G. Prévost, L. Mourey, Crystal structure of leucotoxin S component: new insight into the Staphylococcal beta-barrel pore-forming toxins, *J Biol Chem* 279 (2004) 41028-37.
- [24] L. Baba-Moussa, S. Werner, D.A. Colin, L. Mourey, J.D. Pédelacq, J.P. Samama, A. Sanni, H. Monteil, G. Prévost, Discoupling the Ca(2+)-activation from the pore-forming function of the bi-component Panton-Valentine leucocidin in human PMNs, *FEBS Lett* 461 (1999) 280-6.
- [25] S. Werner, D.A. Colin, M. Coraiola, G. Menestrina, H. Monteil, G. Prévost, Retrieving biological activity from LukF-PV mutants combined with different S components implies compatibility between the stem domains of these staphylococcal bicomponent leucotoxins, *Infect Immun* 70 (2002) 1310-8.
- [26] B. Hazes, B.W. Dijkstra, Model building of disulfide bonds in proteins with known three-dimensional structure, *Protein Eng* 2 (1988) 119-25.
- [27] D.A. Colin, I. Mazurier, S. Sire, V. Finck-Barbançon, Interaction of the two components of leukocidin from *Staphylococcus aureus* with human polymorphonuclear leukocyte membranes: sequential binding and subsequent activation, *Infect Immun* 62 (1994) 3184-8.

- [28] O. Meunier, A. Falkenrodt, H. Monteil, D.A. Colin, Application of flow cytometry in toxinology: pathophysiology of human polymorphonuclear leukocytes damaged by a pore-forming toxin from *Staphylococcus aureus*, *Cytometry* 21 (1995) 241-7.
- [29] V. Gauduchon, S. Werner, G. Prévost, H. Monteil, D.A. Colin, Flow cytometric determination of Panton-Valentine leucocidin S component binding, *Infect Immun* 69 (2001) 2390-5.
- [30] G. Prévost, L. Mourey, D.A. Colin, H. Monteil, M. Dalla Serra, G. Menestrina, Alpha-toxin and bêta-barrel pore-forming toxins (leucocidins, alpha-, gamma-, and delta-cytolysins) of *Staphylococcus aureus*, in: J.E. Alouf, and M.R. Popoff Eds.), *The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins*, 2005, pp 588-605.
- [31] D.M. Czajkowsky, S. Sheng, Z. Shao, Staphylococcal alpha-hemolysin can form hexamers in phospholipid bilayers, *J Mol Biol* 276 (1998) 325-30.
- [32] G. Viero, R. Cunnaccia, G. Prévost, S. Werner, H. Monteil, D. Keller, O. Joubert, G. Menestrina, M. Dalla Serra, Homologous versus heterologous interactions in the bicomponent staphylococcal gamma-hemolysins pore, *Biochem J* in press (2005).
- [33] B. Walker, M. Krishnasastri, L. Zorn, H. Bayley, Assembly of the oligomeric membrane pore formed by Staphylococcal alpha-hemolysin examined by truncation mutagenesis, *J Biol Chem* 267 (1992) 21782-6.
- [34] A. Valeva, A. Weisser, B. Walker, M. Kehoe, H. Bayley, S. Bhakdi, M. Palmer, Molecular architecture of α toxin pore: a 15-residue sequence lines the transmembrane channel of staphylococcal alpha-toxin, *Embo J* 15 (1996) 1857-64.
- [35] L. Jayasinghe, G. Miles, H. Bayley, Role of the amino latch of staphylococcal alpha-hemolysin in pore formation: a co-operative interaction between the N terminus and position 217, *J Biol Chem* (2005).

Figure Legends

Fig. 1. Structural features of the N-terminal extremities of staphylococcal bipartite leucotoxins and α -toxin. **A.** Sequence alignment of the N-termini of staphylococcal α -toxin and of the two components LukF-PV and LukS-PV of the Panton-Valentine leucocidin. The strands arrangement of LukF-PV is indicated by dashes. Cysteine-substituted residues, indicated in bold in the sequences, are also shown on the 3D-structures of LukF-PV (PDB code 1pvl) and LukS-PV (PDB code 1t5r). **B.** For comparison, view of three protomers of the α -toxin heptamer (PDB code 7AHL) and polar interactions involving the N-terminal extremity of a given subunit (red) with residues of two adjacent protomers (grey and dark grey) within the α -toxin pore lumen.

Fig. 2. Biological activity of GST fusion proteins. **A.** Control of homogeneity by 3-8% (w/vol) SDS-PAGE of 200 ng of each purified protein is shown. 1: molecular ladder, 2: LukF-PV, 3: LukF-PV~GST, 4: LukS-PV, 5: LukS-PV~GST. **B.** Flow cytometry evaluation of the Ca^{2+} entry into human PMNs mediated by combinations of wild type LukS-PV and LukF-PV and GST fusion proteins. **C.** Flow cytometry evaluation of the ethidium entry into human PMNs mediated by combinations of LukS-PV and LukF-PV and GST fusion proteins. **D.** Hydrodynamic radius of pores formed by WT and fusion proteins in human PMNs determined after a 30 min incubation of toxins (20 nM of S and 100 nM of F components). Osmotic protection by polyethylene glycol molecules was assessed by variations of the mean FSC (forward light scatter) value in the presence of PEG molecules of different hydrodynamic radii.

Fig. 3. Oligomers formed by PVL and modified toxins. Oligomers were checked in solution or after recovery from treated human PMNs, 3-8% (w/v) SDS-PAGE and immunoblotting with anti-LukS-PV and anti-LukF-PV affinity-purified rabbit antibodies. **A.** Lane 1: LukS-PV + LukF-PV without membranes, Lane 2: PMNs only, Lane 3: LukS-PV~GST + LukF-PV~GST, Lanes 4, 5, 6: toxins applied on PMNs membranes and then saponin / glutaraldehyde treated and heated 5 min at 100°C as described in materials and methods, Lane 4: LukS-PV + LukF-PV~GST, Lane 5: LukS-PV~GST + LukF-PV, Lane 6: LukS-PV~GST + LukF-PV~GST. **B.**

Lane 1: PMNs only, Lane 2: LukS-PV + LukF-PV in solution (4 ng each), Lane 3: LukS-PV + LukF-PV (4 ng each/load) treated by 0.3 mM glutaraldehyde, Lane 4: LukS-PV + LukF-PV saponin / treated with 3 mM glutaraldehyde. Lanes 5-11: each PVL components (30 ng each/load) was applied on PMNs, Lane 5: LukS-PV + LukF-PV saponin treated, Lane 6: LukS-PV + LukF-PV saponin- and glutaraldehyde-treated without heating at 100°C, Lane 7: LukS-PV + LukF-PV saponin at 0°C / glutaraldehyde treated and boiling at 100°C, Lane 8-11: toxins applied on PMNs, saponin treatment at room temperature + 1 mM glutaraldehyde and boiling, Lane 8: LukS-PV + LukF-PV, Lane 9: LukS-PV -1C-R16C + LukF-PV S8C-K20C, Lane 10: LukS-PV N2C-R16C + LukF-PV S8C-K20C, Lane 11: LukS-PV + LukF-PV oxidized.

Fig. 4. Control of homogeneity and absence of significant dimerisation by 3-8% (w/v) SDS-PAGE of 200 ng of each mutated protein: Lane 1, molecular ladder, Lane 2: LukF-PV, Lane 3: LukF-PV T5C-T21C oxidized (ox), Lane 4: LukF-PV S8C-K20Cox, Lane 5: molecular ladder, Lane 6: LukS-PV, Lane 7: LukS-PV -1C-R16Cox, Lane 8: LukS-PV D1C-R16Cox, Lane 9: LukS-PV N2C-R16Cox.

Fig. 5. Flow cytometry evaluation of Ca^{2+} entry into human PMNs for different combinations of purified WT S and F proteins and their oxidized double mutants . **A.** Oxidized LukS-PV mutants were tested with WT LukF-PV. **B.** Oxidized LukF-PV double mutants were tested with WT LukS-PV. **C.** Oxidized LukS-PV double mutants were tested with LukF-PV S8C-K20Cox. **D.** Oxidized LukS-PV double mutants were tested with LukF-PV T5C-T21Cox.

Fig. 6. Flow cytometry evaluation of ethidium entry into human PMNs for different combinations of purified WT S and F proteins and their oxidized or reduced double mutants . **A.** Oxidized LukS-PV mutants were first tested with WT LukF-PV. **B.** Oxidized LukF-PV mutants were tested with WT LukS-PV. **C.** Oxidized or reduced LukS-PV double mutants were tested with LukF-PV S8C-K20C. **D.** Oxidized or reduced LukS-PV double mutants were tested with LukF-PV T5C-T21C .

Fig. 7. Determination of the hydrodynamic radius of pores formed by the different combinations of oxidized LukS-PV (20 nM) and LukF-PV (100 nM) mutants 30 min after application of toxins to human PMNs. Osmotic protection was assessed by variations of the mean FSC (forward light scatter) value in the presence of polyethylene glycol molecules of different hydrodynamic radii. **A.** Oxidized LukS-PV double mutants were tested with LukF-PV S8C-K20Cox. **B.** Oxidized LukS-PV double mutants were tested with LukF-PV T5C-T21Cox.

Table 1. Times (expressed in min) to reach 5% (a) and 100% (b) of the Fluo-3 fluorescence characteristic of the cellular entry of Ca²⁺ due to calcium channels activation by combinations of PVL (taken as reference) and its mutants.

	LukF 40 nM	LukF 2 nM	LukF-T5CT21C	LukF-S8CK20C
LukS 1nM	1.25 ^a 2.5 ^b	3.5 ^a 10 ^b (95%)	1.25 ^a 5 ^b	4.5 ^a n.r.
LukS-D1CR16C	6 ^a n.r. ^b	n.d.	3.4 ^a 7.5 ^b (90%)	n.r. n.r.
LukS-(-1C)R16C	1.25 ^a 2.5 ^b	n.d.	1.75 ^a 5 ^b	n.r. n.r.
LukS-N2CR16C	1.25 ^a 2.5 ^b	n.d.	1.5 ^a 5 ^b	3 ^a 7.5 ^b (95%)

n.r.: not reached ; n.d.: not determined

Table 2. Times (expressed in min) to reach 5% (a), 50% (b) and 100% (c) of the entry of ethidium into cells by pores formed by combinations of PVL (taken as reference) and its mutants.

	LukF 40 nM	LukF 2 nM	LukF-T5C-T21C	LukF-S8C-K20C
LukS 1nM	4 ^a 9.6 ^b 25 ^c	15 ^a 31 ^b 48 ^c	9.6 ^a 18.5 ^b 35 ^c	9.6 ^a 18.5 ^b 35 ^c
LukS 0.1nM	6 ^a 12.5 35	n.d.	n.d.	n.d.
LukS-D1C-R16C	22 ^a 45.5 ^b 70 ^c	n.d.	12 ^a 28 ^b 45.4 ^c	22 ^a 36 ^b 50.2 ^c
LukS-(-1C)-R16C	6 ^a 12.5 ^b 30 ^c	n.d.	6.5 ^a 17 ^b 40 ^c	22 ^a 36 ^b 48.8 ^c
LukS-N2C-R16C	2 ^a 8.6 ^b 25 ^c	n.d.	6.5 ^a 17 ^b 40 ^c	3 ^a 15 ^b 35 ^c

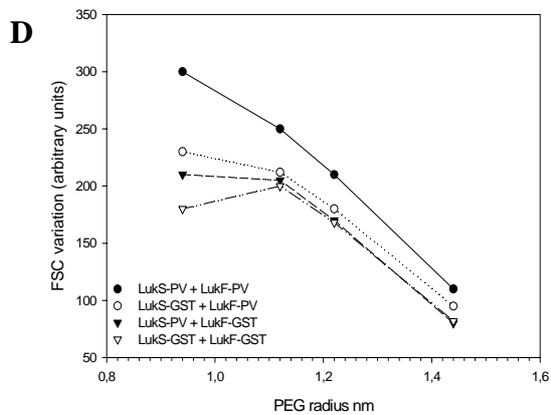
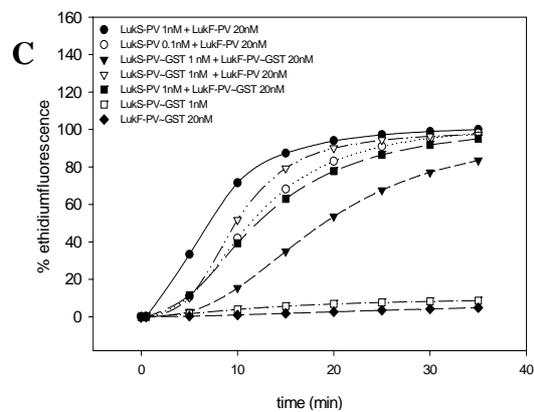
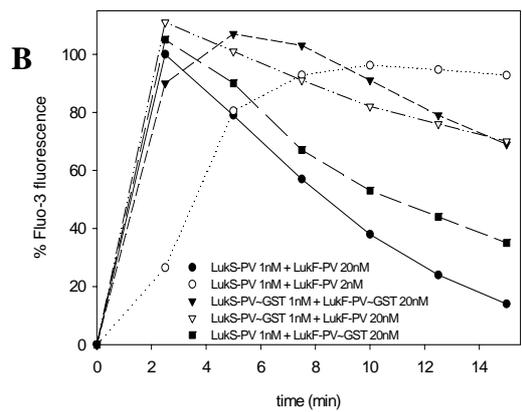
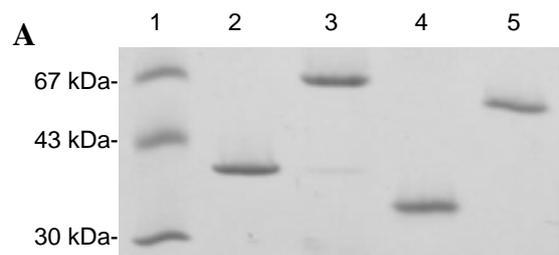


Figure 2. Joubert et al.

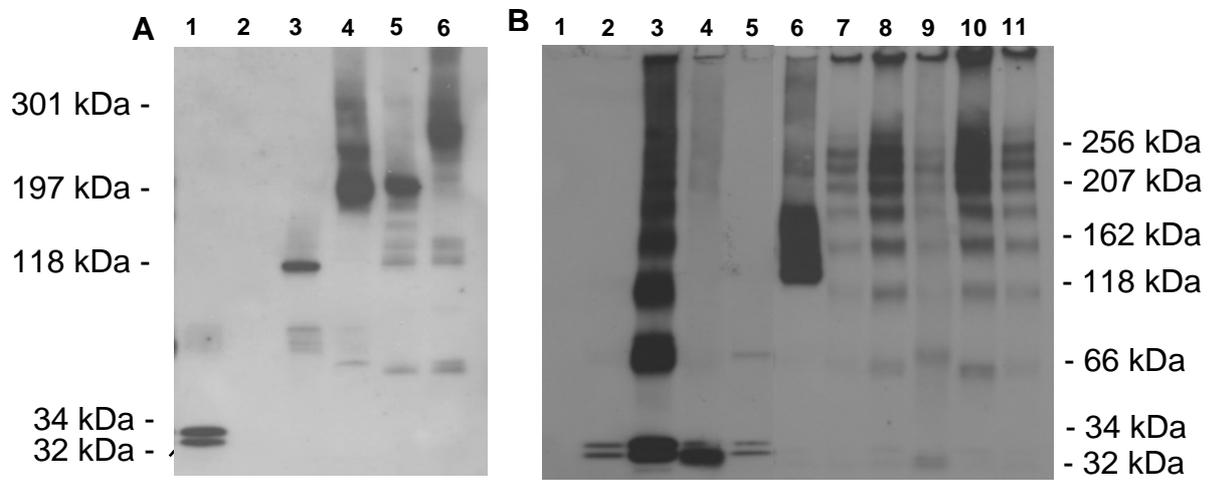


Figure 3. Joubert et al.

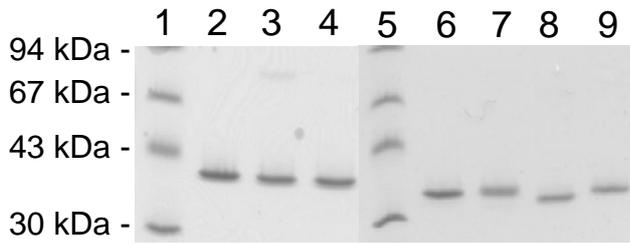


Figure 4. Joubert et al.

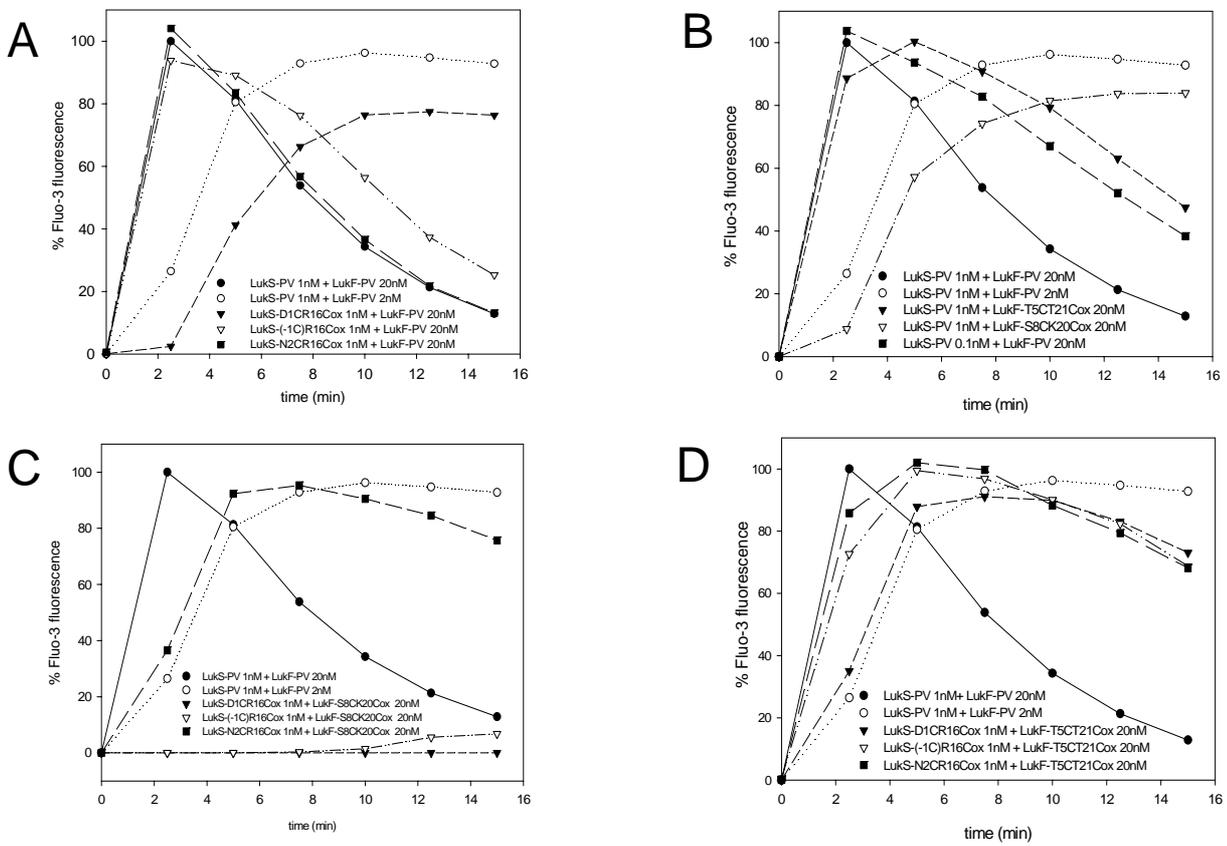


Figure 5. Joubert et al.

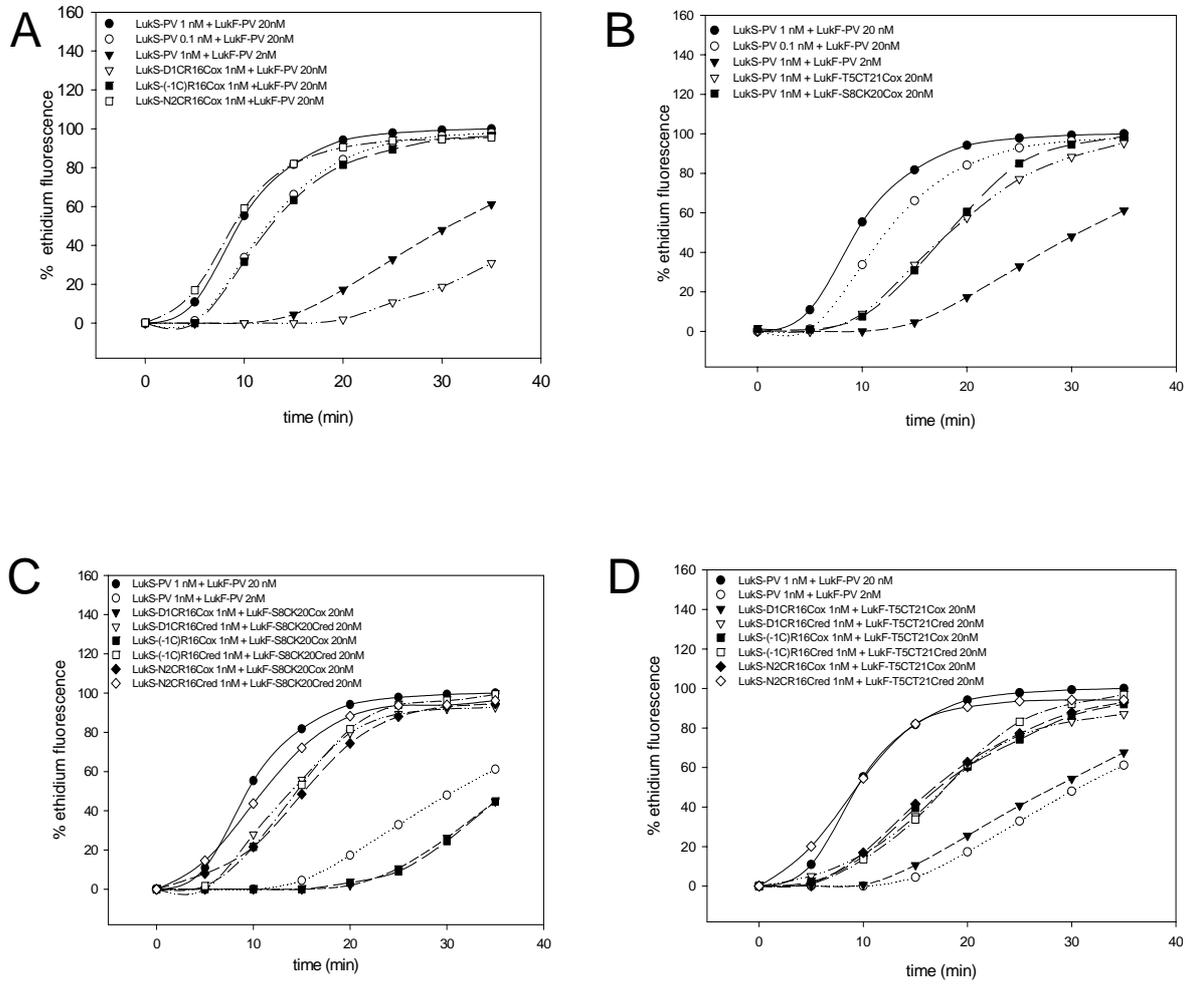


Figure 6. Joubert et al.

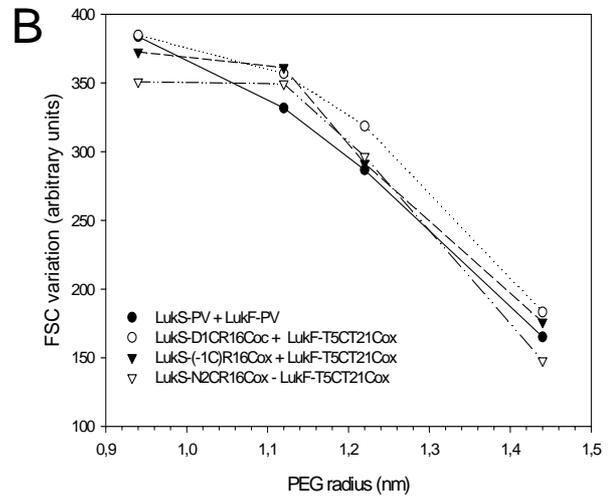
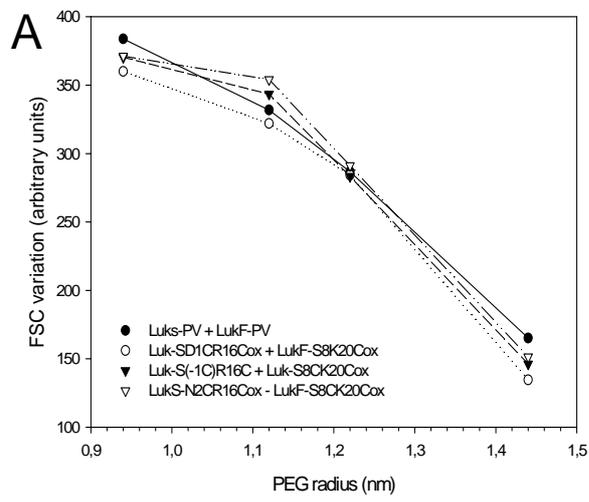


Figure 7. Joubert et al.

B. Discussion de l'article n°1

Pour ce travail, des leucotoxines sauvages, fusionnées à la GST ou des mutants double-cystéine ont été utilisés. Les mutants LukS-PV N2C-R16C et LukF-PV T5C-T21C, sous leur forme oxydée, contiennent quelques traces d'homodimères (**Figure 4** de l'article). Cependant, ceci n'induit pas une baisse significative de l'activité biologique. Après réduction par 10 mM de DTT et un dessalage, on mesure, grâce au DTNB, entre 85 et 97 % de groupements sulfhydriles accessibles. Afin de promouvoir la formation de ponts disulfures, nous avons utilisé le cuivre comme agent oxydant. Il est utilisé en excès (1,5 mM de Cu^{2+} pour 40 μM de protéine), et ainsi, il reste moins de 1,5 % de groupements sulfhydriles dans tous les mutants testés (excepté LukS-PV -1C-R16C), signifiant ainsi que le reste de ces groupements sont impliqués dans la liaison avec le groupement SH voisin, formant ainsi un pont disulfure. Dans le cas du mutant LukS-PV -1C-R16C, environ 26 % des groupements SH demeurent accessibles. Pour ce mutant, l'oxydation par 30 mM de peroxyde d'hydrogène permet d'obtenir une formation maximale de ponts disulfures.

1. Activité des toxines fusionnées à la GST

Les toxines fusionnées à la GST, LukS-PV~GST et LukF-PV~GST, ont une fixation très voisine de leurs homologues sauvages (ki_{app} de 0,2 et 3,4 nM, respectivement). Cependant, le ki_{app} de LukF-PV~GST pour LukS-PV~GST est de 17,4 nM. L'induction de l'activité des canaux calciques (**Figure 2B** de l'article) des combinaisons mixtes partenaire sauvage + partenaire fusionné à la GST est identique à celle du couple de protéines sauvages. En revanche, la combinaison des deux partenaires S et F fusionnés à la GST nécessite, pour atteindre le même maximum de fluorescence, un délai supérieur. L'entrée de l'éthidium par le pore néoformé se montre plus sensible à ces modifications (**Figure 2C** de l'article). En effet, la combinaison LukS-PV~GST + LukF-PV présente une activité intermédiaire entre celle du couple sauvage et une dilution au $1/10^e$. La combinaison LukS-PV + LukF-PV~GST est aussi active qu'une dilution au $1/10^e$ de la PVL. La combinaison des deux protéines fusionnées à la GST présente une forte diminution de l'activité, aisément expliqué par l'encombrement stérique provoqué par les molécules de GST. Les expériences de protection membranaire

(**Figure 2D** de l'article) avec des molécules de PEG de rayons hydrodynamiques variables montrent que le diamètre du pore formé n'est pas modifié par la présence de GST en N-terminal.

2. Activité des doubles mutants de LukS-PV et LukF-PV

Par ailleurs, la fixation des doubles mutants de LukS-PV à la membrane est identique à celle de la toxine sauvage ($k_{\text{Iapp}} = 0,052 \text{ nM} - 0,069 \text{ nM}$). De même, le k_{Iapp} de LukF-PV T5C-T21C pour LukS-PV (et mutants) fixé à la membrane est voisin de celui de la toxine sauvage (2,8 – 5,2 et 2,5, respectivement), en revanche, celui de LukF-PV S8C-K20C est plus grand. La liaison de LukF-PV S8C-K20C pour LukS-PV et LukS-PV –1C-R16C est diminuée ($k_{\text{Iapp}} = 37$ et $24 \pm 6 \text{ nM}$, respectivement), tandis que pour LukS-PV D1C-R16C et N2C-R16C elle l'est moins ($k_{\text{Iapp}} = 18,5$ et $12 \pm 2 \text{ nM}$, respectivement).

2.1. Activités biologiques

2.1.1. Entrée de calcium

L'entrée de calcium dans les PNs induite par l'action des doubles mutants est illustrée dans la **figure 5** de l'article (voir aussi **Table 1**). Les combinaisons hétérologues des toxines sauvages et mutantes offrent des cinétiques d'entrée de calcium similaire au contrôle, sauf les combinaisons LukS-PV D1C-R16C + LukF-PV et LukS-PV + LukF-PV S8C-K20C qui sont moins actives (**Figure 5A et 5B**). Les plus fortes variations sont observées lorsque l'on combine les doubles mutants oxydés entre eux (**Figure 5C et 5D**). Les combinaisons LukF-PV T5C-T21C avec les doubles mutants LukS-PV sont biologiquement actives (**Figure 5D**), tandis que celles avec LukF-PV S8C-K20C le sont beaucoup moins (**Figure 5C**).

2.1.2. Entrée d'éthidium induite par la formation du pore

La formation des pores constitués par les mutants oxydés présente également des différences par rapport aux toxines sauvages (**Figure 6**). Quel que soit le partenaire de classe F associé, le mutant oxydé le plus actif est LukS-PV N2C-R16C et le moins actif est LukS-PV D1C-R16C. Les 2 mutants LukF-PV sont également moins actifs (**Figure 6B**). La combinaison la plus

active est LukS-PV N2C-R16C + LukF-PV S8C-K20C, elle l'est autant que la toxine sauvage (**Figure 6D**). LukS-PV N2C-R16C et LukS-PV -1C-R16C sont légèrement plus actifs combinés avec LukF-PV S8C-K20C qu'avec LukF-PV T5C-T21C, activité cependant comparable à celle de la combinaison avec LukS-PV.

Les entrées d'éthidium induites par les mutants oxydés ou réduits sont enfin comparées (**Figure 6C et 6D**). La plupart des combinaisons sont affectées par l'oxydation. L'activité des pores formés par LukS-PV N2C-R16C + LukF-PV S8C-K20C et par LukS-PV -1C-R16C + LukF-PV T5C-T21C ne sont en revanche pas modifiées par l'oxydation.

2.2. Caractéristiques du pore formé

De même que pour les protéines de fusion à la GST, le diamètre du pore formé par les toxines mutantes est identique à celui formé par les toxines sauvages (**Figure 7**).

3. Observation des oligomères par immunoréplique

Les oligomères de leucotoxines formés par LukS-PV et LukF-PV sur les membranes de PNs sont très sensibles aux détergents. Ainsi, par la technique classique de « western blot », on ne détecte que des monomères (**Figure 3B, piste 2** de l'article). Nous avons ainsi utilisé un agent pontant, le glutaraldéhyde, après l'application du détergent, la saponine, dans le but de stabiliser les oligomères de leucotoxines constitués sur les membranes cellulaires (**Figure 3** de l'article). L'application de 0,3 mM de glutaraldéhyde sur de la PVL en solution provoque la formation de concatémères allant de 2 à 10 unités au moins (**Figure 3B, piste 3**). Différentes conditions sont utilisées, afin d'optimiser au maximum la récupération d'oligomères à partir de PNs traités à la PVL (**Figure 3B, piste 6-8 et 11** de l'article), avec le couple biologiquement actif LukS-PV N2C-R16C + LukF-PV S8C-K20C (**Figure 3B, piste 10**) et inactif LukS-PV -1C-R16C + LukF-PV S8C-K20C (**Figure 3B, piste 9**). Les cellules sans toxine, traitées à la saponine et au glutaraldéhyde, ne révèlent pas de réaction non spécifique des anticorps (**Figure 3b, piste 1**). La récupération des oligomères dépend des concentrations en glutaraldéhyde utilisées ; 0,3 mM

Les cellules traitées à la PVL, à la saponine (4°C ou 23°C) et par 3% (v/v) de glutaraldéhyde permet d'observer des oligomères si l'échantillon est chauffé (**Figure 3B, pistes 5-8**). Les pistes 7 et 8 de la figure 3B présentent des bandes correspondantes aux espèces intermédiaires du monomère à l'octamère, oligomères reconnus par les deux types d'anticorps purifiés par affinité, anti-LukS-PV et anti-LukF-PV (résultat non présenté). Ces oligomères, instables après extraction depuis la membrane à la saponine, sont certainement stabilisés par le glutaraldéhyde. Ces oligomères sont récupérés avec un meilleur rendement pour le couple sauvage et la combinaison active de doubles mutants (**Figure 3B, pistes 8 et 10**) que pour la moins active (**Figure 3B, piste 9**).

Une récupération des oligomères à partir des membranes de PNs, puis un traitement par 3 mM de glutaraldéhyde précédant un chauffage de l'échantillon permet donc d'obtenir le meilleur résultat.

On détecte ainsi des espèces de haut poids moléculaire correspondant à des tétramères pour les protéines fusionnées à la GST ; les oligomères de plus haut poids sont plus difficiles à identifier, sans doute à cause de l'encombrement stérique des GST (**Figure 3A** de l'article).

L' α -toxine et les leucotoxines de *S. aureus* ont une identité de séquence de 25 %, mais leurs structures tertiaires sont voisines. Les différences dans le repliement de ces protéines induisent des différences fonctionnelles. Par exemple, le pore formé par l' α -toxine est légèrement anionique, au contraire du pore cationique formé par les leucotoxines. Il a été montré que la partie N-terminale de l' α -toxine est très sensible aux délétions, aux modifications (Valeva et coll., 1997b) et est impliquée dans les interactions entre protomères (Song et coll., 1996; Walker et coll., 1992). Les molécules de classe S ont une partie N-terminale systématiquement plus courte que celle de l' α -toxine et même que les molécules de classe F. La présence d'un octapeptide, due au système de surexpression dans *E. coli*, à la partie N-terminale des leucotoxines ne perturbe pas leur activité (Baba-Moussa et coll., 1999b), alors que l'on a observé au laboratoire que le même système de surexpression conduit à la production d'une α -toxine moins active. Ainsi, le déploiement de cette partie, pour les leucotoxines, demande à être précisé.

Les mutants fusionnés à la GST (26 kDa) conservent une bonne activité biologique. La combinaison des deux protéines de fusion induit une activité de formation du pore plus faible que le contrôle. Cependant, l'influx de Ca^{2+} est inchangé. Cette diminution du flux d'éthidium par le pore est sans doute due à l'encombrement stérique des molécules de GST. De plus, le diamètre du pore formé est identique à celui des toxines sauvages. Ces observations plaident en faveur d'une absence d'interaction de la partie N-terminale avec plusieurs monomères adjacents, et ce, grâce à une re-conformation spatiale importante, comme observé chez l' α -toxine (Song et coll., 1996).

Nous avons ensuite produit des mutants cystéines de Luk-S-PV et LukF-PV. Ceci afin de créer des ponts disulfures qui vont contraindre la partie N-terminale de ces toxines à rester le long du core de la protéine (**Figure 1A** de l'article). Nous avons choisi tout d'abord les positions T5 et T21 sur LukF-PV, en se basant sur la structure cristallographique de LukF-PV (Pédelacq et coll., 1999). Dans ce cas, le pont disulfure ne se forme pas spontanément, d'où le recours à un agent oxydant. Ce dernier sera utilisé ensuite partout, afin d'optimiser le rendement de formation de cette liaison chimique. LukF-PV S8C-K20C, au contraire, forme spontanément 85 % de ponts disulfures. Les positions sur LukS-PV (-1, D1, N2 en vis-à-vis de R16) furent choisies, bien que les premiers aminoacides ne figurent pas sur la structure 3D (Guillet et coll., 2004). L'introduction de cette liaison disulfure induit une plus grande rigidité dans la structure. On observe une diminution de la fixation pour les double mutants LukF-PV. Cela laisse à penser que cette partie N-terminale peut jouer un rôle dans les interactions monomères – monomères durant la formation du pré-pore et peut être durant la formation du pore. Cependant, toutes les combinaisons de toxines mutées sont actives. LukS-PV D1C-R16C a l'activité la plus faible des trois mutants de LukS-PV. Valeva et coll. ont proposé un modèle « domino », dans lequel les interactions entre monomères durant la formation du pore induisent une modification structurale concertée (Valeva et coll., 1997a; Valeva et coll., 2001). Il est ainsi possible que la partie N-terminale subisse un repliement partiel durant la formation du pore, cependant plus limité que celui de l' α -toxine. Des données récentes atténuent cependant son rôle essentiel chez cette dernière (Jayasinghe et coll., 2005).

Nous avons amélioré le rendement de récupération des oligomères de leucotoxines formés à la membrane des PN. En effet, l'utilisation du glutaraldéhyde comme agent pontant permet de

stabiliser l'oligomère et de le rendre plus résistant aux détergents et nous a permis de visualiser un octamère (**Figure 3B** de l'article). La récupération de tels oligomères prouve que des interactions existent entre monomères, malgré les contraintes introduites dans la structure (ajout d'une protéine de fusion ou d'un pont disulfure).

En conclusion, contrairement à l' α -toxine, les parties N-terminales de la leucocidine de Pantone et Valentine et probablement des autres leucotoxines staphylococciques ne se déplient pas de façon importante pour interagir au niveau de la lumière du pore avec les protomères voisins pour former le pore cytolitique. Nous suggérons cependant un redéploiement partiel de cette partie pour que la forme hydrosoluble sécrétée interagisse de façon optimale afin de conduire à la formation du pore octamérique.

CHAPITRE IV

**Stabilisation et purification d'hétérodimères
biologiquement actifs de leucotoxines. Identification
d'acides aminés en interactions.**

A. Introduction

Peu d'éléments sont connus sur le mécanisme d'action et d'association des leucotoxines, et plus généralement des β -PFTs. Les pores constitués par les leucotoxines de *S. aureus* nécessitent l'association de deux protéines différentes : les protéines de classe S et de classe F (Prévost et coll., 2005). La PFO, une autre β -PFT, requiert une fixation préalable de ces monomères ; la fixation au ligand membranaire entraîne en effet un changement conformationnel qui permet l'oligomérisation. Seuls les monomères fixés peuvent former le pore (Abdel Ghani et coll., 1999; Ramachandran et coll., 2004) (cf. aussi 1.2.3). En est-il de même pour les leucotoxines ? Quels sont les aminoacides en interaction ?

Baba-Moussa et coll., ont montré l'importance de la T28 de HlgA, équivalent à l'H35 de l' α -toxine, dans les interactions entre monomères (Baba-Moussa et coll., 1999b). Par ailleurs, la T28 du monomère A de l'alpha-hémolysine est proche de T161 et de D162 (monomère G) (Song et coll., 1996). Suivant les alignements multiples de séquences (Guillet et coll., 2004b), ces positions correspondent respectivement à la T21 de HlgA et aux positions 157 et 158 sur HlgB. Nous avons donc cherché à identifier avec quels aminoacides HlgA T21 et T28 sont en relation sur le partenaire opposé. A ces fins, nous avons généré une série de mutants cystéines de HlgB : Y99C, N103C, Q104C, R150C, T152C, S154C, R155C, N156C, T157C et N158C. Les résidus 99 à 104 sont situés sur la boucle qui relie les brins β 6 et 7 et les résidus 150 à 158 sur la boucle qui relie les brins β 9 et 10, selon la numérotation utilisée par Olson (Olson et coll., 1999). Les mutations de HlgA : T21C et T28C (situés respectivement sur les brins β 1 et 2) sont situées dans le β -sandwich, impliqué dans les interactions entre monomères.

Nous avons ensuite combiné ces mutants cystéines, afin de générer des hétérodimères de leucotoxines. Un protocole spécifique a été développé pour atteindre cet objectif : il vise à réduire la formation d'homodimères. Après purification, ces hétérodimères ont été testés sur des vésicules et des membranes synthétiques, sur GRH et sur PNs, permettant ainsi de mettre en évidence certaines interactions préférentielles.

De récentes études (Viero et coll., 2005) montrent l'alternance des composés S et F dans les pores néoformés. Nous cherchons à démontrer ici que l'unité de base du pore leucotoxique peut être un hétérodimère constitué par une protéine HlgA et une protéine HlgB. Cela permet ainsi

d'apporter des données supplémentaires permettant de préciser le mécanisme d'association des leucotoxines de *S aureus*.

B. Article n°2 :

Engineered covalent leucotoxin heterodimers form functional pores: insights into S-F interactions

Olivier Joubert¹, Gabriella Viero², Daniel Keller¹, Eric Martinez¹, Didier A. Colin¹, Henri Monteil¹, Lionel Mourey³, Mauro Dalla Serra², Gilles Prévost^{1*}

¹ Laboratoire de Physiopathologie et d'Antibiologie Microbiennes – EA 3432. Institut de Bactériologie de la Faculté de Médecine (Université Louis Pasteur) - Hôpitaux Universitaires de Strasbourg. 3 rue Koeberlé, F-67000 Strasbourg

² ITC & CNR-IBF Unit at Trento, Via Sommarive, 18, I-38050 Povo (Trento) Italy

³ Groupe de Biophysique Structurale, Département Mécanismes Moléculaires des Infections Mycobactériennes, CNRS-IPBS UMR 5089, 205 route de Narbonne, F-31077 Toulouse Cedex

* To whom correspondence should be sent. Tel : 33 3 90 24 37 57 Fax : 33 3 88 25 11 13.

E-mail : gilles.prevost@medecine.u-strasbg.fr

Running title : Functional heterodimers of staphylococcal leucotoxins

Abstract (218 words)

The staphylococcal homo-heptameric α -toxin and bipartite leucotoxins belong to a single family of pore-forming toxins rich in β -strands, although the structure and electrophysiological characteristics of their pores are different. The structures of the Panton-Valentine Leucocidin and HlgB, and of the α -toxin heptamer show a common β -sandwich domain that plays a key role in subunit-subunit interactions. We used several cystein mutants of both HlgA and HlgB to form 20 heterodimers linked by disulfide bridges. A new strategy, using 2,2'-dithiodipyridine, was developed in order to obtain a good yield for S-S bond formation and dimers stabilization. Functions of the pores formed by the engineered dimers were investigated on model membranes, i.e. Planar Lipid Membranes and Large Unilamellar Liposomes and on target cells, i.e. human red blood cells and polymorphonuclear cells. We observed that the variant toxins HlgA T28C and HlgB N156C, and HlgA T21C and HlgB T157C form pores with similar characteristics as the wild-type toxin, thus suggesting that the mutated residues are facing and allow pore formation. Our results also confirm the octameric stoichiometry of the leucotoxin pores as well as the parity of the two monomers in the pore. Furthermore, rigorously assembled heterodimers may be considered as the minimal functional unit of leucotoxins. This allows to propose amino acids in interaction at the interface of monomers. Finally, the notion about an additional assembly of monomers once one of them is initially bound can now be questioned.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, pore-forming toxins, β -barrel, protein-protein interactions, intermolecular disulfide bonds, assembly intermediates

Abbreviations used: 2, 2'-dithiodipyridine, DTDP; Panton and Valentine leucocidin, PVL; γ -hemolysin, Hlg; β -barrel pore-forming toxins, β -PFT; human red blood cells, HRBC; polymorphonuclear neutrophils, PMNs; Large Unilamellar Vesicles, LUV; Planar Lipid Membranes, PLM.

INTRODUCTION

Panton and Valentine leucocidin (PVL) and γ -hemolysin (Hlg) are bicomponent leucotoxins of *Staphylococcus aureus* which form pores in blood cell and purely lipid membranes. Components of a leucotoxin sequentially bind to target cells: a class S protein (LukS-PV or HlgA, 32 kDa) first binds the surface of leucocytes and then, a class F protein (LukF-PV or HlgB, 34 kDa) interacts to develop a bipartite oligomeric and cytolytic pore [1]. These leucotoxins belong to the family of the β -barrel pore-forming toxins (β -PFT). The family of β -PFT includes other members, such as the aerolysin from *Aeromonas hydrophila*, the *Vibrio cholerae* cytolysin, the leucotoxins from *Clostridium septicum*, and the cholesterol dependent cytolysins (CDCs), such as perfringolysin O (PFO) [2]. This family also includes toxins with translocation subunits for partners having an enzymatic activity, such as the anthrax protective antigen (PA) of *Bacillus anthracis* [3], and the iota toxin of *Clostridium perfringens* [4]. All these toxins have three common features. They are rich in β -strands, they have no hydrophobic stretch and they must oligomerise in a very precise manner to form the pore [5]. The oligomerisation is a prerequisite to the pore formation and seems to occur near or on the membrane surface before insertion rather than by lateral diffusion of already-inserted monomers [5]. Several authors have established that *S. aureus* α -toxin forms non-lytic prepores before undergoing conformational changes, which lead to pore formation [6-9]. Such prepores have been also characterized for the α -toxin secreted by *C. septicum*, for the protective antigen of *B. anthracis*, for the cytolysin of *V. cholerae*, and more recently for the perfringolysin O of *C. perfringens* [10-15].

A crucial point about these toxins is to elucidate their mechanisms of assembly, for instance by describing the protein-protein interactions that are involved. For example, PFO is a bacterial protein toxin that binds cholesterol-containing membranes, forms oligomeric complexes and inserts into the bilayer to create large aqueous pores. The binding of each monomer induces some allosteric modifications. After monomer binding, a structural element (strand β 5) in PFO moves to expose the edge of a previously hidden β -strand (β 4) that forms the protomer-protomer interface that is required for oligomer assembly [16]. A two-dimensional diffusion of monomers on the membrane surface then leads to productive

collisions between PFO molecules that results in hydrogen bonding of strand $\beta 1$ of a given monomer to the now-exposed strand $\beta 4$ in the original PFO dimer [16]. Continued association of monomers with the original PFO dimer results in an oligomer containing up to 50 PFO molecules in a circular prepore complex [13]. Finally, there is a cooperative insertion of the transmembrane β -hairpins into the membrane to form the pore [17].

HlgA and HlgB bind to membranes as monomers [18]. Until now, the stoichiometry of the leucotoxins pores has been controversial, with heptamers suggested by electron microscopy [19], or octamers identified by the analysis of labeled or covalent-linked proteins [20, 21]. But hexamers were also proposed [22]. They contained equimolar ratio of the two proteins, even they might not represent the unique form of oligomers on human red blood cells as evidenced by using total internal reflection fluorescence (TIRF) and fluorescence resonance energy transfer (FRET) [19]. However, these last authors could exclude stable contacts between two identical monomers into the pore. Slight modifications occur in the secondary structure during the prepore formation [22] that may favour interactions between monomers of leucotoxins [23]. On α -toxin, Valeva et al. [24] also demonstrated a cooperative assembly between the protomers during the prepore formation.

Here, we report on several purified heterodimers of γ -hemolysin HlgA-HlgB obtained by disulfide bonding through site-directed mutagenesis. The characteristics of the pores formed by these dimers were analyzed on Planar Lipid Membranes (PLM) and on Large Unilamellar Vesicles (LUV), and the biological activity of these dimers was compared to wild-type (wt) toxin on PMNs and HRBC.

RESULTS

This project was designed for the study of protomer residues possibly in interaction within the leucotoxin functional pore, and with the secondary goal to obtain the three-dimensional structure of HlgA. HlgA is one of the three proteins, with HlgC and HlgB, expressed by the early known gamma-hemolysin locus *hlg* (accession numbers L01055, X51786) [1, 25, 26]. HlgA has been also named LukS or H γ II in other reports, but should not be confused with the Pantone-Valentine leucocidin components (LukS-PV, LukF-PV). In fact, the gamma-hemolysin locus leads to the expression of HlgA-HlgB and HlgC-HlgC bipartite hemolysins. Examination

of the crystal structure of HlgB (B) [27, 28] revealed that residues Tyr-99, Asn-103, Gln-104, Arg-150, Thr-152, Ser-154, Arg-155, Asn-156, Thr-157 and Asn-158 are exposed to solvent and accessible for protein interaction (Fig. 1A). Residues B Tyr-99 and Gln-104 are located on the connecting loop between strands 6 and 7 and residues B Arg-150 and Asn-158 are located on the loop connecting strands 9 and 10, according to the secondary structure numbering from Olson et al. [27]. It was already demonstrated that HlgA (A) Thr-28, located on β -strand 3, plays a key role in the association between monomers [29]. This residue aligns with His-35 of α -toxin [18]. According to the structure of the α -toxin heptamer and multiple sequence alignment of staphylococcal leucotoxins [29, 30] (see also Fig. 1B), Thr-28 on α -hemolysin heptameric pore of monomer A is close to Thr-161 and Asp-162 of monomer G and corresponds to A Thr-21 (β -strand 1) which is close to B Thr-157 and B Asn-158, respectively [29]. B Tyr-99 retained attention because it perfectly aligns with Tyr-101 of α -hemolysin, which was shown to be implied in contacts between monomers [30].

Heterodimers construction and purification

Leucotoxin heterodimers had to be highly purified since contamination with monomers (5-10%) may greatly influence the residual biological activities [31]. Figure 2 reports the purification steps of the covalent heterodimer A T28C~B N156C and is representative of the purification rate obtained for all dimers investigated in this study. Lanes 3 and 5 show that A T28C and B N156C have a minor tendency to form dimers (64 kDa) in solution, standard conditions, while they have comparable apparent molecular masses as the recombinant HlgA and HlgB (lane 2 and 6, respectively). Blockage of cysteine of one mutated component by DTDP allowed to bring the protein partner and to favor the thiol exchange reaction with the labeled protein to form heterodimers with apparent molecular mass of 68 kDa (lane 4), whereas when mixed together for 90 min at room temperature, no dimerisation appeared (lane 7). This product could be detected by immunoblotting with both anti-A, and anti-B antibodies as well (data not shown). Before any further purification, heterodimers gave yields ranging from 25 to 65%. After further purification steps by successive hydrophobic interaction and ion exchange FPLC chromatographies, a >99% pure heterodimer was obtained (lane 7). Except for B Y99C, B R150C, and B N152C mutants challenged with either A T21C or A T28C, yields of other

heterodimers were reached enough that allowed their purification. For the negative heterodimer challenges, thiol-titrations with DTNB onto SDS-denatured proteins always indicated 1 cysteine per molecule (Lowry titration). Thus, it was concluded that cysteine residues may not be accessible for disulfide bridge formation for the concerned residues of HlgB.

Hemolytic activity of dimers on Human Red Blood Cells (HRBC)

A T21C combined with wt B had an identical hemolytic activity as the wt leucotoxin, whereas the A T28C and HlgB couple was a little bit less active. All B mutants when combined with HlgA were as active as the wt toxin, except B N103C which was about 10 fold less active (data not shown). The purified heterodimers were evaluated for their hemolytic activity against human red blood cells (Fig. 3 A and B, see Table 1). Dimer A T21C~B N103C displays no hemolytic activity whereas dimers A T21C~B R155C and A T21C~B N156C were found to be poorly hemolytic. The latter required more than one hour to reach 50% of hemolysis (see Table 1). In contrast, dimers A T21C~B Q104C, A T21C~B S154C, A T21C~B N158C needed 9.8, 10.8 and 18 min, respectively, to lyse half of the HRBC (Fig. 3A, see Table 1). Dimer A T21C~B T157C displays an activity closer to the control, with a time-delay of 6 min to reach half-hemolysis (Table 1). On RRBC, A T21C~B N103C had no detectable activity, and the activity of A T21C~B R155C was very weak, whereas that of A T21C~B N156C corresponded to that of a 1:50 dilution of the wt toxin (Table 1). Heterodimers A T21C~B Q104C and A T21C~B S154C had intermediate activities. Dimers A T21C~B T157C and A T21C~B N158C had activities close to the control (Table 1).

Dimer A T28C~B N103C had also no hemolytical activity. Dimers A T28C~B Q104C, A T28C~B S154C, A T28C~B R155C, and A T28C~B T157C were hemolytic, but their activity suffers a longer lag time, in fact it takes more than 60 min to start hemolysis on HRBC (Fig. 3B, see Table 1). The half-hemolysis time of A T28C~B N158C was 20 min whereas A T28C~B N156C shows an activity on HRBC closer to the control, with a time-delay of 4 min. The same experiments were carried out on Rabbit Red Blood Cells (RRBC). Heterodimers involving A T28C gave similar results to those found on HRBC, except that the dimers constructed with either B N156C or B N158C were found similar as the wt control (Table 1). The activity of A T21C~B R155C was intermediate. On these cells, dimers A T21C~B N103C,

A T21C~B Q104C, A T21C~B S154C were also not active whereas that of A T28C~B T157C was very weak.

Pore formation induced by the heterodimers

Monomers (A T21C, A T28C, and B mutants) applied sequentially on PMNs are similar to the control (data not shown). Pore-formation and ethidium entry promoted by 20 nM of each heterodimer on PMNs show that these cells are more sensitive than HRBC (Fig. 4, see Table 1). Nevertheless, A T21C~B N103C was unable to achieve pore-formation on human PMNs (Fig. 4A). Heterodimers A T21C~B Q104C, A T21C~B R155C, and A T21C~B N156C displayed a decreased activity compared to the control. Dimers A T21C~B S154C, A T21C~B T157C, and A T21C~B N158C had the most efficient pore-forming activities, but delays of two and three min were observed for appearance of functional pores for dimers A T21C~B S154C and A T21C~B N158C (Fig. 4, Table 1). Comparable results were obtained for the calcium channel activity induced by these heterodimers. A T21C~B N103C is not active, whereas dimers A T21C~B Q104C, A T21C~B S154C, A T21C~B R155C and A T21C~B N156C activities are intermediate. The calcium channel opening induced by γ -hemolysin and dimers A T21C~B T157C and A T21C~B N158C is comparable (Fig. 5A and B).

Pore-formation on human PMNs was null for A T28C~B N103C and A T28C~B Q104C, and weak for A T28C~B S154C (Fig. 4B, see Table 1). Dimers of A T28C~B R155C generated functional pores as rapidly as the wt recombinant toxin, while A T28C~B N158C revealed a decreased activity (Fig. 4B). Only dimers A T28C~B N156C and A T28C~B T157C had pore-forming activities comprised between those of the wt recombinant toxin and of A T28C combined with HlgB.

The calcium entry induced by the action of the heterodimers was in total coherence with of the pore formation. The calcium channel activities induced by HlgA T28C~HlgB N103C and HlgA T28C~HlgB Q104C were respectively null and weak (Fig. 5A and B). HlgA T28C~HlgB S154C induced an intermediate activity, whereas the other heterodimers appeared with an activity closer to control (Fig. 5B), probably because of the higher sensitivity of the Fluo-3 probe compared to ethidium fluorescence. In fact, it can be noticed that as far away from position 156 of HlgB is considered as low was the efficacy of functional pores formed by the corresponding heterodimers (Fig. 3-5, Table 1).

Characteristics of ion channels formed by the heterodimers

All the heterodimers which were able to permeabilize RBCs and LUVs (Tables 1 and 2), were also prone to open ion conductive pores in planar lipid bilayers (Fig. 6), similarly to what HlgA-HlgB does [32].

Heterodimers display similar electrophysiological pore properties i.e., channel conductance and current voltage characteristic (I-V) (Fig. 6, and Table 2), which are very close to those of wt. In 100 mM KCl, pH7.0, at +40mV applied voltage all the pores normally stay open most of the time (Fig. 6), as do those formed by A-B [32] and α -toxin [33]. All dimers have similar mean conductance in these conditions, ranging from 118 to 162 pS, that are very similar to that of the wt, i.e., 128 pS, (Fig. 6, Table 2). Some of them show a different propensity to open pores, as evidenced by the different rate of channel insertion (for example 28-157 being the most active). Furthermore 21-154 shows a clear increase in current noise, which could be interpreted as an increase in instability of the β -barrel [34], indicating possible significant long distance interaction between key residues [35]. The I-V curve of the wt is markedly asymmetrical, i.e., larger current flow at negative voltages [32]. An estimate of the extent of this non-linearity is given by the ratio Γ^-/Γ^+ measured at 120 mV (Table 2). This ratio is identical for the γ -hemolysin and the heterodimers, indicating a similar charge distribution along the lumen of the channel. All the toxins tested are slightly cation selective as the wt [23]. The cation/anion permeability ratio was determined as in Comai et al. [32] with a 10-fold KCl gradient concentration (20 mM KCl cis, 200 mM KCl trans). The experiment was performed starting from initial symmetrical cis/trans solution of 20 mM KCl, 10 mM Hepes, 0.1 mM EDTA pH 7.0. Thereafter, the concentration of the trans side chamber was increased stepwise till a 200 mM KCl and the permeability values P^+/P^- were given by the ratio of potentials resulting from mobility of cations and anions, respectively. In these conditions, the HlgA-HlgB pore was recorded as having a cationic selectivity with a P^+/P^- of 1.4. Amongst, the most active heterodimers tested, A T21C~B N156C, A T28C~B T157C were similar to wt or A T28C~BT157C pointed at 1.5, or A T28C~B N156C having a 1.6 value, respectively. However, the pores formed by A T28C~B N158C and A T21C~B N158C harbored a higher cationic selectivity of 2.0 and 2.1, respectively.

Oligomer analysis

In order to screen the behavior of oligomers inserted into the live target cells, they were harvested from membranes by an optimised procedure that limits degradation of oligomers through cross-linking. In this assay, cell proteins represent a 100-fold excess. As shown in Fig. 8 (lane 3), 4 ng of purified A and B at nanomolar concentration at mixed together and incubated for 10 min with 0.3 mM glutaraldehyde produced concatemers of the two proteins where at least dodecamers could be distinguished on 3–8% (w/v) SDS/PAGE. The use of 3 mM glutaraldehyde in such assays considerably alters the signal, obviously by producing aggregates (lane 4). No material cross-reacting with antibodies were detected from PMNs lysates alone (Fig. 8, lane1). HlgA and HlgB in solution may produce HlgA homodimers at very low yields even after SDS treatment (lane 2), or applied onto PMNs and retrieved after saponin treatment (lane 5) and boiling of the samples. Boiling is also necessary when oligomers containing PMNs lysates are treated with 3 mM glutaraldehyde. Absence of boiling reveals actually a bulky signal of probably non denaturated oligomers (octamers?) (Fig. 8, lane 6). In fact, instead of a Schiff reaction also promoted by glutaraldehyde, cross-linking probably occurs in our assays through the addition reaction of basic residues (R-NH₂) onto hydrazide groups. Considering the excess of proteins in lysates, the observed oligomers are assumed as preformed oligomers and not during the cross-linking reaction. In the latter occurrence, monomers would have been dispersed by cross-linking with other cell proteins. It has to be noticed that Fig. 8, lane 3 represents 4 ng of the previously HlgA and HlgB in solution, whereas lane 7 represents 15 ng of each of the previously applied HlgA and HlgB issued from membrane-inserted oligomers. Thus, we can assume a significant yield of recovery for oligomers while considering that, concurrently, non bound proteins were lost in assays. Nevertheless, the recovery of oligomers and intermediates was significant (Fig.8, lanes 7 to 11). Besides a minimal duration of 10 min for the saponin treatment, temperature does not really influence cholesterol extraction (lanes 7 and 8). In these conditions, octamers and every intermediate with decreasing intensities can be seen. Similar observations are done for oligomers A T28C~B N156C, A T28C~B T157C, A T21C~B R155C (Fig. 8, lanes 9-11), except that only dimers, tetramers, hexamers and octamers were evidenced together with minor bands corresponding to monomers. Finally, the

inactive heterodimer A T28C~N103C only shows a small signal corresponding to the dimer, and probably has reduced oligomerisation properties (Fig. 8, lane 12).

DISCUSSION

We have developed a new strategy based on thiol-protection/activation to obtain stabilized heterodimers of *S. aureus* leucotoxins. Since native proteins are devoid of cystein residue, mutants were generated taking into account of their probable accessibility as deduced from structural data [27, 28, 30]. Our study reveals that dimers do not form at any combination and disulfide bonding is selective based on structural compatibility. DTPP was used as a protective group of a given cystein mutant and allowed hetero-dimerisation when bringing the second protein with another sulfhydryle group to favor the thiol-exchange reaction. This approach allowed obtain heterodimers at a yield up to 50%, according to the combination tested. Indeed, no significant amounts of dimers were obtained in the case of mutations at positions 99, 150, 152 of HlgB with both T21C and T28C of HlgA revealing structural impossibilities. It is worthwhile mentioning that B Tyr-99 aligns with Tyr-101 of α -toxin. Tyr-101 is interacting with His-35 of an adjacent subunit in the structure of the α -toxin heptamer [30]. As His-35 also aligns with Thr-28 of leucotoxins class S proteins, and since these two amino acids were demonstrated as very important for oligomerisation of α -toxin and leucotoxins [18, 28, 36, 37], these observations suggest that the interactions between α -toxin and leucotoxin molecules within their respective pores might be different. In the case of challenging heterodimers with B Arg-150 and Thr-152, these locations probably may be too low in the HlgB structure to combine either with A Thr-21 or A Thr-28, that are at the same height in the HlgA structure (Fig. 1). Such an observation potentially introduces limits in the flexibility of the B loop supporting these residues.

Covalent heterodimers of leucotoxins were purified to apparent homogeneity (Fig. 2) by using procedures originally designed for the purification of wt and mutated HlgA and HlgB monomeric proteins. In fact, their ionic and hydrophobic properties resemble HlgA when using cation-exchange chromatography, and resemble HlgB when using hydrophobic interactions chromatography, thus allowing to discard both monomers and homodimers.

Amongst the fourteen covalent heterodimers of HlgA and HlgB that have been successfully produced, those including B N103C are inactive in the different assays. However, the latter were able to develop hemolysis within 24 hours at concentrations that allowed straight hemolysis in the case of the most active heterodimers. Thus, the oligomerisation properties of these mutants were dramatically affected (see Fig. 8). It is noteworthy that residue 103 of HlgB is located in the triangle region that may play a key role in the unfolding of the stem during pore formation [27, 30].

Because of the level of non specific binding of HlgA onto target cells [18], the binding properties of heterodimers and this protein and consequently HlgB and the heterodimer cannot be easily quantified on the considered targets. The hemolytic potential of other heterodimers remained more or less efficient despite the onset was longer than for the WT toxin (Fig. 3, Table 1). Nevertheless, any time delays were not so long in regards to those needed for pore formation (*i.e.* cell lysis) onto human PMNs (Fig. 4, 5), but Ca^{2+} induction takes place more rapidly into PMNs. This significant difference between hemolytic and leucocytolytic activities can not be due to the difference in sensitivity of the corresponding assays since at time when hemolysis may be achieved for heterodimers, most of Ca^{2+} signal is completed whereas ethidium fluorescences becomes maximal later into PMNs, and concentrations of toxins and cell densities are comparable in the two kinds of experiments. Thus, such a delay in hemolysis globally evokes a longer time for pore formation but not in the early steps of membrane binding and prepore formation, since Ca^{2+} induction is rather linked to the occurrence of prepores [38]. This discrepancy between erythrocytes and PMNs membranes for the kinetics of lysis does not privileged human PMNs to erythrocytes as main targets, but rather the adaptation of the stem into membranes to become functional. A T21C~B Q104C appears more efficient on RBC or on human PMNs than A T28C~B Q104C, thus indicating a better adaptation of the disulfide bridge in the first case to create pores (Fig. 3 to 5). Such a difference concerning residues located on neighbour β -strands may also reflect a very sharp positioning of this loop to allow the stem to be functional. As heterodimers involving B S154C and heterodimers A T21C~B R155C, A T21C~B N156C, and A T28C~B N158C harbor intermediate biological activities, at least onto human PMNs (Fig. 4), one can assume some flexibility in the final structural accommodation of the B loop when the stem domain refolds into a β -hairpin. The pores formed by these dimers have conductance and ionic selectivity similar to those of the wt toxin (Table

2), but the concentrations needed to obtain such pores and signals were generally higher than that necessary for wt, thus suggesting that dynamics of pore formation is affected.

The most active heterodimers found in this work are A T28C~B N156C and A T21C~B T157C or B N158C (Fig. 3 to 7). Finally, moving away from positions T157 and N158, heterodimers become less active. Most of the active heterodimers produce pores with conductance and cationic selectivity similar to that of wt toxin. Only one heterodimer, A T21C~B N158C harbors a higher cationic selectivity, a high conductance at 144 pS and a high activity onto PLM (Table 2). This may indicate that the loop of HlgB, supporting residues 150-160 is now in a different orientation which modifies locations of charges inside the lumen of the pore having a direct influence on the selectivity. This strongly suggests that these dimers finally preserve correct monomer-monomer interaction, re-folding kinetics of the stem, positioning of the β -hairpin to form the pore and finally ionic selectivity and diameter of the pore (Table 2, Fig. 7). Moreover, any of the active heterodimers form octamers and other less complex oligomers within the membrane of target cells as those shown in Fig. 8, lanes 9-11 as determined by immunoblot using SDS/PAGE that allows discriminate with more complex oligomers. Therefore, these covalently rigidified but active heterodimers (i) probably mimic one (*i.e.* S-F) of the two interprotomer interfaces that most probably occur in the wt leucotoxin and (ii) have the potency to promote pore assembly by dimer-dimer interactions through formation of the second (F-S) interface. These heterodimers can therefore be considered as minimum functional units of the leucotoxins pore.

As class S components of leucotoxins bind first to a membrane ligand, then allowing the secondary binding of the F component, synthesis of heterodimers avoids one kind of S-F interactions. Kinetics in cell Ca^{2+} induction and pore formation of the most active dimers and of the wt toxin are identical, but these kinetics for binding or association between dimers should be specific compared to the wt toxin. However, in the case of a membrane ligand, one can assert that the structural conformation of HlgA and HlgB monomers within the bound heterodimer efficiently provides an accommodation for heterodimers compatible for binding and to achieve the prepore [39].

In conclusion, challenge of several leucotoxin heterodimers allows to evidence that: 1) protein-protein interfaces found within leucotoxins may not be strictly identical to those found in the related α -toxin, 2) erythrocytes membranes are not strictly equivalent to PMNs membranes

when considering heterodimers and may influence the kinetic of stem insertion and function, 3) the loop corresponding to residues 150-158 of HlgB is involved in interactions with residues located on β -strand 2 of HlgA, 4) the plasticity of this loop is such that it might tolerate sequence micro-heterogeneities and this may account for the different possible combinations observed for the assembly of the bipartite leucotoxins [40], 5) the biologically active heterodimers can then be considered as functional units of leucotoxins pores and their structures are able to accommodate further oligomerisation to achieve the final oligomer as for the wt toxin, and 6) these heterodimers might constitute a valuable approach for unraveling the structures the structure of assembled leucotoxins [21]. Accordingly, the three-dimensional structure of one of the most active heterodimers is ought to be determined, and together with other studies, it should help to reconstitute the S-F interface.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and vectors

Escherichia coli XL1 Blue cells [*recA1 endA1 gyrA96 thi1 hsdR17 supE44 relA1 lac* (F' *proAB lacI^qZ Δ M15 Tn10 (tet')*)] (Stratagene, Amsterdam, Netherlands) were used as recipient cells for transformation with recombinant pGEX-6P-1[®] following site-directed mutagenesis. *E. coli* BL21 [F⁻, *ompT*, *hsdS* (*rB*, *mB*), *gal*] was used for overexpression of the glutathione-S-transferase (GST)-leucotoxin fusion genes, according to manufacturer's instructions (Amersham-Biosciences) [29].

Choice of mutations and mutagenesis

Structure-based multiple sequence alignment of leucotoxins components sequences (Fig. 1A) [28] as well as biologically active cross-combinations of leucotoxins at the surface of membranes [40, 41] strongly evokes similar structural arrangements in the symmetric pore composed of alternating class S and class F components. For cysteine substitution, we chose

two residues of HlgA, Thr-21 and Thr-28, and ten residues of HlgB, Tyr-99, Asn-103, Gln-104, Arg-150, Thr-152, Ser-154, Arg-155, Asn-156, Thr-157, Asn-158 [42].

Open reading frames of the secreted HlgA and HlgB encoding genes were previously cloned into the pGEX-6P1 expression vector [31]. The different mutants were obtained by using dedicated oligonucleotides in a two-step mutagenesis procedure. This was similar to that of Quick Change[®] mutagenesis (Stratagene), except that Arrow *Taq* DNA polymerase[®], and T4 GP32 protein[®] (QBIogene) were used instead of *Pfu* Turbo[®] DNA polymerase.

Mutated proteins purification

Recombinant WT and variants of HlgA were purified by affinity chromatography on Glutathione-Sepharose 4B[®] followed by cation-exchange FPLC[®] chromatography using a NaCl gradient from 0.36 M to 0.6 M [29], after cleaving the GST-tag with Prescission[®] Protease (Amersham-Biosciences). These proteins were eluted at about 0.51 M NaCl.

Recombinant wt and variants of HlgB were purified by affinity chromatography on Glutathione-Sepharose 4B[®], cleaving the GST-tag with Prescission[®] Protease and followed by hydrophobic interaction chromatography (Ressource ISO[®]-Amersham Biosciences) using a (NH₄)₂SO₄ gradient ranging from 0.96 M to 0.36 M [29]. All proteins were eluted when (NH₄)₂SO₄ reached 0.6 M. They were then dialyzed at 4°C overnight against a 0.02M Hepes, 0.5 M NaCl buffer. Controls for homogeneity were performed using SDS/PAGE, and the proteins were then stored in the presence of 1 mM DTT at -80°C.

Dimer synthesis

In order to limit any oxidation of the sulfhydryl groups of the cysteine mutants, all buffers were flushed with nitrogen during 30 min. Cysteine mutants of HlgB, observed to be more prone to homodimerisation, were activated by the 2,2'-dithiodipyridine (DTDP). Briefly, previously purified mutants (see above) were reduced in the presence of 20 mM dithiothreitol (DTT), desalted using gel filtration on PD10[®] columns (Amersham-Biosciences) against 0.05 M Hepes, 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA-Na₂, 0.25 mM DTT, pH 7.5. Proteins were then treated

with 2.5 mM DTDP for 10 min at room temperature. To remove excess of DTDP, the activated toxins were desalted a second time in the same conditions as above.

Concurrently, cysteine mutants of HlgA were first desalted by gel filtration on PD10 columns against 0.02 M CH₃COONa, 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA-Na₂, pH 5.0. The two partners were then mixed at a ratio of HlgB Cys~TP/HlgA Cys of 1.5, after pH was adjusted at 7.5 by using 0.5 M Bicine, pH 9.0 (15 mM final concentration). After an incubation of 3 hours at 23°C, 0.5 mM of DTDP were added in order to block the residual free thiols.

Dimer purification

All dimer preparations were first adjusted to 1.2 M (NH₄)₂SO₄, before to be applied on a hydrophobic interaction chromatography column (Resource ISO[®]) using a (NH₄)₂SO₄ gradient as described for HlgB. Samples were 1:6 diluted in 0.05 M Na₂HPO₄, pH 7.0 to decrease the (NH₄)₂SO₄ concentration and were further purified using cation-exchange FPLC[™] chromatography (Resource S) as described above.

Accessibility of Cys residues to DTNB

For the titration of free thiols, about 30 nmoles in 0.5 mL of proteins were precipitated in 5% (w/vol) trichloroacetic acid and left for 5 min at 0°C, pelleted by centrifugation and washed three times with the same solution. The precipitate was dissolved in 400 μL of N₂-saturated 0.2 M Hepes, 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA, Na₂, pH 8.0 and used for a direct titration or was added to 2% (w/v) SDS. The remaining precipitated material was removed by centrifugation and 300 μL of the supernatant were added to 30 μL of 10 mM 5-5'-di-thio-bis (2-nitro) benzoic acid (DTNB) ($\epsilon = 13,600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). After 10 min reaction at room temperature, the amount of titrated thiols was estimated by OD_{412nm} and the molarity was compared to the protein concentration determined by the Lowry method.

Planar lipid bilayers experiments

Planar lipid bilayers were prepared by the apposition on both sides of a 0.1 mm hole in a 12 μm Teflon foil (pretreated with n-hexadecane) of two monolayers of di-phytanoyl phosphatidylcholine (DPhPC, 99% pure from Avanti Polar Lipids) spread from a 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ solution in pentane. Toxins were added on one side (*cis*) to stable preformed bilayer. All experiments were started in symmetrical solutions (100 mM KCl, 10 mM HEPES, 0.1 mM EDTA, Na_2 , pH 7.0). Macroscopic currents were recorded by a patch clamp amplifier (Axopatch 200[®], Axon instruments). A PC equipped with a DigiData 1200 A/D converter (Axon Instruments) was used for data acquisition. The current traces were filtered at 0.1 kHz and acquired by computer assistance using Axoscope 8 software (Axon Instruments). Measurements were performed at room temperature [43].

Permeabilization of lipid vesicles by leucotoxins

For calcein (Sigma) release experiments, LUV were prepared by extrusion of 3 mg of PC/ml and Cho at a 1:1 molar ratio, as described previously [44]. LUV were washed on Sephadex G-50 medium pre-equilibrated with 20 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.0. Permeabilization was assayed with a fluorescence microplate reader. Each well contained LUV (7 μM lipid) and variable dilutions of leucotoxins. The two components were always applied at the same concentration in 200 μl of 20 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 7.0. Maximal protein concentration was 5 nM with HlgB plus HlgA, 50 nM with heterodimers.

Human polymorphonuclear cells (PMNs) and flow cytometry measurements

Human PMNs from healthy donors were purified from buffy coats as previously reported [45], and resuspended in 10 mM Hepes, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM glucose, 0.1 mM EGTA, pH 7.3 at 5×10^5 cells/ml. Flow cytometry measurements from 3000 PMNs were carried out using a FacSort[®] flow cytometer (Becton-Dickinson, Le Pont de Claix, France) equipped with an argon laser tuned to 488 nm [29]. The intracellular calcium was evaluated using flow cytometry of cells previously loaded with 5 μM Fluo-3 (Molecular Probes) in the presence of

1.1 mM extracellular Ca^{2+} by measuring the increase of Fluo-3 fluorescence. Pore formation and monovalent cation influx were revealed by the penetration of ethidium into the pores; cells were incubated 30 min with 4 μM ethidium prior to the addition of toxins in the absence of extracellular Ca^{2+} . Fluo-3 and ethidium fluorescence was measured using Cell Quest ProTM software (Becton-Dickinson) [29, 45]. Results from at least four different donors were averaged and expressed as percentages of a control of human PMNs treated with the wild-type (WT) Hlg. Base level values were obtained for each series of data from a control without addition of toxin. These were systematically subtracted from the other assays. Standard deviations values never exceeded 10% of the obtained values and were removed from figures for clarity.

The dissociation constant ($k_{D[S]}$) of HlgA for the PMN membrane and that of HlgB for the PMN membrane-bound HlgB ($k_{D[F]}$) were previously reported to be 2 nM and 0.04 nM, respectively [46]. WT and mutants of HlgA were applied at 20 nM while WT and mutants of HlgB were applied at 0.4 nM. The heterodimers were applied at 20 nM.

Determination of pore radius

Radius of pores formed by native and modified leucotoxins was assessed using flow cytometry by determining the relative ability of polyethylene glycol (PEG) molecules of various sizes to protect cells from osmotic leakage. If the sizes of PEG molecules are similar or greater than the diameter of lumen they cannot pass through the pores. The relative variations of PMN sizes were assessed by measuring the variations in the forward light scatter (FSC) of cells (5×10^5 cells/ml) treated with 20 nM HlgA WT or mutants, 20 nM HlgB WT or mutants, 20 nM of heterodimers, and 30 mM PEG polymers of different hydrodynamic radii (0.94, 1.12, 1.22, and 1.44 nm). FSC values were collected at 0, 10, 20, and 30 min after toxin application [29].

Hemolysis assays

HRBC were retrieved from buffy coats used for PMNs preparations (see above). They were first pelleted by centrifugation ($1000 \times g$, 5 min), then washed three times in phosphate buffer

(PBS: 10 mM NaH₂PO₄, 1.5 mM Na₂HPO₄, 0.15 M NaCl, pH 7.0.), and finally resuspended in this buffer at 1% (v/v) concentration.

Kinetics of hemolysis were carried out at room temperature in a 0.1% (v/v) suspension of HRBC, which corresponds to a $A_{650\text{ nm}} = 1$. We measured the decay of $A_{650\text{ nm}}$ every 30 seconds during 12 minutes. 100 % hemolysis was obtained after 10 min incubation of 20 nM HlgA and 20 nM HlgB. Measures were carried out using a Campec M330 spectrophotometer (Camspec Ltd, Cambridge, UK).

Identification of oligomers

Oligomers formed in solution or onto human PMNs membranes by WT HlgA and HlgB and heterodimers were examined using denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (SDS/PAGE) and immunoblotting. For investigations of oligomers in solution, 4 ng of each toxin component was incubated with 0.3 or 3 mM glutaraldehyde as described below. Preparations at 5×10^7 cells/ml in 10 mM Hepes, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM glucose, 0.1 mM EGTA, pH 7.3, were incubated with 100 nM of LukS-PV, LukF-PV or derivatives in the presence of 10 $\mu\text{L/mL}$ of a mammalian cell-tissue antiprotease cocktail (Sigma). After 45 min incubation at 22°C. Biological activity was controlled by optical microscopy as swelling the cells and rounding the nucleus, the cells were washed twice and then resuspended in 1 mL of the same buffer and antiprotease cocktail (1 $\mu\text{L/mL}$) as above. The cells were ground in a FastPrep[®] apparatus (QBiogene - Bio101, Illkirch, France) using FastPrep Blue[®] tubes with orbital centrifugation for 10 s at 3,500 $\times g$ at room temperature. The membranes were harvested by ultracentrifugation for 20 min at 20,000 $\times g$ at 4°C. Membrane pellets were resuspended in 100 μL of the same buffer complemented with 2 μL of antiprotease cocktail containing 1% (w/v) saponin (Sigma), incubated for 30 min at room temperature and then, centrifuged for 30 min at 22,000 $\times g$. The supernatants were adjusted to 1 mM glutaraldehyde (in the above buffer) and incubated for 10 min at 50°C. One third volume of loading buffer (0.5M Tris-HCl pH 8.5, 2% (w/v) SDS, 0.04% (w/v) bromophenol blue, 30% (v/v) glycerol), containing 100 mM ethanolamine in order to block the cross-linking reaction was added and assays were heated to 100°C. Finally, 10 μL of the solution was loaded onto Tris-acetate pH 8.1, polyacrylamide 3-8% (w/v) gels[®] (Invitrogen). Proteins were subjected to electrophoresis for 75 min at 150 V at

room temperature in 50 mM Tris, 50 mM Tricine, pH 8.2, 0.1% (w/v) SDS, and then transferred onto nitrocellulose membranes for 1 h at 30 V in 25 mM Tris, 192 mM glycine, pH 9.3, 20% methanol using a transfer Xcell II Blot module (Invitrogen). The leucotoxins oligomers or components were characterized by immunoblot using affinity-purified rabbit polyclonal antibodies and a peroxidase-labeled goat anti-rabbit antibody using ECL[®] detection (Amersham-Biosciences, Saclay, France) as previously described [29]. The apparent molecular masses were estimated from protein migration according to Precision Plus[®] Protein Standards (Bio-Rad).

Acknowledgements

This work was granted by the “Direction de la Recherche et des Etudes Doctorales” (UPRES EA-3432) and partially supported by Fondazione Cariverona (Bando 2004, “Integrazione tra Tecnologia e Sviluppo di Settore). We thank Arianna Gropuzzo for technical support. O. Joubert is supported by grant from a research convention (project StaWars) between Provincia Autonoma di Trento (Italy), and Université Louis Pasteur, and the “Conseil Régional d’Alsace”. G. Viero was supported by PhD grant from the University of Verona (Italy).

References

- 1 Prévost, G., Mourey, L., Colin, D. A., Monteil, H., Dalla Serra, M. and Menestrina, G. (2005) Alpha-toxin and bêta-barrel pore-forming toxins (leucocidins, alpha-, gamma-, and delta-cytolysins) of *Staphylococcus aureus*. In The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins (Alouf, J. E. and Popoff, M. R., eds.), pp. 588-605
- 2 Rossjohn, J., Feil, S. C., McKinstry, W. J., Tweten, R. K. and Parker, M. W. (1997) Structure of a cholesterol-binding, thiol-activated cytolysin and a model of its membrane form. *Cell* **89**, 685-692
- 3 Moayeri, M. and Leppla, S. H. (2004) The roles of anthrax toxin in pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* **7**, 19-24
- 4 Aktories, K. (1994) Clostridial ADP-ribosylating toxins: effects on ATP and GTP-binding proteins. *Mol Cell Biochem* **138**, 167-176
- 5 Parker, M. W. and Feil, S. C. (2005) Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Prog Biophys Mol Biol* **88**, 91-142
- 6 Thelestam, M., Olofsson, A., Blomqvist, L. and Hebert, H. (1991) Oligomerisation of cell-bound staphylococcal alpha-toxin in relation to membrane permeabilisation. *Biochim Biophys Acta* **1062**, 245-254
- 7 Walker, B., Krishnasastri, M., Zorn, L. and Bayley, H. (1992) Assembly of the oligomeric membrane pore formed by Staphylococcal alpha-hemolysin examined by truncation mutagenesis. *J Biol Chem* **267**, 21782-21786
- 8 Vécsey-Sémjen, B., Lesieur, C., Mollby, R. and van der Goot, F. G. (1997) Conformational changes due to membrane binding and channel formation by staphylococcal alpha-toxin. *J Biol Chem* **272**, 5709-5717
- 9 Vécsey-Sémjen, B., Möllby, R. and van der Goot, F. G. (1996) Partial C-terminal unfolding is required for channel formation by staphylococcal alpha-toxin. *J Biol Chem* **271**, 8655-8660
- 10 Tilley, S. J., Orlova, E. V., Gilbert, R. J., Andrew, P. W. and Saibil, H. R. (2005) Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. *Cell* **121**, 247-256
- 11 Miller, C. J., Elliott, J. L. and Collier, R. J. (1999) Anthrax protective antigen: prepore-to-pore conversion. *Biochemistry* **38**, 10432-10441

- 12 Sellman, B. R., Kagan, B. L. and Tweten, R. K. (1997) Generation of a membrane-bound, oligomerized pre-pore complex is necessary for pore formation by *Clostridium septicum* alpha toxin. *Mol Microbiol* **23**, 551-558
- 13 Hotze, E. M., Wilson-Kubalek, E. M., Rossjohn, J., Parker, M. W., Johnson, A. E. and Tweten, R. K. (2001) Arresting pore formation of a cholesterol-dependent cytolysin by disulfide trapping synchronizes the insertion of the transmembrane beta-sheet from a prepore intermediate. *J Biol Chem* **276**, 8261-8268
- 14 Czajkowsky, D. M., Hotze, E. M., Shao, Z. and Tweten, R. K. (2004) Vertical collapse of a cytolysin prepore moves its transmembrane beta-hairpins to the membrane. *Embo J* **23**, 3206-3215
- 15 Ramachandran, R., Tweten, R. K. and Johnson, A. E. (2005) The domains of a cholesterol-dependent cytolysin undergo a major FRET-detected rearrangement during pore formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 7139-7144
- 16 Ramachandran, R., Tweten, R. K. and Johnson, A. E. (2004) Membrane-dependent conformational changes initiate cholesterol-dependent cytolysin oligomerization and intersubunit beta-strand alignment. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 697-705
- 17 Hotze, E. M., Heuck, A. P., Czajkowsky, D. M., Shao, Z., Johnson, A. E. and Tweten, R. K. (2002) Monomer-monomer interactions drive the prepore to pore conversion of a beta-barrel-forming cholesterol-dependent cytolysin. *J Biol Chem* **277**, 11597-11605
- 18 Meunier, O., Ferreras, M., Supersac, G., Hoepfer, F., Baba-Moussa, L., Monteil, H., Colin, D. A., Menestrina, G. and Prévost, G. (1997) A predicted beta-sheet from class S components of staphylococcal gamma-hemolysin is essential for the secondary interaction of the class F component. *Biochim Biophys Acta* **1326**, 275-286
- 19 Sugawara-Tomita, N., Tomita, T. and Kamio, Y. (2002) Stochastic assembly of two-component staphylococcal gamma-hemolysin into heteroheptameric transmembrane pores with alternate subunit arrangements in ratios of 3:4 and 4:3. *J Bacteriol* **184**, 4747-4756
- 20 Miles, G., Movileanu, L. and Bayley, H. (2002) Subunit composition of a bicomponent toxin: staphylococcal leukocidin forms an octameric transmembrane pore. *Protein Sci* **11**, 894-902

- 21 Jayasinghe, L. and Bayley, H. (2005) The leukocidin pore: Evidence for an octamer with four LukF subunits and four LukS subunits alternating around a central axis. *Protein Sci* **14**, 2550-2561
- 22 Ferreras, M., Hoper, F., Dalla Serra, M., Colin, D. A., Prévost, G. and Menestrina, G. (1998) The interaction of *Staphylococcus aureus* bi-component gamma-hemolysins and leucocidins with cells and lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* **1414**, 108-126
- 23 Miles, G., Jayasinghe, L. and Bayley, H. (2005) Assembly of the bi-component leukocidin pore examined by truncation mutagenesis. *J Biol Chem*
- 24 Valeva, A., Palmer, M. and Bhakdi, S. (1997) Staphylococcal alpha-toxin: formation of the heptameric pore is partially cooperative and proceeds through multiple intermediate stages. *Biochemistry* **36**, 13298-13304
- 25 Cooney, J., Kienle, Z., Foster, T. J. and O'Toole, P. W. (1993) The gamma-hemolysin locus of *Staphylococcus aureus* comprises three linked genes, two of which are identical to the genes for the F and S components of leukocidin. *Infect Immun* **61**, 768-771
- 26 Prévost, G., Cribier, B., Couppié, P., Petiau, P., Supersac, G., Finck-Barbançon, V., Monteil, H. and Piémont, Y. (1995) Panton-Valentine leucocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infect Immun* **63**, 4121-4129
- 27 Olson, R., Nariya, H., Yokota, K., Kamio, Y. and Gouaux, E. (1999) Crystal structure of staphylococcal LukF delineates conformational changes accompanying formation of a transmembrane channel. *Nat Struct Biol* **6**, 134-140
- 28 Guillet, V., Roblin, P., Werner, S., Coraiola, M., Menestrina, G., Monteil, H., Prévost, G. and Mourey, L. (2004) Crystal structure of leucotoxin S component: new insight into the Staphylococcal beta-barrel pore-forming toxins. *J Biol Chem* **279**, 41028-41037
- 29 Baba-Moussa, L., Werner, S., Colin, D. A., Mourey, L., Pédelacq, J. D., Samama, J. P., Sanni, A., Monteil, H. and Prévost, G. (1999) Decoupling the Ca²⁺-activation from the pore-forming function of the bi-component Panton-Valentine leucocidin in human PMNs. *FEBS Lett* **461**, 280-286

- 30 Song, L., Hobaugh, M. R., Shustak, C., Cheley, S., Bayley, H. and Gouaux, J. E. (1996) Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* **274**, 1859-1866
- 31 Werner, S., Colin, D. A., Coraiola, M., Menestrina, G., Monteil, H. and Prévost, G. (2002) Retrieving biological activity from LukF-PV mutants combined with different S components implies compatibility between the stem domains of these staphylococcal bicomponent leucotoxins. *Infect Immun* **70**, 1310-1318
- 32 Comai, M., Dalla Serra, M., Coraiola, M., Werner, S., Colin, D. A., Monteil, H., Prévost, G. and Menestrina, G. (2002) Protein engineering modulates the transport properties and ion selectivity of the pores formed by staphylococcal gamma-haemolysins in lipid membranes. *Mol Microbiol* **44**, 1251-1267
- 33 Menestrina, G. (1986) Ionic channels formed by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin: voltage-dependent inhibition by divalent and trivalent cations. *J Membr Biol* **90**, 177-190
- 34 Cheley, S., Braha, O., Lu, X., Conlan, S. and Bayley, H. (1999) A functional protein pore with a "retro" transmembrane domain. *Protein Sci* **8**, 1257-1267
- 35 Jayasinghe, L., Miles, G. and Bayley, H. (2005) Role of the amino latch of staphylococcal alpha-hemolysin in pore formation: a co-operative interaction between the N terminus and position 217. *J Biol Chem*
- 36 Jursch, R., Hildebrand, A., Hobom, G., Trantum-Jensen, J., Ward, R., Kehoe, M. and Bhakdi, S. (1994) Histidine residues near the N terminus of staphylococcal alpha-toxin as reporters of regions that are critical for oligomerization and pore formation. *Infect Immun* **62**, 2249-2256
- 37 Walker, B. and Bayley, H. (1995) Key residues for membrane binding, oligomerization, and pore forming activity of staphylococcal alpha-hemolysin identified by cysteine scanning mutagenesis and targeted chemical modification. *J Biol Chem* **270**, 23065-23071
- 38 Nguyen, V. T., Higuchi, H. and Kamio, Y. (2002) Controlling pore assembly of staphylococcal gamma-haemolysin by low temperature and by disulphide bond formation in double-cysteine LukF mutants. *Mol Microbiol* **45**, 1485-1498

- 39 Gilbert, R. J. (2005) Inactivation and activity of cholesterol-dependent cytolysins: what structural studies tell us. *Structure (Camb)* **13**, 1097-1106
- 40 Dalla Serra, M., Coraiola, M., Viero, G., Comai, M., Potrich, C., Ferreras, M., Baba-Moussa, L., Colin, D. A., Menestrina, G., Bhadki, S. and Prévost, G. (2005) *Staphylococcus aureus* bicomponent γ -hemolysins, HlgA, HlgB, and HlgC, can form mixed pores containing all components. *J Chem Inf Model* **In press**
- 41 Viero, G., Cunaccia, R., Prevost, G., Werner, S., Monteil, H., Keller, D., Joubert, O., Menestrina, G. and Dalla Serra, M. (2005) Homologous versus heterologous interactions in the bicomponent staphylococcal gamma-hemolysins pore. *Biochem J*
- 42 Pédelacq, J. D., Maveyraud, L., Prévost, G., Baba-Moussa, L., Gonzalez, A., Courcelle, E., Shepard, W., Monteil, H., Samama, J. P. and Mourey, L. (1999) The structure of a *Staphylococcus aureus* leucocidin component (LukF-PV) reveals the fold of the water-soluble species of a family of transmembrane pore-forming toxins. *Structure Fold Des* **7**, 277-287
- 43 Malovrh, P., Viero, G., Serra, M. D., Podlesek, Z., Lakey, J. H., Macek, P., Menestrina, G. and Anderluh, G. (2003) A novel mechanism of pore formation: membrane penetration by the N-terminal amphipathic region of equinatoxin. *J Biol Chem* **278**, 22678-22685
- 44 Tejuca, M., Dalla Serra, M., Ferreras, M., Lanio, M. E. and Menestrina, G. (1996) Mechanism of membrane permeabilization by sticholysin I, a cytolysin isolated from the venom of the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biochemistry* **35**, 14947-14957
- 45 Colin, D. A., Mazurier, I., Sire, S. and Finck-Barbançon, V. (1994) Interaction of the two components of leukocidin from *Staphylococcus aureus* with human polymorphonuclear leukocyte membranes: sequential binding and subsequent activation. *Infect Immun* **62**, 3184-3188
- 46 Gauduchon, V., Werner, S., Prévost, G., Monteil, H. and Colin, D. A. (2001) Flow cytometric determination of Panton-Valentine leucocidin S component binding. *Infect Immun* **69**, 2390-2395

Table 1. Joubert et al.

Table 1. Cytotoxic activities of the heterodimers, obtained from figures 3 and 4; and in similar experiments on RRBC. Time to reach half hemolysis on HRBC and RRBC and 50% of the ethidium maximal fluorescence of the WT control on PMNs.

Toxin	PMNs	HRBC	RRBC
	t ₅₀ (min) ^a	t ₅₀ (min) _b	t ₅₀ (min) _b
WT	14.6	2.5	2.9/4.3
Dimer A21 B103	na ^c	na	na
Dimer A21 B104	20.0	9.8	9.4
Dimer A21 B154	16.3	10.8	7.9
Dimer A21 B155	22.7	> 60	23.0
Dimer A21 B156	20.0	> 60	13.7
Dimer A21 B157	14.6	8.8	3.1
Dimer A21 B158	17.3	18.0	4.9
Dimer A28 B103	na	na	na
Dimer A28 B104	na	> 60	na
Dimer A28 B154	32.1	> 60	na
Dimer A28 B155	17.5	> 60	12.5
Dimer A28 B156	13.8	6.8	3.6
Dimer A28 B157	15.0	> 60	44.4
Dimer A28 B158	20.5	23.0	3.6

^a time to 50% activity with [toxin]=20nM

^b half-hemolysis time with [toxin]=20nM

^c na, non active

Table 2. Joubert et al.

Table 2. Characterization of the permeabilization activity on model membranes: 1. permeabilisation activity on LUVs; 2. ion transport properties of the channels formed by γ -hemolysin and their stabilized heterodimers in planar lipid membranes.

Toxin	Calcein release ($t_{40/s}$) ^a	Conductance ^b (pS)	I-/I+ ^c 100 mM KCl	PLM activity ([toxin]/nM) ^d
Wt	57	128 ± 13	2.7	18 (2)
Dimer A21 B103	na	–	–	0 (303)
Dimer A21 B104	na	162 ± 7	2.4	1 (60)
Dimer A21 B154	na	120	–	0 (71)
Dimer A21 B155	na	162	–	0 (250)
Dimer A21 B156	na	126 ± 17	3.2	3 (150)
Dimer A21 B157	579	133 ± 13	2.9	120 (3)
Dimer A21 B158	879	144 ± 14	2.6	31 (2)
			–	
Dimer A28 B103	na	–	–	0 (400)
Dimer A28 B104	na	–	–	0 (280)
Dimer A28 B154	na	–	–	0 (84)
Dimer A28 B155	na	–	–	0 (248)
Dimer A28 B156	182	118 ± 12	3.3	32 (9)
Dimer A28 B157	211	137 ± 19	3	21 (2)
Dimer A28 B158	20	130 ± 15	2.6	25 (3)

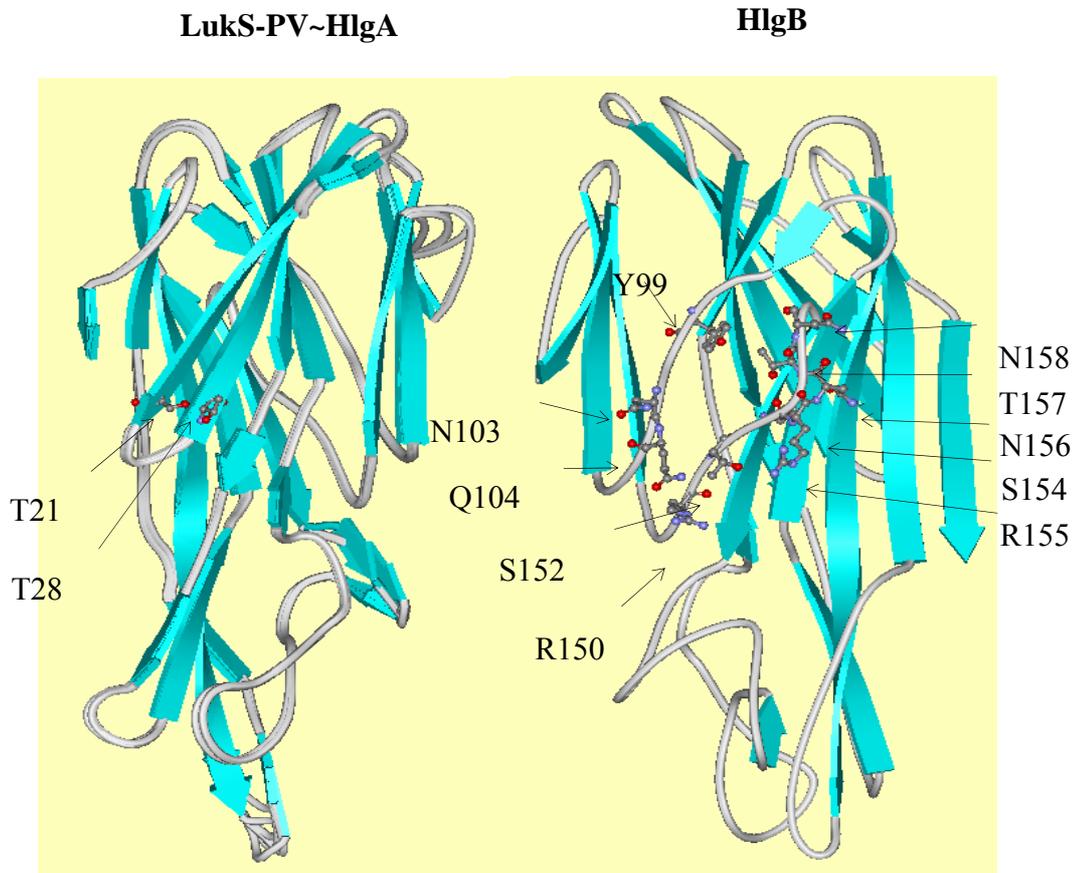
a. Permeabilising activity of the heterodimers on LUVs comprised of PC/Cho (1:1 molar ratio) reported as the time (in s) necessary to cause a 40% of calcein release at 50 nM of toxin concentration. Data are averaged of at least three different experiments. The final concentration of lipids was 5 μ M.

na, non active

b. Single channel conductance obtained at +40 mV. Values are mean \pm SD obtained from histograms such as those in Figure 6. The number of events used, taken from three to eight different experiments, ranged from 32 to 608.

c. Ratio between the ion current flowing through a single channel at negative and positive voltages, measured at 120 mV. Values are mean \pm SEM from one to eight different experiments.

d. Activity on PLM is expressed as the number of pores obtained after 3 min from the toxin addition. Toxin concentration in nM is reported in brackets.

A**B**

	20	35		145	160
HlgA	ITSKRLA	TQNIQFDE	HlgB	KQESYRIT	TL SRNTNY-K
LukS-PV	TSSDKWG	V TQNIQFDE	LukF-PV	KQESYRIT	SL DKRTNF-K
LukE	VSSKKWG	V TQNVQFDE	LukD	KQESYRIT	TI DRKTNH-K
HlgC	KTSNKWG	V TQNIQFDE	Hla	VQPDFKT	IL ESPTD--K
Hla	TYDKENG	MHKKVFYS E	HlgA	NQ KNYV T	EV VVESQNS K
HlgB	ADSDKFK	I SQIL T F N F			

FIGURE 1. Basic three-dimensional structures and sequence alignment of leucotoxins

Panel A. Three-dimensional structures of LukS-PV (PDB = 1t5r, right-rear view) that might be comparable to that of HlgA (A in text) and HlgB (B in text)(PDB = 1LKF, left-rear view) and the location of the cystein-substituted amino acids. **Panel B.** Sequence alignment of the *S. aureus* gamma-hemolysins (X81786), Panton-Valentine leucocidin (X72700), and Luke-LukD (Y13225). Common residues are shown in white with black background while common residues to bipartite leucotoxins are shown in bold; numbering of the amino acids is given on the basis of HlgA and HlgB, respectively.

Fig. 1. Joubert et al.

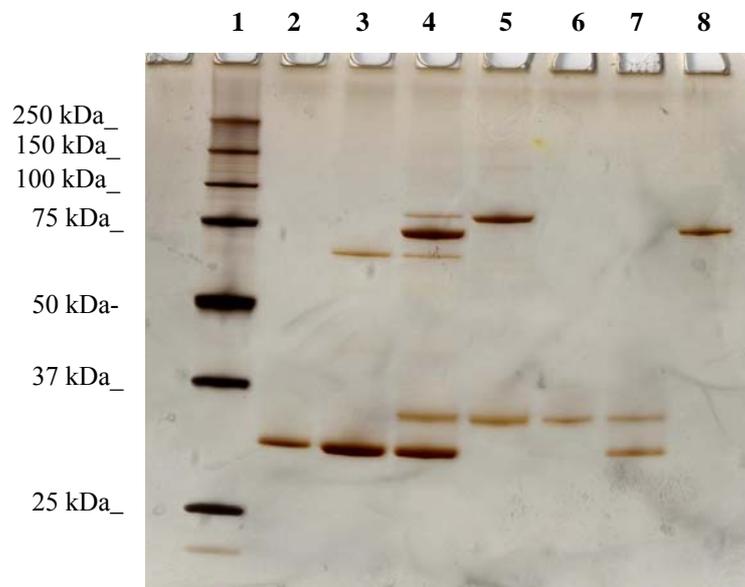


FIGURE 2. The different steps of the engineering and purification of a heterodimer (ex: A T28C~B N156C)

Control by 10-15% (w/vol) SDS-PAGE (Invitrogen) and silver staining of the dimer A T28C~B N156C. Lane 1: Molecular ladder ; Lane 2: A T28C (0,3 µg) in reducing conditions. Homodimers formed by oxidised A T28C (1 µg) or B N156C (0.8 µg) are challenged on Lanes 3 and 5, respectively. Heterodimer A T28C-B N156C (1 µg of the coupling reaction) is challenged on Lane 4, and FPLC-purified on Lane 8. Lane 6: B N156C (0.5 µg) in reducing conditions. Lane 7: Recombinant wt A (0.2 µg) and wt B (0,15 µg) mixed together.

Fig. 2. Joubert et al.

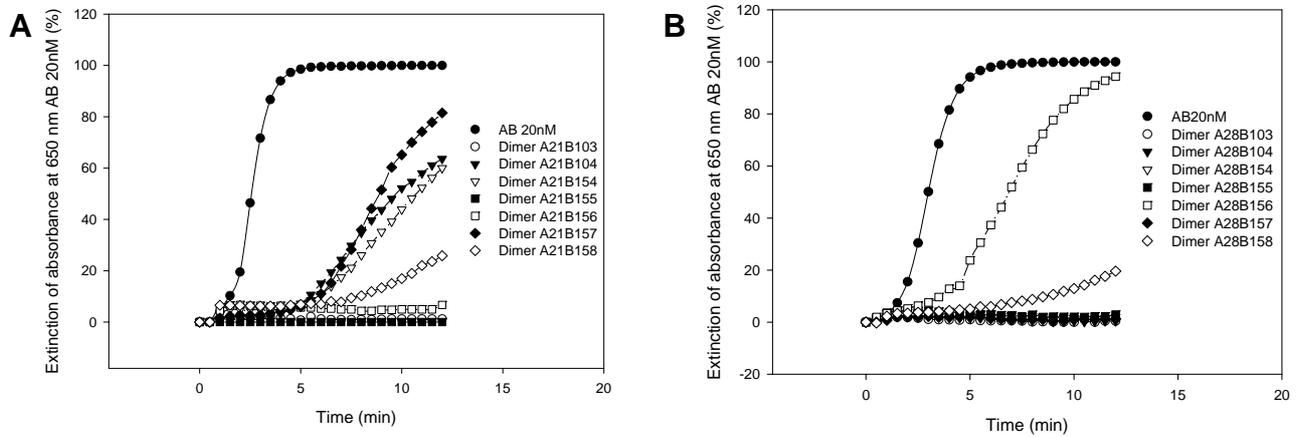


FIGURE 3. HlgA (A) and HlgB (B) heterodimers induce various hemolytic activities in human erythrocytes of compared with the wt toxin.

HRBC were incubated in the presence of 20 nM heterodimers obtained by combining HlgA T21C (A) or HlgA T28C (B). The hemolytic activity was monitored by following the decrease of absorbance at 650 nm. Kinetics were then normalized in function of the 100% of hemolysis obtained for the control, as described in Materials and Methods.

Fig. 3. Joubert et al.

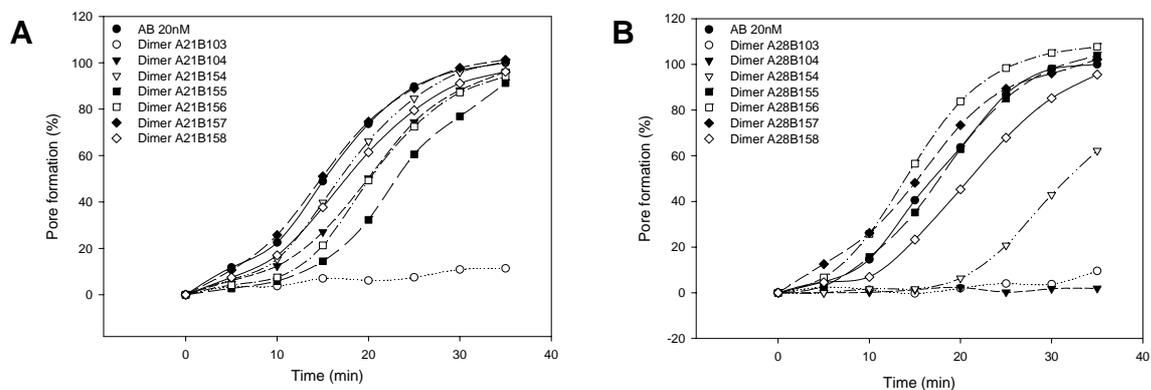
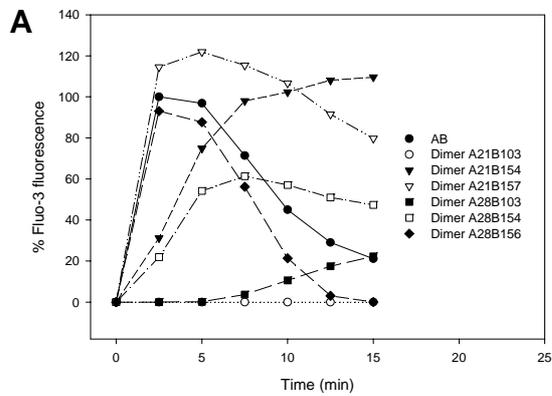


FIGURE 4. Pore-forming activity and ethidium entry into human PMNs are induced by the HlgA (A) - HlgB (B) heterodimers.

Human PMNs were incubated in the presence of 20 nM heterodimers obtained by combining A T21C (A) or A T28C (B), and formation of pores was followed by the entry of ethidium and its combination with nucleic acids, as described in Materials and Methods. the wt HlgA-HlgB leucotoxin, applied at 20 nM, was used as a control.

Fig. 4. Joubert et al.



B

	A T21C	A T28C
B N103C	–	+
B Q104C	++	–
B S154C	++	++
B R155C	++	+++
B N156C	++	+++
B T157C	+++	+++
B N158C	+++	++

FIGURE 5. HlgA~HlgB heterodimers are responsible for different Ca^{2+} influxes into human PMNs as evaluated by flow cytometry

A. Each heterodimer and the control (A + B) were used at 20 nM. Dimers A T21C~B N158C and A T28C~B R155C activities were similar to those of A T21C~B T157C and A T28C~B N156C. Dimers A T21C~B Q104C, A T21C~B R155C and A T21C~B N156C activities were intermediate, similar to those of A T21C~B S154C and A T28C~B S154C. Dimer A T28C~B Q104C activity was null like that of A T21C~B N103C. **B.** Compared calcium entries induced by all purified heterodimers, from serial data as in fig. 5. +++ similarly as active as the control (fluorescence greater than 70% of the control at 5 min incubation), ++ intermediate activity (fluorescence between 20 and 70% of the control at 5 min incubation), + weak activity (fluorescence lesser than 20% of the control at 5 min incubation and greater than 10% at 15 min of incubation), – no calcium entry.

Fig. 5. Joubert et al.

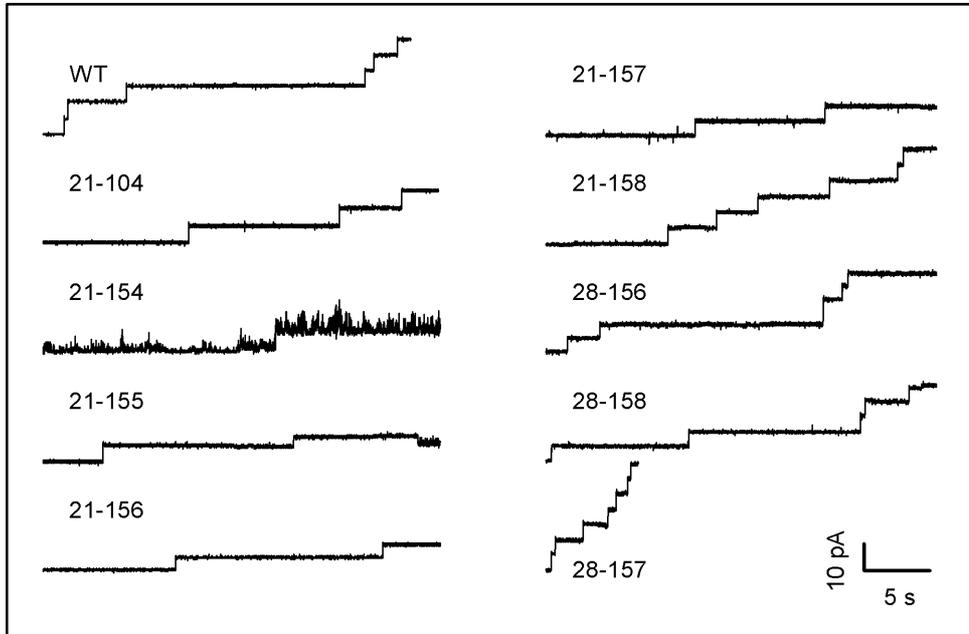


FIGURE 6. Formation of ion channels in PLM by gamma-hemolysin and dimers. Representative stepwise current increases corresponding to the opening of single ion channels of γ -hemolysin wt and all the active heterodimers as indicated on the left of each trace. Each protein was added to the cis side at the concentrations reported in brackets of Table 2. The applied voltage was +40 mV in all cases. The height of each step was used to calculate the conductance of that pore as reported in Table 2.

Fig. 6. Joubert et al.

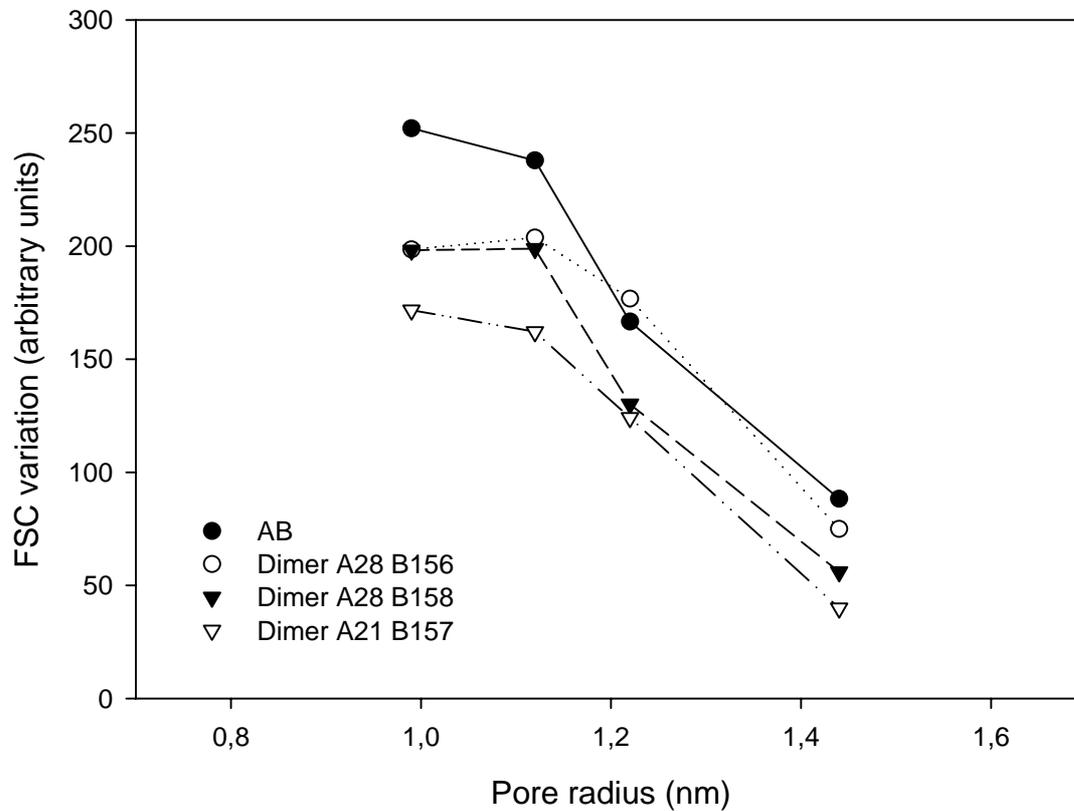


FIGURE 7. The radius of pores formed by active heterodimers are to that of the wt toxin (1.1-1.2 nm)

Pores formed by 20 nM of the wt couple (HlgA + Hlg B), Dimer A T28C~B N156C 20 nM, A T21C~B T157C and A T28C~B N158C 30 min after application of toxins to human PMNs. Osmotic protection was assessed by variations of the mean FSC (forward light scatter) value in the presence of polyethylene glycol molecules of different hydrodynamic radii. The same inflexion point was observed in all active heterodimers. The location of each curve depends of the relative activity of each heterodimer.

Fig. 7. Joubert et al.

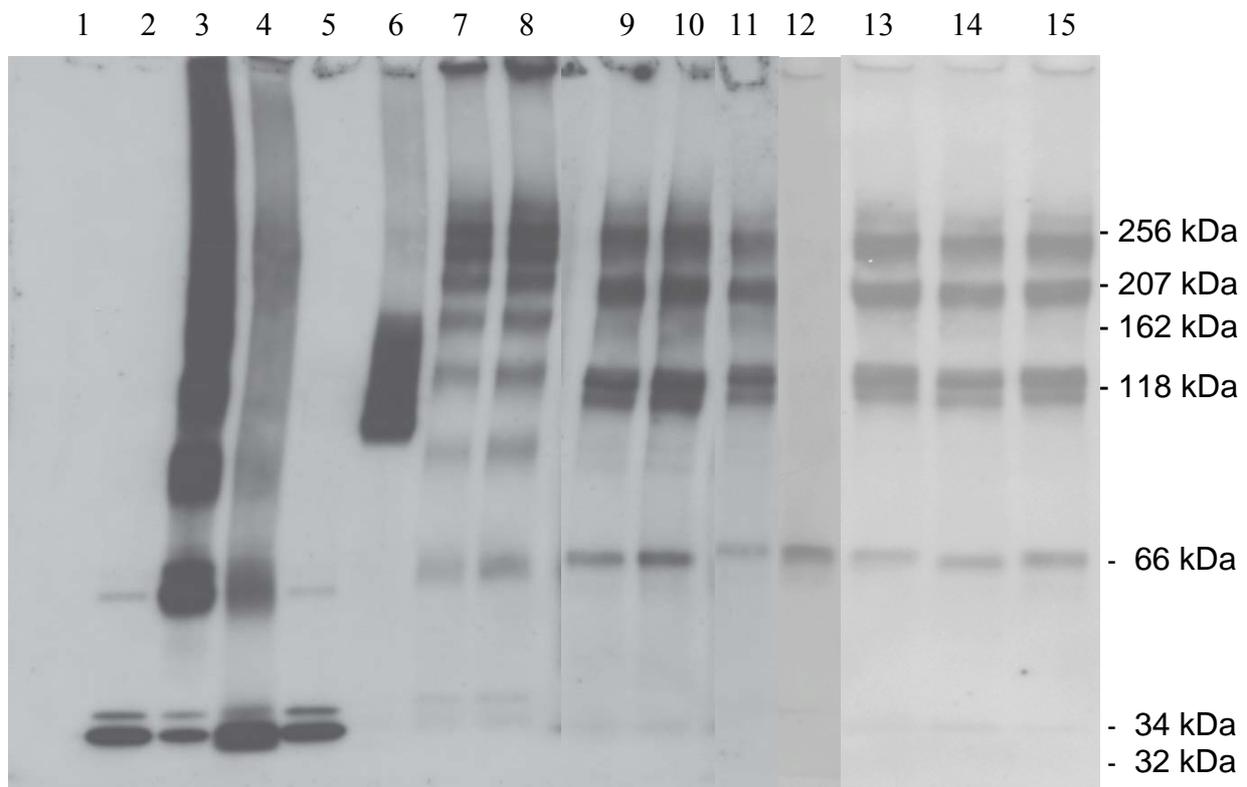


FIGURE 8. HlgA (A) and HlgB (B) and heterodimers oligomers formed in solution or after their insertion into human PMN membranes. Oligomers were analysed onto 3-8% (w/v) SDS-PAGE and revealed by immunoblotting with anti-LukS-PV and anti-LukF-PV affinity-purified rabbit antibodies with wt. Lane 1: PMNs only. Lane 2: A and B (0.2 ng each) are mixed for 1 hour at room temperature and analyzed. Lane 3: 4 ng of each A and B is concatemerised in solution with 0.3 mM glutaraldehyde. Lane 4: same experiment as in lane 3, but with 3 mM glutaraldehyde. Lane 5: A and B were applied onto human PMNs and retrieved after saponin treatment, but without glutaraldehyde. Lane 6: A (15 ng) and B (15 ng) oligomers were applied onto human PMNs and retrieved after saponin and glutaraldehyde treatments, before to be electrophoresed without boiling. Lanes 7 and 8: temperature, 0°C or 23°C, respectively, of the saponin treatment does not affect the retrieving of oligomers that are boiled after the glutaraldehyde treatment. Lanes 9 to 11: 30 ng of heterodimers A T28C~B N156C, A T28C~B T157C, A T21C~B R155C, respectively, are applied onto human PMNs and oligomers are prepared as in Lane 8 and show octamers, hexamers, tetramers, and dimers as well as monomers in minor quantities. Any heterodimers with full or middle activities produced similar oligomers (not shown). Lane 12: A T28C~N103C (or A T28C~Q104C, not shown) failed to promote oligomers in the same conditions as in lanes 7 to 11. Lanes 13, 14, 15 show oligomers obtained from other active heterodimers: A T21C~B N156C, A T21C~B T157C, A T21C~B N158C.

Fig. 8. Joubert et al.

B. Discussion de l'article n°2

1. Synthèse des hétérodimères

En utilisant un système de groupe protecteur (2,2' DithioDiPyridine, DTDP), on augmente la formation d'hétérodimères. Ainsi, la solution avant purification par FPLC contient 50% d'hétérodimères HlgA~HlgB contaminés par des homodimères de HlgA et de HglB, et par des monomères (**Figure 2** de l'article). Une première chromatographie d'interactions hydrophobes permet de se séparer des monomères et des homodimères de HlgA. En effet, l'hétérodimère a le même comportement chromatographique en interaction hydrophobe que HlgB. Ensuite, la purification est poursuivie en utilisant une chromatographie échangeuses d'ions, afin de séparer l'hétérodimère des monomères et des homodimères de HlgB, l'hétérodimère se comportant en échange d'ions comme HlgA.

La combinaison de ces deux types de purification permet d'obtenir un hétérodimère pur à plus de 99%, pouvant être proposé à un projet de cristallisation (**Figure 2 piste 8** de l'article).

Certaines positions n'ont cependant donné aucun dimère Y99C, R150C, T152C. Il apparaît que la cystéine en position 99 n'est pas accessible, ce résidu est masqué ou orienté vers l'intérieur de la molécule, tout comme R150C et T152C qui ont un rendement de dimérisation inexploitable (<10-15%) avec HlgA T21C et HlgA T28C. Ceci nous informe sur le fait que ces résidus ne sont probablement pas en interaction et que d'autres facteurs sont contraires à la dimérisation des protéines.

2. Activités biologiques des hétérodimères

2.1. Sur les polynucléaires neutrophiles

Les positions 103 et 104 amènent à la construction d'un hétérodimère totalement inactif (HlgA T21C~HlgB N103C et HlgA T28C~HlgB N103C) ou peu actif (HlgA T28C~HlgB Q104C) (**Table 1 et 2** de l'article). Ces résidus sont situés dans la région triangle, impliquée dans le

déroulement du « Stem ». La création d'un pont covalent à cet endroit doit perturber ainsi la formation du pore lytique.

Les autres combinaisons sont toutes plus ou moins actives sur PNs (**Figure 4 et 5, Table 1**). Les combinaisons avec HlgA T21C montrent que le dimère dont l'activité est la plus proche du contrôle est le HlgA T21C~HlgB T157C. Les positions 154 et 158 ont également des activités très proches. Les positions intermédiaires 155 et 156 donnent des hétérodimères moins actifs que les précédents. Cela indique que la boucle sur laquelle sont situés ces aminoacides est suffisamment souple pour former des hétérodimères, mais cela induit des contraintes structurales qui influent sur la fonctionnalité du pore. Le résidu HlgA T21 doit se trouver dans une zone spatialement proche des résidus 154 et 158 de HlgB et plus spécialement de 157, alors que 155 et 156 sont plus éloignés.

2.2. Sur les globules rouges humains et les membranes synthétiques

Ces indications sont confirmées par l'hémolyse des GRH (**Figure 3, Table 1**). Ici, l'activité est beaucoup plus lente à se mettre en place par rapport au couple sauvage. Les hétérodimères les plus actifs sont les combinaisons de HlgA T21C avec HlgB Q104C, S154, T157 et dans une moindre mesure N158. Les résultats obtenus sur vésicules et membranes synthétiques (**Table 2**) sont encore plus discriminants puisque seuls les hétérodimères HlgA T21C~HlgB T157C et HlgA T21C~HlgB N158C, HlgA T21C~HlgB Q104C ne formant pas de pore sur les vésicules et est faiblement actif sur les membranes planes. Dans ce dernier cas, la formation de pore avec les hétérodimères HlgA T21C~HlgB S154C, HlgA T21C~HlgB R155C et HlgA T21C~HlgB N156C semble marginale.

Ces éléments indiquent que l'hétérodimère le plus actif de cette série est le HlgA T21C~HlgB T157C.

Des hétérodimères construits en combinaison avec HlgA T28C, HlgA T28C~HlgB N103C et HlgA T28C~HlgB Q104C sont inactifs (**Figure 3 et Table 1**). Il est intéressant de noter que pour les hétérodimères actifs de cette série, le fait de s'éloigner de la position 156 diminue l'activité des hétérodimères synthétisés (**Table 1**). Sur GRH, les résultats sont encore plus clairs. L'hétérodimère HlgA T28C~HlgB N156C est le plus actif avec un temps de demi-hémolyse de 6,8 minutes contre 23 minutes pour le deuxième dimère le plus actif (HlgA T28C~HlgB N158C). Sur membranes et vésicules synthétiques, les seuls hétérodimères actifs

sont HlgA T28C~HlgB N156C, HlgA T28C~HlgB T157C et HlgA T28C~HlgB N158C (**Table 1**). Ainsi, l'hétérodimère HlgA T28C~HlgB N156C est le plus actif de cette série et même de tous les hétérodimères obtenus.

2.3. Propriétés du pore

Les résultats obtenus sur vésicules et membranes synthétiques (**Table 2 et Figure 6** de l'article) confirment les données de PEG obtenues sur PNs (**Figure 7**). Les pores formés par les hétérodimères de leucotoxines ont des propriétés proches de celles du pore formé par les toxines sauvages.

Ces données rassemblées indiquent une interaction préférentielle de la T28 de HlgA avec le N156 de HlgB d'une part, et de la T21 de HlgA avec la T157 de HlgB d'autre part. En effet, malgré les mutations, les pores conservent des caractéristiques identiques à la toxine sauvage. Ces constructions sont aussi toxiques que le couple sauvage, puisqu'ils lysent les PNs jusqu'à une concentration de 20 pM.

2.4. Observation des oligomères par immunoréplique

Contrairement à l'alpha-toxine, il est très difficile de récupérer des oligomères de leucotoxines depuis les membranes des cellules cibles. Afin de résoudre la stœchiométrie du pore, il a semblé pertinent d'utiliser les hétérodimère. En effet, l'utilisation de ces derniers permet d'envisager un résultat plus net encore qu'en utilisant des monomères. Comme au chapitre III (article n°1), nous avons utilisé un agent pontant, le glutaraldéhyde afin d'améliorer le rendement de récupération des oligomères de leucotoxines. Les cellules ont été mises en présence des monomères HlgA et HlgB (**Figure 8, piste 2**) et de différents hétérodimères (**Figure 8, pistes 9 à 12**), inactif (HlgA T28C~HlgB N103C, piste 12), à l'activité intermédiaire (HlgA T21C~HlgB N155C, piste 11), et les plus actifs (HlgA T21C~HlgB T157C et HlgA T28C~HlgB N156C, pistes 9 et 10). Pour les toxines, appliquées sous forme de monomères, on obtient une échelle d'oligomères, allant du monomère à l'octamère (**Figure 8, piste 7 et 8**). L'utilisation des hétérodimères actifs nous permet d'obtenir davantage d'oligomères de haut poids moléculaire, allant jusqu'à l'octamère mais pas au-delà (**Figure 8,**

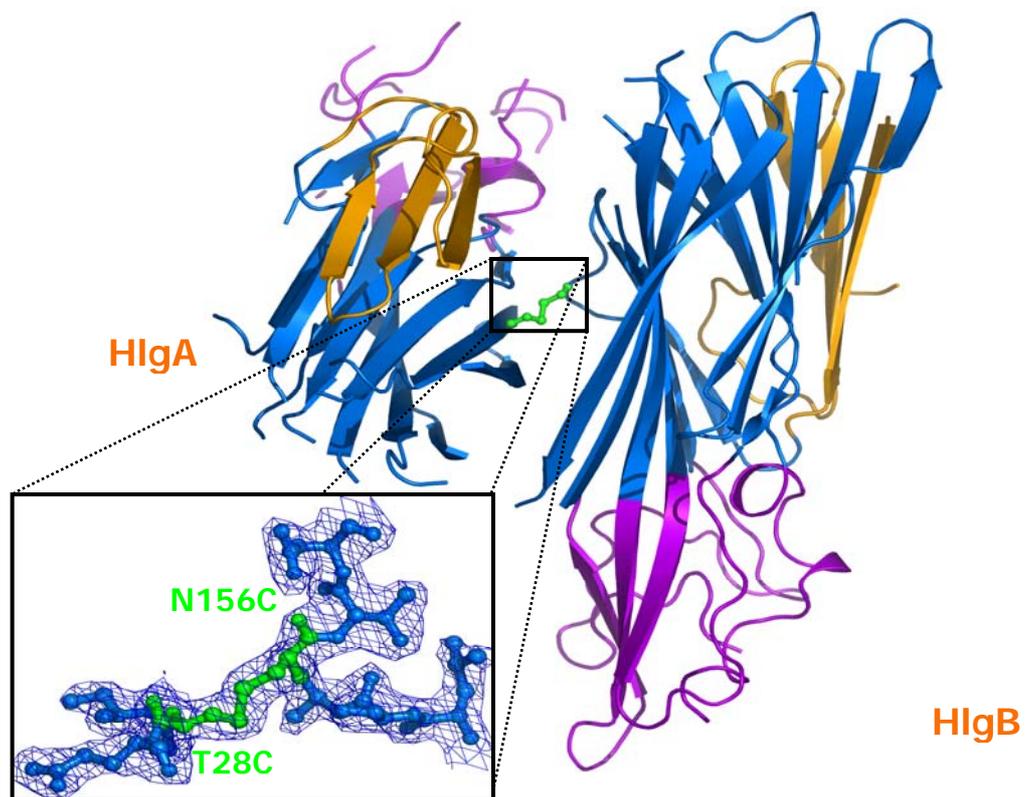


Figure 4.1 Structure tridimensionnelle de l'hétérodimère HlgA T28C~HlgB N156C, obtenue avec une résolution de 2,4 Å

pistes 4 à 6). Ceci confirme les données obtenues récemment (Jayasinghe et Bayley, 2005). Pour l'hétérodimère inactif, on observe des dimères, mais pas d'espèces plus complexes, signifiant par là qu'ils se fixent sur la membrane, mais ne peuvent initier l'oligomérisation conduisant au pore lytique.

C. Conclusion - Perspectives

Ainsi, nous avons stabilisé et purifié des hétérodimères de leucotoxines biologiquement actifs. Ceci indique que, contrairement à la PFO, une fixation préalable des monomères au ligand membranaire n'est pas nécessaire pour constituer un pore fonctionnel. L'hétérodimère est un élément fonctionnel à part entière (oligomérisation, déroulement de la partie « Stem », sélectivité ionique et diamètre du pore) et son activité quasi identique pour les plus actifs au couple sauvage signifie que le pore formé est constitué d'un nombre pair de monomères. Ceci valide en partie la séquence de formation du pore proposée par Nguyen (Nguyen et coll., 2003). Ces auteurs décrivent la formation d'un dimère, d'un tétramère puis enfin d'un pore constitué de 6 ou de 7 unités.

La stœchiométrie du pore est effectivement depuis longtemps source de controverses. Des hexamères (Ferrerias et coll., 1998), heptamères (Sugawara-Tomita et coll., 2002) et octamères (Miles et coll., 2002) ont été proposés. Les résultats obtenus par immunoréplique nous indiquent que les leucotoxines constituent un pore lytique non seulement pair, mais octamérique. Ceci confirme les données obtenues récemment (Jayasinghe et Bayley, 2005).

L'hétérodimère HlgA T28C~HlgB N156C a été cristallisé (**Figure 4.1**) par l'équipe du Dr Lionel Mourey (Groupe de Biophysique Structurale, Département Mécanismes Moléculaires des Infections Mycobactériennes, CNRS-IPBS UMR 5089 – Toulouse). Sa résolution permettra d'obtenir des indices sur les réorganisations conformationnelles subies par le dimère. Egalement, aucune équipe jusqu'alors n'a réussi à cristalliser HlgA. Sa co-cristallisation avec HlgB au sein de l'hétérodimère permettra d'avoir enfin la structure tridimensionnelle d'un deuxième composé de classe S, après la récente résolution de celle de LukS-PV (Guillet et coll., 2004b).

Des expériences de dynamique moléculaire en solution (SAXS, Small-angle X-Ray Scattering) sont en cours dans l'équipe dirigée par le Dr Lionel Mourey. Cette modélisation permettra la validation des interactions d'interface et de la structure de l'oligomère.

La suite de ce travail concernera l'étude de la seconde interface, afin d'identifier les résidus en vis-à-vis pour chaque partenaire. Des données préliminaires et l'étude des structures indiquent que l'obtention d'hétérodimères actifs est encore moins évidente. En effet, l'absence de boucle (présente sur la première interface de HlgB) sur la deuxième interface de HlgB induit une certaine rigidité dans la structure. Plusieurs tentatives n'ont pas permis d'obtenir de dimères actifs et le rendement de synthèse de ces dimères est beaucoup plus faible que pour l'autre interface.

Afin de résoudre de façon définitive la question de la stœchiométrie du pore néoformé, l'utilisation de l'hétérodimère en FRET pourrait être une solution. En marquant deux lots d'hétérodimère, le premier avec un fluorochrome donneur (D) et le second avec un fluorochrome accepteur (A) d'énergie de fluorescence et en faisant varier le ratio D/A, en présence de PNs, il devrait être possible de confirmer un octamère. Un hexamère donnera 2D/1A ou 1D/2A alors qu'un octamère donnera un ratio 2D/2A.

L'identification des aminoacides en interaction sur les deux interfaces permet également d'envisager la synthèse d'une molécule venant perturber l'association des monomères, inhibant ainsi leur activité cytotoxique. Une telle molécule pourrait être utilisée comme adjuvant du traitement antibiotique puisqu'elle ne tuerait pas la bactérie mais défavoriserait son potentiel de virulence.

Cet édifice suggère qu'une série de changements conformationnels, localisés notamment au niveau de l'interface des molécules, se produit avant de conduire à la formation d'un pore actif. Notre travail met aussi en évidence, 1) une disparité dans les aminoacides en interaction entre l' α -toxine et les leucotoxines, 2) que les membranes de GRH ne sont pas équivalentes à celles des PNs pour l'hétérodimère, 3) que la boucle comprenant les résidus 150 à 158 de HlgB est en relation avec les résidus situés sur le brin β 2 de HlgA, et une certaine flexibilité de cette boucle permet la formation du pore.

La stratégie choisie de dimérisation basée sur des mutants cystéines apparaît être une approche pertinente pour reconstituer l'unité de base du pore leucotoxique. Celle-ci permettra peut-être d'aller plus loin dans la reconstitution du pore.

CHAPITRE V

Impact des calixarènes sur l'activité des leucotoxines

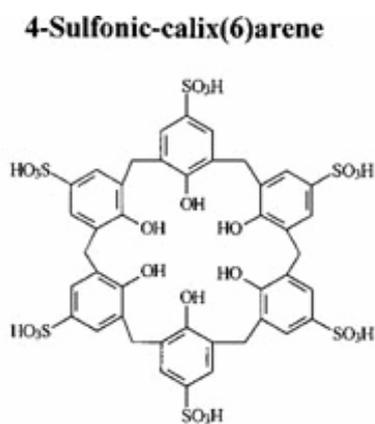


Figure 5.1 : Structure chimique des calixarènes (CXXX) utilisés.

A. Introduction

Le traitement des infections à *S. aureus* repose actuellement uniquement sur l'antibiothérapie. Cependant, en dépit de l'avènement de nouvelles molécules (Nguyen et Chung, 2005), la morbidité et la mortalité de ces infections restent non négligeables (Adedeji et Gray, 2005; Fowler et coll., 2005; Gastmeier et coll., 2005; Suljagic et coll., 2005). En conséquence, la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques adjuvantes à l'antibiothérapie semble intéressante. Parmi celles-ci, l'inhibition directe de certains facteurs de virulence comme les leucotoxines ou les toxines superantigéniques paraît prometteuse. Dans cette optique, un screening de plusieurs molécules cycliques a été réalisé pour rechercher une éventuelle action inhibitrice sur l'activité des leucotoxines, parmi lesquelles, la doxorubicine, les cyclodextrines, le ceftriaxone, et l'érythromycine ont été testés. Les premiers résultats nous ont orienté vers des molécules polycycliques, les calixarènes (CXXX). Nous avons tenté de préciser l'activité et le mode d'action de deux dérivés les plus actifs, les CXXX-6 et -8 (**Figure 5.1**), par des études *in vivo* et *in vitro*.

Cette famille de molécules est décrite depuis le milieu des années cinquante (Cornforth et coll., 1955) comme inhibant les infections par la tuberculose chez la souris. Elles auraient un effet bactériostatique sur *Mycobacterium tuberculosis* en activant la voie inductible de la NO synthase des macrophages murins (Colston et coll., 2004). Elles joueraient également un rôle sur le métabolisme lipidique de ces mêmes macrophages (Hart et coll., 1996). Depuis le milieu des années 80 et surtout dans les 5 dernières années, on constate un intérêt croissant pour ces molécules polycycliques. Elles sont notamment utilisées en physico-chimie et en biophysique pour complexer des atomes lourds comme l'uranium (Sonoda et coll., 1998), ou des aminoacides, réguler l'activité de canaux ioniques (Droogmans et coll., 1999) ou pour la détection de neuromédiateurs comme l'acétylcholine (Takashi, 2003). Leur structure en entonnoir peut être substituée à la couronne supérieure et à la couronne inférieure de manière indépendante, par des phosphates, des sulfonates ou des groupements alkyles (Zadmard et Schrader, 2005). La souplesse de leur structure est dépendante du nombre de sous-unités impliquées. Effectivement, les calix[4]arènes sont plus rigides que les calix[6]arènes et les calix[8]arènes. Si la molécule est substituée de manière adéquate (c'est à dire par des

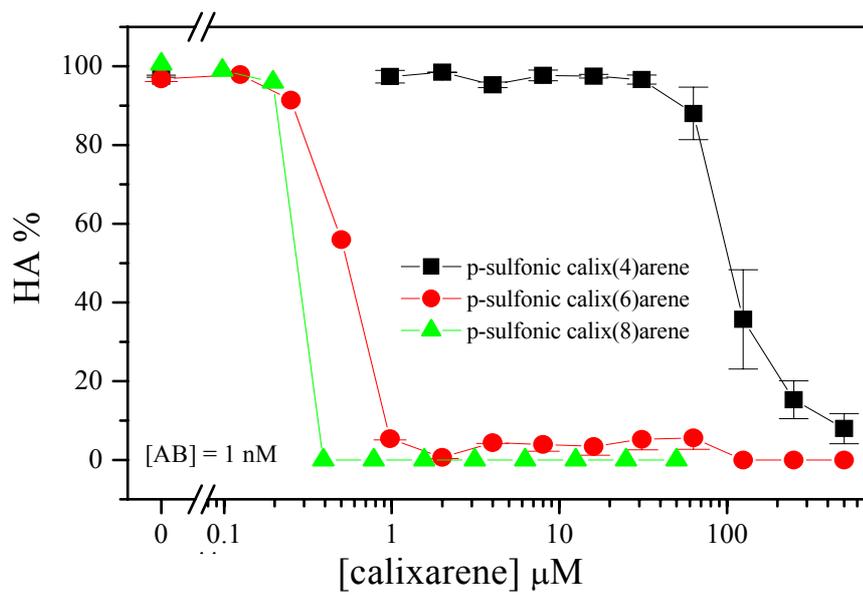


Figure 5.2 : Inhibition de l'hémolyse des GRL induite par 1 nM de γ -hémolysine par les CXXX-4, -6 et -8.

groupements lipophiles), cette souplesse dans la structure permet d'augmenter les affinités pour les membranes biologiques (Gebauer, 1999). Les *para*-sulphonato-calix[*n*]arènes lient les aminoacides par des interactions électrostatiques et interactions π (Zadmard et Schrader, 2005). Ils bloquent aussi les canaux ioniques à chlore, ils sont antithrombotiques et antiviraux à des concentrations hélas non disponibles (Zadmard et Schrader, 2005). Les calix[4]arènes ne sont pas immunogènes chez la souris à 10 μ g / immunisation par injection intraveineuse (Grote Gansey et coll., 1999). Les propriétés hémolytiques de différents *para*-sulphonato-calix-[*n*]-arènes, différemment substitués sur leur couronne inférieure, ont été étudiées (Da Silva et coll., 2004). Ces molécules ne sont significativement hémolytiques qu'à partir de 50 mM. Le *para*-sulphonato-calix-[8]-arène, le plus hémolytique des calixarènes étudiés lyse 30 % des GRH à 200 mM en 30 min. A 5 mM, l'hémolyse chute à moins de 1 % (Da Silva et coll., 2004). Ces derniers auteurs décrivent même une protection des GRH par ces composés, qu'ils rapprochent de celle observée par les polyphénols du thé contre les espèces réactives de l'oxygène (anion superoxyde et peroxyde d'hydrogène) (Grinberg et coll., 1997). Ils concluent à une innocuité vis-à-vis des GRH de tels composés à des concentrations inférieures à 50 mM. D'autres auteurs ont abouti aux mêmes conclusions (Shahgaldian et coll., 2003).

Par comparaison, une concentration de 20 nM d'HlgA-HlgB est capable de lyser 100% des GRH (à même densité cellulaire) en 4 min. Nous avons testé *in vitro* sur GRL et sur PN le pouvoir d'inhibition des CXXX sur l'activité des leucotoxines. La capacité de ces molécules à inhiber l'inflammation induite par l'injection intra-vitréenne de leucotoxines a ensuite été testée chez le lapin.

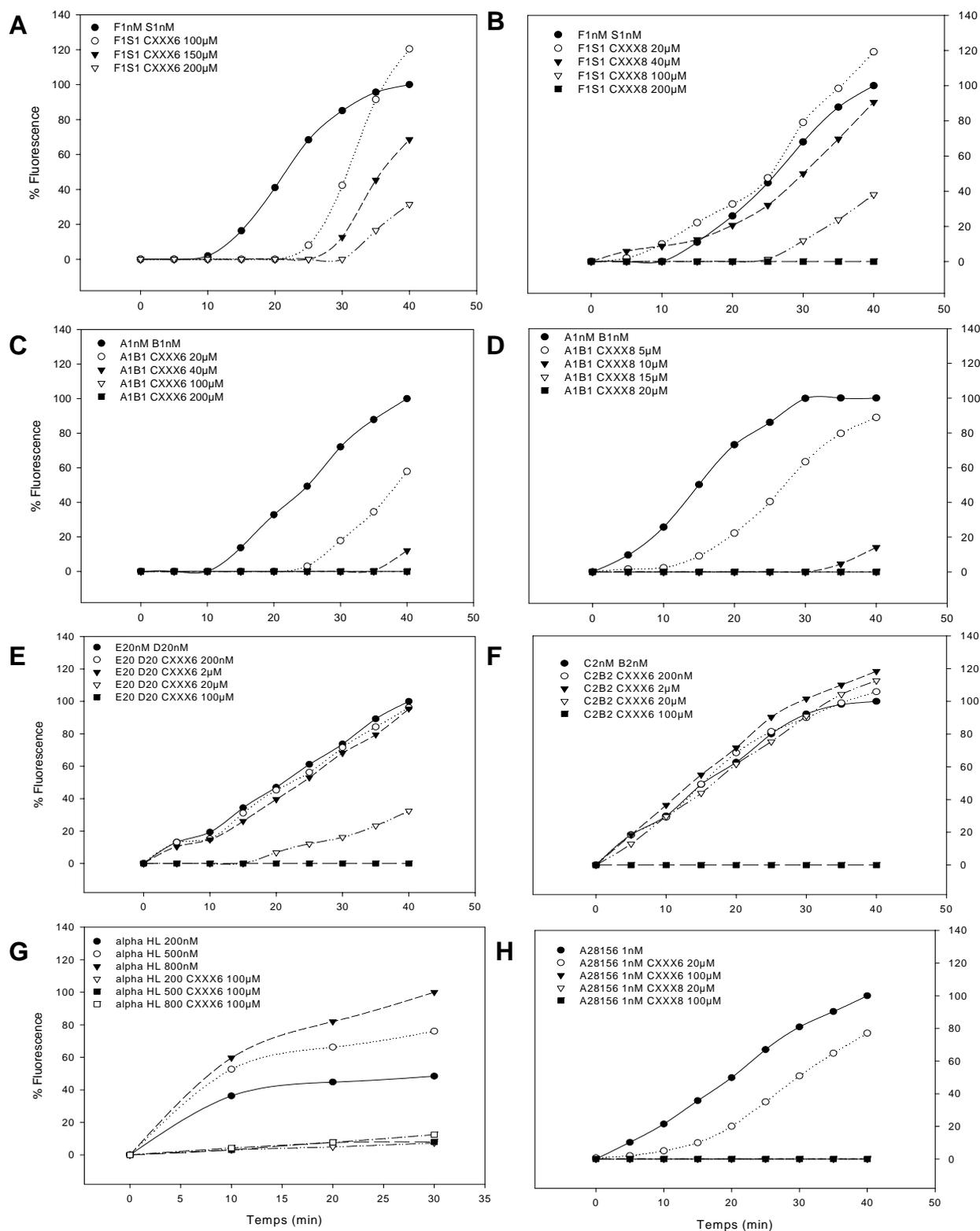


Figure 5.3 : Action des CXXX-6 et -8 sur la lyse des PN induites par différentes leucotoxines (A-G) ou par un hétérodimère de leucotoxine HlgA T28C~HlgB N156C (H), par cytométrie en flux.

B. Résultats

1. Etudes *in vitro*

1.1. Impact des CXXX-4, -6 et -8 sur l'action des toxines

1.1.1. Inhibition de l'hémolyse

Des essais préliminaires ont eu lieu sur les globules rouges de lapin (**Figure 5.2**). Ils ont porté notamment sur l'inhibition de l'hémolyse des GRL induite par la γ -hémolysine, par les CXXX-4, -6 et -8. Les GRL (0,1% v/v) sont incubés en présence de 1 nM HlgA-HlgB. Des concentrations croissantes de CXXX sont ajoutées au même moment. La lecture de l'hémolyse (DO_{415nm}) s'effectue après 30 minutes d'incubation.

Le CXXX-4 inhibe complètement l'action de 1 nM HlgA-HlgB à une concentration supérieure à 500 μ M. L'hémolyse est inhibée à 50% avec 100 μ M de CXXX-4. L'action du CXXX-6 est visible à plus faible concentration, puisque 2 μ M sont suffisants pour inhiber 100% d'activité de la toxine. Cinq cents nM sont nécessaires pour protéger 50 % des GRL de l'hémolyse. Le CXXX-8, quant à lui, inhibe 100 % de l'activité de la toxine à partir de 400 nM et 50 % à 280 nM (**Figure 5.2**).

1.1.2. Inhibition de la leucotoxicité

Nous avons ensuite évalué par cytométrie en flux l'action des CXXX-6 et -8 sur la formation de pores membranaires induite par différentes leucotoxines (**Figure 5.3, Table 5.1**). Les toxines étaient mises en présence de concentrations variables de CXXX (15 min) puis exposées à des PNs humains. La pénétration intra-cellulaire de l'éthidium au cours du temps, révélatrice de l'activité des pores formés par les toxines et décisive dans la lyse cellulaire, était déterminée. Les CXXX-6 ont une action inhibitrice de l'activité de la LPV (**Figure 5.3A, Table 5.1**) tandis que 200 μ M de CXXX-8 l'inactive totalement (**Figure 5.3B, Table 5.1**).

Tableau 5.1 : Concentrations (μM) de CXXX nécessaires pour obtenir une inhibition complète de l'activité des leucotoxines, 30 min après application (cf figure 5.3)

	PVL	HlgA-HlgB	LukE-LukD	HlgC-HlgB	α -hémolysine	Dimère A28B156
CXXX-6	200	100	100	100	100	100
CXXX-8	200	15	> 100	–	–	20

Tableau 5.2 : Intensité de la réponse inflammatoire observée au niveau de l'œil de lapin après injection intra-vitréenne de toxine sans et avec CXXX-6.

Aspect du fond d'œil (selon Nussenblatt)	Sans CXXX-6	Avec CXXX-6	
0 : fond d'œil normal	LPV	+++	0
+	LukE-LukD	+++	+++
++	HlgA-HlgB	++	+
+++	α -hémolysine	+++	0

La γ -hémolysine est plus sensible à l'action des CXXX. En effet, 20 μM de CXXX-6 diminuent fortement l'activité cytolytique induite par 1 nM de HlgA-HlgB et 100 μM de CXXX-6 l'inhibent complètement (**Figure 5.3C, Table 5.1**). La γ -hémolysine est déjà sensible à l'ajout de 5 μM de CXXX-8 et 15 μM de CXXX-8 bloquent toute activité cytolytique (**Figure 5.3D, Table 5.1**). LukE-LukD (**Figure 5.3E, Table 5.1**) et HlgC-HlgB (**Figure 5.3F, Table 5.1**) ont leur activité totalement bloquée par 100 μM de CXXX-6 et sont totalement insensibles au CXXX-8, pour les concentrations testées, de 10 à 200 μM (résultats non présentés). Des concentrations plus importantes de CXXX-8 doivent être testées pour estimer de façon plus précise la sensibilité de ces deux couples leucotoxiques au CXXX-8. L' α -hémolysine à 200 nM est inhibée à 100% par 100 μM de CXXX-6 (**Figure 5.3G, Table 5.1**). Les hétérodimères AB sont inhibés totalement par 100 μM de CXXX-6 et par 20 μM de CXXX-8 (**Figure 5.3H, Table 5.1**).

Nous observons qu'aux faibles concentrations de CXXX, une activité exacerbée des leucotoxines semble être possible (**Figure 5.3A et B**). Effectivement, la pente de la courbe suivant la formation du pore induite par 1 nM de PVL, en présence de 100 μM de CXXX (**Figure 5.3A**) est beaucoup plus forte que celle du témoin. Cela signifie que l'entrée d'éthidium par le pore est plus importante. Ceci par une taille des pores supérieure, ou bien par une plus grande quantité de pores formés. Cela peut signifier que les CXXX interagissent avec les monomères de leucotoxines et ainsi favorisent la formation du pore. Cela peut signifier également, qu'en se complexant dans l'édifice leucotoxique, les CXXX mènent à la formation d'un pore de taille plus importante.

Il existe donc une inhibition concentration-dépendante de l'activité de toutes les leucotoxines par les CXXX. Dans tous les cas, on parvient à une inhibition complète de la formation de pores pour toutes les leucotoxines durant les 30 minutes de la mesure. Cependant, les concentrations en CXXX nécessaires pour une inhibition complète varient selon les toxines entre 100 et 200 μM . De plus, le CXXX-6 semble plus actif que le CXXX-8 vis-à-vis de la majorité des leucotoxines testées.

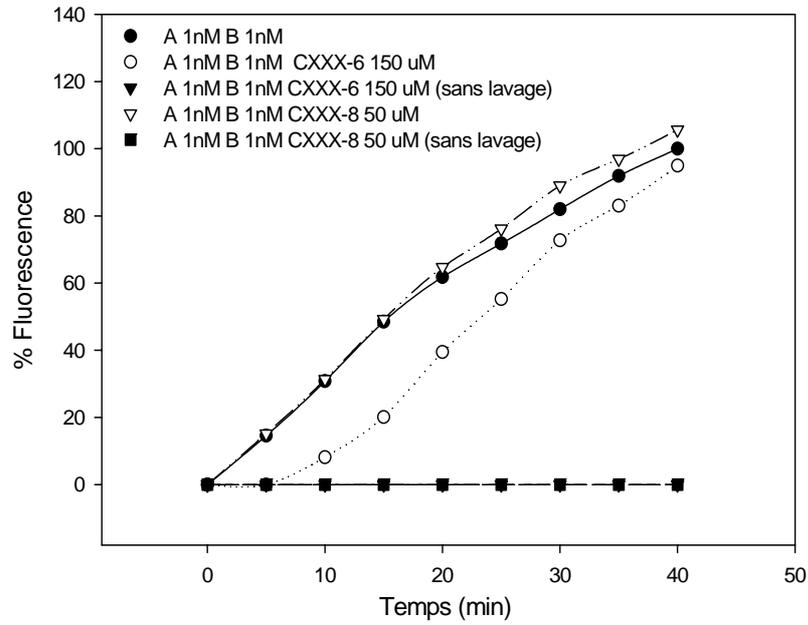


Figure 5.4 : Impact du lavage des PN sur l'inhibition de l'activité de la γ -hémolysine par les CXXX. Les cellules sont incubées 15 minutes avec les CXXX, lavées ou non dix fois à 1200 x g dans du tampon EGTA, puis la toxine est appliquée sur les cellules ; la lyse est suivie par cytométrie en flux.

1.2. Etude du mode d'action des CXXX

L'hypothèse d'une fixation compétitive sur le récepteur membranaire des leucotoxines a été envisagée pour expliquer l'action des CXXX. Afin de la vérifier, des PNs ont été incubés 10 min en présence de CXXX avant d'être lavés puis exposés aux leucotoxines. Une activité identique des leucotoxines est constatée sur ces cellules comparée à celle mesurée sur des cellules non exposées aux CXXX (**Figure 5.4**). Il semble donc que ces derniers n'agissent pas par un blocage des ligands membranaires aux leucotoxines.

Par ailleurs, l'impact des CXXX sur la fixation des composés S et F à la membrane des PNs a été étudiée (**Figure 5.5**). Des mutants fonctionnels de LukS-PV et de HlgB marqués à la fluorescéine ont été utilisés pour cela. On note une inhibition de la fixation des composés S par le CXXX-6 présent en excès molaire à 10^3 - 10^4 (**Figure 5.5A**). La fixation de HlgB est également diminuée (**Figure 5.5B**). Cependant, nous ne savons pas encore si ce phénomène s'explique par une action directe des CXXX sur HlgB ou si il est seulement dû à une interaction avec le composé S lorsque ce dernier est fixé à la membrane. Le fait que l'hétérodimère HlgA T28C~HlgB N156C ait également son activité perturbée par les CXXX (**Figure 5.3H**) nous permet plutôt d'envisager une action du CXXX avant fixation à la membrane cellulaire, c'est à dire au niveau des aminoacides en interaction avec le ligand membranaire. Si néanmoins le CXXX n'inhibe pas la fixation du dimère, alors son action pourrait se situer au niveau des résidus du composé S présent sur l'interface opposée à celle impliquée dans la formation du dimère, interface en relation avec un deuxième dimère.

2. Etude *in vivo* dans l'œil de lapin

Les données disponibles dans la littérature concluent sur une très faible antigénicité (Grote Gansey et coll., 1999) et une absence de toxicité (Da Silva et coll., 2004; Shahgaldian et coll., 2003) pour les quantités utilisées.

Ainsi, en s'appuyant sur les données obtenues *in vitro*, nous avons évalué l'action *in vivo* des CXXX sur l'activité des leucotoxines à la recherche d'une éventuelle action anti-inflammatoire et d'une possible toxicité. Le CXXX-6 a été choisi en fonction des résultats obtenus *in vitro*. Des CXXX testés, c'est en effet le plus apte à inhiber l'action des différentes leucotoxines.

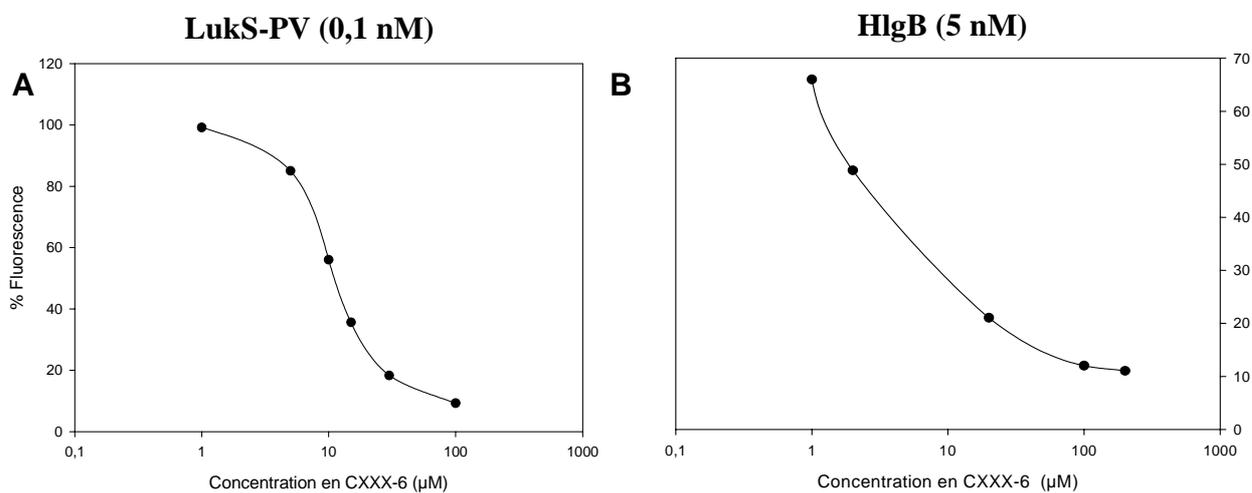


Figure 5.5 : Inhibition de la fixation de LukS-PV* (**A**) et de HlgB* (**B**) par des concentrations croissantes de CXXX-6.

A Les cellules sont mises en présence simultanément de 0,1 nM de LukS-PV marqué à la fluorescéine et de concentrations croissantes de CXXX-6.

B Les cellules sont incubées 15 minutes en présence de 20 nM de HlgA, puis mises en présence simultanément de 5 nM de HlgB marqué à la fluorescéine et de concentrations croissantes de CXXX-6.

Chacune des leucotoxines (LPV, LukE-LukD, HlgA-HlgB, HlgC-HlgB et α -hémolysine) a été injectée seule et en présence de CXXX-6 dans un rapport molaire environ deux mille fois supérieur dans les yeux de lapins. L'importance de la réponse inflammatoire et l'action du CXXX-6 ont été évaluées 24 et 48 heures après l'injection pour chaque toxine (**Figure 5.6**). Elles sont résumées dans le **tableau 5.2**.

En l'absence de CXXX, la réponse inflammatoire est particulièrement intense (vaisseaux principaux du fond rétinien non visualisés au fond d'œil) dès la 24^e heure pour la LPV, LukE-LukD et l' α -hémolysine, et un peu moins franche pour HlgA-HlgB (vaisseaux secondaires non visualisés), avant un retour à la normale en 96 heures. Il existe une inhibition complète de l'activité de la LPV, de HlgC-HlgB et de l' α -hémolysine par le CXXX-6 (fond d'œil normal). L'action de HlgA-HlgB semble également partiellement réduite (capillaires non visualisés). En revanche, le CXXX-6 n'a pas d'impact clinique apparent sur la réponse inflammatoire induite par LukE-LukD à ce rapport molaire. Nous avons pour le moment multiplié par cinq la concentration en CXXX-6 sans obtenir plus d'effet inhibiteur. Par ailleurs, il n'a été noté aucun signe clinique évocateur de toxicité des CXXX sur les yeux de lapin. En effet, les lapins « guéris » de l'activité inflammatoire des leucotoxines ne présentent aucun signe lésionnel en fond d'œil, et ne présentent pas de trouble apparent de l'orientation.

C. Discussion

Les résultats obtenus en cytométrie en flux montrent un pouvoir d'inhibition important des CXXX sur toutes les leucotoxines. Le CXXX-6 semble plus actif que le CXXX-8, en particulier sur LukE-LukD. Les concentrations nécessaires à une inhibition complète varient selon la leucotoxine étudiée, de 10 à 200 μ M. De manière intéressante, ces résultats sont, pour la plupart, reproductibles dans l'œil de lapin puisqu'il existe une inhibition complète et prolongée des signes inflammatoires induits par l'injection intra-vitréenne de leucotoxines par le CXXX-6. Seule l'activité de LukE-LukD n'a pas encore pu être inhibée *in vivo* malgré une majoration de l'excès molaire. Aucune explication évidente, en dehors d'une concentration encore insuffisante de CXXX, ne peut être apportée dans l'état actuel de nos connaissances.

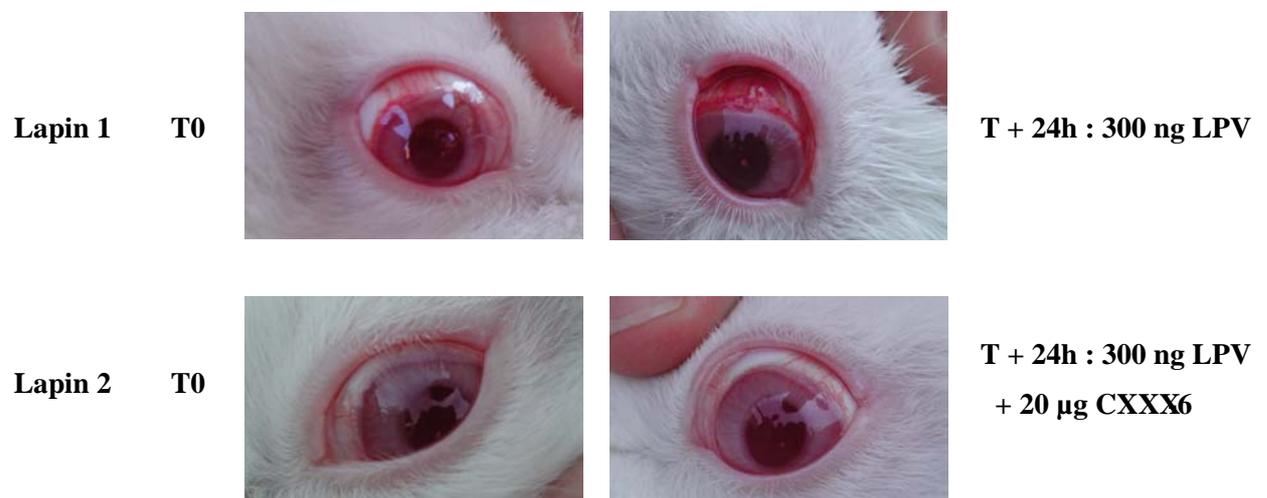


Figure 5.6 : Inhibition de l'activité pro-inflammatoire de la LPV par le CXXX-6 après injection dans le vitré de lapin.

Le mode d'action des CXXX doit être encore mieux déterminé. Alors que ces molécules ont été tout d'abord choisies dans le but de boucher physiquement le pore, elles ne semblent pas agir ainsi. Nos données semblent écarter une fixation compétitive au niveau du ligand membranaire des leucotoxines. En effet un simple lavage des cellules permet d'empêcher l'action du CXXX, donc il n'interagit pas de manière spécifique avec le ligand de la toxine (**Figure 5.4**). Ils bloquent manifestement l'étape initiale de fixation des leucotoxines à la membrane, c'est à dire l'insertion du composé S, par une interaction avec cette protéine. Leur action sur le composé F est moins certaine. En effet, l'action de l'hétérodimère peut être bloquée par le CXXX, donc une action unique et spécifique au niveau de l'interaction protéine-protéine du couple HlgA-HlgB et par extension composé S – composé F n'est guère envisageable.

La fixation des leucotoxines aux GRLs (résultats non figurés, données obtenues au laboratoire du Dr M. Dalla Serra, CNR-IBF, Povo, Italie) et aux PNs (**Figure 5.5**) est perturbée par les CXXX. Or, des expériences de BIACORE menées sur membranes synthétiques par la même équipe semblent exclure une fixation des CXXX avec une membrane simple et symétrique. Ainsi, les CXXX agiraient plus spécifiquement au niveau de l'interaction toxine / ligand membranaire.

Cependant, des résultats préliminaires obtenus sur GRL, montrent que les CXXX n'inhiberaient pas totalement la fixation de la toxine sur la membrane cellulaire. En effet, par immunoréplique, des oligomères de leucotoxines sont récupérés à partir de GRL incubés en présence de CXXX et de HlgA-HlgB. Dans ces conditions, aucune hémolyse n'est observée. Toutefois, HlgA présente une forte fixation aspécifique, ainsi il est possible que les oligomères observés ne soient que des agrégats ne conduisant pas à la formation d'un pore fonctionnel. On aurait donc, dans ce cas, une fixation des toxines, et une oligomérisation qui n'aboutirait pas à la formation du pore lytique.

Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer ce pouvoir inhibiteur : les CXXX pourraient former des agrégats et se fixer directement sur le composé S au niveau de son site de fixation à son ligand membranaire ; ils pourraient également s'assembler pour constituer un « cluster » autour du composé S empêchant toute interaction ; ils pourraient enfin modifier la configuration de la protéine qui deviendrait alors non fonctionnelle. Les CXXX pourraient également, suivant leurs propriétés physico-chimiques, s'associer de façon préférentielle avec certains aminoacides constituant les toxines. D'autres résultats acquis au laboratoire mettent en

avant l'importance des résidus lysine des toxines. En effet, une dérivatisation spécifique de ses lysines par la fluorescéine induit une baisse de l'activité, et à pH <5,5, les leucotoxines ne sont pas actives. A pH physiologique, le groupement amino en ϵ des lysines est sous forme ionisée (NH_3^+) ; on peut imaginer une interaction des SO_3^- des CXXX avec ces résidus.

Toutes ces hypothèses sont envisagées et sont actuellement à l'étude.

En conclusion, les CXXX constituent le premier groupe d'agents chimiques permettant d'inhiber l'activité de toute une famille de toxines comme les leucotoxines. Ces résultats apparaissent très prometteurs et encourageants. Ils sont cependant préliminaires et de nombreuses étapes restent nécessaires avant d'envisager une application concrète en thérapeutique.

Conclusion générale

Les PFTs sont des protéines produites par de nombreux organismes vivants, dont les bactéries. Elles peuvent être classées selon leur structure. Ainsi les α -PFTs (colicines, toxine diphtérique) forment des pores avec des hélices α hydrophobes et amphipathiques et les β -PFTs (VCC, alpha-toxine) forment des pores en tonneaux β . Au sein de cette dernière famille, les leucotoxines de *S. aureus* occupent une place particulière. Elles se distinguent de leurs consœurs dans le sens où elles sont composées de deux protéines. Les protéines de classe S se fixent tout d'abord sur le ligand membranaire, et la fixation des protéines de classe F conduit à la formation d'un pré-pore. Cette étape se caractérise par un influx calcique par des canaux préexistants. L'insertion transmembranaire des six boucles β induit la perméabilisation de la membrane de la cellule cible.

A l'aide de la mutagenèse dirigée de ces leucotoxines, **nous avons étudié les interactions entre les monomères** de classe S et ceux de classe F, en se basant sur les structures tridimensionnelles de LukF-PV, HlgB et celle récemment obtenue de LukS-PV.

La première étape a constitué en **l'identification du rôle de la partie N-terminale des leucotoxines**. Pour l'alpha-hémolysine, cette partie est cruciale dans la formation de l'heptamère. En effet, à la manière d'un lasso, elle interagit avec les deux monomères suivants. Cet « amino-latch », dont la structure est proche de celui de l'alpha-hémolysine, est beaucoup plus court pour les leucotoxines, et ainsi une conformation identique à celui de l'alpha-hémolysine n'apparaît pas évident.

Pour préciser cette hypothèse, nous avons tout d'abord testé des leucotoxines (LukS-PV et LukF-PV) fusionnées à la GST à leur partie N-terminale. Elles ont une fixation très voisine de leurs homologues sauvages, et le pore formé est de même diamètre. Ces leucotoxines conservent une bonne activité biologique, cependant la combinaison des deux protéines de fusion induit une activité de formation du pore plus faible que le couple sauvage. Ceci est sans doute dû à l'encombrement stérique des molécules de GST.

Dans un second temps, nous avons, par mutagenèse dirigée, réussi à contraindre la partie N-terminale de ces leucotoxines le long du core de la protéine. Les doubles mutants cystéine créés, en présence d'un agent oxydant, forment effectivement un pont disulfure entre cette

partie « amino-latch » et le sandwich β de la protéine. Ceci a pour conséquence une rigidification de la structure et une diminution limitée de la fixation des double mutants de classe F. Il est possible que la partie N-terminale subisse une légère modification conformationnelle durant la formation du pore, favorisant ainsi les interactions entre monomères. La récupération d'oligomères à partir de membranes traitées par les leucotoxines modifiées établit que, malgré les contraintes introduites, des interactions persistent entre les monomères de ces toxines.

Nous suggérons **un déroulement partiel de cette partie pour la formation de l'octamère**. Ceci souligne une **certaine hétérogénéité vis-à-vis de l' α -toxine pour laquelle cette partie est essentielle** à la formation de l'heptamère, bien que des données récentes relativisent cette affirmation.

L'identification des aminoacides en interaction entre HlgA et HlgB repose sur l'étude des structures tridimensionnelles de l' α -toxine, de HlgB et de LukS-PV. Nous avons envisagé de créer des hétérodimères stabilisés par un pont disulfure. Des résultats préliminaires impliquant HlgA T28, nous avons, par mutagenèse dirigée, produit des mutants cystéines de HlgB, qui, combinés avec HlgA T28C forment des hétérodimères. Un protocole issu de la chimie combinatoire a été mis au point pour réduire la formation d'homodimères et ainsi obtenir des hétérodimères les plus purs possibles. Ensuite, le comportement chromatographique d'un tel édifice chimique étant inconnu, une mise au point a été nécessaire pour purifier les hétérodimères. La combinaison d'une chromatographie d'interactions hydrophobes et d'une chromatographie échangeuse de cations est la technique retenue pour obtenir un hétérodimère pur. Sur les vingt combinaisons testées (deux mutants de HlgA et dix de HlgB), quatorze ont permis la synthèse d'hétérodimères.

Les six combinaisons ne donnant pas d'hétérodimère (HlgA T21C et T28C avec HlgB Y99C) ou un rendement insuffisant (HlgA T21C et T28C avec HlgB R150C et HlgB T155C) nous informent sur le fait que ces résidus ne sont probablement pas en interaction et que d'autres facteurs sont contraires à la dimérisation des protéines. Trois autres combinaisons conduisent à la formation d'hétérodimères inactifs (HlgA T21C~HlgB N103C et HlgA T28C~HlgB N103C) ou peu actif (HlgA T28C~HlgB Q104C). Cela souligne l'importance de la région triangle dans

le déroulement du « Stem ». Les positions 103 et 104 de HlgB sont effectivement situées dans cette région et les impliquer dans un pont disulfure avec l'autre partenaire leucotoxique est sans doute défavorable à un déroulement optimal de cette région en un pore fonctionnel. Une investigation de la structure d'un pré-pore bloqué à un certain niveau serait intéressante pour évaluer le rôle dynamique de la région du pore dans la structuration d'un pore fonctionnel. Les hétérodimères les plus actifs synthétisés sont HlgA T21C~HlgB T157C et HlgA T28C~HlgB N156C. Le pore formé par ces hétérodimères a des propriétés proches de celui formé par les toxines sauvages. On peut ainsi envisager **une interaction préférentielle entre HlgA T28 et HlgB N156, et entre HlgA T21 et HlgB T157.**

Des résultats non présentés mettent également en évidence l'importance de la position HlgA F53. Des hétérodimères actifs ont été obtenus en combinaison avec les résidus 154 à 158 de HlgB, mettant en évidence une souplesse de cette boucle impliquée dans les interactions entre les monomères.

La parfaite fonctionnalité biologique de ces hétérodimères, et leur absence de contamination par des monomères, permet de conclure sur **la parité du pore. L'hétérodimère peut être ainsi une sous-unité fonctionnelle du pore leucotoxique.** Ceci est confirmé par des résultats très récents. En utilisant un mutant créé durant ce projet (HlgB R155C), l'équipe dirigée par le Dr Mauro Dalla Serra a mis en évidence l'alternance des monomères S et F au sein du pore (Viero et coll., 2005).

Comme dans l'étude du rôle de l'extrémité N-terminale, nous avons été conduits à analyser la stœchiométrie des pores, en utilisant comme artifice un agent pontant de faible masse moléculaire (glutaraldéhyde) permettant de stabiliser les oligomères préparés à partir des membranes cellulaires traitées. Cela permet en partie de répondre à la controverse dans laquelle le pore a été proposé être constitué de six, sept ou huit unités. En effet, il est maintenant clair que **des octamères sont formés**, aussi bien à partir des protéines sauvages qu'à partir de mutants et d'hétérodimères. Cependant, notre protocole indiquant la présence d'hexamères, nous ne pouvons trancher encore sur une formulation plus fonctionnelle que l'autre de ces oligomères.

La résolution de la structure tridimensionnelle de l'hétérodimère HlgA T28C~HlgB N156C est en cours (Figure 4.1). Cela permettra d'obtenir davantage d'informations sur les réorganisations conformationnelles subies par les monomères au sein du dimère. La co-

crystallisation de HlgA avec HlgB permet d'obtenir la structure d'un deuxième composé de classe S, après la récente résolution de celle de LukS-PV : des informations utiles non seulement pour la communauté scientifique s'intéressant aux leucotoxines, mais également aux cristallographes car peu de protéines intégrales ont été cristallisées. Cela donnera ainsi des indices utiles à la résolution des structures d'autres protéines du même type, et combiné aux analyses de dynamique moléculaire en solution et de la modélisation, une approche vers la structure de l'oligomère pourra être tentée.

L'utilisation de l'hétérodimère en FRET pourrait permettre de résoudre la controverse sur la stœchiométrie du pore. En faisant varier la concentration, en présence de PNs, d'un lot d'hétérodimère marqué avec un fluorochrome donneur et d'un autre marqué avec un fluorochrome accepteur, une analyse quantitative des signaux pourrait confirmer la formation d'octamères.

L'identification des résidus en interaction sur la seconde interface est moins évidente.

Plusieurs tentatives n'ont pas permis d'obtenir de dimères actifs, de plus, le rendement de dimérisation était beaucoup plus faible que ceux de la première interface sans doute pour des raisons de rigidité structurale. L'utilisation d'un bras espaceur (composé de glycines par exemple), permettrait peut-être d'obtenir un meilleur rendement.

L'identification des aminoacides en interaction sur les deux interfaces permettrait d'envisager la reconstruction en solution d'un trimère, puis d'un pore entier, en présence ou en absence de détergent, comme ce fut le cas pour l' α -hémolysine. Ainsi, la cristallisation du pore constitué par les leucotoxines serait envisageable. **Cette identification permet également d'envisager la synthèse d'une molécule venant perturber l'association des monomères, inhibant ainsi leur activité cytotoxique.**

Les β -PFTs ont parfois de faibles homologies de séquences, mais des repliements très voisins comme c'est le cas pour HlgB et VCC. Nos résultats mettent en évidence une hétérogénéité dans le mode d'oligomérisation. Les monomères de la PFO doivent d'abord se fixer à la membrane pour pouvoir ensuite s'associer. La parfaite fonctionnalité de l'hétérodimère prouve qu'une fixation préalable des monomères au ligand membranaire n'est pas requise. **Nos résultats permettent de progresser dans la compréhension du fonctionnement dynamique des β -PFTs, dont on sait peu de choses.**

Enfin, la stabilisation de l'interaction des monomères des leucotoxines n'est que l'une des possibilités qui permettent d'envisager leurs applications dans différents secteurs des biotechnologies : stimulateurs de l'immunité, vecteurs de perméabilisation cellulaire, antitumoraux, biosenseurs.

Il sera également intéressant de se pencher sur **l'identification du ligand membranaire de ces leucotoxines**. La résolution structurale de HlgA et du dimère permettront certainement d'avoir plus d'informations sur ce ligand membranaire. La compréhension du rôle incontournable des lipides et de ligands plus spécifiques dans la fixation des leucotoxines de *Staphylococcus aureus* à leur cible est d'un intérêt évident en thérapeutique.

L'inhibition de l'activité des leucotoxines a constitué la dernière partie de ce travail. Les premiers résultats nous ont orientés vers des molécules polycycliques, les CXXX.

Les concentrations nécessaires à une inhibition complète varient selon la leucotoxine étudiée, de 10 à 200 μM , soit un excès moléculaire de 10000 à 200000. De manière intéressante, ces résultats sont, pour la plupart, reproductibles dans l'œil de lapin puisqu'il existe une inhibition complète et prolongée des signes inflammatoires induits par l'injection intra-vitréenne de leucotoxines par le CXXX-6.

Les CXXX étaient tout d'abord testés dans l'idée de boucher physiquement le pore, en interagissant avec les aminoacides de sa lumière. Les CXXX jouent effectivement un rôle inhibiteur dans l'activité des leucotoxines, mais pas de la manière envisagée initialement. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer ce pouvoir inhibiteur : les CXXX pourraient former des agrégats et se fixer directement sur le composé S au niveau de son site de fixation à son ligand membranaire ; ils pourraient également s'assembler pour constituer un « cluster » autour du composé S empêchant toute interaction ; ils pourraient enfin modifier la configuration de la protéine qui deviendrait alors non fonctionnelle. Les CXXX pourraient également, suivant leurs propriétés physico-chimiques, s'associer de façon préférentielle avec certains aminoacides constituant les toxines.

L'intérêt de ces molécules en thérapeutique **serait leur application potentielle comme adjuvants du traitement antibiotique** puisque ces inhibiteurs ne tueront pas la bactérie mais défavoriseront son potentiel de virulence.

La perspective de ce travail est de synthétiser et de **tester des CXXX aux propriétés plus inhibitrices** que ceux utilisés dans cette étude. La compréhension du mécanisme d'action de ces molécules sur les leucotoxines est un préalable à l'ingénierie de nouvelles molécules plus actives.

Références bibliographiques

- Abdel Ghani, E.M., Weis, S., Walev, I., Kehoe, M., Bhakdi, S., and Palmer, M. (1999) Streptolysin O: inhibition of the conformational change during membrane binding of the monomer prevents oligomerization and pore formation. *Biochemistry* **38**: 15204-15211.
- Abrami, L., Fivaz, M., Decroly, E., Seidah, N.G., Jean, F., Thomas, G., Leppla, S.H., Buckley, J.T., and van der Goot, F.G. (1998a) The pore-forming toxin proaerolysin is activated by furin. *J Biol Chem* **273**: 32656-32661.
- Abrami, L., Fivaz, M., Glauser, P.E., Parton, R.G., and van der Goot, F.G. (1998b) A pore-forming toxin interacts with a GPI-anchored protein and causes vacuolation of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **140**: 525-540.
- Abrami, L., Liu, S., Cosson, P., Leppla, S.H., and 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.
- Adedeji, A., and Gray, J.W. (2005) MRSA at an English children's hospital from 1998 to 2003. *Arch Dis Child* **90**: 720-723.
- Aktorics, K. (1994) Clostridial ADP-ribosylating toxins: effects on ATP and GTP-binding proteins. *Mol Cell Biochem* **138**: 167-176.
- Alouf, J. (2005) Introduction: the world of bacterial protein toxins. In *Microbial Toxins. Molecular and Cellular Biology*. Thomas Proft (ed).
- Anderluh, G., Dalla Serra, M., Viero, G., Guella, G., Macek, P., and Menestrina, G. (2003) Pore formation by equinatoxin II, a eukaryotic protein toxin, occurs by induction of nonlamellar lipid structures. *J Biol Chem* **278**: 45216-45223.
- Atkins, A., Wyborn, N.R., Wallace, A.J., Stillman, T.J., Black, L.K., Fielding, A.B., Hisakado, M., Artymiuk, P.J., and Green, J. (2000) Structure-function relationships of a novel bacterial toxin, hemolysin E. The role of alpha G. *J Biol Chem* **275**: 41150-41155.
- Avril, J.L., Dabernat, H., Denis, F., and Monteil, H. (1992) Chapitre I: Les staphylocoques. In *Bactériologie clinique*. Paris: ellipses, pp. 9-30.
- Baba-Moussa, L., Sanni, A., Dagnra, A.Y., Anagonou, S., Prince-David, M., Edoh, V., Befort, J.J., Prévost, G., and Monteil, H. (1999a) Approche épidémiologique de l'antibiorésistance et de la production de leucotoxines par les souches de *Staphylococcus aureus* isolées en Afrique de l'Ouest. *Med. Mal. Infect.* **29**: 689-696.
- Baba-Moussa, L., Werner, S., Colin, D.A., Mourey, L., Pédelacq, J.D., Samama, J.P., Sanni, A., Monteil, H., and Prévost, G. (1999b) Decoupling the Ca(2+)-activation from the pore-forming function of the bi-component Panton-Valentine leucocidin in human PMNs. *FEBS Lett* **461**: 280-286.
- Bashford, C.L., Alder, G.M., Fulford, L.G., Korchev, Y.E., Kovacs, E., MacKinnon, A., Pederzoli, C., and Pasternak, C.A. (1996) Pore formation by *S. aureus* alpha-toxin in liposomes and planar lipid bilayers: effects of nonelectrolytes. *J Membr Biol* **150**: 37-45.
- Bayley, H., and Cremer, P.S. (2001) Stochastic sensors inspired by biology. *Nature* **413**: 226-230.

- Belmonte, G., Cescatti, L., Ferrari, B., Nicolussi, T., Ropele, M., and Menestrina, G.** (1987) Pore formation by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin in lipid bilayers. Dependence upon temperature and toxin concentration. *Eur Biophys J* **14**: 349-358.
- Bhakdi, S., Fussle, R., and Trantum-Jensen, J.** (1981) Staphylococcal alpha-toxin: oligomerization of hydrophilic monomers to form amphiphilic hexamers induced through contact with deoxycholate detergent micelles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 5475-5479.
- Bhakdi, S., Muhly, M., Mannhardt, U., Hugo, F., Klapettek, K., Mueller-Eckhardt, C., and Roka, L.** (1988) Staphylococcal alpha toxin promotes blood coagulation via attack on human platelets. *J Exp Med* **168**: 527-542.
- Bhakdi, S., Muhly, M., Korom, S., and Hugo, F.** (1989) Release of interleukin-1 beta associated with potent cytotoxic action of staphylococcal alpha-toxin on human monocytes. *Infect Immun* **57**: 3512-3519.
- Bonev, B.B., Gilbert, R.J., Andrew, P.W., Byron, O., and Watts, A.** (2001) Structural analysis of the protein/lipid complexes associated with pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. *J Biol Chem* **276**: 5714-5719.
- Braha, O., Walker, B., Cheley, S., Kasianowicz, J.J., Song, L., Gouaux, J.E., and Bayley, H.** (1997) Designed protein pores as components for biosensors. *Chem Biol* **4**: 497-505.
- Bronner, S., Stoessel, P., Gravet, A., Monteil, H., and Prévost, G.** (2000) Variable expressions of *Staphylococcus aureus* bicomponent leucotoxins semiquantified by competitive reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol* **66**: 3931-3938.
- Bronner, S., Monteil, H., and Prévost, G.** (2004) Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. *FEMS Microbiol Rev* **28**: 183-200.
- Buerke, M., Sibelius, U., Grandel, U., Buerke, U., Grimminger, F., Seeger, W., Meyer, J., and Darius, H.** (2002) *Staphylococcus aureus* alpha toxin mediates polymorphonuclear leukocyte-induced vasoconstriction and endothelial dysfunction. *Shock* **17**: 30-35.
- Chang, C.Y., Niblack, B., Walker, B., and Bayley, H.** (1995) A photogenerated pore-forming protein. *Chem Biol* **2**: 391-400.
- Cheley, S., Malghani, M.S., Song, L., Hobaugh, M., Gouaux, J.E., Yang, J., and Bayley, H.** (1997) Spontaneous oligomerization of a staphylococcal alpha-hemolysin conformationally constrained by removal of residues that form the transmembrane beta-barrel. *Protein Eng* **10**: 1433-1443.
- Chen, J., and Stites, W.E.** (2001) Packing is a key selection factor in the evolution of protein hydrophobic cores. *Biochemistry* **40**: 15280-15289.
- Choe, S., Bennett, M.J., Fujii, G., Curmi, P.M., Kantardjieff, K.A., Collier, R.J., and Eisenberg, D.** (1992) The crystal structure of diphtheria toxin. *Nature* **357**: 216-222.
- Choorit, W., Kaneko, J., Muramoto, K., and Kamio, Y.** (1995) Existence of a new protein component with the same function as the LukF component of leukocidin or gamma-hemolysin and its gene in *Staphylococcus aureus* P83. *FEBS Lett* **357**: 260-264.
- Cleveland, M.V., Slatin, S., Finkelstein, A., and Levinthal, C.** (1983) Structure-function relationships for a voltage-dependent ion channel: properties of COOH-terminal fragments of colicin E1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**: 3706-3710.

- Colin, D.A., Mazurier, I., Sire, S., and Finck-Barbançon, V.** (1994) Interaction of the two components of leukocidin from *Staphylococcus aureus* with human polymorphonuclear leukocyte membranes: sequential binding and subsequent activation. *Infect Immun* **62**: 3184-3188.
- Colin, D.A., and Monteil, H.** (2003) Control of the oxidative burst of human neutrophils by staphylococcal leukotoxins. *Infect Immun* **71**: 3724-3729.
- Collier, R.J.** (1975) Diphtheria toxin: mode of action and structure. *Bacteriol Rev* **39**: 54-85.
- Colston, M.J., Hailes, H.C., Stavropoulos, E., Hervé, A.C., Hervé, G., Goodworth, K.J., Hill, A.M., Jenner, P., Hart, P.D., and Tascon, R.E.** (2004) Antimycobacterial calixarenes enhance innate defense mechanisms in murine macrophages and induce control of *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Infect Immun* **72**: 6318-6323.
- Comai, M., Dalla Serra, M., Coraiola, M., Werner, S., Colin, D.A., Monteil, H., Prévost, G., and Menestrina, G.** (2002) Protein engineering modulates the transport properties and ion selectivity of the pores formed by staphylococcal gamma-haemolysins in lipid membranes. *Mol Microbiol* **44**: 1251-1267.
- Cooney, J., Kienle, Z., Foster, T.J., and O'Toole, P.W.** (1993) The gamma-hemolysin locus of *Staphylococcus aureus* comprises three linked genes, two of which are identical to the genes for the F and S components of leukocidin. *Infect Immun* **61**: 768-771.
- Coraiola, M., Viero, G., Comai, M., Potrich, C., Ferreras, M., Baba-Moussa, L., Colin, D.A., Prévost, G., Menestrina, G., Bhadki, S., and Dalla Serra, M.** (2005) *Staphylococcus aureus* bicomponent γ -hemolysins, HlgA, HlgB, and HlgC, can form mixed pores containing all components. *J Chem Inf Model* **In press**.
- Cornforth, J.W., Hart, P.D., Nicholls, G.A., Rees, R.J., and Stock, J.A.** (1955) Antituberculous effects of certain surface-active polyoxyethylene ethers. *Br J Pharmacol Chemother* **10**: 73-88.
- Couppié, P., Cribier, B., and Prévost, G.** (1994) Leukocidin from *Staphylococcus aureus* and cutaneous infections: an epidemiologic study. *Arch Dermatol* **130**: 1208-1209.
- Couppié, P., Hommel, D., Prévost, G., Godart, M.C., Moreau, B., Sainte-Marie, D., Peneau, C., Hulin, A., Monteil, H., and Pradinaud, R.** (1997) Septicémie à *Staphylococcus aureus*, furoncle et leucocidine de Panton et Valentine leukocidin: 3 observations. *Ann Dermatol Venereol* **124**: 684-686.
- Cowell, S., Aschauer, W., Gruber, H.J., Nelson, K.L., and Buckley, J.T.** (1997) The erythrocyte receptor for the channel-forming toxin aerolysin is a novel glycosylphosphatidylinositol-anchored protein. *Mol Microbiol* **25**: 343-350.
- Cribier, B., Finck-Barbançon, V., Prévost, G., Jaulhac, B., and Piémont, Y.** (1992a) *Staphylococcus aureus* cutaneous infections: role of leucocidin in an experimental animal model. *J. Invest. Dermatol.* **98**: 835.
- Cribier, B., Prévost, G., Couppié, P., Finck-Barbançon, V., Grosshans, E., and Piémont, Y.** (1992b) *Staphylococcus aureus* leukocidin: a new virulence factor in cutaneous infections? An epidemiological and experimental study. *Dermatology* **185**: 175-180.
- Czajkowsky, D.M., Sheng, S., and Shao, Z.** (1998) Staphylococcal alpha-hemolysin can form hexamers in phospholipid bilayers. *J Mol Biol* **276**: 325-330.
- Da Silva, E., Shahgaldian, P., and Coleman, A.W.** (2004) Haemolytic properties of some water-soluble *para*-sulphonato-calix-[*n*]-arenes. *Int J Pharm* **273**: 57-62.

- Dajcs, J.J., Austin, M.S., Sloop, G.D., Moreau, J.M., Hume, E.B., Thompson, H.W., McAleese, F.M., Foster, T.J., and O'Callaghan, R.J.** (2002) Corneal pathogenesis of *Staphylococcus aureus* strain Newman. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**: 1109-1115.
- Dalla Serra, M., Coraiola, M., Viero, G., Comai, M., Potrich, C., Ferreras, M., Baba-Moussa, L., Colin, D.A., Menestrina, G., Bhadki, S., and Prévost, G.** (2005) Staphylococcus aureus bi-component gamma-hemolysins, HlgA, HlgB and HlgC can form mixed pores containing all components. *Journal of Chemical Information and Modelling* in press.
- Diep, D.B., Lawrence, T.S., Ausio, J., Howard, S.P., and Buckley, J.T.** (1998) Secretion and properties of the large and small lobes of the channel-forming toxin aerolysin. *Mol Microbiol* **30**: 341-352.
- Droogmans, G., Maertens, C., Prenen, J., and Nilius, B.** (1999) Sulphonic acid derivatives as probes of pore properties of volume-regulated anion channels in endothelial cells. *Br J Pharmacol* **128**: 35-40.
- Duché, D., Parker, M.W., Gonzalez-Manas, J.M., Pattus, F., and Baty, D.** (1994) Uncoupled steps of the colicin A pore formation demonstrated by disulfide bond engineering. *J Biol Chem* **269**: 6332-6339.
- 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., and Vande Woude, G.F.** (1998) Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor. *Science* **280**: 734-737.
- Dufourcq, J., Castano, S., and Talbot, J.C.** (1999) δ -toxin, related haemolytic toxins and peptidic analogues. In *The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins*. J.E. Alouf and J.H. Freer (eds). London San Diego Boston New York Sydney Tokyo Toronto: Academic Press, pp. 386-401.
- Fernandez, L.E., Perez, C., Segovia, L., Rodriguez, M.H., Gill, S.S., Bravo, A., and Soberon, M.** (2005) Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* binds its receptor in *Aedes aegypti* mosquito larvae through loop alpha-8 of domain II. *FEBS Lett* **579**: 3508-3514.
- Ferreras, M., Hoper, F., Dalla Serra, M., Colin, D.A., Prévost, G., and Menestrina, G.** (1998) The interaction of *Staphylococcus aureus* bi-component gamma-hemolysins and leucocidins with cells and lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* **1414**: 108-126.
- Fielding, C.J., and Fielding, P.E.** (2003) Relationship between cholesterol trafficking and signaling in rafts and caveolae. *Biochim Biophys Acta* **1610**: 219-228.
- Finck-Barbançon, V., Prévost, G., and Piémont, Y.** (1991) Improved purification of leukocidin from *Staphylococcus aureus* and toxin distribution among hospital strains. *Res Microbiol* **142**: 75-85.
- Forti, S., and Menestrina, G.** (1989) Staphylococcal alpha-toxin increases the permeability of lipid vesicles by cholesterol- and pH-dependent assembly of oligomeric channels. *Eur J Biochem* **181**: 767-773.
- Fowler, V.G., Jr., Miro, J.M., Hoen, B., Cabell, C.H., Abrutyn, E., Rubinstein, E., Corey, G.R., Spelman, D., Bradley, S.F., Barsic, B., Pappas, P.A., Anstrom, K.J., Wray, D., Fortes, C.Q., Anguera, I., Athan, E., Jones, P., van der Meer, J.T., Elliott, T.S., Levine, D.P., and Bayer, A.S.** (2005) *Staphylococcus aureus* endocarditis: a consequence of medical progress. *Jama* **293**: 3012-3021.

- Frank, D.W., and Iglewski, B.H.** (1988) Kinetics of *toxA* and *regA* mRNA accumulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **170**: 4477-4483.
- Gastmeier, P., Sohr, D., Geffers, C., Behnke, M., Daschner, F., and Ruden, H.** (2005) Mortality risk factors with nosocomial *Staphylococcus aureus* infections in intensive care units: results from the German Nosocomial Infection Surveillance System (KISS). *Infection* **33**: 50-55.
- Gauduchon, V., Werner, S., Prévost, G., Monteil, H., and Colin, D.A.** (2001) Flow cytometric determination of Panton-Valentine leucocidin S component binding. *Infect Immun* **69**: 2390-2395.
- Gebauer, S.** (1999) Calixarene - Eigenschaften und Anwendungen in der Analytik in Calixaren-Kieselgele: Unterschiedlich große Makrocyclen als chromatographische Selektoren in der HPLC. In *Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Halle-Wittenberg*: Martin-Luther-Universität, pp. 136.
- Gerber, D., and Shai, Y.** (2000) Insertion and organization within membranes of the delta-endotoxin pore-forming domain, helix 4-loop-helix 5, and inhibition of its activity by a mutant helix 4 peptide. *J Biol Chem* **275**: 23602-23607.
- Gerber, D., and Shai, Y.** (2003) Delta-endotoxin mode of action. In *Pore-forming peptides and protein toxins*. G. Menestrina, M. Dalla Serra and P. Lazarovici (eds). London and New York: Taylor and Francis, pp. 76-89.
- Gilbert, R.J.** (2005) Inactivation and activity of cholesterol-dependent cytolysins: what structural studies tell us. *Structure (Camb)* **13**: 1097-1106.
- Gill, S.S., Cowles, E.A., and Francis, V.** (1995) Identification, isolation, and cloning of a *Bacillus thuringiensis* CryIAC toxin-binding protein from the midgut of the lepidopteran insect *Heliothis virescens*. *J Biol Chem* **270**: 27277-27282.
- Gillet, Y., Issartel, B., Vanhems, P., Fournet, J.C., Lina, G., Bes, M., Vandenesch, F., Piémont, Y., Brousse, N., Floret, D., and Etienne, J.** (2002) Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet* **359**: 753-759.
- Gladstone, G.P., and Van Heyningen, W.E.** (1957) Staphylococcal leucocidins. *Br J Exp Pathol* **38**: 123-137.
- Gladstone, G.P., Mudd, S., Hochstein, H.D., and Lenhart, N.A.** (1962) The assay of anti-staphylococcal leucocidal components (F and S) in human serum. *Br J Exp Pathol* **43**: 295-312.
- Gomez, I., Sanchez, J., Miranda, R., Bravo, A., and Soberon, M.** (2002) Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix alpha-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Lett* **513**: 242-246.
- Gordon, V.M., Klimpel, K.R., Arora, N., Henderson, M.A., and Leppla, S.H.** (1995) Proteolytic activation of bacterial toxins by eukaryotic cells is performed by furin and by additional cellular proteases. *Infect Immun* **63**: 82-87.
- Gouaux, J.E., Braha, O., Hobaugh, M.R., Song, L., Cheley, S., Shustak, C., and Bayley, H.** (1994) Subunit stoichiometry of staphylococcal alpha-hemolysin in crystals and on membranes: a heptameric transmembrane pore. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 12828-12831.

- Gravet, A., Colin, D.A., Keller, D., Girardot, R., Monteil, H., and Prévost, G.** (1998) Characterization of a novel structural member, LukE-LukD, of the bi-component staphylococcal leucotoxins family. *FEBS Lett* **436**: 202-208.
- Gravet, A., Rondeau, M., Harf-Monteil, C., Grunenberger, F., Monteil, H., Scheftel, J.M., and Prévost, G.** (1999) Predominant *Staphylococcus aureus* isolated from antibiotic-associated diarrhea is clinically relevant and produces enterotoxin A and the bicomponent toxin LukE-lukD. *J Clin Microbiol* **37**: 4012-4019.
- Gravet, A., Couppié, P., Meunier, O., Clyti, E., Moreau, B., Pradinaud, R., Monteil, H., and Prévost, G.** (2001) *Staphylococcus aureus* isolated in cases of impetigo produces both epidermolysin A or B and LukE-LukD in 78% of 131 retrospective and prospective cases. *J Clin Microbiol* **39**: 4349-4356.
- Gray, G.S., and Kehoe, M.** (1984) Primary sequence of the alpha-toxin gene from *Staphylococcus aureus* wood 46. *Infect Immun* **46**: 615-618.
- Green, M.J., and Buckley, J.T.** (1990) Site-directed mutagenesis of the hole-forming toxin aerolysin: studies on the roles of histidines in receptor binding and oligomerization of the monomer. *Biochemistry* **29**: 2177-2180.
- Grinberg, L.N., Newmark, H., Kitrossky, N., Rahamim, E., Chevion, M., and Rachmilewitz, E.A.** (1997) Protective effects of tea polyphenols against oxidative damage to red blood cells. *Biochem Pharmacol* **54**: 973-978.
- Grote Gansey, M.H., de Haan, A.S., Bos, E.S., Verboom, W., and Reinhoudt, D.N.** (1999) Conjugation, immunoreactivity, and immunogenicity of calix[4]arenes; model study to potential calix[4]arene-based Ac³⁺ chelators. *Bioconjug Chem* **10**: 613-623.
- Gu, L.Q., Braha, O., Conlan, S., Cheley, S., and Bayley, H.** (1999) Stochastic sensing of organic analytes by a pore-forming protein containing a molecular adapter. *Nature* **398**: 686-690.
- Guillet, V., Keller, D., Prévost, G., and Mourey, L.** (2004a) Crystallization and preliminary crystallographic data of a leucotoxin S component from *Staphylococcus aureus*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**: 310-313.
- Guillet, V., Roblin, P., Werner, S., Coraiola, M., Menestrina, G., Monteil, H., Prévost, G., and Mourey, L.** (2004b) Crystal structure of leucotoxin S component: new insight into the Staphylococcal beta-barrel pore-forming toxins. *J Biol Chem* **279**: 41028-41037.
- Guyonnet, F., and Plommet, M.** (1970) [Gamma hemolysin of *Staphylococcus aureus*: purification and properties]. *Ann Inst Pasteur (Paris)* **118**: 19-33.
- Habeeb, A.F.S.A.** (1972) Reaction of protein sulfhydryl groups with Ellman's reagent. *Methods enzymol* **25**: 457-464.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., and Jakoby, W.B.** (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* **249**: 7130-7139.
- Hall, R.H., and Drasar, B.S.** (1990) *Vibrio cholerae* HlyA hemolysin is processed by proteolysis. *Infect Immun* **58**: 3375-3379.
- Harris, J.R., Bhakdi, S., Meissner, U., Scheffler, D., Bittman, R., Li, G., Zitzer, A., and Palmer, M.** (2002) Interaction of the *Vibrio cholerae* cytolysin (VCC) with cholesterol, some cholesterol esters, and cholesterol derivatives: a TEM study. *J Struct Biol* **139**: 122-135.

- Hart, P.D., Armstrong, J.A., and Brodaty, E.** (1996) Calixarenes with host-mediated potency in experimental tuberculosis: further evidence that macrophage lipids are involved in their mechanism of action. *Infect Immun* **64**: 1491-1493.
- Hazes, B., and Dijkstra, B.W.** (1988) Model building of disulfide bonds in proteins with known three-dimensional structure. *Protein Eng* **2**: 119-125.
- Hensler, T., Köller, M., Prévost, G., Piémont, Y., and König, W.** (1994a) GTP-binding proteins are involved in the modulated activity of human neutrophils treated with the Panton-Valentine leukocidin from *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **62**: 5281-5289.
- Hensler, T., König, B., Prévost, G., Piémont, Y., Köller, M., and König, W.** (1994b) Leukotriene B4 generation and DNA fragmentation induced by leukocidin from *Staphylococcus aureus*: protective role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and G-CSF for human neutrophils. *Infect Immun* **62**: 2529-2535.
- Honjo, T., Nishizuka, Y., and Hayaishi, O.** (1969) Adenosine diphosphoribosylation of aminoacyl transferase II by diphtheria toxin. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **34**: 603-608.
- Hotze, E.M., Wilson-Kubalek, E.M., Rossjohn, J., Parker, M.W., Johnson, A.E., and Tweten, R.K.** (2001a) Arresting pore formation of a cholesterol-dependent cytolysin by disulfide trapping synchronizes the insertion of the transmembrane beta-sheet from a prepore intermediate. *J Biol Chem* **276**: 8261-8268.
- Hotze, E.M., Wilson-Kubalek, E.M., Rossjohn, J., Parker, M.W., Johnson, A.E., and Tweten, R.K.** (2001b) Arresting pore formation of a cholesterol-dependent cytolysin by disulfide trapping synchronizes the insertion of the transmembrane β -sheet from a prepore intermediate. *J Biol Chem* **276**: 8261-8268.
- Hotze, E.M., Heuck, A.P., Czajkowsky, D.M., Shao, Z., Johnson, A.E., and Tweten, R.K.** (2002) Monomer-monomer interactions drive the prepore to pore conversion of a beta-barrel-forming cholesterol-dependent cytolysin. *J Biol Chem* **277**: 11597-11605.
- Howard, S.P., and Buckley, J.T.** (1985) Activation of the hole-forming toxin aerolysin by extracellular processing. *J Bacteriol* **163**: 336-340.
- Howard, S.P., Meiklejohn, H.G., Shivak, D., and Jahagirdar, R.** (1996) A TonB-like protein and a novel membrane protein containing an ATP-binding cassette function together in exotoxin secretion. *Mol Microbiol* **22**: 595-604.
- Hunter, S.E., Brown, J.E., Oyston, P.C., Sakurai, J., and Titball, R.W.** (1993) Molecular genetic analysis of beta-toxin of *Clostridium perfringens* reveals sequence homology with alpha-toxin, gamma-toxin, and leukocidin of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **61**: 3958-3965.
- Jayasinghe, L., and Bayley, H.** (2005) The leukocidin pore: Evidence for an octamer with four LukF subunits and four LukS subunits alternating around a central axis. *Protein Sci* **14**: 2550-2561.
- Jayasinghe, L., Miles, G., and Bayley, H.** (2005) Role of the amino latch of staphylococcal alpha-hemolysin in pore formation: a co-operative interaction between the N terminus and position 217. *J Biol Chem*.
- Jiang, J.X., and London, E.** (1990) Involvement of denaturation-like changes in Pseudomonas exotoxin a hydrophobicity and membrane penetration determined by characterization of pH and thermal transitions. Roles of two distinct conformationally altered states. *J Biol Chem* **265**: 8636-8641.

- Jonas, D., Walev, I., Berger, T., Liebetrau, M., Palmer, M., and Bhakdi, S.** (1994) Novel path to apoptosis: small transmembrane pores created by staphylococcal alpha-toxin in T lymphocytes evoke internucleosomal DNA degradation. *Infect Immun* **62**: 1304-1312.
- Julianelle, L.A.** (1922) Studies of hemolytic staphylococci. Hemolytic activity - biochemical reactions - serologic reactions. *J. Infect. Dis.* **31**: 256-284.
- Jursch, R., Hildebrand, A., Hobom, G., Trantum-Jensen, J., Ward, R., Kehoe, M., and Bhakdi, S.** (1994) Histidine residues near the N terminus of staphylococcal alpha-toxin as reporters of regions that are critical for oligomerization and pore formation. *Infect Immun* **62**: 2249-2256.
- Kamio, Y., Rahman, A., Nariya, H., Ozawa, T., and Izaki, K.** (1993) The two Staphylococcal bi-component toxins, leukocidin and gamma-hemolysin, share one component in common. *FEBS Lett* **321**: 15-18.
- Kaneko, J., Muramoto, K., and Kamio, Y.** (1997) Gene of LukF-PV-like component of Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* P83 is linked with lukM. *Biosci Biotechnol Biochem* **61**: 541-544.
- Kaneko, J., Kimura, T., Narita, S., Tomita, T., and Kamio, Y.** (1998) Complete nucleotide sequence and molecular characterization of the temperate staphylococcal bacteriophage phiPVL carrying Panton-Valentine leukocidin genes. *Gene* **215**: 57-67.
- Kasianowicz, J.J., and Bezrukov, S.M.** (1995) Protonation dynamics of the alpha-toxin ion channel from spectral analysis of pH-dependent current fluctuations. *Biophys J* **69**: 94-105.
- Katsumi, H., Tomita, T., Kaneko, J., and Kamio, Y.** (1999) Vitronectin and its fragments purified as serum inhibitors of *Staphylococcus aureus* gamma-hemolysin and leukocidin, and their specific binding to the hlg2 and the LukS components of the toxins. *FEBS Lett* **460**: 451-456.
- Kawate, T., and Gouaux, E.** (2003) Arresting and releasing Staphylococcal alpha-hemolysin at intermediate stages of pore formation by engineered disulfide bonds. *Protein Sci* **12**: 997-1006.
- Köller, M., Hensler, T., König, B., Prévost, G., Alouf, J., and König, W.** (1993) Induction of heat-shock proteins by bacterial toxins, lipid mediators and cytokines in human leukocytes. *Zentralbl Bakteriol* **278**: 365-376.
- Koni, P.A., and Ellar, D.J.** (1994) Biochemical characterization of *Bacillus thuringiensis* cytolytic delta-endotoxins. *Microbiology* **140** (Pt 8): 1869-1880.
- König, B., Köller, M., Prévost, G., Piémont, Y., Alouf, J.E., Schreiner, A., and König, W.** (1994) Activation of human effector cells by different bacterial toxins (leukocidin, alveolysin, and erythrogenic toxin A): generation of interleukin-8. *Infect Immun* **62**: 4831-4837.
- König, B., Prévost, G., Piémont, Y., and König, W.** (1995) Effects of *Staphylococcus aureus* leukocidins on inflammatory mediator release from human granulocytes. *J Infect Dis* **171**: 607-613.
- Krasilnikov, O.V., Sabirov, R.Z., Ternovsky, V.I., Merzliak, P.G., and Muratkhodjaev, J.N.** (1992) A simple method for the determination of the pore radius of ion channels in planar lipid bilayer membranes. *FEMS Microbiol Immunol* **5**: 93-100.
- Krasilnikov, O.V., Merzlyak, P.G., Yuldasheva, L.N., Rodrigues, C.G., Bhakdi, S., and Valeva, A.** (2000) Electrophysiological evidence for heptameric stoichiometry of ion

- channels formed by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin in planar lipid bilayers. *Mol Microbiol* **37**: 1372-1378.
- Krause, K.H., Fivaz, M., Monod, A., and van der Goot, F.G.** (1998) Aerolysin induces G-protein activation and Ca²⁺ release from intracellular stores in human granulocytes. *J Biol Chem* **273**: 18122-18129.
- Krishnasastri, M., Walker, B., Braha, O., and Bayley, H.** (1994) Surface labeling of key residues during assembly of the transmembrane pore formed by staphylococcal alpha-hemolysin. *FEBS Lett* **356**: 66-71.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lakey, J.H., Duché, D., Gonzalez-Manas, J.M., Baty, D., and Pattus, F.** (1993) Fluorescence energy transfer distance measurements. The hydrophobic helical hairpin of colicin A in the membrane bound state. *J Mol Biol* **230**: 1055-1067.
- Lakey, J.H., and Slatin, S.L.** (2001) Pore-forming colicins and their relatives. In *Current Topics in Microbiology and Immunology: Pore-forming toxins*. Vol. 257. F. G. van der Goot (ed). Berlin: Springer Verlag.
- Lesieur, C., Vecsey-Semjen, B., Abrami, L., Fivaz, M., and Gisou van der Goot, F.** (1997) Membrane insertion: The strategies of toxins (review). *Mol Membr Biol* **14**: 45-64.
- Li, J., Koni, P.A., and Ellar, D.J.** (1996) Structure of the mosquitocidal delta-endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. *J Mol Biol* **257**: 129-152.
- Lina, G., Piémont, Y., Godail-Gamot, F., Bès, M., Peter, M.O., Gauduchon, V., Vandenesch, F., and Etienne, J.** (1999) Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis* **29**: 1128-1132.
- Ludwig, A., Tengler, C., Bauer, S., Bubert, A., Benz, R., Mollenkopf, H.J., and Goebel, W.** (1995) SlyA, a regulatory protein from *Salmonella typhimurium*, induces a haemolytic and pore-forming protein in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **249**: 474-486.
- MacKenzie, C.R., Hirama, T., and Buckley, J.T.** (1999) Analysis of receptor binding by the channel-forming toxin aerolysin using surface plasmon resonance. *J Biol Chem* **274**: 22604-22609.
- Mahoudeau, I., Delabranche, X., Prévost, G., Monteil, H., and Piémont, Y.** (1997) Frequency of isolation of *Staphylococcus intermedius* from humans. *J Clin Microbiol* **35**: 2153-2154.
- Malghani, M.S., Fang, Y., Cheley, S., Bayley, H., and Yang, J.** (1999) Heptameric structures of two alpha-hemolysin mutants imaged with in situ atomic force microscopy. *Microsc Res Tech* **44**: 353-356.
- Malovrh, P., Viero, G., Serra, M.D., Podlesek, Z., Lakey, J.H., Macek, P., Menestrina, G., and Anderluh, G.** (2003) A novel mechanism of pore formation: membrane penetration by the N-terminal amphipathic region of equinatoxin. *J Biol Chem* **278**: 22678-22685.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J.** (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor laboratory.

- Manning, P.A., Brown, M.H., and Heuzenroeder, M.W.** (1984) Cloning of the structural gene (hly) for the haemolysin of *Vibrio cholerae* El Tor strain 017. *Gene* **31**: 225-231.
- McClelland, M., and Nelson, M.** (1992) Effect of site-specific methylation on DNA modification methyltransferases and restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res* **20 Suppl**: 2145-2157.
- Menestrina, G.** (1986) Ionic channels formed by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin: voltage-dependent inhibition by divalent and trivalent cations. *J Membr Biol* **90**: 177-190.
- Menestrina, G., and Vécsey-Semjén, B.** (1999) Biophysical methods and model membranes for the study of bacterial pore-forming toxins. In *The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins*. J.E. Alouf and J.H. Freer (eds). London San Diego Boston New York Sydney Tokyo Toronto: Academic Press, pp. 287-309.
- Menestrina, G., Dalla Serra, M., and Prévost, G.** (2001) Mode of action of beta-barrel pore-forming toxins of the staphylococcal alpha-hemolysin family. *Toxicon* **39**: 1661-1672.
- Menestrina, G., Dalla Serra, M., Comai, M., Coraiola, M., Viero, G., Werner, S., Colin, D.A., Monteil, H., and Prévost, G.** (2003) Ion channels and bacterial infection: the case of beta-barrel pore-forming protein toxins of *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett* **552**: 54-60.
- Menzies, B.E., and Kernodle, D.S.** (1994) Site-directed mutagenesis of the alpha-toxin gene of *Staphylococcus aureus*: role of histidines in toxin activity in vitro and in a murine model. *Infect Immun* **62**: 1843-1847.
- Menzl, K., Maier, E., Chakraborty, T., and Benz, R.** (1996) HlyA hemolysin of *Vibrio cholerae* O1 biotype E1 Tor. Identification of the hemolytic complex and evidence for the formation of anion-selective ion-permeable channels. *Eur J Biochem* **240**: 646-654.
- Meunier, O., Falkenrodt, A., Monteil, H., and Colin, D.A.** (1995) Application of flow cytometry in toxinology: pathophysiology of human polymorphonuclear leukocytes damaged by a pore-forming toxin from *Staphylococcus aureus*. *Cytometry* **21**: 241-247.
- Meunier, O., Ferreras, M., Supersac, G., Hoepfer, F., Baba-Moussa, L., Monteil, H., Colin, D.A., Menestrina, G., and Prévost, G.** (1997) A predicted beta-sheet from class S components of staphylococcal gamma-hemolysin is essential for the secondary interaction of the class F component. *Biochim Biophys Acta* **1326**: 275-286.
- Miles, G., Cheley, S., Braha, O., and Bayley, H.** (2001) The staphylococcal leukocidin bicomponent toxin forms large ionic channels. *Biochemistry* **40**: 8514-8522.
- Miles, G., Movileanu, L., and Bayley, H.** (2002) Subunit composition of a bicomponent toxin: staphylococcal leukocidin forms an octameric transmembrane pore. *Protein Sci* **11**: 894-902.
- Miller, C.J., Elliott, J.L., and Collier, R.J.** (1999) Anthrax protective antigen: prepore-to-pore conversion. *Biochemistry* **38**: 10432-10441.
- Moayeri, M., and Leppla, S.H.** (2004) The roles of anthrax toxin in pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* **7**: 19-24.
- Muchmore, S.W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Yoon, H.S., Nettesheim, D., Chang, B.S., Thompson, C.B., Wong, S.L., Ng, S.L., and Fesik, S.**

- S.W. (1996) X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* **381**: 335-341.
- Nagamune, K., Yamamoto, K., and Honda, T.** (1997) Intramolecular chaperone activity of the pro-region of *Vibrio cholerae* El Tor cytolysin. *J Biol Chem* **272**: 1338-1343.
- Nariya, H., Shimatani, A., Tomita, T., and Kamio, Y.** (1997) Identification of the essential amino acid residues in lukS for the hemolytic activity of staphylococcal leukocidin towards rabbit erythrocytes. *Biosci Biotechnol Biochem* **61**: 2095-2099.
- Neisser, M., and Wechsberg, E.** (1901) Über das Staphylotoxin. *Z. Hyg. Infektkranh.* **36**: 299-349.
- Nelson, K.L., Raja, S.M., and Buckley, J.T.** (1997) The glycosylphosphatidylinositol-anchored surface glycoprotein Thy-1 is a receptor for the channel-forming toxin aerolysin. *J Biol Chem* **272**: 12170-12174.
- Nguyen, M., and Chung, E.P.** (2005) Telithromycin: The first ketolide antimicrobial. *Clin Ther* **27**: 1144-1163.
- Nguyen, V.T., Higuchi, H., and Kamio, Y.** (2002) Controlling pore assembly of staphylococcal gamma-haemolysin by low temperature and by disulphide bond formation in double-cysteine LukF mutants. *Mol Microbiol* **45**: 1485-1498.
- Nguyen, V.T., Kamio, Y., and Higuchi, H.** (2003) Single-molecule imaging of cooperative assembly of gamma-hemolysin on erythrocyte membranes. *Embo J* **22**: 4968-4979.
- Olson, R., Nariya, H., Yokota, K., Kamio, Y., and Gouaux, E.** (1999) Crystal structure of staphylococcal LukF delineates conformational changes accompanying formation of a transmembrane channel. *Nat Struct Biol* **6**: 134-140.
- Olson, R., and Gouaux, E.** (2003) *Vibrio cholerae* cytolysin is composed of an alpha-hemolysin-like core. *Protein Sci* **12**: 379-383.
- Olson, R., and Gouaux, E.** (2005) Crystal Structure of the *Vibrio cholerae* Cytolysin (VCC) Pro-toxin and its Assembly into a Heptameric Transmembrane Pore. *J Mol Biol* **350**: 997-1016.
- Oscarsson, J., Mizunoe, Y., Li, L., Lai, X.H., Wieslander, A., and Uhlin, B.E.** (1999) Molecular analysis of the cytolytic protein ClyA (SheA) from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **32**: 1226-1238.
- Palmer, M.** (2001) The family of thiol-activated, cholesterol-binding cytolysins. *Toxicon* **39**: 1681-1689.
- Panchal, R.G., and Bayley, H.** (1995) Interactions between residues in staphylococcal alpha-hemolysin revealed by reversion mutagenesis. *J Biol Chem* **270**: 23072-23076.
- Panchal, R.G., Cusack, E., Cheley, S., and Bayley, H.** (1996) Tumor protease-activated, pore-forming toxins from a combinatorial library. *Nat Biotechnol* **14**: 852-856.
- Panton, P.N., and Valentine, F.C.O.** (1932) Staphylococcal toxin. *Lancet* **222**: 506-508.
- Pany, S., Vijayvargia, R., and Krishnasastri, M.V.** (2004) Caveolin-1 binding motif of alpha-hemolysin: its role in stability and pore formation. *Biochem Biophys Res Commun* **322**: 29-36.
- Parker, M.W., Tucker, A.D., Tsernoglou, D., and Pattus, F.** (1990) Insights into membrane insertion based on studies of colicins. *Trends Biochem Sci* **15**: 126-129.
- Parker, M.W., and Pattus, F.** (1993) Rendering a membrane protein soluble in water: a common packing motif in bacterial protein toxins. *Trends Biochem Sci* **18**: 391-395.

- Parker, M.W., Buckley, J.T., Postma, J.P., Tucker, A.D., Leonard, K., Pattus, F., and Tsernoglou, D.** (1994) Structure of the *Aeromonas* toxin proaerolysin in its water-soluble and membrane-channel states. *Nature* **367**: 292-544-250.
- Parker, M.W.** (2003) Cryptic clues as to how water-soluble protein toxins form pores in membranes. *Toxicon* **42**: 1-6.
- Parker, M.W., and Feil, S.C.** (2005) Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Prog Biophys Mol Biol* **88**: 91-142.
- Pastan, I., and Kreitman, R.J.** (2002) Immunotoxins in cancer therapy. *Curr Opin Investig Drugs* **3**: 1089-1091.
- Paula, S., Akeson, M., and Deamer, D.** (1999) Water transport by the bacterial channel alpha-hemolysin. *Biochim Biophys Acta* **1418**: 117-126.
- Pédelacq, J.D., Maveyraud, L., Prévost, G., Baba-Moussa, L., Gonzalez, A., Courcelle, E., Shepard, W., Monteil, H., Samama, J.P., and Mourey, L.** (1999) The structure of a *Staphylococcus aureus* leucocidin component (LukF-PV) reveals the fold of the water-soluble species of a family of transmembrane pore-forming toxins. *Structure Fold Des* **7**: 277-287.
- Peng, H.L., Novick, R.P., Kreiswirth, B., Kornblum, J., and Schlievert, P.** (1988) Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **170**: 4365-4372.
- Petosa, C., Collier, R.J., Klimpel, K.R., Leppla, S.H., and Liddington, R.C.** (1997) Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen. *Nature* **385**: 833-838.
- Pokorny, A., Birkbeck, T.H., and Almeida, P.F.** (2002) Mechanism and kinetics of delta-lysin interaction with phospholipid vesicles. *Biochemistry* **41**: 11044-11056.
- Prévost, G., Bouakham, T., Piémont, Y., and Monteil, H.** (1995a) Characterisation of a synergohymenotropic toxin produced by *Staphylococcus intermedius*. *FEBS Lett* **376**: 135-140.
- Prévost, G., Couppié, P., Prévost, P., Gayet, S., Petiau, P., Cribier, B., Monteil, H., and Piémont, Y.** (1995b) Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins. *J Med Microbiol* **42**: 237-245.
- Prévost, G., Cribier, B., Couppié, P., Petiau, P., Supersac, G., Finck-Barbançon, V., Monteil, H., and Piémont, Y.** (1995c) Panton-Valentine leucocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infect Immun* **63**: 4121-4129.
- Prévost, G., Colin, D.A., Staali, L., Baba Moussa, L., Gravet, A., Werner, S., Sanni, A., Meunier, O., and Monteil, H.** (1998) [Pore-forming leukotoxins from *Staphylococcus aureus*: variability of the target cells and 2 pharmacological processes]. *Pathol Biol (Paris)* **46**: 435-441.
- Prévost, G.** (1999) The bi-component staphylococcal leucocidins and γ -haemolysins (toxins). In *The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins*. J.E. Alouf and J.H. Freer (eds). London San Diego Boston New York Sydney Tokyo Toronto: Academic Press, pp. 402-418.
- Prévost, G., Mourey, L., Colin, D.A., and Menestrina, G.** (2001) Staphylococcal pore-forming toxins. In *Current Topics in Microbiology and Immunology: Pore-forming toxins*. Vol. 257. F.G. van der Goot (ed). Berlin: Springer Verlag, pp. 53-83.
- Prévost, G., Menestrina, G., Colin, D.A., Werner, S., Bronner, S., Dalla Serra, M., Baba-Moussa, L., Coraiola, M., Gravet, A., and Monteil, H.** (2003) Staphylococcal

- bicomponent leucotoxins, mechanism of action, impact on cells and contribution to virulence. In *Pore-forming peptides and protein toxins*. G. Menestrina, M. Dalla Serra and P. Lazarovici (eds). London New York: Taylor & Francis Press, pp. 3-26.
- Prévost, G.** (2005) Toxins in *Staphylococcus aureus* pathogenesis. In *Microbial Toxins. Molecular and Cellular Biology*. Thomas Proft (ed). Norfolk, England, pp. 243-284.
- Prévost, G., Mourey, L., Colin, D.A., Monteil, H., Dalla Serra, M., and Menestrina, G.** (2005) Alpha-toxin and bêta-barrel pore-forming toxins (leucocidins, alpha-, gamma-, and delta-cytolysins) of *Staphylococcus aureus*. In *The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins*. J.E. Alouf and M.R. Popoff (eds), pp. 588-605.
- Ramachandran, R., Tweten, R.K., and Johnson, A.E.** (2004) Membrane-dependent conformational changes initiate cholesterol-dependent cytolysin oligomerization and intersubunit beta-strand alignment. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 697-705.
- Rose, F., Dahlem, G., Guthmann, B., Grimminger, F., Maus, U., Hanze, J., Duemmer, N., Grandel, U., Seeger, W., and Ghofrani, H.A.** (2002) Mediator generation and signaling events in alveolar epithelial cells attacked by *S. aureus* alpha-toxin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **282**: L207-214.
- Rossetto, O., de Bernard, M., Pellizzari, R., Vitale, G., Caccin, P., Schiavo, G., and Montecucco, C.** (2000) Bacterial toxins with intracellular protease activity. *Clin Chim Acta* **291**: 189-199.
- Rossjohn, J., Feil, S.C., McKinstry, W.J., Tweten, R.K., and Parker, M.W.** (1997) Structure of a cholesterol-binding, thiol-activated cytolysin and a model of its membrane form. *Cell* **89**: 685-692.
- Saiki, R.K., Gelfaud, D.H., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Ehrlich, H.A.** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Sakoulas, G., Eliopoulos, G.M., Moellering, R.C., Jr., Wennersten, C., Venkataraman, L., Novick, R.P., and Gold, H.S.** (2002) Accessory gene regulator (*agr*) locus in geographically diverse *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 1492-1502.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.
- Sansom, M.S., and Kerr, I.D.** (1995) Transbilayer pores formed by beta-barrels: molecular modeling of pore structures and properties. *Biophys J* **69**: 1334-1343.
- Schwan, W.R., Langhorne, M.H., Ritchie, H.D., and Stover, C.K.** (2003) Loss of hemolysin expression in *Staphylococcus aureus agr* mutants correlates with selective survival during mixed infections in murine abscesses and wounds. *FEMS Immunol Med Microbiol* **38**: 23-28.
- Sekino-Suzuki, N., Nakamura, M., Mitsui, K.I., and Ohno-Iwashita, Y.** (1996) Contribution of individual tryptophan residues to the structure and activity of theta-toxin (perfringolysin O), a cholesterol-binding cytolysin. *Eur J Biochem* **241**: 941-947.
- Sellman, B.R., Kagan, B.L., and Tweten, R.K.** (1997) Generation of a membrane-bound, oligomerized pre-pore complex is necessary for pore formation by *Clostridium septicum* alpha toxin. *Mol Microbiol* **23**: 551-558.

- Shahgaldian, P., Da Silva, E., and Coleman, A.W.** (2003) A first approach to the study of calixarene solid lipid nanoparticle (SLN) toxicity. *J Incl Phenom Macro Chem* **46**: 175-177.
- Shen, W.H., Choe, S., Eisenberg, D., and Collier, R.J.** (1994) Participation of lysine 516 and phenylalanine 530 of diphtheria toxin in receptor recognition. *J Biol Chem* **269**: 29077-29084.
- Shepard, L.A., Shatursky, O., Johnson, A.E., and Tweten, R.K.** (2000) The mechanism of pore assembly for a cholesterol-dependent cytolysin: formation of a large prepore complex precedes the insertion of the transmembrane beta-hairpins. *Biochemistry* **39**: 10284-10293.
- Singh, Y., Liang, X., and Duesbery, N.S.** (2005) Pathogenesis of *Bacillus anthracis*: the role of anthrax toxins. In *Microbial Toxins. Molecular and Cellular Biology*. Proft Thomas (ed).
- Slatin, S.L., and Kienker, P.K.** (2003) Colicin channels and protein translocation: parallels with diphtheria toxin. In *Pore-forming peptides and protein toxins*. G. Menestrina, M. Dalla Serra and P. Lazarovici (eds). London and New York: Taylor and Francis, pp. 102-131.
- Smith, D.B., and Johnson, K.S.** (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**: 31-40.
- Smith, M.L., and Price, S.A.** (1938) *Staphylococcus* γ -haemolysin. *J. Pathol. Microbiol.* **47**: 379-393.
- Soberon, M., Pérez, R.V., Nuñez-Valdez, M.E., Gomez, I., Sanchez, J., Güereca, L., and Bravo, A.** (2003) Functional studies of helix α -5 regions from *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab δ -endotoxin. In *Pore-forming peptides and protein toxins*. G. Menestrina, M. Dalla Serra and P. Lazarovici (eds). London and New York: Taylor and Francis, pp. 90-101.
- Soboll, H., Ito, A., Schaeg, W., and Blobel, H.** (1973) [Leukocidin from staphylococci of different origin (author's transl)]. *Zentralbl Bakteriol [Orig A]* **224**: 184-193.
- Song, L., Hobaugh, M.R., Shustak, C., Cheley, S., Bayley, H., and Gouaux, J.E.** (1996) Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* **274**: 1859-1866.
- Sonoda, M., Hayashi, K., Nishida, M., Ishii, D., and Yoshida, I.** (1998) Another uranophile sodium hydroxycalix[8]arene-*p*-sulfonate: Its acid dissociation and divalent metal ion binding properties. *Analytical Science* **14**: 493-499.
- Staali, L., Monteil, H., and Colin, D.A.** (1998) The staphylococcal pore-forming leukotoxins open Ca²⁺ channels in the membrane of human polymorphonuclear neutrophils. *J Membr Biol* **162**: 209-216.
- Sugawara-Tomita, N., Tomita, T., and Kamio, Y.** (2002) Stochastic assembly of two-component staphylococcal gamma-hemolysin into heteroheptameric transmembrane pores with alternate subunit arrangements in ratios of 3:4 and 4:3. *J Bacteriol* **184**: 4747-4756.
- Sugawara, N., Tomita, T., and Kamio, Y.** (1997) Assembly of *Staphylococcus aureus* gamma-hemolysin into a pore-forming ring-shaped complex on the surface of human erythrocytes. *FEBS Lett* **410**: 333-337.

- Suljagic, V., Cobeljic, M., Jankovic, S., Mirovic, V., Markovic-Denic, L., Romc, P., and Mikic, D.** (2005) Nosocomial bloodstream infections in ICU and non-ICU patients. *Am J Infect Control* **33**: 333-340.
- Supersac, G., Prévost, G., and Piémont, Y.** (1993) Sequencing of leucocidin R from *Staphylococcus aureus* P83 suggests that staphylococcal leucocidins and gamma-hemolysin are members of a single, two-component family of toxins. *Infect Immun* **61**: 580-587.
- Supersac, G., Piémont, Y., Kubina, M., Prévost, G., and Foster, T.J.** (1998) Assessment of the role of gamma-toxin in experimental endophthalmitis using a hlg-deficient mutant of *Staphylococcus aureus*. *Microb Pathog* **24**: 241-251.
- Suttorp, N., Seeger, W., Dewein, E., Bhakdi, S., and Roka, L.** (1985) Staphylococcal alpha-toxin-induced PGI₂ production in endothelial cells: role of calcium. *Am J Physiol* **248**: C127-134.
- Suttorp, N., Seeger, W., Zucker-Reimann, J., Roka, L., and Bhakdi, S.** (1987) Mechanism of leukotriene generation in polymorphonuclear leukocytes by staphylococcal alpha-toxin. *Infect Immun* **55**: 104-110.
- Suttorp, N., Fuhrmann, M., Tannert-Otto, S., Grimminger, F., and Bhakdi, S.** (1993) Pore-forming bacterial toxins potently induce release of nitric oxide in porcine endothelial cells. *J Exp Med* **178**: 337-341.
- Szmigielski, S., Sobiczewska, E., Prévost, G., Monteil, H., Colin, D.A., and Jeljaszewicz, J.** (1998) Effect of purified staphylococcal leukocidal toxins on isolated blood polymorphonuclear leukocytes and peritoneal macrophages in vitro. *Zentralbl Bakteriologie* **288**: 383-394.
- Takashi, J.** (2003) A new fluorimetric method for the detection of the neurotransmitter acetylcholine in water using a dansylcholine complex with *p*-sulfonated calix[8]arene. *J Incl Phenom Macro* **45**: 195-201.
- Taylor, A.G., and Bernheimer, A.W.** (1974) Further characterization of staphylococcal gamma-hemolysin. *Infect Immun* **10**: 54-59.
- Tejuca, M., Dalla Serra, M., Ferreras, M., Lanio, M.E., and Menestrina, G.** (1996) Mechanism of membrane permeabilization by sticholysin I, a cytolysin isolated from the venom of the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biochemistry* **35**: 14947-14957.
- Thelestam, M., Olofsson, A., Blomqvist, L., and Hebert, H.** (1991) Oligomerisation of cell-bound staphylococcal alpha-toxin in relation to membrane permeabilisation. *Biochim Biophys Acta* **1062**: 245-254.
- Tomita, T., and Kamio, Y.** (1997) Molecular biology of the pore-forming cytolysins from *Staphylococcus aureus*, alpha- and gamma-hemolysins and leukocidin. *Biosci Biotechnol Biochem* **61**: 565-572.
- Traut, R.R., Casino, C., and Zecherle, N.** (1989) Cross-linking of protein subunits and ligands by the introduction of disulphine bonds. In *Protein function, a practical approach*. T.E. Creighton (ed). New York: IRL Press.
- Tweten, R.K., Parker, M.W., and Johnson, A.E.** (2001) The cholesterol-dependant cytolysins. In *Current Topics in Microbiology and Immunology: Pore-forming toxins*. Vol. 257. F. G. van der Goot (ed). Berlin: Springer Verlag, pp. 1-14.
- Valeva, A., Palmer, M., Hilgert, K., Kehoe, M., and Bhakdi, S.** (1995) Correct oligomerization is a prerequisite for insertion of the central molecular domain of

- staphylococcal alpha-toxin into the lipid bilayer. *Biochim Biophys Acta* **1236**: 213-218.
- Valeva, A., Weisser, A., Walker, B., Kehoe, M., Bayley, H., Bhakdi, S., and Palmer, M.** (1996) Molecular architecture of α toxin pore: a 15-residue sequence lines the transmembrane channel of staphylococcal alpha-toxin. *Embo J* **15**: 1857-1864.
- Valeva, A., Palmer, M., and Bhakdi, S.** (1997a) Staphylococcal alpha-toxin: formation of the heptameric pore is partially cooperative and proceeds through multiple intermediate stages. *Biochemistry* **36**: 13298-13304.
- Valeva, A., Pongs, J., Bhakdi, S., and Palmer, M.** (1997b) Staphylococcal alpha-toxin: the role of the N-terminus in formation of the heptameric pore -- a fluorescence study. *Biochim Biophys Acta* **1325**: 281-286.
- Valeva, A., Schnabel, R., Walev, I., Boukhallouk, F., Bhakdi, S., and Palmer, M.** (2001) Membrane insertion of the heptameric staphylococcal alpha-toxin pore. A domino-like structural transition that is allosterically modulated by the target cell membrane. *J Biol Chem* **276**: 14835-14841.
- Valeva, A., Walev, I., Weis, S., Boukhallouk, F., Wassenaar, T.M., Endres, K., Fahrenholz, F., Bhakdi, S., and Zitzer, A.** (2004) A cellular metalloproteinase activates *Vibrio cholerae* pro-cytolysin. *J Biol Chem* **279**: 25143-25148.
- Valeva, A., Walev, I., Boukhallouk, F., Wassenaar, T.M., Heinz, N., Hedderich, J., Lautwein, S., Mocking, M., Weis, S., Zitzer, A., and Bhakdi, S.** (2005) Identification of the membrane penetrating domain of *Vibrio cholerae* cytolysin as a beta-barrel structure. *Mol Microbiol* **57**: 124-131.
- van der Flier, M., van Dijk, N.B., Fluit, A.C., Fler, A., Wolfs, T.F., and van Gestel, J.P.** (2003) Fatal pneumonia in an adolescent due to community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* positive for Panton-Valentine leukocidin. *Ned Tijdschr Geneeskde* **147**: 1076-1079.
- van der Goot, F.G., Lakey, J., Pattus, F., Kay, C.M., Sorokine, O., Van Dorselaer, A., and Buckley, J.T.** (1992) Spectroscopic study of the activation and oligomerization of the channel-forming toxin aerolysin: identification of the site of proteolytic activation. *Biochemistry* **31**: 8566-8570.
- van der Goot, F.G., Pattus, F., Wong, K.R., and Buckley, J.T.** (1993) Oligomerization of the channel-forming toxin aerolysin precedes insertion into lipid bilayers. *Biochemistry* **32**: 2636-2642.
- van der Goot, F.G., Hardie, K.R., Parker, M.W., and Buckley, J.T.** (1994) The C-terminal peptide produced upon proteolytic activation of the cytolytic toxin aerolysin is not involved in channel formation. *J Biol Chem* **269**: 30496-30501.
- Van der Velde, H.** (1894) Etude sur le mécanisme de la virulence du staphylocoque pyogène. *La Cellule* **10**: 401-460.
- Vandenesch, F., Naimi, T., Enright, M.C., Lina, G., Nimmo, G.R., Heffernan, H., Liassine, N., Bes, M., Greenland, T., Reverdy, M.E., and Etienne, J.** (2003) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis* **9**: 978-984.
- Vécsey-Sémjen, B., Möllby, R., and van der Goot, F.G.** (1996) Partial C-terminal unfolding is required for channel formation by staphylococcal alpha-toxin. *J Biol Chem* **271**: 8655-8660.

- Vécsey-Sémjen, B., Lesieur, C., Mollby, R., and van der Goot, F.G.** (1997) Conformational changes due to membrane binding and channel formation by staphylococcal alpha-toxin. *J Biol Chem* **272**: 5709-5717.
- Viero, G., Cunnaccia, R., Prévost, G., Werner, S., Monteil, H., Keller, D., Joubert, O., Menestrina, G., and Dalla Serra, M.** (2005) Homologous versus heterologous interactions in the bicomponent staphylococcal gamma-hemolysins pore. *Biochem J* in press.
- Wai, S.N., Lindmark, B., Soderblom, T., Takade, A., Westermark, M., Oscarsson, J., Jass, J., Richter-Dahlfors, A., Mizunoe, Y., and Uhlin, B.E.** (2003) Vesicle-mediated export and assembly of pore-forming oligomers of the enterobacterial ClyA cytotoxin. *Cell* **115**: 25-35.
- Walev, I., Martin, E., Jonas, D., Mohamadzadeh, M., Muller-Klieser, W., Kunz, L., and Bhakdi, S.** (1993) Staphylococcal alpha-toxin kills human keratinocytes by permeabilizing the plasma membrane for monovalent ions. *Infect Immun* **61**: 4972-4979.
- Walev, I., Palmer, M., Martin, E., Jonas, D., Weller, U., Hohn-Bentz, H., Husmann, M., and Bhakdi, S.** (1994) Recovery of human fibroblasts from attack by the pore-forming alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microb Pathog* **17**: 187-201.
- Walker, B., Krishnasastri, M., Zorn, L., and Bayley, H.** (1992) Assembly of the oligomeric membrane pore formed by Staphylococcal alpha-hemolysin examined by truncation mutagenesis. *J Biol Chem* **267**: 21782-21786.
- Walker, B., Kasianowicz, J., Krishnasastri, M., and Bayley, H.** (1994a) A pore-forming protein with a metal-actuated switch. *Protein Eng* **7**: 655-662.
- Walker, B., and Bayley, H.** (1995) Key residues for membrane binding, oligomerization, and pore forming activity of staphylococcal alpha-hemolysin identified by cysteine scanning mutagenesis and targeted chemical modification. *J Biol Chem* **270**: 23065-23071.
- Walker, B., Braha, O., Cheley, S., and Bayley, H.** (1995) An intermediate in the assembly of a pore-forming protein trapped with a genetically-engineered switch. *Chem Biol* **2**: 99-105.
- Walker, P.A., Leong, L.E., Ng, P.W., Tan, S.H., Waller, S., Murphy, D., and Porter, A.G.** (1994b) Efficient and rapid affinity purification of proteins using recombinant fusion proteases. *Biotechnology (N Y)* **12**: 601-605.
- Wallace, A.J., Stillman, T.J., Atkins, A., Jamieson, S.J., Bullough, P.A., Green, J., and Artymiuk, P.J.** (2000) *E. coli* hemolysin E (HlyE, ClyA, SheA): X-ray crystal structure of the toxin and observation of membrane pores by electron microscopy. *Cell* **100**: 265-276.
- Wang, X., Noda, M., and Kato, I.** (1990) Stimulatory effect of staphylococcal leukocidin on phosphoinositide metabolism in rabbit polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* **58**: 2745-2749.
- Ward, P.D., and Turner, W.H.** (1980) Identification of staphylococcal Pantone-Valentine leukocidin as a potent dermonecrotic toxin. *Infect Immun* **28**: 393-397.
- Ward, R.J., Palmer, M., Leonard, K., and Bhakdi, S.** (1994) Identification of a putative membrane-inserted segment in the alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry* **33**: 7477-7484.

- Wedekind, J.E., Trame, C.B., Dorywalska, M., Koehl, P., Raschke, T.M., McKee, M., FitzGerald, D., Collier, R.J., and McKay, D.B.** (2001) Refined crystallographic structure of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and its implications for the molecular mechanism of toxicity. *J Mol Biol* **314**: 823-837.
- Werner, S., Colin, D.A., Coraiola, M., Menestrina, G., Monteil, H., and Prévost, G.** (2002) Retrieving biological activity from LukF-PV mutants combined with different S components implies compatibility between the stem domains of these staphylococcal bicomponent leucotoxins. *Infect Immun* **70**: 1310-1318.
- Wilmsen, H.U., Pattus, F., and Buckley, J.T.** (1990) Aerolysin, a hemolysin from *Aeromonas hydrophila*, forms voltage-gated channels in planar lipid bilayers. *J Membr Biol* **115**: 71-81.
- Wilmsen, H.U., Buckley, J.T., and Pattus, F.** (1991) Site-directed mutagenesis at histidines of aerolysin from *Aeromonas hydrophila*: a lipid planar bilayer study. *Mol Microbiol* **5**: 2745-2751.
- Wilmsen, H.U., Leonard, K.R., Tichelaar, W., Buckley, J.T., and Pattus, F.** (1992) The aerolysin membrane channel is formed by heptamerization of the monomer. *Embo J* **11**: 2457-2463.
- Woodin, A.M.** (1959) Fractionation of a leucocidin from *Staphylococcus aureus*. *Biochem J* **73**: 225-237.
- Woodin, A.M.** (1960) Purification of the two components of leucocidin from *Staphylococcus aureus*. *Biochem J* **75**: 158-165.
- Wright, J.** (1936) Staphylococcal leukocidin (Neisser-Wechsberg type) and antileucocidin. *Lancet* **230**: 1002-1004.
- Xie, R., Zhuang, M., Ross, L.S., Gomez, I., Oltean, D.I., Bravo, A., Soberon, M., and Gill, S.S.** (2005) Single amino acid mutations in the cadherin receptor from *Heliothis virescens* affect its toxin binding ability to Cry1A toxins. *J Biol Chem* **280**: 8416-8425.
- Yadav, S.P., Kundu, B., and Ghosh, J.K.** (2003) Identification and characterization of an amphipathic leucine zipper-like motif in *Escherichia coli* toxin hemolysin E. Plausible role in the assembly and membrane destabilization. *J Biol Chem* **278**: 51023-51034.
- Yamaizumi, M., Mekada, E., Uchida, T., and Okada, Y.** (1978) One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell. *Cell* **15**: 245-250.
- Yamamoto, K., Ichinose, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Nakata, A., Iwanaga, M., Honda, T., and Miwatani, T.** (1990) Two-step processing for activation of the cytolysin/hemolysin of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor: nucleotide sequence of the structural gene (hlyA) and characterization of the processed products. *Infect Immun* **58**: 4106-4116.
- Yuldasheva, L.N., Merzlyak, P.G., Zitzer, A.O., Rodrigues, C.G., Bhakdi, S., and Krasilnikov, O.V.** (2001) Lumen geometry of ion channels formed by *Vibrio cholerae* EL Tor cytolysin elucidated by nonelectrolyte exclusion. *Biochim Biophys Acta* **1512**: 53-63.
- Zadmard, R., and Schrader, T.** (2005) Nanomolar protein sensing with embedded receptor molecules. *J Am Chem Soc* **127**: 904-915.
- Zakharov, S.D., Kotova, E.A., Antonenko, Y.N., and Cramer, W.A.** (2004) On the role of lipid in colicin pore formation. *Biochim Biophys Acta* **1666**: 239-249.

- Zitzer, A., Walev, I., Palmer, M., and Bhakdi, S.** (1995) Characterization of *Vibrio cholerae* El Tor cytolysin as an oligomerizing pore-forming toxin. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **184**: 37-44.
- Zitzer, A., Wassenaar, T.M., Walev, I., and Bhakdi, S.** (1997) Potent membrane-permeabilizing and cytotoxic action of *Vibrio cholerae* cytolysin on human intestinal cells. *Infect Immun* **65**: 1293-1298.
- Zitzer, A., Zitzer, O., Bhakdi, S., and Palmer, M.** (1999) Oligomerization of *Vibrio cholerae* cytolysin yields a pentameric pore and has a dual specificity for cholesterol and sphingolipids in the target membrane. *J Biol Chem* **274**: 1375-1380.
- Zitzer, A., Harris, J.R., Kemminer, S.E., Zitzer, O., Bhakdi, S., Muething, J., and Palmer, M.** (2000) *Vibrio cholerae* cytolysin: assembly and membrane insertion of the oligomeric pore are tightly linked and are not detectably restricted by membrane fluidity. *Biochim Biophys Acta* **1509**: 264-274.

Résumé

Titre : Identification, stabilisation et inhibition de l'interaction monomère S – monomère F des leucotoxines à deux composés de *Staphylococcus aureus*.

Staphylococcus aureus est la bactérie la plus fréquemment isolée en milieu hospitalier. Parmi de nombreux facteurs de virulence, elle produit des leucotoxines à deux composés, riches en feuillettes β , et formant des pores. Les leucotoxines résultent de l'interaction synergique d'une protéine de classe S avec un ligand membranaire, puis d'une de classe F. Elles s'associent à la surface membranaire en hexa, hepta ou octamères de façon coopérative, et ciblent les cellules immunitaires de l'hôte. Notre étude a porté sur le mode d'action de ces toxines sur la base des structures des monomères solubles. Notre contribution à l'étude du mécanisme d'action de ces leucotoxines montre que la partie N-terminale n'interagit probablement pas avec les monomères adjacents lorsque le pore est formé, contrairement à ceux de l' α -toxine. L'obtention d'hétérodimères biologiquement actifs de la première interface nous permet d'affirmer la parité du pore formé par les leucotoxines (hexamère ou octamère). Nous avons identifié des interactions préférentielles entre certains aminoacides et de nouvelles différences structurales avec l'alpha-toxine. Un hétérodimère HlgA T28C~HlgB N156C est cristallisé. Cela permettra de résoudre la structure de HlgA. L'identification des aminoacides en interaction sur la seconde interface permettrait de résoudre *in fine* la structure du pore constitué par HlgA/HlgB, puis le développement de molécules inhibitrices de l'association. Cette inhibition constitue un axe majeur de la poursuite de ce travail pour l'étude de leur rôle dans la virulence de la bactérie. Avec les CXXX, nous avons identifié des molécules capables d'inhiber toutes les toxines formant des pores de *S. aureus*. La stabilisation de l'interaction des monomères des leucotoxines n'est donc qu'une des possibilités qui permet d'envisager leurs applications dans différents secteurs des biotechnologies : stimulateurs de l'immunité, vecteurs de perméabilisation cellulaire, anti-tumoraux, biosenseurs.

Abstract

Title : Identification, stabilization and inhibition of the interaction monomer S - monomer F of the bicomponent staphylococcal leucotoxins.

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) is the most common bacteria isolated at the hospital. Amongst a number of virulence factors, it produces β -strands rich leucotoxins. They are bicomponent toxins which form pores. The leucotoxins result from the synergistic interaction of a class S protein of with a membrane ligand, then of a class F protein. They associate cooperatively at the membrane surface as hexa-, hepta-, or octamers, and target the host immune cells. Our work, based on the soluble monomers structure, focuses on the mode of action of these toxins. Our contribution to the study of the bicomponent leucotoxins mode of action shows that, contrary to the α -toxin, the N-terminus extremity might not interact with the adjacent monomers, when the pore is formed. Leucotoxins show some structural micro-heterogeneity compared to α -hemolysin. The synthesis of biologically active heterodimers of the first interface allows us to affirm the parity of the leucotoxins pore (hexamer or octamer). We have identified functional interactions between certain amino acids, and new structural differences with α -hemolysin. HlgA T28C~HlgB N156C heterodimer is crystallized. It will permit to solve the HlgA structure. The identification of the interacting amino acids on both interfaces could allow finally to solve the structure of the pore formed by HlgA/HlgB, and then lead to the development of inhibiting molecules of association. The inhibition of the leucotoxic pore formation constitutes a major axis of the continuation of this work for the study of their role in the virulence of the bacterium. We have succeeded in, with CXXX, the identification of molecules able to inhibit all the pore-forming toxins of *S. aureus*. The stabilisation of the leucotoxins monomers interactions is thus only one of the possibilities which make it possible to consider their applications in various sectors of biotechnologies stimulators of immunity, vectors of cellular permeabilization, antitumor, biosensors.

Key words : *Staphylococcus aureus*, Panton and Valentine leucocidin, γ -hemolysin, oligomerization, heterodimer, pore, flux cytometry, site-directed mutagenesis.

COMMUNICATIONS ECRITES

Engineered covalent leucotoxin heterodimers form functional pores: insights into S-F interactions.

O. JOUBERT, J. VOEGELIN, V. GUILLET, S. TRANIER, S. WERNER, D.A. COLIN, M. DALLA SERRA, D. KELLER, H. MONTEIL, L. MOUREY, G. PREVOST.
Biochimie, soumis

Heterogeneity in the assembly of β -barrel pore-forming toxins: locked N-terminal extremities display functional staphylococcal bipartite leucotoxins.

O. JOUBERT, D. KELLER, G. VIERO, E. MARTINEZ, D.A. COLIN, M. DALLA SERRA, H. MONTEIL, L. MOUREY, G. MENESTRINA, G. PREVOST.
Biochemical Journal, soumis

Homologous versus heterologous interactions in the bicomponent staphylococcal gamma-hemolysins pore.

G. VIERO, R. CUNACCIA, G. PRÉVOST, S. WERNER, H. MONTEIL, D. KELLER, **O. JOUBERT**, G. MENESTRINA, M. DALLA SERRA
Biochemical Journal, sous presse

Staphylococcal leucotoxins: Tribute to Gianfranco Menestrina to their study.

O. JOUBERT, V. GUILLET, G. VIERO, D. A. COLIN, P. ROBLIN, M. COMAI, C. POTRICH, M. CORRAIOLA, E. MARTINEZ, D. KELLER, H. MONTEIL, M. DALLA SERRA, L. MOUREY, G. PREVOST.
International Journal of Medical Microbiology. 2005, sous presse.

Les leucotoxines de staphylocoque : de l'investigation bio-structurale vers la notion d'inhibiteurs.

O. JOUBERT, C. POTRICH, V. GUILLET, L. MOUREY, P. ROBLIN, D. KELLER, G. VIERO, E. FORESTIER, E. MARTINEZ, L. BABA-MOUSSA, H. MONTEIL, D. A. COLIN, M. DALLA SERRA, G. PREVOST
In "*Toxines et douleur*" Editions Lavoisier, C. Bon, F. Goudey-Perrière (eds), 2005, sous presse.

Sensitive and Specific Detection of Staphylococcal Epidermolysins A and B in broth cultures by flow cytometry-assisted multiplex immunoassay.

O. JOUBERT, D. KELLER, A. PINCK, H. MONTEIL, L. TALBOT, G. PREVOST
Journal of Clinical Microbiology. 2005 Mar;43(3):1076-80.

Application de la technologie Bio-Plex® à la quantification simultanée et différentielle des épidermolysines staphylococciques A et B.

O. JOUBERT, D. KELLER, A. PINCK, H. MONTEIL, L. TALBOT, G. PREVOST
Toxinogénèse : biosynthèse, ingénierie, polymorphisme, neutralisation des toxines, Rencontres en Toxinologie, ED. F. Goudey-Perrière, C. Bon, A. Ménez, S. Puiseux-Dao, 2003 Elsevier SAS PP-191-192.

Versatility of the Bio-Plex® System : Application to the detection of bacterial protein toxin.

O. JOUBERT, D. KELLER, A. PINCK, H. MONTEIL, L. TALBOT, G. PREVOST

- *Bioradiations 111*, 40-41 (2003).
- Bio-Rad : tech note 3013.

Long term magnesium deficiency increases mortality through effects on inflammation parameters and oxidant stress defence in ageing rats.

D. BLACHE, S. DEVAUX, **O. JOUBERT**, N. LOREAU, M. SCHNEIDER, P. DURAND, M. PROST, V. GAUME, M. ADRIAN, P. LAURANT, A. BERTHELOT

Free Radical in Biology and Medicine, sous presse

Les polyphénols et le resvératrol protègent contre certains effets toxiques de l'éthanol au niveau cellulaire: un nouveau bénéfice du vin rouge.

D. BLACHE, L. PROUVENSIER, **O. JOUBERT**, N. LOREAU

In Vin et santé 2006, sous presse

COMMUNICATIONS ORALES ET AFFICHEES

Inhibition chimique des toxines formant des pores de staphylocoque.

G. PREVOST, C. POTRICH, E. FORESTIER, E. MARTINEZ, C. LE BRUN, L. BABA-MOUSSA, D. KELLER, M. DALLA SERRA, **O. JOUBERT**

26ème Réunion de Chimiothérapie Anti-Infectieuse 01-02.12.2005, Paris.

Controlled release of calixarenes from chitosan hydrogel coated polymeric surfaces as a potential antimicrobial treatment of staphylococcal infections.

M. VINANTE, C. PEDERZOLLI, L. PASQUARDINI, L. LUNELLI, R. CANTERI*, M. ANDERLE, C. POTRICH, G. VIERO, M. DALLA SERRA, G. PREVOST, **O. JOUBERT**

Communication affichée au 52nd International Symposium and exhibition of the American Vacuum Society. 01.10-04.10.2005, Boston (USA).

The mode of action of bicomponent γ -hemolysins of *Staphylococcus aureus*.

M. DALLA SERRA, G. VIERO, M. COMAI, C. POTRICH, R. CUNACCIA, H. BASTIANI, C. BACHMEYER, S. WERNER, D. KELLER, H. MONTEIL, **O. JOUBERT**, G. PRÉVOST, G. MENESTRINA

Communication affichée au 5th European Biophysical Societies Association (EBSA). 27.08-01.09.2005, Montpellier.

Challenging monomer-monomer interactions of a bicomponent leucotoxin: structural insights and differences with the α -toxin pore.

O. JOUBERT, V. GUILLET, G. VIERO, D.A. COLIN, P. ROBLIN, C. BACHMEYER, D. KELLER, G. MENESTRINA, M. DALLA SERRA, L. MOUREY, G. PREVOST*

Communication orale* au 12th European Workshop on Bacterial Protein Toxins (ETOX12). 25.06-30.06.2005, Canterbury (Royaume-Uni).

Extension of the stem region in the staphylococcal bicomponent gamma-hemolysins.

G. VIERO, M. DALLA SERRA, **O. JOUBERT**, D. KELLER, H. MONTEIL, G. PRÉVOST, G. MENESTRINA

Communication affichée au 12th European Workshop on Bacterial Protein Toxins (ETOX12). 25.06-30.06.2005, Canterbury (Royaume-Uni).

Unfolding of the stem region in the staphylococcal bicomponent gamma-hemolysins.

G. VIERO, G. MENESTRINA, **O. JOUBERT**, D. KELLER, G. PRÉVOST, M. DALLA SERRA

Communication affichée au Regional Biophysics Meeting 2005. 16.03-20.03.2005, Terme Zreče, Slovenia,

The mode of action of bicomponent γ -hemolysins of *Staphylococcus aureus*.

M. DALLA SERRA*, G. VIERO, R. CUNACCIA, C. POTRICH, H. BASTIANI, C. BACHMEYER, **O. JOUBERT**, S. WERNER, D. KELLER, H. MONTEIL, G. PRÉVOST, G. MENESTRINA

Communication orale* au Regional Biophysics Meeting 2005. 16.03-20.03.2005, Terme Zreče, Slovenia,

Genetic variability of the staphylococcal leukotoxin luke-lukd is associated with its expression.

E. ETIENNE*, **O. JOUBERT**, D. KELLER, H. MONTEIL, G. PREVOST

Communication orale* et affichée VIth European Congress of Chemotherapy and Infection. 24^e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse (RICAI). 02.12-03.12.2004, Paris.

Les toxines formant des pores : l'exemple des leucotoxines de staphylocoque.

G. PREVOST*, D.A. COLIN, **O. JOUBERT**, G. MENESTRINA, L. MOUREY, H. MONTEIL

Communication orale* et affichée. VI^e Congrès National de la Société Française de Microbiologie (SFM), 10.05-12.05.2004, Bordeaux.

De la structure tridimensionnelle de la leucocidine de Panton et Valentine à la caractérisation d'acides aminés en interaction.

O. JOUBERT, L. MOUREY, V. GUILLET, P. ROBLIN, D. KELLER, H. MONTEIL, G. PREVOST

Communication affichée. VI^e Congrès National de la SFM, 10.05-12.05.2004, Bordeaux.

Generation of soluble staphylococcal leukotoxins heterodimers: identification of interfaces between monomers and flexibility of the triangle region.

O. JOUBERT, L. MOUREY, C. BACHMEYER, D. KELLER, , D.A. COLIN, E. MARTINEZ, H. MONTEIL, G. MENESTRINA, G. PREVOST

Communication affichée. Vth Workshop on Pore-Forming Toxins, 10.10-13.10.2004, Mainz (Allemagne).

Application de la technologie Bio-Plex® a la quantification simultanee et differentielle des epidermolysines staphylococciques A et B.

O. JOUBERT*, D. KELLER, A. PINCK, H. MONTEIL, L. TALBOT, G. PREVOST
COMMUNICATIONS ORALES* ET AFFICHEES

- ❑ *Journée d'information sur les techniques d'analyse d'interactions moléculaires. IFR122 Institut Montpellierain de Biologie – Bio-Rad, 24.02.2004, Montpellier.
- ❑ 13th European Congress Of Clinical Microbiology And Infectious Diseases (ECCMID), 11-13.05.2003, Glasgow (Royaume-Uni).
- ❑ *11^e Rencontres en Toxinologie, Société Française pour l'Etude des Toxines (SFET), 11 ET 12.12.2003, Paris.
- ❑ 23^e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, 4 et 5.12.2003, Paris.

N-terminal extremities of staphylococcal leucotoxins within the protein core monomers of functional pores.

O. JOUBERT, J. VOEGELIN, S. WERNER, D.A. COLIN, D. KELLER, H. MONTEIL, G. PREVOST

Communication affichée 11th ETOX, 28.06-02.07.2003, Celakoviče (République Tchèque).

Annexe 1

Homologous versus heterologous interactions in the bicomponent staphylococcal gamma-hemolysins pore.

Viero, G., Cunaccia, R., Prevost, G., Werner, S., Monteil, H., Keller, D., Joubert, O., Menestrina, G. and Dalla Serra, M. (2005) *Biochem J*

Annexe 2

Staphylococcal leucotoxins: Tribute to Gianfranco Menestrina to their study

Olivier Joubert¹, Valérie Guillet², Gabriella Viero³, Didier A. Colin¹, Pierre Roblin², Massimiliano Comai³, Cristina Potrich³, Manuela Corraiola³, Eric Martinez¹, Daniel Keller¹, Henri Monteil¹, Mauro Dalla Serra³, Lionel Mourey², Gilles Prévost^{1*}

¹ Laboratoire de Physiopathologie et d'Antibiologie des Infections Bactériennes Emergentes et Nosocomiales – EA 3432. Institut de Bactériologie de la Faculté de Médecine (Université Louis Pasteur) - Hôpitaux Universitaires de Strasbourg. 3 rue Koeberlé, F-67000 Strasbourg

² Groupe de Biophysique Structurale, Département Mécanismes Moléculaires des Infections Mycobactériennes, CNRS-IPBS UMR 5089, 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse Cedex, France

³ ITC & CNR-IBF Unit at Trento, Via Sommarive, 18, I-38050 Povo (Trento) Italy

* Corresponding author: Laboratoire de Physiopathologie et d'Antibiologie des Infections Bactériennes Emergentes et Nosocomiales – EA 3432. Institut de Bactériologie de la Faculté de Médecine (Université Louis Pasteur) - Hôpitaux Universitaires de Strasbourg. 3 rue Koeberlé, F-67000 Strasbourg. Tel : 33 3 90 24 37 57. Fax : 33 3 88 25 11 13. Email: gilles.prevost@medecine.u-strasbg.fr

Running title: Staphylococcal leucotoxins and G. Menestrina

Summary

This minireview is dedicated to the memory of Gianfranco Menestrina (Figure 1), who frequently contributed to ETOX (European workshop on bacterial protein toxins), and tragically died on July 8th, 2004. From the 1993 edition of ETOX6 in Stirling, Scotland, he developed interest and great enthusiasm to the study of staphylococcal bicomponent leucotoxins. Thus, he brought all his experience in biophysics and largely contributed to the success of a fair and fruitful collaboration based on the principle of a lab without walls gathering another complementary field with the structural biology lab of L. Mourey in Toulouse (CNRS-IPBS). He left a wife Alessandra, and a daughter, Sylvia, family, friends and a ten of collaborators who love him.

Key words: bipartite leucotoxins, alpha-toxin, 3D structures, assembly, ionic selectivity

Introduction

Staphylococcus aureus may express different families of toxins, among them are β -barrel pore-forming toxins (Prévost, 2005). From intriguing pore-forming toxins, the staphylococcal leucotoxins have extended both their multiplicity and their phylogenetic conservation among pathogenic bacteria other than *Staphylococcus aureus* (Menestrina et al., 2001). However, they also constitute a very interesting model to master such a bipartite system, to deepen the molecular properties of pore-formation, to illustrate the structural flexibility associated to specific functions and to emphasize the role played by toxins in pathogenicity.

From generic toxins to genomics and the definition of a family of toxins

Before the nineties it is well known that pore-forming toxins secreted by *S. aureus* were represented by alpha, beta, gamma, and delta-hemolysins and the Panton and Valentine leucocidin (PVL)(Prévost, 1999). The beta-hemolysin is a sphingomyelinase and the delta-hemolysin is an alpha-helical peptide containing 26 amino acids. The alpha-toxin forms a homoheptamer whereas the gamma-hemolysin and the PVL are bipartite toxins derived from cotranscribed genes. These bipartite toxins are composed of two proteins, one of class S (31-32 kDa), and one of class F (34-35 kDa), that act synergistically. However, the locus encoding the gamma-hemolysin is composed of 3 ORFs, giving the opportunity to form two different toxins by combining two class S proteins with one class F protein (Menestrina et al., 2001). Other leucotoxins such as LukE-LukD, LukM-LukF PV-like, LukS-I LukF-I (*S. intermedius*) have been now characterised. It appears that these toxins share 55 to 80% of sequence identity within a given class of proteins, whereas the identity is not higher than 28% between the two classes of proteins when comparing with the alpha toxin. Nevertheless, sequence similarities are much higher and suggest that these toxins could be classified into a single family. The analysis of some locus like *lukE-lukD* is more complex since its sequence has a high variability and 2/3 of the operons are not functional. Moreover, this family of toxins has been enlarged by the addition of other toxins secreted by Gram positive bacteria: β -toxin from *Clostridium perfringens*, CytK and HlyA from *Bacillus cereus* (Prévost et al., 2003); and from a Gram negative bacteria: cytolysin (VCC) from *Vibrio cholerae* (Olson et al., 2005).

Sequence homologies are present among all of them and identities are concentrated on the domain that forms a β -barrel and inserts into the membranes.

***Staphylococcus aureus* leucotoxins spectra and clinical associations**

Alpha-toxin and the gamma-hemolysin HlgA-HlgB have certainly the widest cell permeabilising spectrum covering all blood cells, even though alpha-toxin has almost 250-fold less activity on human red blood cells than HlgA-HlgB (Prévost et al., 2001). Additional cells such as endothelial cells, keratinocytes or fibroblasts may be targeted by these two toxins. The other bipartite leucotoxins (PVL, LukM-Luk-PV like, LukE-LukD) show narrower specificities; sharing human polymorphonuclear cells, monocytes and macrophages as common targets. These latter leucotoxins are not present in all leucotoxic strains. In addition, alpha-toxin, HlgA-HlgB and LukE-LukD affect T-lymphocytes. However, any combination of a given class S protein with another class F protein may give a specific leucotoxin (Ferrerias et al., 1998).

Bipartite leucotoxins may exert a critical role in pathogenesis by their lytic activity upon host defence cells and blood reactive cells, and somewhat an economical role by providing cell bulk nutrients useful for the bacterial multiplication and spreading. Only two of them are associated with clinical syndromes. Pantone-Valentine leucocidin presence and production is associated with furuncles, carbuncles and some community pneumonia concerning young adults. The production of LukE-LukD is encountered in almost 35% of strains but is significantly more frequent for strains isolated from bullous impetigo (together with epidermolysins A and B) affecting young children, and for strains issued from antibiotic-associated diarrhoea (together with enterotoxins A, C, D) concerning elderly people (Prévost, 2005).

Mode of action and structures of leucotoxins

Binding of leucotoxins to the plasma membrane reflects their diversity. While some of them (e.g. HlgA-HlgB, HlgC-HlgB, and alpha-toxin) are present in almost all strains, and can create pores into membrane models, others may be more or less sensitive to the presence of specific ligands. Pantone-Valentine leucocidin was initially used to demonstrate that the S protein (LukS-PV) binding is a prerequisite for the binding of the F protein leading to pore

formation. Moreover, the LukS-PV binding can be affected by effectors of the protein kinase pathway such as phorbol myristyl acetate or staurosporin. LukS-PV only competes efficiently with HlgC for the binding to target cells (Gauduchon et al., 2001). HlgA-HlgB or HlgC-HlgB are able to insert and efficiently create pores into PC-CHO (1:1) membrane bilayers (Ferrerias et al., 1998, Meunier et al., 1995). Menestrina's lab has continued to explore the influence of membrane composition and observed that the accessibility of cholesterol is a key parameter that positively influences the capability and rate of pore formation (unpublished data). In fact, specific ligands that remain to be characterized can facilitate and increase kinetics of insertion of some of these pore-forming toxins into membranes. In the same way as alpha-toxin, bicomponent leucotoxins are now assumed to step through a prepore where the transmembrane β -barrel is not formed. Among the numerous features leading to pore formation, a crucial one is the protein-protein interaction between leucotoxin-constituting-proteins. Aligned onto residue His35, which plays a critical role in the assembly and function of alpha-toxin, Thr28 of LukS-PV is also crucial for the secondary binding of LukF-PV (Meunier et al., 1995, Guillet et al., 2004) and many substitutions at this residue resulted in abrogation of this secondary binding. However, cysteine substitution of this residue retains wild type properties in terms of binding and pore formation. We took advantage of this functional substitution on HlgA by introducing several cysteine substitutions in HlgB to engineer heterodimers and checked for their biological activities. It appeared that two purified heterodimers HlgA T28C – HlgB N156C and HlgA T28C – HlgB T157C retained wild type activity (Figure 2) on human polymorphonuclears (PMN), human red blood cells (HRBC), rabbit red blood cells (RRBC) or model membranes (e.g. lipid vesicles and planar lipid bilayers) (unpublished data). These results indicate that a heterodimer can be considered as a functional unit of the pore. HlgA T28C – HlgB N156C has been successfully crystallised and its structure will bring insight into the possible conformational adaptations required for protein-protein interactions and oligomerization.

The comparison of the three-dimensional structures of the alpha-toxin heptamer (Song et al., 1996) and of the secreted and soluble form of LukF-PV (Pédelacq et al., 1999) confirmed the structure-function relationships between these toxins. Basically, the 3D structures are mainly composed of three domains:

i) a β -sandwich of two six stranded β -sheets that forms the core of the proteins; the association of several (6 to 8) β -sandwiches forms the cap of the mushroom-shaped pore (Song et al., 1996). The N-terminal extremity in the alpha-toxin unfolds as the so-called amino latch that contributes to the interactions between two adjacent protomers. This kind of interaction is not evident for bipartite leucotoxins. In fact, their N-termini are shorter, and sequestering the corresponding peptide segments to the β -sandwich core still gives rise to functional toxins (unpublished data),

ii) the rim domain which is the anchor to the membrane contains a mixture of β -strands, helical segments and loops. This domain has been shown to possess a well defined cleft for phosphatidyl-choline binding for alpha-toxin, HlgB and LukF-PV (Guillet et al., 2004). Caveolin-1 would also bind alpha-toxin by a defined peptide motif (Pany et al., 2004). However, both HlgB and LukF-PV also bear the same motif as alpha-toxin despite they are active onto human PMNs that lack caveolin-1. The determination of the LukS-PV structure evidenced a difference in the overall conformation of the rim domain (Guillet et al., 2004),

iii) the central domain of the secreted proteins that constitute leucotoxins appears as three anti-parallel β -strands stacked to the β -sandwich core through hydrophobic interactions. During pore formation, each central domain unfolds into a β -hairpin and association of these supersecondary structures determine the transmembrane β -barrels. Such a deployment was recorded using Fourier Transformed InfraRed (FTIR) spectroscopy (Ferrerias et al., 1998, Comai et al., 2002).

The stoichiometry of the leucotoxins pore has been assessed by different methods. First, Menestrina's lab observed that the HlgA-HlgB pore has a lower conductance (115 pS) than the pore formed by HlgC-HlgB (190 pS) (Ferrerias et al., 1998). Since the only difference between these two leucotoxins is related to the S component (either HlgA or HlgC), they suggested that HlgA is responsible for low conductance pores whereas the presence of HlgC induces a higher conductance pore. Nevertheless, pores formed in a high excess of HlgA or HlgC did not cause any significant changes in the conductance, thus suggesting a fixed 1:1 ratio of the constituted components for each single pore. Octamers were proposed for HlgA-HlgB by using gel shift and site-specific chemical modification during single-channel recording, but hexamers were deduced from FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) experiments combined with a fluorescent microscopy method, confirming our

previous results obtained by SDS-PAGE. Leucotoxins oligomers are less stable in solution than those of alpha-toxin. However, PVL oligomers extracted from living human PMNs and cross-linked with glutaraldehyde showed concatemers with complexity up to hexamers. It cannot be excluded that, according to membrane and toxins, a variation in stoichiometry of leucotoxins may occur. The functionality of each multimer has then to be addressed.

Rapidly after application onto living cells, leucotoxins promote a Ca^{2+} influx, that can be inhibited by econazole, before the entry of monovalent cations that is responsible for cell lysis (Prévost et al., 2003). Monovalent cations such as ethidium entry can be blocked, without modification of the Ca^{2+} influx, by creating disulfide bridges between the stem domain and the core of the proteins, i.e. HlgB Val12Cys-Thr136Cys (Nguyen et al., 2002) or LukF-PV Leu128Cys-Tyr144Cys (unpublished data), or by substitutions or deletions inside the stem domain (Prévost et al., 2003). Therefore, Ca^{2+} influx and monovalent cations entry are independent phenomena. Moreover, the presence of free Ca^{2+} inside the cells is not sensitive to 2-APB (2-aminoethoxydiphenyl borate) indicating no role of calcium stores (unpublished data). Finally, 0.2 mM Zn^{2+} may also inhibit monovalent cations entry by a mechanism that remains to be understood.

Besides single channel conductance, further intriguing differences among staphylococcal pore-forming toxins concern their ionic selectivity. While alpha-toxin forms weak anion selective pores, HlgA-HlgB and HlgC-HlgB pores are cation selective.

Sequence alignment and pore modeling suggested the presence of some charged residues lining the pore lumen (Comai et al., 2002). These residues are important for the conductive properties (Figure 3). In alpha-toxin the charged residues are placed into two rings and are all paired, so the interior of the pore is globally neutral. From the sequence alignment, it is clear that charge distribution along the gamma- hemolysins pore is different. Whether the HlgA-HlgB pore is assembled with a 1:1 stoichiometry, its channel lumen is globally neutral, as for alpha toxin, even though two opposite charges quite distant from one another (i.e. HlgA Lys108 and HlgB Asp121) is present. The HlgC-HlgB pore has instead an unpaired negative charge (i.e. HlgB Asp121), which might cause the higher cationic selectivity.

By removing Lys108 from the HlgA-HlgB pore lumen, the negative charge of Asp121 is not neutralized, and the pore become electrophysiologically similar to that formed by HlgC-HlgB. As expected, this pore shows conductance and selectivity higher than that of the wt and

similar to that of HlgC-HlgB. Instead if the negative charge of Asp121 is removed, the channel becomes anion selective. Removing both charges, the lumen returns neutral as for the wt and its selectivity decreases becoming closer to that of wt.

We concluded that pores of such toxins may function as electrostatic filters and that isolated charges located near the interior of the cell and together with the narrow constriction of the pore are very effective in modulating both conductance and selectivity.

Conclusions

The characterization of bipartite leucotoxins, the evaluation of their biological properties on different membrane systems and the determination of their three-dimensional structures have required the use of many complementary technologies. The multistrategy has largely contributed to characterize leucotoxins according to their binding, cell spectra, functional and structural characteristics. The variety observed for these toxins certainly accounts for their importance with respect to the bacterial virulence. Unfortunately, Gianfranco Menestrina left us just when new exciting perspectives and challenges came to our hands deepening the molecular architecture and function of pores and to progress in the concepts of new toxin inhibitors. He leaves an unanimous impression of a true scientist expressing science as a noble art.

Acknowledgements

This work was granted by the “Direction de la Recherche et des Etudes Doctorales” (UPRES EA-3432). O. Joubert is supported by grants from a research convention between Provincia Autonoma di Trento (Italy), (project StaWars) and Université Louis Pasteur, and the “Conseil Régional d’Alsace”. G. Viero is supported by a PhD grant from the University of Verona (Italy).

References

- Comai, M., Dalla Serra, M., Coraiola, M., Werner, S., Colin, D. A., Monteil, H., Prévost, G., Menestrina, G.: Protein engineering modulates the transport properties and ion selectivity of the pores formed by staphylococcal gamma-haemolysins in lipid membranes. *Mol. Microbiol.* 44, 1251-1267 (2002).
- Ferreras, M., Hoper, F., Dalla Serra, M., Colin, D. A., Prévost, G., Menestrina, G.: The interaction of *Staphylococcus aureus* bi-component gamma-hemolysins and leucocidins with cells and lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1414, 108-126 (1998).
- Gauduchon, V., Werner, S., Prévost, G., Monteil, H., Colin, D. A.: Flow cytometric determination of Panton-Valentine leucocidin S component binding. *Infect. Immun.* 69, 2390-2395 (2001).
- Guillet, V., Roblin, P., Werner, S., Coraiola, M., Menestrina, G., Monteil, H., Prévost, G., Mourey, L.: Crystal structure of leucotoxin S component: new insight into the Staphylococcal beta-barrel pore-forming toxins. *J. Biol. Chem.* 279, 41028-41037 (2004).
- Menestrina, G., Dalla Serra, M., Prévost, G.: Mode of action of beta-barrel pore-forming toxins of the staphylococcal alpha-hemolysin family. *Toxicon* 39, 1661-1672 (2001).
- Meunier, O., Ferreras, M., Supersac, G., Hoepfer, F., Baba-Moussa, L., Monteil, H., Colin, D. A., Menestrina, G., Prévost, G.: A predicted beta-sheet from class S components of staphylococcal gamma-hemolysin is essential for the secondary interaction of the class F component. *Biochim. Biophys. Acta* 1326, 275-286 (1997).
- Nguyen, V.T., Higuchi, H., and Kamio, Y.: Controlling pore assembly of staphylococcal gamma-haemolysin by low temperature and by disulphide bond formation in double-cysteine LukF mutants. *Mol. Microbiol.* 45, 1485-1498 (2002).
- Olson, R., Gouaux E.: Crystal structure of the *Vibrio cholerae* cytotoxin (VCC) pro-toxin and its assembly into a heptameric transmembrane pore. *J. Mol. Biol.* 350, 997-1016 (2005).
- Pany, S., Vijayvargia, R., Krishnasastry, M.V. : Caveolin-1 binding motif of alpha-hemolysin: its role in stability and pore formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 29-36 (2004).
- Prévost, G., Menestrina, G., Colin, D.A., Werner, S., Bronner, S., Dalla Serra, M., Baba Moussa, L., Coraiola, M., Gravet, A., and Monteil, H.: Staphylococcal bicomponent leucotoxins, mechanism of action, impact on cells and contribution to virulence. In: Pore-forming peptides and protein toxins (G. Menestrina, M. Dalla Serra, P. Lazarovici, eds.) pp. 3-26. Taylor & Francis Press, London, NewYork 2003.
- Prévost, G., Mourey, L., Colin, D. A., Menestrina, G.: Staphylococcal pore-forming toxins. In: *Current Topics in Microbiology and Immunology: Pore-forming toxins.* (Goot, F.G.v.d. ed), Vol. 257, pp. 53-83. Springer Verlag, Berlin 2001.

Prévost, G.: The bi-component staphylococcal leucotoxins and γ -haemolysins (toxins). In: The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins (J. E. Alouf and J. H. Freer, eds), pp. 402–418. Academic Press, London, San Diego, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto 1999.

Prévost, G.: Toxins in *Staphylococcus aureus* Pathogenesis. In: Microbial Toxins. Molecular and Cellular Biology. (P. Thomas, ed.), pp. 243-284. Horizon Bioscience, Norfolk, England. 2005.

Song, L., Hobaugh, M. R., Shustak, C., Cheley, S., Bayley, H., Gouaux, J. E.: Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. Science 274, 1859-1866 (1996).

Legends to figures

Figure 1: Gianfranco Menestrina giving a talk at a meeting.

Figure 2: Investigation on residues that may give functional pores of HlgA-HlgB after substitution by cysteines and disulfide bond formation. The 3D structure of HlgA was assimilated to that of LukS-PV (PDB: 1t5r). Location of amino acids of HlgB (PDB: 1LKf) candidates to bridge the Thr28 of HlgA; this last residue is determinant for the secondary interaction of F proteins.

Figure 3. Location of residues determinant for the ionic selectivity of leucotoxins (HlgA, HlgB, HlgC) as they are unbalanced by opposite charged residues. **A.** Transverse cut of the alpha-toxin pore (PDB: 7AHL) that served as a model for the location of specific residues at the mouth of the pore and in the narrow constriction of the stem. **B.** Vertical view of the same amino acids. **C** and **D.** Partial sequence alignments of alpha-toxin, HlgA, HlgB, HlgC corresponding to residues at the mouth of the pore or comprised in the stem of the pore, respectively. Residues determinant for ionic selectivity are shown in bold, the two β -strands forming the β -hairpin are indicated by arrows, and residues facing lipidic bilayers are shown in a grey background.



Fig. 1 Joubert et al., IJMM 2005

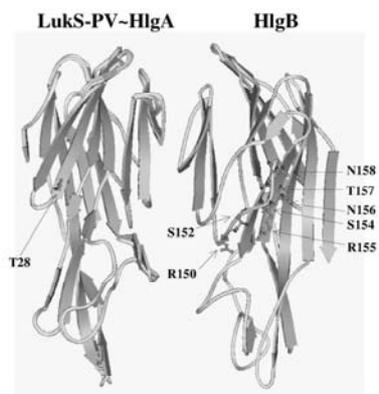
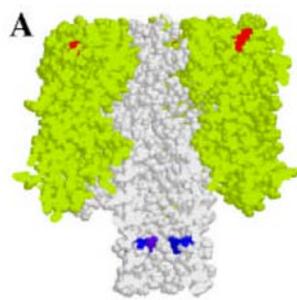


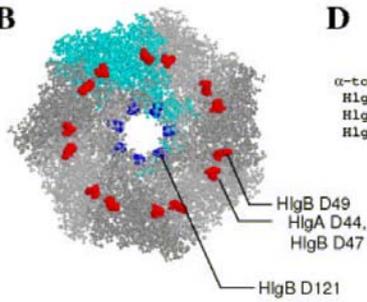
Fig. 2 Joubert et al., IJMM 2005



C

	30	40	50	60	70	
α -toxin	28	YDKENGMHKKVFYSPILDKNHNKLLLVIRTEGTIAGQYRVYSEEGA	73			
HlgB	26	DSDKPFISQILTFNPIKDKSYDRDLVLRKATGNINSGFVKPNPNQY	71			
HlgA	21	TSKRLAITQNIQDFVVDKRYNRDALVVKMQGPISSRTTYSDLKKY	66			
HlgC	23	TSNKGVTQNIQDFVVDKRYNRDALILKMQGPISSRTTYYNYKKT	68			
: : *.:**..:*.:.*::: *.* : . .				

B



D

	110	120	130	140	150	
α -toxin	108	DTREYMSILTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIHGLKRYVQFD	152			
HlgB	106	EFPQVONTLGYTFGGDISI-SNG-LSGGLNGNTAFSETINYKQES	148			
HlgA	101	DSADVSKLGYNIIGGNPOS-APS-IGGSGSFNRSRTISYNQKNV	143			
HlgC	103	ESTNVSQTLGYNIGGNPOS-APS-LGGNGSFNRSISYTOQNV	145			
	:	.: . *.:**..:*.:.*::: *.* : . .				

Fig. 3 Joubert et al.,IJMM 2005