

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

EA-7290 Virulence bactérienne précoce : fonctions cellulaires et contrôle de l'infection aiguë et subaiguë

THÈSE présentée par :

Mira TAWK

soutenue le : **07 juillet 2014**

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

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

**Action et contrôle des leucotoxines de
Staphylococcus aureus sur les
cellules cibles**

THÈSE dirigée par :

Dr. PRÉVOST Gilles
Pr. BOURCIER Tristan

MCU-PH, Université de Strasbourg
Professeur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Pr. FREY Joachim
Dr. LADANT Daniel

PR-PUPH, Université de Berne
DR, Institut Pasteur-Paris

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Dr. FAFI-KREMER Samira
Dr. JOUBERT Olivier

MCU-PH, Université de Strasbourg
MCU, Université de Lorraine

TAWK Mira • tawk.mira@gmail.com

Université de Strasbourg • EA-7290 Virulence bactérienne précoce : fonctions
cellulaires et contrôle de l'infection aiguë et subaiguë

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

À mes parents...

Remerciements

Je tiens à remercier le Pr. Joachim FREY et le Dr. Daniel LADANT d'avoir accepté de juger ce travail, ainsi que le Dr. Samira FAFI-KRAEMER et le Dr. Olivier JOUBERT pour avoir accepté de faire partie du jury.

Toute ma gratitude à Gilles PRÉVOST pour avoir dirigé cette thèse et m'avoir permis de la réaliser dans les meilleures conditions. Merci pour tous les efforts qui ont permis de financer cette thèse, ce qui n'a pas toujours été facile. Merci de m'avoir offert des opportunités de communications, de collaborations et de projets. Je tiens particulièrement à lui exprimer ma gratitude pour son soutien et surtout pour tous les documents administratifs qu'il a dû me faire. J'espère avoir été digne de la confiance qu'il m'a accordée et que ce travail soit finalement à la hauteur de ses espérances.

Merci au Pr. Tristan BOURCIER pour avoir co-encadré ma thèse et pour le financement à travers la Bourse Berthe FOUASSIER.

Je remercie énormément Emmanuel JOVER pour sa disponibilité. Je le remercie pour mon initiation à la microscopie confocale et ses nouvelles idées de manipes. Je le remercie également pour nos discussions qui m'ont beaucoup enrichi et pour tous les conseils qu'il m'a prodigué.

Je remercie Cristina POTRICH et Mauro DALLA SERRA pour leur gentillesse et tout ce qu'ils m'ont appris sur les membranes synthétiques. C'était un plaisir de travailler avec eux. Merci également à Mauro pour son accueil à Trento, et tout ce qu'il a fait pour me faciliter mon séjour.

Je remercie Zouhair ASFARI pour la synthèse des calixarènes et sa disponibilité. Je remercie également nos collaborateurs de l'IPHC : Sarah CIANFERANI et François DEBAENE pour leur travail sur les calixarènes.

Merci à nos collaborateurs de l'Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale (IPBS) de Toulouse : Lionel Mourey et Laurent Maveyraud, qui ont contribué à ce travail.

Merci à Daniëlla VERRA de m'avoir initié à la manipulation des yeux de lapins, surtout à la conservation et à la coupe. Merci également à l'équipe de David HICKS qui m'a permis d'utiliser son cryostat.

Je remercie Jean-Michel SCHEFFTEL et Frédéric SCHRAMM qui m'ont donné l'opportunité de faire le monitorat de Travaux Pratiques de Bactériologie.

Un grand merci à l'Unité Inserm U1110 (Institut de Virologie, Strasbourg) : à Mélanie, Sylvie, Thomas, Bin et les autres qui nous ont cédé les PMNs de leurs « Buffy coats ».

Cette thèse a été soutenue par la fondation de France - Bourse Berthe FOUASSIER, par une bourse de la Région Alsace et par l'EA-7290 de l'Université de Strasbourg.

Je remercie l'ensemble du personnel de l'Institut de Bactériologie

Un grand merci à Daniel KELLER, pour sa disponibilité, pour son savoir faire technique et pour son aide dans la recherche des solutions à tous les problèmes.

Je tiens à exprimer ma gratitude envers Raymonde GIRARDOT, d'abord pour son savoir faire technique et son aide dans les manipes, puis, et surtout, pour ses qualités humaines. Merci de m'avoir fait découvrir l'Alsace et d'avoir essayé de m'apprendre l'alsacien (même si on n'a pas eu le temps de trop avancer). Merci pour sa bonne humeur et les gâteaux lors des pauses quotidiennes avant son départ, et le « ravitaillement » lors de ses visites actuelles.

Je remercie les thésards qui étaient au labo à mon arrivée, Benoît-Joseph, Wardi, Sophie et Khaldoun qui m'ont permis une très rapide intégration dans la vie du labo. Je remercie Gaëlle pour sa serviabilité, sa gentillesse et surtout pour sa bonne humeur et les moments de rigolade. Je la remercie également pour sa contribution aux manipes. Je remercie aussi les nouveaux thésards, Élodie et Xavier pour l'ambiance au labo et les pauses de midi. Je remercie Pauline pour son amitié.

Merci à tous mes amis qui m'ont aidé à passer ces sept ans depuis mon arrivée en France et qui m'ont permis d'oublier momentanément le travail. Elie, mon meilleur ami, avec qui j'ai passé la plupart de mon temps et avec qui j'ai partagé cette expérience. Patrick, Ranine, Omar, Marianne, Ahmad, Ricardos pour leur présence, les sorties, les repas, les voyages que nous avons effectué ensemble... Laurent D., Laurent P., Jérémy, Maïté et les autres avec qui j'ai découvert un autre monde. Je pense aussi à Nisrine et Zeina avec qui je suis restée en contact malgré la distance qui nous sépare.

Enfin, je remercie ma grande famille pour son soutien et son amour. Farid et Monique pour m'avoir hébergée pendant mes premières années à Strasbourg. Samira et Samia pour leur soutien inconditionnel. Georges, Addisé et tous les autres... Je remercie surtout mon père et ma mère, autant pour leur soutien financier que pour leur soutien moral et leurs encouragements pendant les moments les plus durs. Merci pour avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Je remercie Yara, Charbel et Mario rien que pour être là...

SOMMAIRE

CHAPITRE I : INTRODUCTION	1
1. <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	3
<i>Généralités</i>	3
<i>L'évasion du système immunitaire</i>	4
Les enzymes et les peptides antimicrobiens	5
Le système du complément	6
La phagocytose	9
<i>Les facteurs de virulence de S. aureus</i>	10
Régulation des facteurs de virulence	11
Les éléments génétiques mobiles	11
Le « Quorum sensing »	12
Les principaux facteurs de virulence de <i>S. aureus</i>	13
Les facteurs d'adhésion (adhésines)	13
Les exoenzymes	13
Les toxines de <i>S. aureus</i>	14
Les toxines ADP-ribosylantes	14
Les superantigènes	15
Les épidermolysines	16
Hémolysine β (Sphingomyélinase C)	16
Les toxines formant des pores	17
2. TOXINES FORMANT DES PORES	18
<i>Généralités</i>	18
<i>Mode d'action des PFTs</i>	19
<i>Effets des PFTs sur les cellules cibles</i>	20
<i>Les PFTs de S. aureus</i>	22
Hémolysine δ	22
L'hémolysine α	22
Les PFTs bipartites – Les leucotoxines	23
<i>Généralités</i>	23
<i>Les différentes leucotoxines de S. aureus</i>	23
γ -hémolysines	23
Leucocidine de Pantou et Valentine	24
LukE/LukD	25
LukM/LukF'-PV	25
LukG/LukH ou LukA/LukB	25
Structure et Mode d'action	26
Effets cellulaires des leucotoxines	29
3. RÉCEPTEURS DE PFTs DE <i>S. AUREUS</i>	31
<i>Récepteurs de la toxine α</i>	31
La famille de l'A Desintegrin And Metalloprotease (ADAM)	31
ADAM10	32
<i>Récepteurs de LukG/LukH (LukA/lukB)</i>	33
Les intégrines	33
$\beta 2$ integrin macrophage antigen 1 (Mac-1)	34
Signalisation inside-out	35
Signalisation « outside-in »	36

Activités de signalisation non-classiques	37
<i>Récepteurs de Luke/LukD</i>	37
Les récepteurs de chimiokines	38
CCR5	38
CXCR1 et CXCR2	39
<i>Récepteurs de LPV</i>	40
C5aR	40
C5L2	41
<i>Les GPCRs</i>	42
Structure	42
Mode d'action	43
Voies de signalisation activées	43
Signalisation biaisée	45
Internalisation/ recyclage	46
4. INTERNALISATION ET SIGNALISATION CALCIQUE	48
<i>Endocytose</i>	48
Généralités	48
Endocytose dépendante de la clathrine (CDE)	49
Endocytose dépendante des cavéoles	49
Endocytose indépendante de la clathrine et de la cavéoline	51
Endocytose dépendante des Flotillines	51
Endocytose dépendante de RhoA et Cdc42	51
Endocytose dépendante d'Arf6	52
Macropinocytose ou endocytose en phase fluide	52
La phagocytose	52
<i>Le tri intracellulaire</i>	53
Voies de recyclage	53
Voies de dégradation	54
<i>Origine du calcium</i>	57
<i>Shiga-toxine</i>	58
Généralités	58
Structure	58
Mode d'action	59
Fixation	59
Endocytose et transport intracellulaire	59
<i>Exotoxine de Bacillus anthracis</i>	61
Généralités	61
Mode d'action	61
Fixation	63
Endocytose et transport intracellulaire	63
5. OBJECTIFS DE LA THÈSE	64
CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES	65
MATÉRIELS	67
<i>Produits chimiques</i>	67
Calixarènes	67
Autres produits chimiques	68
<i>Tampons</i>	68
CULTURE CELLULAIRE	69
<i>Lignées cellulaires</i>	69
<i>Milieu de culture et stock</i>	70

PURIFICATION DES NEUTROPHILES	70
EXPRESSION ET PURIFICATION DES LEUCOTOXINES	72
COUPLAGE À UN FLUOROCHROME	72
<i>Dosage protéique par la méthode de Bradford</i>	74
TEST D'ACTIVITÉ DES LEUCOTOXINES	74
<i>Spectrofluorimétrie : Détermination de la variation de la concentration intracellulaire en calcium</i>	74
<i>Cytométrie en flux</i>	76
Principe de la cytométrie en flux	76
Détermination de la constante de dissociation de LukS-PV* ou HlgC/HlgB*(K_d)	76
Mesure de la fixation des leucotoxines aux membranes par compétition	77
Détermination de la variation de la concentration intracellulaire en calcium	77
Mesure de l'intégrité membranaire par l'incorporation d'éthidium	78
TEST D'HÉMOLYSE EN POINT FINAL	78
IMAGERIE	79
<i>Fixation des PMNs sur lamelle de verre</i>	79
<i>Microscopie confocale</i>	79
Marquages et fixation des PMNs	79
Observation des lames au microscope confocal	80
DOSAGE MULTIPLEXE DE CYTOKINES	81
OUTILS BIOINFORMATIQUES ET STATISTIQUES	83
<i>Calcul des K_d</i>	83
<i>Calcul des EC_{50} et K_i</i>	83
<i>Calcul des IC_{50} des inhibiteurs</i>	84
<i>Analyses statistiques</i>	85
Analyse statistique de l'activité des LukS-PV mutés	85
Analyse statistique de l'efficacité des calixarènes	85
EXPÉRIMENTATION ANIMALE	85
<i>Ethique et autorisations</i>	85
<i>Modèle d'endophtalmie chez le lapin</i>	86
<i>Injections intravitréennes</i>	87
<i>Euthanasie et Enucléation</i>	88
<i>Congélation et coupes</i>	88
<i>Coloration à l'hématoxyline et l'éosine</i>	88
<i>Immuno-marquage</i>	89
CHAPITRE III : MODE D'ACTION DES LEUCOTOXINES	91
NOUVELLES CELLULES CIBLES DES LEUCOTOXINES ET MODE D'ACTION	93
<i>Introduction</i>	93
<i>Résultats</i>	94
Neurones	94
Article n°1 : Staphylococcal leukotoxins trigger free intracellular Ca^{2+} rise in neurones, signalling through acidic stores and activation of store-operated channels.	95
Rétine de lapin	115
Polynucléaires neutrophiles	116
Article n°2 : Internalization of staphylococcal leukotoxins that bind the C5aR is required for the initiation of intracellular Ca^{2+} mobilization.	117
Effet de la $[Ca^{2+}]$ extracellulaire sur l'action de HlgC/HlgB et de la LPV sur les hPMNs	159
La signalisation des leucotoxines est différente de celle du fMLP	161
Les leucotoxines mettent en jeu des voies de signalisations complexes	163

Effets cellulaires de HlgC/HlgB et de la LPV	167
Identification des résidus essentiels à la fixation de LukS-PV à C5aR	169
Article n°3 : Residues essential for Pantone-Valentine Leukocidin S component binding to its cell receptor suggest both plasticity and adaptability in its interaction surface.....	169
<i>Discussion</i>	183
Conclusion	183
Perspectives	188
CHAPITRE IV : INHIBITION DE L’ACTION DES LEUCOTOXINES DE S. AUREUS	176
<i>LES CALIXARÈNES</i>	193
<i>Introduction</i>	193
<i>Résultats</i>	199
Inhibition de l’action des leucotoxines sur les hPMNs.....	199
HlgC/HlgB et la LPV	199
Les autres leucotoxines.....	202
Evaluation de l’effet hémolytique des calixarènes	203
Evaluation de l’effet leucocytotoxique des calixarènes	204
Réévaluation de l’effet inhibiteur des calixarènes.....	205
Recherche d’un effet antibiotique de ces calixarènes	206
<i>Conclusion</i>	207
Perspectives	208
CHAPITRE V : CONCLUSION	211
PATHOLOGIES ASSOCIÉES A HLG C/HLG B ET A LA LPV	213
RÔLE DES LEUCOTOXINES DANS LES PATHOLOGIES.....	215
CONCLUSION GÉNÉRALE	216
CHAPITRE VI : BIBLIOGRAPHIE.....	219

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU II. 1 : LES DIFFÉRENTS CALIXARÈNES UTILISÉS	67
TABLEAU II. 2 : RÉFÉRENCES ET DOSES DES DROGUES UTILISÉES POUR L'EXPÉRIMENTATION ANIMALE.....	86
TABLEAU III. 1 : TABLEAU RÉCAPITULATIF DES EFFETS DES DIFFÉRENTS INHIBITEURS SUR L'AUGMENTATION DE LA $[Ca^{2+}]_i$ PAR RAPPORT À L'EFFET DE LA TOXINE.	165
TABLEAU IV. 1 : RÉSUMÉ DES IC50 DES DIFFÉRENTS CALIXARÈNES SUR HLGc/HLGB ET LA LPV	201
TABLEAU IV. 2 : IC50 DES CALIXARÈNES SUR LA FIXATION DE 1 nM DE LUKS*-PV SUR LES HPMNs AVANT ET APRÈS NEUTRALISATION DES CALIXARÈNES.	205
TABLEAU IV. 3 : EFFET DES CALIXARÈNES SUR LA PERMÉABILISATION DE LA MEMBRANE DE HPMNs AU BET.....	206
TABLEAU V. 1 : EFFETS CELLULAIRES DES DIFFÉRENTS COUPLES DE LEUCOTOXINES.....	218

LISTE DES FIGURES

FIGURE I. 1 : <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	3
FIGURE I. 2 : EVASION DU SYSTÈME DU COMPLÉMENT.....	7
FIGURE I. 3 : SCHÉMA SIMPLIFIÉ DU CYCLE D'UN BIOFILM.....	11
FIGURE I. 4 : LES PRINCIPAUX FACTEURS DE VIRULENCE DE <i>S. AUREUS</i>	17
FIGURE I. 5 : MODE D'ACTION DES PFTs.....	20
FIGURE I. 6 : STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DE SOUS-UNITÉS DE LEUCOTOXINES BIPARTITES.....	27
FIGURE I. 7 : STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DU PORE FORMÉ PAR HlGA-HlGB.....	29
FIGURE I. 8 : ADAM10.....	32
FIGURE I. 9 : PHAGOCYTOSE INDUITE PAR MAC-1.....	35
FIGURE I. 10 : STRUCTURE TRI-DIMENSIONNELLE DE CXCR1 ET CCR5.....	38
FIGURE I. 11 : MÉCANISME D'ACTION DES GPCRs.....	44
FIGURE I. 12 : ENDOCYTOSE ET TRI INTRACELLULAIRE.....	56
FIGURE I. 13 : MÉCANISME D'ACTION DE LA SHIGA-TOXINE.....	60
FIGURE I. 14 : MÉCANISME D'ACTION DE L'EXOTOXINE DE <i>BACILLUS ANTHRACIS</i>	62
 FIGURE II. 1: PURIFICATION DES PMNS.....	 71
FIGURE II. 2 : IMMUNO-MARQUAGE EN SANDWICH POUR DOSAGE BIO-PLEX (MANUEL BIORAD).....	82
 FIGURE III. 1 : COUPES DE RÉTINE DE LAPIN ALBINS DE RACE NEW ZEALAND.....	 115
FIGURE III. 2 : EFFETS DE HlGC/HlGB ET LA LPV SUR LA VARIATION DE LA $[Ca^{2+}]_i$ LIBRE EN PRÉSENCE ET EN ABSENCE DE Ca^{2+} EXTRACELLULAIRE.....	159
FIGURE III. 3 : EFFET DU Ca^{2+} EXTRACELLULAIRE SUR LA FIXATION DES LEUCOTOXINES.....	160
FIGURE III. 4 : EFFET DU Ca^{2+} EXTRACELLULAIRE SUR L'ENTRÉE DE BET DANS LES HPMNS.....	161
FIGURE III. 5 : COMPARAISON DE L'EFFET DE 1 μ M DE fMLP (BLEU) ET 1,2 nM DE C5A (ROUGE) SUR LES HPMNS.....	162
FIGURE III. 6 : EFFETS DU fMLP ET DU C5A DANS LES HPMNS EN PRÉSENCE DE THAPSIGARGINE OU D'IONOMYCINE.....	162
FIGURE III. 7 : EFFETS DE DIVERS INHIBITEURS SUR LA SIGNALISATION CALCIQUE DE HlGC/HlGB.....	164
FIGURE III. 8 : EFFET DE L'IONOMYCINE SUR LA SIGNALISATION DE LA LPV.....	166
FIGURE III. 9 : DOT PLOTS DES HPMNS SOUS L'EFFET DE HlGC/HlGB ET LA LPV À 30 ET 60 MIN.....	167
FIGURE III. 10 : EFFETS DE HlGC/HlGB (CB) ET LA LPV (SF) SUR LA SÉCRETION DE L'IL8 ET L'IL1-RA PAR LES HPMNS.....	168
 FIGURE IV. 1 : STRUCTURE TYPE D'UN CALIX[N]ARÈNE,.....	 193
FIGURE IV. 2 : STRUCTURE DE SC4, SC6 ET SC8 (PERRET ET AL., 2006).....	195
FIGURE IV. 3 : STRUCTURES PLANES (GAUCHE) ET 3D (DROITE) DU THIA-SC4, DU CARBOXYMÉTHOXY- <i>P</i> -SULFONATE PHÉNOL, DU DCM-SC4 ET DU MC-SC4.....	197
FIGURE IV. 4 : STRUCTURES PLANES (GAUCHE) ET 3D (DROITE) DU BIS-BENZO-SC4, DU BIS-NAPHTO-SC4, DU BIS-DIBENZO-SC4 ET DU BIS-ESCULETIN-SC4.....	198
FIGURE IV. 5 : EFFET DES CALIXARÈNES SUR LA PERMÉABILISATION DES HPMNS AU BET DUE À HlGC/HlGB ET LA LPV.....	200
FIGURE IV. 6 : EFFETS DES CALIXARÈNES SUR HlGA/HlGB ET LUKE/LUKD.....	202
FIGURE IV. 7 : TEST D'HÉMOLYSE DES CALIXARÈNES.....	203
FIGURE IV. 8 : EFFETS DU BIS-DIBENZO-SC4 ET DU SC8 ZA(1) SUR LES HPMNS.....	204

Abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
[Ca ²⁺] _i	concentration de calcium intracellulaire
ADAM	A Desinegrin And Metalloprotease
agr	accessory gene regulator
AIP	Auto-Inducteur Peptide
AMPc	Adénosine MonoPhosphate cyclique
AP2	Adaptor Protein complex-2
APP	précurseur de plaque amyloïde
ATP	Adénosine-5'-TriPhosphate
BAR	Bin-Amphiphysin-Rvs167
Bb	sous-unité protéase du facteur B
BET	Bromure d'ETHidium
Bis-Benzo-SC4	tétra-sulfonate de Na-bis-benzo-couronne-6-calix[4]arène
Bis-Dibenzo-SC4	<i>para</i> -sulfonate de Na-bis-(dibenzo)-couronne-6-calix[4]arène
Bis-Esculetin-SC4	tétra-sulfonate de Na-bis-esculetin-couronne-6-calix[4]arène
Bis-Naphto-SC4	tétra-sulfonate de Na-bis-naphto-couronne-6-calix[4]arène
C5aR	C5a Receptor
Ca ²⁺	Calcium
cADPR	Adenosine 5'-Diphosphate Ribose cyclique
CaM	CalModuline
CamKII	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase
CAV	CAVéoline
CCP	Clathrin Coated Pits
CCR5	Récepteur à C-C chimiokine de type 5
CCV	Clathrin-Coated Vesicles
CDC	Cytolysines Dépendantes du Cholestérol
Cdc42	Cell division control protein 42
CDE	Clathrin Dependent Endocytosis
ChAT	Choline acetyltransferase
CHIPS	CHemotaxis Inhibitory Protein of <i>S. aureus</i>
CICR	Calcium Induced Calcium released
CIE	Clathrin Independent Endocytosis
Clf	Clumping Factor
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMH I ou II	Complexe Majeur d'Histocompatibilité I ou II
Coa	Coagulase
CTb	sous-unité B de la toxine cholérique
CXCR	récepteur à C-X-C chimiokine
DAG	diacylglycérol
DCM-SC4	1,3-dicarboxyméthoxy- <i>p</i> -tétra-sulfonate de Na-calix[4]arène
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DRG	neurones sensoriels du ganglion spinal

DSF	Differential Scanning Fluorescence
DTT	Dithiothreitol
Eap	Extracellular adherence protein
EC50	concentration efficace médiane
ECL	ExtraCellular Loop
ECM	ExtraCellular Matrix
EDIN	Epidermal Cell Differentiation Inhibitors
eDNA	ADN extracellulaire
EEA1	Early Endosome Antigen 1
EF	Edema Factor
Efb	Extracellular fibrinogen binding protein
EGTA	Ethylène Glycol-bis (β-amino éthyl éther) N, N, N', N' TétrAcétate
EHD2	Eps-15 Homology Domain-containing protein 2
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
Emp	ECM binding protein
ERAD	Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation
ERC	Endocytic Recycling Compartment
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinases
ESCRT	Endosomal Sorting Complexes Required for Transport
ESI-MS	Electrospray Ionization Mass Spectrometry
ET	Edema Toxin
ETs	Exfoliative Toxins
F5M	Fluorescéine 5-Maléïmide ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 521 \text{ nm}$)
FbpA	Fibrinogen binding protein A
Fc	Fragments constants des anticorps
FcαRI	Fc fragment of IgA receptor I
FcγRs	Fc fragment of IgG receptors
FERM	Protein 4.1, Ezrin, Radixin, And Moesin
Fluo-3 AM	Fluo-3 AcétoxyMéthylesther ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$)
fMLP	N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine
Fnbp	Fibronectin binding protein
FPR	N-Formyl Peptide Receptor
FPRL1	FPR Like-1
FSC	Forward SCatter
Fura-2 AM	Fura-2 AcétoxyMéthylesther ($\lambda_{\text{ex}} = 340/380 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 510 \text{ nm}$)
GEEC	GPI-Enriched Early Endosomal Compartment
GEF	Guanine Exchange Factor
GPCR	G Protein-Coupled Receptor
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
GRK	G protein-coupled Receptor Kinases
GST	Glutathion-S-Transférase
HCAb	"Heavy Chain Only Antibody", anticorps à chaîne lourde humanisés
Hla	hémolysine α ou toxine α
HlgA, HlgB, HlgC	γ-hémolysine A, B, C

hPMNs	PolyMorphoNucléaires humains
IC50	concentration inhibitrice médiane
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
ICL	IntraCellular Loops
IgA	Immunoglobulin A
IgG	Immunoglobulin G
IL	InterLeukin
ILVs	IntraLuminal Vesicles
IP3	Inositol TrisPhosphate
IP3R	IP3 Receptor
iPLA2	calcium-independent PhosphoLipase A2
JNKs	c-Jun N-terminal Kinase
K ⁺	potassium
K _d	constante de dissociation
kDa	kiloDalton
k _i	constante d'inhibition apparente
LF	Lethal Factor
LL-37	cathélicidine 37
LPS	LipoPolySaccharide
LPV	Leucocidine de Panton et Valentine de <i>S. aureus</i>
LT	Anthrax Lethal Toxin
MAC	Membrane Attack Complex
Mac-1	β2 integrin Macrophage antigen 1
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MBL	Mannose Binding Lectine
MC-SC4	1,3-dicarboxyméthoxy-2,4-MonoCouronne-6- <i>p</i> -tétra-sulfonate de Na-calix[4]arène (MonoCouronne-SC4)
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MFI	médiane de fluorescence
MGE	Mobile Genetic Elements
Mpb	Méga paires de bases
MRSA	Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus Aureus</i>
MSCRAMMs	Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules
MSSA	Methicillin-Sensitive <i>Staphylococcus Aureus</i>
MURC	MUScle-Related Coiled-Coil protein
MVBs	MultiVesicular Bodies
Na ⁺	Sodium
NAADP	Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide PHosphate
nanoESI-MS	spectrométrie de masse par ionisation Electrospray
NCX	Sodium-Calcium Exchanger
NETs	Neutrophil Extracellular Traps
NF-κB	Nuclear Factor-kappa B
NK	Natural Killers

NLRP3	NOD-Like Receptor Protein 3
NLRs	Nod-Like Receptors
NRD convertase	N-arginine Dibasic convertase
OatA	O-acetyltransferase A
ORAI 1	Calcium release-activated calcium channel protein 1
ORF	Open-Reading Frames
PA	Protective Antigen
PACSLN2	PKC And Casein kinase Substrate In Neurons 2
PAF	ParaFormAldéhyde
Pak1	Serine/threonine-protein kinase
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC	PhosphatidylCholine
PFT	Pore Forming Toxin
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PI3P	Phosphatidylinositol-3-Phosphate
PIP2	Phosphoinositol-4,5-Biphosphate
PIP3	Phosphoinositol-3,4,5-Triphosphate
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine Kinase C
PLA2	PhosphoLipase A ₂
PLC	PhosphoLipase C
PLD	PhosphoLipase D
PLM	Membranes Lipidiques Planes
PMA	Phorbol 12-Myristyl-13-Acetate
PMN	PolyMorphoNucléaires
PMT	Photomultiplicateur
PSGL-1	P-Selectin Glycoprotein Ligand-1
PTRF	Protein Polymerase 1 Transcript Release Factor
Rap1	Ras-proximate-1 ou Ras-related protein 1
RE	Réticulum Endoplasmique
RhoA	Ras homolog gene family, member A
RIP	Regulated Intramembrane Proteolysis
ROS	Reactive Oxygen Species
RPS	Résonance Plasmonique De Surface
RTX	Repeats-in-Toxin
RyRs	Ryanodin Receptor
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SAK	StaphyloKinase
SC4 ZA	SC4 synthétisé par Zouhair Asfari
SC4, SC6 ou SC8	para-sulfonato-calix[4,6 ou 8]arène
SC8 Acros	SC8 fournit par Acros organics (Geel, Belgique)
SC8 Acros	SC4 fournit par Acros organics (Geel, Belgique)

SC8 ZA(1)	SC8 synthétisé par Zouhair Asfari (1)
SCIN	Staphylococcal Complement INhibitor
SCn	para-sulfonato-calix[n]arènes
SDPR	Serum Deprivation-Response Protein
SEI	Staphylococcal Enterotoxin-like
SEM	Standard Error of the Mean
SERAMs	Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules
SEs	Staphylococcal Enterotoxins
SNC	Système Nerveux Central
SOCs	Store-Operated Channels
SpA	Staphylococcal protein A
SRBC	SDPR-Related gene product that Binds to C-kinase
SREBPs	Sterol Reponsive Element Binding Proteins
SSC	Side SCatter
SSL	Staphylococcal Superantigen-Like proteins
SSL-7	Staphylococcal Superantigen-Like protein 7
SSSS	Staphylococcal Scaled Skin Syndrome
STECs	Shiga Toxin-producing <i>Escherichia Coli</i>
STIM1	STromal Interaction Molecule 1
Stx	Shiga-toxine
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TA	Température Ambiante
TCR	$\alpha\beta$ T Cell Receptor
TE	Tris EDTA
Th	lymphocytes T helper
Thia-SC4	thia-calix[4]arène
TIAM	T-Cell Lymphoma Invasion And Metastasis 1
TLR2	Toll Like Receptor 2
TLR4	Toll-Like Receptor 4
TNF- α	Tumor Necrosis Factor Alpha
Tris	Tris (hydroxyméthyl) aminométhane
TSS	Toxic Shock Syndrome
TSST-1	Toxic Shock Syndrome Toxin-1
UPR	Unfolded Protein Response
α -PFTs	toxines formant des pores à hélices α
β -PFTs	toxines formant des pores à feuillets β

CHAPITRE I : INTRODUCTION

S. aureus peut être commensal et pathogène de l'homme. Cette bactérie est un composant de la flore chronique du nasopharynx chez environ 30% des personnes en bonne santé (van Belkum et al., 2009a; van Belkum et al., 2009b; Wertheim et al., 2005). Le portage par des individus sains est plus fréquent chez les hommes que chez les femmes (Andersen et al., 2012; Ruimy et al., 2010) et pendant l'enfance (Lebon et al.; Regev-Yochay et al., 2004). Cette bactérie peut infecter tous les tissus du corps humain ; les types d'infections associés pouvant être simples et locaux ou systémiques comme les septicémies et le syndrome du choc toxique (TSS ou « Toxic Shock Syndrome »). Elles peuvent affecter aussi bien des hôtes en bonne santé que des patients immunodéprimés (Lowy, 1998). La forte morbidité et mortalité, et l'émergence des infections de souches multi-résistantes aux antibiotiques, dont les souches résistantes à la méticilline (MRSA), ont fait de *S. aureus* un sérieux problème de santé (Klein et al., 2007).

De plus, la pathogénicité de *S. aureus* est amplifiée par sa capacité à former des biofilms qui prolifèrent sur diverses surfaces inertes ou biologiques et surtout les instruments médicaux. Ces biofilms jouent un rôle majeur dans les infections nosocomiales, 60 à 70 % de ces infections sont liées à l'implantation d'un dispositif médical/chirurgical. Les biofilms constituent un consortium structuré de bactéries enkystées dans une matrice adhésive et protectrice. En fonction de l'espèce bactérienne, le type de souche et des conditions environnementales, la matrice du biofilm est constituée de substances de nature chimique variée telles que des exopolysaccharides, des protéines, des acides teichoïques et de l'ADN extracellulaire (eDNA). Les biofilms bactériens sont capables de résister aux antibiotiques, aux désinfectants, à la phagocytose et à d'autres composants du système de défense inflammatoire et immunitaire inné et adaptatif de l'hôte (Costerton et al., 2005; Hoiby et al., 2011; Stewart and Costerton, 2001).

L'EVASION DU SYSTEME IMMUNITAIRE

Suite à une infection, le système immunitaire inné constitue la première ligne de défense de l'organisme contre les pathogènes (Medzhitov and Janeway, 2000). Ce système repose sur trois mécanismes majeurs : (1) les enzymes et les peptides antimicrobiens, (2) le système du complément et (3) la phagocytose (Medzhitov and Janeway, 2000; Rooijakkers et al., 2005b). La reconnaissance des molécules associées aux pathogènes (« pathogen-associated molecular patterns » (PAMPs) (Fedtke et al., 2004; Kumar et al., 2011)) déclenche la libération des composants antimicrobiens et de chimio-attractants permettant le recrutement des cellules immunitaires. Cependant, *S. aureus* a élaboré un arsenal de mécanismes pour échapper à la réponse immunitaire innée de l'hôte, comportant des modifications de ses composants structuraux et la sécrétion d'une large variété de protéines spécifiques qui agissent en synergie

pour contourner les défenses immunitaires et créer un microenvironnement propice à la survie de la bactérie (Fedtke et al., 2004; Rooijakkers et al., 2005b).

LES ENZYMES ET LES PEPTIDES ANTIMICROBIENS

Les peptides antimicrobiens sont formés de moins de 50 acides aminés ; ils sont cationiques et amphiphiles ce qui permet leur interaction avec la surface membranaire anionique des pathogènes. L'accumulation des peptides à la surface des bactéries conduit à la formation d'un pore, ou « gap », et aboutit à la bactériolyse (Hancock and Diamond, 2000; Hancock and Scott, 2000; Jenssen et al., 2006; Otto; Schaubert and Gallo, 2009). Trois grandes familles de peptides antimicrobiens ont été identifiées : les défensines, les cathélicidines et les chromogranines, auxquelles peuvent s'ajouter les peptides dérivés des chromogranines et sécrétogranines.

Les enzymes antimicrobiens sont des polypeptides largement présents dans le règne animal et végétal. Le plus important est le lysozyme (1,4-8-N-acetylmuraminidases) qui exerce une activité antimicrobienne en hydrolysant les peptidoglycanes des parois bactériennes et en activant les autolysines (Masschalck and Michiels, 2003). Il peut également provoquer une perturbation de la membrane par la fixation d'un domaine spécifique du lysozyme avec la surface bactérienne (Masschalck et al., 2002).

S. aureus module sa sensibilité aux défensines et à un large spectre de peptides antimicrobiens en modifiant la composition des phospholipides et la charge nette des acides lipoteichoïques et des acides teichoïques de la paroi (Kraus and Peschel, 2008; Peschel, 2002; Rooijakkers et al., 2005b). L'expression de certains gènes de *S. aureus* permet de réduire la charge superficielle négative des acides teichoïques ce qui réduit l'attractivité pour divers peptides, dont la cathélicidine LL-37, qui a un rôle bactéricide contre les staphylocoques, et d'autres peptides antimicrobiens. LL-37 est également inactivée par l'auréolysine, une protéase extracellulaire sécrétée par *S. aureus*. La résistance au lysozyme est liée aux changements dans la composition du peptidoglycane, et plus particulièrement par O-acétylation de l'acide N-acétylmuramique grâce à la protéine membranaire intégrale « O-acetyltransferase A », ou OatA (Bera et al., 2005). Certaines souches de *S. aureus* (67%) sécrètent une staphylokinase (SAK) qui en plus de son rôle dans l'activation du plasminogène permet d'inactiver différentes défensines (Jin et al., 2004). Enfin, en plus de l'inactivation des peptides antimicrobiens, l'activité de facteurs de virulence sécrétés par *S. aureus* peut être augmentée par l'interaction avec certains peptides antimicrobiens. Ainsi, l'interaction entre la cathélicidine et SAK amplifie la fibrinolyse suite à

l'activation du plasminogène et augmente la dissémination bactérienne et l'infection dans un modèle de pneumonie (Braff et al., 2007).

LE SYSTEME DU COMPLEMENT

Le système du complément est un ensemble de protéines du sérum qui peut être activé par 3 voies différentes selon le mode de reconnaissance, mais toutes les voies convergent en un point commun qui est le clivage de C3 (Figure I.2). Les 3 voies du complément génèrent des convertases C3, des complexes enzymatiques associés à la membrane qui clivent le C3. L'activation du C3 permet la libération de la molécule chimio-attractante C3a et le dépôt de molécules C3b à la surface microbienne. C3b et son produit de dégradation, le C3bi, marquent le microbe pour une phagocytose efficace (opsonisation).

La voie classique et la voie « lectine » (médiée par les anticorps) comportent une molécule C4b, attachée de manière covalente à la surface microbienne, et une protéase C2a faiblement liée à C4b. Alors que la voie alternative comporte une molécule C3b associée à la surface bactérienne et liée à la sous-unité protéase du facteur B (Bb). C4b2a et C3bBb (les 2 convertases C3) partagent de grandes similarités de structure et de fonction et sont des complexes instables. La liaison d'une molécule C3b à un de ces complexes change la spécificité de la convertase et génère la convertase C5. Le clivage de C5 libère le C5a, un important chimio-attractant. Enfin, C5b sert de base pour la formation de complexes comportant C5b-C9 qui lysent la membrane et détruisent certaines bactéries (Gasque, 2004; Sahu and Lambris, 2001). C5a, C3a et les peptides bactériens formylés attirent les phagocytes au site d'infection.

Le rôle du complément est donc : d'opsoniser les bactéries (C3b), de recruter les phagocytes, grâce à des molécules chimio-attractantes (C3a et C5a) et de perturber les membranes bactériennes (C5b-C9). Cependant, les bactéries à Gram (+) et les champignons résistent mieux à la lyse directe par le complément, puisque leur membrane est protégée par une épaisse paroi. Ainsi, dans la défense contre *S. aureus*, le rôle du complément réside surtout dans son rôle dans l'opsonisation qui est un processus par lequel les protéines du complément (C3b) ou des anticorps recouvrent la membrane de la cellule cible pour favoriser sa phagocytose. Néanmoins, *S. aureus* a développé plusieurs stratégies pour échapper à ce processus (Figure I.2).

La **protéine A** (SpA) présente chez toutes les souches de *S. aureus* est capable de fixer la partie Fc des IgG bloquant la phagocytose médiée par les récepteurs de Fc, mais également l'activation de la voie classique du complément qui nécessite la reconnaissance des Fc par la protéine C1q (Cedergren et al., 1993; Rooijakkers et al., 2005b).

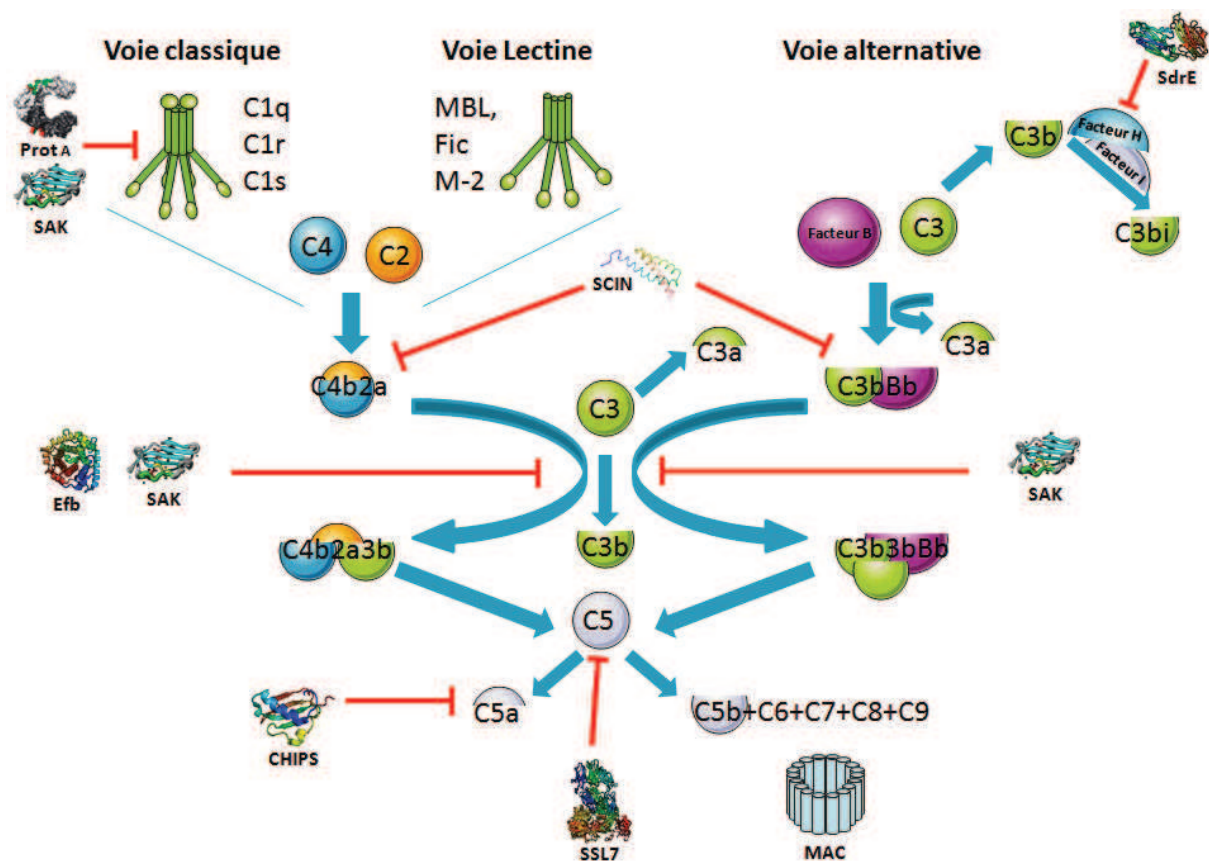


Figure I. 2 : Evasion du système du complément

Dans les voies « classique » et « lectine », C1q, MBL (Mannose Binding Lectine), et les ficolines sont les composants de reconnaissance des voies classique et lectine alors que C1r, C1s, M-2 (MASP-2) jouent le rôle de protéases. Le clivage des composants C2 et C4 (voies « classique » et « lectine ») et du composant C3 et du facteur B (voie « alternative ») permet la formation des deux convertases C3 (C4b2a et C3bBb). Ces convertases clivent le C3 en C3a qui est libéré et C3b qui se lie à la membrane du pathogène ainsi que son produit de clivage par le facteur I, le C3bi (opsonisation). La fixation d'un C3b aux convertases C3 (C4b2a et C3bBb) permet la formation des convertases C5 (C4b2a3b et C3b3bBb) qui clivent le C5 en C5a et C5b qui s'associe avec les composants du complément C6-C9 pour former le complexe d'attaque membranaire (membrane attack complex ou MAC). Les facteurs de *S. aureus* qui permettent l'évasion au système du complément sont: la staphylokinase (SAK), la protéine A (SpA), la « staphylococcal complement inhibitor » (SCIN), le facteur d'adhésion Efb, la « staphylococcal superantigen-like protein 7 » (SSL-7), la protéine CHIPS et SdrE qui inhibe la dégradation de C3b en C3bi.

De plus, toutes les souches de *S. aureus* sécrètent une famille de protéines, les « **staphylococcal superantigen-like proteins** » (SSL) dont la structure est similaire aux superantigènes, mais qui ne possèdent pas les acides aminés importants pour leur liaison au complexe majeur d'histocompatibilité II (CMH II) ou aux récepteurs des lymphocytes T (TCR ou $\alpha\beta$ T cell receptor) (Arcus et al., 2002; Williams et al., 2000). La protéine SSL-7 se fixe au composant C5 et empêche l'activation du complément, alors que les superantigènes ne se fixent pas sur le complément

(Miwa et al., 2003). Cette protéine se lie également aux IgA humains et interfère avec leur fixation aux récepteurs FcαRI (ou CD89) cellulaires (Langley et al., 2005).

La sécrétion de **SAK** agit également sur le système du complément. En effet, SAK active le plasminogène présent à la surface des bactéries qui se transforme en plasmine et peut alors cliver aussi bien les IgG, C3b et C3bi. La diminution du nombre de molécules C3b et C3bi à la surface de *S. aureus* diminue ainsi l'activation des convertases C3, ainsi que des convertases C5. La plasmine formée par la conversion de plasminogène par SAK permet donc la suppression de ces molécules importantes pour l'opsonisation (IgG, C3b et C3bi) et la reconnaissance par les cellules immunitaires (Rooijakkers et al., 2005c).

Le **facteur d'adhésion Efb** sécrété par *S. aureus* lie le fibrinogène, mais il est également capable de lier la région C3d de C3 et bloque ainsi l'opsonisation et la phagocytose dépendantes de la voie classique du complément (Lee et al., 2004a; Lee et al., 2004b; Sharp et al., 2012).

S. aureus, comme d'autres pathogènes, lie le **facteur H** à sa surface grâce à la protéine associée à la membrane SdrE (Sharp et al., 2012), pour se protéger contre l'attaque du complément. Le facteur H est un régulateur du système du complément humain qui accélère la dissociation des convertases C3, mais agit aussi comme co-facteur du clivage de C3b en C3bi par le facteur I (Kraiczy and Wurzner, 2006; Zipfel et al., 2002).

De plus, 60% des souches de *S. aureus* sécrètent une protéine inhibitrice de la chimiotaxie (« Chemotaxis Inhibitory Protein of *S. aureus* » (CHIPS)) qui se lie spécifiquement sur les récepteurs C5aR et FPR et bloque complètement la liaison des ligands et les signaux de transduction (de Haas et al., 2004; Veldkamp et al., 2000). Ces récepteurs présents sur différentes cellules de l'immunité, dont les neutrophiles, reconnaissent C5a et des peptides formylés qui transmettent les premiers signes d'une invasion bactérienne.

Enfin, 90% des souches de *S. aureus* sécrètent un inhibiteur du complément très efficace, « **Staphylococcal Complement INhibitor** » (SCIN) (Rooijakkers et al., 2005a). Cette protéine bloque toutes les voies du complément suite à son interaction avec les convertases C2a–C4b et Bb–C3b. En stabilisant ces complexes enzymatiques au niveau de la surface bactérienne, elle perturbe leur activité enzymatique. Ainsi, elle empêche également la production de C5a, la phagocytose et l'élimination des staphylocoques (Rooijakkers et al., 2005b; Rooijakkers and van Strijp, 2007).

Les phagocytes sont capables d'ingérer, de tuer et de digérer des bactéries en quelques minutes. Les neutrophiles sont les cellules les plus nombreuses et les mieux équipées pour combattre les bactéries. Elles sont les premières cellules qui arrivent au site d'infection. Elles sécrètent une grande variété de protéases, de lipases, de peptides antimicrobiens et d'amidases et un arsenal important de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) (Mayer-Scholl et al., 2004; Roos et al., 2003). Les neutrophiles expriment des récepteurs de Fc et du complément qui induisent une phagocytose initiée par des anticorps et le système du complément pour englober les bactéries opsonisées dans les phagosomes (Segal, 2005).

A part les facteurs cités précédemment qui inhibent la phagocytose en altérant l'opsonisation, *S. aureus* sécrète des protéines qui agissent sur la migration des leucocytes pour les empêcher d'atteindre le site d'infection dont SSL-5, l'« Extracellular Adherence Protein » (Eap) et CHIPS. Le polypeptide bactérien SSL-5 se fixe directement aux neutrophiles par le ligand « P-selectin glycoprotein ligand-1 » (PSGL-1) et inhibe le phénomène de roulement sur les cellules endothéliales lors de la chimiotaxie (Bestebroer et al., 2007). Eap inhibe la chimiotaxie suite à son interaction directe avec des protéines d'adhésion de l'hôte comme l'« Intercellular Adhesion Molecule 1 » (ICAM-1), le fibrinogène et la vitronectine (Chavakis et al., 2002; Geisbrecht et al., 2005; Haggart et al., 2004). A part son action sur les C5aR, la molécule CHIPS bloque l'action du FPR qui est le récepteur des chimio-attractants les plus puissants, les peptides N-formylés (de Haas et al., 2004; Veldkamp et al., 2000).

Les pigments caroténoïdes de *S. aureus* qui lui confèrent sa coloration dorée sont de puissants antioxydants qui neutralisent les ROS (Liu et al., 2005). La catalase et des enzymes superoxyde dismutases bactériennes dégradent les espèces réactives de l'oxygène produits par les cellules phagocytaires suite à l'ingestion de la bactérie (Karavolos et al., 2003). *S. aureus* peut également avoir un programme de survie dans les neutrophiles qui lui permet d'échapper aux défenses de l'hôte. En effet, *S. aureus* est capable de se répliquer dans le phagosome ou librement dans le cytoplasme des cellules hôtes. Il échappe au phagosome des phagocytes professionnels et non-professionnels, subvertit l'autophagie et induit des mécanismes de mort cellulaire tels que l'apoptose et la pyronécrose, et peut induire des programmes anti-apoptotiques dans les phagocytes (Fraunholz and Sinha, 2012).

Enfin, *S. aureus* produit des toxines cytolytiques qui endommagent les membranes des cellules immunitaires de l'hôte, induisant une lyse osmotique et empêchant la phagocytose (Foster,

2005; Rooijakkers et al., 2005b). Ces toxines seront traitées en détail dans la partie 2 de cette introduction.

LES FACTEURS DE VIRULENCE DE *S. AUREUS*

La grande pathogénicité de *S. aureus* réside probablement dans la très grande variété des facteurs de virulence qui peuvent être produits et sécrétés par cette bactérie. Ils lui permettent d'adhérer à la surface, d'envahir ou d'échapper au système immunitaire et d'avoir un effet toxique chez l'hôte (Figure I.4) (Lowy, 1998). Ces facteurs varient entre les différentes souches de *S. aureus*. La plupart des cas sévères d'infections à *S. aureus* ne peuvent pas être expliqués par l'action d'un seul des facteurs de virulence, mais par une combinaison de l'action de différents facteurs.

De plus, certains de ces facteurs jouent un rôle important pour la formation de biofilms. La production du biofilm staphylococcique est sous le contrôle d'un réseau complexe de molécules signal qui agissent soit en activant soit en inhibant l'expression de composants des biofilms. En effet, en se basant sur un modèle expérimental *in vitro*, la formation de biofilm est classiquement considérée comme un cycle formé de quatre étapes: (1) la fixation initiale de cellules bactériennes par des interactions non spécifiques (hydrophobe, électrostatique et Van der Waals...) en plus des autolysines (Foster, 1995; Legeay et al., 2006); (2) l'agrégation cellulaire et l'accumulation en couches multiples de cellules, un processus actif médié par les « microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules » (MSCRAMMs) (Patti et al., 1994; Speziale et al., 2009) et par adhésion intercellulaire; (3) la maturation du biofilm et (4) le détachement des cellules du biofilm dans un état planctonique pour initier un nouveau cycle de formation de biofilm ailleurs (Figure I.3) (Costerton et al., 2005; Mack et al., 2004). Les facteurs de virulence impliqués dans l'adhésion et la formation de biofilm font généralement partie du génome accessoire et ne sont donc pas communs à toutes les souches.

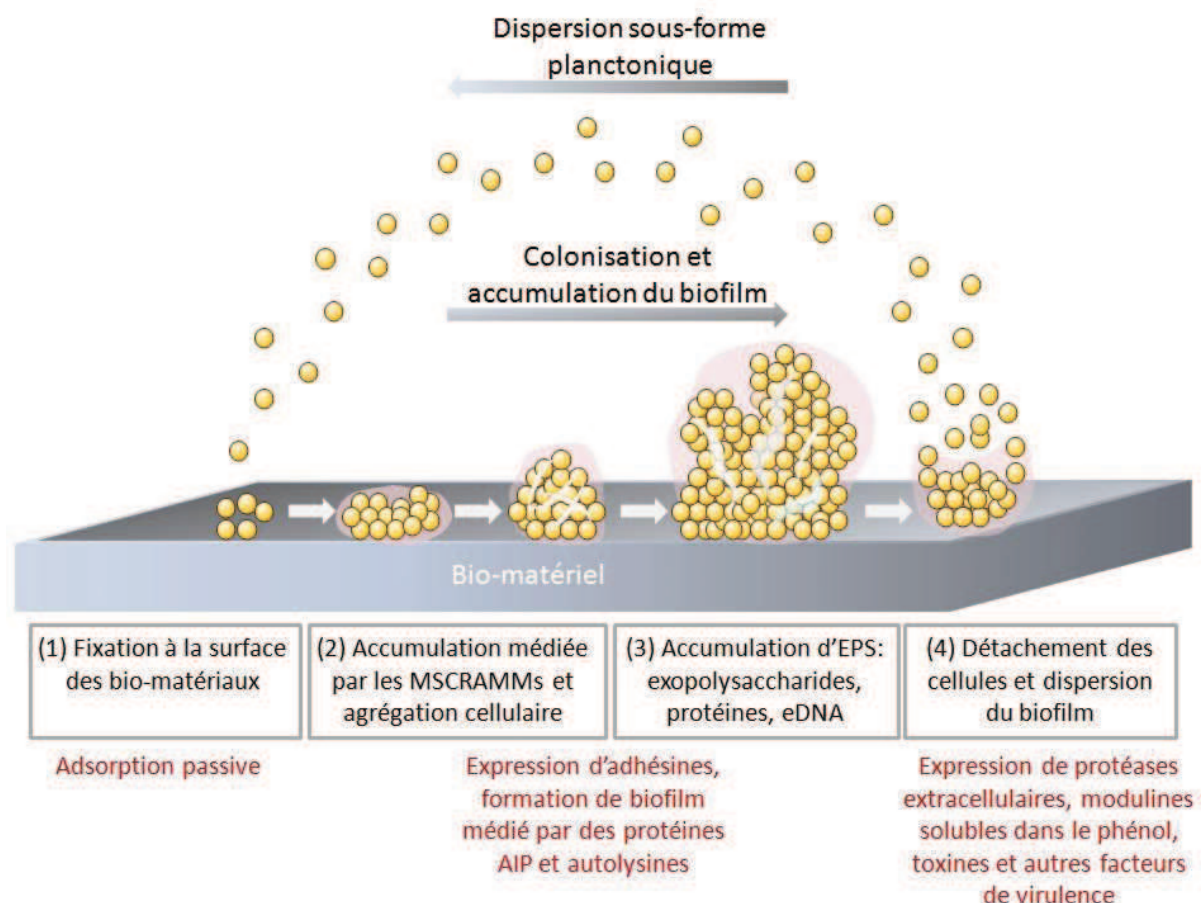


Figure I. 3 : Schéma simplifié du cycle d'un biofilm

La formation d'un biofilm, de sa formation à sa dispersion, se fait en 4 étapes qui nécessitent l'expression de différents facteurs de virulence. Les premiers événements impliquent l'expression d'adhésines, d'exopolysaccharides et de protéines impliquées dans l'agrégation. Une fois que le biofilm atteint sa phase finale de maturation, l'excès de peptide auto-inducteur (AIP) déclenche le début de la phase de dispersion, caractérisée par l'augmentation de l'expression de RNAlII avec production consécutive de protéases extracellulaires et de modulines solubles dans le phénol. Les facteurs de virulence impliqués dans l'adhésion et la formation de biofilm font généralement partie du génome accessoire et ne sont donc pas communs à toutes les souches. En outre, les modèles *in vitro* de la formation de biofilms sont certainement loin de décrire les interactions complexes dans des conditions *in vivo*. Figure adaptée de (Arciola et al., 2012).

REGULATION DES FACTEURS DE VIRULENCE

LES ELEMENTS GENETIQUES MOBILES

Les éléments génétiques mobiles (MGE ou « Mobile Genetic Elements ») sont des fragments d'ADN qui peuvent coder une variété de facteurs de virulence et de résistance, ainsi que des enzymes qui permettent leur propre transfert et leur intégration dans l'ADN de l'hôte (Frost et

al., 2005). Les MGEs montrent une mobilité intracellulaire et intercellulaire. Le transfert des MGEs entre les cellules est connu sous le nom de transfert horizontal ou latéral. Les MGEs peuvent être des séquences d'insertion, des transposons, des bactériophages, des plasmides, des îlots de pathogénicité ou des cassettes chromosomiques qui sont responsables d'une grande part de la variabilité du génome. Les bactéries acquièrent ces informations génétiques d'autres cellules ou de leur environnement selon 3 mécanismes : (1) la transformation (intégration d'un fragment d'ADN libre de l'environnement dans le génome), (2) la transduction (transfert d'un ADN bactérien par l'intermédiaire d'un vecteur viral) et (3) la conjugaison (contact direct entre des cellules bactériennes). L'ADN non chromosomique comme les MGEs joue un rôle crucial dans la plasticité des génomes permettant aux bactéries de s'adapter à de nouveaux environnements. La pression de sélection de l'environnement permet l'enrichissement de génomes bactériens avec des gènes spécifiques qui permettent leur survie (Malachowa and DeLeo, 2010). De nombreux facteurs de virulence de *S. aureus* sont présents sur des MGEs comme SAK, CHIPS, les entérotoxines, les exotoxines, les leucocidines... (Gill et al., 2005; Holden et al., 2004; Kennedy et al., 2008; Musser and Kapur, 1992).

LE « QUORUM SENSING »

Le « quorum sensing » est un processus de communication entre les différentes cellules qui fait intervenir la production, la détection et la réponse à des auto-inducteurs qui sont des molécules de signalisation extracellulaire sécrétées par les bactéries. Ces auto-inducteurs s'accumulent quand la densité bactérienne augmente, permettant aux bactéries de suivre l'évolution de leur nombre de cellules et de modifier collectivement l'expression des gènes (Ng and Bassler, 2009; Novick and Geisinger, 2008; Williams and Camara, 2009). Le « quorum sensing » contrôle l'expression des gènes codant les facteurs de virulence. *S. aureus* utilise un système de « quorum sensing » canonique des bactéries à Gram (+), formé de deux composants et codé par le locus « *agr* ».

A différents stades de l'infection et en fonction de son génome, *S. aureus* produit différents panels de facteurs de virulence. Pendant les premiers stades de l'infection, l'expression des protéines de surface qui fixent les molécules de la matrice extracellulaire permettent la colonisation des tissus, alors que la production d'exotoxines permet la propagation de l'infection à des tissus adjacents. Le gène de régulation le plus étudié est « *agr* ». Il induit l'expression d'exoprotéines et supprime l'expression de protéines de surface grâce à un octapeptide appartenant à un système qui détecte la densité bactérienne appelé peptide auto-inducteur, ou « AIP » (Ji et al., 1997; Ji et al., 1995; Thoendel et al., 2011). Les protéines de surface sont surtout

produites pendant la phase exponentielle de croissance et les protéines sécrétées sont synthétisées lors de la phase stationnaire.

La densité bactérienne régule aussi bien la production de biofilm que les conditions de stress environnemental. Dans le cas de *S. aureus*, le quorum sensing inhibe la formation de biofilm (Boles and Horswill, 2008; Otto, 2001; Vuong et al., 2000; Yarwood et al., 2004).

LES PRINCIPAUX FACTEURS DE VIRULENCE DE *S. AUREUS*

LES FACTEURS D'ADHESION (ADHESINES)

De nombreuses adhésines permettent l'adhésion de *S. aureus* à la surface des cellules hôtes initialisant le processus de colonisation. Les « microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules » (MSCRAMMs) forment la famille la plus importante des adhésines de *S. aureus*, ce sont des protéines ancrées dans le peptidoglycane qui se lient spécifiquement à la membrane plasmique et aux composants de la matrice extracellulaire (ECM ou « ExtraCellular Matrix ») (Foster and Hook, 1998; Marraffini et al., 2006; Speziale et al., 2009). Ces adhésines reconnaissent les principaux composants de la matrice comme le fibrinogène, la fibronectine et le collagène. Les MSCRAMMs staphylococciques incluent : la protéine A (SpA), les « Clumping factor » A et B (Clf), la « Fibronectin binding protein » A et B (Fnbp), la « collagen binding protein » et l'« elastin-binding protein ». Un total de 21 MSCRAMMs ont été identifiés ; cependant, les protéines auxquelles elles se lient restent inconnues (Bartlett and Hulten, 2010; Roche et al., 2003a). Les « Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules » (SERAMs) sont des adhésines sécrétées par *S. aureus* qui interagissent avec un large spectre de ligands chez l'hôte. Les SERAMs incluent la « Fibrinogen binding protein A » (FbpA), la coagulase (Coa), l'« Extracellular fibrinogen binding protein » (Efb), l'« ECM binding protein » (Emp), l'« Extracellular adherence protein » (Eap) et la « Von Willebrand factor binding protein » (Chavakis et al., 2005).

LES EXOENZYMES

S. aureus produit différents enzymes comme des nucléases, des protéases, des lipases, des hyaluronidases et des collagénases qui détruisent les tissus (Dinges et al., 2000). Ces produits bactériens peuvent faciliter la propagation de l'infection à des tissus adjacents. *S. aureus* produit également de la β -lactamase et la coagulase (Lowy, 1998). La β -lactamase est un enzyme qui inactive la pénicilline, alors que la coagulase qui n'est pas un enzyme, active la prothrombine qui transforme le fibrinogène en fibrine et induit une coagulation (Friedrich et al., 2003), ce qui

semble jouer un rôle dans le développement de végétations lors d'une endocardite. La coagulase permet dans un premier lieu de protéger la bactérie de la phagocytose, favorisant sa multiplication. Les protéases de *S. aureus* appartiennent à différentes classes : les sérine-protéases, les cystéine-protéases et les métallo-protéases qui peuvent dégrader l'environnement cellulaire. Les protéases de *S. aureus* sont relativement insensibles à la plupart des inhibiteurs de protéases du plasma humain. De plus, certaines protéases, comme l'auréolysine, sont aussi capables d'inactiver certains de ces inhibiteurs pour potentialiser l'effet des protéases de la bactérie (Dubin, 2002).

LES TOXINES DE *S. AUREUS*

S. aureus sécrète de nombreuses exotoxines qui peuvent être classées en fonction de leur activité biologique : les toxines ADP-ribosylantes, les superantigènes, les protéases et les toxines formant des pores.

LES TOXINES ADP-RIBOSYLANTES

Les « Epidermal cell Differentiation Inhibitors » (EDIN) sont des facteurs ADP-ribosylants qui ciblent les petites protéines hétérotrimériques G (Sugai et al., 1992). Trois facteurs EDIN ont été caractérisés : EDIN-A (Inoue et al., 1991), EDIN-B (Wilde et al., 2001; Yamaguchi et al., 2002) et EDIN-C (Yamaguchi et al., 2001). Le gène codant EDIN-B est situé sur le chromosome dans un îlot de pathogénicité (Franke et al., 2010; O'Neill et al., 2007; Yamaguchi et al., 2002), alors que les gènes codant EDIN-A et EDIN-C sont localisés sur un plasmide (Yamaguchi et al., 2001; Yamaguchi et al., 2002). Bien que les gènes codant les EDINs ont une prévalence plus élevée dans les isolats pathogènes de *S. aureus* (Czech et al., 2001), la contribution des EDINs à la virulence bactérienne reste à définir. Les EDINs passent dans le cytosol de la cellule hôte à partir des compartiments acides suite à la macropinocytose ou après l'internalisation dans les phagosomes (Molinari et al., 2006). Puis, EDIN mono-ADP-ribosyle préférentiellement RhoA en l'inactivant et en bloquant ainsi une voie majeure responsable à la fois de l'élongation des filaments d'actine et de leur assemblage avec la myosine en actinomyosine (Chardin et al., 1989; Jaffe and Hall, 2005; Ridley and Hall, 1992). Dans les cellules endothéliales, l'activation de RhoA contrôle la formation des « gaps » intercellulaires en induisant les fibres d'actinomyosine (Millan et al., 2010). Ainsi, l'inactivation de RhoA renforce la cohésion des jonctions d'adhérence dans l'endothélium (Wojciak-Stothard and Ridley, 2002). Cependant, les EDINs, par l'inactivation de RhoA, déclenchent la formation de grands tunnels trans-cellulaires appelés macro-perforations dans les cellules endothéliales, qui altèrent leur rôle de barrière (Boyer et al., 2006).

S. aureus sécrète une variété de toxines appartenant à la famille des superantigènes qui est également nommée famille de toxines pyrogènes. Ces toxines dévient la réponse du système immunitaire de l'hôte de la réponse spécifique contre une infection. Elles conduisent à un syndrome du choc toxique ou à des intoxications alimentaires. Dans le cas d'un antigène, la réponse immunitaire des lymphocytes T est initiée suite à l'interaction d'un TCR et d'un antigène peptidique présenté par le complexe majeur d'histocompatibilité II (CMHII) (Garcia and Adams, 2005; Garcia et al., 1999). La reconnaissance de l'antigène par le TCR induit une signalisation cellulaire résultant en l'activation de facteurs de transcription pour induire la prolifération et la différenciation des lymphocytes T (Smith-Garvin et al., 2009). De manière différente, les superantigènes se lient simultanément au CMH II (Major Histocompatibility Complex Class II) des cellules présentatrices de l'antigène (Scholl et al., 1989) et au domaine hypervariable V β des récepteurs des cellules T sur les lymphocytes T. Grâce à cette interaction, les superantigènes activent 10 à 30% des lymphocytes T périphériques, contre 0,01% pour un antigène (Givan et al., 1999), ce qui provoque la libération massive de cytokines (McCormick et al., 2001). Les superantigènes agissent d'une manière très efficace, une quantité de l'ordre du picogramme (10^{-12} g) suffit pour induire une activation détectable des lymphocytes T *in vitro* (Xu and McCormick, 2012). *S. aureus* sécrète 2 groupes de superantigènes : la « Toxic Shock Syndrome Toxin-1 » (TSST-1) et les entérotoxines staphylococciques (SEs ou « Staphylococcal Enterotoxins ») avec les protéines « enterotoxin-like » (SEIs) (Lina et al., 2004).

Le syndrome du choc toxique (TSS ou « Toxic Shock Syndrome ») est une maladie aiguë et potentiellement mortelle qui se caractérise par une forte fièvre, une éruption érythémateuse diffuse, une hypotension, et implique au moins trois systèmes d'organes. La toxine du syndrome du choc toxique (TSST-1) est à l'origine de plus de 90% des chocs toxiques menstruels et 50% des chocs non menstruels (Bohach et al., 1990; Issa and Thompson, 2001; Schlievert, 1986), ceci est dû à son unique pouvoir de traverser les muqueuses. TSST-1 est très soluble dans l'eau, n'a pas de résidus cystéine et elle est généralement résistante à la chaleur et à la protéolyse (Dinges et al., 2000).

Les entérotoxines (SE) comprennent SEA, SEB, SEC, SED, SEG, SEH, SEI, SER et SET. Ces SE partagent une similitude de leur structure tertiaire, comportant une liaison disulfure intramoléculaire, et elles ont une résistance intermédiaire à la chaleur et à la digestion par la pepsine. Ces superantigènes causent des intoxications alimentaires et se distinguent par leur capacité de provoquer des vomissements suite à l'ingestion d'une ou de plusieurs SE présentes

sur les aliments qui ont été contaminés par *S. aureus*. Les signes de toxicité systémique, comme la fièvre et l'hypotension, sont rarement observées dans les cas de ces intoxications alimentaires (Dinges et al., 2000). Certaines entérotoxines peuvent également jouer un rôle dans le TSS (Crass and Bergdoll, 1986; Garbe et al., 1985; Schlievert, 1986).

Les protéines « enterotoxin-like » (SEIs) sont des homologues aux SEs avec qui elles partagent de nombreuses activités biologiques, y compris la superantigénicité, la pyrogénicité chez le lapin, la capacité d'amplifier le choc endotoxinique, et la létalité lorsqu'elles sont administrées grâce à des pompes mini-osmotiques sous-cutanées (Dinges et al., 2000; Orwin et al., 2002). Elles ont également une structure similaire, mais ont été classées à part à cause de leur potentiel émétique non démontré et elles comportent SEIj, SEIk, SEIL, SEIM, SEIN, SEIO, SEIP, SEIQ, SEIS, SEIU, SEIV et SEIX (Xu and McCormick, 2012). Récemment, le potentiel émétique de SEIk, SEIL, SEIM, SEIN, SEIO, SEIP, et SEIQ a été démontré sur un modèle de primate (des singes *Cynomolgus*) (Omoe et al., 2013).

LES EPIDERMOLYSINES

Les épidermolysines ou toxines exfoliantes (ETs ou « Exfoliative Toxins », ETA, ETB, ETD) sont des sérine-protéases sécrétées par *S. aureus* et qui possèdent une haute spécificité pour leur substrat. Elles reconnaissent et hydrolysent spécifiquement la desmoglérine 1 - une cadhérine desmosomale - uniquement dans les couches superficielles de la peau, ce qui est directement responsable de la manifestation clinique du syndrome de la peau ébouillantée (« staphylococcal scaled skin syndrome », ou SSSS) et l'impétigo bulleux qui est une forme localisée au site d'infection (Bukowski et al., 2010). La mélatonine A et certains produits non conventionnels des gènes du CMH pourraient aussi être hydrolysés (Prévost et al., 2003). Les ETs les plus fréquentes sont ETA et ETB (Kondo et al., 1974; Wiley and Rogolsky, 1977), leur gène est porté sur un bactériophage et un plasmide, respectivement, tandis que celui codant ETD est situé sur un îlot de pathogénicité.

HEMOLYSINE B (SPHINGOMYELINASE C)

L'hémolysine β , ou toxine β , est une exotoxine de 35 kDa (Bernheimer et al., 1974). Cette toxine provoque une dégradation importante de la sphingomyéline de la membrane en phosphocholine et en céramide, d'où sa cytotoxicité pour une grande variété de types cellulaires (Wiseman, 1968). Elle endommage la membrane plasmique des érythrocytes, des leucocytes et des macrophages. Elle est capable de dégrader également la lyso-phosphatidylcholine (Doery et al., 1963). La sensibilité des différents érythrocytes à la β -toxine est liée à leur contenu en

sphingomyéline (Wiseman and Caird, 1967) et l'emplacement de la sphingomyéline à la membrane. La sphingomyéline des membranes érythrocytaires est hydrolysée plus efficacement en présence de concentrations relativement élevées de phosphatidylcholine (Rogolsky, 1979). La β -toxine joue également un rôle dans la formation de biofilms *in vivo* (Huseby et al., 2010).

LES TOXINES FORMANT DES PORES.

Les différentes souches de *S. aureus* sécrètent plusieurs toxines formant des pores qui seront décrites dans la partie 2. Ces toxines jouent un rôle important dans l'évasion de *S. aureus* au système des défenses antibactériennes de l'hôte.

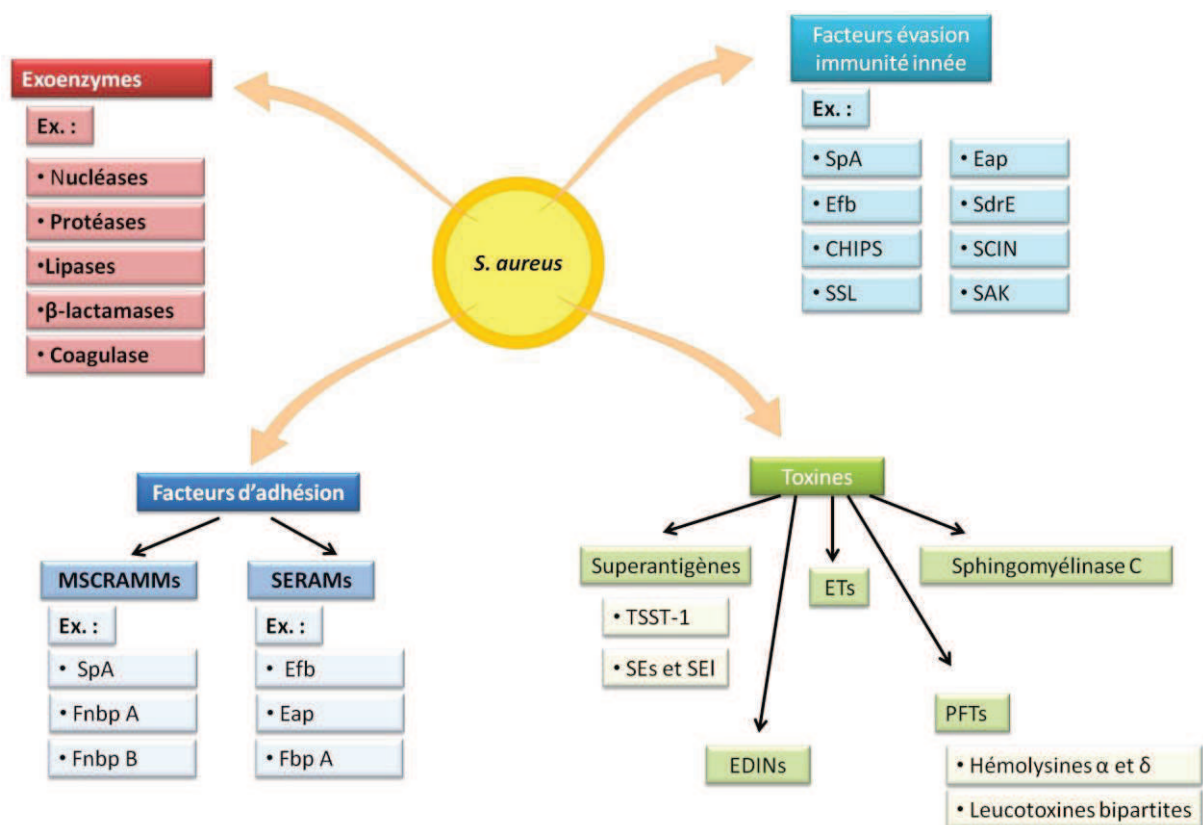


Figure I. 4 : Les principaux facteurs de virulence de *S. aureus*.

Certains facteurs de virulence jouent plusieurs rôles.

2. TOXINES FORMANT DES PORES

GENERALITES

Les toxines formant des pores (PFTs ou « Pore Forming Toxins ») représentent la plus grande classe de toxines protéiques bactériennes et sont souvent sécrétées comme facteurs de virulence par des microorganismes pathogènes (Bhakdi and Trantum-Jensen, 1987; Gonzalez et al., 2008). Les PFTs peuvent être classées en trois superfamilles en se basant sur leurs propriétés moléculaires et fonctionnelles : (1) les toxines formant de petits pores en tonneau β , (2) les cytolysines dépendantes du cholestérol (CDC), et (3) les RTX (repeats-in-toxin) qui sont des toxines qui interagissent avec des acides gras (Bhakdi et al., 1996). Les PFTs peuvent également être classées en 2 groupes en fonction du type de structures qu'elles utilisent pour s'insérer dans la bicouche lipidique lors de la formation de pores, les α -PFTs forment un pore avec des hélices α et les β -PFTs avec des feuilletts β .

Les α -PFTs se ressemblent dans la manière de former le pore (Parker and Pattus, 1993). 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 amphipathiques qui sont ultérieurement utilisées pour l'insertion membranaire de la toxine (Parker and Feil, 2005). Le déploiement partiel des hélices semble suffisant pour l'insertion dans la membrane, alors que la formation de pore nécessite probablement une oligomérisation de la protéine (Gonzalez et al., 2008). Cependant, le mécanisme exact de la formation de pore reste relativement peu connu.

Les β -PFTs sont libérées sous forme soluble (Gonzalez et al., 2008). A forte concentration, elles se multimérisent en un polymère circulaire, puis chaque monomère participe avec un ou 2 brins β amphipathiques pour former un tonneau β amphipathique. Ce tonneau β possède une cavité hydrophile et une surface externe hydrophobe permettant son insertion dans la membrane lipidique (Iacovache et al., 2006; Melton et al., 2004; Nassi et al., 2002; Shatursky et al., 1999). Le nombre de monomères varie entre 5 (ex. cytolysine de *vibrio sp.*) et 50 (ex. streptolysine O et perfringolysine O) selon les toxines, et le diamètre du pore peut de ce fait varier entre 2 nm à 50 nm (Moniatte et al., 1996; Olofsson et al., 1993; Parker and Feil, 2005; Sekiya et al., 1993; Valeva et al., 1997a; Wilmsen et al., 1992). Les pores de grande taille comme celui des CDC peuvent permettre le passage de protéines repliées.

Certaines toxines sont capables de former des pores au niveau des membranes, mais sont un peu plus que des PFTs. Ces protéines sont appelées les toxines AB, où la sous-unité B est responsable de la liaison à la cellule cible, de la translocation et du transfert de la sous-unité A qui a une activité enzymatique dans le cytoplasme. Au contraire des PFTs proprement dites, les sous-unités B des toxines AB ne s'insèrent pas dans la membrane plasmique des cellules cibles parce qu'elles nécessitent un environnement acide pour favoriser l'insertion. La formation de pores par la sous-unité B a lieu dans les vésicules d'endocytose au cours de l'internalisation (Abrami et al., 2004; Abrami et al., 2005; Milne et al., 1994).

MODE D'ACTION DES PFTS

Suite à leur sécrétion par les bactéries, les PFTs diffusent vers les cellules cibles, où elles se fixent avec une affinité variable à des récepteurs membranaires. La fixation de la toxine à la membrane est la première étape dans le processus d'intoxication. Puis, la toxine détourne la fonction des structures de la membrane cellulaire. Si le récepteur n'est pas ubiquitaire, l'intoxication sera spécifique du type cellulaire. En absence de récepteurs spécifiques, les cellules sont résistantes à l'action de la toxine (Barrows et al., 2006). Les PFTs se fixent à différents types de récepteurs comme des protéines transmembranaires pour la sous-unité B des toxines AB (Scobie and Young, 2005), des protéines ancrées dans des lipides comme dans le cas de l'aérolysine (Nelson et al., 1997), des lipides pour les CDC (Tweten et al., 2001) ou même des clusters de lipides ont été proposés pour la fixation de la toxine α de *S. aureus* (Valeva et al., 2006). Il est probablement judicieux d'imaginer une composante lipidique et une composante protéique à la fixation des PFTs. Chacune ayant une part variable en fonction des toxines, ce qui explique l'activité de certaines sur les membranes synthétiques.

L'oligomérisation des PFTs se fait d'une manière additive circulaire aboutissant à la formation de structures circulaires (Song et al., 1996). Certaines toxines, comme la toxine α de *S. aureus*, forment d'abord un pré-pore qui nécessite une série de changements conformationnels pour aboutir à l'insertion dans la membrane (Figure I.5) (Valeva et al., 1997b). Pour d'autres toxines comme l'aérolysine, l'oligomérisation, la formation du tonneau transmembranaire et l'insertion dans la membrane semblent des événements couplés (Iacovache et al., 2006). L'exposition de la surface hydrophobe du côté externe du tonneau β semble fournir l'énergie nécessaire à l'insertion dans la membrane, mais cette hypothèse reste à démontrer (Gonzalez et al., 2008).

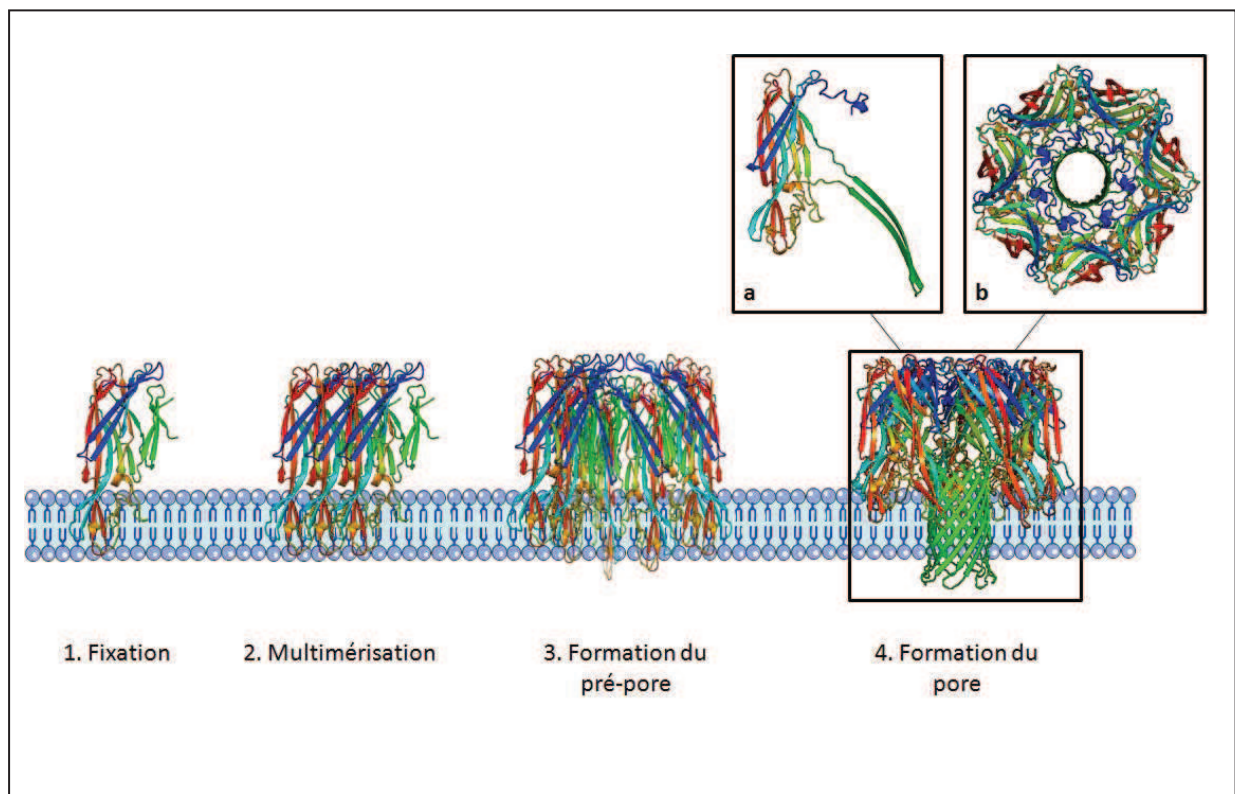


Figure I. 5 : Mode d'action des PFTs.

Exemple de la toxine α de *S. aureus*. 1. Fixation du monomère (pdb : 4IDJ (Foletti et al., 2013)) sur la membrane plasmique. 2. Multimérisation de plusieurs monomères. 3. Formation d'un pré-pore heptamérique. 4. Formation du pore (pdb : 7AHL (Song et al., 1996)) qui nécessite une série de changements conformationnels pour aboutir à l'insertion dans la membrane. (a) changements conformationnels d'un monomère qui permettent l'insertion dans la membrane. (b) vue du haut du pore formé par la toxine α .

EFFETS DES PFTS SUR LES CELLULES CIBLES

Les effets des PFTs sur les cellules cibles suite à la formation des pores dépendent de la concentration des toxines, le temps d'exposition et le type cellulaire.

La formation de pores par certaines PFTs active des voies de signalisations dépendantes du Ca^{2+} et médiées par des lipides déclenchant une variété d'effets comme la phosphorylation par des tyrosines (Gekara and Weiss, 2004), le réarrangement de filaments d'actine (Cossart and Lecuit, 1998), l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Kayal et al., 1999) et la régulation de l'expression des gènes par la modification des histones (Hamon et al., 2007). Les variations de Ca^{2+} peuvent réguler la transcription et divers autres mécanismes comme l'internalisation, la fusion des vésicules, la dégranulation, la synthèse de cytokines et l'apoptose (Dramsi and Cossart, 2003; Gekara et al., 2007).

Les cellules cibles ont développé des mécanismes pour résister ou réparer les dégâts causés par les PFTs suite à la détection de la rupture de l'intégrité de leur membrane. Les NLRs ou « Nod-like receptors » sont activés suite à l'action de différentes PFTs (Gurcel et al., 2006 ; Martinon and Tschopp, 2005; Walev et al., 1995). Les NLRs forment une famille de détecteurs de PAMPs qui sont des protéines cytoplasmiques reconnaissant des composants structuraux des microorganismes (Akira et al., 2006). L'activation des NLRs induit l'activation de NF- κ B et de la caspase-1 (Franchi et al., 2006). L'activation de NF- κ B, qui est un régulateur clé de la réponse pro-inflammatoire, active les gènes qui codent des cytokines comme l'interleukine IL-8 et des facteurs de co-stimulation (Bonizzi and Karin, 2004). La caspase-1 est responsable du clivage et de l'activation des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18 (Dinarello, 1998). Les complexes multi-protéiques qui interviennent dans l'activation de la caspase-1 sont nommés « inflammasome » (Martinon et al., 2002). Outre son activité de clivage des cytokines pro-inflammatoires, la caspase-1 active les « Sterol Responsive Element Binding Proteins », ou SREBPs, qui sont des régulateurs centraux du métabolisme lipidique (Gurcel et al., 2006) et qui favorisent la survie de la cellule suite à l'effet des PFTs.

D'autres voies de signalisation induites par les PFTs peuvent favoriser la survie de la cellule. La voie des p38-MAPK, ou « Mitogen Activated Protein Kinase », serait activée suite au stress osmotique induit par la formation de pores (Ratner et al., 2006). Cependant, les conséquences de l'activation de cette voie, qui est une caractéristique de la réponse cellulaire à la formation d'un pore, sont différentes d'une toxine à l'autre en fonction de la taille et de la stabilité des pores et du type cellulaire. De plus, les PFTs peuvent activer d'autres voies MAPK comme l'activation des JNKs « c-Jun N-terminal Kinase » qui induit la production de TNF- α (Stassen et al., 2003).

Suite à la rupture de la membrane plasmique par les PFTs, certains types cellulaires déclenchent divers mécanismes de réparation pour rétablir les niveaux de K⁺ et d'ATP, et ainsi conduire à une survie prolongée. Ces mécanismes peuvent dépendre de p38 (Walev et al., 1994), ou du Ca²⁺ qui joue un rôle important dans la fusion des organelles avec la membrane plasmique (McNeil and Steinhardt, 2003). D'autres possibilités ont également été proposées comme la constriction du pore (Walev et al., 1994) ou l'intervention des gènes lipogéniques (Gurcel et al., 2006) dans la survie des cellules.

HEMOLYSINE δ

L'hémolysine δ ou δ -Lysine ou toxine δ est un peptide de 26 acides aminés de 3 kDa environ et elle est produite par 97% des souches de *S. aureus*, mais également par 50 à 70% des staphylocoques à coagulase négative. L'hémolysine δ est capable de lyser les érythrocytes et différentes autres cellules de mammifères, ainsi que des structures intracellulaires (Freer and Birkbeck, 1982), et son activité est inhibée par la présence de phospholipides. L'hémolysine δ adopte une configuration en forme d'hélice α avec des domaines hydrophiles et hydrophobes sur les côtés opposés. L'association de six de ces monomères en un arrangement hexagonal dans une membrane plasmique peut conduire à la formation d'un « pore » transmembranaire bordé par les surfaces hydrophiles des monomères (Freer and Birkbeck, 1982; Lee et al., 1987). Les canaux formés semblent sélectifs aux cations (Kerr et al., 1995; Mellor et al., 1988; Verdon et al., 2009).

L'HEMOLYSINE α

L'hémolysine α ou toxine α (Hla) est une protéine de 33 kDa sécrétée sous forme de monomères solubles par 95% des souches de *S. aureus* à la fin de la phase de croissance exponentielle. A la différence de la plupart des facteurs de virulence qui sont codés par les MGEs, la toxine α est codée par des gènes présents sur l'ADN chromosomique. Cette toxine cible un large spectre de cellules hôtes y compris les cellules épithéliales, les érythrocytes, les fibroblastes (Walev et al., 1994), les monocytes (Bhakdi et al., 1989), les macrophages et les lymphocytes (Jonas et al., 1994), mais pas les neutrophiles (Grumann et al., 2013). Les érythrocytes de lapin sont particulièrement sensibles, l'injection intraveineuse d'1 μ g de toxine suffit pour tuer un lapin (Dinges et al., 2000). La toxine α augmente le métabolisme de l'acide arachidonique suite à l'activation calcique. Cette toxine induit également la libération de cytokines. Les monomères sécrétés par la bactérie se fixent d'abord à la membrane des cellules cibles sous forme d'heptamères cylindriques pour former un pore transmembranaire (Belmonte et al., 1987). Le pore formé a un diamètre de 2,8 nm à l'entrée et de 1,4 nm à la base du pore (Song et al., 1996). Il est formé par l'assemblage des 7 épingles β (2 x 7 brins β) qui forment un tonneau β (Figure I.5). La toxine α , en perturbant l'intégrité des couches épithéliales et endothéliales, permet l'invasion de *S. aureus*. Cette toxine est également dermonécrotique et neurotoxique. La toxine α peut être classée dans la famille des leucotoxines vu son effet sur les lymphocytes et les ressemblances structurales et fonctionnelles avec les autres leucotoxines.

GENERALITES

Les toxines bipartites de *S. aureus* sont nommées leucocytoxines ou leucotoxines à cause de leurs effets sur les cellules de la lignée leucocytaire, ce qui n'exclut pas que d'autres cellules puissent être sensibles. Elles sont formées de deux protéines sécrétées séparément, nommées sous-unités S et F pour « slow » et « fast » se référant à la vitesse d'élution des protéines sur une colonne échangeuse d'ions (Woodin, 1959, 1960). Les gènes codant ces protéines sont disposés en tandem et sont co-transcrits, les gènes codant la protéine S étant situés en amont des gènes codant F. La protéine de classe S se fixe d'abord à la membrane cible permettant l'interaction secondaire de la protéine de classe F, puis l'oligomérisation et la formation du pore (Colin et al., 1994). Cette famille de toxines comporte les γ -hémolysines HlgA/HlgB et HlgC/HlgB, la Leucocidine de Pantou et Valentine (LPV), LukM/LukF'-PV, LukE/LukD, un variant de LukE/LukD et LukG/LukH (nommée aussi LukA/LukB). Des leucotoxines bipartites ont également été identifiées chez d'autres espèces comme *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* et *S. delphini* (Ben Zakour et al., 2012; Prévost, 1995; Prévost et al., 1995a; Riegel et al., 2011). Les protéines d'une même classe peuvent partager entre 60 et 80 % d'homologie de séquence à l'exception de LukG et LukH qui ne partagent que 30 à 40 % d'homologie de séquence avec les autres toxines (Dumont et al., 2010; Ventura et al., 2010; Yoong and Torres, 2013). La combinaison de n'importe quelle sous-unité S avec une sous-unité F peut former une leucotoxine active. Des différences subtiles dans l'activité et le spectre des cellules cibles de chaque leucotoxine suggèrent que ces toxines ne sont pas redondantes, mais au contraire qu'elles ont des fonctions spécialisées et éventuellement complémentaires dans l'attaque et/ou l'évasion des défenses de l'hôte (Yoong and Torres, 2013). La sensibilité des cellules aux leucotoxines est dépendante du type cellulaire et de l'espèce hôte.

LES DIFFERENTES LEUCOTOXINES DE *S. AUREUS*

γ -HEMOLYSINES

Les γ -hémolysines HlgA/HlgB et HlgC/HlgB sont produites par 99% des souches de *S. aureus* (Mahoudeau et al., 1997; Prévost et al., 1995b). Les gènes codant ces deux leucotoxines se situent sur un même locus présent sur le chromosome et comportant 3 ORF (open-reading frames), deux codant les sous-unités de classe S (HlgA et HlgC) et un codant la sous-unité de classe F (HlgB) (Cooney et al., 1993). Les γ -hémolysines possèdent un large spectre d'action cellulaire. HlgA/HlgB lyse très efficacement les érythrocytes humains et de lapin. Les leucocytes

ciblés sont les lymphocytes T, les granulocytes (neutrophiles, basophiles, éosinophiles), les monocytes et leur descendance (macrophages, cellules dendritiques).

De toutes les leucotoxines, HlgA/HlgB est la plus active sur les membranes synthétiques (phosphatidylcholine : cholestérol, 1:1) (Ferrerias et al., 1998). Sa capacité à former des pores est augmentée en présence de phosphocholines avec de courtes chaînes acyles saturées ou avec des chaînes insaturées. En effet, HlgA/HlgB ne pourrait se fixer à la bicouche lipidique que si la tête de la phosphatidylcholine (PC) est librement accessible, ce qui est facilité par la présence de cholestérol, mais uniquement si les chaînes acyles sont courtes ou insaturées (Potrich et al., 2009).

La γ -hémolysine HlgC/HlgB est capable de cibler toute la lignée myéloïde humaine et de lapin (Prévost et al., 1995c; Supersac et al., 1993), mais elle n'a pas d'activité sur les lymphocytes T. Elle est également active sur des membranes synthétiques.

LEUCOCIDINE DE PANTON ET VALENTINE

La leucocidine de Panton et Valentine LukS-PV/LukF-PV est produite par 2 à 3% des souches de *S. aureus* en Europe (Prévost et al., 1995b; Prévost et al., 1995c) et peut atteindre plus de 35% des souches isolées dans certaines régions d'Afrique (Aires-de-Sousa et al., 2006; Breurec et al., 2011; Omuse et al., 2013). Elle est fortement associée aux souches MRSA acquises en communauté (CA-MRSA) en raison de la propagation de la souche USA300 qui produit la LPV aux États-Unis (DeLeo et al., 2010; Naimi et al., 2003; Vandenesch et al., 2003). Cependant, en Europe, une forte proportion de souches LPV+ est sensible à la méticilline (Holmes et al., 2005; Otter and French, 2010; Shallcross et al., 2010). La présence du locus codant cette leucotoxine a été identifiée sur le bactériophage ϕ Sa2 (Baba et al., 2002; Kaneko et al., 1998; Narita et al., 2001). Les gènes codant la LPV ont par la suite été identifiés sur 8 bactériophages différents. Les phages porteurs de la LPV sont fortement associés aux infections de la peau et des tissus mous, et à une pneumonie nécrosante qui peut affecter de jeunes personnes immunocompétentes (Shallcross et al., 2013; Vandenesch et al., 2003; Zanger et al., 2012). Les phages peuvent différer dans la composition de leurs modules internes, et s'intègrent typiquement dans l'un des deux sites d'insertion (Boakes et al., 2011; Chen et al., 2012; Kaneko et al., 1998; Ma et al., 2008; Narita et al., 2001; Otter et al., 2010; Wirtz et al., 2009). La LPV est active sur les monocytes et les macrophages humains et de lapins (Gauduchon et al., 2001; Woodin, 1972), mais les cellules de souris, de rats et de bovins lui sont fortement résistantes (Löffler et al., 2010; Szmigielski et al., 1998). La LPV agit également sur les phagocytes et sur la capacité de prolifération des

lymphocytes T et B de carpes (*Cyprinus carpio* L.) (Bownik et al., 2004; Bownik et al., 2000). Les souches LPV+ sont fortement associées aux infections de la peau et des tissus mous, mais sont relativement rares dans les pneumonies, les infections musculo-squelettiques, les bactériémies et des souches colonisatrices, tout au moins dans les pays développés (Shallcross et al., 2013).

LukE/LukD

La prévalence des gènes de LukE/LukD est controversée. Une étude a montré la présence de cette leucotoxine chez 87% des souches de *S. aureus* (Alonzo et al., 2012; Morinaga et al., 2003), tandis qu'un autre groupe a décrit une prévalence d'environ 30% dans les isolats cliniques chez les humains (Gravet et al., 1998; Gravet et al., 2001; Gravet et al., 1999). Le locus codant cette leucotoxine est situé sur l'îlot de pathogénicité vSaβ situé sur le chromosome (Baba et al., 2002; Grumann et al., 2013; Lindsay and Holden, 2006). LukE/LukD agit sur les neutrophiles humains et les érythrocytes du lapin, mais c'est aussi la seule leucotoxine à être fortement active sur les phagocytes de souris (Alonzo et al., 2012). Elle est également active sur les mastocytes (Gravet et al., 1999; Reyes-Robles et al., 2013). LukE/LukD a un effet immunosuppresseur sur la prolifération des lymphocytes chez les chiens (Siwicki et al., 2003) et les carpes (Bownik, 2006).

LukM/LukF'-PV

LukM/LukF'-PV est essentiellement produite par des souches de *S. aureus* isolées chez des espèces bovines, caprines, et également murines. Les gènes codant LukM/LukF' sont présents chez 27 à 86% des isolats d'origine bovine (Haveri et al., 2007; Yamada et al., 2005). Ils semblent être exclusivement portés par des souches associées à la mammite des ruminants (Fueyo et al., 2005; Herron-Olson et al., 2007; Yamada et al., 2005). Elle a été purifiée pour la première fois lors de la purification des leucotoxines chez une souche de *S. aureus* P83 (Choorit et al., 1995; Kaneko et al., 1997a). Cette leucotoxine est très active sur les neutrophiles bovins (Barrio et al., 2006; Rainard et al., 2003), mais beaucoup moins sur les cellules humaines (Fromageau et al., 2010).

LukG/LukH OU LukA/LukB

LukG/LukH, nommée également LukA/LukB, a été récemment identifiée et elle semble être la leucotoxine la plus divergente entre celles produites par *S. aureus* (Dumont et al., 2010; Ventura et al., 2010). Elle est active sur les neutrophiles, les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques humaines (Dumont et al., 2010). L'activité hémolytique de cette leucotoxine n'a pas été détectée et sa toxicité est amplifiée en présence de LPV. Cette leucotoxine, en plus de sa

sécrétion par *S. aureus* comme les autres leucotoxines, est capable de s'associer à la surface de la bactérie (Ventura et al., 2010).

STRUCTURE ET MODE D'ACTION

La toxine α représente l'archétype structural des toxines formant des pores à tonneau β (Figure I.5) (Gouaux, 1998; Gouaux et al., 1997; Montoya and Gouaux, 2003). Toutes les sous-unités des leucotoxines sont formées de trois domaines : (1) le β sandwich ou « core », (2) le domaine central ou domaine « Stem » et (3) le domaine « Rim ». Le β sandwich représente le plus grand domaine et rassemble plus de la moitié de la protéine, il comporte deux fois six brins β antiparallèles. Le domaine central est formé de trois brins β antiparallèles repliés contre le sandwich β sous forme hydrosoluble. Ces 3 brins β se reforment en boucle β à la formation du pore. Le domaine « Rim » formant le pied de ces protéines est probablement la zone entrant la première en contact avec la membrane plasmique de la cellule cible, grâce à ses boucles et certains acides aminés qui pourraient être ancrés dans un environnement lipidique (Valeva et al., 1997a; Vecsey-Semjen et al., 1997). Ce domaine est composé de quatre brins β antiparallèles, de deux hélices α et de deux boucles oméga dont l'arrangement varie en fonction de la protéine. LukE et LukD ont été cristallisées (Galy et al., 2012) et les structures tridimensionnelles de HlgB (Olson et al., 1999), LukF-PV (Pédélecq et al., 1999) et LukS-PV (Guillet et al., 2004) ont été résolues par la technique de diffraction aux rayons X (Figure I.6). Ces structures mettent en évidence la parenté structurale des leucotoxines à deux composés et l' α -toxine, favorisant l'hypothèse d'un ancêtre commun (Song et al., 1996). Les structures tridimensionnelles des protéines de classe F sont fortement homologues. LukF-PV et HlgB, sont similaires, ce qui est dû à leur forte identité (72% d'identité de séquence). Les variabilités de séquence induisent cependant des différences au niveau des boucles du « Rim » et en C-terminal. L'organisation des domaines « Rim » est différente pour toutes les toxines.

Le mécanisme de fixation des sous-unités à la membrane cellulaire n'est pas complètement élucidé. Des études faites sur LPV ont suggéré que LukS-PV se fixe à un récepteur membranaire et recrute par la suite LukF-PV (Colin et al., 1994). Différemment, des études effectuées sur la γ -hémolysine HlgA/HlgB montrent que HlgB se lie d'abord à la cellule cible suivi par la fixation de HlgA (Kaneko et al., 1997b). D'autres études suggèrent la présence de récepteurs distincts pour LukS-PV et LukF-PV (Meyer et al., 2009). Récemment, des récepteurs de plusieurs leucotoxines ont été identifiés, ils seront décrits dans la partie 3 de ce chapitre.

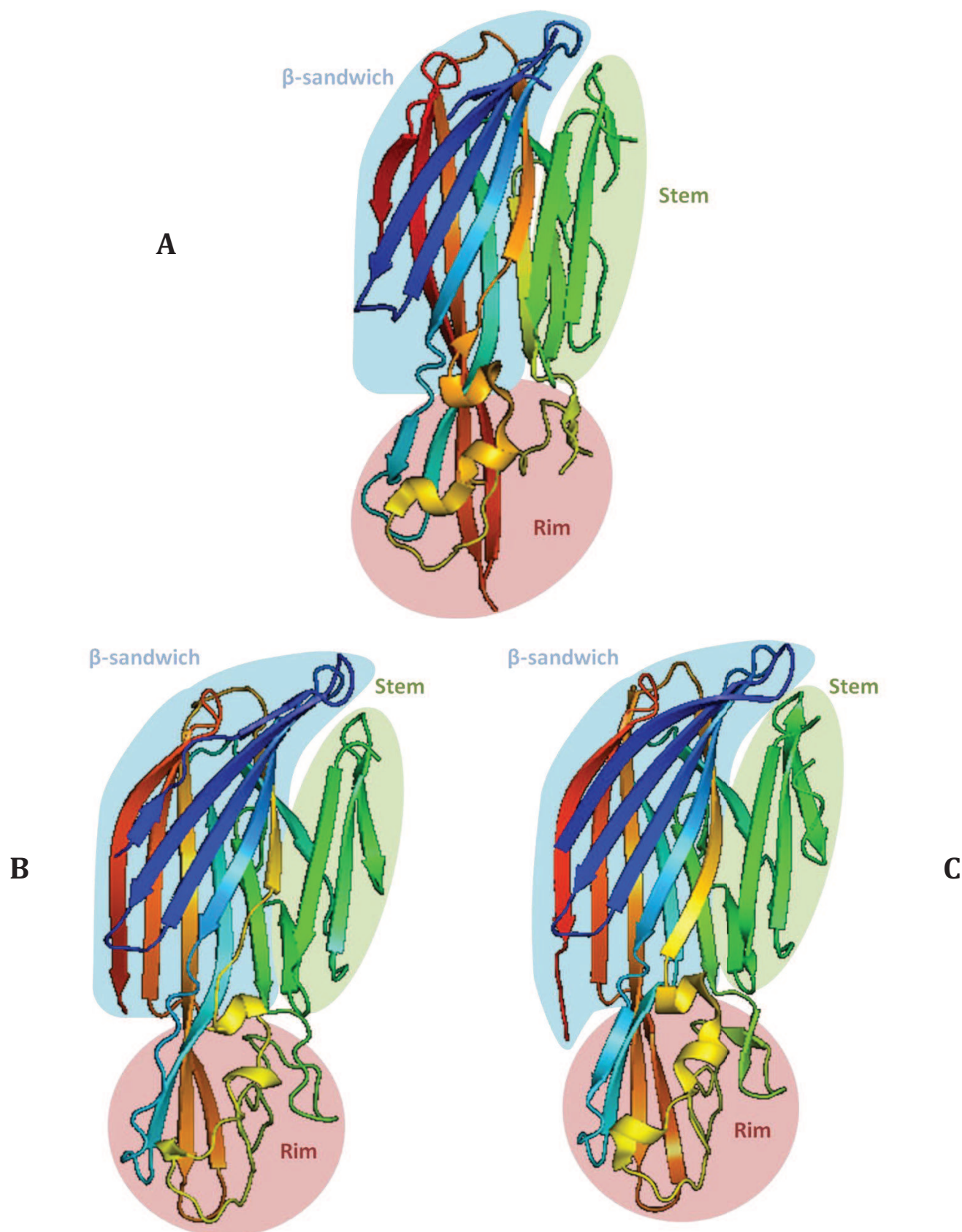


Figure I. 6 : Structure tridimensionnelle de sous-unités de leucotoxines bipartites.

A : LukS-PV (pdb : 1T5R), B : HlgB (pdb : 1LKF) et C : LukF-PV (pdb : 1PVL)

Une fois à la surface de la membrane hôte, les sous-unités S et F s'alternent pour former un pré-pore octamérique (Aman et al., 2010; Joubert et al., 2006; Kaneko and Kamio, 2004; Miles et al., 2002; Sugawara et al., 1999; Viero et al., 2006; Yamashita et al., 2011). Grâce à des ponts disulfure, il a pu être montré que le dimère HlgA-HlgB constitue une base fonctionnelle de l'oligomère (Joubert et al., 2006). D'autre part, au contraire de l' α -toxine, l'extrémité N-terminale ne peut se déployer hors du reste de la structure du monomère ou être éliminée sans une perte dramatique de l'activité biologique (Joubert et al., 2006). La formation de ce pré-pore est accompagnée par une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$) (Colin et al., 1994; Finck-Barbançon et al., 1993). Des structures hexamériques et heptamériques du pré-pore ont été observées en microscopie électronique, sur gel de polyacrylamide et par modélisation informatique (Ferreras et al., 1998; Nguyen et al., 2002; Pédelacq et al., 1999; Sugawara-Tomita et al., 2002). Alors que, les structures octamériques ont été démontrées par cross-linking entre monomères, par mesure de conductance lors de la formation d'un pore unique, par électrophorèse de modification de mobilité (Gel Shift electrophoresis) et par microscopie en force atomique qui a montré que la forme octamérique est la plus stable (Alessandrini et al., 2013; Jayasinghe and Bayley, 2005; Joubert et al., 2007; Miles et al., 2002). Enfin, la structure octamérique a été confirmée par la cristallographie pour HlgA/HlgB (Figure I.7)(Yamashita et al., 2011).

Les domaines Stem des sous-unités assemblées se déplient et s'insèrent dans la membrane pour former un pore en tonneau β . Les pores des leucotoxines sont sélectifs aux cations monovalents, comme le K^+ et le Na^+ et ils laissent également passer le bromure d'éthidium (BET) et l'eau (Baba Moussa et al., 1999; Finck-Barbançon et al., 1993; Staali et al., 1998). Des modifications au niveau du domaine « Stem », comme des mutations ou des délétions, permettent le découplage entre l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ et l'entrée de BET dans les cellules (Baba Moussa et al., 1999; Werner et al., 2002). De plus, en reliant le domaine central au domaine β sandwich par des ponts disulfides, la formation de pores est empêchée, l'entrée de BET est inhibée, mais pas l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ (Nguyen et al., 2002). Ces données suggèrent que l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ se fait indépendamment de la formation de pores.

La première structure tridimensionnelle d'un tonneau β transmembranaire d'une toxine bipartite a été celui de HlgA/HlgB qui montre effectivement la structure octamérique de la toxine ainsi que les interactions entre les domaines « Stem » des différents protomères (Figure I.7) (Yamashita et al., 2011). Il faut noter également que, dans des membranes synthétiques, les leucotoxines sont capables de former des pores mixtes comportant différentes sous-unités de la

même classe comme HlgA, HlgB, et HlgC qui peuvent être présents au niveau d'un même pore (Dalla Serra et al., 2005).

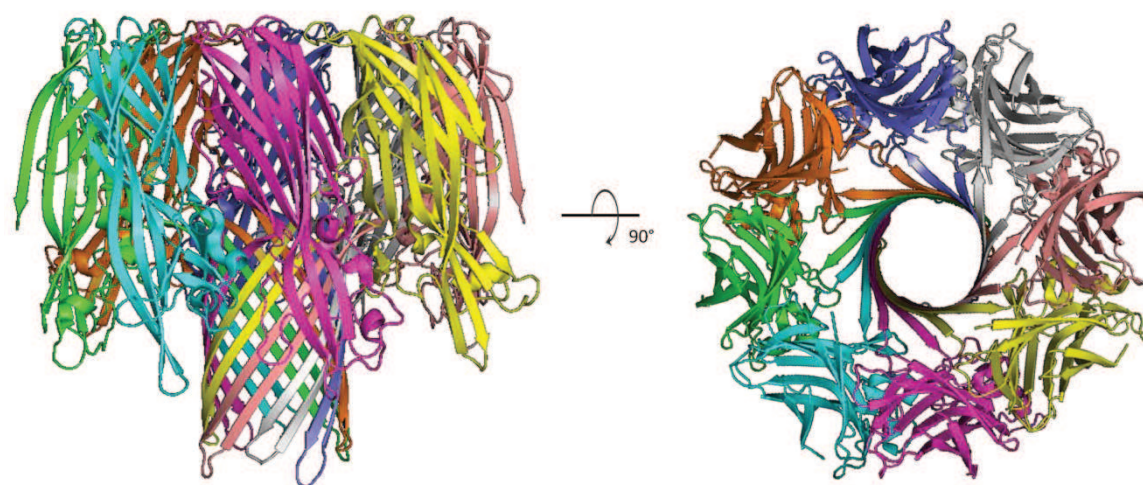


Figure I. 7 : Structure tridimensionnelle du pore formé par HlgA-HlgB
pdb : 3B07 (Yamashita et al., 2011). Vues latérale et supérieure.

EFFETS CELLULAIRES DES LEUCOTOXINES

Outre leur activité de formation de pores, les leucotoxines activent les effecteurs de l'immunité innée. La LPV utilisée à des concentrations sub-lytiques permet la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires par les neutrophiles, comme l'interleukine IL-8 et le leucotriène B4 (König et al., 1995; Staali et al., 1998) et des facteurs antimicrobiens comme les défensines et les cathélicidines (Yoong and Pier, 2010, 2012). LPV permet alors d'amorcer les neutrophiles en agissant au niveau de l'expression génique induisant une augmentation de la phagocytose et l'élimination de *S. aureus* (Graves et al., 2012). La LPV est également capable d'activer des cellules résistantes à son activité lytique dont des cellules murines et des cellules humaines non-immunes (Perret et al., 2012). LukG/LukH induit également une réponse inflammatoire chez le lapin suite à une injection intradermique (Malachowa et al., 2012). Les γ -hémolysines peuvent agir en synergie avec l'hémolysine α et l'hémolysine β pour activer l'inflammasome NLRP3 et la caspase-1 (Munoz-Planillo et al., 2009). La formation de pores sur les cellules immunes provoque également l'activation de la caspase-1, suggérant que toutes les leucotoxines l'activent également (Gurcel et al., 2006). La caspase-1 initie par la suite la pyroptose qui est une mort cellulaire programmée dépendante de l'inflammation et couplée à une importante libération de cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-18 et IL-33 (Bergsbaken et al., 2009; Gurcel et al., 2006).

L'activation des cellules immunitaires par les cytokines et la caspase-1 activent des voies impliquées dans la biogenèse de la membrane et sont liées à une augmentation de la survie cellulaire (Gurcel et al., 2006).

A des doses sub-lytiques, les leucotoxines sont également capables d'induire une mort cellulaire par apoptose. La toxine α semble avoir un effet pro-apoptotique (Jonas et al., 1994), le mécanisme pourrait reposer sur l'efflux de potassium par les pores, sur l'activation de protéases caspase-like et sur le relargage de cytochrome *C* par les mitochondries (Warny and Kelly, 1999). De plus, à faible concentration, la LPV induit l'apoptose, alors qu'elle induit la nécrose à fortes concentrations (Genestier et al., 2005). L'apoptose a été associée à une rupture rapide de l'homéostasie mitochondriale et l'activation de la caspase-9 et de la caspase-3, ce qui suggère que l'apoptose induite par la LPV est préférentiellement médiée par la voie mitochondriale. Les auteurs suggèrent que la LPV pourrait agir au niveau de la mitochondrie en créant des pores dans la membrane mitochondriale externe.

Cependant, avant le déclenchement de toutes ces voies, la formation du pré-pore de toutes les leucotoxines est accompagnée par une augmentation très rapide de la concentration du calcium intracellulaire (Staali et al., 1998). Cette augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ nécessite la présence des deux sous-unités et elle est dépendante de la présence de calcium extracellulaire. Le calcium est un messenger secondaire impliqué dans la transduction de signal de nombreuses voies telles que l'inflammation, le métabolisme, l'apoptose, les mouvements intracellulaires et la réponse immune. Le mécanisme qui aboutit à cette augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ est le sujet principal d'investigation de cette thèse. En effet, plusieurs travaux suggèrent que l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ se fait indépendamment de la formation du pore (Baba Moussa et al., 1999; Nguyen et al., 2002). Pour comprendre tous les effets des leucotoxines, il est donc important d'identifier les mécanismes et les voies calciques activées par ces leucotoxines.

3. RECEPTEURS DE PFTS DE *S. AUREUS*

La première étape de l'action de n'importe quelle toxine est sa fixation à la membrane cellulaire qui est l'interface entre les cellules et les facteurs pathogènes. Les lipides membranaires ont été considérés pendant longtemps comme les molécules fixant les PFTs de *S. aureus*. Cependant, ils n'expliquent pas la spécificité de ces toxines pour certains types cellulaires et certaines espèces. Récemment, une série de protéines membranaires ont été identifiées comme récepteurs des toxines de *S. aureus* (Dumont and Torres, 2013).

RECEPTEURS DE LA TOXINE A

La toxine α (Hla) se lie, à forte concentration, à la plupart des cellules eucaryotes par un mécanisme d'adsorption non spécifique, probablement par l'interaction avec les groupes de tête de la phosphocholine (Hildebrand et al., 1991). La déplétion du cholestérol ou de la sphingomyéline de la membrane abolit la liaison et la cytotoxicité de Hla. Aussi, l'ajout de phosphocholine exogène perturbe la fixation de la toxine et altère l'hémolyse des érythrocytes de lapin (Valeva et al., 2006). Cependant, une interaction de haute affinité de la toxine avec un récepteur protéique a aussi été suggérée, car les érythrocytes de lapin sont significativement plus sensibles que ceux d'origine humaine. Récemment, la désintégrine et métalloprotéase 10 (ADAM10) a été identifiée, par une approche biochimique, comme le déterminant cellulaire de la toxine α (Wilke and Bubeck Wardenburg, 2010). L'interaction d'ADAM10 avec Hla est nécessaire à l'heptamérisation et la formation du pore cytolytique à faible concentration de Hla. Suite à la fixation de Hla, ADAM10 se relocalise dans des rafts, plateformes lipidiques riches en cavéoline-1 qui facilitent le regroupement des molécules de signalisation. Ces résultats permettent de comprendre les observations suggérant des interactions entre Hla et la cavéoline-1 (Pany et al., 2004). Il est démontré que le complexe Hla-ADAM10 initie les événements de signalisation qui aboutissent à la rupture des matrices d'adhésion cellulaire (Wilke and Bubeck Wardenburg, 2010).

LA FAMILLE DE L'A DESINTEGRIN AND METALLOPROTEASE (ADAM)

«A Disintegrin And Metalloprotease » (ADAM) regroupe une famille de protéines d'environ 750 acides aminés. Elles sont caractérisées par la présence d'une séquence signal N-terminale suivie par un pro-domaine, d'un domaine métalloprotéase, d'un domaine désintégrine riche en cystéines, d'un domaine transmembranaire et d'une extrémité cytoplasmique capable de lier des domaines SH3 (Figure I.7) (Black and White, 1998; Blobel, 1997; Blobel and White, 1992; Seals and Courtneidge, 2003; Takeda, 2009). Trente huit protéines ADAM ont été identifiées, mais

seuls sept membres de cette famille (ADAM 8, 9, 10, 12, 15, 17 et 33) possèdent un motif consensus de liaison du zinc (HEXGHXXGXXHD) avec 3 résidus histidine et un résidu aspartate, ce qui confère l'activité protéolytique au domaine extracellulaire (domaine métalloprotéase). Ces protéines jouent un rôle dans le clivage de l'ectodomaine et la protéolyse intramembranaire régulée (RIP ou « Regulated Intramembrane Proteolysis ») de protéines transmembranaires. Le domaine disintégrine pourrait se fixer au substrat pour permettre au domaine protéase de le cliver (Black and White, 1998). Il pourrait également jouer un rôle dans l'adhésion cellulaire en se fixant aux intégrines (Zhang et al., 1998b).

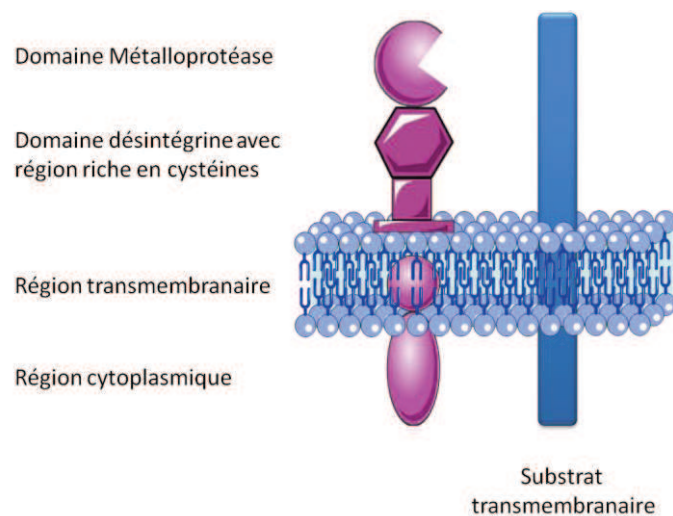


Figure I. 8 : ADAM10.

ADAM10 est formée d'un domaine métalloprotéase, un domaine désintégrine et un domaine riche en cystéines. La région cytoplasmique contient des sites de phosphorylation ou des régions riches en prolines qui peuvent lier des molécules à domaine SH3. ADAM10 permet le clivage de l'ectodomaine et la protéolyse intramembranaire régulée (RIP) de nombreux substrats transmembranaires. (Figure adaptée de (Saftig and Reiss, 2010))

ADAM10

ADAM10 est un médiateur important du clivage de l'ectodomaine et de la protéolyse intramembranaire régulée (RIP) de nombreux substrats dont le précurseur de plaque amyloïde (APP), les éphrines, les cadhérines, les chimiokines, les récepteurs Notch, Delta-1, CD23, Lag-3, FasL et CD44. Le clivage protéolytique de plusieurs de ces substrats contribue à la pathogenèse de multiples maladies, comme des cancers ou l'inflammation (Blobel, 2005; Crawford et al., 2009).

ADAM10 est exprimée sous forme de zymogène, activé par clivage du pro-domaine par la protéase furine (Hwang et al., 2006). Après activation, l'activité protéolytique d'ADAM10 est dépendante de la conformation structurale du substrat. Cependant, cette activité d'ADAM10

peut être modulée par de nombreuses signalisations, comme l'acide rétinoïque et la protéine kinase C (PKC), l'expression de la nardylsine ou NRD convertase, la déplétion du cholestérol, la N-glycosylation, la composition lipidique de la membrane et l'influx calcique (Escrevente et al., 2008; Hiraoka et al., 2007; Kojro et al., 2001; Saftig and Reiss, 2010; Sanderson et al., 2005; Skovronsky et al., 2000; Tippmann et al., 2009). Cette activité d'ADAM10 peut également être affectée par sa localisation cellulaire et ses interactions avec des protéines et/ou par des modifications post-traductionnelles de son extrémité cytoplasmique. Outre le clivage de l'ectodomaine et l'activité de RIP, ADAM10 contribue au tri exosomal de substrats comme l'APP, le CD44 et L1, qui sont clivés dans les endosomes, puis libérés sous forme d'exosomes (Sharples et al., 2008; Stoeck et al., 2006). ADAM10 peut également subir une RIP par ADAM9 et ADAM15 et la γ -sécrétase (Tousseyn et al., 2009). Le domaine intracellulaire d'ADAM10 a également été retrouvé dans le noyau cellulaire, dans des sites qui interviennent probablement dans la régulation génique, suite à son clivage par la γ -sécrétase. ADAM10 joue donc un rôle de métalloprotéase lorsqu'elle est située dans la membrane et un rôle de signalisation potentielle suite à son clivage. ADAM17 partage beaucoup d'homologies de structure et de fonction avec ADAM10 (Saftig and Reiss, 2010).

RECEPTEURS DE LukG/LukH (LukA/LukB)

Récemment, la « $\beta 2$ integrin macrophage antigen 1 » (Mac-1) (aussi nommée CD11b/CD18, CR3, ou intégrine $\alpha M/\beta 2$) a été identifiée comme étant le récepteur membranaire de LukG/LukH (DuMont et al., 2013a). La présence de CD11b est essentielle et suffisante à rendre les cellules susceptibles à LukG/LukH, du fait de son interaction avec le domaine I de CD11b, qui conditionne la spécificité de la toxine envers les différentes espèces. L'affinité de LukG/LukH pour le domaine I de CD11b humain est d'environ 1,92 nM, mais la toxine ne reconnaît pas le CD11b murin (Malachowa et al., 2012). L'identification de ce récepteur peut expliquer la synergie de LukG/LukH et la LPV sur les neutrophiles puisqu'à concentration sub-lytique, la LPV augmente le niveau d'expression de CD11b à la surface de ces cellules (DuMont et al.; Graves et al., 2012; Ventura et al., 2010).

LES INTEGRINES

Les intégrines forment une famille de récepteurs hétérodimériques exprimées sur la plupart des cellules ; identifiées d'abord en rapport avec l'adhésion cellulaire, elles sont impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires. Ces récepteurs sont composés de 2 sous-unités transmembranaires : α et β , formées d'un grand domaine extracellulaire, d'un segment

transmembranaire et d'une courte région cytoplasmique. Dix-huit chaînes α et 8 chaînes β ont été identifiées chez l'homme, elles permettent de constituer 24 hétérodimères différents, qui peuvent se lier à une variété de ligands (Hynes, 2002).

β 2 INTEGRIN MACROPHAGE ANTIGEN 1 (MAC-1)

L'intégrine Mac-1 est exprimée par les polymorphonucléaires humains (hPMNs) (pour la plupart, des neutrophiles), les « Natural Killers » (NK) et les phagocytes mononucléaires tels que les macrophages. Elle joue un rôle important dans l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales et aux plaquettes, dans leur transmigration à travers l'épithélium, ainsi que dans la phagocytose dépendante des intégrines. Dans les neutrophiles, Mac-1 module également l'apoptose dépendante de la synthèse de ROS par la NADPH oxydase et l'activation des caspases (Mayadas and Cullere, 2005). Mac-1 peut identifier certains pathogènes en reconnaissant les polysaccharides sur leur surface ainsi que les partenaires de signalisation liés au glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI) (Ross, 2000). Elle agit aussi comme récepteur spécifique du peptide C3bi du complément, ce qui augmente l'efficacité de la phagocytose lorsque le pathogène est opsonisé (Ehlers, 2000; Mayadas and Cullere, 2005; Plow and Zhang, 1997). Grâce à la grande variété des ligands de Mac-1 et à son pouvoir de coopérer fonctionnellement avec une variété d'autres récepteurs (Fc γ Rs, TLR2 ou « toll like receptor 2 » et CD14), cette protéine intervient dans la régulation de nombreuses fonctions des neutrophiles comme la fixation au fibrinogène, aux plaquettes et aux complexes immuns (Ehlers, 2000). L'activation des neutrophiles augmente l'expression à la membrane et l'avidité de Mac-1 (Springer, 1994).

A l'état de repos, les dimères Mac-1 sont inactifs et peuvent être activés par divers stimuli externes, pour produire un état de liaison au ligand de haute affinité suite à des changements conformationnels rapides qui interviennent dans les deux sous-unités α et β (Lim and Hotchin, 2012). A l'état inactif, les régions transmembranaires et cytoplasmiques des deux sous-unités sont étroitement associées et les domaines extracellulaires sont incurvés vers la membrane cellulaire. Suite à l'activation, les domaines extracellulaires sont dressés, et les régions transmembranaires et cytoplasmiques des deux sous-unités se séparent (Tao et al., 2010) (Figure I.9).

Mac-1 peut assurer trois types de signalisation : (1) la transduction de signaux de l'intérieur de la cellule à l'ECM « inside-out », (2) la transduction de signaux de l'ECM vers l'intérieur de la cellule « outside-in », et (3) une signalisation non classique (Lim and Hotchin, 2012). La signalisation « inside-out » permet aux phagocytes de se lier à leur cible opsonisée, ce qui induit

la signalisation « outside-in » résultant en une internalisation de la cible opsonisée, qui se fait d'une manière dépendante de l'actine suite à sa polymérisation (Figure I.9).

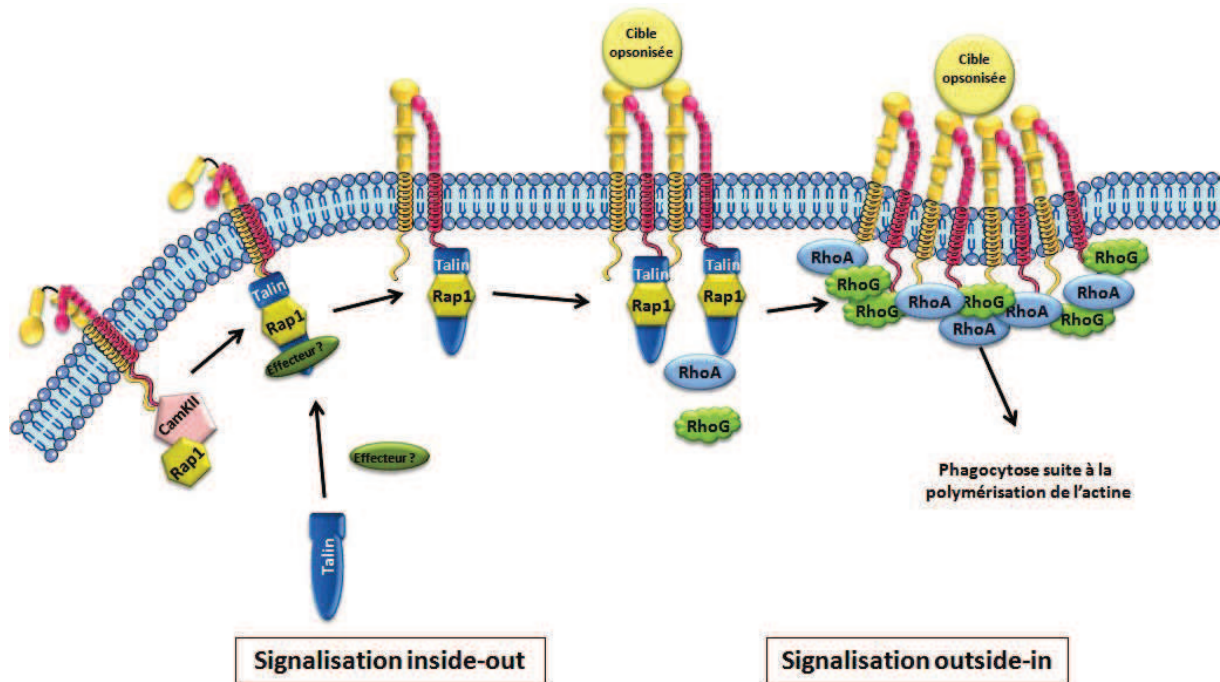


Figure I. 9 : Phagocytose induite par Mac-1

Suite à une stimulation par un agoniste extracellulaire, Mac-1 permet aux phagocytes de se lier à leur cible opsonisée (signalisation « inside-out ») résultant en une internalisation de la cible opsonisée (signalisation « outside-in »). A l'état de repos, les régions transmembranaires et cytoplasmiques sont étroitement associées et les domaines extracellulaires courbés vers la membrane cellulaire. Suite à l'activation, les domaines extracellulaires sont dressés, et les régions transmembranaires et cytoplasmiques des deux sous-unités se séparent. La signalisation « inside-out » implique Rap1, Talin1, CamKII activés par un effecteur potentiel. La signalisation « outside-in » nécessite l'action de RhoA et RhoG qui facilitent la polymérisation de l'actine. (Figure adaptée de (Lim and Hotchin, 2012))

SIGNALISATION INSIDE-OUT

La signalisation « inside-out » de Mac-1 est initiée dans la région cytoplasmique. Les effecteurs majeurs de cette signalisation sont Rap1, Talin1 et CamKII (Figure I.9). Rap1 est une petite GTPase impliquée dans l'activation des intégrines (Caron, 2003). Talin1 est une protéine du cytosquelette qui possède une extrémité N-terminale avec un domaine FERM (protein 4.1, ezrin, radixin, and moesin) grâce à laquelle se fait l'interaction avec la partie cytoplasmique de plusieurs intégrines β ; elle est suffisante pour l'activation des intégrines (Kopp et al.; Praekelt et al., 2012; Tadokoro et al., 2003). CamKII est une kinase sérine/thréonine, dépendante du

calcium et de la calmoduline, qui est connue pour son activité de régulation de l'expression génique, du trafic membranaire, de la sécrétion, du dynamisme du cytosquelette, de l'apoptose et de la phagocytose des cellules cancéreuses induite par $\beta 3$ (Poggi et al., 2002). L'interaction entre Rap1 et Talin1 régule la localisation de ces molécules au niveau des invaginations membranaires lors de la phagocytose. Puis Mac-1 est activée grâce à l'interaction du domaine N-terminal de Talin1 avec sa sous-unité $\beta 2$ (Caron et al., 2000; Lim et al., 2007). D'autres protéines à domaine FERM, comme les kindlines, sont également essentielles à la fixation et à l'activation des intégrines dans différents types cellulaires. Par exemple, kindline-3 est nécessaire à l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales dépendantes de l'intégrine $\beta 2$ (Moser et al., 2009; Svensson et al., 2009). De plus, CD44 qui est une molécule d'adhésion impliquée dans la fixation et le métabolisme de l'hyaluronane, peut aussi interagir avec des protéines à domaine FERM, est liée à l'activation « inside-out » de Mac-1. Elle permet l'adhésion des ostéoclastes à la fibronectine en absence de Kindline-3 (Schmidt et al., 2011). L'activation « inside out » de $\beta 2$ fait intervenir également des kinases et des phosphatases (Chilcoat et al., 2008; Fagerholm et al., 2002).

SIGNALISATION « OUTSIDE-IN »

La signalisation « outside-in » est observée chez les macrophages et d'autres types cellulaires qui expriment des intégrines non-leucocytaires. Dans les macrophages, la localisation et l'activation de la petite GTPase RhoA impliquent deux régions différentes de la région cytoplasmique de $\beta 2$. La région de $\beta 2$ proche de la membrane est nécessaire pour l'activation de RhoA, mais elle est insuffisante pour déclencher la polymérisation de l'actine et de l'absorption des particules. Inversement, les résidus carboxy-terminaux de la région cytoplasmique de $\beta 2$ contrôlent l'accumulation de RhoA actif dans les phagosomes enrichis en Mac-1 (Wiedemann et al., 2006). RhoG, une autre petite GTPase (Tzircotis et al., 2011) (Figure I.9), avec la protéine 14-3-3 sont des protéines clés de cette signalisation. 14-3-3 est une protéine liant la phosphosérine/phosphothréonine, elle intervient en interagissant avec des facteurs de transcription, des protéines du cytosquelette et plusieurs molécules de signalisation (Freeman and Morrison, 2011). Un complexe Rac1 GEF, TIAM et protéine 14-3-3 se forme suite à la fixation de la protéine 14-3-3 permettant l'activation de Rac1, le remodelage du cytosquelette et, finalement, l'adhésion cellulaire et la migration (Gronholm et al., 2011).

De plus, certains ligands solubles de Mac-1 peuvent déclencher des signaux transmembranaires qui peuvent activer la signalisation calcique et le renouvellement de l'inositol-triphosphate (IP3) menant à la phagocytose, la production d'anions superoxyde, l'exocytose des granules et

l'adhésion cellulaire (Petty and Todd, 1996; Todd and Petty, 1997). Il reste à définir si cette voie de signalisation est activée suite à la fixation de l'hémolysine LukG/LukH ou si c'est plutôt la signalisation des intégrines appelée non classique qui est activée.

ACTIVITES DE SIGNALISATION NON-CLASSIQUES

Des effets médiés par Mac-1 et ne rentrant pas dans la signalisation bidirectionnelle ont été identifiés (Simon, 2011), ils ont été nommés événements non-classiques de la signalisation de Mac-1. Ici, le regroupement des dimères et le plissage de la membrane se produisent indépendamment du ligand en incubant les macrophages avec le phorbol 12-myristyl-13-acetate (PMA) ou le lipopolysaccharide (LPS) (Patel and Harrison, 2008; Williams and Ridley, 2000).

Cette forme de regroupement des dimères se produit grâce aux extrémités cytoplasmiques de Mac-1 et conduit, dans les monocytes, à l'expression du facteur de transcription Foxp1 et le marqueur de différenciation PKC δ et à la différenciation subséquente des monocytes en macrophages (Shi et al., 2004; Xue et al., 2010). Le plissage de la membrane a été observé dans les macrophages activés par le PMA ou le LPS, avant la fixation des particules C3bi-opsonisées et implique un ensemble différent de molécules du cytosquelette et de signalisation (Patel and Harrison, 2008).

RECEPTEURS DE Luke/LukD

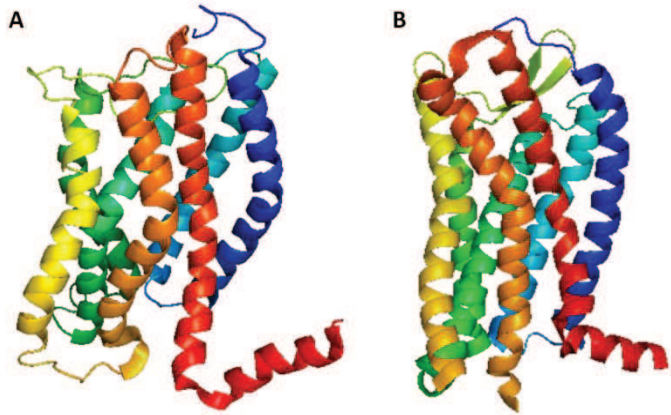
Plusieurs récepteurs de type GPCR pouvant lier l'hémolysine Luke/LukD ont été identifiés. Luke/LukD cible l'immunité innée en se fixant sur les récepteurs CXCR1 et CXCR2 présents sur les PMNs, les monocytes et les cellules NK (Reyes-Robles et al., 2013). En visant le récepteur CCR5, Luke/LukD cible l'immunité adaptative en éliminant les sous-ensembles de cellules T CCR5⁺, y compris les lymphocytes mémoire, les cellules Th1 et Th17, ainsi que les cellules présentatrices d'antigène (Alonzo et al., 2013).

CCR5 (Figure I.10) est un récepteur de chimiokines couplé aux protéines G, il est impliqué dans la chimiotaxie des cellules immunes et il est surtout connu pour être un co-récepteur du VIH (Blanpain et al., 1999; Deng et al., 1996; Doranz et al., 1996). La sous-unité de classe S de Luke/LukD (Luke) se lie directement à CCR5 avec une constante de dissociation (Kd) de l'ordre de 39,6 nM. La même sous-unité Luke se lie spécifiquement à CXCR1 et CXCR2 présent sur les cellules-hôtes. Cependant, la concentration de Luke utilisée dans l'étude de Reyes-Robles et al. (2013) est de 300 nM, environ 10 fois le Kd de Luke pour CCR5. De plus, des hybrides Luke/S-PV, formés à partir de Luke avec un des 5 domaines de LukS-PV qui sont différents entre ces

deux toxines, ont été générés. La région DR4 semble jouer un rôle dans la fixation de LukE à CXCR1 et CXCR2, cependant, il est difficile de tirer une interprétation des résultats obtenus avec ces chimères.

Figure I. 10 : Structure tri-dimensionnelle de CXCR1 et CCR5.

Forte ressemblance entre les structures 3D de CXCR1 (A) (pdb : 2LNL (Park et al., 2012)) et CCR5 (B) (pdb : 4MBS (Tan et al., 2013)), les récepteurs de LukE. Les deux récepteurs sont des GPCRs formés de 7 hélices α transmembranaires.



LES RECEPTEURS DE CHIMIOKINES

Les chimiokines sont de petites protéines (70-90 acides aminés) caractérisées par des Cystéines conservées dans la partie N-terminale, elles sont classées en quatre groupes selon le nombre et l'espacement entre les cystéines conservées (C): les chimiokines α ou CXC, les β ou CC, les γ ou C et les δ ou CXC3 (Rossi and Zlotnik, 2000). Les chimiokines ont été initialement identifiées comme des cytokines pro-inflammatoires chimio-attractantes qui permettent l'activation et la migration des leucocytes jusqu'au site d'inflammation, mais leur rôle biologique n'est pas limité à la chimiotaxie. Les chimiokines sont également impliquées dans l'angiogenèse, l'hématopoïèse, le développement embryonnaire et la formation de métastases (Gerard and Rollins, 2001; Yoshie et al., 2001). Ces processus sont induits par l'interaction des chimiokines avec leurs récepteurs respectifs, qui appartiennent à la famille des récepteurs couplés à la protéine G (GPCR). Une chimiokine peut se lier à plusieurs récepteurs, et un récepteur donné peut interagir avec plusieurs chimiokines, mais dans certains cas, il existe des couples récepteur-ligand spécifiques (Domanska et al., 2010). Une série d'interactions séquentielles doit avoir lieu avant la signalisation induite par les chimiokines. Il s'agit de: (1) la liaison au récepteur et l'interaction du récepteur avec les protéines G, (2) l'activation de molécules effectrices intracellulaires, et (3) la désensibilisation du récepteur (Maghazachi, 1999).

CCR5

Le récepteur de chimiokines CCR5 (Figure I.10) est formé de 352 acides aminés ; il est principalement exprimé dans les lymphocytes mémoire et les lymphocytes T effecteurs, les cellules NK, les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques immatures. Dans ces

cellules, il régule le chimiotactisme et l'activation cellulaire (Balistreri et al., 2007; Mueller and Strange, 2004; Oppermann, 2004), grâce à l'interaction avec les chimiokines β suivantes : CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), CCL5 (RANTES), CCL8 (MCP-2), CCL11 (eotaxin), CCL14a (HCC-1) et CCL16 (HCC-4) (Alexander et al., 2008).

Suite à la liaison des ligands, diverses cascades qui régulent la signalisation de CCR5 et son expression à la surface cellulaire sont initiées. La signalisation permet de mobiliser le Ca^{2+} intracellulaire, et induire la chimiotaxie et l'exocytose. La régulation de l'expression de CCR5 implique la désensibilisation, l'internalisation et le recyclage, ou la dégradation, du récepteur. Ces mécanismes sont initiés par la phosphorylation du complexe récepteur/ligand par la PKC, ou par phosphorylation homologue par l'intermédiaire des kinases des GPCRs (GRKs) (Oppermann, 2004). Le complexe phosphorylé se lie aux protéines régulatrices β -arrestines, qui initient l'internalisation du récepteur CCR5 à travers des vésicules revêtues de clathrine (Goodman et al., 1996; Laporte et al., 1999). L'endocytose du complexe récepteur/ligand se produit aussi indépendamment de la voie β -arrestine/clathrine (Kraft et al., 2001). Une fois le ligand dissocié ou dégradé, les protéines CCR5 sont recyclées par les endosomes périnucléaires et se retrouvent à l'état déphosphorylé à la membrane cellulaire (Pollok-Kopp et al., 2003; Signoret et al., 1998).

CXCR1 ET CXCR2

CXCR1 et CXCR2 sont formées respectivement de 350 et 360 acides aminés et sont les principaux récepteurs de chimiokines sur les neutrophiles. Ils sont exprimés par les granulocytes, surtout les neutrophiles, mais aussi par les éosinophiles, les mastocytes, les lymphocytes T et les basophiles (Bertini et al., 2012; Kim, 2004). CXCR2 se retrouve aussi sur les cellules endothéliales où il contribue également au chimiotactisme (Reutershan et al., 2006). CXCR1 et CXCR2 partagent 78% d'homologie de leur séquence d'acides aminés et sont activés par les chimiokines ELR⁺ (contenant les acides glutamique-leucine-arginine) (Konrad and Reutershan, 2012). CXCR1 est spécifique à CXCL8, alors que CXCR2 interagit également avec CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, et CXCL7 (Baggiolini et al., 1997). CXCR2 semble activer directement les PMNs, alors que CXCR1 semble ralentir leur migration par la régulation de CXCR2 et agit pour l'activation de propriétés microbicides (Tsai et al., 2000). Les acides aminés des deuxième et troisième boucles intra-cytoplasmiques de CXCR1 et CXCR2 sont nécessaires pour la liaison de la protéine $\text{G}_{i\alpha 2}$ (Damaj et al., 1996). Suite à la fixation des chimiokines, les deux récepteurs se couplent à la protéine G pour hydrolyser l'IP₃, mobiliser le Ca^{2+} intracellulaire, et induire la chimiotaxie et l'exocytose (Richardson et al., 2003; Richardson et al., 1998). CXCR1 et CXCR2 sont phosphorylées, désensibilisées et internalisées suite à l'activation

par les chimiokines (Barlic et al., 1999; Feniger-Barish et al., 1999). CXCR2 est internalisée plus rapidement que CXCR1, mais il est recyclé plus lentement. CXCR1 et CXCR2 sont capables de former des homodimères et des hétérodimères (Milligan et al., 2005).

RECEPTEURS DE LPV

Les récepteurs de la LPV ont été identifiés par une approche basée sur la neutralisation d'anticorps. LukS-PV se lie sur les récepteurs du complément C5aR (ou CD88) et C5L2 (ou GPR77). La LPV cible les neutrophiles, les monocytes et les macrophages, mais pas les lymphocytes, ce qui s'explique par l'absence de l'expression de C5aR et C5L2 sur ces cellules (Gao et al., 2005; Gauduchon et al., 2001; Gerard and Gerard, 1991; Meyer et al., 2009; Monk et al., 2007; Woodruff et al., 2011). C5aR détermine également la spécificité de la LPV envers les différentes espèces animales au vu des variations de séquence de C5aR entre celles-ci (Spaan et al., 2013). Ce récepteur est fortement exprimé par les neutrophiles, ce qui permet à la toxine de distinguer les cellules phagocytaires des autres cellules. La liaison de LukS-PV sur les neutrophiles peut être inhibée par le ligand du C5aR (C5a) et les antagonistes de C5aR sécrétés par *S. aureus* (CHIPS) (de Haas et al., 2004). La concentration efficace médiane (EC50) de LukS-PV est de 2,8 nM pour les neutrophiles humains (Spaan et al., 2013). LPV utilise à la fois le C5aR et le C5L2 pour induire la formation de pores, mais comme C5aR est le récepteur le plus abondant sur les neutrophiles, il est considéré comme le récepteur majeur de la LPV. LukS-PV se lie à la fois au domaine N-terminal et à un domaine central du C5aR humain. Cependant, la liaison de LukS-PV à la cellule hôte, qui peut se faire uniquement par association au N-terminal, n'est pas suffisante pour la formation de pores qui nécessite la présence du domaine central (Spaan et al., 2013).

C5aR

C5aR est le récepteur majeur de l'anaphylatoxine C5a, une glycoprotéine de 74 acides aminés ($\approx$ 11 kDa). C5a possède une structure en un faisceau à quatre hélices α hélicoïdales qui se juxtaposent dans une topologie antiparallèle, elles sont stabilisées par trois ponts disulfure et reliées par trois boucles peptidiques (Zhang et al., 1997; Zuiderweg and Fesik, 1989; Zuiderweg et al., 1989). C5aR est un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé aux protéines G. C5a fixe le récepteur sur deux sites d'ancrage, d'abord un «site de reconnaissance» qui inclut à la fois l'extrémité N-terminale et la troisième boucle extracellulaire de C5aR, puis la région C-terminale de C5a qui s'insère dans une poche de liaison autour de la cinquième région transmembranaire, appelée le «site effecteur» (Huber-Lang et al., 2003; Siciliano et al., 1994).

Le rôle d'un récepteur est intimement associé au type de cellules sur lesquelles il est exprimé. Dans le sang, C5aR est exprimé principalement par les leucocytes tels que les neutrophiles, les éosinophiles, les basophiles, les monocytes, les cellules dendritiques et les mastocytes. Il est également présent sur des cellules non immunes : les cellules endothéliales vasculaires, les cardiomyocytes, les astrocytes, la microglie, les cellules de Müller, des cellules souches neuronales, des oligodendrocytes, des synoviocytes, des chondrocytes articulaires, des cellules mésangiales du glomérule rénal, des cellules hépatiques de Kupffer et des hépatocytes stimulés, des cellules épithéliales bronchiques et des kératinocytes (Lee et al., 2008a).

Selon le type cellulaire, la liaison de C5a à C5aR conduit à une augmentation des niveaux de calcium intracellulaire et à l'activation de cascades de signalisation intracellulaire accompagnées d'un certain nombre de réponses fonctionnelles. Par exemple, le recrutement et l'activation de cellules inflammatoires, l'augmentation de l'expression de molécules d'adhésion cellulaire, le retard ou l'augmentation de l'apoptose, la phagocytose, le burst oxydatif, la libération d'enzymes granulaires, la sécrétion et la libération d'histamine, la production de cytokines et de chimiokines, la vasodilatation et la chimiotaxie (Guo and Ward, 2005).

C5L2

C5L2 est un récepteur protéique transmembranaire à 7 hélices qui est classé dans la famille des protéines G. Il est formé de 337 acides aminés, partage 38% d'homologie de séquence avec C5aR et est conservé entre les espèces mammifères (Li et al., 2013). L'homologie entre C5L2 et C5aR est surtout présente dans les domaines extracellulaires responsables de la fixation de C5a (Scola et al., 2007). Toutefois, C5L2 présente des différences dans d'importantes régions de la troisième boucle intracellulaire, hautement conservées entre les récepteurs couplés aux protéines G et qui interviennent dans la signalisation calcique et essentielles pour l'activation de la phospholipase C (PLC) et de la MAPK (He et al., 2001; Okinaga et al., 2003). Ces différences ont contribué à l'hypothèse originale que C5L2 est un « récepteur leurre » dépourvu d'activité de signalisation (Monk et al., 2007).

C5L2 est généralement exprimé dans les mêmes cellules que C5aR, ce qui est en accord avec leur emplacement génomique en tandem. C5L2 semble avoir une localisation prédominante intracellulaire au contraire de C5aR (Li et al., 2013). Cependant, le rapport d'expression à la surface et à l'intérieur des cellules peut être dynamique et varie en fonction du type cellulaire et de l'état d'une pathologie (Huber-Lang et al., 2005). La régulation de la transcription et de la traduction de C5L2 dépend de stimuli extracellulaires.

Le rôle physiologique de la protéine C5L2 est toujours énigmatique et controversé; trois observations contradictoires sur la fonction de la protéine C5L2 ont été présentées depuis sa découverte en 2000 (Ohno et al., 2000). Deux hypothèses décrivent un rôle anti-inflammatoire pour C5L2 dans le système immunitaire (Bamberg et al., 2010; Scola et al., 2009), tandis qu'une troisième fournit des preuves pour C5L2 qui agit comme une entité pro-inflammatoire, déclenchant la libération de cytokines (Rittirsch et al., 2008). Cependant, les trois hypothèses s'appuient sur des travaux effectués sur des espèces, des types cellulaires et des modèles expérimentaux différents.

LES GPCRs

Quatre récepteurs de leucotoxines appartiennent à la famille des GPCRs. Cette famille de récepteurs est largement étudiée pour comprendre les réponses cellulaires aux différents stimuli, en résolvant la complexité des voies déclenchées à partir de la membrane plasmique qui forme la barrière qui sépare la cellule des pathogènes.

Les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) forment la famille de protéines membranaires la plus grande et la plus diversifiée. Le génome humain comporte plus de 800 gènes codant des GPCRs (Fredriksson et al., 2003). Ils induisent la plupart des réponses cellulaires dues aux hormones et aux neurotransmetteurs, mais aussi à de grandes protéines, à des lipides, à de petites molécules organiques, à des ions et des photons. Chez les vertébrés, les GPCRs non-sensoriels sont divisés en 4 classes basées sur la similarité de leur séquence et de leur structure primaire : « rhodopsine-like » (classe A), « secretine-like » (classe B), « glutamate-like » (classe C) et récepteurs « frizzled » (classe D) (Sharman et al., 2011). Les GPCRs font partie des nœuds essentiels dans la communication entre les environnements intracellulaires et extracellulaires, transmettant ainsi l'information fournie par un stimulus à des seconds messagers. Suite à leur activation, les GPCRs subissent des changements conformationnels qui facilitent l'activation des protéines hétérotrimériques G et mettent en place une série d'interactions moléculaires permettant : (1) la régulation du couplage des protéines G, (2) l'endocytose du récepteur, (3) la signalisation à travers des voies indépendantes des protéines G (Ferguson et al., 1996; Ferguson and Caron, 1998; Hall et al., 1999; Krupnick and Benovic, 1998; Lefkowitz, 1993; Luttrell et al., 1999; Schoneberg et al., 1999).

STRUCTURE

La structure d'un GPCR peut être divisée en trois parties : (1) la région extracellulaire qui comporte la partie N-terminale et 3 boucles extracellulaires (ECL1-ECL3); (2) la région

transmembranaire qui comporte 7 hélices α (TM1-TM7); et (3) une région intracellulaire comportant 3 boucles (ICL1-ICL3), une hélice amphipathique (H8) et la partie C-terminale (Figure I.11). La région extracellulaire module l'accessibilité du ligand; la région transmembranaire forme le cœur de la structure, lie le ligand et transmet l'information à la région intracellulaire par des changements conformationnels, et la région intracellulaire interagit avec les protéines de signalisation (Venkatakrishnan et al., 2013).

MODE D'ACTION

L'activation des GPCRs par un ligand, la désensibilisation, l'internalisation et le processus de recyclage s'effectuent de manière cyclique. Ce comportement permet, d'une part, de protéger la cellule contre une stimulation excessive et, d'autre part, de préserver les cellules d'une désensibilisation prolongée et d'une insensibilité aux hormones. Ainsi, la magnitude et la durée de la réponse des GPCRs induite par un ligand sont fortement liées à la balance entre la genèse et la fin du signal. La voie d'internalisation contrôle fortement l'activité des GPCRs. Dans la plupart des situations décrites, ceci induit la fin de la signalisation. Cependant, des informations émergentes ont montré un nouveau paradigme, où l'endocytose des GPCRs induit une signalisation persistante (Calebiro et al., 2010; Feinstein et al., 2011; Ferrandon et al., 2009; Kotowski et al., 2011; Mullershausen et al., 2009; Vilardaga et al., 2012) et un fonctionnement prolongé (Okazaki et al., 2008). Dans ces cas, les GPCRs continuent à moduler le taux d'AMPc à partir des membranes de différents compartiments intracellulaires comme les endosomes.

VOIES DE SIGNALISATION ACTIVEES

Pour distinguer les différents stimuli extracellulaires captés par les GPCRs, les cellules ont développé des réseaux de signalisation intracellulaires complexes, gouvernés par des mécanismes dépendants ou indépendants des protéines G. Une protéine G est un hétérotrimère formé des sous-unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$, qui s'assemblent à l'état inactif et fixent un GDP. Suite à l'activation, le GDP est échangé contre un GTP, permettant ainsi aux sous-unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ de se dissocier et d'initier des cascades de signalisations propres à chaque sous-unité (Figure I.11). Il existe 4 voies de signalisation médiées par $G\alpha$ qui sont fortement étudiées. (1) $G\alpha_s$ active l'adénylate cyclase, permettant l'accumulation de l'AMPc dans le cytoplasme et les réponses médiées par l'AMPc, alors que (2) $G\alpha_{i/o}$ inhibe l'adénylate cyclase et ainsi l'accumulation de l'AMPc. (3) $G\alpha_{q/11}$ active la phospholipase C, induisant la formation de l'IP₃ et du diacylglycérol (DAG), et (4) $G\alpha_{12/13}$ active Rho GEF (guanine exchange factor) activant les kinases associées à

Rho et le réarrangement du cytosquelette. Les sous-unités $G\beta\gamma$ sont également impliquées dans la régulation de voies de signalisation comme la libération de Ca^{2+} (Stehno-Bittel et al., 1995a).

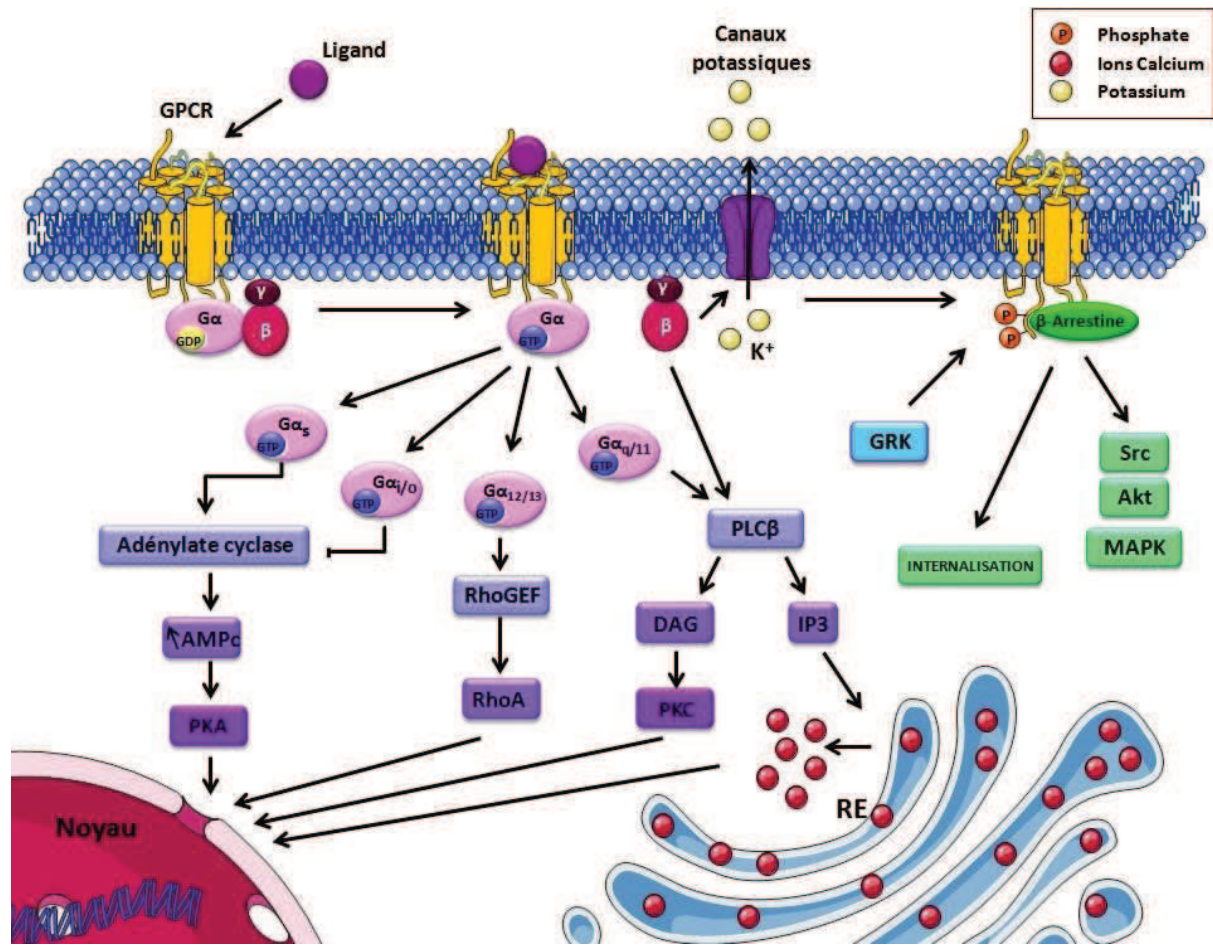


Figure I. 11 : Mécanisme d'action des GPCRs

Suite à la fixation du ligand, le GDP de la protéine trimérique G qui se fixe au GPCR est échangé contre un GTP, permettant aux sous-unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ de se dissocier et d'initier des cascades de signalisation propres à chaque sous-unité. $G\alpha_s$ active l'adénylate cyclase, permettant l'accumulation de l'AMPc dans le cytoplasme et les réponses médiées par l'AMPc, alors que $G\alpha_{i/o}$ inhibe l'adénylate cyclase et ainsi l'accumulation de l'AMPc. $G\alpha_{12/13}$ active Rho GEF activant les kinases associées à Rho. $G\alpha_{q/11}$ active la PLC β induisant la formation du DAG qui active la PKC et de l'IP $_3$ qui permet la libération des stocks réticulaires. Les sous-unités $G\beta\gamma$ sont également impliquées dans la régulation de voies de signalisation comme l'activation de la PLC β induisant la libération de Ca^{2+} (Stehno-Bittel et al., 1995a) et l'activation de canaux ioniques. Les GPCRs peuvent être phosphorylées par les GRKs recrutant la β -arrestine. La β -arrestine peut activer plusieurs kinases comme Src, Akt, et MAP kinases, ainsi qu'elle permet l'internalisation des GPCRs, initiant un processus de trafic intracellulaire qui détermine si le récepteur sera recyclé ou dégradé. Figure adaptée de (Ritter and Hall, 2009).

La voie de signalisation non dépendante des protéines G la mieux décrite implique la phosphorylation du GPCR par les GRKs, suivie par le recrutement de l'adaptateur β -arrestine (Figure I.11). Les β -arrestines sont capables d'activer plusieurs kinases comme Src, Akt, et MAPK (Violin and Lefkowitz, 2007). Le recrutement de la β -arrestine est également l'une des voies

possibles d'internalisation des GPCRs, initiant un processus de trafic intracellulaire qui détermine si le récepteur sera recyclé ou dégradé suite à une exposition constante à l'agoniste (Hanyaloglu and von Zastrow, 2008; Zhang et al., 1998a).

SIGNALISATION BIAISEE

Traditionnellement, il était établi qu'un même complexe agoniste-récepteur induise la même efficacité intrinsèque aux voies de signalisation intracellulaire. Ce paradigme classique est suffisant pour expliquer les variations dans le potentiel de l'agoniste, et la réponse maximale, qui dépend de l'étendue de l'amplification du signal et la réserve du récepteur. Cependant, plusieurs évidences défient ce point de vue, suggérant que certains ligands peuvent activer les GPCRs différemment à travers des efficacités intrinsèques dépendantes de la voie de signalisation empruntée (Kahsai et al., 2011; Kenakin and Miller, 2010; Kenakin, 2012).

Sur l'aspect de la signalisation cellulaire, ce phénomène prédit la présence de ligands qui ont la capacité de biaiser la réponse fonctionnelle et favorise une sélection de certaines voies de signalisation par rapport à d'autres du répertoire de signalisation du récepteur. Ceci permet au récepteur d'activer seulement une série d'effecteurs spécifiques et, ainsi régler les réponses cellulaires et les réponses physiologiques associées. En plus de la signalisation biaisée du ligand, des changements conformationnels du récepteur par la substitution de certains acides aminés permet au récepteur de sélectionner certains signaux de transduction par rapport à d'autres. Ce concept connu sous le nom de « trafic dirigé par le ligand », « sélectivité fonctionnelle » ou « agonisme biaisé », montre que les récepteurs sont capables de générer une réponse plus complexe que la pharmacologie classique des agonistes et des antagonistes ne pouvait prédire.

De telles signalisations biaisées peuvent être générées par des mutations présentes sur différentes régions des GPCRs, qui activent sélectivement l'une ou l'autre des voies de signalisation (Gregory et al., 2010). Des mutations de résidus situés au niveau de la poche de fixation du ligand des récepteurs de classe A peuvent biaiser la réponse à travers les voies dépendantes ou indépendantes des protéines G. Des substitutions dans la partie intracellulaire du récepteur peuvent découpler soit les protéines G, soit la β -arrestine (Wei et al., 2003).

La plupart des ligands biaisés décrits différencient le couplage des protéines G de la signalisation indépendante des protéines G (Violin and Lefkowitz, 2007). Cependant, dans certains cas, la transduction du signal par une protéine G est favorisée par rapport à une autre (Berg et al., 1998). Les mutations, ainsi que les ligands, peuvent biaiser la réponse du récepteur pour faire une distinction entre les différentes protéines G (Sivertsen et al., 2013).

CHANGEMENTS CONFORMATIONNELS PENDANT LA SIGNALISATION BIAISEE

D'un point de vue moléculaire, les propriétés de la signalisation biaisée peuvent correspondre à l'existence de différentes conformations « actives » et « inactives » du récepteur. Les conformations « actives » peuvent interagir différemment avec les partenaires intracellulaires de la signalisation et génèrent des modèles de signalisation différents (Kenakin, 1995). La transition à la forme active, stabilisée par des ligands de nature chimique très variable, est possible grâce aux mêmes changements conformationnels. Ces changements ont pu être étudiés par diverses méthodes biochimiques et biophysiques et par la cristallographie aux rayons X (Farrens et al., 1996; Rasmussen et al., 2011). Des données biophysiques suggèrent que les agonistes totaux et les agonistes partiels de β_2 AR, par exemple, se fixent et activent le récepteur suivant différents mécanismes et avec différentes cinétiques, malgré la grande similarité de leurs structures chimiques (Swaminath et al., 2005). Différentes conformations du récepteur peuvent également induire un recrutement différentiel de protéines régulatrices intracellulaires comme les protéines G, les β -arrestines et les GRKs, qui permettent des réponses biaisées du récepteur (Breit et al., 2011; Ulloa-Aguirre et al., 2011). Vu que certains GPCRs peuvent exister en dimères ou oligomères (Milligan, 2008; Pin et al., 2005), il paraît possible que la signalisation soit modulée différemment par rapport à un récepteur monomérique. La dimérisation (homo- ou hétéro-dimérisation) a été impliquée dans la signalisation biaisée (Jarrahian et al., 2004).

INTERNALISATION/ RECYCLAGE

L'internalisation stimulée par un ligand peut conduire les GPCRs à travers des itinéraires divergents, dont la voie de dégradation du récepteur et les voies de recyclage qui induisent une resensibilisation de la membrane par le récepteur (Hanyaloglu and von Zastrow, 2008). La phosphorylation du récepteur et la liaison subséquente de la β -arrestine empêchent l'interaction du récepteur avec les protéines G, arrêtant ainsi le signal induit par les protéines G et initie l'endocytose. Les GPCRs activés par l'agoniste sont rapidement phosphorylés par les GRKs (Premont and Gainetdinov, 2007), suivis par la translocation des arrestines à la membrane plasmique (Lefkowitz and Shenoy, 2005). La liaison de l'arrestine aux GPCRs induit un changement de conformation qui permet l'interaction avec la clathrine et la sous-unité β_2 -adaptine de l'adaptateur de la clathrine AP2 (adaptor protein complex-2), qui compose la machinerie d'endocytose et induit ainsi l'internalisation des récepteurs liés à l'arrestine (Goodman et al., 1996; Laporte et al., 1999; Wolfe and Trejo, 2007). L'activité d'endocytose de l'arrestine est également soumise à une régulation dynamique par déphosphorylation et ubiquitination (Alonso and Friedman, 2013).

Suite à l'endocytose, le « sorting » des récepteurs joue un rôle critique dans la réponse à la signalisation du récepteur suite à la désensibilisation initiale. La distribution des récepteurs internalisés entre lysosomes et voies de recyclage induisent des effets opposés sur la signalisation cellulaire. L'endocytose vers le lysosome représente majoritairement un mécanisme par lequel l'activité des GPCRs est diminuée suite à une activation due au ligand (Hicke, 1999; Katzmann et al., 2001; Katzmann et al., 2002; Wiley and Burke, 2001). D'autres GPCRs sont conduits à travers une voie alternative, qui facilite un recyclage efficace des récepteurs membranaires après l'endocytose induite par la liaison du ligand. La voie de recyclage permet une resensibilisation rapide de la cellule (Lefkowitz et al., 1998; Mohan et al.; von Zastrow, 2003). Le mécanisme moléculaire qui régule le trafic des GPCRs des mammifères sont essentiels à la signalisation du récepteur, désensibilisation et resensibilisation. Cependant, ils ne sont pas encore complètement élucidés. Les modifications post-traductionnelles sont considérées comme les premiers régulateurs des GPCRs. En plus de la phosphorylation, la glycosylation et la palmitoylation (Torrecilla and Tobin, 2006), de nouvelles preuves montrent le rôle de la modification post-traductionnelle par l'ubiquitine qui régule aussi l'intensité, les composants spaciaux, et la durée de la signalisation des GPCRs (Alonso and Friedman, 2013).

4. INTERNALISATION ET SIGNALISATION CALCIQUE

Suite à la première étape de fixation à leurs récepteurs sur la membrane plasmique, les leucotoxines de *S. aureus* induisent une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$. L'endocytose, ainsi que les différents mécanismes et compartiments calciques intracellulaires, peuvent alors être impliqués vu que certains récepteurs de leucotoxines sont susceptibles d'être internalisés via la fixation de leurs ligands, déclenchant une activation de diverses voies calciques.

ENDOCYTOSE

GENERALITES

L'endocytose est l'internalisation de protéines et de lipides de la membrane plasmique, de molécules extracellulaires, de fluides, de particules, d'exosomes, de virus ou de bactéries. L'internalisation par endocytose est un processus conservé chez toutes les cellules eucaryotes et elle est nécessaire à diverses fonctions cellulaires. Ces fonctions comportent le renouvellement et la dégradation des protéines et des récepteurs membranaires, la transduction et la dispersion des signaux au sein de la cellule et entre les cellules d'un tissu organisé, la propagation des morphogènes, la communication synaptique cellule-cellule, l'élimination des micro-organismes pathogènes, l'établissement de la symbiose avec des micro-organismes et l'absorption des nutriments (Samaj et al., 2004). Elle contrôle donc la composition de la membrane plasmique, et contrôle de ce fait la réponse et l'interaction des cellules à leur environnement (Doherty and McMahon, 2009).

Les voies d'endocytose comportent (1) la voie dépendante de la clathrine, (2) la voie dépendante de la cavéoline, (3) l'endocytose indépendante de la clathrine et de la cavéoline, (4) la micropinocytose et (5) la phagocytose (Figure I.12) (Mayor and Pagano, 2007; Sandvig et al., 2008; Stagg et al., 2007). Ces voies diffèrent en ce qui concerne la nature des particules internalisées, la taille des vésicules et la machinerie moléculaire associée (Conner and Schmid, 2003). La voie dépendante de la clathrine représente la forme d'endocytose la plus étudiée (Schmid and McMahon, 2007).

Toutes les voies d'endocytose nécessitent l'action coordonnée de protéines qui sont capables de déformer la membrane plasmique, afin de produire des invaginations et des protéines capables d'induire la scission de ces invaginations à partir de la membrane plasmique. On y trouve les protéines à domaine ENTH, les protéines de la superfamille BAR, les petites protéines G de la famille Arf, les protéines responsables de la nucléation pendant la polymérisation de l'actine

(ex : complexe Arp2/3) et des protéines de la superfamille dynamine (Doherty and McMahon, 2009).

L'endocytose met en jeu divers compartiments tubulo-vésiculaire membraneux englobant les endosomes de tri (ou endosomes précoces), les endosomes de recyclage, les corps multi-vésiculaires, les endosomes tardifs et les lysosomes. Ces compartiments endocytiques diffèrent par leur pH, leur enrichissement en lipides membranaires spécifiques et pour les petites GTPases de la famille Rab associées à leur membrane.

ENDOCYTOSE DEPENDANTE DE LA CLATHRINE (CDE)

L'endocytose clathrine dépendante se déroule en 6 étapes : (1) l'assemblage d'un réseau à mailles hexagonales de clathrine sur la membrane, (2) l'invagination de la vésicule, (3) la fission, (4) la migration des vésicules à l'intérieur de la cellule, (5) la décapsulation de la vésicule, et (6) la fusion avec les endosomes précoces. Lorsque les protéines adaptatrices sont liées à la membrane plasmique, elles recrutent la clathrine et favorisent l'assemblage des triskélions en manteau sur la surface interne de la membrane plasmique. Ces protéines adaptatrices, tels l'AP2, l'AP180 et les épsines, rentrent en interaction avec les phospholipides de la membrane, des domaines cytoplasmiques des récepteurs et avec la synaptotagmine (une protéine des vésicules synaptique). D'autres protéines, telles les β -arrestines, interagissent avec les récepteurs et le réseau de clathrine. De plus, les β -arrestines sont impliquées dans la transduction du signal. L'endophiline, une transférase d'acide lyso-phosphatidique, est impliquée dans l'invagination des domaines de la membrane enduits, ce qui conduit à la formation de puits recouverts de clathrine (CCP ou « clathrin coated pits »). La dynamine, une grande GTPase, est essentielle pour la fission des vésicules recouvertes de clathrine (CCV ou « clathrin-coated vesicles »).

ENDOCYTOSE DEPENDANTE DES CAVEOLES

Les cavéoles (pour petites caves) ont été les premières structures à être considérées en tant que médiateurs de l'endocytose indépendante de la clathrine. Elles sont définies comme étant des invaginations membranaires de 60 à 80 nm de large et qui contiennent des oligomères de cavéoline (Parton and Simons, 2007). Chaque cavéole comporte environ 140-150 molécules de cavéoline-1 (CAV1) (Pelkmans and Zerial, 2005). Les cavéoles ont été décrites comme ayant une forme en fiole, cependant, suite à une cryofixation, les cavéoles apparaissent en « tasse de thé » ou en « cratères » ayant une large ouverture au lieu d'un col rétréci (Richter et al., 2008; Schlormann et al., 2010). Les cavéolines sont essentielles pour la formation des cavéoles, et elles agissent avec un autre groupe de protéines appelées les cavines (Parton and del Pozo, 2013). Les

oligomères de cavéoline sont stabilisés par les cavines de manière dépendante des lipides. Les cavéoles sont enrichies en cholestérol et en sphingolipides nécessaires à l'intégrité des domaines cavéolaires (Breen et al., 2012; Hill et al., 2008). EHD2 (Eps-15 homology domain-containing protein 2) et PACSIN2 (PKC and casein kinase substrate in neurons 2) ont été identifiés comme composants de la machinerie cavéolaire (Hansen et al., 2011; Moren et al., 2012; Senju et al., 2011; Stoeber et al., 2012). Les filaments d'actine (Stahlhut and van Deurs, 2000), les microtubules (Wickstrom et al., 2010) et, dans certains contextes, les filaments intermédiaires (Nixon et al., 2007) sont associés avec les cavéoles.

Il existe trois cavéolines chez les mammifères, CAV1, CAV2 et CAV3. CAV1 et CAV2 sont largement répandues et sont généralement exprimées ensemble dans les cellules non musculaires, tandis que CAV3 est principalement exprimée dans les muscles striés. Le niveau d'expression de la cavéoline montre des différences considérables d'un tissu à l'autre. Cependant, l'absence de cavéoline dans certains types de cellules pourrait refléter non pas l'absence complète, mais un niveau d'expression beaucoup plus faible. Ainsi, les lymphocytes, les neurones et les hépatocytes peuvent exprimer des niveaux de cavéoline faibles mais fonctionnellement importants (Fernandez-Rojo et al., 2012; Head et al., 2011; Head et al., 2010; Tomassian et al., 2011).

La famille des cavines comporte la cavine 1 (également connue sous le nom PTRF ou « protein polymerase 1 transcript release factor »), la cavine 2 (SDPR ou « serum deprivation-response protein »), la cavine 3 (SRBC ou « SDPR-related gene product that binds to C-kinase ») et la cavine 4 (MURC ou « muscle-related coiled-coil protein ») (Aboulaich et al., 2004; Bastiani et al., 2009; Hansen and Nichols, 2010; Vinten et al., 2005). Les cavines sont des protéines cytoplasmiques avec des domaines amino-terminaux en « coiled-coil » qui forment de grands complexes hétéromériques recrutés sur les cavéoles dans les cellules exprimant les cavéolines. La cavine 1 est essentielle à la formation de cavéoles (Liu and Pilch, 2008) (Hill et al., 2008). La cavine 2 (Gustincich and Schneider, 1993) et la cavine 3 (Izumi et al., 1997) ont été identifiées comme substrats de la PKC et semblent recruter la PKC vers des cavéoles (Mineo et al., 1998). Toutefois, les fonctions exactes des cavines ne sont pas encore bien définies. La cavine 2 semble liée à la génération des invaginations de la membrane, et la cavine 3 semble être une protéine adaptatrice qui régule la fonction des cavéoles.

L'utilisation de plusieurs systèmes expérimentaux différents a permis de montrer que la dynamine conduit au bourgeonnement des cavéoles de la surface membranaire (Henley et al., 1998; Oh et al., 1998).

Après avoir atteint l'endosome précoce, les composants des cavéoles peuvent être recyclés ensemble vers la surface de la membrane plasmique (Pelkmans et al., 2004). Cette «unité» de recyclage peut être maintenue par le complexe cavines, puisque la cavine-1 reste associée à la cavéole pendant l'endocytose (Boucrot et al., 2011). Le ciblage des cavéolines vers les endosomes de recyclage nécessite la dynamine-2 et, dans un premier temps, une voie de polymérisation d'actine, puis les microtubules dans une phase ultérieure (Echarri et al., 2012; Muriel et al., 2011). Les endosomes de recyclage permettent le trafic de cavéoline vers la surface membranaire lors de la restauration de l'adhésion par l'intégrine (Balasubramanian et al., 2007).

Les fonctions associées aux cavéoles sont diverses et comprennent l'endocytose, la régulation des lipides et la compartimentalisation des voies de signalisation et de la signalisation calcique. En outre, il a été démontré que les cavéoles peuvent s'aplatir en réponse à l'étirement de la membrane. Cet aplatissement peut fournir un moyen pour empêcher la rupture immédiate de la membrane et, de plus, la mécano-sensibilité des cavéoles pourrait induire des réponses de signalisation qui peuvent réguler la composition de la matrice extracellulaire.

ENDOCYTOSE INDEPENDANTE DE LA CLATHRINE ET DE LA CAVEOLINE

ENDOCYTOSE DEPENDANTE DES FLOTILLINES

Les protéines flotilline-1 et flotilline-2 (également nommées reggie 2 et reggie 1, respectivement (Lang et al., 1998)), associées aux radeaux lipidiques, jouent un rôle dans l'endocytose. Ces protéines sont impliquées à la fois dans un mécanisme dynamine-dépendant (Ait-Slimane et al., 2009; Payne et al., 2007) et dynamine-indépendant (Glebov et al., 2006). Les microdomaines de flotillines semblent rarement bourgeonner, mais ce processus semble être contrôlé par la kinase Fyn (Riento et al., 2009). Les flotillines ont été observées sur des domaines membranaires plats. La flotilline pourrait donc affecter l'efficacité de l'endocytose suite à l'agrégation des récepteurs associés aux lipides et certaines espèces lipidiques en dehors des zones d'invagination de la membrane donnant lieu à des vésicules (Frick et al., 2007).

ENDOCYTOSE DEPENDANTE DE RHOA ET CDC42

Les endocytoses dépendantes de RhoA (dynamine-dépendante) et Cdc42 (dynamine-indépendante) sont dépendantes des radeaux lipidiques pour la formation de vésicules (Howes et al., 2010b; Kumari et al., 2010; Lamaze et al., 2001). L'endocytose dépendante de RhoA est responsable de l'internalisation d'IL2R (interleukin-2 receptor), ainsi que certaines toxines comme la toxine C2 de *Clostridium botulinum* (Gibert et al., 2010; Lamaze et al., 2001; Pust et al.,

2010). L'endocytose dépendante de Cdc42 a été rapportée comme étant responsable de la plus grande partie de l'absorption de fluide (Howes et al., 2010a; Kumari et al., 2010). Elle peut être impliquée dans l'internalisation des protéines ancrées à des GPI, et cette voie a été également appelée la voie GEEC (GPI-enriched early endosomal compartment) (Kumari et al., 2010).

ENDOCYTOSE DEPENDANTE D'ARF6

Une voie d'endocytose distincte, dépendante d'Arf6, liée à l'internalisation des protéines du CMH I (Radhakrishna and Donaldson, 1997) et des intégrines (Brown et al., 2001; Powelka et al., 2004) a été décrite. Cependant, Arf6 ne semble pas être nécessaire pour l'endocytose, mais pour le recyclage de cette voie qui nécessite une Arf6 active (Radhakrishna and Donaldson, 1997). Majoritairement, l'endocytose dépendante d'Arf6 semble être indépendante de la dynamine (Grant and Donaldson, 2009). L'identification de cette voie a été facilitée par le système tubulaire caractéristique du recyclage endosomal, contenant des particules endocytées par un système indépendant de la clathrine, qui est visible dans les cellules HeLa.

MACROPINOCYTOSE OU ENDOCYTOSE EN PHASE FLUIDE

La macropinocytose implique les plissements membranaires et permet la formation de pinosomes qui sont de grandes vésicules (0,5 à 5 μm de diamètre) qui internalisent les fluides extracellulaires. Plusieurs protéines, comme la kinase dépendante des phosphoinositols et les petites GTPases des familles Ras et Rho, avec leurs effecteurs, dont la kinase activée par p21 et le facteur d'ADP-ribosylation (Arf6), jouent un rôle de régulation au cours de la macropinocytose (Cardelli, 2001). Le processus semble donc être dépendant de Rac, Pak1, Cdc42, CtBP1/BARS, Arf6 (Kerr and Teasdale, 2009) et des nexines de tri (Wang et al., 2010). La forme la plus commune de macropinocytose semble être dynamine-indépendante (Kerr and Teasdale, 2009), alors que les « circular ruffles » donnent lieu à des vésicules par un processus impliquant la dynamine (Kerr and Teasdale, 2009; Liu et al., 2008). La phosphorylation de CtBP1/BARS par Pak1 active la phospholipase D1 permettant la fission de la vésicule (Haga et al., 2009). En plus de l'étape de fission, la dynamine a été également impliquée dans la formation de queues de comète d'actine, qui sont nécessaires pour le déplacement intracellulaire des macropinosomes (Orth et al., 2002).

LA PHAGOCYTOSE

La phagocytose est un type spécial d'endocytose se produisant dans les organismes vivants unicellulaires libres ou dans les cellules spécialisées des organismes supérieurs tels que les

neutrophiles et les macrophages, lorsque l'ensemble d'un micro-organisme ou d'une particule étrangère est englouti par la formation de vésicules phagocytaires. Des stades distincts ont été identifiés au cours de la phagocytose englobant (1) la fixation des particules à des récepteurs de la surface cellulaire, (2) l'engloutissement de la particule par des changements de formes dynamiques dépendants de la polymérisation de l'actine et de l'exocytose de la membrane, et, finalement, (3) la formation de phago-lysosomes (Cardelli, 2001). Tous ces processus phagocytaires dépendent des réarrangements du cytosquelette d'actine. Les lipides phosphoinositides et les complexes de signalisation multi-composants sont importants pour la transduction du signal des récepteurs phagocytaires au cytosquelette d'actine.

LE TRI INTRACELLULAIRE

Suite à l'internalisation, les vésicules primaires générées par les endocytoses dépendantes (CDE) et indépendantes (CIE) de la clathrine sont transférés dans l'endosome précoce. La petite GTPase Rab5 et son effecteur EEA1 (Early endosome antigen 1), la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et son produit la phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) sont des marqueurs de l'endosome précoce et sont nécessaires à sa fonction. Le pH de la lumière de l'endosome précoce est légèrement acide (Maxfield and McGraw, 2004), facilitant les changements de conformation des protéines permettant la libération des ligands qui étaient fixés aux récepteurs.

VOIES DE RECYCLAGE

Le tri des protéines membranaires et des lipides à partir de la lumière de l'endosome précoce, et la formation de tubules membranaires issus des endosomes, conduit à des voies de recyclage rapide, ou au transfert à un compartiment endocytaire de recyclage (ERC), situé à proximité du noyau, à partir duquel émergeront les endosomes de recyclage (Figure I.12). Plusieurs protéines permettent de réguler le trafic et le recyclage endosomal en particulier, dont les GTPases (les protéines Rab et Arf) et leurs effecteurs (comme la PI3K).

La voie de recyclage rapide vers la membrane plasmique peut avoir lieu à partir de l'endosome précoce ou d'un stade plus précoce (Choudhury et al., 2004; Maxfield and McGraw, 2004). Rab4 (Choudhury et al., 2004; Maxfield and McGraw, 2004; van der Sluijs et al., 1992) et Rab35 semblent jouer un rôle important dans cette voie (Kouranti et al., 2006). Rab35 est également associée à des endosomes de recyclage tubulaires, Arf6 et EHD1 positifs, qui transportent les molécules endocytées par CIE vers la membrane plasmique (Walseng et al., 2008).

La voie de recyclage lente implique le transport des protéines endocytées de l'endosome précoce à l'ERC, et de l'ERC à la membrane plasmique. Lors de sa maturation, l'endosome précoce élabore des tubules qui deviennent l'ERC, tandis que le corps principal de l'endosome précoce devient le corps multivésiculaire (MVB) (Maxfield and McGraw, 2004). L'imagerie en temps réel a permis de montrer que l'endosome précoce perd Rab5 et acquiert Rab11 (Sonnichsen et al., 2000). L'ERC est un compartiment tubulaire largement dépourvu de fluide qui est marqué par la présence de Rab11 et/ou EHD1. De nombreuses protéines jouent un rôle important pour le positionnement juxta-nucléaire de l'ERC et dans le transport des molécules endocytées à l'ERC comme EHD3 et EHD4 (Naslavsky et al., 2006; Sharma et al., 2008).

Il existe probablement plusieurs voies de recyclage distinctes de l'ERC à la membrane plasmique. Certaines molécules internalisées par voie CDE retournent vers la membrane plasmique dans des endosomes de recyclage qui sont différents des endosomes de recyclage tubulaires qui transportent les molécules internalisées par CIE vers la membrane plasmique (Naslavsky et al., 2003, 2004; Radhakrishna and Donaldson, 1997). Bien que les deux voies de recyclage nécessitent la fonction de Rab11 (Weigert et al., 2004), le système de recyclage de la voie CIE est plus élaboré et nécessite plus d'éléments de régulation (comme les Arfs surtout Arf6 et les Rabs). Les tubules s'alignent le long des microtubules, et le recyclage vers la membrane plasmique dépend à la fois des microtubules et de l'actine (Balasubramanian et al., 2007; Radhakrishna and Donaldson, 1997; Weigert et al., 2004).

VOIES DE DEGRADATION

D'autres molécules internalisées sont destinées à la dégradation et doivent donc aboutir aux compartiments lysosomaux (Figure I.12). Le trafic des composants individuels nécessite une série d'événements bien orchestrée pour les diriger à partir de la première station d'endocytose, l'endosome de tri, vers leur destination finale. La maturation de l'endosome précoce en endosome tardif est marquée par « la conversion de Rab », où Rab5 présente sur les endosomes précoces est remplacée par Rab7 (Bucci et al., 1992; Poteryaev et al., 2010). Cette conversion de Rab représente probablement le point final d'un processus très dynamique : la formation de vésicules intra-luminales (ILVs) est effectuée par la machinerie du complexe de tri endosomal requis pour le transport (ESCRT), qui séquestre les molécules ubiquitinées par bourgeonnement vers l'intérieur de la lumière endosomale pour former les MVBs (Gruenberg and Stenmark, 2004; Nickerson et al., 2007; Slagsvold et al., 2006; Woodman and Futter, 2008). L'acidification progressive des endosomes est réalisée par la V-ATPase, une pompe à protons très complexe formée de plusieurs sous-unités (Lee et al., 2010). Les phosphoinositides de la membrane

endosomale initialement formés de phosphoinositol-3-phosphate (PI(3)P) sont transformés en phosphoinositol-3,5-bisphosphate (PI(3,5)P₂) (Bohdanowicz and Grinstein, 2013; Dove et al., 2009; Robinson and Dixon, 2006). La taille et la morphologie des endosomes changent, ils perdent leurs extensions tubulaires et leur capacité de recyclage, et se dirigent vers la région périnucléaire de la cellule. Enfin, les endosomes tardifs fusionnent avec les lysosomes, des organelles très acides, à partir desquels toutes les molécules dégradées, ainsi que des composants endosomaux sont récupérés pour permettre aux cycles de fusion suivants d'avoir lieu (Huotari and Helenius, 2011).

Lors de la phagocytose, la maturation du phagosome se fait d'une manière parallèle à la progression de l'endosome. Le phagosome naissant subit une évolution progressive, devenant d'abord un phagosome précoce, puis un phagosome tardif qui fusionne ensuite avec les lysosomes, donnant lieu au phagolysosome. La formation d'ILV pendant les étapes intermédiaires permet de classer le phagosome comme un type de MVB (Bohdanowicz and Grinstein, 2013).

Les compartiments d'endocytose sont reliés entre eux de manière dynamique par des voies de trafic de vésicules et de tubules membranaires. Le système d'endocytose peut être considéré comme un prolongement de la membrane plasmique en agissant comme un sous-ensemble de sous-domaines spécialisés qui sont séparées de la surface de la cellule. L'implication de l'endocytose dans la signalisation n'est pas limitée à l'élimination des récepteurs de la membrane plasmique pour réguler l'activation des cellules. Mais les endosomes peuvent également agir comme un ensemble de foyers comportant des complexes de signalisation (Platta and Stenmark, 2011).

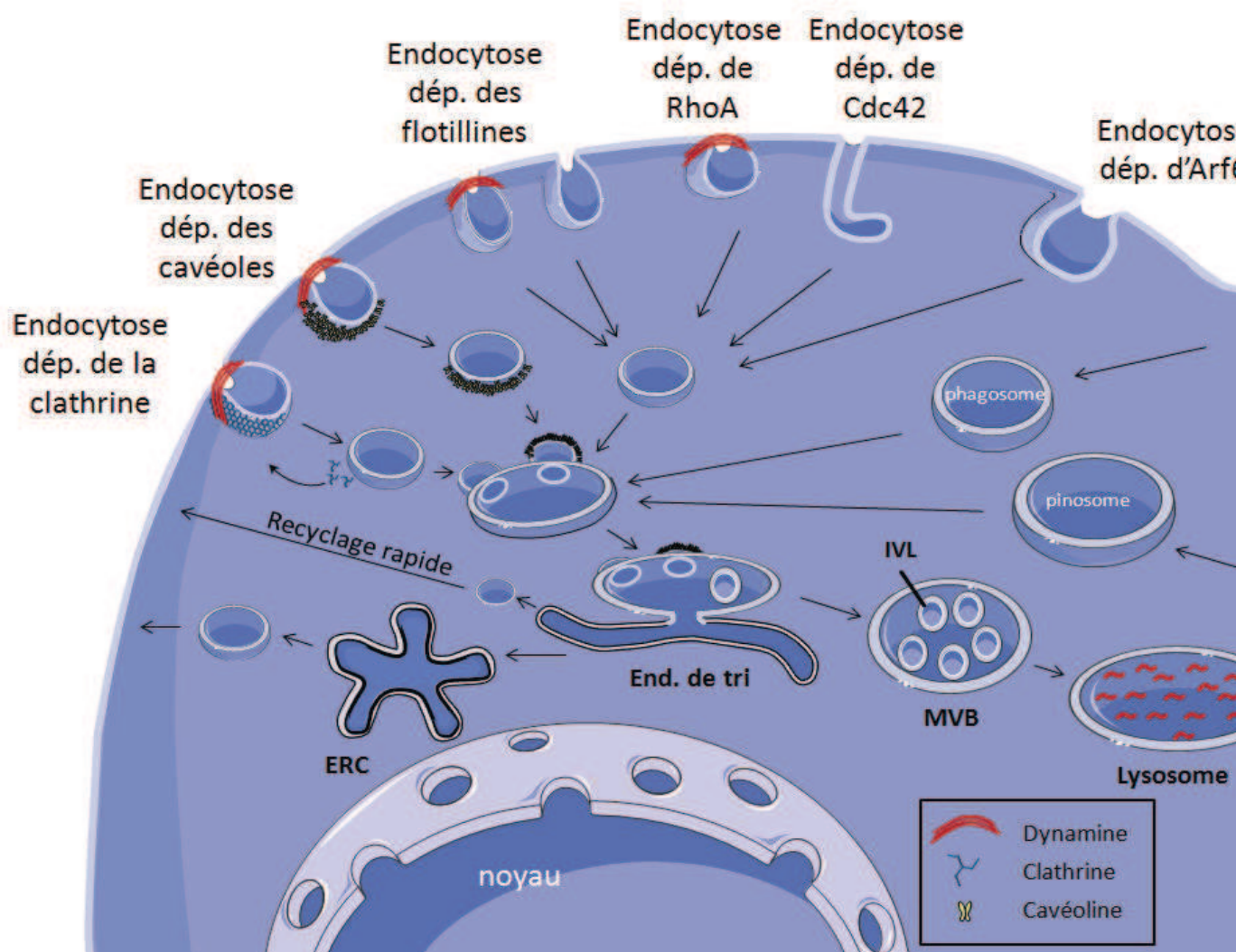


Figure I. 12 : Endocytose et tri intracellulaire

Figure I.12 : Endocytose et tri intracellulaire

Les voies d'endocytose comportent (1) la voie dépendante de la clathrine, (2) la voie dépendante de la cavéoline, (3) les endocytoses indépendantes de la clathrine et de la cavéoline : endocytose dépendante des flotillines, de RhoA/Cdc42, et d'Arf6, (4) la phagocytose et (5) la micropinocytose. Ces voies diffèrent en ce qui concerne la nature des particules internalisées, la taille des vésicules et la machinerie moléculaire associée (Conner and Schmid, 2003). L'endocytose met en jeu divers compartiments tubulo-vésiculaires membranaires englobant les endosomes de tri (ou endosomes précoces), les endosomes de recyclage (ERC), les corps multi-vésiculaires (MVB) (ou endosomes tardifs) et les lysosomes. Ces compartiments endocytiques diffèrent par leur pH, leur enrichissement en lipides membranaires spécifiques et pour les petites GTPases de la famille Rab associées à leur membrane. Le tri des protéines membranaires et des lipides se fait à partir de la lumière de l'endosome précoce ; la formation de tubules membranaires issus des endosomes, conduit à des voies de recyclage rapide, ou au transfert à l'ERC, situé à proximité du noyau, à partir duquel émergeront les endosomes de recyclage. D'autres molécules internalisées sont destinées à la dégradation et aboutissent aux compartiments lysosomiaux en passant par les MVBs.

ORIGINE DU CALCIUM

Les ions Ca^{2+} sont les éléments les plus sollicités pour la transduction des signaux lors de la signalisation intracellulaire (Berridge et al., 2000). Cependant, une augmentation excessive peut entraîner la mort de la cellule à la fois par la nécrose et l'apoptose. Pour cela, son stockage et sa circulation dans le cytoplasme sont fortement contrôlés dans les cellules par la régulation de canaux, pompes et échangeurs d'ions, qui agissent pour déterminer, spatialement et temporellement, les concentrations précises dans le cytoplasme et les autres compartiments intracellulaires (Clapham, 1995; Lam and Galione, 2013).

L'origine de l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ due aux leucotoxines peut donc être le milieu extracellulaire, grâce à des canaux calciques présents dans la membrane plasmique et qui affecteront les cibles situées à proximité de la membrane, ou bien les stocks calciques intracellulaires dispersés dans toute la cellule. Ces stocks intracellulaires sont formés par : (1) le RE qui est la principale organelle de stockage du Ca^{2+} intracellulaire et qui joue un rôle central dans l'homéostasie et la signalisation calcique, (2) l'enveloppe nucléaire qui est considérée comme un sous-domaine du RE (Stehno-Bittel et al., 1995b), (3) les stocks acides comme les lysosomes ou les endosomes et les différentes vésicules formées par le système d'endocytose citées ci-dessus (Lam and Galione, 2013) et (4) les mitochondries (Nicholls, 2005).

Le mode d'action de ces leucotoxines formant des pores concernant les variations de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ est encore inconnu. La fixation de ces leucotoxines sur certains récepteurs, qui sont internalisés suite à la fixation de leurs agonistes naturels, induit-elle l'internalisation du récepteur avec la leucotoxine ? La formation du pore se fait-elle alors à la membrane plasmique ou au niveau de la

membrane des vésicules d'endocytose ? Les voies de signalisations calciques activées sont-elles les mêmes que pour les agonistes naturels de ces récepteurs ? Des exemples d'autres toxines bactériennes, comme la shiga-toxine ou l'exotoxine de *B. anthracis*, montrent que de tels événements sont possibles.

SHIGA-TOXINE

GENERALITES

La Shiga-toxine est le prototype d'un groupe de protéines ayant une structure et une fonction très proche. La famille des Shiga toxines comprend la Shiga-toxine, sécrétée par *Shigella dysenteriae*, et les Shiga-toxine 1 (Stx1) et Shiga-toxine 2 (Stx2) produites par certaines souches d'*Escherichia coli* (STECs). La Shiga-toxine et la Shiga-toxine 1 sont presque identiques (Degrandis et al., 1987; Seidah et al., 1986; Strockbine et al., 1988) alors que la Shiga-toxine 2 montre moins d'identité et ne peut pas être neutralisée par des anticorps dirigés contre la Shiga-toxine ou la Shiga-toxine 1 (Calderwood et al., 1987; Jackson et al., 1987; Strockbine et al., 1986).

STRUCTURE

La Shiga-toxine appartient à la famille des toxines protéiques de type AB₅, avec une sous-unité A qui possède une activité enzymatique et le groupe de sous-unités B, non-toxique, responsable de la fixation aux récepteurs cellulaires. Le groupe B comprend 5 sous-unités identiques de 7,7 kDa formant un anneau pentamérique avec un pore central où est ancrée la partie C-terminale de A (Fraser et al., 1994; Stein et al., 1992). Chaque sous-unité B comporte 3 sites de fixation distincts qui interagissent spécifiquement avec la partie trisaccharidique du glycosphingolipide Gb3 (Lindberg et al., 1987; Ling et al., 1998; Lingwood et al., 1987). Ainsi, chaque groupe B peut potentiellement interagir avec 15 molécules Gb3 d'où la forte affinité de fixation.

Pour agir sur les cellules, la protéine A (32,2 kDa) doit être clivée par la « furine » en un fragment A1 (~27,5 kDa), porteur de l'activité enzymatique, et un petit fragment A2 (~4,5 kDa) (Garred et al., 1995). Les fragments A1 et A2 sont liés par un pont disulfure entre les cystéines 242 et 261. Le clivage de la Shiga-toxine est optimal à faible pH (Garred et al., 1997), ce qui suggère que le clivage a lieu lors des premières étapes du transport intracellulaire. Le fragment A1 libéré passe alors dans le cytosol où il exerce son effet cytotoxique.

MODE D'ACTION

Les Shiga-toxines induisent une inactivation catalytique de la sous-unité 60S du ribosome (Reisbig et al., 1981), inhibant ainsi la synthèse protéique dans les cellules cibles (Brown et al., 1980; Thompson et al., 1976). Pour atteindre sa cible, la Shiga-toxine subit un transport rétrograde jusqu'au réseau *trans*-Golgi, l'appareil de Golgi, et le RE après l'endocytose (Donta et al., 1995; Sandvig et al., 1992; Sandvig et al., 1989; Sandvig et al., 1991). Depuis le RE, la partie toxique passe dans le cytoplasme où elle inactive les ribosomes (Figure I.13). De plus, la Shiga-toxine induit l'apoptose dans différents types cellulaires suite à un effet prolongé de cette toxine (Tesh, 2010).

FIXATION

Les Shiga-toxines se fixent à la partie carbohydrate du glycosphingolipide Gb3 extracellulaire des cellules cibles (Lindberg et al., 1987; Lingwood et al., 1987). Gb3 est considéré comme le seul récepteur fonctionnel des Shiga-toxines chez les mammifères (Okuda et al., 2006). La fixation des Shiga-toxines est influencée par le nombre de récepteurs, des différents isoformes de Gb3 (Lingwood et al., 2010a; Lingwood et al., 2010b) et du microenvironnement lipidique membranaire qui entoure les récepteurs Gb3, comme par exemple la composition en phospholipides et le niveau de cholestérol (Arab and Lingwood, 1996; Binnington et al., 2002; Kiarash et al., 1994; Lingwood et al., 2011; Nakajima et al., 2001; Pellizzari et al., 1992). Enfin, le récepteur TLR4 (Toll-like receptor 4) semble jouer un rôle dans la fixation de cette toxine à certaines lignées cellulaires (Torgersen et al., 2011). En particulier, sur les PMNs qui n'expriment pas le récepteur Gb3, TLR4 a été identifié comme récepteur des Shiga-toxine 1 (Stx1) et Shiga-toxine 2 (Stx2) (Brigotti et al., 2013).

Suite à sa fixation, la Shiga-toxine induit une augmentation rapide de la $[Ca^{2+}]_i$, probablement due à la libération des stocks intracellulaires, (Cherla et al., 2009; Lee et al., 2008b) et active plusieurs tyrosine kinases comme Yes et Lyn de la famille Src kinases (Katagiri et al., 1999; Mori et al., 2000), Syk (Lauvrak et al., 2006), ainsi que la sérine/thréonine kinase PKC δ (Torgersen et al., 2007) et la p38 α MAPK (Walchli et al., 2008)). De plus, la fixation de la Shiga-toxine stimule le remodelage du cytosquelette (Takenouchi et al., 2004).

ENDOCYTOSE ET TRANSPORT INTRACELLULAIRE

Les Shiga-toxines peuvent être endocytées par différents mécanismes (Sandvig et al., 2010a; Sandvig et al.; Sandvig et al., 2010b) dépendants ou indépendants de la clathrine. La clathrine, la

dynamine (Lauvrak et al., 2004) et le complexe rétromère (Bujny et al., 2007; Popoff et al., 2007) jouent un rôle important dans le transport des endosomes vers l'appareil de Golgi. L'activité de la pompe à protons (V-ATPase) semble nécessaire dans ce transport bien qu'il soit indépendant de l'acidification des endosomes (Dyve Lingelem et al., 2012). Le transport vers l'appareil de Golgi est également dépendant du Ca^{2+} (Chen et al., 2002). Le tri des Shiga-toxines associés à Gb3 dépend de l'isoforme de Gb3 et son association avec des « lipid rafts » (Arab and Lingwood, 1998; Kovbasnjuk et al., 2001; Raa et al., 2009; Sandvig et al., 1996; Sandvig et al., 1994). De plus, plusieurs protéines Rab (Mallard et al., 2002; Monier et al., 2002; Wilcke et al., 2000), des SNAREs (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors) (Mallard et al., 2002; Tai et al., 2004), ainsi que d'autres protéines intracellulaires interviennent dans ce trafic.

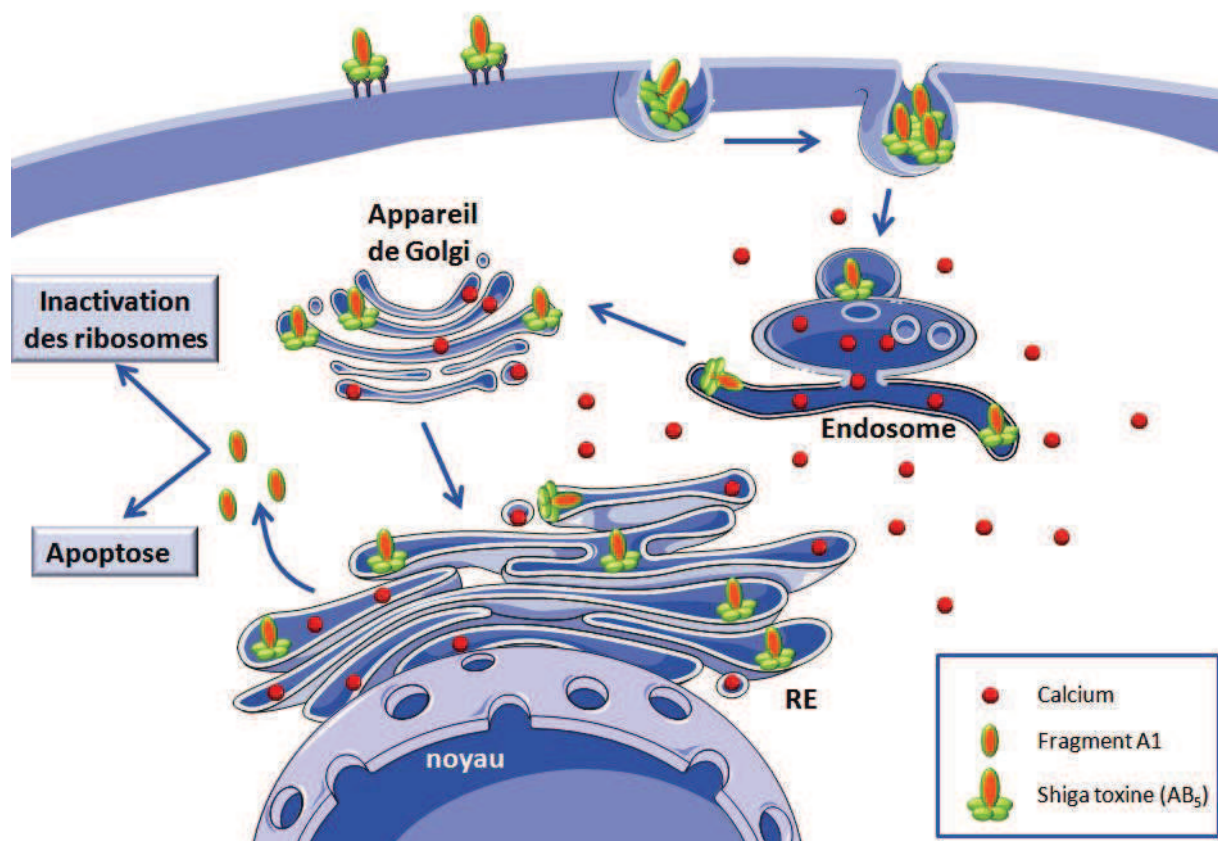


Figure I. 13 : Mécanisme d'action de la Shiga-toxine

Les Shiga-toxines peuvent être endocytées par différents mécanismes dépendants et indépendants de la clathrine. Suite à l'internalisation, la toxine subit un transport rétrograde de l'endosome précoce jusqu'à l'appareil de Golgi, puis le réticulum endoplasmique (RE). Depuis le RE, la partie toxique passe (fragment A1) dans le cytoplasme où elle inactive les ribosomes et induit l'apoptose dans certains types cellulaires. Ce mécanisme est accompagné d'une augmentation rapide de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, probablement due à la libération des stocks intracellulaires. Figure adaptée de (Johannes and Romer, 2010).

Puis, le transport de l'appareil de Golgi vers le RE est dépendant de la protéine Rab6a' (Del Nery et al., 2006; White et al., 1999), de l'actine (Valderrama et al., 2001) et il est médié par la protéine motrice myosine II (Duran et al., 2003). Un réseau intact de microtubules est nécessaire pour un bon transport des protéines de l'appareil de Golgi et toute perturbation de ce réseau inhibe le transfert de la Shiga-toxine B entre l'appareil de Golgi et le RE (Pernet-Gallay et al., 2002).

Il est estimé que la translocation d'une seule molécule A1 dans le cytosol est suffisante pour tuer une cellule (Tam and Lingwood, 2007). La translocation se fait grâce à la voie de dégradation des protéines associées au RE (ERAD) (LaPointe et al., 2005; Moreau et al., 2011; Yu and Haslam, 2005). Par ailleurs, l'association à des membranes résistantes aux détergents dans le RE semble importante à une translocation efficace de la toxine (Smith et al., 2006).

EXOTOXINE DE BACILLUS ANTHRACIS

GENERALITES

La bactérie à Gram positif sporulante *Bacillus anthracis* est l'agent causal de la maladie du charbon (Mock and Fouet, 2001). Cette bactérie a deux facteurs de virulence essentiels : une capsule poly- γ -D-glutamique codée par des gènes présents sur le plasmide pX02 et une exotoxine tripartite codée par des gènes situés sur le plasmide pX01 (Green et al., 1985; Mikesell et al., 1983). L'exotoxine est composée de 3 protéines : l'antigène de protection (« protective antigen » ou PA), qui est la protéine de fixation au récepteur de la cellule hôte, et deux protéines enzymatiques, le facteur oedémateux (« edema factor » ou EF) et le facteur létal (« lethal factor » ou LF) (Smith and Stanley, 1962; Stanley et al., 1960). LF et EF n'ont pas d'activité connue sur l'hôte avant de se lier et d'être transloquées dans le cytosol des cellules cibles par PA. Une fois que LF ou EF sont liées au PA, elles sont appelées la toxine létale (LT) ou la toxine de l'oedème (ET), respectivement.

MODE D'ACTION

La protéine PA se lie à la membrane cellulaire en formant un heptamère et permet à EF ou LF de passer dans le cytosol (Figure I.14). LF est une métalloprotéase à zinc qui clive l'extrémité N-terminale de plusieurs MEKs et empêche l'activation des voies ERK1/2, p38 et JNK (Duesbery et al., 1998) (Pellizzari et al., 1999) (Vitale et al., 2000). EF exerce une activité adényl cyclase

dépendante de la calmoduline qui augmente le taux d'AMPc à des niveaux supra-physiologiques (Leppla, 1982). Elle produit des quantités élevées d'AMPc péri-nucéaire plutôt que sur la membrane cellulaire, comme d'autres toxines qui agissent sur le taux d'AMPc (ex. : la toxine cholérique) (Dal Molin et al., 2006). L'augmentation du taux d'AMPc permet d'activer la protéine kinase A (PKA), la protéine d'échange activée par l'AMPc (« exchange protein activated by cAMP » ou Epac), et le facteur d'échange du nucléotide Guanine Rap1 (Hong et al., 2007). Ces exotoxines agissent sur des voies de signalisation clés qui sont présentes dans plusieurs types de cellules et de nombreux systèmes physiologiques.

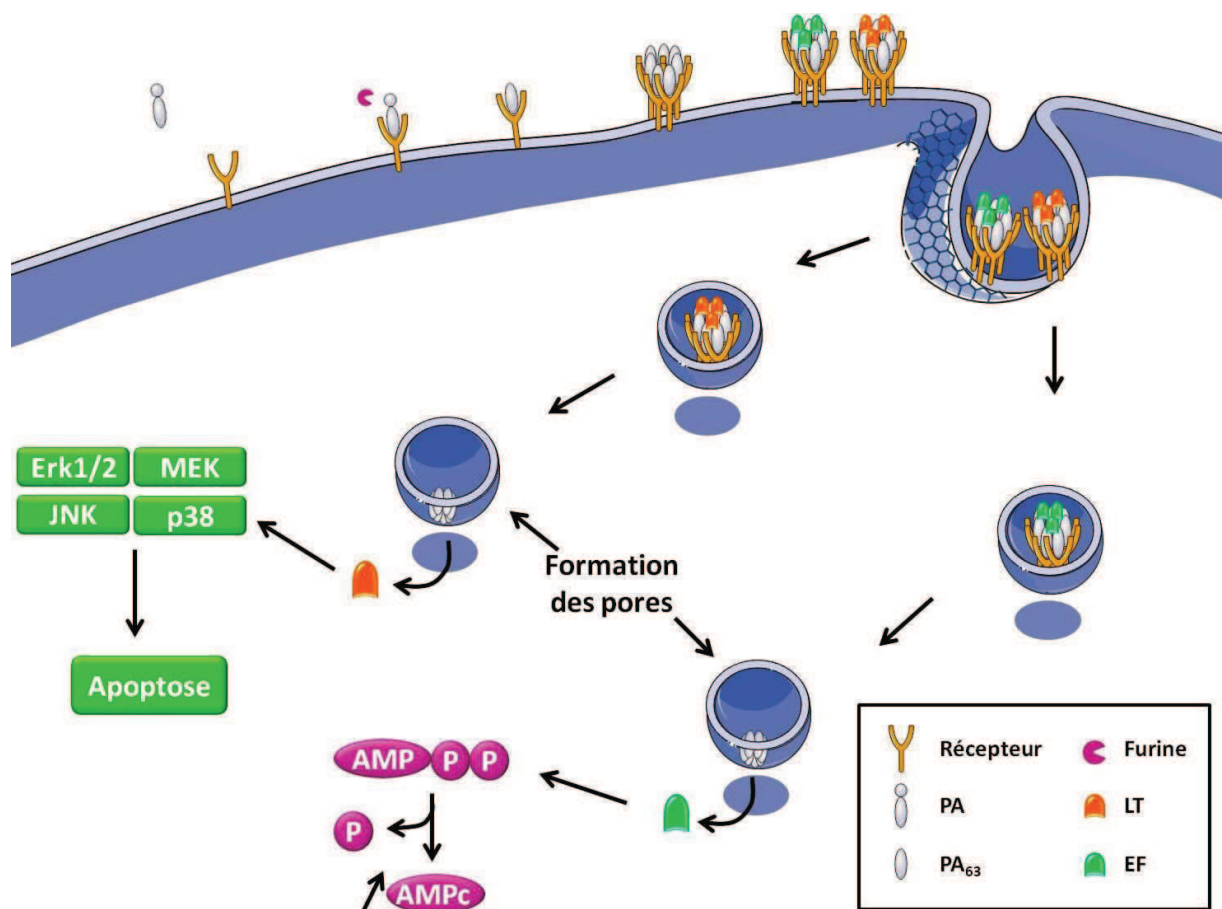


Figure I. 14 : Mécanisme d'action de l'exotoxine de *Bacillus anthracis*

Suite à la fixation de PA à ses récepteurs membranaires, elle est clivée par la furine en un isoforme de 63 kDa (PA₆₃) qui s'organise en heptamère. Ensuite, LF et EF peuvent se fixer à l'heptamère sur un des trois sites de liaison potentiels, et la toxine est endocytée. La diminution du pH dans l'endosome précoce provoque un réarrangement conformationnel de PA/récepteur nécessaire pour l'insérer dans la membrane et former le pore permettant la translocation de LF ou EF dans le cytosol. LF clive plusieurs MEKs et empêche l'activation des voies ERK1/2, p38 et JNK. EF augmente le taux d'AMPc à des niveaux supra-physiologiques.

FIXATION

PA se lie à deux récepteurs de surface cellulaire : le premier identifié a été le récepteur de la toxine de l'anthrax 1 (ANTXR1), plus tard identifié au marqueur tumoral endothélial 8 (TEM8), le second est le récepteur de la toxine de l'anthrax 2 (ANTXR2) (ou gène de la morphogénèse capillaire 2 (CMG2)) (Bradley et al., 2001; Scobie et al., 2003). PA peut également se lier aux intégrines $\beta 1$, qui potentialisent son absorption par les macrophages (Martchenko et al., 2010). TEM8 a été impliqué dans la liaison des cellules endothéliales à l'ECM, où cette protéine dirige la migration et l'adhérence (Hotchkiss et al., 2005; Nanda et al., 2004). CMG2 participerait à la prolifération endothéliale (Reeves et al., 2010).

ENDOCYTOSE ET TRANSPORT INTRACELLULAIRE

Suite à la liaison à CMG2 ou TEM8, PA est clivée par la furine en un isoforme de 63 kDa (PA₆₃) qui s'organise en heptamère. Ensuite, LF et EF peuvent se fixer à l'heptamère sur un des trois sites de liaison potentiels (Mogridge et al., 2002a; Mogridge et al., 2002b). PA peut également s'oligomériser en octamère, plus stable que l'heptamère lorsqu'il est non lié au récepteur de la toxine, et former le complexe de l'exotoxine dans le sérum (Kintzer et al., 2009).

L'oligomérisation des PA est nécessaire pour son association avec les radeaux lipidiques et son endocytose dépendante de la clathrine (Abrami et al., 2003). Après endocytose, l'exotoxine est triée dans des ILVs dans l'endosome précoce (Abrami et al., 2004). La diminution du pH dans l'endosome précoce provoque un réarrangement conformationnel de PA/TEM8 nécessaire pour l'insérer dans la membrane et former le pore permettant la translocation de LF ou EF (Milne et al., 1994). Le complexe PA lié à CMG2 nécessite un pH inférieur à celui du complexe avec TEM8 pour former le pore de translocation (Rainey et al., 2005). Dans les deux cas, cela conduit à la translocation de LF/EF qui va alors atteindre le cytosol (Abrami et al., 2004; Ha et al., 2010).

5. OBJECTIFS DE LA THESE

Les leucotoxines de *Staphylococcus aureus* sont des facteurs de virulence sécrétés par cette bactérie. Elles endommagent les membranes des cellules immunitaires et empêchent la phagocytose. Ces toxines sont surtout connues pour leur activité de formation de pore, cependant leurs effets ne se limitent pas à cette capacité. Suite à la fixation des deux sous-unités à la membrane plasmique, une augmentation rapide de la $[Ca^{2+}]_i$ est observée. Le Ca^{2+} étant un messager secondaire impliqué dans la transduction de signal de nombreuses voies, il est intéressant de comprendre le mode d'action détaillé de ces leucotoxines. Récemment, les récepteurs membranaires de plusieurs leucotoxines ont été décrits, permettant de mieux envisager la spécificité des leucotoxines envers les différents types cellulaires et les différentes espèces.

De plus, en raison de la prévalence de souches de *S. aureus* résistantes aux antibiotiques et des échecs thérapeutiques, et vu que les leucotoxines sont de manière générale des facteurs aggravant la sévérité des infections à *S. aureus*, de nouveaux traitements ciblant les facteurs de virulence sont recherchés, afin de renforcer les antibiothérapies. Les nouvelles pistes sont essentiellement l'approche vaccinale, dirigée contre les facteurs de virulence, et l'immunothérapie par l'utilisation d'anticorps pour bloquer des facteurs bactériens. De plus, de nouvelles molécules inhibitrices prometteuses ont été étudiées au sein du laboratoire : les para-sulfonato-calix[n]arènes (SCn) (Laventie et al., 2013) et les anticorps à chaîne lourde humanisés (HCAbs) (Laventie et al., 2011).

Les objectifs de cette thèse se divisent en deux parties :

- La compréhension du mode d'action des leucotoxines :
 - La recherche de nouvelles cellules cibles des leucotoxines qui expriment les récepteurs de ces leucotoxines
 - L'identification de voies calciques ou de stocks calciques activés par les leucotoxines au niveau des PMNs
 - L'identification des régions nécessaires à la fixation des leucotoxines à leurs récepteurs.
- L'évaluation de nouvelles molécules chimiques dérivées des SCn, inhibitrices des leucotoxines, qui permettraient de neutraliser les leucotoxines.

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

MATERIELS

PRODUITS CHIMIQUES

CALIXARENES

Les *para*-sulfonato-calix[4,6 ou 8]arènes ont été fournis par Acros Organics, Thermo Fisher Scientific (Illkirch, France) dans un premier temps, puis synthétisés par l'équipe du Dr Zouhair Asfari (Laboratoire de Chimie analytique et Sciences séparatives, UMR 7178, Cronenbourg, France). Les autres calixarènes ont été synthétisés par l'équipe du Dr Zouhair Asfari.

Tableau II. 1 : Les différents calixarènes utilisés

Nom	<i>para</i> -sulfonate-calix[4]arène	<i>para</i> -sulfonate-calix[6]arène	<i>para</i> -sulfonate-calix[8]arène
Fournisseur	Acros organics (Geel, Belgique)	Acros organics (Geel, Belgique)	Acros organics (Geel, Belgique)
Référence	n°290250010	n°290260010	n°301440010
Formule chimique	$C_{28}H_{24}O_{16}S_4 \cdot 0,5 H_2SO_4 \cdot 8,5 H_2O$	$C_{42}H_{36}O_{24}S_6 \cdot 0,33 H_2SO_4 \cdot 11,7 H_2O$	$C_{56}H_{48}O_{32}S_8 \cdot x H_2O$
Masse molaire	744,75 g/mol	1117,1 g/mol	1489,45 g/mol
Pureté en masse	95%	95%	97%
Solubilité	> 100 mM, H ₂ O	> 100 mM, H ₂ O	≤100 mM, H ₂ O

Nom	<i>para</i> -sulfonate-calix[4]arène (ZA)	<i>para</i> -sulfonate-calix[6]arène (ZA)	<i>para</i> -sulfonate-calix[8]arène (ZA)
Fournisseur	Equipe Dr Z. Asfari, UMR 7178	Equipe Dr Z. Asfari, UMR 7178	Equipe Dr Z. Asfari, UMR 7178
Formule chimique	$C_{28}H_{24}O_{16}S_4 \cdot 4 H_2O$	$C_{42}H_{36}O_{24}S_6 \cdot 6 H_2O$	$C_{56}H_{48}O_{32}S_8 \cdot 8 H_2O$
Masse molaire	816,79 g/mol	1224,6 g/mol	1633,58 g/mol
Pureté en masse	99,5%	99,4%	99,6%
Solubilité	> 100mM, H ₂ O	> 100mM, H ₂ O	≤100 mM, H ₂ O

Nom	<i>para</i> -sulfonate du sodium -thia-calix[4]arène	carboxy-méthoxy- <i>para</i> -sulfonate phénol	1,3-dicarboxy-méthoxy- <i>para</i> -sulfonate-calix[4]arène
Fournisseur	Equipe Dr Z. Asfari, UMR 7178	Equipe Dr Z. Asfari, UMR 7178	Equipe Dr Z. Asfari, UMR 7178
Formule chimique	$C_{24}H_{12}O_{16}S_8Na_4 \cdot 4 H_2O$	$C_8H_7O_6SNa \cdot 2 H_2O$	$C_{32}H_{24}O_{20}S_4Na_4 \cdot 6 H_2O$
Masse molaire	888,86 g/mol	290,22 g/mol	1056,82 g/mol
Pureté en masse	99,8%	99,5%	99,7%
Solubilité	> 100mM, H ₂ O	> 100mM, H ₂ O	> 100mM, H ₂ O

Nom	1,3-dicarboxy-méthoxy-2,4-monocouronne-6-para-sulfonate du sodium-calix[4]arène	<i>para-sulfonate du sodium-bis-benzo-couronne-6-calix[4]arène</i>	<i>para-sulfonate du sodium-bis-naphto-couronne-6-calix[4]arène</i>
Fournisseur	Equipe Dr Z. Asfari, UMR 7178	Equipe Dr Z. Asfari, UMR 7178	Equipe Dr Z. Asfari, UMR 7178
Formule chimique	$C_{42}H_{42}O_{24}S_4 Na_4 \cdot 4 H_2O$	$C_{56}H_{56}O_{24}S_4 Na_4 \cdot 4 H_2O$	$C_{64}H_{60}O_{24}S_4 Na_4 \cdot 4 H_2O$
Masse molaire	1223,04 g/mol	1405,31 g/mol	1505,43 g/mol
Pureté en masse	99,2%	99,9%	99,9%
Solubilité	> 100mM, H ₂ O	> 100mM, H ₂ O	> 100mM, H ₂ O

Nom	<i>para-sulfonate du sodium-bis-(dibenzo)-couronne-6-calix[4]arène</i>	<i>para-sulfonate du sodium-bis-esculetin-couronne-6-calix[4]arène</i>
Fournisseur	Equipe Dr Z. Asfari, UMR 7178	Equipe Dr Z. Asfari, UMR 7178
Formule chimique	$C_{64}H_{56}O_{24}S_4 Na_4 \cdot 8 H_2O$	$C_{62}H_{56}O_{28}S_4 Na_4 \cdot 4 H_2O$
Masse molaire	1573,45 g/mol	1541,37 g/mol
Pureté en masse	99,9%	99,9%
Solubilité	> 100mM, H ₂ O	≤ 100mM, H ₂ O

AUTRES PRODUITS CHIMIQUES

Le KB-R7943, l'YM-59483 et le trans-Ned-19 proviennent de Tocris Bioscience (Bristol, United Kingdom). Le W-54011 et le SB-290157 proviennent de Calbiochem (EMD Millipore, MA, USA). Les autres inhibiteurs (Thapsigargin, Ionomycin, Bafilomycin A1, GPN...), le fMLP, le Dextran, le Triton X-100 et les sels proviennent de Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

TAMPONS

PBS : NaH₂PO₄ 10 mM, Na₂HPO₄ 1,5 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,0.

Tampon HEPES : HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA·Na₂ 1 mM, pH 7,2.

Tampon EGTA : NaCl 140 mM, KCl 5 mM, glucose 10 mM, éthylène glycol-bis (β-aminoéthyl-éther) N, N, N', N'-acide tétraacétique (EGTA) 0,1 mM, Tris Base 3 mM, pH 7,3.

COLORATION HEMATOXYLINE/EOSINE :

- Acide-alcool : 5 mL HCl (concentré) dans 1 L d'éthanol 70%
- Eau ammoniacquée : 2 mL Hydroxide d'ammonium concentré dans 1 L H₂O MilliQ®

COUPLAGE DE FLUOROCHROME :

- **Tampon A** : HEPES 0,1M, NaCl 0,2M, EDTA·Na₂ 1 mM, pH 7,8 (NaOH).
- **Tampon B** : HEPES 20mM, NaCl 0,5M, EDTA·Na₂ 1 mM, pH 7,2.

FIXATION DES YEUX DE LAPIN :

- **PAF 4%** : paraformaldéhyde 4%(p/v), NaOH 2 mM, dans PBS, pH 7,4.

IMAGERIE :

- **Tampon Borate** : borate de sodium 4,9 mM, Acide Borique 50 mM, pH 8,0.
- **Tampon de blocage** : SVF 10%, BSA 5 mg/mL, dans PBS.
- **Tampon de dilution** : SVF 5%, BSA 1 mg/mL, dans PBS.
- **Tampon glycine** : glycine 150 mM, dans PBS (préparation extemporanée).
- **Fixateur** : paraformaldéhyde 4 % (p/v), Saccharose 4% (p/v), dans PBS.
- **Mowiol** : Mowiol® 4-88 (Polysciences, Eppelheim, Allemagne) 10% (p/v), glycérol 25% (v/v), Tris-HCl 100 mM, QSP H₂O, pH 8,5, puis centrifuger 15 minutes à 500 x g pour clarifier la solution et stocker à -20°C.

IMMUNO-MARQUAGE DES COUPES DES YEUX

- Tampon de perméabilisation : Triton® X-100 0,025% (v/v), BSA 0,25% (p/v), dans PBS.

CULTURE CELLULAIRE

LIGNEES CELLULAIRES

U937 est une lignée de cellules hématopoïétiques dérivée de l'épanchement pleural d'un patient de 37 ans atteint de lymphome histiocytaire diffus (Sundstrom and Nilsson, 1976). La morphologie des cellules de cette lignée est identique à celle des cellules tumorales à partir desquelles elle a été dérivée, elle présente de nombreuses caractéristiques monocytaires. Les cellules de la lignée U937 n'expriment pas le récepteur C5aR.

La lignée U937-C5aR est une lignée U937 stablement transfectée pour exprimer le récepteur C5aR sur la membrane plasmique (Kew et al., 1997).

Les lignées cellulaires U937 et U937-C5aR ont été généreusement cédées par l'équipe du Dr J. A. Van Striip (University Medical Center Utrecht, 3584CX Utrecht, The Netherlands).

MILIEU DE CULTURE ET STOCK

Les lignées sont mises en culture en suspension dans un milieu RPMI 1640 avec de la L-Glutamine (Dominique Dutscher, Brumath, France), supplémenté par un mélange d'antibiotiques (Pénicilline 10 U/mL et Streptomycine 10 µg/mL) (Gibco®, InVitrogen, Paisley, UK) et par 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté (30 min à 57°C) (PAN Biotech GmbH, Allemagne).

Les cellules sont cultivées dans des flasques ventilées pour culture cellulaire dans un incubateur thermostaté à +37°C, saturé en humidité (95 %) et équilibré à 5 % de CO₂ pour tamponner le pH du milieu de culture. Le milieu est renouvelé tous les trois jours, les cellules sont centrifugées à 500 x g pendant 5 min, puis réensemencées.

Pour constituer un stock, les cellules sont congelées à environ 10⁷ cellules/mL dans un milieu froid constitué de SVF 50%, RPMI 42% et DMSO 8%. Les aliquotes de cellules sont congelées lentement dans l'isopropanol à -80°C pendant 24h, puis transférées et conservées dans l'azote liquide. La décongélation des cellules se fait en les réchauffant rapidement à 37°C dans un bain-marie. Les cellules sont utilisées pendant un nombre restreint de passages (± 40) avant la décongélation d'une nouvelle aliquote.

PURIFICATION DES NEUTROPHILES

Principe : Les polynucléaires neutrophiles humains (hPMNs) sont préparés à partir de concentrés leuco-plaquettaires sanguins (« buffy coat ») (Etablissement Français du Sang, Strasbourg, France) moins de 24h après le don du sang. La méthode est basée sur la séparation des monocytes et des lymphocytes d'une part (les « PBMC », ou « Peripheral Blood Mononuclear Cells »), et des PMNs et érythrocytes de l'autre, par centrifugation sur gradient de ficoll +diatrizoate (d=1.077). Les érythrocytes sont ensuite éliminés par lyse osmotique.

Méthode : 30 mL de concentré sanguin sont dilués au 1/3 dans du NaCl 9 ‰ et sont déposés doucement sur 12 mL de milieu de séparation des lymphocytes J-Prep (TechGen International, Les Ullis, France). Après 20 min de centrifugation sans frein à 800 x g dans une centrifugeuse à

rotor mobile, les différentes phases contenant les différents types cellulaires peuvent être séparées (Figure II.1).

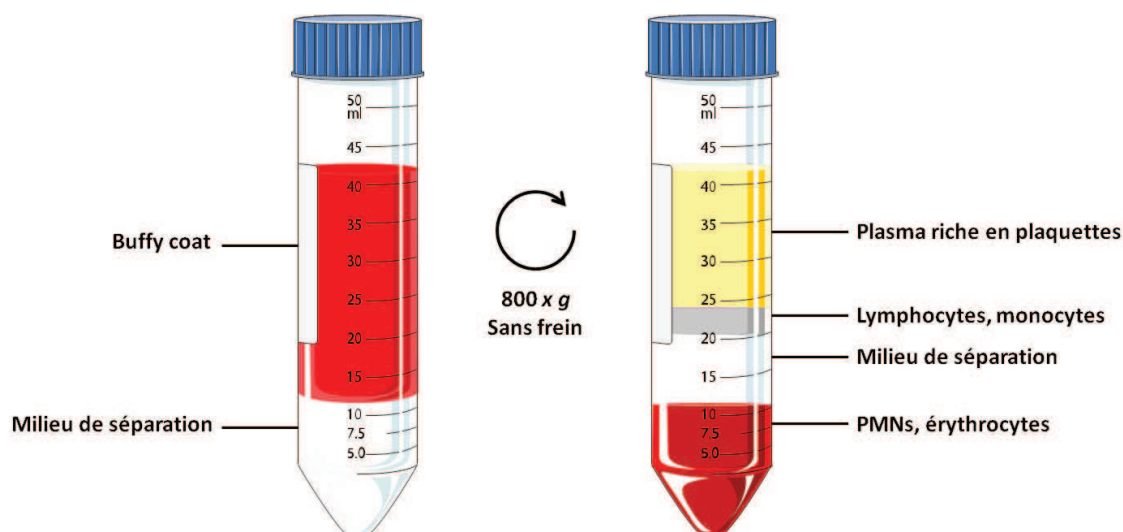


Figure II. 1: Purification des PMNs

Séparation des composants cellulaires et plaquettaires sanguins par centrifugation sur gradient de ficoll +diatrizoate (milieu de séparation des lymphocytes)

Purification des PMNs : le culot (PMNs et érythrocytes) est resuspendu dans 30 mL de NaCl 9 ‰, puis sont additionnés de 10 mL de solution de Dextran 6 % (p/v) (Sigma). Après 30 min de sédimentation, le surnageant qui contient les PMNs est récupéré et centrifugé 6 min à 1 700 x g. Le culot est resuspendu dans 500 µL de NaCl 9‰. Les érythrocytes résiduels sont éliminés par lyse osmotique en 45 secondes en ajoutant 18 mL d'H₂O. L'osmolarité est rétablie par l'addition de 2 mL d'une solution de NaCl 9% (p/v), puis les tubes sont centrifugés et le culot resuspendu dans du tampon EGTA 6 min à 1 700 x g. Les PMNs sont de nouveau lavés par une centrifugation de 6 min à 1 700 x g et resuspendus dans du tampon EGTA. Après 1h de repos, les PMNs sont filtrés sur un tamis cellulaire de nylon de 70 µm (Becton Dickinson, Le Pont De Claix, France) pour éliminer les agrégats pouvant perturber la lecture en cytométrie en flux et en spectrofluorimétrie.

A propos du protocole de purification des neutrophiles : La méthode de purification sur gradient est une des 2 techniques de référence de séparation des granulocytes (neutrophiles, éosinophiles, basophiles) avec la technique de Mono-Poly Resolving Medium (M-PRM). Au sens strict, ce n'est donc pas une technique de purification des polynucléaires neutrophiles, mais des polynucléaires dans leur ensemble (neutrophiles, éosinophiles, basophiles). Cependant, la suspension cellulaire obtenue contient plus de 95% de neutrophiles, ce qui est suffisant dans la

plupart des expérimentations, en particulier en cytométrie en flux où l'on peut trier les cellules par taille et complexité interne à l'analyse. En microscopie, l'analyse individuelle des paramètres biochimiques (coloration) ou morphologiques des cellules permet de faire la différence entre ces cellules (Neutrophiles : noyau multilobé, granules très petits ; Eosinophiles : noyau bilobé et gros granules acidophiles ; Basophiles : gros granules très nombreux pouvant masquer le noyau). Si la préparation s'avère insuffisamment pure, une solution est de purifier les neutrophiles par FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting). Dans la plupart des cas, la présence de quelques Eosinophiles et Basophiles n'est pas perturbante, mais Sabroe et collaborateurs font état d'un rôle de ces cellules sur les neutrophiles dans des expériences fonctionnelles, que l'on ne peut donc pas totalement exclure (Sabroe et al., 2004).

EXPRESSION ET PURIFICATION DES LEUCOTOXINES

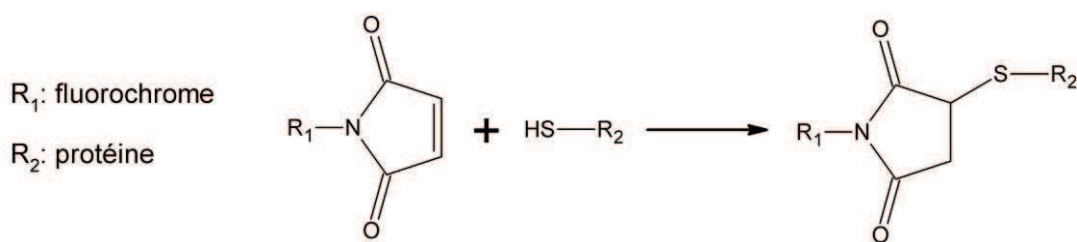
Les leucotoxines fusionnées à la glutathion-S-transférase (GST) sont exprimées dans *E. coli* BL21 recombinantes (Baba Moussa et al., 1999). Le tag GST permet, par son activité enzymatique, une quantification de la surexpression, puis une co-purification sur colonne d'affinité GST.

Les bactéries sont cultivées dans du milieu 2 x TY (bactotryptone 17 g/L, extrait de Bacto-levure 10 g/L, NaCl 5 g/L), et l'expression des protéines est induite avec 0,2 mM d'IPTG. Les protéines de fusion GST sont purifiées par chromatographie d'affinité sur une colonne glutathion-Sepharose 4B™ (GE Healthcare). Puis, le tag GST est éliminé grâce à la PreScission® Protease (GE Healthcare). Ensuite, les leucotoxines sont purifiées par chromatographie d'échange d'ions (LukS-PV, LukF-PV, HlgA et HlgC) ou d'interaction hydrophobe (HlgB) selon les leucotoxines avec une colonne pilotée par un Fast Protein Liquid Chromatography AKTA Purifier (Baba Moussa et al., 1999; Gravet et al., 1998; Werner et al., 2002).

L'identité et la pureté des protéines sont vérifiées par SDS-PAGE (10 à 15% (p/v)) et par immuno-précipitation radiale double en gel d'agarose contre des antigènes natifs (0,6% (p/v) d'agarose dans du PBS). Les protéines sont ensuite stockées à -80 °C.

COUPLAGE A UN FLUOROCHROME

Principe : afin de marquer les leucotoxines, un fluorochrome peut être couplé à la protéine de classe S ou F. Ces protéines étant naturellement dépourvues de cystéine, il est possible d'en insérer une à une position ciblée par mutagenèse dirigée. Les protéines utilisées sont LukS-PV G10C, HlgA -1C, HlgB S27C et LukF-PV -1C. Le thiol (-SH) de la cystéine peut réagir avec une fonction maléimide greffée sur un fluorochrome.



Marquage à la fluorescéine : Les cystéines des protéines sont réduites par addition de 20 mM final de Dithiothreitol (DTT). Une solution mère de fluorescéine-5-maléimide (F5M ; M = 427 g/mol, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 521 \text{ nm}$, $\epsilon_{490\text{nm}} = 81.900 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$; Molecular Probes, Lerden, Pays-Bas) est préparée dans du diméthyl-sulfoxyde (DMSO). La réaction s'effectue à pH 7,8, en présence de 30 à 60 μM de protéine cible dans un volume de 300 à 500 μL et d'un excès molaire de F5M de 20 à 50 x selon la leucotoxine, dans du tampon A. Après 2h d'incubation à température ambiante (TA) à l'obscurité, l'excès de F5M est éliminé par un dessalage sur une colonne d'exclusion PD10 (GE Healthcare) dans du tampon B. Les fractions de 0,5 mL ayant une absorbance à 280 nm sont rassemblées. Le degré de couplage est estimé en rapportant la concentration de fluorescéine ($\text{DO}_{490\text{nm}}$) de la solution à la concentration protéique déterminée par un dosage de Bradford. Ce rendement de marquage doit être compris entre 80% et 120% pour que la protéine marquée soit utilisable.

Marquage à l'Alexa 488 et 555 : l'Alexa Fluor® 488 C5 maléimide et l'Alexa Fluor® 555 C2 maléimide (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) sont solubilisés dans du DMSO. Un mL de LukS-PV G10C, HlgA -1C, HlgB -1C ou LukF-PV -1C à 40-80 μM est préparé dans du tampon A (ou PBS) (l'excès d'Alexa doit être environ 30-40 x). Afin de réduire les cystéines, 20 mM final de DTT sont ajoutés, puis l'excès de DTT est éliminé par un dessalage sur une colonne d'exclusion PD10. Si la solution de protéine est trop diluée par cette étape, elle doit être concentrée sur Amicon Ultra (seuil de coupure 10 000 Da, Millipore, Molsheim, France) pour atteindre une concentration de 30-60 μM et un volume de 300-500 μL , puis ajouter l'Alexa et incuber 2h à TA, à l'obscurité. Un dessalage sur PD10 équilibré avec 4-6 volumes de tampon B permet d'éliminer l'excès d'Alexa. Le rapport de concentration [Alexa]/[protéine] est estimé : la concentration d'Alexa est mesurée au spectrophotomètre à 493 ou 556 nm pour l'Alexa 488 ou 555 respectivement, la concentration en protéine est obtenue par un dosage de Bradford.

Fluorochrome	λ_{ex}	λ_{em}	$\epsilon_{\text{M}} (\text{cm}^{-1}.\text{M}^{-1})$	MM (Da)	solubilité
Fluorescéine-5-maléimide	494 nm	518 nm	81.900	427	DMF, DMSO
Alexa Fluor® 488 C5 maléimide	493 nm	516 nm	72.000	720	H ₂ O, DMSO
Alexa Fluor® 555 C2 maléimide	556 nm	572 nm	158.000	1.250	H ₂ O, DMSO

DOSAGE PROTEIQUE PAR LA METHODE DE BRADFORD

Principe : Cette méthode de dosage colorimétrique des protéines est basée sur la propriété du bleu de Coomassie à se lier avec les acides aminés basiques (arginine, histidine, lysine) et hydrophobes (phénylalanine, tyrosine, tryptophane) présents dans la ou les protéines en milieu acide. Le bleu de Coomassie voit son absorbance maximale passer de 465 nm à 595 nm lorsqu'il est lié à une protéine. C'est une méthode rapide et facilitée par la stabilité de la densité optique du complexe colorant-protéine.

Méthode : La concentration en leucotoxine est estimée par la mesure de l'absorbance à 280 nm, en utilisant la relation de Beer Lambert : $[C] = \frac{DO_{280}}{\epsilon_{280}}$, avec $[C]$ la concentration en protéine et ϵ_{280} le coefficient d'absorption molaire (ϵ_{280} LukS-PV = 45.800 M⁻¹.cm⁻¹, ϵ_{280} LukF-PV+8 = 61.310 M⁻¹.cm⁻¹, ϵ_{280} HlgA+8 = 41.830 M⁻¹.cm⁻¹, ϵ_{280} HlgB = 58.460 M⁻¹.cm⁻¹). La DO₂₈₀ de 800 µL d'une dilution de leucotoxine est mesurée après l'addition de 200 µL de réactif de Bradford (BIO-RAD, Hercules, CA, USA), et l'incubation 5 min à TA. Une courbe d'étalonnage est réalisée avec des dilutions sériées d'une solution de leucotoxine étalonée au spectrophotomètre (0 / 2,5 / 7,5 / 10 / 12,5 / 15 / 17,5 µg/mL). La densité optique à 595 nm est mesurée au spectrophotomètre.

TEST D'ACTIVITE DES LEUCOTOXINES

SPECTROFLUORIMETRIE : DETERMINATION DE LA VARIATION DE LA CONCENTRATION INTRACELLULAIRE EN CALCIUM

Principe de la spectrofluorimétrie : un spectrofluorimètre est capable d'exciter des molécules par un faisceau lumineux de longueur d'onde désirée et de mesurer les rayonnements lumineux émis. L'appareil utilisé est un spectrofluorimètre Kontron 4000 (Deltascan™, PTI, USA). La source lumineuse est une lampe au xénon de 75W, capable de générer deux faisceaux envoyés chacun dans un monochromateur d'excitation, grâce à un miroir rotatif (« chopper »). Transmis par fibre optique, les deux faisceaux traversent une cuve en polystyrène (Dutscher, Brumath, France) (trajet optique 1 cm) dont les 4 faces sont transparentes. Le polystyrène permet la transmission de 75 à 80% de l'énergie lumineuse de 780 nm à 380 nm, 70% à 340 nm. La fluorescence émise par l'échantillon est mesurée à 90° par deux photomultiplicateurs reliés à deux monochromateurs d'émission. Le programme Felix (PTI) assure l'enregistrement continu et le traitement des données.

Principe des sondes calciques : les variations de la concentration intracellulaire en calcium ($[Ca^{2+}]_i$) sont mesurées grâce à deux types de sondes calciques dérivées d'un chélateur de Ca^{2+} (l'EDTA) :

- **le Fluo-3** (λ excitation = 488 nm, λ émission = 530 nm ; Molecular Probes, Invitrogen, (Fischer Scientific, Illkirch, France)) : l'intensité de fluorescence de cette sonde calcique non ratiométrique augmente lorsqu'elle fixe du Ca^{2+} . Les deux principaux avantages du Fluo-3 sont une augmentation intense de la fluorescence en réponse à la fixation de Ca^{2+} , et son spectre d'absorption compatible avec l'excitation à 488 nm par les lasers argon.
- **le Fura-2** (FluoProbes®, Interchim) est une sonde ratiométrique en excitation. La liaison au Ca^{2+} entraîne un déplacement de la longueur d'onde d'excitation de 380 vers 340 nm, tandis que la longueur d'onde d'émission est constante à 510 nm. Le ratio des intensités de fluorescence 340/380 permet de suivre la variation de la concentration du calcium intracellulaire tout en éliminant les effets de la concentration de sonde dans les cellules et du photoblanchiment.

Méthode d'incorporation dans les cellules : le Fluo-3 et le Fura-2 étant peu lipophiles, ils sont couplés à un groupement acétoxy-méthyle (-AM) pour faciliter leur incorporation dans les cellules. Le groupement -AM est clivé par les estérases cellulaires, piégeant la sonde à l'intérieur de la cellule. La sonde est ajoutée dans la suspension cellulaire à une concentration finale de 2 μ M pour le Fluo-3, ou 4 μ M pour le Fura-2, et les cellules sont incubées 45 min à TA à l'obscurité dans un tube en verre. Les cellules sont ensuite lavées 2 x dans du tampon EGTA pour éliminer la sonde libre.

Méthode de spectrofluorimétrie : dans une cuve en polystyrène, 1,1 mM de $CaCl_2$ sont ajoutés à 2 mL de suspension cellulaire ($3,5 \times 10^6$ cellules/mL) dans du tampon EGTA, et sont incubées 5 min avant le début de l'enregistrement. Après avoir placé la cuve dans le spectrofluorimètre, la toxine est ajoutée et la fluorescence de la sonde est mesurée en continu. Pour tester l'effet de produits (inhibiteurs) qui pourraient agir au niveau de la $[Ca^{2+}]_i$, ces produits sont incubés avec les cellules dans la cuve avant l'ajout des leucotoxines. A la fin de la mesure, du Triton® X-100 (0,05%) (Sigma) est ajouté dans la cuve pour perméabiliser les membranes des cellules et mesurer la fluorescence maximale.

Analyse des résultats : Les données enregistrées par le logiciel Felix (PTI) sont ensuite exportées vers un logiciel de type tableur (Excel) pour les analyser. Les courbes sont normalisées. La moyenne de fluorescence mesurée avant l'ajout des leucotoxines est considérée

comme le bruit de fond et retranchée aux autres valeurs de fluorescence. La moyenne de fluorescence mesurée suite à l'ajout du Triton® X-100 correspond à la fluorescence maximale.

CYTOMETRIE EN FLUX

PRINCIPE DE LA CYTOMETRIE EN FLUX

Principe : La cytométrie en flux est une méthode d'analyse individuelle rapide des 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, granularité), et de détecter la fluorescence provenant des cellules ou d'un marquage artificiel.

Le cytomètre en flux FACS^{Sort}® (Becton-Dickinson, Le Pont de Claix, France) aspire les cellules en suspension par un flux continu d'une solution iso-osmotique appelée liquide de gaine (système fluide), qui permet leur hydrofocalisation, puis leur passage cellule à cellule dans un faisceau laser (laser argon 15 mW, 488 nm). La lumière diffractée entre 3 à 10° par rapport au rayon incident (diffraction à petit angle, FSC « Forward Scatter ») permet d'estimer la taille des cellules. La lumière réfractée à 90° par rapport au rayon incident (réfraction aux grands angles, SSC « Side Scatter ») est une estimation de la complexité interne de la cellule. La cellule ou les fluorochromes excités émettent des signaux lumineux, filtrés et recueillis par un système optique de miroirs dichroïques, de photomultiplicateurs et de détecteurs. La fluorescence peut être recueillie à trois longueurs d'onde différentes (FL1 : 530 nm, FL2 : 585 nm, FL3 : 650 nm). Les données enregistrées et traitées par le logiciel Cell Quest Pro™ (Becton-Dickinson) sont ensuite exportées vers un logiciel de type tableur (Excel, Sigma Plot, GraphPad PRISM) pour les analyser.

DETERMINATION DE LA CONSTANTE DE DISSOCIATION DE LukS-PV* OU HlgC/HlgB* (K_d)

Principe : la constante de dissociation (K_d) est une mesure de l'affinité d'un ligand pour son récepteur. Il existe plusieurs techniques pour estimer ou calculer un K_d , comme la microcalorimétrie ou la résonance plasmonique de surface. Afin de calculer le K_d de leucotoxines couplées à la fluorescéine, la cytométrie en flux peut être utilisée en mesurant la quantité de protéine fixée à la surface des cellules. Le K_d est calculé grâce à un logiciel, par une régression non linéaire des valeurs de fluorescence en fonction de la concentration en protéine marquée. Le K_d des différentes leucotoxines doit être mesuré pour chaque type cellulaire.

Méthode :

Sur les PMNs : une suspension de cellules (5×10^5 cellules/mL) est incubée avec des concentrations croissantes de LukS-PV G10C*, LukS-PV G10C*/LukF-PV, LukS-PV/LukF-PV -1C* (0 / 0,01 / 0,025 / 0,05 / 0,1 / 0,25 / 0,5 / 1 / 2 / 5 / 10 nM), et HlgC/HlgB S27C* (0 / 0,025 / 0,05 / 0,1 / 0,25 / 0,5 / 1 / 2 / 5 / 10 / 20 nM) jusqu'à l'équilibre. La fluorescence de la fluorescéine associée aux cellules est mesurée en cytométrie en flux ($n \geq 3$, avec des cellules issues de donneur différents).

Sur les U937-C5aR : une suspension de cellules (5×10^5 cellules/mL) est incubée avec des concentrations croissantes de LukS-PV G10C*, LukS-PV G10C*/LukF-PV, LukS-PV/LukF-PV -1C* (0 / 0,1 / 0,25 / 0,5 / 1 / 2 / 5 / 10 / 20 / 25 nM), et HlgC/HlgB S27C* (0 / 0,025 / 0,05 / 0,1 / 0,25 / 0,5 / 1 / 2 / 5 / 10 / 20 nM) jusqu'à l'équilibre. La fluorescence de la fluorescéine associée aux cellules est mesurée en cytométrie en flux ($n \geq 3$, avec des cellules issues de cultures différentes).

Pour le calcul du K_d , voir paragraphe « outils bioinformatiques et statistiques ».

MESURE DE LA FIXATION DES LEUCOTOXINES AUX MEMBRANES PAR COMPETITION

Principe : L'affinité de LukS-PV ou HlgC pour leur ligand à la surface des cellules peut être calculée en mesurant le déplacement de LukS-PV G10C~fluorescéine (LukS-PV*). Des concentrations croissantes de compétiteurs déplacent progressivement LukS-PV* et la fluorescence associée aux cellules diminue.

Méthode : Une suspension cellulaire (5×10^5 cellules/mL dans du tampon EGTA) est incubée à TA avec une concentration fixe de LukS-PV G10C* (0,1 nM pour les hPMNs et 1nM pour les U937-C5aR) et des concentrations croissantes de composés LukS-PV ou HlgC (0,003 à 100 nM, et jusqu'à 500 nM pour les mutants de LukS-PV ayant une fixation altérée). La fluorescence des cellules à l'équilibre (> 15 min) est mesurée en cytométrie en flux (FL1, $\lambda_{Em} = 530$ nm). Les valeurs sont exprimées en pourcentage de la fluorescence en absence de compétiteur après avoir soustrait la fluorescence des cellules en absence de marquage.

DETERMINATION DE LA VARIATION DE LA CONCENTRATION INTRACELLULAIRE EN CALCIUM

Principe : le principe est le même que celui cité plus haut pour la spectrofluorimétrie. Cependant, parmi les deux sondes, seul le Fluo-3 a une longueur d'onde d'excitation compatible avec le laser argon du cytomètre.

Méthode : les cellules sont chargées avec du Fluo-3 comme décrit plus haut. Cinq minutes avant l'addition de leucotoxine, 1.1 mM de CaCl_2 est ajouté à 1 mL de suspension cellulaire (1×10^6 cellules/mL dans du tampon EGTA), dans un tube de cytométrie. Puis 1 mL de solution de leucotoxine 2 x concentrée est ajouté à $t = 0$ et homogénéisé. La fluorescence du Fluo-3 est mesurée toutes les 15 sec en cytométrie en flux (FL1, $\lambda_{\text{Em}} = 530 \text{ nm}$).

MESURE DE L'INTEGRITE MEMBRANAIRE PAR L'INCORPORATION D'ETHIDIUM

Principe : les leucotoxines forment des pores perméables aux cations monovalents et à l'éthidium (Et^+). L'éthidium ne traverse pas spontanément les membranes. Il s'agit d'un agent intercalant des plateaux de bases des acides nucléiques, qui peut alors émettre une fluorescence à 630 nm s'il est excité dans le visible ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$). La fluorescence de l'éthidium a donc été utilisée comme marqueur de la formation de pore (Meunier et al., 1995), mais peut indiquer aussi une rupture de l'intégrité membranaire. La cinétique de formation de pore est initialement exponentielle, mais la concentration d'éthidium intracellulaire s'équilibre avec le milieu extracellulaire et la fluorescence d'éthidium tend ensuite vers un plateau. L'éthidium est par ailleurs principalement connu pour son utilisation comme marqueur de la mortalité cellulaire (apoptose et nécrose confondues). En effet, les cellules mortes incorporent l'éthidium sans l'effluer activement. L'éthidium est donc incubé avec les cellules avant les leucotoxines, afin de différencier les cellules mortes au début des mesures.

Méthode : la suspension cellulaire (5×10^5 cellules/mL dans du tampon EGTA) est incubée 10 min en présence de 4 μM d'éthidium. Puis à $t = 0$, les leucotoxines sont ajoutées et l'échantillon homogénéisé. La fluorescence de l'éthidium est mesurée toutes les 5 min en cytométrie en flux pendant 40-60 min (FL3, $\lambda_{\text{Em}} = 650 \text{ nm}$). Les valeurs sont exprimées soit en pourcentage de la fluorescence d'éthidium de la leucotoxine contrôle, soit en pourcentage de la fluorescence d'éthidium des cellules mortes, après avoir soustrait la fluorescence des cellules en absence de toxine.

TEST D'HEMOLYSE EN POINT FINAL

Principe : ce test permet d'évaluer l'activité hémolytique des leucotoxines, mais également d'autres composés. Il peut constituer une évaluation de toxicité d'une molécule, ou encore être utilisé pour déterminer l'activité d'inhibiteur des leucotoxines. Le principe du test repose sur le relargage d'hémoglobine par les érythrocytes lysés. Après centrifugation, l'absorbance de l'hémoglobine du surnageant à 414 nm est proportionnelle à la lyse.

Méthode : Les érythrocytes humains sont purifiés à partir de « buffy coat » comme décrit plus haut. Les érythrocytes sont lavés 3 x dans du PBS par centrifugation 5 min à 1 200 x *g*, puis resuspendus à 0,4% (v/v). La molécule dont le pouvoir hémolytique est testé, est diluée en cascade de 2 en 2 dans 100 µL de PBS dans une plaque 96 puits à fond rond. Cent µL de la suspension d'érythrocytes sont ajoutés et incubés 45 min à 37°C. Le contrôle positif est obtenu par un triplet de puits contenant du 0,5% (p/v) de saponine, et le contrôle négatif par un triplet de puits contenant du tampon PBS. Les plaques de micro-titration sont centrifugées 2 min à 300 x *g*. A ce stade, la lyse peut être évaluée par la présence ou non d'érythrocytes culotés, et une photographie peut être prise. Le surnageant est transféré dans une plaque 96 puits à fond plat et son absorbance est mesurée par un lecteur de plaque Titertek Multiscan® MC (Flow Laboratories, Rockville, MD-USA) à DO414/DO620 nm, et les valeurs sont normalisées par rapport aux contrôles.

IMAGERIE

FIXATION DES PMNS SUR LAMELLE DE VERRE

Méthode : Des lamelles de verre (ø 14 mm) sont préalablement nettoyées avec un mélange 50 :50 éthanol : acide chlorhydrique puis traitées à la poly-lysine 50 µg/mL dans du tampon Borate pendant 1h. Les PMNs, suite à un lavage, sont resuspendus à 6 x 10⁶ cellules/mL dans du tampon EGTA et incubées pendant 15 min en présence de 1,1 mM CaCl₂. Les lamelles sont recouvertes de 500 µL de cette suspension de PMNs et incubées 30 min à TA. Les lamelles sont lavées 2 x dans 1mL de tampon EGTA/Ca²⁺ 1,1 mM.

MICROSCOPIE CONFOCALE

MARQUAGES ET FIXATION DES PMNS

Principe : Les PMNs peuvent être fixés puis marqués, ou inversement, ou encore seulement marqués et observés au microscope confocal sans être fixés (c'est-à-dire encore vivants). Un marquage nucléaire est généralement utilisé (DRAQ5, DAPI, Hoechst), éventuellement un marquage membranaire (toxine cholérique marquée, anticorps anti-cavéoline), et surtout un marquage du paramètre étudié (marquage des toxines, lysosomes, STIM, ORAI).

Ajout de la (ou des) toxine(s) : les PMNs fixés sur une lamelle de verre sont recouverts de 500 µL de toxine à différentes concentrations et temps d'incubation à TA, puis lavés 2 fois avec 1 mL de tampon EGTA/Ca²⁺ 1,1 mM.

Fixation : les lamelles sont recouvertes de 500 μ L de fixateur et incubées 5 min à TA, puis lavées 2 fois avec 1 mL de PBS. Ensuite les lamelles sont incubées pendant 30 min dans 500 μ L de tampon glycine pour éteindre l'auto-fluorescence du PAF, puis lavées 2 fois avec 1 mL de PBS.

Perméabilisation et saturation: les cellules sont perméabilisées dans du chloroforme froid pendant 5 min à -20°C. Puis elles sont rincées dans un bain d'éthanol, puis dans du PBS. Les lamelles sont ensuite incubées dans 500 μ L de tampon de blocage pendant 1h, puis lavées 3 fois dans 1mL de PBS pendant 5 min sous agitation.

Marquage : Les PMNs sont alors incubés pendant 1h dans 250 μ L d'anticorps primaire anti-leucotoxine à 1 μ g/mL et de fragment Fc humain à 5 μ g/mL dilués dans du tampon de dilution, afin de bloquer les récepteurs de Fc sur les PMNs. Puis, les lamelles sont lavées 5 fois avec 1mL de PBS pendant 5 min sous agitation. Ensuite, les cellules sont incubées pendant 1h dans 250 μ L d'anticorps secondaire à 1 μ g/mL dilué dans du tampon de dilution, puis lavées 4 fois avec 1mL de PBS pendant 5 min sous agitation. Enfin, les cellules peuvent être incubées 30 min dans 250 μ L de Hoescht à 10 μ g/mL avec la sous-unité B de la toxine cholérique (CTb) 488 à 0,5 μ g/mL dilués dans du PBS, puis lavées 3 fois avec 1mL de PBS.

Montage lame/lamelle : 10 μ L de Mowiol (milieu de montage antifading) sont déposés sur une lame de verre, puis la lamelle est déposée côté cellules sur la lame. Le Mowiol polymérise en 24h à TA.

OBSERVATION DES LAMES AU MICROSCOPE CONFOCAL

Principe : L'utilisation du microscope confocal permet d'obtenir des images avec des sections optiques très fines ($< 0,5 \mu$ M) et résolues, sans être perturbées par les tranches optiques adjacentes. Cette technique permet une localisation subcellulaire précise des molécules marquées.

Méthode : Les lames sont observées à la plateforme d'imagerie de l'Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives (INCI), Strasbourg, France. Les images sont obtenues grâce à un microscope confocal Leica SP5 II (Leica; champs de 1024×1024 pixels, objectif apochromatique 63 x/1,4 DIC immersion à huile), aux longueurs d'ondes 405 nm (Canal 1, bleu, Hoescht), 488 nm (Canal 2, vert, FITC ou Alexa 488) et 561 nm (Canal 3, rouge, Alexa 555, Alexa 594). Les images sont traitées par le logiciel LAS-AF et LAS-AF Lite version 2.4.1.

DOSAGE MULTIPLEXE DE CYTOKINES

Principe : Le dosage multiplexe permet de doser simultanément et indépendamment plusieurs paramètres dans un même échantillon. Le dosage multiplexe par Bio-Plex permet, de part sa sensibilité, de quantifier des molécules dont la concentration est comprise entre 10 et 10⁴ pg/mL dans un petit volume pouvant aller jusqu'à 12,5 µL. Cette méthode est basée sur 3 éléments principaux de la technologie xMAP :

- Des microsphères, ou billes marquées par fluorescence, chacune avec un code couleur différent ou une adresse spectrale différente permettant la discrimination entre différents tests effectués au sein d'une suspension multiplexe. Ceci permet la détection simultanée de plus de 100 types de molécules différentes dans un seul puits d'une plaque 96-puits.
- Un cytomètre en flux muni de deux lasers et les systèmes optiques associés à ces lasers pour mesurer les différentes molécules liées à la surface des billes.
- Un processeur de signal numérique à grande vitesse qui permet de gérer efficacement les données de fluorescence.

Le test de dosage de cytokines par Bio-Plex® est essentiellement un dosage immunologique effectué sur des billes magnétiques. Le principe du dosage est similaire à une ELISA en sandwich (Figure II.2). Des anticorps dirigés contre le bio-marqueur d'intérêt sont couplés d'une manière covalente aux billes. Les billes couplées aux anticorps réagissent avec les molécules d'intérêts dans l'échantillon. Suite à une série de lavages pour éliminer les protéines non-liées, un anticorps de détection couplé à la biotine est ajouté pour former un complexe en sandwich. Le complexe de détection final est formé suite à l'addition d'un conjugué streptavidine-phycoérythrine (SA-PE). La phycoérythrine sert de marqueur fluorescent.

Les données des réactions sont acquises par un système Bio-Plex ou un autre lecteur similaire basé sur la technique Luminex. Dans le cas d'un lecteur Bio-Plex 100, un laser rouge (635 nm) illumine les marqueurs fluorescents de chaque bille pour effectuer une classification et une identification des billes. Parallèlement, un laser vert (532 nm) excite la PE pour générer un signal détecté par le tube photomultiplicateur (PMT). Un processeur numérique à grande vitesse gère les données de fluorescence, puis le programme Bio-Plex Manager™ présente les résultats sous forme d'intensité médiane de fluorescence (MFI) et sous forme de concentration (pg/mL). La concentration de la molécule d'intérêt liée à chaque bille est proportionnelle à la MFI du signal fluorescent de la PE.

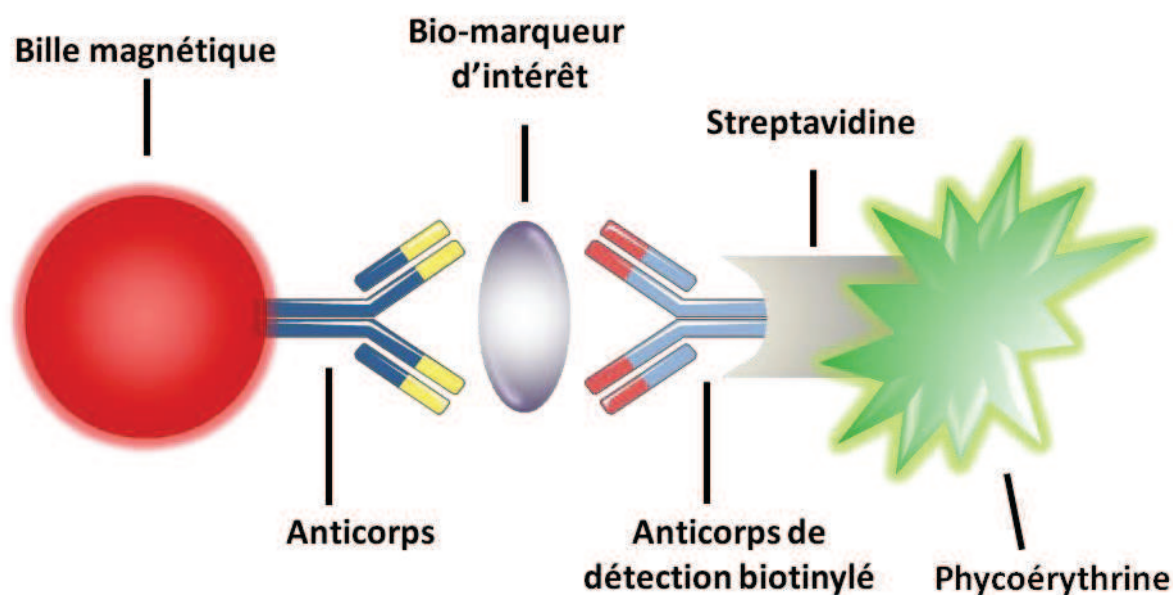


Figure II. 2 : Immuno-marquage en sandwich pour dosage Bio-Plex (Manuel BioRad)

Sécrétions : Les sécrétions des PMNs sont recueillies suite à l'activation de ces cellules par les leucotoxines. Les PMNs purifiés comme décrit précédemment sont resuspendus à 10 millions de cellules/mL dans du tampon EGTA/ Ca^{2+} 1,1mM contenant un mélange d'antiprotéases (Complete, Roche, Allemagne). La suspension cellulaire est centrifugée 6 min à $1\,700 \times g$ et le surnageant récolté suite à l'incubation des cellules en présence de différentes concentrations de leucotoxines pendant 5 min, 20 min ou 1h. Les PMNs ont été incubés avec différents inhibiteurs de canaux calciques dans certains cas avant d'ajouter les leucotoxines. Les surnageants collectés sont congelés à -80°C jusqu'au moment du dosage de cytokines.

Dosage : L'étalon lyophilisé est reconstitué dans 500 μL de milieu de dilution et incubé 30 min dans la glace. La gamme étalon constituée de 8 points est préparée par des dilutions au quart à partir d'une dilution de 72/200 μL du standard reconstitué, puis les billes sont diluées au 1/10. Le filtre au fond de la plaque 96-puits est mouillé avec 100 μL de tampon de dosage. Cinquante μL de billes sont déposés dans tous les puits, ensuite les puits sont lavés 2 fois avec 100 μL de tampon de dosage. Cinquante μL de la gamme standard, blancs et échantillons sont ajoutés dans les puits correspondants. La plaque est incubée 30 min à l'obscurité à TA sous agitation à 300 rpm. Les anticorps de détection biotinylés sont dilués dans le tampon de dilution de l'anticorps. Les puits sont lavés 3 fois avec 100 μL de tampon de dosage puis 25 μL d'anticorps 1x sont rajoutés dans les puits. La plaque est ensuite recouverte et incubée 30 min à

l'obscurité à TA sous agitation à 300 rpm. Pendant ce temps, le protocole du programme Bio-Plex Manager™ est préparé et les valeurs des standards normalisés sont introduites dans le programme. La SA-PE est diluée dans du tampon de dosage pour former 6 mL d'une suspension 1x (à protéger de la lumière). Les puits sont lavés 3 fois avec 100 µL de tampon de dosage, puis 50 µL de SA-PE 1x sont ajoutés. La plaque est recouverte et incubée 10 min à l'obscurité à TA sous agitation à 300 rpm. Les puits sont ensuite lavés 3 fois avec 100 µL de tampon de dosage. Enfin, les billes sont resuspendues dans 125 µL de tampon de dosage, puis la plaque est agitée à 1100 rpm pendant 30 secondes avant d'être lue.

OUTILS BIOINFORMATIQUES ET STATISTIQUES

CALCUL DES K_D

Les K_d sont calculés au moyen du logiciel GraphPad Prism® version 5.04 pour Windows (GraphPad Software, San Diego, CA-USA), en utilisant la formule de régression non linéaire « one site binding » :

$$y = \frac{B_{\max} \times x}{K_d + x}$$

x = [LukS-PV*] (M)

y = fluorescence de la fluoréscéine (unité arbitraire)

$B_{\max}$ = fixation maximum (même unité que Y)

K_d = constante de dissociation (M)

CALCUL DES EC_{50} ET K_I

Principe : Ce calcul permet d'obtenir une valeur chiffrée de l'affinité d'une protéine pour son ligand. La courbe de compétition, représentant la variation de la fluorescence de la protéine marquée en fonction de la concentration du compétiteur froid, permet de déterminer une EC_{50} . L' EC_{50} est la concentration en agoniste qui provoque une diminution de 50% de la réponse, ce qui correspond dans notre cas à une inhibition de 50% de la fluorescence de protéine marquée. Les valeurs de fluorescence obtenues en cytométrie sont normalisées : la réponse minimale est la fluorescence des cellules en absence de protéine marquée, la réponse maximale est la fluorescence des cellules en présence de protéine marquée sans compétiteur.

Méthode : la protéine marquée est LukS-PV*, dont le K_d et la concentration sont connus. Le logiciel GraphPad Prism® est utilisé pour établir un modèle de courbe de compétition au moyen

du modèle « one-site nonlinear regression ». Prism® donne une valeur d'EC₅₀ et calcule la constante d'inhibition apparente (k_i) du compétiteur froid en utilisant l'équation de Cheng et Prusoff (Cheng and Prusoff, 1973) :

$$K_i = \frac{EC_{50}}{1 + \frac{[LukS-PV^*]}{K_d}}$$

EC₅₀ = concentration en agoniste (HlgC, LukS-PV ou LukS-PV muté) qui provoque une inhibition de 50% de la fluorescence de LukS-PV* à la surface des cellules

[LukS-PV*] = concentration en LukS-PV* totale

k_d = constante de dissociation de LukS-PV* (sur hPMNs : $7 \pm 2 \times 10^{-11}$ M ; sur monocytes : $2 \pm 0,3 \times 10^{-11}$ M)

k_i = constante d'inhibition de l'agoniste

Prism® génère un graphe moyen à partir d'au moins 3 expériences indépendantes, et les barres représentent l'erreur standard (SEM). Il est important de remarquer que les SEM sont données pour les log EC₅₀ et non les EC₅₀, du fait que la SEM est symétrique sous forme logarithmique, mais ne l'est plus sous forme linéaire. De plus, l'EC₅₀ varie selon la concentration en LukS-PV* et en compétiteur. C'est pourquoi il est préférable d'utiliser la valeur de k_i , invariable, plutôt que l'EC₅₀, variable selon les paramètres de l'expérience.

CALCUL DES IC₅₀ DES INHIBITEURS

Principe : l'IC₅₀ est une variable de l'EC₅₀ et elle est calculée de la même manière, c'est l'appellation qui diffère sans différence fondamentale, IC₅₀ («I» pour l'inhibition) plutôt que EC₅₀ ("E" pour effecteur). Dans le cas de l'IC₅₀, c'est la concentration en inhibiteur qui provoque une diminution de 50% de la réponse qui est recherchée, ce qui correspond dans notre cas à une inhibition de 50% de la réponse des cellules aux leucotoxines. Les valeurs de fluorescence obtenues en cytométrie ou en spectrofluorimétrie sont normalisées : la réponse minimale est la fluorescence des cellules en absence de leucotoxine, la réponse maximale est la fluorescence des cellules en présence de leucotoxine sans compétiteur.

Méthode : Une concentration croissante d'inhibiteur est testée pour une concentration fixe de leucotoxine. Le logiciel GraphPad Prism® est utilisé pour établir un modèle de courbe de compétition au moyen du modèle « log(inhibitor) vs. normalized response - nonlinear regression ». Prism® donne une valeur d'IC₅₀.

ANALYSES STATISTIQUES

ANALYSE STATISTIQUE DE L'ACTIVITE DES LUKS-PV MUTES

Afin de comparer l'activité des LukS-PV mutés (fixation, activation des cellules, rupture de l'intégrité membranaire), une analyse de la variance (ANOVA) a été réalisée au moyen du logiciel GraphPad Prism®. L'ANOVA permet de comparer les moyennes de 3 séries ou plus d'échantillons indépendants, afin de répondre à la question : « toutes les populations ont-elles la même moyenne ? ». Si la valeur de p est faible ($p < 0,05$), il est peu probable que les différences observées soient dues au hasard, et au moins une des moyennes est significativement différente des autres. L'ANOVA est suivie d'un post-test de Dunnett, afin de comparer deux à deux l'activité des protéines mutées à celle de la protéine contrôle LukS-PV, de la même manière qu'un test t de Student classique. Ces tests imposent que les échantillons suivent une répartition gaussienne, ce qui a été vérifié avec le test de Shapiro-Wilk sur les valeurs de fluorescence de $n = 3000$ cellules et une homogénéité des variances (test de Bartlett qui est fait automatiquement comme pré-test d'ANOVA dans Prism®). Quoi qu'il en soit, chaque mesure en cytométrie est la moyenne de fluorescence de 3000 cellules, or les tests t de Student et l'ANOVA sont très robustes en cas de répartition non gaussienne des échantillons si n est élevé.

ANALYSE STATISTIQUE DE L'EFFICACITE DES CALIXARENES

Les IC50 des différents calixarènes avant et après neutralisation ont été comparés grâce à un t -test. Un test ANOVA suivi d'un post-test Tukey a été utilisé pour comparer les différents couples de calixarènes. Et un test ANOVA suivi d'un post-test Dunnett a été utilisé pour comparer l'efficacité de différents calixarènes par rapport au SC8.

EXPERIMENTATION ANIMALE

ETHIQUE ET AUTORISATIONS

Les protocoles d'expérimentation ophtalmologiques sur le lapin sont en conformité avec les procédures de l'« Association for Research in Vision and Ophthalmology » (ARVO), et autorisés par le Ministère de l'Agriculture (autorisation n° A67-482-34). En complément, un traitement antalgique est administré si des signes de douleurs apparaissent. Dans ce cas, un traitement antalgique est dispensé par injection intramusculaire de Buprénorphine (1 ampoule de 1mL/Lapin) toutes les 8 à 12h. Seul 1 œil par lapin peut subir une injection, afin de préserver la vision de l'animal.

Tableau II. 2 : Références et doses des drogues utilisées pour l'expérimentation animale

Principe actif	Nom commercial	Fournisseur	Concentration stock (% p/v dans l'eau)	Dose injectée	Indication
Xylazine	ROMPUN®	Bayer Healthcare	2 % (p/v)	3 mg / kg ($\approx 450\mu\text{L}$ / lapin)	Anesthésie générale
Kétamine	IMALGENE®	Virbac Animal Health	5 % (p/v)	20 mg / kg ($\approx 1200 \mu\text{L}$ / lapin)	Anesthésie générale
Lidocaïne	XYLOCAINE®	AstraZeneca	1 % (p/v)	quelques gouttes par œil	Anesthésie locale de l'œil
Buprénorphine	BUPRECARE®	Axience	0,03 % (p/v)	1mL toutes les 8-12h	Antalgique
Pentobarbital	DOLETHAL®	Vétoquinol	20 % (p/v)	3-5 mL / lapin	Euthanasie

MODELE D'ENDOPHTALMIE CHEZ LE LAPIN

Structure de l'œil : Afin de comprendre le protocole, il est nécessaire de se familiariser avec les structures de l'œil, qui sont pratiquement les mêmes chez l'homme et le lapin (**Figure II.3 A**). L'œil est composé d'une chambre antérieure contenant l'humeur aqueuse, limitée en avant par la cornée, et en arrière par l'iris et le cristallin. La chambre postérieure contient l'humeur vitrée ($\approx 1,4 \text{ mL}$ chez le lapin), et est bordée par la choroïde, richement vascularisée. Les 2/3 postérieurs de la choroïde sont recouverts par la rétine, responsable de la transformation du signal lumineux en information nerveuse. La rétine est composée de la superposition de 10 couches (**Figure II. 3.B**), dont les 3 couches cellulaires principales sont :

- la couche des cellules photoréceptrices (cônes et bâtonnets)
- la couche des cellules bipolaires, qui forment une passerelle entre les cônes et les bâtonnets d'un côté et les cellules ganglionnaires de l'autre
- la couche des cellules ganglionnaires dont les axones se rassemblent pour former le nerf optique.

Les différences entre l'œil du lapin et l'œil humain sont 2 muscles oculaires au lieu de 4 et une membrane sus-conjonctivale rétractable qui est ancrée du côté sinusoïdal.

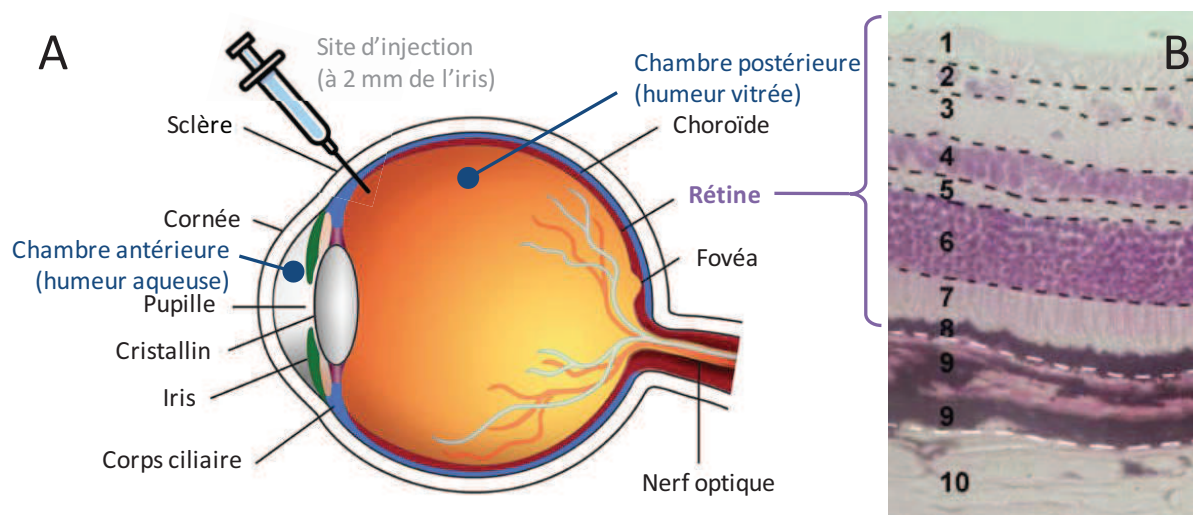


Figure II.3. Anatomie de l'œil humain et de lapin et détail des couches de la rétine

(A) coupe sagittale médiane d'un œil. La seringue schématise le point d'injection, à environ 2 mm du bord de la cornée. Dessin traduit et adapté de Steve Tatler, 2007, <http://illustration.stevetatler.co.uk>. (B) structure histologique de la rétine, colorée à l'hématoxyline-éosine, en microscopie optique. 1 : fibres du nerf optique ; 2 : couche des cellules ganglionnaires ; 3 : couche plexiforme interne ; 4 : couche nucléaire interne ; 5 : couche plexiforme externe ; 6 : couche nucléaire externe ; 7 : cônes et bâtonnets ; 8 : épithélium pigmenté ; 9 : choroïde ; 10 : sclère.

INJECTIONS INTRAVITREENNES

Principe : les leucotoxines sont capables à elles seules de provoquer une inflammation des tissus internes de l'œil, appelée endophtalmie. L'injection de leucotoxine dans le vitrée de l'œil de lapin permet de générer un modèle d'endophtalmie non infectieuse, qui peut être utilisé pour tester le potentiel thérapeutique de molécules dirigées contre ces toxines. Elle permet également d'identifier les cellules cibles des leucotoxines au niveau de la rétine.

Méthode : les injections sont pratiquées sur des yeux de lapins New Zealand de 2,7 – 3 kg. Les animaux sont sédatés par injection intramusculaire d'un mélange de Kétamine (20 mg/kg) + Xylazine (3 mg/kg) (référence des drogues : voir Tableau II. 2 II.2). Quelques gouttes de Lidocaïne sur l'œil permettent une anesthésie locale. Un volume de 50 µL est injecté dans le vitrée avec une aiguille 25-gauge, à environ 2 mm de la cornée, en évitant à la fois le cristallin et la rétine. L'aiguille est retirée précautionneusement pour éviter un reflux sur la conjonctive. Prévoir un contrôle négatif (50 µL de solution physiologique stérile) et positif (leucotoxine).

EUTHANASIE ET ENUCLEATION

Principe : l'euthanasie et l'énucléation sont effectuées pour l'étude immunohistologique de l'œil.

Méthode : un cathéter est posé à l'oreille du lapin sous anesthésie générale. Puis 3 à 5 mL de Pentobarbital sont lentement injectés en intraveineuse. Cent μL de paraformaldéhyde sont injectés en intravitrée afin d'éviter le décollement de la rétine puisqu'elle commence à s'autolyser rapidement après la mort du lapin. Les yeux sont ensuite énucléés le plus rapidement possible et sont incubés dans 10 volumes de paraformaldéhyde pendant 30 min suite à une entaille à 2 mm de la cornée. Les yeux sont disséqués délicatement pour éviter le décollement de la rétine et seule la partie antérieure de la sclère où la rétine s'épaissit est conservée. Les fragments des yeux conservés sont fixés dans du paraformaldéhyde pendant une nuit.

CONGELATION ET COUPES

Principe : Afin d'obtenir des coupes de tissu fixé, il doit être inclus dans un milieu d'enrobage. L'OCT® est le milieu d'enrobage classique pour des coupes en congélation. C'est un gel à TA, qui se solidifie en dessous de -10°C . Les qualités morphologiques des coupes congelées sont moins bonnes que celles obtenues par d'autres techniques de coupes, comme par exemple les coupes en paraffine. Cependant, la congélation permet la préservation des antigènes membranaires et cytoplasmiques, et permet de faire des immunomarquages par immunofluorescence.

Méthode : Les fragments sont cryo-protégés dans des bains de PBS-sucrose 10%, 20% puis 30%. Les fragments sont par la suite congelés dans de l'OCT® par refroidissement progressif dans de l'azote liquide. Les blocs sont conservés à -80°C et transférés à -20°C , 24 heures avant d'effectuer les coupes. Les coupes de 10 μm sont obtenues grâce à un cryostat Leica CM 3050S refroidi à -20°C . Les coupes adhèrent sur des lames de microscopie Superfrost® Plus ou Superfrost® Ultra Plus, qui sont conservées à -20°C jusqu'au moment du marquage.

COLORATION A L'HEMATOXYLINE ET L'EOSINE

Principe : La coloration à l'hématoxyline et l'éosine est une méthode employée universellement pour l'examen microscopique des tissus. Elle permet l'identification d'un tissu, de l'étude de la composition du tissu et elle nous permet surtout de s'assurer de la qualité de nos coupes et de la morphologie et de la structure des coupes obtenues. Cette méthode est basée sur la coloration nucléaire par l'hématoxyline de Harris et la contre coloration du cytoplasme et du collagène par

l'éosine. L'inconvénient des sections des yeux enrobés d'OCT® est que le tissu a tendance à se décoller de la lame durant la coloration.

Méthode : Les lames sont d'abord lavées à l'eau pour enlever l'OCT (10-20 bains). Elles sont recouvertes d'une solution d'hématoxyline de Harris pendant 5 min, puis lavées à l'eau (10-20 bains). Elles sont ensuite décolorées par une solution acide-alcool qui enlève le colorant du cytoplasme, tout en le maintenant dans le noyau (1-10 bains). La coloration est ensuite accentuée en trempant les lames pendant 30 secondes à 1 min dans de l'eau ammoniacquée puis rincées à l'eau. Les lames sont ensuite contre-colorées en les recouvrant d'une solution d'éosine 1% pendant 30 secondes, puis elles sont lavées rapidement à l'eau. Le tissu est ensuite déshydraté par 10 bains d'éthanol 100°. Le seul but de cette coloration est de vérifier la qualité des coupes.

IMMUNO-MARQUAGE

But : Le but de l'immuno-marquage sur les coupes de rétines est de localiser les leucotoxines injectées dans l'œil du lapin 30 min avant son euthanasie dans le cas de leur fixation à un type précis de cellules, afin d'identifier les cellules de la rétine qui pourraient être la cible des leucotoxines.

Méthode : Les lames sont d'abord lavées dans du PBS pour enlever l'OCT®. Le tissu est perméabilisé suite à une incubation pendant 15 min dans du tampon de perméabilisation, puis lavé 10 min dans du PBS. Ensuite, les lames sont incubées pendant 1h avec des anticorps primaires anti-leucotoxines, puis elles sont lavées 10 min dans du PBS. Les lames sont incubées pendant 1h avec des anticorps secondaires marqués puis lavées 10 min dans du PBS. Puis, elles sont incubées avec du Hoescht (10µg/mL) pendant 15 min puis lavées 10 min dans du PBS. Les coupes sont enfin montées entre lames et lamelles avec du Mowiol®. Elles sont par la suite observées avec le microscope confocal cité ci-dessus.

CHAPITRE III : MODE D'ACTION DES LEUCOTOXINES

INTRODUCTION

Les leucocytes formés par la lignée myéloïde et la lignée lymphoïde comportent les premières cellules cibles décrites des leucotoxines. La γ -hémolysine HlgC/HlgB est capable de cibler toute la lignée myéloïde humaine alors que la LPV cible les monocytes, les macrophages et les PMNs. Les PMNs constituent le type cellulaire le plus utilisé pour l'étude de ces leucotoxines. Cependant, *S. aureus* peut infecter tous les tissus du corps humain, il n'est donc pas exclu que d'autres cellules soient sensibles à ces toxines.

Des cas d'infections du système nerveux central (SNC) par des souches de *S. aureus* ont été décrits, même si ces infections restent rares (<5%) (Arora et al., 2012; David et al., 2012; Naesens et al., 2009; Sifri et al., 2007; Somand and Meurer, 2009; Taglietti et al., 2012). Dans les thromboses septiques des sinus caverneux et les abcès du cerveau, *S. aureus* est l'agent causal de 60 à 70 et 20% des cas, respectivement (Ebright et al., 2001; Roche et al., 2003b). Ces infections du SNC peuvent provenir suite à une otite moyenne causée par *S. aureus*, qui entraîne des complications intracrâniennes, suite à une infection dentaire ou à une fracture de l'os nasal qui conduit à une thrombose du sinus caverneux (Munckhof et al., 2008a). Une sinusite chronique, compliquée par *S. aureus* pourrait conduire à une diffusion hématogène, à travers le système veineux avalvulé du sinus paranasal, dans le sinus caverneux, et consécutivement dans le cerveau (Naesens et al., 2009). Les infections du SNC peuvent également être le résultat d'une diffusion hématogène de sites d'infection périphériques (Wadhwa et al., 2012), y compris l'endocardite bactérienne ou l'abcès pulmonaire, d'un traumatisme de la calotte crânienne, ou de complications infectieuses suite à des interventions chirurgicales. Ils peuvent aussi toucher des patients immunodéprimés (Muzumdar et al., 2011).

De plus, les infections à *S. aureus* sont souvent douloureuses d'où la question de la sensibilité des neurones aux leucotoxines. Pour détecter une activité cellulaire des leucotoxines sur les neurones, deux types cellulaires ont été choisis : les neurones en grains du cervelet et les neurones sensoriels des ganglions spinaux (DRG). Les premiers, représentants des neurones centraux, forment une population homogène en culture et sont d'accès plus simple que toute autre population neuronale centrale. Les neurones des ganglions spinaux forment la population périphérique de vigilance capable d'alerter le SNC en transmettant les perceptions douloureuses. Il a paru important de vérifier la sensibilité de ces neurones à la présence des leucotoxines.

S. aureus est l'un des agents pathogènes principaux des infections oculaires (Freidlin et al., 2007). Pour des infections comme les kératites et les endophtalmies, elles peuvent mettre en jeu les capacités initiales de la vision, voire la conservation de l'organe malgré le privilège immunitaire qui normalement préserve l'œil de l'inflammation (Alexandrakis et al., 2000; Callegan et al., 2002; Hanscom, 2004; Khanal et al., 2005; Streilein, 2003). Les leucotoxines induisent une réaction inflammatoire importante dans l'œil (chambre postérieure, chambre antérieure, conjonctive, paupières et annexes), lorsqu'elles sont présentes en quantités proches de 10 pM, soit une activité importante au regard du nombre de bactéries pouvant être présentes (Bronner et al., 2000; Siqueira et al., 1997). Plusieurs leucotoxines provoquent une endophtalmie sévère dans un modèle d'œil de lapin (Supersac et al., 1998), même en absence de la bactérie (Siqueira et al., 1997). Les activités de la myéloperoxydase et de la phospholipase A2 (PLA2) augmentent consécutivement à l'injection de bactéries, d'alpha-toxine ou de leucotoxines (Girgis et al., 2005; O'Callaghan et al., 2007; Siqueira et al., 1997). Cependant, les lapins jeunes (6 - 8 semaines) semblent plus susceptibles à l'alpha-toxine que les individus âgés (30 mois) (O'Callaghan et al., 2007). Ces toxines sont en fait sécrétées même pour des densités bactériennes faibles dans l'humeur vitrée du lapin infecté, correspondant à une situation de stress de la bactérie comme le manque de nutriments (Bronner et al., 2003). L'injection de la LPV induit une forte réponse inflammatoire dans la chambre antérieure de l'œil du lapin, masquant la chambre postérieure, une congestion vasculaire intense de l'iris et un infiltrat inflammatoire intense dans la choroïde, alors que la rétine perd son architecture et est remplacée par une lyse purulente (Laventie et al., 2011). D'où l'importance d'identifier les cellules de la rétine ciblées par les leucotoxines et de comprendre le mode d'action sur ces cellules, afin de prévenir les dommages irréparables pour l'œil.

RESULTATS

NEURONES

L'effet de l' α -toxine, la LPV, HlgA/HlgB et de HlgC/HlgB a été étudié sur les neurones en grains du cervelet de rat, ainsi que sur les neurones sensoriels du ganglion spinal (DRG). Les deux types cellulaires se sont montrés sensibles à toutes ces toxines. Un test permettant de mesurer la sécrétion de glutamate par les neurones granulaires a permis de montrer que le signal induit par HlgC/HlgB est beaucoup plus intense que celui initié par les autres toxines. La libération de glutamate se fait suite à l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ d'où l'intérêt de comprendre le mécanisme qui aboutit à cette augmentation.

ARTICLE N°1 : STAPHYLOCOCCAL LEUKOTOXINS TRIGGER FREE INTRACELLULAR Ca^{2+} RISE IN NEURONES, SIGNALLING THROUGH ACIDIC STORES AND ACTIVATION OF STORE-OPERATED CHANNELS.

Staphylococcal leukotoxins trigger free intracellular Ca^{2+} rise in neurones, signalling through acidic stores and activation of store-operated channels

Emmanuel Jover,^{1*} Mira Y. Tawk,^{2†}
Benoît-Joseph Laventie,^{2‡} Bernard Poulain¹ and
Gilles Prévost²

¹INCI – UPR-CNRS 3212; Neurotransmission et
sécrétion neuroendocrine; 5, rue Blaise Pascal;
F- 67084 Strasbourg cedex, France.

²Université de Strasbourg, Physiopathologie et
Médecine Translationnelle EA-4438; Hôpitaux
Universitaires de Strasbourg, Institut de Bactériologie,
3, rue Koeberlé; F-67000 Strasbourg, France.

Summary

Headache, muscle aches and chest pain of mild to medium intensity are among the most common clinical symptoms in moderate *Staphylococcus aureus* infections, with severe infections usually associated with worsening pain symptoms. These nociceptive responses of the body raise the question of how bacterial infection impinges on the nervous system. Does *S. aureus*, or its released virulence factors, act directly on neurones? To address this issue, we evaluated the potential effects on neurones of certain bi-component leukotoxins, which are virulent factors released by the bacterium. The activity of four different leukotoxins was verified by measuring the release of glutamate from rat cerebellar granular neurones. The bi-component γ -haemolysin HlgC/HlgB was the most potent leukotoxin, initiating transient rises in intracellular Ca^{2+} concentration in cerebellar neurones and in primary sensory neurones from dorsal root ganglia, as probed with the Fura-2 Ca^{2+} indicator dye. Using pharmacological antagonists of receptors and Ca^{2+} channels, the variations in intracellular Ca^{2+} concentration were found independent of the activation of voltage-operated

Ca^{2+} channels or glutamate receptors. Drugs targeting Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) or H^{+} -ATPase and antagonists of the store-operated Ca^{2+} entry complex blunted, or significantly reduced, the leukotoxin-induced elevation in intracellular Ca^{2+} . Moreover, activation of the ADP-ribosyl cyclase CD38 was also required to initiate the release of Ca^{2+} from acidic stores. These findings suggest that, prior to forming a pore at the plasma membrane, leukotoxin HlgC/HlgB triggers a multistep process which initiates the release of Ca^{2+} from lysosomes, modifies the steady-state level of reticular Ca^{2+} stores and finally activates the Store-Operated Calcium Entry complex.

Introduction

Staphylococcus aureus is a common host in human flora that asymptotically colonizes one in three healthy individuals; children having higher persistent carriage rates than adults (Wertheim *et al.*, 2005). However, this bacterium can be a serious pathogen, and is now the second cause of hospital and community-acquired infections worldwide (David and Daum, 2010; DeLeo *et al.*, 2010; David *et al.*, 2011). The severity and locations of *S. aureus* infections display broad variation. Contamination typically progresses from a local infection (furuncle, cellulitis, wound infection) to systemic propagation (bacteraemia) and metastatic infections (pneumonia, endocarditis, osteomyelitis, septic arthritis). The emergence and spread of community-acquired, drug-resistant (CA-MRSA) and extremely virulent strains reinforces the morbidity of *S. aureus* infections (Chambers and DeLeo, 2009; David and Daum, 2010). Pathogenesis of the bacterium relies on an arsenal of virulence-associated factors, some of which specifically produce toxin-induced diseases (e.g. bullous impetigo, toxic shock syndrome, staphylococcal scaled skin syndrome and food-borne gastroenteritis) (Archer, 1998; Lowy, 1998).

One distinctive feature of CA-MRSA strains is the bearing of genes for the Panton-Valentine leukocidin (PVL), a bi-component toxin encoded by *lukS-PV* and *lukF-PV* from an integrated bacteriophage, rarely carried

Received 21 August, 2012; revised 18 October, 2012; accepted 6 November, 2012. *For correspondence. E-mail jover@inci-cnrs.unistra.fr; Tel. (+33) 3 88 45 66 47; Fax (+33) 3 88 60 16 64.

†These authors equally contributed to the work. ‡Present address: Biozentrum; University of Basel; Klingelbergstrasse 50/70; CH - 4056 Basel, Switzerland.

by *S. aureus* strains prior to the 1990s (Woodin, 1960; Finck-Barbançon *et al.*, 1991; Rahman *et al.*, 1992; Kaneko *et al.*, 1998). The activity of PVL plays a role in pathogenesis under conditions involving host susceptibility factors and infected tissues (Gillet *et al.*, 2002; Crémieux *et al.*, 2009). Moreover, *S. aureus* has the capacity to produce several homologous two-component leukotoxins that contribute to the bacterium's power of infection, including the ubiquitous γ -haemolysins (Hlg, encoded by *hlgA*, *hlgB* and *hlgC*) (Prévost *et al.*, 1995), the leukotoxin LukE–LukD (Gravet *et al.*, 1998), PVL, LukM and LukF–PV (Choorit *et al.*, 1995). These toxins assemble as pore-forming octamers on the surface of susceptible target cells, such as neutrophils, monocytes and macrophages, and can thereby alter host cell functions or cause cytolysis (Prévost *et al.*, 2001; Jayasinghe and Bayley, 2005). Genes encoding several cytolytic toxins, notably γ -haemolysin subunits HlgA, HlgB and HlgC, can be upregulated in human blood over time (Malachowa *et al.*, 2011).

Major advances have been achieved over the last decade in the understanding of the structure and mechanisms of pore formation by two-component toxins from *S. aureus* and from other origins (Menestrina *et al.*, 2003; Gonzalez *et al.*, 2008). In contrast, much less is known regarding the overall cell targets and responses to *S. aureus* leukotoxins. The increase in free intracellular calcium or the loss of cellular potassium are examples of early cellular reactions to the presence of pore-forming toxins, an ion imbalance that may lead to the activation of a variety of signalling cascades (Woodin and Wieneke, 1963; Staali *et al.*, 1998; Kloft *et al.*, 2009; Kao *et al.*, 2011).

In the present study, the question of the sensitivity of neurones to bi-component leukotoxins of *S. aureus* is addressed with the aim of deciphering the mechanisms of cell response. Cell cultures from rat cerebellar cortex and primary sensory neurones from dorsal root ganglia were used to demonstrate the neurotoxic activity of PVL, α -toxin and γ -haemolysins. The four virulence-associated factors maintained neuronal integrity while triggering a $[Ca^{2+}]_i$ increase in cerebellar neurones, which was followed by the release of glutamate. The γ -leukotoxin HlgC/HlgB was found to be the most potent on both types of cultured neurones. The leukotoxin-induced rises in free intracellular ($[Ca^{2+}]_i$) were initiated by a discharge of Ca^{2+} from acidic stores and followed by a Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release from the reticulum. These effects were further amplified by the activation of the store-operated Ca^{2+} entry complex. The initial signal linking leukotoxin binding to the acidic stores was due to the activation of the ADP ribosyl cyclase CD38. This cellular response to the presence of the leukotoxin in neuronal cells preceded the formation of toxin pores into the plasma membrane.

Results

Staphylococcal leukotoxins trigger glutamate release from cerebellar granular neurones

Cerebellar granular neurones have been shown to act in response to the presence of certain pore-forming toxins (Lonchamp *et al.*, 2010). Thus, to examine whether neurones sense and react to *S. aureus* leukotoxins, glutamate release by cerebellar granular neurones was quantified after a 10 min exposure to the toxins. Dose–response curves for α -toxin, leukotoxins HlgC/HlgB and HlgA/HlgB and the PVL are shown in Fig. 1A. HlgC/HlgB was the most potent of the four leukotoxins, reaching a half-maximal effect at a concentration of 3 nM and maximum glutamate release at 0.1 μ M. This maximum was 2.4 times higher than the total release generated by a 5 s depolarization pulse of 60 mM KCl, but only 35% of the total-cell glutamate content, as assessed using a 10 min osmotic shock in 10 mM Tris-HCl, pH: 7.4 (Fig. 1B). Alpha-toxin (0.1 μ M), leukotoxin HlgA/HlgB (0.1 μ M) and PVL (0.1 μ M) were less effective than HlgC/HlgB, releasing equivalent amounts of glutamate as that generated by the 5 s 60 mM KCl depolarization pulse (Fig. 1A). The release due to leukotoxin HlgC/HlgB was dependent on an increase in free $[Ca^{2+}]_i$, since pre-incubation of neurones with the intracellular calcium chelator BAPTA-AM (10 μ M) (30 min loading followed by 20 min hydrolysis) strongly reduced the amount of glutamate released into the medium (Fig. 1B). The HlgC or HlgB subunits separately failed to induce glutamate release from granular neurones (Fig. S1a).

To determine whether HlgC/HlgB-treated neurones undergo lysis, the amount of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) enzymatic activity released into the medium was quantified. An example of G6PDH activity measured after incubation at increasing concentrations of HlgC/HlgB leukotoxin is illustrated in Fig. 1C. Significant enzymatic activity was detected only after 20 min incubation with 0.1 μ M leukotoxin, suggesting that high toxin concentration treatment may have been fatal for some cells. However, assessment of the number of pyknotic nuclei in cultures labelled with Hoechst-33258 revealed no significant difference between control (three independent cultures, > 400 nuclei, 6.5% pyknotic) and 6 nM leukotoxin-treated cells after a 15 min incubation period (three independent cultures, > 400 nuclei, 5.8% pyknotic). Membrane permeation of ethidium bromide has been proposed for monitoring pore formation at the cell membrane due to leukotoxin (Staali *et al.*, 1998). Time-lapse video microscopy was used to record the infiltration of ethidium bromide in neurones incubated in the presence of 8 nM leukotoxin HlgC/HlgB-Alexa-488. Visual inspection of neurones incubated 30 min in the presence of toxin revealed that ethidium bromide-related fluorescence

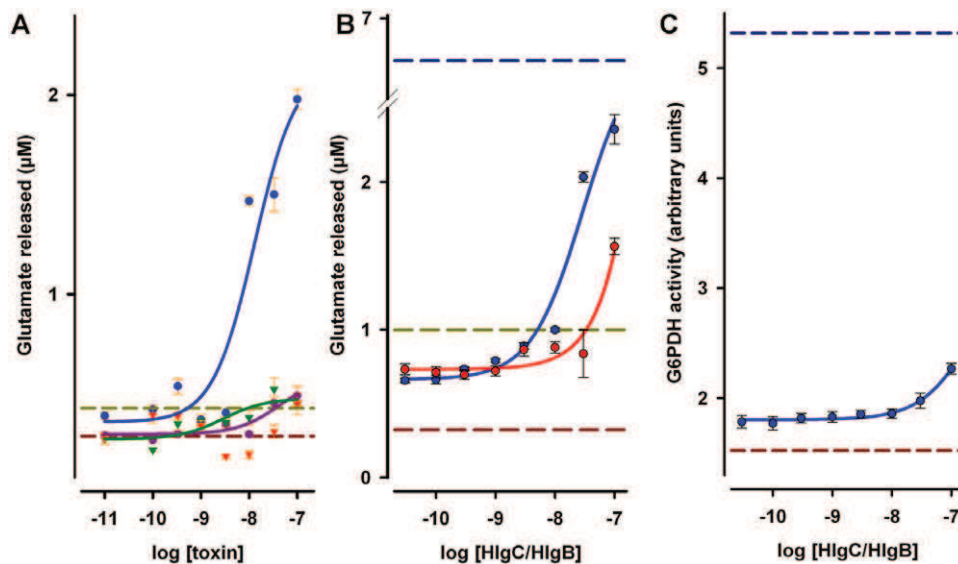


Fig. 1. *Staphylococcus aureus* leukotoxins trigger glutamate release from cerebellar granular neurones.

A. Cultured cells were challenged for 10 min with the indicated concentrations of leukotoxin HlgA/HlgB (●), leukotoxin HlgC/HlgB (●), α -toxin (▼) or PVL (▼). Leukotoxin HlgC/HlgB was the most active, showing a half-maximum concentration effect at nanomolar concentrations. The other three toxins triggered glutamate release at higher concentrations only; the glutamate measured in these instances was similar to the amount measured after a 10 s pulse of 60 mM KCl depolarization.

B. Prior to addition of the toxin, cells were loaded with 10 μM of the membrane-permeable intracellular calcium chelator BAPTA-AM (●), which led to a significant decrease in the amount of glutamate release. Control leukotoxin HlgC/HlgB (●). The upper reference value (6.51 μM , blue dotted line) stands for the total-cell glutamate content.

C. Glucose-6-phosphate dehydrogenase enzymatic activity measured in culture media after a 10 min incubation of neurones in the presence of leukotoxin HlgC/HlgB. Only the highest concentration (0.1 μM) demonstrated a significant amount of released enzymatic activity. Results in (B) (glutamate) and (C) (G6PDH) are from of the same experiment. The brown dotted line represents glutamate (A and B) or G6PDH activity (C) measured in the bathing media of control cells. The green dotted line in (A) and (B) corresponds to glutamate released by a 10 s depolarization of neurones in 60 mM KCl. The blue dotted line in (B) and (C) stands for total glutamate (B) or total G6PDH (C) content measured after a 10 min osmotic shock of neurones in 10 mM Tri-HCl buffer (pH 7.4).

remained low, constant and consistently extracellular (Fig. S2). These results together with the reduction in glutamate release due to the Ca^{2+} chelator BAPTA favour the notion that leukotoxin-induced glutamate release is triggered by a rise in free $[Ca^{2+}]_i$, independently of the formation of a pore.

The leukotoxin-induced rise in $[Ca^{2+}]_i$ is concentration dependent

We monitored $[Ca^{2+}]_i$ variations in cerebellar granular neurones and in sensory neurones from dorsal root ganglia (DRG), using the Fura-2 Ca^{2+} indicator dye, to analyse the activity of leukotoxins HlgC/HlgB and HlgA/HlgB and PVL (Fig. 2). The subunits HlgC or HlgB separately failed to induce $[Ca^{2+}]_i$ variations (Fig. S1b). Leukotoxin HlgC/HlgB (2 nM) induced a rise in $[Ca^{2+}]_i$ in 86% of granular neurones (12 cultures, 618 cells, Fig. 2A) and in 65% of DRG neurones at 4 nM (9 cultures, 191 cells, Fig. 2B). In contrast, leukotoxin HlgA/HlgB activated a rise in $[Ca^{2+}]_i$ in 20% of granular neurones at higher concentration (20 nM; three experiments, 130 cells). PVL (2 nM) was active in 24% of recorded granular neurones (13 cultures, 419

cells, Fig. 2C) and in 28% of DRG sensory neurones at 4 nM (three cultures, 84 cells, Fig. 2D).

The typical reaction of a neurone to the presence of leukotoxin HlgC/HlgB was a progressive elevation in free $[Ca^{2+}]_i$, which led to a transient peak and returned to a new $[Ca^{2+}]_i$, resting value (Fig. 2A and B). In a same culture plate, the effect of the leukotoxin on different granular neurones occurred at various unrelated moments. However, the response of DRG sensory neurones was both fast and synchronous for all responding cells of the same plate. For comparison purposes, the response of each neurone was characterized by the peak value of $[Ca^{2+}]_i$ (amplitude) and the time needed by the cell to reach the $[Ca^{2+}]_i$ peak after the addition of the leukotoxin (latency). These values are shown in box plots with the mean, the median and percentiles.

In granular neurones, the amplitude of the $[Ca^{2+}]_i$ peak was dependent on leukotoxin concentration, as illustrated in examples in Fig. 3A–C. Moreover, the consolidation of results from 44 independent experiments confirmed that mean $[Ca^{2+}]_i$ peak amplitude values increased, while the latency of the response decreased with increasing concentrations of leukotoxin, as shown in Table 1 and Fig. 3D

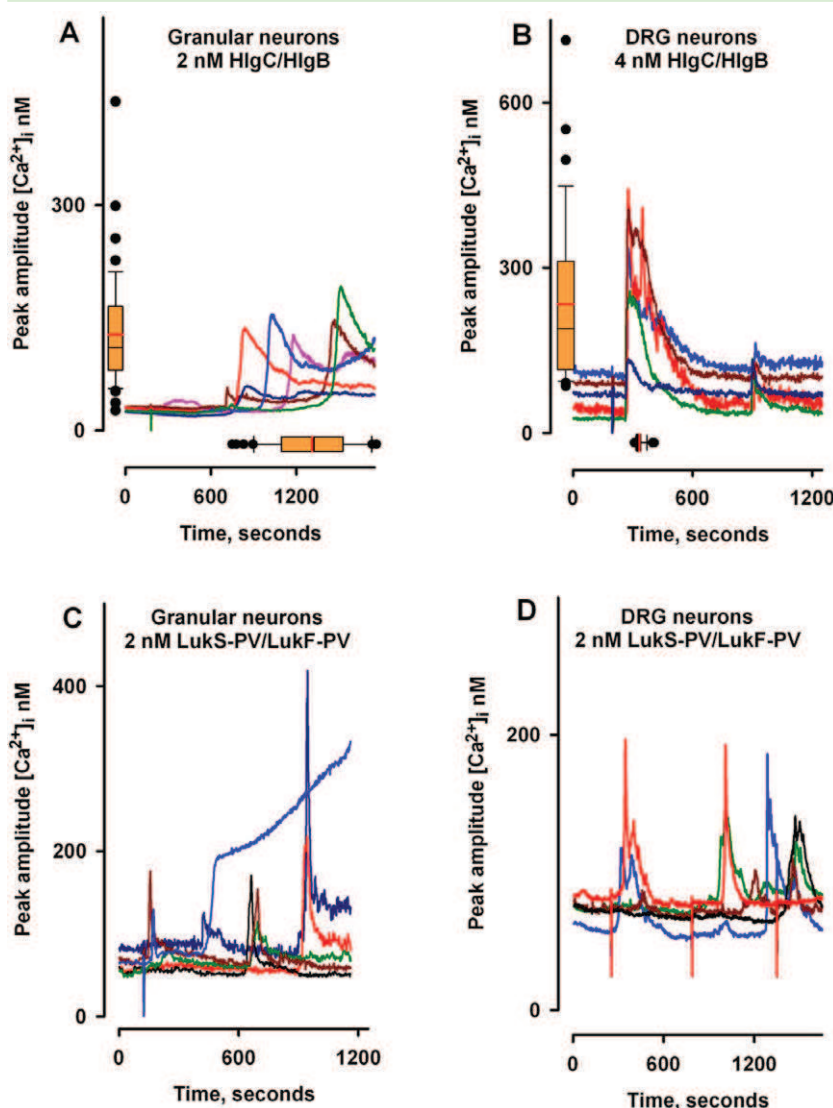


Fig. 2. Leukotoxins induce $[Ca^{2+}]_i$ changes in cerebellar granular and in dorsal root ganglion neurones.

A. Multiple examples of recordings of cerebellar neurones challenged with 2 nM leukotoxin HlgC/HlgB. The amplitude of the $[Ca^{2+}]_i$ peak induced by the leukotoxin was variable as was the latency of the response. Boxes along the axis show the median and percentiles for both peak amplitude and latency for 47 cells recorded simultaneously. The mean is indicated by the red trace.

B. $[Ca^{2+}]_i$ variation caused by leukotoxin HlgC/HlgB in dorsal root ganglion neurones (4 nM toxin). The box presentation corresponds to 36 neurones from three different dishes recorded the same day.

C. PVL (2 nM) induced $[Ca^{2+}]_i$ changes in 25% of recorded cerebellar neurones; in certain instances, the same cell presented a few $[Ca^{2+}]_i$ transient peaks.

D. Responses of DRG neurones to different applications of 2 nM PVL; contrary to the γ -leukotoxin HlgC/HlgB effects, PVL was able to induce different responses within the same cell during the recording period. Less than 25% of DRG cells from the same culture plate were sensitive to the leukocidin. The vertical stroke at approximately 200 s indicates the time of addition of the toxin.

In (D), the three vertical strokes indicate three independent additions of PVL. In (A)–(D), all traces represent individual sample recordings.

and E. However, the dispersion of both parameters was high among neurones within a same plate, which suggests that a multistep process may be necessary to disrupt $[Ca^{2+}]_i$ homeostasis and that its activation may depend on a particular cell's status.

The increase in free $[Ca^{2+}]_i$ is independent of voltage-operated Ca^{2+} channels or glutamate receptor activity

Activation of any of the various types of voltage-operated Ca^{2+} channels (VOCC) or glutamate receptors may lead to rise in $[Ca^{2+}]_i$ in granular neurones (Randall and Tsien, 1995; Brickley *et al.*, 2001). To investigate whether leukotoxin HlgC/HlgB activates a Ca^{2+} -permeable channel or receptor, VOCC were antagonized with either 5 μ M nifedipine (L-Type channels), 0.1 μ M ω -GVI-A (N-Type channels) or 0.1 μ M ω -AgaTK (P/Q-Type channels) whereas

ionotropic glutamate receptors were antagonized with 10 μ M CNQX (AMPA receptors) or 10 μ M D-AP5 (NMDA receptors) while recording $[Ca^{2+}]_i$ variations induced by leukotoxin HlgC/HlgB. Amplitude and latency of $[Ca^{2+}]_i$ variations are presented in Fig. 4A and B and in Table 2 (mean values). The presence of these drugs either alone or in various combinations, prior to addition of the leukotoxin, did not considerably alter the amplitude of the $[Ca^{2+}]_i$ peak (Fig. 4A). However, blockade of all VOCC significantly shortened the latency of the leukotoxin effect by 45% ($P < 0.05$), effect observed also when Na^+ channels and glutamate receptors were additionally blocked (Fig. 4B, Table 2). When the P/Q-type Ca^{2+} channel antagonist ω -AgaTk was removed from the cocktail, the latency of the response was four times longer (853 ± 14 s versus 210 ± 20 s, $P < 0.05$). The selective blockade of voltage-gated Na^+ channels (0.3 μ M TTX) doubled the latency of the response (436 ± 8 s versus 210 ± 20 s,

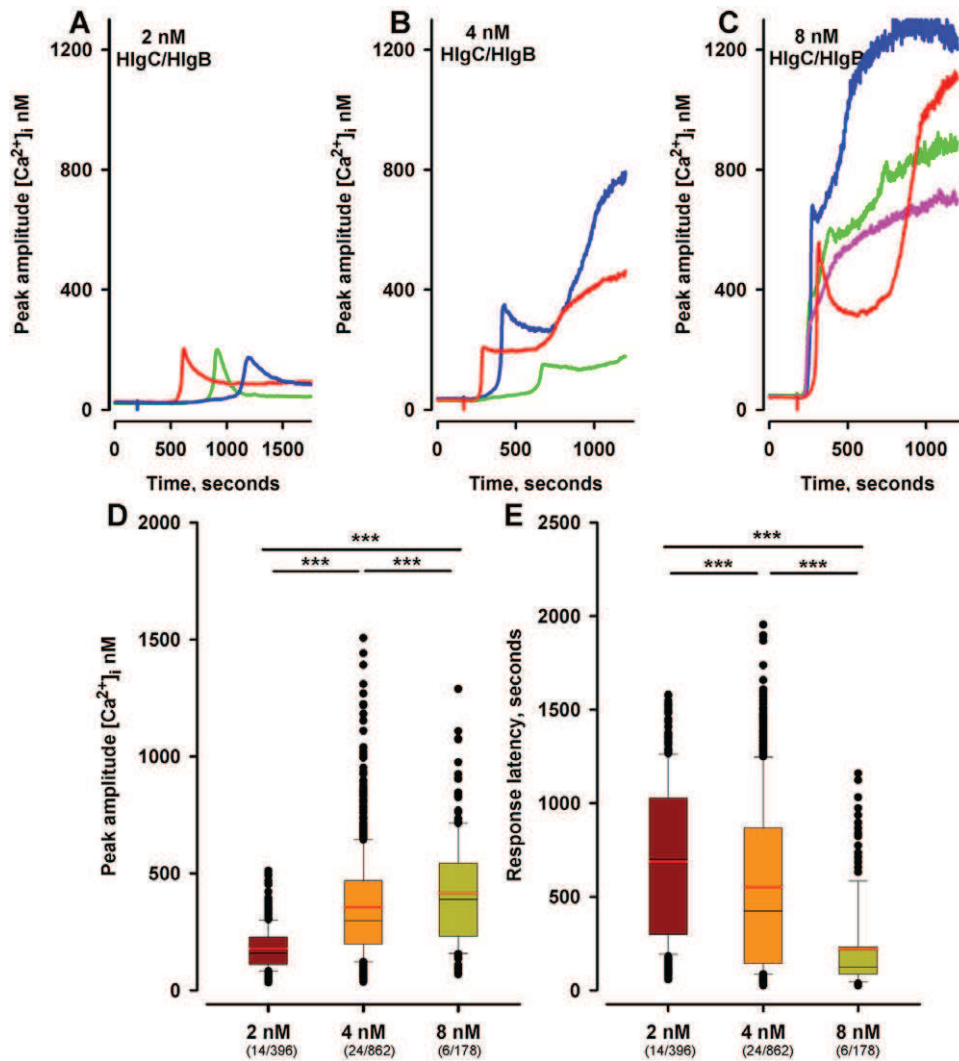


Fig. 3. The mean of the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ peak amplitude and the response latency to leukotoxin HlgC/HlgB are concentration dependent. A–C. Representative recordings of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ changes in cerebellar neurones challenged with three different concentrations of leukotoxin HlgC/HlgB (A: 2 nM, B: 4 nM, C: 8 nM). The dot around 200 seconds in (A), (B) and (C) indicates the addition point of the toxin. These examples suggest a toxin concentration-dependent effect that was further established by pooling the values from 44 independent experiments. Boxes are the median and percentiles and include the mean value (red line). All other traces represent individual sample recordings. D and E. (D) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ peak amplitude, (E) latency. The mean values are significantly different as determined by a Kruskal–Wallis analysis of variance and Dunn's Pairwise Multiple Comparison Procedures (*** $P < 0.005$).

$P < 0.05$). Altogether, these results rule out both VOCC and glutamate receptors as direct passageways for extracellular Ca^{2+} influx induced by leukotoxin. However, given the impact of the blockade of these channels on the

kinetics of the leukotoxin effect, a role for resting $[\text{Ca}^{2+}]_i$ or membrane potential cannot be excluded.

To ascertain the contribution of extracellular Ca^{2+} , neurones were equilibrated in buffers of various extracellular

Table 1. Peak amplitude and latency values are dependent on toxin concentration.

HlgC/HlgB	Mean $[\text{Ca}^{2+}]_i$ peak $\pm$ SEM	Latency, seconds $\pm$ SEM	Secondary $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rise, % of cells
2 nM leukotoxin HlgC/HlgB (14 plates, 396 cells)	178 nM $\pm$ 4	687 s $\pm$ 21	
4 nM leukotoxin HlgC/HlgB (24 plates, 862 cells)	355 nM $\pm$ 8	551 s $\pm$ 15	54% cells
8 nM leukotoxin HlgC/HlgB (6 plates, 178 cells)	416 nM $\pm$ 17	221 s $\pm$ 18	98% cells

Mean values of the peak amplitudes and latencies of the experiment shown in Fig. 3D and E. Dunn's Pairwise Multiple Comparison shows that the differences among all mean values are statistically significant.

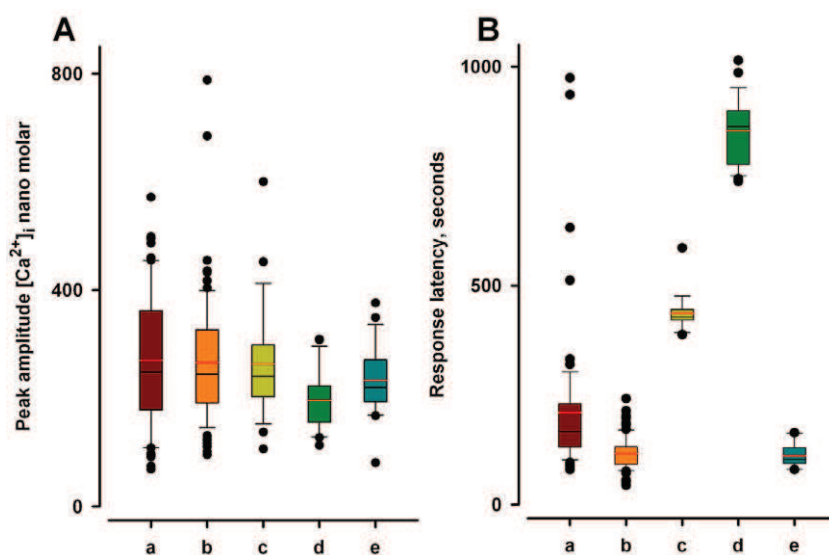


Fig. 4. The rise in free $[Ca^{2+}]_i$ evoked by leukotoxins in cerebellar neurones is independent of voltage-operated Ca^{2+} channels or glutamate receptor opening. (A) Peak amplitude and (B) latency of recordings carried out in a: control (56 cells) or in the presence of HlgC/HlgB (4 nM) and the following blockers/antagonists: b: (5 μ M nifedipine + 0.1 μ M ω -GVI-A + 0.1 μ M ω -Aga-TK; 88 cells), c: (0.3 μ M TTX; 24 cells), d: (5 μ M nifedipine + 0.1 μ M ω -GVI-A + 0.3 μ M TTX + 10 μ M CNQX + 10 μ M APV; 26 cells), e: (5 μ M nifedipine + 0.1 μ M ω -GVI-A + 0.1 μ M ω -Aga-TK + 0.3 μ M TTX + 10 μ M CNQX + 10 μ M APV; 21 cells). None of the differences in mean values for peak amplitude were statistically significant when examined by the Kruskal–Wallis analysis of variance. All the differences in mean latency values were statistically significant ($P < 0.001$) with respect to the control value (box a); pairwise multiple comparison showed a non-significant difference among values for b and e.

Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_e$) prior to incubation with the leukotoxin HlgC/HlgB. As shown in Fig. 5A, the mean $[Ca^{2+}]_i$ peak was reduced by 80% in 30 μ M $[Ca^{2+}]_e$ relative to controls (43 ± 2 nM versus 227 ± 7 nM; $n = 50$, $P < 0.001$), with no significant change observed for the latency of the effect. Leukotoxin-induced $[Ca^{2+}]_i$ changes could still be observed in neurones incubated in 3 μ M $[Ca^{2+}]_e$ but not in cells bathing in Ca^{2+} -free buffer (0 mM Ca^{2+} , 5 mM EGTA), where resting $[Ca^{2+}]_i$ remained constant.

The contribution of Ca^{2+} stored in internal compartments was assessed by incubating the neurones in the presence of 1 μ M thapsigargin (endoplasmic reticular stores) or 0.2 μ M bafilomycin A (acidic stores) (Fig. 5B) prior to toxin application. In the presence of thapsigargin, 56% of the cells (mean of seven independent experi-

ments) responded to the presence of leukotoxin HlgC/HlgB (4 nM) by displaying a transient peak of low amplitude (Fig. 5B: 160 ± 8 nM versus 362 ± 37 nM; $n > 100$, $P < 0.001$) whereas the latency of the response was prolonged (1447 ± 44 s versus 413 ± 6 s; $n > 100$, $P < 0.001$). Inhibition of vesicular H-ATPase by 0.2 μ M bafilomycin A abolished nearly all leukotoxin-induced $[Ca^{2+}]_i$ movements; approximately half of the recorded cells showed delayed low-amplitude transient increases in $[Ca^{2+}]_i$ that barely reached twice the amplitude of resting $[Ca^{2+}]_i$. To confirm that Ca^{2+} release from acidic organelles indeed contributed to the leukotoxin effect, osmotic lysosomal degradation was induced with Glycyl-L-phenylalanine 2-naphthylamide (GPN) (Churchill *et al.*, 2002). Application of GPN (200 mM, 10 min) essentially blunted the leukotoxin effect; only 11% of neurones

Table 2. Mean values and statistical significance of recordings with blunted voltage-operated Ca^{2+} channels (VOCC) and voltage-gated Na^+ channels (VGNC).

	Mean $[Ca^{2+}]_i$ peak $\pm$ SEM	Latency s $\pm$ SEM	Pairwise comparison of mean latencies (Holm–Sidak method)
8 nM HlgC/HlgB			
a: control (65 cells)	270 $\pm$ 15 nM	210 $\pm$ 20 s	a versus b: $P < 0.001$; a versus c: $P < 0.001$; a versus d: $P < 0.001$; a versus e: $P < 0.001$
b: blockade of L-, N- and P/Q-Type VOCC by 5 μ M nifedipine + 0.1 μ M ω -GVI-A + 0.1 μ M ω -Aga-TK (88 cells)	265 $\pm$ 12 nM	116 $\pm$ 4 s	b versus c: $P < 0.001$; b versus d: $P < 0.001$; b versus e: $P = 0.839$
c: blockade of VGNC by 0.3 μ M TTX (24 cells)	263 $\pm$ 22 nM	436 $\pm$ 8 s	c versus d: $P < 0.001$; c versus e: $P < 0.001$
d: blockade of L- and N-Type VOCC, VGNC and Glu-R by 5 μ M nifedipine + 0.1 μ M ω -GVI-A + 0.3 μ M TTX + 10 μ M CNQX + 10 μ M D-AP5 (26 cells)	196 $\pm$ 10 nM	853 $\pm$ 14 s	d versus e: $P < 0.001$
e: blockade of L-, N- and P/Q-Type, VGNC and Glu-R: 5 μ M nifedipine + 0.1 μ M ω -GVI-A + 0.1 μ M ω -Aga-TK + 0.3 μ M TTX + 10 μ M CNQX + 10 μ M D-AP5; 21 cells	232 $\pm$ 14 nM	111 $\pm$ 6 s	

Mean values and statistical significance of peak amplitudes and latencies of the experiment shown in Fig. 4. The pairwise comparison between the means of the peak amplitude did not reveal significant statistical differences, whereas mean latencies were significantly different, but for experiments b and e only.

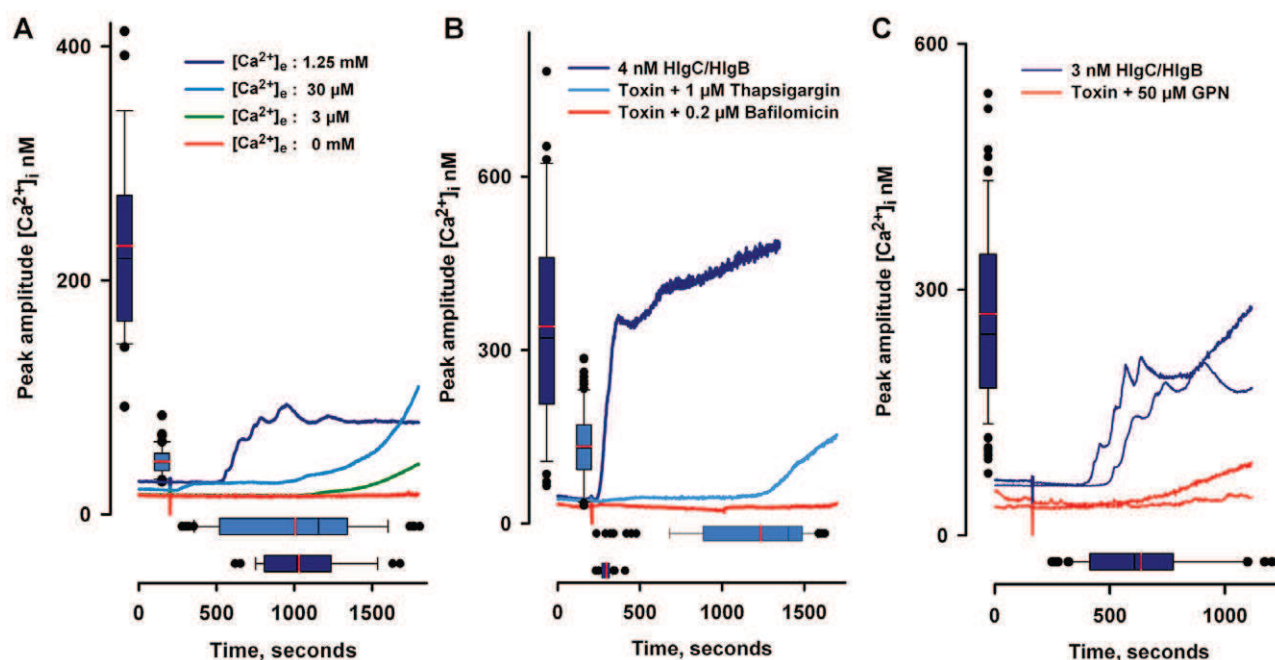


Fig. 5. Both extracellular and intracellular Ca^{2+} stores contribute to leukotoxin-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ changes in cerebellar neurones.

A. Averaged traces of four recordings obtained at different extracellular Ca^{2+} concentrations ($[\text{Ca}^{2+}]_e$) showing that, in a Ca^{2+} -free medium, neurones (35 cells) do not react to the presence of the leukotoxin. In low $[\text{Ca}^{2+}]_e$ (3 μM), an increase in free $[\text{Ca}^{2+}]_i$ can be observed (mean of 41 recorded neurones). Control recordings with 1.25 mM Ca^{2+} (34 cells) are shown as well as recordings with 30 μM Ca^{2+} (47 cells). The boxes show the distribution values for control and 30 μM Ca^{2+} recordings.

B. Average traces of cells recorded upon interruption of reticular Ca^{2+} refilling by blockade of the SERCA pump (1 μM thapsigargin; two experiments, 66 cells) or upon interruption of acidic compartment Ca^{2+} refilling through the blockade of H-ATPase (0.2 μM bafilomycin; two experiments, 80 cells). The boxes show the distribution values for control and thapsigargin recordings.

C. Lysosomal destruction by 0.2 μM Glycyl-L-phenylalanine 2-naphthylamide (GPN) prevented leukotoxin-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ changes. Two different experiments are shown where the mean of control traces are compared with the mean traces of neurones recorded after addition of GPN. The boxes correspond to the values of control recordings (87 cells). In all panels, the addition point of the toxin is indicated by a vertical stroke.

produced low-amplitude transient variations in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ or displayed a late and moderate increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ after addition of the leukotoxin (three cultures, 87 cells, Fig. 5C). These observations suggest that Ca^{2+} released from acidic compartments may couple with reticular stores through a Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release (CICR) mechanism. Moreover, the contribution of Ca^{2+} from both the external medium and intracellular stores points towards the Store-Operated Ca^{2+} Entry (SOCE) complex as a final outcome of Ca^{2+} mobilization initiated by the leukotoxin.

Leukotoxin HlgC/HlgB alters the store-operated Ca^{2+} entry complex

Neuronal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ variations were monitored in the presence of drugs or ions known to interfere with SOCE (Bird *et al.*, 2008; Varnai *et al.*, 2009). A highly effective neutralization was observed when 100 μM Gd^{3+} was added a few minutes prior to the leukotoxin (Fig. 6A). At lower concentration, Gd^{3+} (50 μM) reduced the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ amplitude by 44% (291 ± 20 nM versus 519 ± 20 nM; $n > 50$, $P < 0.001$) and slightly affected the time of the response,

but totally abolished the second Ca^{2+} rise present in 96% of control cells challenged with 4 nM leukotoxin (not shown). The SOCE antagonist econazole (5 μM), totally prevented the toxin-induced rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Fig. 6A). In addition, incubation of cells for 15 min in 100 μM 2-aminoethoxydiphenylborane (2-APB), a cell-permeable modulator of inositol (1,4,5)-P₃-induced Ca^{2+} release targeting SOCE, decreased the peak amplitude by 40% (203 ± 18 nM versus 335 ± 17 nM; $n > 20$, $P < 0.001$) and increased the latency of the response by more than 10-fold (1149 ± 47 s versus 100 ± 1 s; $n > 20$, $P < 0.001$) (Fig. 6B). Cells maintained for 15 min in the presence of 90 μM thapsigargin, which also blocks ryanodine and Ins(1,4,5)-P₃ receptors, showed a 57% reduction in amplitude (144 ± 4 nM versus 335 ± 17 nM; $n > 40$, $P < 0.001$) and a sixfold delay in latency (608 ± 25 s versus 100 ± 1 s; $n > 40$, $P < 0.001$) (Fig. 6B). The pyrazole derivative YM-58483 has been reported as an inhibitor of the Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} (CRAC) channels (Ishikawa *et al.*, 2003). Pre-incubation of neurones in 10 μM YM-58483 significantly modified the leukotoxin effect by reducing the amplitude of the Ca^{2+} peak by 70%

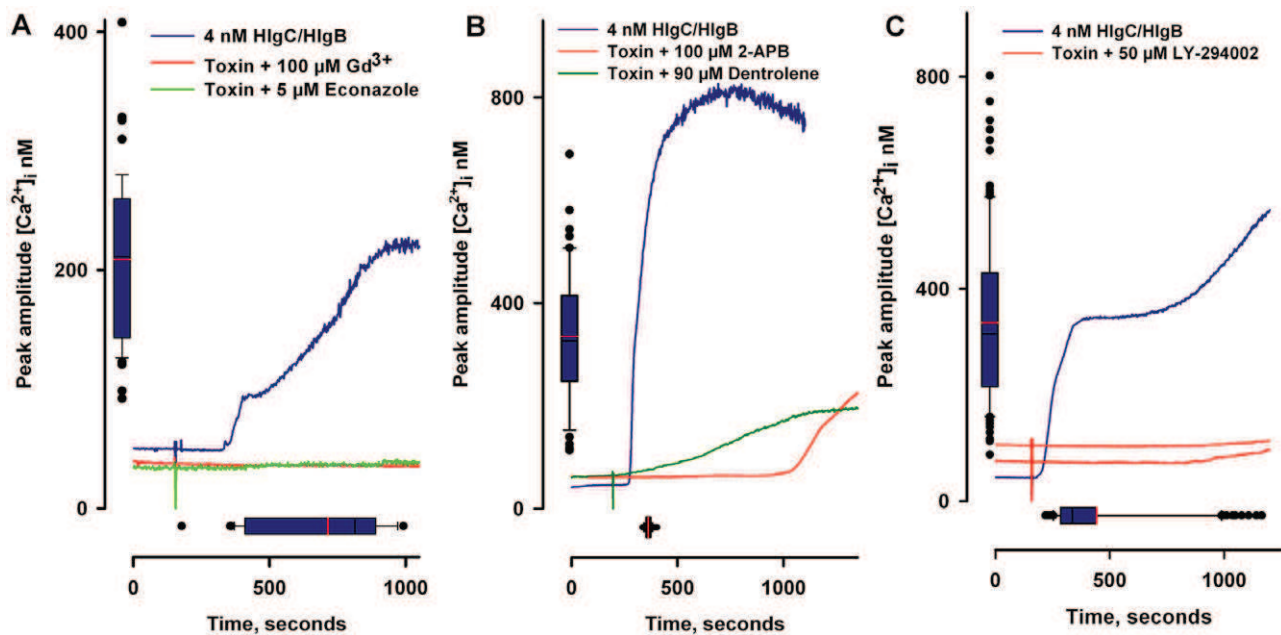


Fig. 6. Disruption of the Store-Operated Ca^{2+} entry complex strongly inhibits the effect of leukotoxin HlgC/HlgB in cerebellar neurones. **A.** Mean traces of cells recorded in the presence of 5 μM econazole (24 cells) and 100 μM gadolinium (38 cells). The control experiment corresponds to the mean of 35 cells. **B.** Mean traces of cells recorded in the presence of drugs that target SOCE by also interfering with $\text{Ins}(1,4,5)\text{-P}_3$ Ca^{2+} mobilization (2-APB, 100 μM) or ryanodine receptors (dantrolene, 90 μM). Pre-treatment with these agents significantly reduced the effect of γ -leukotoxin HlgC/HlgB. Control experiment, 38 cells; 2-APB, 13 cells; dantrolene, 49 cells. This experiment was reproduced three times. **C.** Incubation of neurones in the presence of LY-294002 (50 μM), which inactivates phosphatidylinositol 3 and 4 kinase and modifies membrane PIP2 content, thus strongly affecting the cellular response to leukotoxin action. Control boxes present the median of 110 recorded cells and LY-294002 (red lines) recordings are the mean of 52 and 63 treated cells. The boxes in the three panels correspond to the values of control recordings. Addition of the toxins is indicated by a vertical stroke in all panels.

(142 ± 10 nM versus 458 ± 31 nM; $n > 26$, $P < 0.001$), while the latency of the effect remained unaltered. CRAC channels are formed in the plasma membrane by the association of Orai1 monomers, mediated by the reticular protein STIM1 that senses the ER Ca^{2+} filling state (Collins and Meyer, 2011 and references therein). The interaction between STIM1 and Orai1 is regulated by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) (Korzeniewski *et al.*, 2009; Walsh *et al.*, 2009). In order to verify whether the disruption of the STIM1–Orai1 interaction alters the leukotoxin effect, experiments were conducted in which phosphatidylinositol kinases (PI3K and PI4K) were inhibited by LY-294002 (50 μM , 15 min), thereby potentially modifying the PIP2 content, while recording leukotoxin-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ changes. Under these conditions, only 6% of the 176 recorded cells (three independent experiments) responded to the leukotoxin through a low amplitude rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ whereas in controls, 90% of the 155 recorded cells mobilized $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Fig. 6C).

Following the Ca^{2+} depletion, the translocation of STIM1 molecules to endoplasmic reticulum–plasma membrane junctions activates the Orai1-formed CRAC channels; simultaneously the formation of STIM1 puncta can be observed using fluorescence labelling methods (Walsh

et al., 2009). The consequences of leukotoxin HlgC/HlgB activity on the redistribution of interacting partners of the SOCE complex were investigated through immunolabelling of neurones with antibodies raised against STIM1 and Orai1. Figure 7 illustrates the differences in labelling observed for STIM1 in control cells relative to cells incubated for 10 min with 4 nM leukotoxin. In treated cells, labelling became partially punctuated suggesting that a redistribution of STIM1 is also an effect of leukotoxin HlgC/HlgB. Taken together, the above results from pharmacological manipulation as well as immunolabelling allow to decompose $[\text{Ca}^{2+}]_i$ movements induced by the leukotoxin as a succession of events beginning by the release of acidic Ca^{2+} stores and resulting in the stimulation of the SOCE complex.

The HlgC/HlgB-induced rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ is initially dependent on ADP-ribosyl cyclase CD38 signalling

We next focused on the early signalling which could be activated by the leukotoxin in the plasma membrane and induce the release of Ca^{2+} from acidic stores. Lysosomes release Ca^{2+} through two-pore channels that are opened by nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate

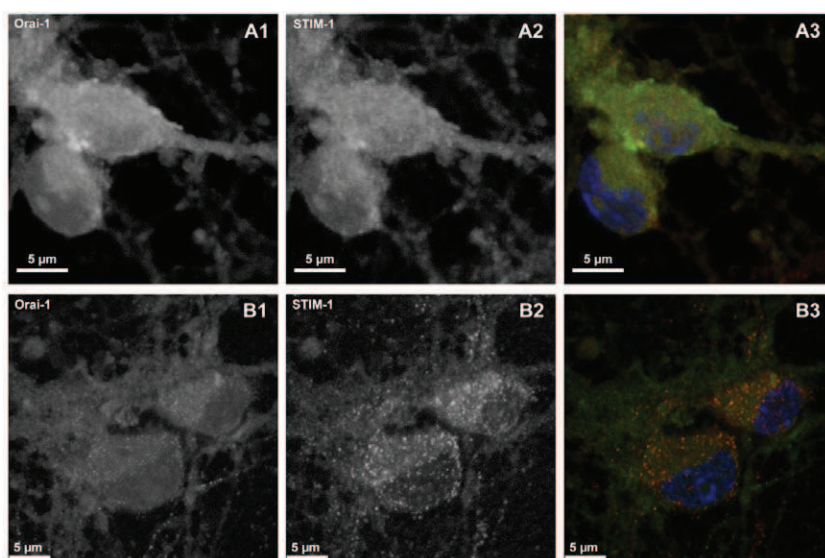


Fig. 7. Distribution of STIM1 and Orai1 molecules of the SOCE complex before and after incubation of neuronal cells with 4 nM HlgC/HlgB-Alexa 488. Confocal acquisition images of cerebellar neurones labelled with the anti-Orai1 goat polyclonal antibody D15 (A1, B1) and the anti-Stim1 mouse monoclonal antibody A-8 (A2, B2). Panels A3 and B3 correspond to merged images with Hoechst 33258-labelled nuclei. Cells in row A were fixed prior to incubation for 10 min in the presence of 4 nM leukotoxin HlgC/HlgB; cells in row B were fixed after incubation with the toxin.

(NAADP), an intracellular messenger produced by the ADP-ribosyl cyclase CD38 (Zhu *et al.*, 2009; Cosker *et al.*, 2010). Although efficient antagonists of CD38 activity are not currently available, it is known that β -NAD rapidly induces the internalization of the enzyme and reduces its activity (Zocchi *et al.*, 1999). Hence, we assessed the potential effect of preventing granular neurones from being activated by the leukotoxin by incubating the latter for 10 min in the presence of 5 mM β -NAD prior to the addition of the toxin. In four independent experiments, only 26% of recorded cells showed a transient rise in $[Ca^{2+}]_i$, along with a significant reduction in mean peak amplitude (191 ± 14 nM versus 444 ± 18 nM; $n = 23$, $P < 0.001$) and a delayed latency (1147 ± 31 s versus 537 ± 35 s; $n = 23$, $P < 0.001$) (Fig. 8A). Similar effects were observed using 2.5 mM NADP or 1 μ M NAADP added 10 min prior to the toxin (Fig. 8A). NAADP likely induces a desensitization of the lysosomal two-pore channel (Zhu *et al.*, 2009) that may prevent leukotoxin signalling. Challenge of the granular neurones by 5 mM β -NAD or 2.5 mM NADP did not produce $[Ca^{2+}]_i$ peaks, but induced a slight increase in $[Ca^{2+}]_i$ level.

The enzymatic properties of CD38 can be altered by antibodies directed against its C-terminal portion (Ferrero *et al.*, 2004; Hara-Yokoyama *et al.*, 2008). When cells were incubated for 20 min in the presence of an anti-CD38 C-terminal goat polyclonal antibody (M-19 antibody, Santa Cruz Biotechnology), the response to the leukotoxin was significantly delayed (842 ± 25 s versus 378 ± 27 s; $n = 94$, $P < 0.001$) along with a reduction in the peak of $[Ca^{2+}]_i$ (259 ± 16 nM versus 430 ± 18 nM; $n = 94$, $P < 0.001$) (Fig. 8B).

Granular neurones incubated in Alexa 488-tagged HlgC/HlgB leukotoxin (4 nM) were observed by confocal microscopy after fixation and paired labelling the anti-

CD38 antibody or Alexa 594-conjugated Cholera toxin-B subunit (Fig. 8C and D). The anti-CD38 labelling was observed at the edge of the cells, showing a dotted aspect that partially appeared superimposed with leukotoxin labelling. However, the fluorescence of Alexa 488-HlgC/HlgB leukotoxin appears located preferentially in the cytosol. Labelling with the Alexa 594-Cholera toxin, which binds membrane gangliosides, surrounded the cells and was clearly segregated from the Alexa 488-leukotoxin fluorescence. These results suggest that the leukotoxin may be partially trapped in intracellular organelles together with CD38.

Taken together, the results presented here can be better understood if confronted to the mechanism proposed for the endolysosomal Ca^{2+} signalling in a variety of cells (Morgan *et al.*, 2011). It is suggested that NAADP initiates a multistep process by releasing Ca^{2+} from acidic stores, which triggers the further release of reticular Ca^{2+} and finally causes the activation of CRAC channels. The HlgC/HlgB leukotoxin could initiate the same signalling pathway, as we suggest through the schematic representation of Fig. 9.

Discussion

S. aureus leukotoxins are a critical threat to the nervous system

Staphylococcus aureus has been shown to efficiently invade human brain microvascular endothelial cells, which results in tissue damage, brain abscesses and meningeal inflammation (Pedersen *et al.*, 2006; Sheen *et al.*, 2010). We carried out this work in cerebellar granular neurones to assess whether leukotoxins may cause damage to nervous tissue. Rat granular neurones have

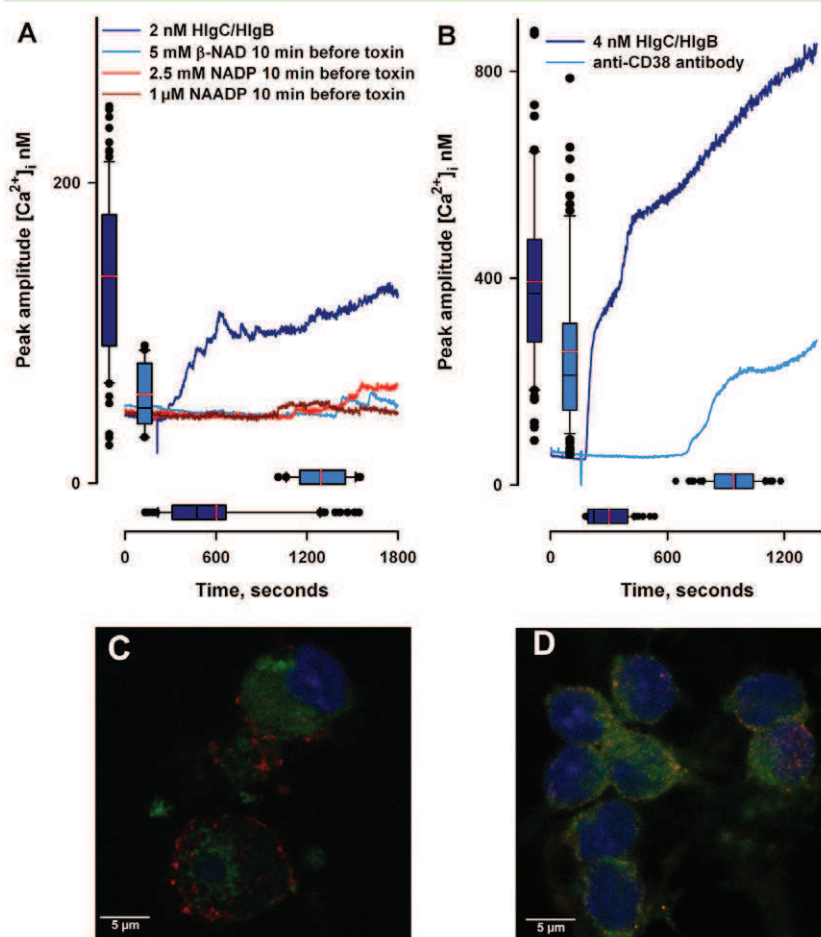


Fig. 8. Leukotoxin-induced $[Ca^{2+}]_i$ movements in cerebellar neurones require ADP-ribosyl cyclase CD38 activity.

A. CD38 internalization by addition of 5 mM β -NAD prior to adding leukotoxin HlgC/HlgB significantly reduced its effect. The results combine data from three independent experiments. Control line and boxes (101 cells); recordings of β -NAD pre-treated cells are the mean of the 25% responding cells. Recordings of cells pre-treated with 2.5 mM or 1 μ M NAADP are also shown. The boxes represent control and 5 mM β -NAD recordings.

B. Effect of incubation of granular neurones in the presence of the anti-CD38 goat polyclonal antibody prior to addition of 4 nM leukotoxin. The decrease in mean peak amplitude and the reduction in response latency were statistically significant ($P < 0.001$). Control, 190 cells; CD38 antibody, 94 cells.

C. Granular neurones labelled with HlgC/HlgB-Alexa 488 and Cholera toxin-B-subunit-Alexa 594 conjugated.

D. Neurones labelled with HlgC/HlgB-Alexa 488 and anti-CD38 goat polyclonal antibody M-19 revealed by a donkey anti-goat Alexa 594-conjugated secondary antibody.

been used for cellular studies on bacterial toxins while glutamate release assays have aided in investigating their neurotoxicity (Foran *et al.*, 2003; Lonchamp *et al.*, 2010). The use of these cells allowed us to establish that different *S. aureus* leukotoxins can represent a serious threat to neurones by inducing a rise in free intracellular Ca^{2+} and, as a consequence, the release of glutamate. The increase in free $[Ca^{2+}]_i$ was also measured in DRG neurones, highlighting the fact that the activity of leukotoxins is not restricted to a single class of neurones. The γ -haemolysin HlgC–HlgB was found to be the most potent, both in cerebellar and in DRG neurones, inducing important cellular effects while preserving the integrity of the plasma membrane. The pharmacological manipulations, which can prevent free $[Ca^{2+}]_i$ movements through the disruption of internal stores as well as acting on the plasma membrane, together with the lack of permeability to ethidium bromide, parallel to the $[Ca^{2+}]_i$ increase, strongly supports the notion that the formation of a pore is not the first cellular effect induced by leukotoxins in neurones. Cellular differences between neurones and neutrophils may explain an expanded delay between

intracellular Ca^{2+} rise and pore formation as it has been observed in neutrophils through the introduction of mutations in PVL (Baba Moussa *et al.*, 1999). Moreover, PVL can confer an enhanced bactericidal capacity to human neutrophils at very low concentrations, independently of the formation of a pore (Graves *et al.*, 2012). The activity of the HlgC/HlgB leukotoxin is concentration dependent, which may suggest that minute amounts of toxin can be sensed by neurones and induce intracellular signalling. A neuronal early response to leukotoxin could have the positive outcome of initiating cellular protection (Aroian and van der Goot, 2007), conceivably in association with noxious stimuli.

Neurones preferentially use VOCC and ionotropic neurotransmitter receptors as Ca^{2+} influx pathways, while for neutrophils the SOCE complex is the main Ca^{2+} signalling system. This difference could obscure the fact that both cells types are sensitive to the leukotoxin. Interestingly, the Ca^{2+} activated movement shown herein demonstrates a reasonable link between internal Ca^{2+} stores and membrane signalling proteins, through pathways which are otherwise observed separately in neurones. The

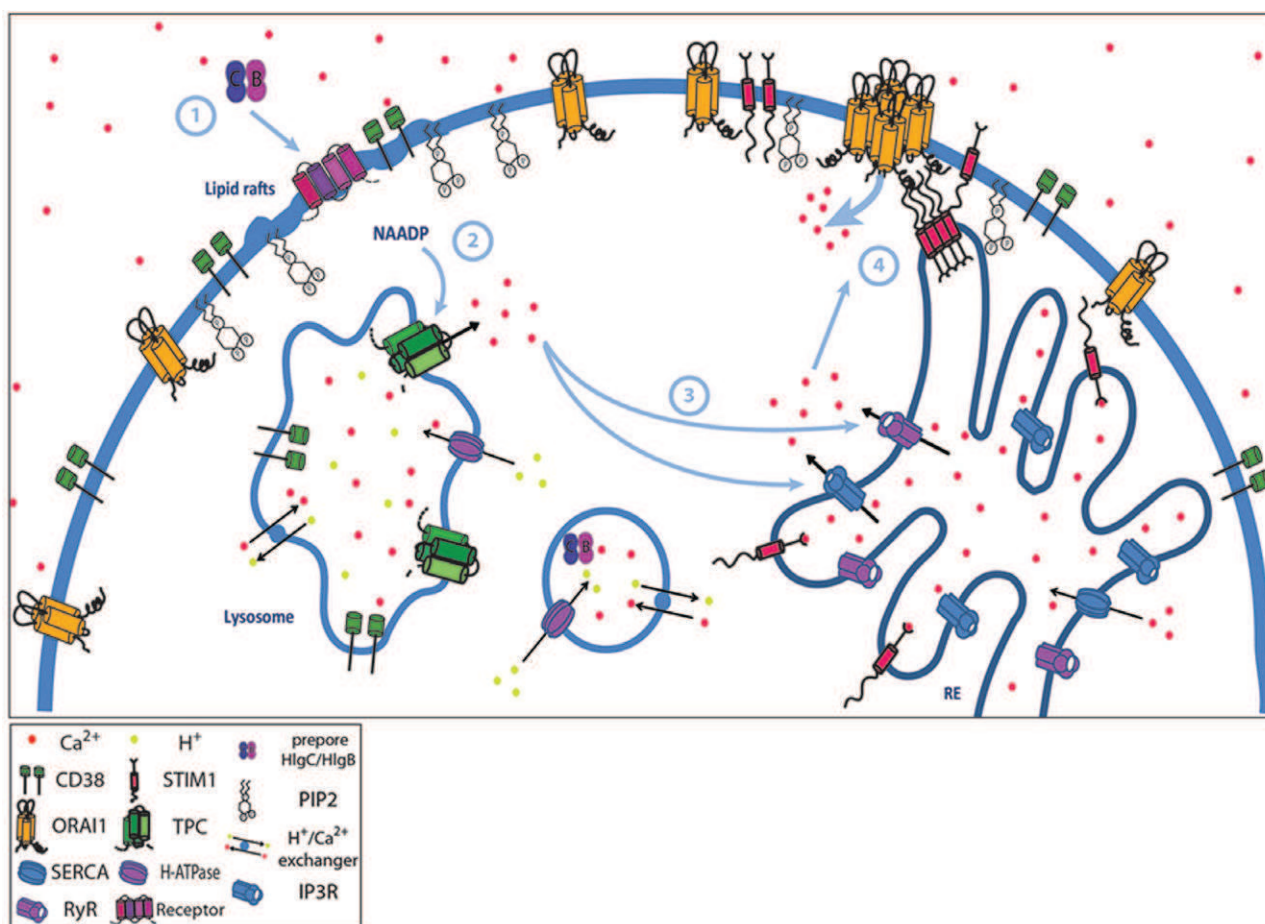


Fig. 9. Schematic representation of the multistep signalling mechanism triggered by γ -leukotoxin HlgC/HlgB on neuronal cells. Upon binding (1) to a receptor complex, likely associated with lipid rafts, the bi-component leukotoxin triggers the formation of NAADP by ADP-ribosyl cyclase CD38. NAADP, acting on the two-pore Ca^{2+} channels of lysosomes (2) elicits the release of Ca^{2+} into the cytosol. Free $[\text{Ca}^{2+}]$ can further be increased (3) through a Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release mechanism from reticular stores. Finally, reticular Ca^{2+} depletion activates the Store-Operated Ca^{2+} Entry complex formed by STIM1 and Orai1 (4).

ADP-ribosyl cyclase CD38 has been detected in rat brain (Yamada *et al.*, 1997; Ceni *et al.*, 2003), where the signalling molecule NAADP has been proposed as a stimulator of neurite outgrowth (Brailoiu *et al.*, 2005). The release of Ca^{2+} from either lysosomes or Ryanodine-sensitive pre-synaptic stores has been shown to enhance the efficiency of neurotransmitter release (Collin *et al.*, 2005; McGuinness *et al.*, 2007). In cortical and hippocampal neurones, differential regulatory roles of intracellular Ca^{2+} levels have been observed for STIM1 and STIM2 (Gruszczynska-Biegala *et al.*, 2011), and the depletion of Orai1 impairs the rhythmic firing of motoneurones in drosophila (Venkiteswaran and Hasan, 2009). A further question will be to ascertain whether endogenous activator(s) would be able to stimulate this 'leukotoxin signalling multistep process' in the nervous system. The future identification of the molecular complex that binds the leukotoxins will help to find the answer, as it will contribute to assess the consequences of the Ca^{2+} imbalance caused

by leukotoxins in neurones. It is of interest to note that in mild *S. aureus* pathologies, such as chronic rhinosinusitis, associated headaches and facial pain/pressure negatively affect quality of life and impair daily activities (Singhal *et al.*, 2011).

A multistep Ca^{2+} signalling mechanism that could be shared by other toxins

An increase in free intracellular Ca^{2+} has already been described as an early response for the activity of different pore forming toxins. Intracellular Ca^{2+} movements are regarded as a prerequisite for the pre-pore to pore transition of membrane bound bi-component *S. aureus* leukotoxins (Woodin and Wieneke, 1963; Staali *et al.*, 1998). The α -haemolysin from *Escherichia coli* has been shown to induce $[\text{Ca}^{2+}]$ oscillations in renal epithelial cells that are sensitive to L-type Ca^{2+} channel blockers (Uhlen *et al.*,

2000), although the contribution of the L-type channel was subsequently challenged (Koschinski *et al.*, 2006). In the present study, the pharmacological neutralization of voltage-operated Ca^{2+} channels, including L-type channels, as well as glutamate receptors revealed that these channels are not a primary pathway for the *S. aureus* leukotoxin-induced rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. However, the latency to reach the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ peak was affected by combinations of drugs known to be active on voltage-operated channels, which may suggest an influence of either the resting $[\text{Ca}^{2+}]_i$, or the membrane potential, on the kinetics of leukotoxin activity. The vacuolating cytotoxin A (VacA) from *Helicobacter pylori* induces the oscillation of free cytosolic Ca^{2+} through the mobilization of internal stores (De Bernard *et al.*, 2005). The leukotoxin HlgC–HlgB shares the feature of mobilizing internal stores. Its activity was significantly inhibited when reticular Ca^{2+} stores were depleted. Even though the total reticular Ca^{2+} load remains low, and free cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]_i$ slightly changes upon blocking the SERCA pump with thapsigargin (Pinilla *et al.*, 2005), the reticulum is an important link for the response process activated by the toxin. A drastic inhibition was observed when H-ATPase, which contributes to the refilling of acidic Ca^{2+} stores, was blocked by Bafilomycin A, or upon disruption of lysosomes by GPN. Therefore, we propose that an initial release of Ca^{2+} from the acidic stores may be followed by a Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release from the endoplasmic reticulum. The Ca^{2+} depletion of the endoplasmic reticulum, sensed by the stromal interacting molecule STIM1, subsequently leads to the assembly of Orai1 molecules to form the store-operated CRAC channel (Varnai *et al.*, 2009). Noteworthy, listeriolysin O, produced by *Listeria monocytogenes*, mobilizes Ca^{2+} from the extracellular milieu as well as from various types of intracellular stores (Gekara *et al.*, 2007) whereas Streptolysin O, from *Streptococcus pyogenes*, induces long-lasting intracellular Ca^{2+} oscillations through the activation of the SOCE complex, which are modulated by the level of expression of STIM1 and Orai1 (Usmani *et al.*, 2012). Another leukotoxin, secreted by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, induces free $[\text{Ca}^{2+}]_i$ movements if the molecules needed for its activity are previously clustered into lipid rafts (Fong *et al.*, 2006). In the present study, the inhibition of *S. aureus* leukotoxin activity through LY294002 inactivation of PI3K and PI4K may suggest a similar prerequisite for leukotoxin HlgB/HlgC. However, the relationship between membrane PIP2 content and the regulation of SOCE (Korzeniowski *et al.*, 2009; Walsh *et al.*, 2009), could also be an alternative explanation for such inhibition.

The contribution of intracellular acidic stores as an early step of Ca^{2+} mobilization induced by a bacterial toxin is a novel finding. It is worth mentioning that signalling molecules linking plasma membrane receptors to the release

of Ca^{2+} from internal stores are now starting to be identified (Cosker *et al.*, 2010). The more potent of these molecules is NAADP, which is synthesized by the ADP-ribosyl cyclase CD38 (Malavasi *et al.*, 2008) and activates the two-pore Ca^{2+} channels from lysosomes (Zhu *et al.*, 2009). Our various approaches in shutting down CD38 activity by mimicking published protocols (Zocchi *et al.*, 1999; Ferrero *et al.*, 2004; Hara-Yokoyama *et al.*, 2008), successfully reduced or suppressed the leukotoxin effect, strengthening the probable relationship between leukotoxin HlgC/HlgB binding and Ca^{2+} release from acidic stores. Summarizing the pharmacological manipulations that alter the granular neurones response to HlgC/HlgB leukotoxin, Fig. 9A illustrates a multistep process evoked by the endolysosomal Ca^{2+} signalling (Morgan *et al.*, 2011). The cell membrane molecule (or molecules) that bind the toxin needs to be identified; here is represented by a 'schematic receptor'. The step 'binding' (1) must be connected to the activation of the CD38 ADP-ribosyl cyclase, since the toxin activity is significantly inhibited by β -NAD acting on CD38 or the action of an anti-CD38-specific antibody. Step 2 comprises the NAADP mediated activation of Ca^{2+} release from the endolysosomal compartment, as suggested by the total inhibition caused by Bafilomycin A or GPN. The local release of Ca^{2+} triggers further Ca^{2+} release from the thapsigargin-sensitive reticular store (step 3). The final step (4) involves the activation of CRAC channels induced by the Ca^{2+} reticular stores depletion.

It would be of interest to determine whether other bacterial toxins mobilizing intracellular Ca^{2+} initiate a related mechanism, regardless of other effects they may induce. Similarly to *S. aureus* bi-component leukotoxins that evoke intracellular Ca^{2+} rise in neurones, even though they are known to discriminate between target cells (Menestrina *et al.*, 2003). Irrespective of their similarities, the γ -haemolysins HlgA–HlgB and HlgC–HlgB share their F-component, the S-components HlgC and LukS-PV can compete for a same binding site (Prévost *et al.*, 1995; Meyer *et al.*, 2009), *S. aureus* leukotoxins share an initial intracellular Ca^{2+} mobilization which may induce a variable final outcome depending on the cell type or on the specific toxin. A question to focus on will be how bi-component bacterial toxins initiate cell signalling. It is tempting to speculate about some multi-molecular system, which should integrate the characterized cellular responses that are independent of the pore forming ability, such as cytotoxicity (Genestier *et al.*, 2005; Zivkovic *et al.*, 2011), enhanced bactericidal capacity (Graves *et al.*, 2012) and Ca^{2+} mobilization from acidic stores. A comparative study of the responses of cultured neurones, alveolar macrophage and neutrophils to the *S. aureus* bi-component leukotoxins would be of valuable interest.

Experimental procedures

Ethic statement

All experiments have been conducted using protocols designed according to the European and French guidelines on animal experimentation and approved by the direction of the Bas-Rhin veterinary office, Strasbourg, France; authorization number 67-312 to E.J.

Animals

Sprague-Dawley rats were obtained from the Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives (INCI) animal facilities (French government agreement No. B-67-482-25). All procedures regarding housing, feeding and sacrifice of the animals were in accordance with approved European guidelines (No. 86/609/CEE) on animal care and experimentation.

Toxins

The *S. aureus* α -toxin, γ -haemolysins HlgC/HlgB and HlgA/HlgB and the Pantone – Valentine leukocidin LukS-PV/LukF-PV were purified as described previously (Werner *et al.*, 2002). The fluorescent derivatives for HlgB were prepared as previously described (Finck-Barbançon *et al.*, 1991).

Drugs and chemicals

All standard chemicals, the glutamate receptor antagonists CNQX and APV, the calcium blockers and modulators nifedipine, dantrolene, 2-Aminoethoxydiphenyl borate D-AP5, Bafilomycin A1, Glycyl-L-phenylalanine 2-naphthylamide and the PI3Kinase antagonist LY-294002 were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). *N*-[4-[3,5-Bis(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]phenyl]-4-methyl-1,2,3-thiadiazole-5-carboxamide (YM-59483) was from Tocris Bioscience (Bristol, UK). The voltage-gated channel blockers Tetrodotoxin, ω -Conotoxin GVI-A, ω -Agatoxin TK as well as ryanodine and thapsigargin were from Alomone Labs (Israel). Fura2-AM was from TEF Labs (Austin, TX), while Pluronic-127 and BAPTA-AM were from Molecular Probes/Life Technologies (Saint Aubin, France). Stock solutions of the drugs were prepared in their appropriate solvent (ethanol, dimethyl sulfoxide or water) at 1000 $\times$ the final working concentration. The Ca^{2+} -free bath solution used in selected experiments was prepared by omitting CaCl_2 from the standard solution and adding 10 mM EGTA.

Cerebellar granular neurones

Cell culture media and reagents, enzymatic solutions and antibiotics were from Gibco/Life Technologies (Saint Aubin, France). Insulin, progesterone, putrescine and human apo-transferrin were from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). Cerebellar cortices from postnatal day 5 (P5) rats were incubated for 5 min at 37°C in trypsin 0.05%–EDTA 0.02% solution, followed by 20 min at 37°C in papain 10 U ml^{-1} and DNase (250 U ml^{-1}). Enzymes were inactivated by adding fetal calf serum (10%) and removed by three successive washes in culture media. The tissue was mechanically dissociated through polished Pasteur

pipettes of decreasing tip diameter. After removal of tissue debris, cells were centrifuged and the pellet resuspended in culture medium. Cells were seeded on either poly-L-lysine-coated (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$) 24-well plates (Corning) at a density of 3.5×10^5 cells per well for glutamate release studies, in 35 mm glass bottom Petri dishes for microfluorimetry, or on 11-mm-diameter glass coverslips for immunocytochemical studies. Cells were then incubated at 37°C in a 5% CO_2 -air humidified atmosphere. The culture medium consisted of B27-supplemented Neurobasal medium (Gibco/Life Technologies) and 25 mM KCl, 2 mM L-glutamine and penicillin/streptavidin antibiotics. Growth medium was further complemented with 1 μM insulin, 20 nM progesterone, 0.1 mM putrescine, 80 $\mu\text{g ml}^{-1}$ transferrin and 0.5 μM sodium selenite. Cultures were also supplemented with 5 μM cytosine β -D-arabinofuranoside 24 h after plating in order to prevent glial proliferation; culture media were renewed every 3 days. Experiments were performed after 8-day differentiation *in vitro* to allow neuronal stabilization of intracellular Ca^{2+} stores (Mhyre *et al.*, 2000).

Dorsal root ganglion neurones

Dorsal root ganglia from as many spinal levels as possible were collected from euthanized P5 rats. The cells were dissociated from the ganglia as described previously (Jover *et al.*, 2005). The cells were seeded on poly-L-lysine-coated bottom-glass Petri dishes at a density of 1×10^5 cells per dish. Culture media consisted of complete Neurobasal medium supplemented with 100 ng ml^{-1} Nerve Growth Factor (Alomone Labs, Israel). The culture medium was renewed 4 days after plating. Experiments were performed using neurones cultured for 4–7 days.

Glutamate release and quantification

Prior to toxin incubation or KCl stimulation, the medium was removed and the cell monolayer washed three times in Hanks balanced salt solution (HBSS) pre-warmed at 37°C. The appropriate toxin concentration was added for an incubation of 10 min. For KCl stimulation, cells were maintained in the depolarizing buffer (same as incubation buffer but with 60 mM KCl and 73 mM NaCl) for less than 10 s, before collecting the media for glutamate determination.

Glutamate cycling assay was based on the Amplex Red Glutamic Acid method (Chapman and Zhou, 1999). Typically, reactions were performed in 96-well plates (Falcon). To 50 μl of samples was added an equal volume of reagent mix containing 0.25 U ml^{-1} HRP, 0.08 U ml^{-1} glutamate oxydase, 0.5 U ml^{-1} glutamate pyruvate synthetase, 0.2 mM L-alanine and 100 μM 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (AnaSpec, Fremont, CA) in 0.1 mM Tris-HCl buffer pH 7.4. The cycling reaction was allowed to proceed at 37°C for 30 min and the increase in resorufin fluorescence was measured using a Mithras LB 940 fluorescence plate reader (Berthold Technologies, Thoiry, France) at 530 nm excitation and 590 nm emission.

Results are expressed as means $\pm$ SEM from at least four independent well measurements for each concentration of toxin. Glutamate determination was performed in triplicate. Statistical significance was determined by one-way analysis of variance followed by a Student's *t*-test using SigmaPlot for Windows Version 11.0. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

Glucose-6-phosphate dehydrogenase

Quantification of cell death was performed using the fluorescence-based micro-plate assay (Batchelor and Zhou, 2004) which measures glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) activity released into the media. The same supernatant collected for glutamate determination was also used for G6PDH activity. Reactions were conducted in a 100 µl final volume (96-well plates). Experimental samples were mixed 1:1 (v/v) with reagent mix containing 15 µM resazurin, 2 mM Glucose-6-Phosphate, 0.5 mM NADP and 0.5 U ml⁻¹ diaphorase in 100 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5. The reaction was carried out at 37°C for 30 min and the increase in fluorescence was measured as described for the glutamate assay.

Immunocytochemistry

The subcellular localization of leukotoxin in granular neurones was detecting using the HlgB subunit tagged with Alexa Fluor 488 C₅ maleimide (Life Technologies). Cells were incubated at room temperature for 1–10 min in the presence of 1 nM native or 5 nM tagged HlgC/HlgB. Neurones were then fixed in 4% (v/v) para-formaldehyde and 4% (w/v) sucrose in phosphate-buffered saline (PBS) for 15 min at room temperature and subsequently rinsed with PBS. Neurones were permeabilized and non-specific epitopes were blocked in PBS buffer containing 0.1% (v/v) Triton X-100, 1% (w/v) bovine serum albumin and 5% (v/v) normal goat serum (Chemicon-Millipore, Molsheim France) for 30 min prior to 2 h incubation at room temperature with antibodies diluted in the same buffer. The following primary antibodies were used: the anti-STIM1 (N-19) goat polyclonal antibody and A8 mouse monoclonal antibody; the anti-mouse CD38 (2Q1628) rat monoclonal antibody and M-19 goat polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology). The plasma membrane was labelled by the cholera toxin B subunit conjugated to Alexa Fluor 594 (Life Technologies). After three washes in PBS, secondary antibodies tagged with Alexa 488 or Alexa 546 (Molecular Probes/Life Technologies, 1:1000) were incubated in PBS for 2 h at room temperature. After the immunostaining process, cell nuclei were stained using Hoechst 32258 (Sigma) at a final concentration of 40 nM. After washing in PBS, coverslips were stored at 4°C until observation. A Leica SP5-II confocal microscope was used.

Microfluorimetry

Intracellular [Ca²⁺]_i recordings were performed on cells grown on glass coverslips and loaded with 5 µM Fura-2 AM – 0.04% Pluronic 127 for 30 min in the dark at 37°C, washed twice in HBSS and transferred to an inverted epifluorescence microscope (Axiovert, Zeiss, Germany) equipped with a UPlanFL 40/0.75 objective. The cells were alternatively illuminated at 350 nm and 380 nm and image pairs of the 520 nm light emission were recorded every 2 s for 30 min. Cells were bathed in HBSS buffer containing 10 mM Hepes buffer (pH 7.2) or, if needed, continuously superfused with the same buffer at a rate of 1 ml min⁻¹. The toxins were applied directly into the bath. For DRG neurones, a solution of ATP (1 µM final concentration) preceded of 1 min the administration of the toxin; this ATP application never induced [Ca²⁺]_i changes. The ratio of fluorescence intensities (Ex350 nm/Ex380 nm) was calculated on a

pixel basis for each image pair. The calcium concentration was then estimated by the formula (Grynkiewicz *et al.*, 1985):

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

where K_d is the dissociation constant of Fura-2 for Ca²⁺ (924 nM, calculated in our cultures), $\beta = (I_{380 \text{ max}}) / (I_{380 \text{ min}})$ (2.08 ± 0.03 , $n = 39$). Values of $R_{\min}$ and $R_{\max}$ were determined by periodical calibrations (Grynkiewicz *et al.*, 1985).

Statistics

Data are presented as box-plots with median, 10th, 25th, 75th and 90th percentiles and the outlying points; the mean line is also shown. Statistical significance was determined by Kruskal–Wallis one-way analysis of variance (SigmaPlot for Windows version 11.0). Differences were considered significant at $P < 0.05$.

Acknowledgements

The authors are particularly grateful to Daniel Keller for the skilful preparation of leukotoxins. Thanks to Dr Sophie Reibel and her team at the animal facilities of the Institut Fédératif des Neurosciences IFR37/Strasbourg and to the Imaging facility of the IFR37. Special thanks to Dr Nancy Grant (CNRS UPR3212, Strasbourg) for her valuable comments and discussions.

The experimental work was supported by grants from EA-4438 and Scientific Council from the Université de Strasbourg, and from UMR 3212. The funding agencies had no role in any of the study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript. None of the results obtained are part of a patent or commercial product. M.Y.T. and B.-J.L. were supported by a doctoral fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and from the Fondation Fouassier respectively. E.J. and B.P. are permanent staff of the CNRS (governmental) and G.P. is a permanent faculty member of the Université de Strasbourg. The above does not alter the authors' adherence to all OnlineOpen policies on sharing data and materials.

References

- Archer, G.L. (1998) *Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen. *Clin Infect Dis* **26**: 1179–1181.
- Aroian, R., and van der Goot, F.G. (2007) Pore-forming toxins and cellular non-immune defenses (CNIDs). *Curr Opin Microbiol* **10**: 57–61.
- Baba Moussa, L., Werner, S., Colin, D.A., Mourey, L., Pédelacq, J.D., Samama, J.P., *et al.* (1999) Discoupling the Ca²⁺-activation from the pore-forming function of the bi-component Panton-Valentine leucocidin in human PMNs. *FEBS Lett* **461**: 280–286.
- Batchelor, R.H., and Zhou, M. (2004) Use of cellular glucose-6-phosphate dehydrogenase for cell quantitation: applications in cytotoxicity and apoptosis assays. *Anal Biochem* **329**: 35–42.
- Bird, G.S., DeHaven, W.I., Smyth, J.T., and Putney, J.W., Jr (2008) Methods for studying store-operated calcium entry. *Methods* **46**: 204–212.

- Brailoiu, E., Hoard, J.L., Filipeanu, C.M., Brailoiu, G.C., Dun, S.L., Patel, S., and Dun, N.J. (2005) Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate potentiates neurite outgrowth. *J Biol Chem* **280**: 5646–5650.
- Brickley, S.G., Farrant, M., Swanson, G.T., and Cull-Candy, S.G. (2001) CNQX increases GABA-mediated synaptic transmission in the cerebellum by an AMPA/kainate receptor-independent mechanism. *Neuropharmacology* **41**: 730–736.
- Ceni, C., Pochon, N., Brun, V., Muller-Steffner, H., Andrieux, A., Grunwald, D., *et al.* (2003) CD38-dependent ADP-ribosyl cyclase activity in developing and adult mouse brain. *Biochem J* **370**: 175–183.
- Chambers, H.F., and DeLeo, F.R. (2009) Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol* **7**: 629–641.
- Chapman, J., and Zhou, M. (1999) Microplate-based fluorometric methods for the enzymatic determination of L-glutamate: application in measuring L-glutamate in food samples. *Anal Chim Acta* **402**: 47–52.
- 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.
- Churchill, G.C., Okada, Y., Thomas, J.M., Genazzani, A.A., Patel, S., and Galione, A. (2002) NAADP mobilizes Ca^{2+} from reserve granules, lysosome-related organelles, in sea urchin eggs. *Cell* **111**: 703–708.
- Collin, T., Marty, A., and Llano, I. (2005) Presynaptic calcium stores and synaptic transmission. *Curr Opin Neurobiol* **15**: 275–281.
- Collins, S.R., and Meyer, T. (2011) Evolutionary origins of STIM1 and STIM2 within ancient Ca^{2+} signaling systems. *Trends Cell Biol* **21**: 202–211.
- Cosker, F., Cheviron, N., Yamasaki, M., Menteyne, A., Lund, F.E., Moutin, M.-J., *et al.* (2010) The Ecto-enzyme CD38 is a nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) synthase that couples receptor activation to Ca^{2+} mobilization from lysosomes in pancreatic acinar cells. *J Biol Chem* **285**: 38251–38259.
- Crémieux, A.-C., Dumitrescu, O., Lina, G., Vallee, C., Côté, J.-F., Muffat-Joly, M., *et al.* (2009) Pantone-valentine leukocidin enhances the severity of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* rabbit osteomyelitis. *PLoS ONE* **4**: e7204.
- David, M.Z., and Daum, R.S. (2010) Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clin Microbiol Rev* **23**: 616–687.
- David, M.Z., Boyle-Vavra, S., Zychowski, D.L., and Daum, R.S. (2011) Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* as a predominantly healthcare-associated pathogen: a possible reversal of roles? *PLoS ONE* **6**: e18217.
- De Bernard, M., Cappon, A., Pancotto, L., Ruggiero, P., Rivera, J., Del Giudice, G., and Montecucco, C. (2005) The *Helicobacter pylori* VacA cytotoxin activates RBL-2H3 cells by inducing cytosolic calcium oscillations. *Cell Microbiol* **7**: 191–198.
- DeLeo, F.R., Otto, M., Kreiswirth, B.N., and Chambers, H.F. (2010) Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **375**: 1557–1568.
- Ferrero, E., Orciani, M., Vacca, P., Ortolan, E., Crovella, S., Titti, F., *et al.* (2004) Characterization and phylogenetic epitope mapping of CD38 ADPR cyclase in the cynomolgus macaque. *BMC Immunol* **5**: 21.
- 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.
- Fong, K.P., Pacheco, C.M.F., Otis, L.L., Baranwal, S., Kieba, I.R., Harrison, G., *et al.* (2006) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin requires lipid microdomains for target cell cytotoxicity. *Cell Microbiol* **8**: 1753–1767.
- Foran, P.G., Mohammed, N., Lisk, G.O., Nagwaney, S., Lawrence, G.W., Johnson, E., *et al.* (2003) Evaluation of the therapeutic usefulness of botulinum neurotoxin B, C1, E, and F compared with the long lasting type A. Basis for distinct durations of inhibition of exocytosis in central neurons. *J Biol Chem* **278**: 1363–1371.
- Gekara, N.O., Westphal, K., Ma, B., Rohde, M., Groebe, L., and Weiss, S. (2007) The multiple mechanisms of Ca^{2+} signalling by listeriolysin O, the cholesterol-dependent cytolysin of *Listeria monocytogenes*. *Cell Microbiol* **9**: 2008–2021.
- Genestier, A.-L., Michallet, M.-C., Prévost, G., Bellot, G., Chalabreysse, L., Peyrol, S., *et al.* (2005) *Staphylococcus aureus* Pantone-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. *J Clin Invest* **115**: 3117–3127.
- Gillet, Y., Issartel, B., Vanhems, P., Fournet, J.-C., Lina, G., Bes, M., *et al.* (2002) Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Pantone-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet* **359**: 753–759.
- Gonzalez, M., Bischofberger, M., Pernot, L., van der Goot, F., and Frêche, B. (2008) Bacterial pore-forming toxins: the (w)hole story? *Cell Mol Life Sci* **65**: 493–507.
- Graves, S.F., Kobayashi, S.D., Braughton, K.R., Whitney, A.R., Sturdevant, D.E., Rasmussen, D.L., *et al.* (2012) Sublytic concentrations of *Staphylococcus aureus* Pantone-Valentine leukocidin alter human PMN gene expression and enhance bactericidal capacity. *J Leukoc Biol* **92**: 361–374.
- Gravet, A., Colin, D.A., Keller, D., Girardot, R., Monteil, H., and Prévost, G. (1998) Characterization of a novel structural member, LukE–LukD, of the bi-component staphylococcal leucotoxins family. *FEBS Lett* **436**: 202–208.
- Gruszczynska-Biegala, J., Pomorski, P., Wisniewska, M.B., and Kuznicki, J. (2011) Differential roles for STIM1 and STIM2 in store-operated calcium entry in rat neurons. *PLoS ONE* **6**: e19285.
- Gryniewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R.Y. (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260**: 3440–3450.
- Hara-Yokoyama, M., Kimura, T., Kaku, H., Wakiyama, M., Kaitsu, Y., Inoue, M., *et al.* (2008) Alteration of enzymatic properties of cell-surface antigen CD38 by agonistic anti-CD38 antibodies that prolong B cell survival and induce activation. *Int Immunopharmacol* **8**: 59–70.

- Ishikawa, J., Ohga, K., Yoshino, T., Takezawa, R., Ichikawa, A., Kubota, H., and Yamada, T. (2003) A pyrazole derivative, YM-58483, potentially inhibits store-operated sustained Ca^{2+} influx and IL-2 production in T lymphocytes. *J Immunol* **170**: 4441–4449.
- 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.
- Jover, E., Gonzalez de Aguilar, J.-L., Luu, B., and Lutz-Bucher, B. (2005) Effect of a cyclohexenonic long-chain fatty alcohol on calcium mobilization. *Eur J Pharmacol* **516**: 197–203.
- Kaneko, J., Kimura, T., Narita, S., Tomita, T., and Yoshiyuki, K. (1998) Complete nucleotide sequence and molecular characterization of the temperate staphylococcal bacteriophage Φ PVL carrying Panton-Valentine leukocidin genes. *Gene* **215**: 57–67.
- Kao, C.-Y., Los, F.C.O., Huffman, D.L., Wachi, S., Kloft, N., Husmann, M., et al. (2011) Global functional analyses of cellular responses to pore-forming toxins. *PLoS Pathog* **7**: e1001314.
- Kloft, N., Busch, T., Neukirch, C., Weis, S., Boukhallouk, F., Bobkiewicz, W., et al. (2009) Pore-forming toxins activate MAPK p38 by causing loss of cellular potassium. *Biochem Biophys Res Commun* **385**: 503–506.
- Korzeniowski, M.K., Popovic, M.A., Szentpetery, Z., Varnai, P., Stojilkovic, S.S., and Balla, T. (2009) Dependence of STIM1/Orai1-mediated calcium entry on plasma membrane phosphoinositides. *J Biol Chem* **284**: 21027–21035.
- Koschinski, A., Repp, H., Ünver, B., Dreyer, F., Brockmeier, D., Valeva, A., et al. (2006) Why *Escherichia coli* α -hemolysin induces calcium oscillations in mammalian cells – the pore is on its own. *FASEB J* **20**: 973–975.
- Lonchamp, E., Dupont, J.-L., Wioland, L., Courjaret, R., Mbebi-Liegeois, C., Jover, E., et al. (2010) *Clostridium perfringens* epsilon toxin targets granule cells in the mouse cerebellum and stimulates glutamate release. *PLoS ONE* **5**: e13046.
- Lowy, F.D. (1998) *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* **339**: 520–532.
- McGuinness, L., Bardo, S.J., and Emptage, N.J. (2007) The lysosome or lysosome-related organelle may serve as a Ca^{2+} store in the boutons of hippocampal pyramidal cells. *Neuropharmacology* **52**: 126–135.
- Malachowa, N., Whitney, A.R., Kobayashi, S.D., Sturdevant, D.E., Kennedy, A.D., Braughton, K.R., et al. (2011) Global changes in *Staphylococcus aureus* gene expression in human blood. *PLoS ONE* **6**: e18617.
- Malavasi, F., Deaglio, S., Funaro, A., Ferrero, E., Horenstein, A.L., Ortolan, E., et al. (2008) Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol Rev* **88**: 841–886.
- Menestrina, G., Dalla Serra, M., Comai, M., Coraiola, M., Viero, G., Werner, S., et al. (2003) Ion channels and bacterial infection: the case of β -barrel pore-forming protein toxins of *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett* **552**: 54–60.
- Meyer, F., Girardot, R., Piemont, Y., Prevost, G., and Colin, D.A. (2009) Analysis of the specificity of panton-valentine leukocidin and gamma-hemolysin f component binding. *Infect Immun* **77**: 266–273.
- Mhyre, T.R., Maine, D.N., and Holliday, J. (2000) Calcium-induced calcium release from intracellular stores is developmentally regulated in primary cultures of cerebellar granule neurons. *J Neurobiol* **42**: 134–147.
- Morgan, A.J., Platt, F.M., Lloyd-Evans, E., and Galione, A. (2011) Molecular mechanisms of endolysosomal Ca^{2+} signalling in health and disease. *Biochem J* **439**: 349–374.
- Pedersen, M., Benfield, T., Skinhoj, P., and Jensen, A. (2006) Haematogenous *Staphylococcus aureus* meningitis. A 10-year nationwide study of 96 consecutive cases. *BMC Infect Dis* **6**: 49.
- Pinilla, P.J.G., Hernández, A.T., Camello, M.C., Pozo, M.J., Toescu, E.C., and Camello, P.J. (2005) Non-stimulated Ca^{2+} leak pathway in cerebellar granule neurones. *Biochem Pharmacol* **70**: 786–793.
- Prevost, G., Cribier, B., Couppié, P., Petiau, P., Supersac, G., Finck-Barbancon, V., et al. (1995) Panton-Valentine leukocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infect Immun* **63**: 4121–4129.
- Prevost, G., Mourey, L., Colin, D.A., and Menestrina, G. (2001) Staphylococcal poreforming toxins. *Curr Top Microbiol Immunol* **257**: 53–83.
- Rahman, A., Nariya, H., Izaki, K., Kato, I., and Kamio, Y. (1992) Molecular cloning and nucleotide sequence of leukocidin F-component gene (*lukF*) from methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun* **184**: 640–646.
- Randall, A., and Tsien, R.W. (1995) Pharmacological dissection of multiple types of Ca^{2+} channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J Neurosci* **15**: 2995–3012.
- Sheen, T., Ebrahimi, C., Hiemstra, I., Barlow, S., Peschel, A., and Doran, K. (2010) Penetration of the blood–brain barrier by *Staphylococcus aureus*: contribution of membrane-anchored lipoteichoic acid. *J Mol Med* **88**: 633–639.
- Singhal, D., Foreman, A., Bardy, J.-J., and Wormald, P.-J. (2011) *Staphylococcus aureus* biofilms. *Laryngoscope* **121**: 1578–1583.
- Staali, L., Monteil, H., and Colin, D.A. (1998) The staphylococcal pore-forming leukotoxins open Ca^{2+} channels in the membrane of human polymorphonuclear neutrophils. *J Membr Biol* **162**: 209–216.
- Uhlen, P., Laestadius, A., Jahnukainen, T., Soderblom, T., Backhed, F., Celsi, G., et al. (2000) α -Haemolysin of uropathogenic *E. coli* induces Ca^{2+} oscillations in renal epithelial cells. *Nature* **405**: 694–697.
- Usmani, S.M., von Einem, J., Frick, M., Miklavc, P., Mayenburg, M., Husmann, M., et al. (2012) Molecular basis of early epithelial response to streptococcal exotoxin: role of STIM1 and Orai1 proteins. *Cell Microbiol* **14**: 299–315.
- Varnai, P., Hunyady, L., and Balla, T. (2009) STIM and Orai: the long-awaited constituents of store-operated calcium entry. *Trends Pharmacol Sci* **30**: 118–128.
- Venkateswaran, G., and Hasan, G. (2009) Intracellular Ca^{2+} signaling and store-operated Ca^{2+} entry are required in *Drosophila* neurons for flight. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 10326–10331.

- Walsh, C.M., Chvanov, M., Haynes, L.P., Petersen, O.H., Tepikin, A.V., and Burgoyne, R.D. (2009) Role of phosphoinositides in STIM1 dynamics and store-operated calcium entry. *Biochem J* **425**: 159–168.
- Werner, S., Colin, D.A., Coraiola, M., Menestrina, G., Monteil, H., and Prevost, G. (2002) Retrieving biological activity from LukF-PV mutants combined with different S components implies compatibility between the stem domains of these staphylococcal bicomponent leukotoxins. *Infect Immun* **70**: 1310–1318.
- Wertheim, H.F.L., Melles, D.C., Vos, M.C., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Verbrugh, H.A., and Nouwen, J.L. (2005) The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* **5**: 751–762.
- Woodin, A.M. (1960) Purification of the two components of leucocidin from *Staphylococcus aureus*. *Biochem J* **75**: 158–165.
- Woodin, A.M., and Wieneke, A.A. (1963) The accumulation of calcium by the polymorphonuclear leucocyte treated with staphylococcal leucocidin and its significance in extrusion of protein. *Biochem J* **87**: 487–495.
- Yamada, M., Mizuguchi, M., Otsuka, N., Ikeda, K., and Takahashi, H. (1997) Ultrastructural localization of CD38 immunoreactivity in rat brain. *Brain Res* **756**: 52–60.
- Zhu, M.X., Ma, J., Parrington, J., Calcraft, P.J., Galione, A., and Evans, A.M. (2009) Calcium signaling via two-pore channels: local or global, that is the question. *Am J Physiol Cell Physiol* **298**: C430–C441.
- Zivkovic, A., Sharif, O., Stich, K., Doninger, B., Biaggio, M., Colinge, J., *et al.* (2011) TLR 2 and CD14 mediate innate immunity and lung inflammation to staphylococcal Pantone-Valentine leukocidin *in vivo*. *J Immunol* **186**: 1608–1617.
- Zocchi, E., Usai, C., Guida, L., Franco, L., Bruzzone, S., Passalacqua, M., and De Flora, A. (1999) Ligand-induced internalization of CD38 results in intracellular Ca^{2+} mobilization: role of NAD^+ transport across cell membranes. *FASEB J* **13**: 273–283.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Fig. S1. The HlgC or HlgB subunits separately fail to induce glutamate release or free intracellular $[Ca^{2+}]$ changes in granular neurones.

a. Dose–response curves of glutamate released by granular neurones challenged for 10 min with the indicated concentrations of leukotoxin HlgC/HlgB (●), HlgC subunit alone (●) or HlgB subunit alone (▼). The green line shows the glutamate measured after a 10 s pulse of 60 mM KCl depolarization.

b. averaged traces of records obtained in the presence of 2 nM HlgC/HlgB leukotoxin (51 cells, blue line), 2 nM HlgC subunit alone (60 cells, green line) and 2 nM HlgB subunit alone (31 cells, dark red line). The boxes show the distribution values of $[Ca^{2+}]$ peak amplitude (vertical box) and peak latency (horizontal box) from the control records.

Fig. S2. Confocal microscopy records of living granular neurones incubated in 12 μ M Ethidium bromide and Leukotoxin HlgC/HlgB. Optical sections of 1.68 μ m of cells bathing in HBSS containing Ethidium bromide (12 μ M) were observed on a Leica SP5-II confocal microscope (fields of magnification $\times 63$, initial pixel size 79.4 nm). Images of 1024 $\times$ 1024 pixels were acquired using 500–545 nm (green channel), 589–750 nm (red channel) and Nomarsky-DIC. Line 1: sample images after 3 min incubation in 12 μ M Ethidium Bromide; 1A shows the living cells autofluorescent signal in the green channel, 1B is the Ethidium Bromide red fluorescence signal and 1C shows the recorded cells. Line 2 shows the same cells 15 min after the addition in the bath of HlgC/HlgB-Alexa-488 tagged leukotoxin (4 nM final); 2A green channel, 2B red channel and 2C Nomarsky-DIC image. Line 3 shows the same two cells after 20 more min incubation in 8 nM final concentration of HlgC/HlgB-Alexa-488 tagged; 3A green fluorescence, 3B Ethidium Bromide red fluorescence and 3C Nomarsky-DIC image.

Nous avons conduit des expériences préliminaires destinées à identifier les cellules de la rétine sensibles aux leucotoxines. Nous avons privilégié les techniques de marquage fluorescent sur des coupes (10 μ m) de rétine de lapin albinos de race New Zealand. Des images obtenues par microscopie confocale ont montré que les lapins albinos ne représentent pas le meilleur modèle d'études pour la rétine vu la forte autofluorescence de leur rétine (Figure III.1.a). Après incubation des rétines avec des leucotoxines marquées par couplage à l'Alexa-488, les images obtenues ont montré une différence entre la fluorescence des coupes contrôles et les coupes incubées avec les leucotoxines (Figure III.1.b). Cependant, le marquage des leucotoxines par couplage avec l'Alexa-488 s'est avéré insuffisant pour permettre l'identification des cellules ayant fixé la toxine de façon spécifique. Dans un deuxième temps, la fixation des leucotoxines a été révélée par des anticorps dirigés contre ces leucotoxines, mais cette alternative ne permet pas de s'affranchir de l'autofluorescence du tissu.

Ainsi, la suite de l'étude qui a été initiée sur des yeux de lapins albinos de la race New Zealand se poursuit sur des lapins pigmentés de la lignée HY79B de la race Argenté de Champagne par Pauline Heitz (Interne en Ophtalmologie), en injectant la LPV dans un œil de lapin 30 min avant son euthanasie et gardant le deuxième œil comme un contrôle négatif. Les leucotoxines fixées sont marquées par immunohistochimie grâce aux anticorps spécifiques de LukS-PV et les premiers résultats obtenus récemment montrent que les leucotoxines se fixent spécifiquement à des cellules particulières de la couche neuro-ganglionnaire de la rétine. Ces résultats restent à confirmer et permettront d'identifier une nouvelle cible des leucotoxines au niveau de la rétine.

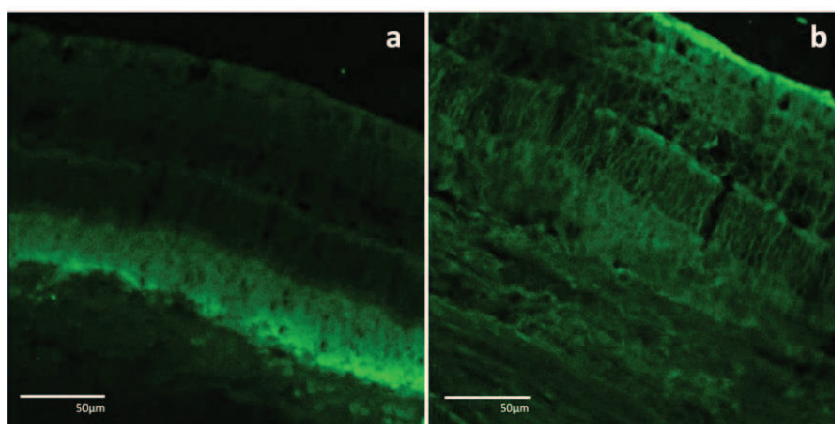


Figure III. 1 : Coupes de rétine de lapin albinos de race New Zealand

Les coupes de rétines montrent une très forte autofluorescence du tissu et surtout au niveau des cônes et des bâtonnets (a). Cependant, en présence de leucotoxines marquées (HlgC/HlgB*), la zone marquée correspond à la région ganglionnaire et des fibres du nerf optique (b).

L'action des leucotoxines impliquant des changements de la $[Ca^{2+}]_i$ dans les hPMNs serait également indépendante de l'activité de formation de pore (Baba Moussa et al., 1999; Nguyen et al., 2002). Il est donc intéressant de comprendre le mécanisme qui aboutit à des modifications de la $[Ca^{2+}]_i$ dans les hPMNs et de le comparer au mécanisme intervenant dans les neurones en grains du cervelet de rat.

Ce chapitre compare les effets des deux leucotoxines HlgC/HlgB et la LPV sur la $[Ca^{2+}]_i$ dans les hPMNs. Récemment deux protéines de la famille des récepteurs couplés aux protéines G, C5aR et C5L2, ont été identifiées comme récepteurs de LukS-PV (Spaan et al., 2013). Cependant, C5aR est plus exprimé à la membrane des neutrophiles que C5L2, il est donc considéré comme le récepteur majeur de la LPV (Spaan et al., 2013). Des expériences de compétition entre LukS-PV marquée à la fluorescéine et HlgC non marquée ont permis de montrer que LukS-PV et HlgC partagent le même site à la surface des hPMNs, ce qui n'est pas le cas des sous-unités de classe S des autres leucotoxines (Gauduchon et al., 2001). Ceci suggère que le mode d'action de ces toxines est semblable, cependant, **des différences sont observées concernant le profil de modification de la $[Ca^{2+}]_i$.**

Le récepteur C5aR est également exprimé sur les neurones du SNC (Davoust et al., 1999; Nataf et al., 1998; Stahel et al., 1997) et plus particulièrement au niveau des neurones en grains du cervelet de rat (Bénard et al., 2004). La signalisation induite par HlgC/HlgB pourrait donc être déclenchée suite à sa fixation à C5aR. Cependant, le rôle d'un récepteur GPCR est intimement associé au type de cellules sur lesquelles il est exprimé et de l'agoniste qui se fixe à ce récepteur.

Lorsque le peptide dérivé du complément C5a se fixe sur le récepteur C5aR des neutrophiles, ce dernier subit un changement conformationnel qui lui permet d'interagir avec la protéine G_{i2} permettant son activation et la dissociation des sous-unités α et $\beta\gamma$. Les sous-unités $\beta\gamma$ activent la phospholipase $C\beta_2$ ($PLC\beta_2$) (Camps et al., 1992) et la phosphoinositide 3-kinase γ ($PI3K\gamma$) (Stoyanov et al., 1995). $PI3K\gamma$ convertit le phosphoinositol-4,5-biphosphate (PIP_2) de la membrane plasmique en phosphoinositol-3,4,5-triphosphate (PIP_3). $PLC\beta_2$ hydrolyse le PIP_2 en diacylglycérol (DAG) et inositol triphosphate (IP_3). L' IP_3 permet la libération du calcium des stocks intracellulaires suite à l'activation des récepteurs de l' IP_3 (IP_3R) du réticulum endoplasmique (RE) suivie d'une faible entrée du calcium extracellulaire (Rabiet et al., 2007). Le Ca^{2+} et le DAG facilitent l'activation de la protéine kinase C (PKC) permettant de phosphoryler C5aR.

L'activation de plusieurs autres kinases est également impliquée dans la signalisation. Les kinases régulées par des signaux extracellulaires (ERK1/2) et la p38 MAPK sont activées par C5a dans les neutrophiles (Lopez-Illasaca et al., 1997). Les effecteurs intracellulaires associés à la cascade de signalisation de C5aR comprennent, entre autres, la phospholipase A₂-α (PLA₂-α), la phospholipase D (PLD), des kinases activées par les protéines mitogènes (MAPK), et les kinases de la famille c-Src (Rabiet et al., 2007). PLA₂-α est phosphorylée par des MAPKs et subit une translocation vers la membrane plasmique d'une manière dépendante du calcium (Lin et al., 1993). La stimulation de C5aR conduit également à l'activation des petites protéines G de la famille Rho (Rho, Rac et Cdc42), par l'intermédiaire de l'activation des facteurs d'échange de guanine-nucléotide (GEFs) (Welch et al., 2002).

L'inactivation de C5aR fait suite à sa phosphorylation et son internalisation par la voie d'endocytose classique clathrine dépendante (Braun et al., 2003; Suvorova et al., 2005). Cette voie d'endocytose associe la β-arrestine qui permet de cibler le récepteur fixé à l'agoniste dans des puits pré-formés couverts de clathrine dont la fission sera assurée par la dynamine (Damke, 1996; Scott et al., 2002). Une fois dans l'endosome précoce, C5aR peut être recyclé vers la membrane plasmique ou dégradé dans le lysosome. Ce « sorting » semble dépendre du type cellulaire (Naik et al., 1997; Suvorova et al., 2005).

Pour comprendre le mécanisme d'action de HlgC/HlgB et de la LPV sur les neutrophiles, les effets de ces deux leucotoxines ont été comparés à ceux de C5a.

ARTICLE N°2 : INTERNALIZATION OF STAPHYLOCOCCAL LEUKOTOXINS THAT BIND THE C5AR IS REQUIRED FOR THE INITIATION OF INTRACELLULAR CA²⁺ MOBILIZATION.

Internalization of staphylococcal leukotoxins that bind and divert C5aR is required for intracellular Ca²⁺ mobilization by human neutrophils.

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

¹ Université de Strasbourg - Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, EA7290 Virulence Bactérienne précoce. Institut de Bactériologie, 3 rue Koeberlé ; F-67000 Strasbourg

² INCI – UPR-CNRS 3212 ; Physiologie des réseaux de neurones, 5 rue Blaise Pascal, F- 67084 Strasbourg cedex

³ National Research Council of Italy - Institute of Biophysics & Bruno Kessler Foundation, via Sommarive 18, 38123 Trento, Italy

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

Running title: Leukotoxins internalization and Ca²⁺ mobilization

ABSTRACT.

A growing number of receptors, often associated with the innate immune response, are being identified as targets for bacterial toxins of the pore-forming family. These findings raise the new question of whether the receptors are normally activated or merely used as docking points facilitating the formation of a pore. To elucidate whether the *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine Leukocidin and the leukotoxin HlgC/HlgB act through the C5a receptor (C5aR) as agonists, antagonists or differ from the C5a complement-derived peptide, their activity was explored on C5aR-expressing cells. Both leukotoxins equally bound C5aR in neutrophils and in stable transfected cells and initiated mobilization of intracellular Ca^{2+} . HlgC/HlgB required the presence of robust intracellular acidic Ca^{2+} stores in order to evoke a rise in free $[\text{Ca}^{2+}]_i$, while the LukS-PV/LukF-PV directly altered reticular Ca^{2+} stores. Intracellular target specificity was conferred by the F-subunit formign the complex. Furthermore, internalization of C5aR with the two leukotoxin components (S- and F-subunits) was required for the initiation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mobilization. Electrophysiological recordings on living cells demonstrated that LukS-PV/LukF-PV did not alter the membrane resistance of C5aR-expressing cells, which was confirmed in planar lipid bi-layers and in liposomes. The present observations suggest that part of the pore forming process occurs in distinct intracellular compartments rather than at the plasma membrane.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Panton and Valentine Leukocidin, HlgC/HlgB, human neutrophils, Fura-2, liposomes, electrophysiological recordings, immunocytochemistry, confocal microscopy.

Author Summary

Staphylococcus aureus virulence is achieved by a large variety of cell-threatening activities carried out by a wide range of released factors. Among these, bi-component pore-forming leukotoxins are exhibiting greater sophisticated effects than previously reported. Two *Staphylococcus aureus* leukotoxins bind the C5a complement-derived peptide receptor, divert its internalization process and release intracellular Ca^{2+} from specific internal stores. The Pantone and Valentine leukotoxin induces the release of Ca^{2+} from reticular stores whereas HlgC/HlgB, which acts more swiftly, triggers Ca^{2+} release from acidic stores. While generally recognized to complete cell lysis through the formation of a pore in the plasma membrane, LukS-PV/LukF-PV is unable to alter the membrane resistance of C5aR-expressing cells or of planar lipid bilayers. Conversely, HlgC/HlgB can form pores in bilayers as well as alter cell membrane resistance, although its pore-forming activity competes with internalization process in the cells. The HlgB subunit determines the aptitude of the two associated components to insert and disrupt membranes. These newly-revealed properties thus provide a novel understanding of physiological effects observed for sublytic concentrations of leukotoxins.

INTRODUCTION

Staphylococcus aureus has the ability to cause a large variety of human infections, from mild boils and subcutaneous abscesses to severe toxic shock syndrome, necrotizing pneumonia and sepsis, among others [1]. The bacterium colonizes mucosal and skin surfaces and escapes host immunity through the production of adhesion proteins [2,3], superantigens [4,5], cytolytins and pore-forming toxins [6,7]. Of the latter, α -toxin and the δ -lysin assemble as single-component polymers to constitute a pore [8,9,10]; the β -toxin is a neutral sphingomyelinase that lyses erythrocytes [11], while the other toxins are members of the β -barrel pore-forming leukotoxin family and act through the combination of two subunits commonly known as the fast- (F) and slow-eluted (S) components [12]. To date the latter group includes six *S. aureus* class-S and five class-F proteins naturally assembling as: γ -Hemolysins HlgA/HlgB or HlgC/HlgB, the Pantón–Valentine Leukocidin LukS-PV/LukF-PV, LukM/LukF'-PV, LukE/LukD and LukA/LukB [13,14], which significantly differ in their specific cell targets [7,15,16]. The subunits of the β -barrel leukotoxins are secreted as separate molecules, which will act synergistically to alter a target cell [17]. It is currently acknowledged that the class-S component binds to a “unique receptor” and that the subsequent binding of the F-subunit initiates the assembly of a pre-pore structure [18]. The class-S components LukS-PV and HlgC associate with human neutrophils by binding a membrane molecule expressed during differentiation to the metamyelocyte stage [19,20]. In addition, a link has been suggested between the toxin binding to the receptor and the activation of a Ca^{2+} conductance, which allows the oligomerization of S- and F-subunits and the formation of hetero-octameric pores [21,22,23,24]. However, the characterization of intracellular Ca^{2+} movements induced by HlgC/HlgB [25] and the demonstration of human neutrophils activation by sublytic concentrations of LukS-PV/LukF-PV [26], both challenge the view of the formation of a membrane pore after activation of a Ca^{2+} conductance.

In the past few years, various active membrane proteins have emerged as receptors for *S. aureus* virulence factors. The ADAM-10 metalloproteinase is the predominant high affinity receptor for α -toxin. ADAM-10 allows the initialization of the sequence of events by which the toxin is transformed into a cytolytic pore [27,28]. The CCR5 G protein coupled receptor is deemed to be necessary and sufficient for the killing of T cells, macrophages and dendritic cells by leukotoxin LukE/LukD, [29], although

when targeting neutrophils, the same leukotoxin binds the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 [30]. Notwithstanding the above, the identification of steps leading to cell lysis and the process of pore formation after binding of the receptor remain elusive events. LukS-PV/LukF-PV-induced lung inflammation has been suggested to be mediated through its binding to the CD14/TLR2 complex [31], although this observation has recently been challenged by data showing that the human complement receptors C5aR and C5L2 act as host targets for LukS-PV, mediating both toxin binding and cytotoxicity [32].

Herein, we confirm that the HlgC/HlgB and the Panton–Valentine Leukocidin both bind to human neutrophils and to the stably-transfected U937-C5aR cell line. Conversely, their binding can be antagonized by the C5a peptide and their activity modified by the synthetic C5aR antagonist W-54011 [33]. Moreover, after binding to C5aR, the toxins trigger a rise in intracellular Ca^{2+} , which differs from that of C5a-induced Ca^{2+} mobilization. Notably, particular intracellular Ca^{2+} -releasing compartments are related to each toxin, as suggested by the initial depletion of distinct Ca^{2+} stores preventing the toxin's effect. This compartment-associated Ca^{2+} specificity is supported by the F-subunit, since the LukS-PV/HlgB complex initiates Ca^{2+} release from acidic stores as is the case of HlgC/HlgB while the HlgC/LukF-PV complex initiates a rise in free $[\text{Ca}^{2+}]_i$ from the same compartment as LukS-PV/LukF-PV. Considering that both LukS-PV/LukF-PV and HlgC/HlgB are endocytosed shortly after binding of the F component, our results suggest that part of the pore forming process possibly occurs in distinct intracellular compartments rather than at the plasma membrane.

RESULTS

LukS-PV/LukF-PV and HlgC/HlgB bind to the C5a Receptor.

Previous work from our group showed that the leukotoxin HlgC S-subunit competes for the same binding site as the LukS-PV S-subunit of LukS-PV/LukF-PV [34]. The human complement receptor C5aR has been proposed to act as the host target of LukS-PV/LukF-PV, mediating both toxin binding and cytotoxicity [32]. In light of the above, binding properties of both leukotoxins S-subunits were verified on transfected U937-C5aR cells and compared with the affinity association constants in human neutrophils. The results, summarized in table 1, show that the affinity of the two leukotoxins for C5aR was highly similar in natural neutrophils and in transfected cells. Moreover, the presence of the natural ligand C5a or the antagonist W-54011, did not affect the binding properties of the leukotoxins. Non transfected cells U937 were unable to bind either of the toxins.

Although the affinity of the toxins for the receptor was not affected by the presence of well-defined C5aR ligands, maximum binding was nevertheless reduced as summarized in table 2. The same concentrations of C5a (1.2 nM) or W-54011 (20 nM) reduced the binding of LukS-PV/LukF-PV by 55 % in neutrophils and by 30 % in transfected cells. Interestingly, the binding of HlgC/HlgB was slightly increased in the presence of W-54011. The high affinity antagonist of the C3a receptor, SB-290157 [35], had no significant effect on leukotoxins binding.

Both LukS-PV/LukF-PV and HlgC/HlgB mobilize intracellular Ca^{2+} upon binding to C5aR.

The association of C5aR to its natural agonist C5a leads to the activation of the trimeric $G_{\alpha_2\beta\gamma}$ complex, which in turn triggers phosphoinositide 3-kinase (PI3K) activity, amplifies the canonical phospholipase $C\beta_2$ -PI3K pathway and, finally, impinges on the release of reticular Ca^{2+} [36,37]. Herein, free $[Ca^{2+}]_i$ movements were recorded in C5aR-expressing cells (human neutrophils and transfected U937 cells) in order to compare the activity of the C5a peptide with that of the two leukotoxins. We first verified the failure of isolated S-components to induce $[Ca^{2+}]_i$ elevation (figure 1A: 2.5 nM LukS-PV, orange trace; 5 nM HlgC, clear blue trace). When cells were challenged with concentrations slightly above the dissociation constant (K_d), all three active molecules induced a variation in free $[Ca^{2+}]_i$, although differing in shape, latency and buffering to resting $[Ca^{2+}]_i$ values

(figure 1, A and B). The mobilization of $[Ca^{2+}]_i$ due to 1.2 nM C5a was fast, transient and returned to the initial resting value within a few minutes (figure 1A and 1B, green trace). The free $[Ca^{2+}]_i$ increase triggered by 0.5 nM HlgC/HlgB began after a short latency, reached a maximum at a slow rate and decreased to a new steady state value above the initial resting concentration (figure 1A and 1B, dark blue trace). Finally, the rise in free $[Ca^{2+}]_i$ induced by 0.25 nM LukS-PV/LukF-PV was slow to start and gradually reached a long lasting plateau (figure 1A and 1B, red trace).

These observations suggest that C5aR occupancy by each active molecule triggers activation of a distinct Ca^{2+} release mechanism. As a result, and to clarify how C5aR contributes to the leukotoxin effect, $[Ca^{2+}]_i$ changes were recorded in the presence of the small molecules W-54011 (20 nM) or SB-290157 (1 μ M), well-known antagonists of C5aR and C3aR respectively [38,39]. The effect of 1.2 nM C5a in neutrophils was completely abolished by the presence of 20 nM W-54011 (figure 1C, red trace) while reduced to $46.5 \% \pm 13.1$ (n=3) in U937-C5aR cells (figure 1D, red trace). The presence of 1 μ M SB-290157 slightly sharpened the C5a response in neutrophils, reducing the area under the curve by $19.1 \% \pm 16$ (n=3) (figure 1C, green trace). In the transfected cells, SB-290157 increased the amplitude of the C5a response (area under curve: $+18.47 \% \pm 7.3$, n=3) (figure 1D, green trace). When cells were pre-incubated with 1 μ M thapsigargin (a SERCA inhibitor) or 1 μ M ionomycin (a reticular Ca^{2+} ionophore), C5a signaling was completely abolished, both in neutrophils and in transfected cells, thus confirming the reticular origin of the Ca^{2+} increase (figures 1C and 1D). As expected, non-transfected U937 cells were entirely unaffected by the presence of 12 nM C5a, 0.1 μ M LukS-PV/LukF-PV or 0.1 μ M HlgC/HlgB (figure 1D insert). The C5aR antagonist W-54011 (20 nM) reduced the LukS-PV/LukF-PV effect by $71.7 \% \pm 7$ in human neutrophils (n=3) (figure 1E, red trace) and by $34.9 \% \pm 15$ in U937-C5aR cells (n=3) (figure 1F, red trace). A reduced latency of the LukS-PV/LukF-PV effect was observed in the presence of 1 μ M SB-290157 with a non significant alteration on the area under the curve, both in neutrophils (figure 1E, green trace) and in U937-C5aR cells (figure 1F, green trace). Surprisingly, 20 nM W-54011 amplified the activity of HlgC/HlgB up to $149.3 \% \pm 23$ of baseline level (n=3) in neutrophils and up to $181.3 \% \pm 23$ (n=3) in U937-C5aR cells (figure 1G and 1H, red trace). A non significant reduction of the effect was always observed however in at least 3 independent experiments in the presence of 1 μ M SB-290157 (figures 1G and 1H, green trace). These results strengthen the notion of C5aR fostering the cellular activity of the two

leukotoxins, although the outcome of their effects is significantly different in addition to being divergent from C5a activity. Hence, given that the activity of leukotoxins is reduced but not abolished in the absence of extracellular Ca^{2+} (supplementary figure 1), we hypothesized that the increase in free $[\text{Ca}^{2+}]_i$ may stem from the release of Ca^{2+} from an unidentified intracellular compartment. This concept is also strengthened by the confirmation that a commonly-used test to assess membrane pore formation (i.e. ethidium bromide diffusion into the cell) was only achieved when cells were bathed in a Ca^{2+} -free buffer [20] (supplementary figure 2).

The leukotoxins HlgC-HlgB and LukS-PV/LukF-PV induce a rise in intracellular Ca^{2+} from diverse intracellular compartments

In a previous study, we had described the effect of HlgC/HlgB in rat granular neurons, where the resulting complex triggers the release of Ca^{2+} from intracellular acidic stores [25]. Herein, a similar pharmacological analysis was conducted to identify putative Ca^{2+} stores targeted by staphylococcal leukotoxins in human neutrophils. In order to determine their participation, established Ca^{2+} compartments [40] were pharmacologically altered, namely: i) the reticular store, which releases Ca^{2+} through IP3 and ryanodine receptors, was emptied through the use of the SERCA blocker thapsigargin [41], ii) the action of ionomycin enabled to reveal a complementary neutral compartment [42] and iii) the contribution of acidic organelles was tested through the action of bafilomycin A1 (a V-type H^+ -ATPase inhibitor) or glycyl-phenylalanine 2-naphthylamide (GPN), a cathepsin C substrate, which drives the blockade of lysosomes by altering their osmolarity [43].

As indicated above, the effect of C5a can be prevented by the presence of $1\mu\text{M}$ thapsigargin or ionomycin in the bath (figure 1C and D), which confirms the expected release of Ca^{2+} from reticular stores [44,45]. In neurons, HlgC/HlgB activity impinges on the acidic Ca^{2+} stores, which release Ca^{2+} through a nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP)-activated mechanism [25]. Herein, in the presence of the NAADP competitor Ned-19 [46], the free $[\text{Ca}^{2+}]_i$ change due to HlgC/HlgB was increased by $159.3\% \pm 18$ (figure 2A1) whereas the LukS-PV/LukF-PV effect was unaltered in the presence of the drug (figure 2A2), hence supporting a link between HlgC/HlgB and a specific acidic store. Moreover, H^+ -ATPase blockade by bafilomycin A reduced the rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ due to HlgC/HlgB by

66.6 % $\pm$ 21 (figure 2B1) while slightly accelerated the LukS-PV/LukF-PV response with no modification of the area under the curve (figure 2B2). Similarly, the alteration of lysosomal activity by GPN reduced the effect of HlgC/HlgB to 61.5 % $\pm$ 10 (n=3) (figure 2C1) but did not alter the LukS-PV/LukF-PV effect (figure 2C2). The presence of 1 μ M thapsigargin (figures 2D1 and 2D2) or 1 μ M ionomycin (figures 2E1 and 2E2) significantly reduced the effect of both leukotoxins. The drop in HlgC/HlgB effect due to the blockage of SERCA by thapsigargin reached 59.9 % $\pm$ 2 (n=3) of the maximum and 55.7 % $\pm$ 8 (n=3) for LukS-PV/LukF-PV. Ionomycin completely abolished the effect of both toxins on internal stores. Finally, the pyrazole derivative YM-58483, a specific store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) blocker [47], inhibited HlgC/HlgB activity to 71.9 % $\pm$ 17 (n=3) (figure 2F1) whereas it did not alter the effect of LukS-PV/LukF-PV, although the latency time was shortened (figure 2F2). All of these effects were similarly expressed when comparing maximum $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ratios between control and drug-treated cells as shown in table 3. These results confirm that, acting early through acidic intracellular compartments, HlgC/HlgB activity is similar in human neutrophils and in rat cerebellar neurons [25]. LukS-PV/LukF-PV, however, appears to target neutral stores leaving the acidic stores unaltered. Nevertheless, in order to understand how two leukotoxins which bind the same receptor differ with regard to the release of intracellular Ca^{2+} emanating from different compartments, we next focused our attention to the F-Subunits and their ability to target these various compartments.

The F subunit of leukotoxins determines the intracellular compartment releasing Ca^{2+} .

Given that the two S-subunits, which directly associate with C5aR, can form active compounds with either LukF-PV or HlgB [48], the cellular activity of atypical subunit associations was verified in order to discriminate the specific contribution of the F-subunit to Ca^{2+} release. When 1.5 nM HlgC complemented with 15 nM Luk-F-PV was added to neutrophils, a delay in the increase in free $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was observed when compared with HlgC/HlgB (0.5 nM each), with an overall response profile similar to the usual reaction to LukS-PV/LukF-PV (figure 3A, compared to figure 1A blue and red traces). Moreover, when 0.5 nM LukS-PV was complemented with 1 nM HlgB, the free $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase occurred much faster than the effect observed with LukS-PV/LukF-PV (0.25 nM for each subunit) (figure 3B, compared to figure 1A blue and red traces). Furthermore, the activity of HlgC/LukF-PV was

unaltered in cells incubated in the presence of GPN (figure 3C) as previously observed for the usual LukS-PV/LukF-PV response (figure 2C2). Finally, the association of LukS-PV with HlgB presented a sensitivity to GPN similar to that of HlgC/HlgB association (figure 3D, Table 3). These results strengthen the notion of a Ca^{2+} -activating specificity displayed by leukotoxins and defined by the F-subunit, in addition to suggesting the need of a particular environment for each F-subunit to act accordingly.

Only HlgB confers pore forming capabilities to the leukotoxin complex.

The pharmacological sensitivity that differentiates cell responses to each leukotoxin suggests that they also differ in the bearing of pore formation. We therefore investigated pore formation in planar lipid bilayers [49], in large unilamellar vesicles [48] and through determination of membrane resistance in living cells [50]. The S- and F-subunits of the leukotoxins were added in various associations to the cis-side of stable bilayers comprised of diphytanoyl-phosphatidylcholine (DPhPC) after which the current between the two separate chambers was measured. The HlgC/HlgB leukotoxin formed pores with a unitary conductance of 175.6 ± 15.8 pS ($n=280$), which is consistent with previously published values [49,51]; the LukS-PV/HlgB association also formed membrane pores of 184.8 ± 19.5 pS ($n=16$) unitary conductance (figure 4A and 4B). Conversely, the LukS-PV/LukF-PV and the association of HlgC with LukF-PV never assembled as transmembrane pores in this membrane lipid composition. The threshold concentration required to establish a pore was obtained in large unilamellar vesicles (100 nm in diameter), prepared with a 1:1 mixture of dioleoylphosphatidylcholine/cholesterol (DOPC/Ch), and containing 80 mM calcein (pH 7.0). The calcein-related fluorescence released from vesicles enabled to reveal the pores formed by the various associations of leukotoxin subunits. HlgC/HlgB triggered calcein release with a half-concentration effect of 0.5 nM while the combination of LukS-PV and HlgB also generated calcein release with a half concentration effect above 1.5 nM. Conversely, both the LukS-PV/LukF-PV and the HlgC/LukF-PV associations at high concentrations (100 nM) failed to induce calcein release from the vesicles (figure 4C).

Lipid bilayers and liposomes do not include proteins; therefore, the above results apparently challenge the need of a specific protein receptor for the leukotoxins. Therefore, the trans-membrane resistance

(voltage-clamp, whole cell configuration) was recorded in C5aR-transfected cells and in the original U937 cell line in order to detect changes due to leukotoxin treatment, while maintaining the membrane potential at -60 mV. Membrane resistance ($R_m = V/I$, according to Ohms law) was monitored by analyzing the trans-membrane current traces (I) corresponding to changes in trans-membrane potential (V). After a control determination of R_m , the studied leukotoxin was applied to the bath and R_m determined every minute for a minimum of ten minutes. No significant changes were observed in R_m of U937-C5aR transfected cells bathed in a 2 nM solution of LukS-PV/LukF-PV. Figure 5A1 shows a typical example while figure 5A2 summarizes eight independent experiments before and after LukS-PV/LukF-PV addition. In contrast, HlgC/HlgB induced an abrupt decrease in membrane resistance after a 5-min incubation of the cells in the presence of 2 nM of the toxin. Figure 5B1 illustrates an example of a cell treated with HlgC/HlgB while figure 5B2 depicts the resting membrane resistance values before and after addition of the toxin for eight independent cells. Furthermore, certain cells incubated in the presence of the combination of subunits LukS-PV and HlgB (4 nM each) also generated changes in membrane resistance of C5aR-expressing cells. Figure 5C1 illustrates a responding cell while figure 5C2 summarizes the results of resting membrane resistance recordings. Concentrations up to 10 nM HlgC/HlgB failed to induce any modification in membrane resistance in U937 cells (figure 5B1). These results highlight the need of a different environment for each F-subunit in order to efficiently induce the surge in free intracellular Ca^{2+} into the cytosol of a cell expressing the appropriate receptor for the S-subunit.

Both HlgC/HlgB and LukS-PV/LukF-PV are internalized by neutrophils.

Altogether, the above results suggest that the association of either LukS-PV or HlgC to C5aR fails to achieve intracellular Ca^{2+} movements while the association of the F-subunit to the complex initiates the release of Ca^{2+} from diverse internal compartments. To achieve this, the internalization of C5aR in a complex with leukotoxins could provide the latter the possibility of triggering Ca^{2+} release from internal stores. To verify this hypothesis, specific antibodies raised against each S-subunit were used to observe leukotoxin location in human neutrophils following various treatments. Cells incubated in the presence of leukotoxins were fixed and fluorescently stained with the appropriate antibodies,

together with the B-subunit of Cholera toxin (Alexa-488 labeled) to label the plasma membrane. A Leica SP5-II confocal microscope was used to acquire single optical slices of random areas from different preparations. The proportion of cells showing an intense labeling of the membrane was determined for S-subunits alone (figure 6A1: 2 nM LukS-PV and figure 6B1: 2 nM HlgC); cells presenting degradation (condensed nucleus) were discarded from the analysis. The labeling after addition of the corresponding F subunit (figure 6A2: 2 nM LukS-PV/LukF-PV and figure 6B2: 2 nM HlgC/HlgB) showed a translocation of membrane labeling towards the cytosol. A reduction in the proportion of cells with intense membrane labeling was also observed; from 82 % for LukS-PV alone to 52 % after 5 min in the presence of LukS-PV/LukF-PV and 31 % after 10 min. The labeling of cells treated with the HlgC/HlgB subunits followed a similar distribution pattern. However, cell degradation occurred more rapidly than during LukS-PV/LukF-PV incubation with plasma membrane degradation appearing first, as opposed to condensation of the nuclei. Clearly-damaged cells were not included and cells were never incubated for more than 5 min in the presence of the two components in Ca^{2+} -containing buffer. Nevertheless, a significant reduction in membrane-labeled cells was already present after a 5 min incubation with the toxin (figure 6C2). Conversely, cells incubated with the toxins in a Ca^{2+} -free buffer displayed an intense labeling of the plasma membrane suggesting an absence of internalization (figure 6A3: 2 nM LukS-PV/LukF-PV and figure 6B3: 2 nM HlgC/HlgB).

Discussion

It is widely accepted that staphylococcal leukotoxins form pores on particular lipid bi-layers or in unilamellar vesicles [52,53]. However, they specifically target certain cells of the myeloid lineage, while remaining harmless in other cells [19,20]. Moreover, of the two leukotoxins HlgC/HlgB and LukS-PV/LukF-PV, which have been described as recognizing the same membrane receptor on human neutrophils [16], only HlgC/HlgB was able to form pores in lipid bi-layers [48]. This divergence is partially clarified by the finding of human complement receptors C5aR and C5L2 as mediators of LukS-PV/LukF-PV action in neutrophils [32]. C5aR also acts as a receptor for HlgC/HlgB and, by comparing its activity with that of LukS-PV/LukF-PV, we show herein that both leukotoxins induce a rise in intracellular free Ca^{2+} by diverting the C5aR signaling process. The two leukotoxin S-subunits recognize and compete with each other for C5aR expressed in human neutrophils and in stably transfected U937-C5aR cells. The presence of 1.2 nM C5a reduces their binding without altering their affinity for the receptor, which is in agreement with published data highlighting an interaction of the S-subunit with the C5aR N-terminus [32]. There is also a second low-affinity site of interaction between the C5a C-terminus and the core region of the receptor which is critical for receptor activation and which can be challenged by the non peptide antagonist W-54011 [54]. The presence of 20 nM of the antagonist reduced the binding of LukS-PV while the binding of HlgC with the receptor remained unaltered, hence suggesting differences in the interaction of each leukotoxin with the receptor. Other known protein ligands for C5aR include the human ribosomal protein homodimer S19 (hRP S19) [55], a 17 kDa molecular chaperone of Gram-negative bacteria Skp [56] and the Chemotaxis Inhibitory Protein of *S. aureus* (CHIPS) [57]. C5a and hRP S19 act as chemo-attractants and secretagogues [55] while Skp behaves as a pure chemo-attractant factor [58] and CHIPS works as a potent antagonist [59]. Thus, the two leukotoxins expand the number of natural proteins that bind C5aR, while acting differentially on the receptor. It could be expected from binding data that isolated S-subunits act as antagonists on C5aR, which is never the case for complete leukotoxins known to stimulate neutrophils and to cause the secretion of chemotactic factors [17,60]. Isolated S-subunits clearly bound C5aR and the addition of a F-subunit was required to observe changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, which differed to changes due to C5a (figure 1A and 1B). However, combination of diverse concentrations of LukS-PV and LukF-PV led to the observation that 1 nM LukS-PV primed human neutrophils for the

intracellular production of H_2O_2 activated by fMLP or PMA, an effect reversed by LukF-PV in a concentration dependent manner (see figure 8 in [61]). Besides, the immunolabeling results showed that isolated S-subunits remain associated with the extracellular side of the membrane, while binding of both S- and F-subunits to C5aR brings about internalization of the toxin-receptor complex. All this, which is in keeping with the activation of an unexpected signaling pathway, calls for a careful attention to be given to a potential signaling triggered by the binding of a single leukotoxin S-subunit to C5aR.

Herein we focused on intracellular Ca^{2+} concentration changes occurring when C5aR is simultaneously engaged by both S- and F- leukotoxin subunits which, as shown from the pharmacological analysis, differed from receptor activation by C5a. In instances where the C5aR antagonist W-54011 was in direct competition with the leukotoxins, the outcome on LukS-PV/LukF-PV was one of inhibition, while outcome on HlgC/HlgB was rather that of potentiation. Aside from the dissimilar kinetics between the rise in free $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induced by each toxin, the manipulation of distinct intracellular Ca^{2+} stores also differentiates these leukotoxins with regard to their outcome. The alteration of acidic store integrity resulted in a decreased activity of HlgC/HlgB, while leaving LukS-PV/LukF-PV effect unaltered. Conversely, the modification of reticular stores influenced the effect of both leukotoxins. The block of SOCE markedly reduced the extent of HlgC/HlgB-induced Ca^{2+} mobilization, while LukS-PV/LukF-PV-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ movements were accelerated. Interestingly, the targeting of either one of the internal Ca^{2+} stores relied on the F-subunit being present in the complex. As for HlgC/HlgB, the association of HlgB to LukS-PV required a robust acidic store to generate Ca^{2+} changes, while the HlgC/LukF-PV combination necessitated a well Ca^{2+} -loaded reticular compartment as in the case of LukS-PV/LukF-PV. As expected, homologous associations of leukotoxins resulting from individual genetic loci were the most potent, while heterogeneous associations worked at higher concentrations. The present results advocate for a reconsideration of the sequence of events leading to neutrophil lysis. It is generally acknowledged that after the first S-subunit binds to the receptor, the association of four pairs of S- and F-subunits form a pre-pore that will transform in a fully open pore if the latter is accompanied by an increase in free $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [19,24]. However, the unveiled relationship between a particular F-subunit and a distinct intracellular compartment, aimed to release Ca^{2+} , impairs such frame of thinking. The presence of HlgB, associated to a generic S-subunit, was sufficient to induce membrane resistance reduction in artificial lipid membranes and in C5aR expressing cells.

Interestingly, the staphylococcal α -toxin and HlgB are closely related in their structure, both containing a rim domain with a preponderance of exposed aromatic residues and a binding site for phospholipid head groups located in a cleft, which enables the fusion of these leukotoxins to lipids [62]. Likewise to α -toxin, which needs the presence of ADAM10 to initiate self assembly and to engage cell membrane damage [27,28], HlgB likely begins altering membrane integrity through its high affinity association with the C5aR-S-subunit complex. Nevertheless, a subsequent internalization may buffer the process and ultimately transfer the membrane damaging ability of HlgC/HlgB to the endosome. A comparable mechanism it has been suggested for the α -toxin, which could be internalized to prevent pore-complexes to be formed [63]. A similar intracellular progression is likely followed by the LukS-PV/HlgB association. However, inherent properties of LukS-PV/LukF-PV, due to LukF-PV association to a particular receptor [16], may preserve membrane integrity prior to accessing of the complex to a particular environment. This hypothesis, which calls for future studies to be confirmed, is consistent with i) the absence of pore formation in liposomes and cells carrying the receptor, ii) the internalization of LukS-PV/LukF-PV-C5aR complex and iii) the observed delay before the onset of free $[Ca^{2+}]_i$ modifications and pharmacological block. The need for leukotoxins of a receptor that transport them into the cell sheds further light on the fact that sublytic concentrations activate human neutrophils, but fail to lyse the latter [26]. This is of critical importance since low concentrations of staphylococcal leukotoxins are likely those who support certain forms of virulence in *S. aureus* infections. The challenge remains to understand what becomes of a cell having internalized a few leukotoxin molecules after their respective binding to C5aR. This particular threat not only addresses blood cells, but all tissues expressing the C5a receptor, particularly neurons [25,64,65]. Furthermore, a pathogenic intracellular mechanism may start clarifying the controversy about LukS-PV/LukF-PV as a major virulence factor and stresses the need for finding new antivirulence therapies [66,67].

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement. Buffy coats donors were adult volunteers that provided informed consent. Written consent was collected by the “ Etablissement Français du Sang (Strasbourg, France) ”, which kept the information confidential.

Drugs and chemicals. Thapsigargin, Ionomycin, Bafilomycin A1, Glycyl-1-phenylalanine 2-naphthylamide and Triton X-100 were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). (YM-59483) and (trans-Ned-19) were from Tocris Bioscience (Bristol, United Kingdom). (W-54011) and (SB-290157) were from Calbiochem (EMD Millipore, MA, United States) while Fura-2 acetoxymethyl ester (Fura-2/AM) was from Molecular Probes-Invitrogen (Fisher Scientific, Illkirch, France).

Human polymorphonuclear cell (hPMN) preparation. PMNs were prepared from buffy coats obtained from healthy donors of either sex within 24 hours after blood donation (Etablissement Français du Sang, Strasbourg, France) as previously described [68].

Undifferentiated U937 and U937-C5aR cell cultures. Undifferentiated U937 and U937-C5aR cells, which respectively do not express or stably express the C5aR receptor [69], were a generous gift from Pr. J.A. van Strijp (Utrecht University, The Netherlands). Cells were cultured as 50 ml cultures at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere in 250 ml flasks in RPMI-1640 medium supplemented with 10% (v/v) decompartmented fetal calf serum (Life Technologies, Carlsbad, USA) and 0.1% (w/v) of both penicillin and streptomycin (Invitrogen, Paisley, UK).

Leukotoxin purification. The *Staphylococcus aureus* HlgC/HlgB and the Pantón and Valentine leukocidin LukS-PV/LukF-PV were purified as previously described [70]. Leukotoxin mutations and purification were performed as previously described [34].

Leukotoxin labeling. The mutated proteins HlgB S27C, LukS-PV G10C and LukF-PV-Cys were fluorescein-labeled to obtain HlgB*, LukS-PV* and LukF-PV*: 500 µL of 50 µM HlgB S27C, LukS-PV G10C or LukF-PV-Cys were mixed with a 20-fold excess of fluorescein 5-maleimide (Molecular

Probes, Eugene, OR) and were incubated for 1h 30 min in darkness at room temperature in a total volume of 500 μ l in 0.1 M HEPES, 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA (pH 7.8). The mixtures were then desalted and the coupling yield for HlgB*, LukS-PV* or LukF-PV* determined through the ratio of fluorescein ($\epsilon_{492\text{ nm}} = 80,000\text{ cm}^{-1}\text{ mol}^{-1}$) concentration to protein concentration obtained from Bradford titration (Bio-Rad, Ivry sur Seine, France). Only leukotoxins with a coupling yield higher than 0.95 but less than 1 were used in this study.

Spectrofluorimetry. Variations in intracellular free Ca^{2+} levels were determined by recording the Fura-2 fluorescence contained in hPMNs as previously described [68]. Briefly, cells were loaded with 4 μ M Fura-2 AM (FluoProbes[®], Interchim S.A., Montluçon) in EGTA buffer for 45 min in darkness, at room temperature. Thereafter, hPMNs were washed twice and then suspended (3.5×10^6 cells/ml) in EGTA buffer. Two ml of hPMNs were incubated for 5 min with 1.1 mM CaCl_2 in a 4-ml Polystyrene cuvette (1-cm light path). Variations in fluorescence intensity were recorded at 37°C with a dual-excitation spectrofluorometer (Deltascan; PTI, United States) operated in a ratio mode for Fura-2 at excitation wavelengths of 340 and 380 nm (slit widths, 4 nm) and an emission wavelength of 510 nm (slit widths, 4 nm). To compare the effects of different toxins in various conditions, the fluorescent signal was standardized by giving the background, or zero value, before the addition of the toxin and the 100 % value to the fluorescence measured after the addition of Triton X-100 (0.05 %, final concentration) which equilibrates the internal Ca^{2+} concentration with that of buffer content. Results are expressed as percentage of the maximum, after subtraction of the background value.

Planar lipid bilayer experiments. Solvent-free planar lipid bilayers were prepared by the apposition on both sides of a 0.1 mm aperture made in a 25 μ m thick Teflon septum (pretreated with pentane:n-hexadecane 20:1) of two monolayers of diphytanoylphosphatidylcholine (DPhPC, >99% pure from Avanti Polar Lipids) spread from a 5 mg/ml lipid solution in pentane, as described previously [71]. Bicomponent couples were added on one side only (called *cis*) to preformed bilayers; the voltage potential was applied on the *cis* side while the *trans* side was grounded. Macroscopic currents were recorded by a patch clamp amplifier (Axopatch 200; Axon Instruments). A PC equipped with a DigiData 1200 A/D converter (Axon Instruments) was used for data acquisition. Current traces were

filtered at 100 Hz and acquired at 500 Hz using the Axoscope 8 software (Axon Instruments). Measurements were performed at room temperature as described previously [72].

Permeabilization of lipid vesicles. Large unilamellar vesicles (LUV) comprised of a 1:1 molar ratio of dioleoyl phosphatidylcholine/cholesterol (DOPC/Ch) were prepared as previously described [48] by the extrusion method. A suspension of multilamellar liposomes prepared in the presence of 80 mM calcein (Sigma), pH 7.0, was extruded 31 times through polycarbonate membranes with 100 nm pores. Vesicle permeabilization was assayed in a fluorescence microplate reader (Fluostar Galaxy, BMG Germany) with excitation and emission filters at 480 and 540 nm, respectively. The two components of the complex, always at the same concentration, were serially 2-fold diluted in 10 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl and 0.1 mM EDTA, pH 7.0 and dispensed into wells of a 96-well microplate, after which 100 μ l of calcein-loaded LUVs were added at a final lipid concentration of 5 μ M. The time course of calcein release was recorded for 45 min at room temperature and expressed as the increase in fluorescence owing to the dequenching of the released dye when diluted in the external medium. Toxin-induced permeabilizing activity was calculated as: $P(\%) = 100(F_t - F_i)/(F_m - F_i)$ [73] where F_i is the initial fluorescence prior to adding the toxins, F_t the value at time t (i.e. 45 min), and F_m the maximal value after addition of 1 mM Triton X-100. Spontaneous release of calcein was negligible.

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

For single cell electrophysiological recordings, a suspension of 10^4 cells (30 μ l) was transferred to poly-Lysine coated culture dishes; after 5 min, 2 ml of HBSS were added to the cells and the dish moved to the fixed stage of a Nikon upright microscope. Five-5 M Ω micro-electrodes were pulled from borosilicate glass capillaries (Clark Electromedical Instruments, Pangbourne, England), and filled with a solution containing: 135 mM CsMeSO₄, 1 mM MgCl₂, 5 mM NaCl, 10 mM Hepes/CsOH, 4 mM Mg-ATP and 0.4 mM Na₂-GTP, pH = 7.3 adjusted with CsOH. For the electrode approach, cells were observed through a 40x objective, DIC mode. Whole cell membrane currents were recorded at RT (22-24°C) using the patch-clamp technique (Axopatch 200A amplifier; Axon Instruments, Foster City, CA). Cell transmembrane potential was held at -60 mV, while passive transmembrane resistance (R_m) was determined from membrane current changes (ΔI) induced by a series of hyperpolarizing and depolarizing square pulses (ΔV , 200 ms duration, with stepwise 5 mV increments), under voltage-

clamp. This protocol was repeated once every minute throughout the duration of the experiment. The recorded signals were digitized at 20 KHz using a Digidata 1320 (Axon Instruments) and stored on a PC hard drive. Off-line analyses were performed using pClamp-8 (Axon Instruments) software, with previously filtered at 1.5 KHz. For each set of data (i.e. one protocol), R_m was determined by averaging the $\Delta V/\Delta I$ values.

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

Immunocytochemistry. The subcellular localization of leukotoxins in hPMNs was detected using rabbit polyclonal antibodies independently raised against the HlgC, HlgB, LukS-PV and LukF-PV subunits [16,74]. Cells, attached to poly-lysine treated coverslips, were incubated at room temperature for 5 min in the presence of S-subunits alone or the complete leukotoxin and, after washing, were fixed in 4 % (v/v) paraformaldehyde and 4% (w/v) sucrose in phosphate-buffered saline (PBS) for 5 min at room temperature. Cells were then incubated for 30 min in 150 mM glycine in PBS, (for reducing tissue auto-fluorescence), permeabilized for 5 min in chloroform at -20°C and washed in ethanol before rehydration in PBS. Fixed cells were incubated overnight in blocking buffer (10 % FCS, 5mg/ml BSA in PBS), then transferred for 60 min in a 1 $\mu\text{g/ml}$ PBS solution of specific primary antibodies, containing 5 % FCS and 1 mg/ml BSA,. After repeated washings, cells were incubated with Alexa-labeled secondary antibodies (Life Technologies) for 60 min, then washed and incubated 30 min in the presence of a 0.3 $\mu\text{g/ml}$ solution of Alexa-488-labelled Cholera toxin B-subunit (Life Technologies) and 10 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst 32258 (Sigma) for labeling of the plasma membrane and cell nuclei, respectively. Coverslips mounted in Mowiol were stored at 4°C until observation with a Leica SP5-II confocal microscope.

Statistical analysis

Results are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) of at least three independent experiments. Microsoft Excel 2007 was used to calculate the mean of each experimental condition and GraphPad Prism (version 5 for Windows) for preparation of graphs and statistical analysis. Statistical significance of the difference between differently immunolabelled groups was evaluated by one-way Anova followed by Tukey multiple-group comparisons. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Acknowledgements: The authors are particularly grateful to Daniel Keller for constant support, recollection of unpublished results in frequent scientific discussions and the skilful preparation of leukotoxins. The authors thank the Institut Fédératif des Neurosciences IFR37/Strasbourg and the Imaging facility of the IFR37. Thanks to the team of C. Moog (Mécanisme de neutralisation du VIH par les anticorps, UMR-1110) for sharing human neutrophils from buffy coats. The authors also thank Pr. J.A. van Strijp (Utrecht University, The Netherlands) for generously providing U937-C5aR-transfected cells. The authors are extremely grateful to Dr P. Pothier (Sherbrooke, Québec Canada) for his excellent work straightening our defective English.

References

1. Lowy FD (1998) *Staphylococcus aureus* Infections. *New Engl J Med* 339: 520-532.
2. Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Hook M (2014) Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Microbiology* 12: 49-62.
3. Popov L, Kovalski J, Grandi G, Bagnoli F, Amieva MR (2014) Three-Dimensional Human Skin Models to Understand *Staphylococcus aureus* Skin Colonization and Infection. *Frontiers in Immunology* 5.
4. Lappin E, Ferguson AJ (2009) Gram-positive toxic shock syndromes. *The Lancet Infectious Diseases* 9: 281-290.
5. McCormick JK, Yarwood JM, Schlievert PM (2001) Toxic Shock Syndrome and Bacterial Superantigens: An Update. *Annual Review of Microbiology* 55: 77-104.
6. Archer GL (1998) *Staphylococcus aureus*: A Well-Armed Pathogen. *Clin Infect Dis* 26: 1179-1181.
7. Vandenesch F, Lina G, Henry T (2012) *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2: 12.
8. Mellor I, Thomas D, Sansom M (1988) Properties of ion channels formed by *Staphylococcus aureus* delta-toxin. *Biochim Biophys Acta* 942: 280-294.
9. Menestrina G (1986) Ionic channels formed by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin: Voltage-dependent inhibition by divalent and trivalent cations. *The Journal of Membrane Biology* 90: 177-190.
10. Nakamura Y, Oscherwitz J, Cease KB, Chan SM, Munoz-Planillo R, et al. (2013) *Staphylococcus* δ -toxin induces allergic skin disease by activating mast cells. *Nature*.
11. Huseby M, Shi K, Brown CK, Digre J, Mengistu F, et al. (2007) Structure and Biological Activities of Beta Toxin from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 189: 8719-8726.
12. Woodin AM (1960) Purification of the two components of leucocidin from *Staphylococcus aureus*. *Biochem J* 75: 158-165.
13. Otto M (2014) *Staphylococcus aureus* toxins. *Current Opinion in Microbiology* 17: 32-37.
14. Yoong P, Torres VJ (2013) The effects of *Staphylococcus aureus* leukotoxins on the host: cell lysis and beyond. *Current Opinion in Microbiology* 16: 63-69.
15. Alonzo III F, Torres VJ (2013) Bacterial Survival Amidst an Immune Onslaught: The Contribution of the *Staphylococcus aureus* Leukotoxins. *PLoS Pathog* 9: e1003143.
16. Meyer F, Girardot R, Piémont Y, Prévost G, Colin DA (2009) Analysis of the Specificity of Pantone-Valentine Leucocidin and Gamma-Hemolysin F Component Binding. *Infection and Immunity* 77: 266-273.
17. Prévost G, Mourey L, Colin DA, Menestrina G (2001) Staphylococcal poreforming toxins. *Curr Top Microbiol* 257: 53-83.
18. Yamashita K, Kawai Y, Tanaka Y, Hirano N, Kaneko J, et al. (2011) Crystal structure of the octameric pore of staphylococcal γ -hemolysin reveals the β -barrel pore formation mechanism by two components. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 17314-17319.
19. Colin DA, Mazurier I, Sire S, 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.
20. Meunier O, Falkenrodt A, Monteil H, Colin DA (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.

21. Baba Moussa L, Werner S, Colin DA, Mourey L, Pédelacq JD, et al. (1999) Discoupling the Ca^{2+} -activation from the pore-forming function of the bi-component Panton-Valentine leucocidin in human PMNs. *FEBS Letters* 461: 280-286.
22. Joubert O, Viero G, Keller D, Martinez E, Colin DA, et al. (2006) Engineered covalent leucotoxin heterodimers form functional pores: insights into S-F interactions. *Biochem J* 396: 381-389.
23. Miles G, Jayasinghe L, Bayley H (2006) Assembly of the Bi-component Leukocidin Pore Examined by Truncation Mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry* 281: 2205-2214.
24. Staali L, Monteil H, Colin DA (1998) The Staphylococcal Pore-forming Leukotoxins Open Ca^{2+} Channels in the Membrane of Human Polymorphonuclear Neutrophils. *J Membrane Biol* 162: 209-216.
25. Jover E, Tawk MY, Laventie BJ, Poulain B, Prévost G (2013) Staphylococcal Leukotoxins Trigger Free Intracellular Ca^{2+} Rise in Neurons, Signaling through Acidic Stores and Activation of Store-Operated Channels. *Cell Microbiol*.
26. Graves SF, Kobayashi SD, Braughton KR, Whitney AR, Sturdevant DE, et al. (2012) Sublytic concentrations of *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin alter human PMN gene expression and enhance bactericidal capacity. *Journal of Leukocyte Biology* 92: 361-374.
27. Inoshima I, Inoshima N, Wilke GA, Powers ME, Frank KM, et al. (2011) A *Staphylococcus aureus* pore-forming toxin subverts the activity of ADAM10 to cause lethal infection in mice. *Nat Med* 17: 1310-1314.
28. Wilke GA, Bubeck Wardenburg J (2010) Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in *Staphylococcus aureus* α -hemolysin-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 13473-13478.
29. Alonzo III F, Kozhaya L, Rawlings SA, Reyes-Robles T, DuMont AL, et al. (2013) CCR5 is a receptor for *Staphylococcus aureus* leukotoxin ED. *Nature* 493: 51-55.
30. Reyes-Robles T, Alonzo III F, Kozhaya L, Lacy DB, Unutmaz D, et al. (2013) *Staphylococcus aureus* Leukotoxin ED Targets the Chemokine Receptors CXCR1 and CXCR2 to Kill Leukocytes and Promote Infection. *Cell Host & Microbe* 14: 453-459.
31. Zivkovic A, Sharif O, Stich K, Doninger B, Biaggio M, et al. (2011) TLR 2 and CD14 mediate innate immunity and lung inflammation to staphylococcal Panton-Valentine leukocidin in vivo. *J Immunol* 186: 1608-1617.
32. Spaan AN, Henry T, van Rooijen WJ, Perret M, Badiou C, et al. (2013) The staphylococcal toxin panton-valentine leukocidin targets human c5a receptors. *Cell Host Microbe* 13: 584-594.
33. Sumichika H, Sakata K, Sato N, Takeshita S, Ishibuchi S, et al. (2002) Identification of a Potent and Orally Active Non-peptide C5a Receptor Antagonist. *Journal of Biological Chemistry* 277: 49403-49407.
34. Gauduchon V, Werner S, Prévost G, Monteil H, Colin DA (2001) Flow cytometric determination of Panton-Valentine leucocidin S component binding. *Infect Immun* 69: 2390-2395.
35. Ames RS, Lee D, Foley JJ, Jurewicz AJ, Tornetta MA, et al. (2001) Identification of a Selective Nonpeptide Antagonist of the Anaphylatoxin C3a Receptor That Demonstrates Antiinflammatory Activity in Animal Models. *The Journal of Immunology* 166: 6341-6348.
36. Goldsmith ZG, Dhanasekaran DN (2007) G Protein regulation of MAPK networks. *Oncogene* 26: 3122-3142.
37. Monk PN, Scola AM, Madala P, Fairlie DP (2007) Function, structure and therapeutic potential of complement C5a receptors. *British Journal of Pharmacology* 152: 429-448.
38. Mathieu M-C, Sawyer N, Greig GM, Hamel M, Kargman S, et al. (2005) The C3a receptor antagonist SB 290157 has agonist activity. *Immunology Letters* 100: 139-145.
39. Proctor LM, Arumugam TV, Shiels I, Reid RC, Fairlie DP, et al. (2004) Comparative anti-inflammatory activities of antagonists to C3a and C5a receptors in a rat model of intestinal ischaemia/reperfusion injury. *British Journal of Pharmacology* 142: 756-764.

40. Laude AJ, Simpson AWM (2009) Compartmentalized signalling: Ca^{2+} compartments, microdomains and the many facets of Ca^{2+} signalling. *FEBS Journal* 276: 1800-1816.
41. Periasamy M, Kalyanasundaram A (2007) SERCA pump isoforms: Their role in calcium transport and disease. *Muscle and nerve* 35: 430-442.
42. Fasolato C, Zottini M, Clementi E, Zacchetti D, Meldolesi J, et al. (1991) Intracellular Ca^{2+} pools in PC12 cells. Three intracellular pools are distinguished by their turnover and mechanisms of Ca^{2+} accumulation, storage, and release. *Journal of Biological Chemistry* 266: 20159-20167.
43. Galione A, Morgan AJ, Arredouani A, Davis LC, Rietdorf K, et al. (2010) NAADP as an intracellular messenger regulating lysosomal calcium-release channels. *Biochemical Society Transactions* 38: 1424-1431.
44. Möller T, Nolte C, Burger R, Verkhratsky A, Kettenmann H (1997) Mechanisms of C5a and C3a Complement Fragment-Induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Signaling in Mouse Microglia. *The Journal of Neuroscience* 17: 615-624.
45. Norgauer J, Dobos G, Kownatzki E, Dahinden C, Burger R, et al. (1993) Complement fragment C3a stimulates Ca^{2+} influx in neutrophils via a pertussis-toxin-sensitive G protein. *European Journal of Biochemistry* 217: 289-294.
46. Rosen D, Lewis AM, Mizote A, Thomas JM, Aley PK, et al. (2009) Analogues of the Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate (NAADP) Antagonist Ned-19 Indicate Two Binding Sites on the NAADP Receptor. *Journal of Biological Chemistry* 284: 34930-34934.
47. Ishikawa J, Ohga K, Yoshino T, Takezawa R, Ichikawa A, et al. (2003) A pyrazole derivative, YM-58483, potentially inhibits store-operated sustained Ca^{2+} influx and IL-2 production in T lymphocytes. *J Immunol* 170: 4441-4449.
48. Ferreras M, Höper F, Dalla Serra M, Colin DA, Prévost G, et al. (1998) The interaction of *Staphylococcus aureus* bi-component γ -hemolysins and leucocidins with cells and lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1414: 108-126.
49. Comai M, Serra MD, Coraiola M, Werner S, Colin DA, et al. (2002) Protein engineering modulates the transport properties and ion selectivity of the pores formed by staphylococcal γ -haemolysins in lipid membranes. *Molecular Microbiology* 44: 1251-1267.
50. Lonchamp E, Dupont J-L, Wioland L, Courjaret RI, Mbebi-Liegeois C, et al. (2010) *Clostridium perfringens* Epsilon Toxin Targets Granule Cells in the Mouse Cerebellum and Stimulates Glutamate Release. *PLoS ONE* 5: e13046.
51. Dalla Serra M, Coraiola M, Viero G, Comai M, Potrich C, et al. (2005) *Staphylococcus aureus* Bicomponent γ -Hemolysins, HlgA, HlgB, and HlgC, Can Form Mixed Pores Containing All Components. *Journal of Chemical Information and Modeling* 45: 1539-1545.
52. Alonzo F, Torres VJ (2014) The Bicomponent Pore-Forming Leucocidins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 78: 199-230.
53. Menestrina G, Dalla Serra M, Comai M, Coraiola M, Viero G, et al. (2003) Ion channels and bacterial infection: the case of β -barrel pore-forming protein toxins of *Staphylococcus aureus*. *FEBS Letters* 552: 54-60.
54. Klos A, Wende E, Wareham KJ, Monk PN (2013) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXVII. Complement Peptide C5a, C4a, and C3a Receptors. *Pharmacological Reviews* 65: 500-543.
55. Nishiura H, Chen J, Ota Y, Semba U, Higuchi H, et al. (2010) Base of molecular mimicry between human ribosomal protein S19 dimer and human C5a anaphylatoxin. *International Immunopharmacology* 10: 1541-1547.
56. Shrestha A, Shi L, Tanase S, Tsukamoto M, Nishino N, et al. (2004) Bacterial Chaperone Protein, Skp, Induces Leukocyte Chemotaxis via C5a Receptor. *The American Journal of Pathology* 164: 763-772.

57. de Haas CJC, Veldkamp KE, Peschel A, Weerkamp F, Van Wamel WJB, et al. (2004) Chemotaxis Inhibitory Protein of *Staphylococcus aureus*, a Bacterial Antiinflammatory Agent. The Journal of Experimental Medicine 199: 687-695.
58. Jia N, Semba U, Nishiura H, Kuniyasu A, Nsima TK, et al. (2010) Pivotal Advance: Interconversion between pure chemotactic ligands and chemoattractant/secretagogue ligands of neutrophil C5a receptor by a single amino acid substitution. Journal of Leukocyte Biology 87: 965-975.
59. Postma B, Kleibeuker W, Poppelier MJG, Boonstra M, Van Kessel KPM, et al. (2005) Residues 10-18 within the C5a Receptor N Terminus Compose a Binding Domain for Chemotaxis Inhibitory Protein of *Staphylococcus aureus*. Journal of Biological Chemistry 280: 2020-2027.
60. Perret M, Badiou C, Lina G, Burbaud S, Benito Y, et al. (2012) Cross-talk between *Staphylococcus aureus* leukocidins-intoxicated macrophages and lung epithelial cells triggers chemokine secretion in an inflammasome-dependent manner. Cellular Microbiology 14: 1019-1036.
61. Colin DA, Monteil H (2003) Control of the Oxidative Burst of Human Neutrophils by Staphylococcal Leukotoxins. Infection and Immunity 71: 3724-3729.
62. Olson R, Nariya H, Yokota K, Kamio Y, Gouaux E (1999) Crystal structure of Staphylococcal LukF delineates conformational changes accompanying formation of a transmembrane channel. Nat Struct Mol Biol 6: 134-140.
63. Husmann M, Beckmann E, Boller K, Kloft N, Tenzer S, et al. (2009) Elimination of a bacterial pore-forming toxin by sequential endocytosis and exocytosis. FEBS Letters 583: 337-344.
64. Bénard M, Gonzalez BJ, Schouft M-T, Falluel-Morel A, Vaudry D, et al. (2004) Characterization of C3a and C5a Receptors in Rat Cerebellar Granule Neurons during Maturation: Neuroprotective Effect of C5a Against Apoptotic Cell Death. Journal of Biological Chemistry 279: 43487-43496.
65. Rothermel E, Götze O, Zahn S, Schlaf G (2000) Analysis of the Tissue Distribution of the Rat C5a Receptor and Inhibition of C5a-Mediated Effects Through the Use of Two MoAbs. Scandinavian Journal of Immunology 52: 401-410.
66. Otto M (2013) Community-associated MRSA: What makes them special? International Journal of Medical Microbiology 303: 324-330.
67. Watkins RR, David MZ, Salata RA (2012) Current concepts on the virulence mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Medical Microbiology 61: 1179-1193.
68. Finck-Barbançon V, Duportail G, Meunier O, Colin DA (1993) Pore formation by a two-component leukocidin from *Staphylococcus aureus* within the membrane of human polymorphonuclear leukocytes. Biochim Biophys Acta 1182: 275-282.
69. Kew RR, Peng T, DiMartino SJ, Madhavan D, Weinman SJ, et al. (1997) Undifferentiated U937 cells transfected with chemoattractant receptors: a model system to investigate chemotactic mechanisms and receptor structure/function relationships. J Leukoc Biol 61: 329-337.
70. Werner S, Colin DA, Coraiola M, Menestrina G, Monteil H, et al. (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.
71. Dalla Serra M, Menestrina G (2000) Characterization of Molecular Properties of Pore-Forming Toxins with Planar Lipid Bilayers. Bacterial Toxins: Methods and Protocols: Humana Press. pp. 171-188.
72. Laventie BJ, Potrich C, Atmanene C, Saleh M, Joubert O, et al. (2013) p-Sulfonato-calix[n]arenes inhibit staphylococcal bicomponent leukotoxins by supramolecular interactions. Biochem J 450: 559-571.
73. Couppié P, Prévost G (1997) Les Leucotoxines Staphylococciques. Ann Dermatol Vénéréol 124: 740-748.

74. Finck-Barbançon V, Prévost G, Piémont Y (1991) Improved purification of leukocidin from *Staphylococcus aureus* and toxin distribution among hospital strains. Res Microbiol 142: 75-85.

Figure legends

Figure 1: After binding to C5aR, the leukotoxins trigger a rise in intracellular Ca^{2+} according to pathways that are distinct from the C5a peptide.

All traces of the left panels (panels A-C-E-G) are from recordings in human neutrophils and traces in the right panels (panels B-D-F-H) were obtained in U937-C5aR transfected cells. The effects of 1.2 nM C5a (green), 0.25 nM LukS-PV/LukF-PV (red) and 0.5 nM HlgC/HlgB (blue) are compared in panels **A** (human neutrophils) and **B** (U937-C5aR cells). Control recordings indicating the lack of activity of the isolated S-subunits are also shown in **A** (5 nM HlgC, light blue trace, 2.5 nM LukS-PV orange trace). The black trace in panels **A** and **B** depicts the recorded baseline in human neutrophils and U937-C5aR cells in the absence of toxins. Panels **C** to **H** show the response of human neutrophils (**C**, **E** and **G**) and U937-C5aR cells (**D**, **F** and **H**) to 1.2 nM C5a, 0.25 nM LukS-PV/LukF-PV or 0.5 nM HlgC/HlgB (dark blue), in the presence of 20 nM W-54011 (red) or 1 μM SB-290157 (green). The light blue trace in panels **C** and **D** represent the response to 1 μM thapsigargin and the grey trace in panel **D** to 1 μM ionomycin. The inset in panel **D** shows the lack of response of the non-transfected U937 cell line to the presence of 12 nM C5a (orange), 0.1 μM LukS-PV/LukF-PV (green) or 0.1 μM HlgC/HlgB (red) and the control recording (blue). Results are normalized to the maximum Fura-2 fluorescent signal obtained after bathing the cells in 0.05 % Triton X-100 to equilibrate $[\text{Ca}^{2+}]_i$ with that of the buffer concentration, after which data are expressed as percentage of this value.

Figure 2: The origin of free intracellular Ca^{2+} stems from separate compartments and depends on the identity of the leukotoxin.

As indicated, the panels on the left show recordings of 0.5 nM HlgC/HlgB leukotoxin and panels on the right show recordings of 0.25 nM LukS-PV/LukF-PV in human neutrophils (blue traces in all cases). The red traces depict recordings in cells incubated with various drugs prior to addition of the corresponding leukotoxin: panels **A 1-2** are for the NAADP antagonist Ned19 (100 μM), panels **B 1-2** the H^+ -ATPase blocker bafilomycin (100 nM), panels **C 1-2** the lysosomal disrupter glycyl-phenylalanine 2-naphthylamide GPN (50 μM), panels **D 1-2** 1 μM thapsigargin, panels **E 1-2** 1 μM ionomycin and panels **F 1-2** the SOCE blocker pyrazole derivative YM-58483 (10 μM). Results are normalized to the maximum Fura-2 fluorescent signal obtained after bathing the cells in 0.05 % Triton

X-100 to equilibrate $[Ca^{2+}]_i$ with that of buffer concentration, then expressed as a percentage of this value.

Figure 3: The F-subunit of the HlgC/HlgB and LukS-PV/LukF-PV bicomponent leukotoxins carries the specificity for releasing Ca^{2+} from acidic stores (HlgB) or neutral stores (LukF-PV).

A: HlgC/HlgB (both 0.5 nM, in blue) and HlgC/LukF-PV (1.5/15 nM, in red). **B:** LukS-PV/LukF-PV (both 0.25 nM, in blue) and LukS-PV/HlgB (0.5/1 nM, in red). **C:** control recording of 1.5/15 nM HlgC/LukF-PV (in blue) and GPN-treated cells prior to the addition of HlgC/LukF-PV (in red). **D:** control recording of 0.5/1nM LukS-PV/HlgB subunits (in blue) and GPN-treated cells prior to the addition of LukS-PV/HlgB (in red). Results are normalized to the percent maximum Fura-2 fluorescent signal obtained after bathing the cells in 0.05 % Triton X-100 to equilibrate $[Ca^{2+}]_i$ with that of buffer concentration. The use of these concentrations highlights the similarity between the responses of HlgC/LukF-PV and the LukS-PV/LukF-PV and those between HlgC/HlgB and LukS-PV/HlgB.

Figure 4: The presence of HlgB is necessary for pore formation in lipid bilayers.

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

Figure 5: The HlgB F-subunit confers to the two-component leukotoxins the capability of dropping the membrane resistance of U937-C5aR transfected cells.

A: the membrane resistance of C5aR-transfected cells recorded in the presence of 2 nM LukS-PV/LukF-PV remained constant over a 10-min incubation period. **A1** shows the R_m recording of a

representative cell. The histogram in **A2** assembles the R_m values of eight independently recorded cells prior to and 10 min after the addition of 2 nM LukS-PV/LukF-PV. **B**: the R_m of C5aR-transfected cells dropped dramatically in the presence of 2 nM HlgC/HlgB, whereas it remained elevated in non-transfected U937 cells. **B1** shows the membrane resistance recording of a C5aR cell incubated in the presence of 2 nM HlgC/HlgB (black) compared to a representative recording of a non-transfected U937 cell (in red) recorded in the presence of 10 nM HlgC/HlgB. **B2** summarizes membrane resistance values for ten independent experiments prior to and after the addition of 2 nM HlgC/HlgB (10 min). **C**: C5aR-transfected cells were challenged by a 4 nM solution of LukS-PV/HlgB combination. Membrane resistance dropped in 50 % of the cells after an 8-min incubation with the latter combination while in the remaining half, membrane resistance remained unchanged for more than 10 min. **C1** shows the R_m recording a C5aR cell incubated in the presence of the LukS-PV/HlgB combination and **C2** the R_m values prior to addition of LukS-PV/HlgB and after a 10-min incubation in seven independent experiments.

Figure 6: The association of the F-subunit to the S-subunit attached to the C5a receptor facilitates the internalization of the resulting complex.

After a 10-min incubation of human neutrophils in the presence of 2 nM of isolated S-subunits, labeling with toxin-specific antibodies against Luk-S PV (panel **A1**) and HlgC (panel **B1**) was associated with the plasma membrane. The addition of the normally-associated F-subunit for 2 to 5 min induced an attenuation of membrane labeling likely due to the internalization of the complex. **A2**: representative example of cells labeled after a 5-min incubation in a 2 nM solution of LukS-PV/LukF-PV; **A3**: cells labeled after a 10-min incubation in a 2 nM LukS-PV/LukF-PV solution in Ca^{2+} free buffer. **B2**: representative example of cells labeled after a 5-min incubation in 2 nM HlgC/HlgB; **B3**: cells labeled after a 10-min incubation in a 2 nM HlgC/HlgB solution in Ca^{2+} free buffer. The labeled neutrophils presented in panels **A1** and **B1** are representative of the aspect of counted cells included in the histograms presented in **C1** and **C2**, which summarize the percentage of human neutrophils exhibiting fluorescent staining with the specific antibodies associated with the plasma membrane under various incubation conditions indicated under each column. Antibodies are specific for the S-subunits.

Supplementary figure 1: Leukotoxins that bind C5aR do not require extracellular Ca^{2+} to induce $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase. Recordings of LukS-PV/LukF-PV (**A**) or HlgC/HlgB-induced (**B**) rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in human neutrophils in 1 mM Ca^{2+} -containing buffer (blue traces) or in Ca^{2+} -free-EGTA buffer (red traces).

Supplementary figure 2: Extracellular Ca^{2+} is required for the permeated leukotoxin membrane to allow Ethidium Bromide leaking into human neutrophils. Mean fluorescence intensity of human neutrophils staining by Ethidium bromide diffusion due to LukS-PV/LukF-PV (**A**) or HlgC/HlgB (**B**) incubation. Blue traces illustrate recordings in Ca^{2+} -free-EDTA buffer, while red traces were obtained in 1 mM Ca^{2+} containing buffer. Data were obtained using a FACSort cytometer equipped with a 15-mW argon laser tuned to 488 nm. Ethidium bromide fluorescence was recorded at a 650 nm wavelength.

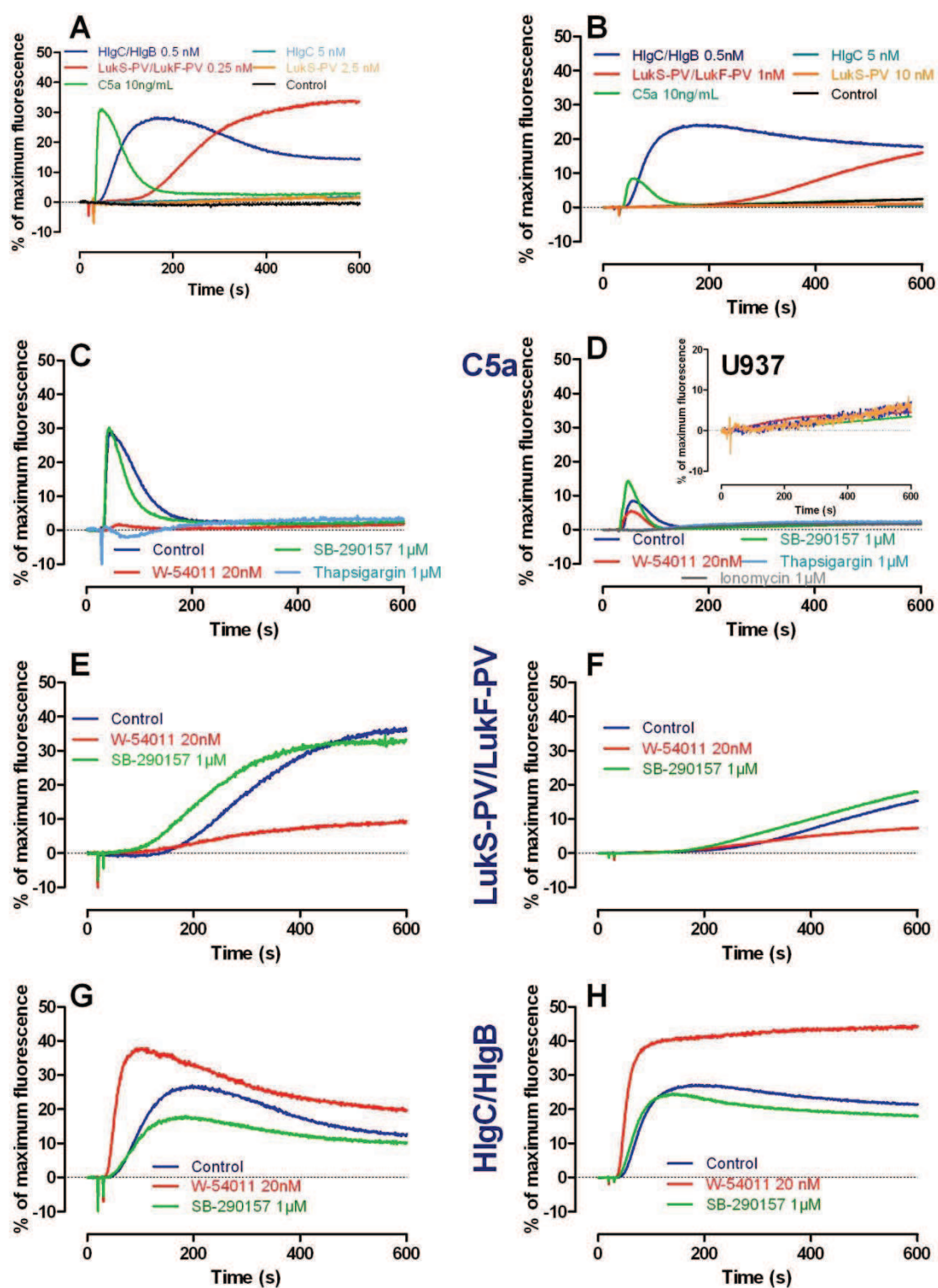


Figure 1

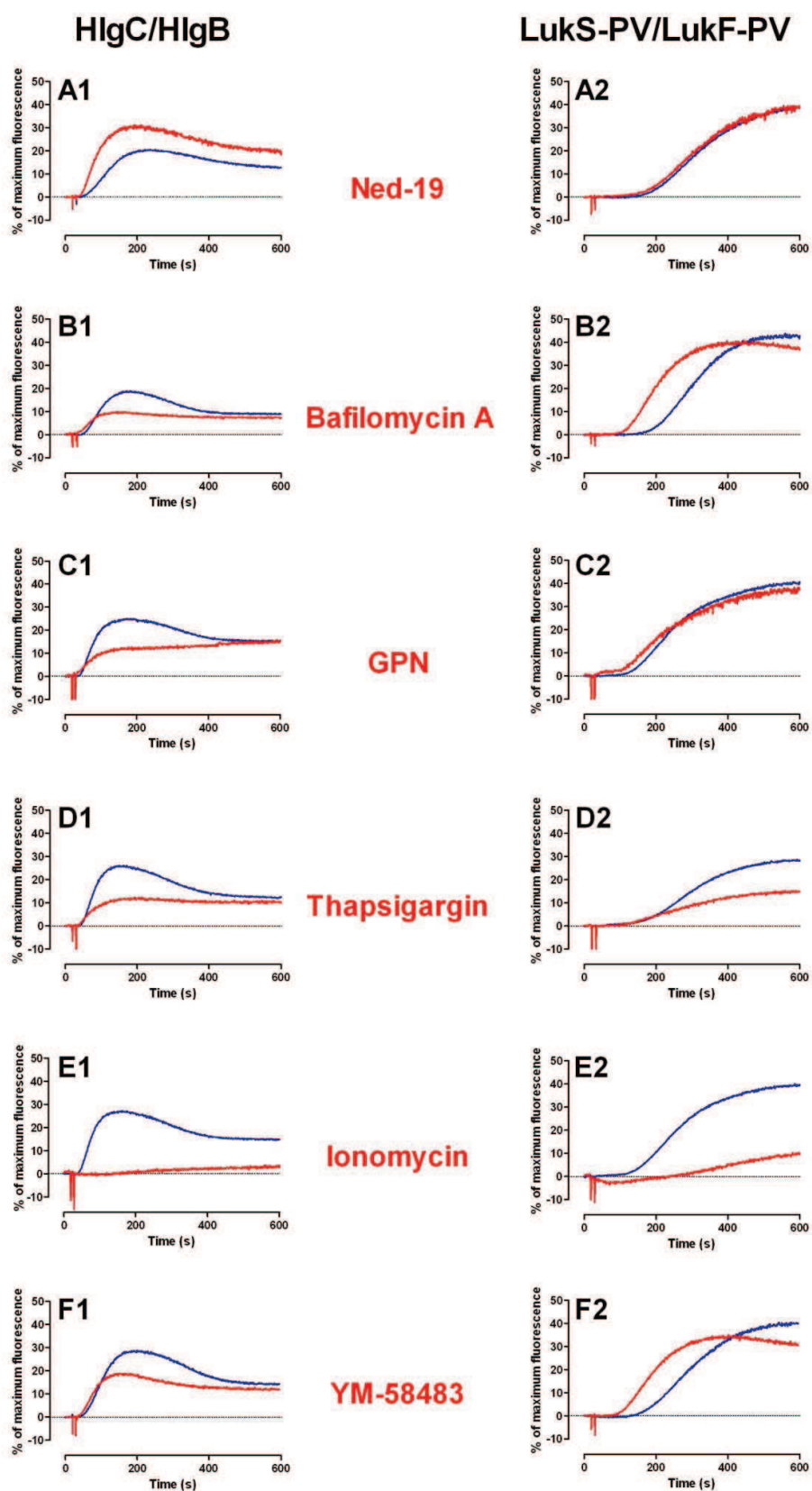


Figure 2

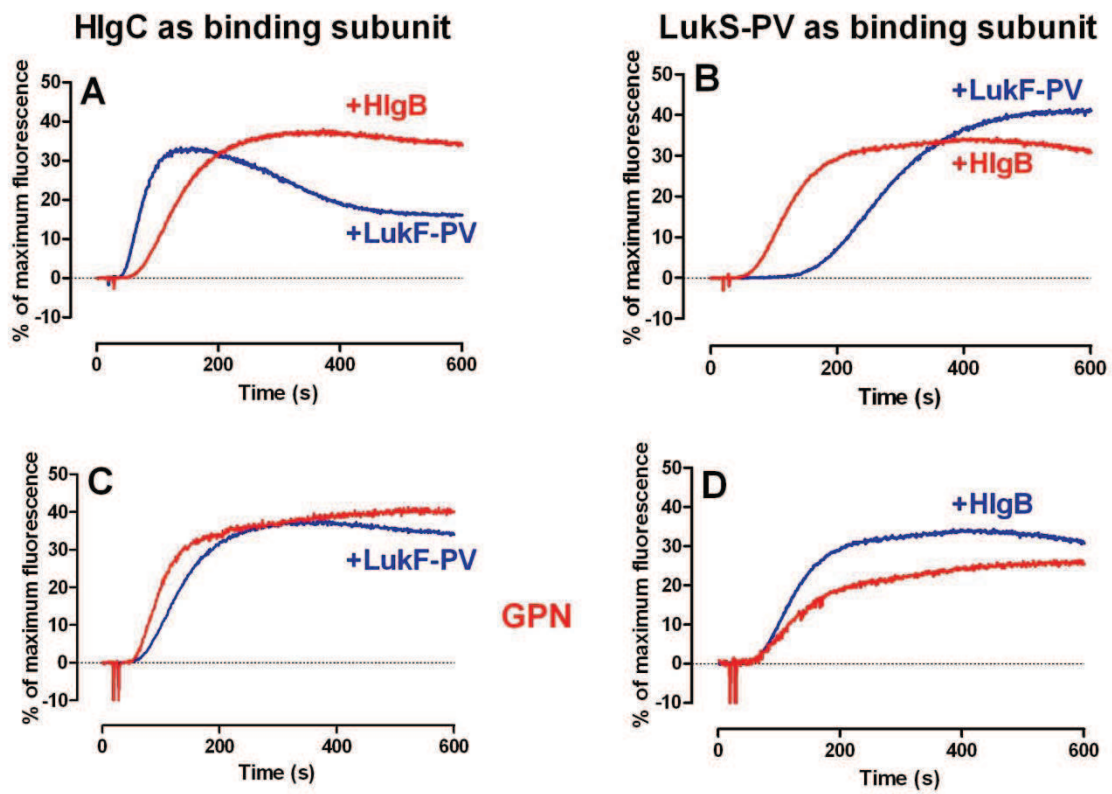


Figure 3

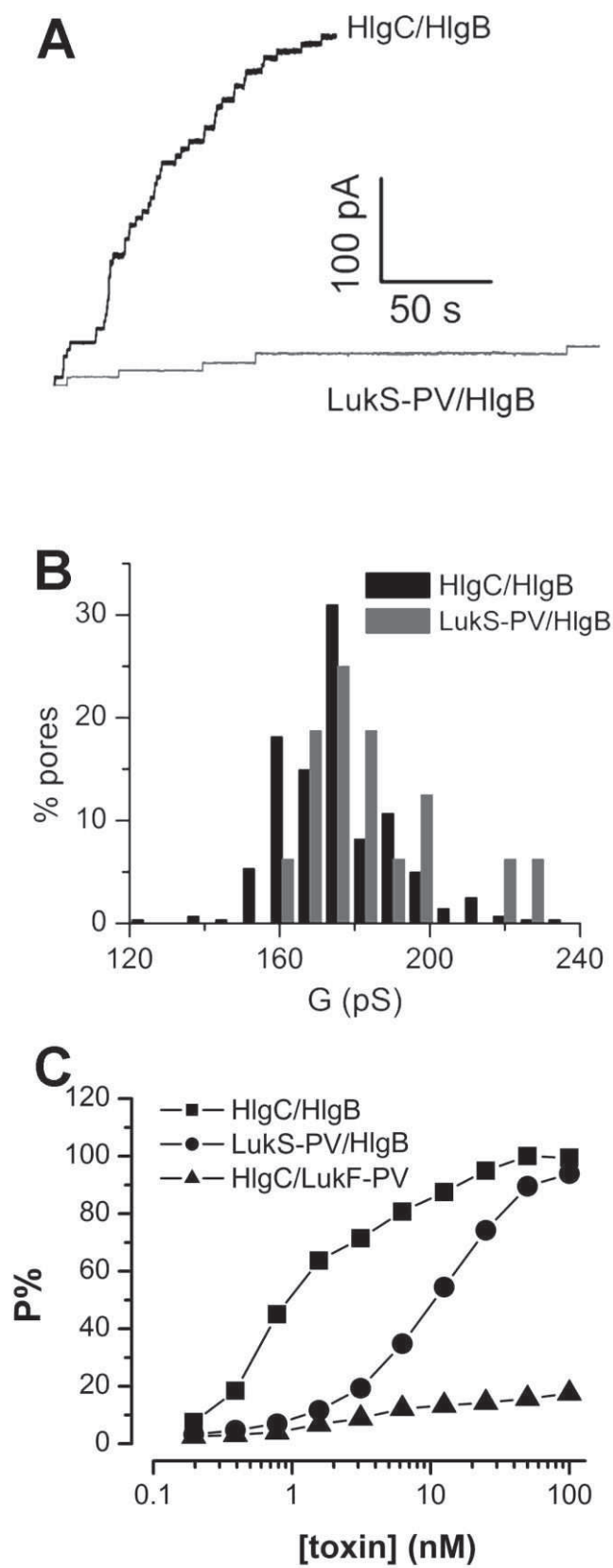


Figure 4

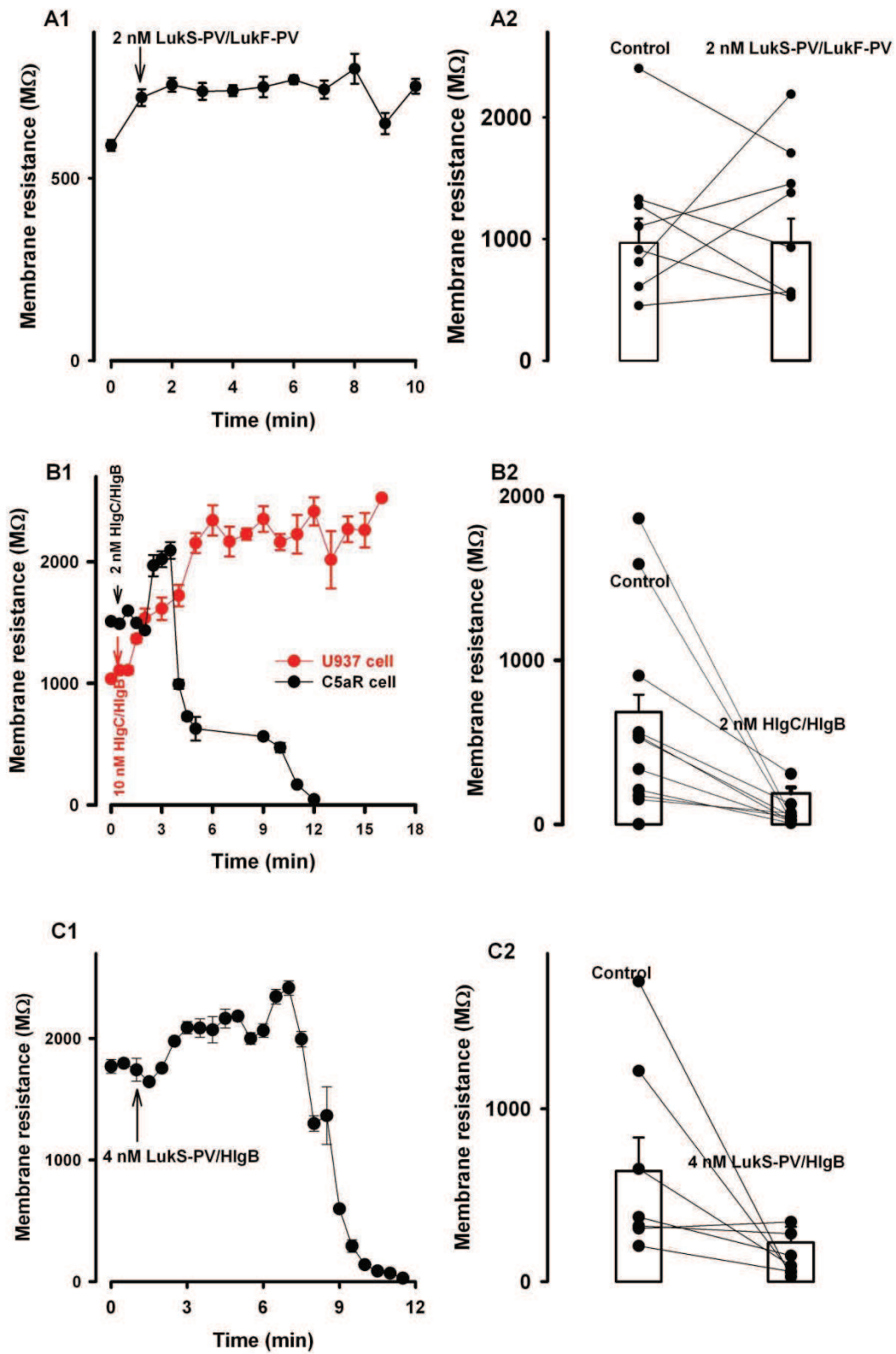


Figure 5

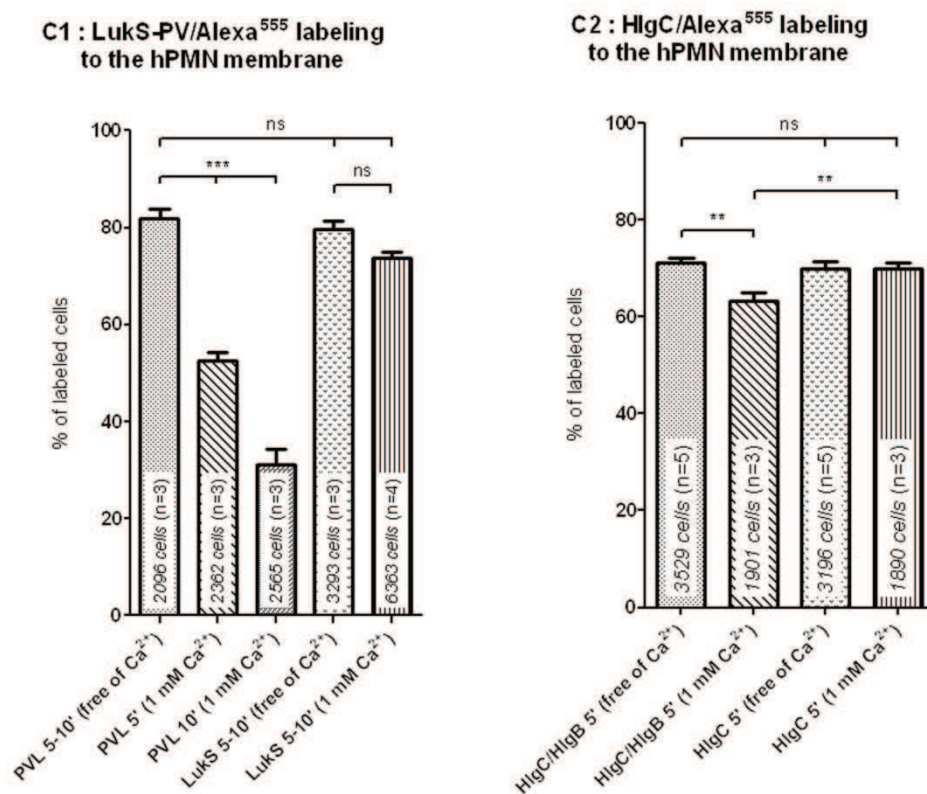
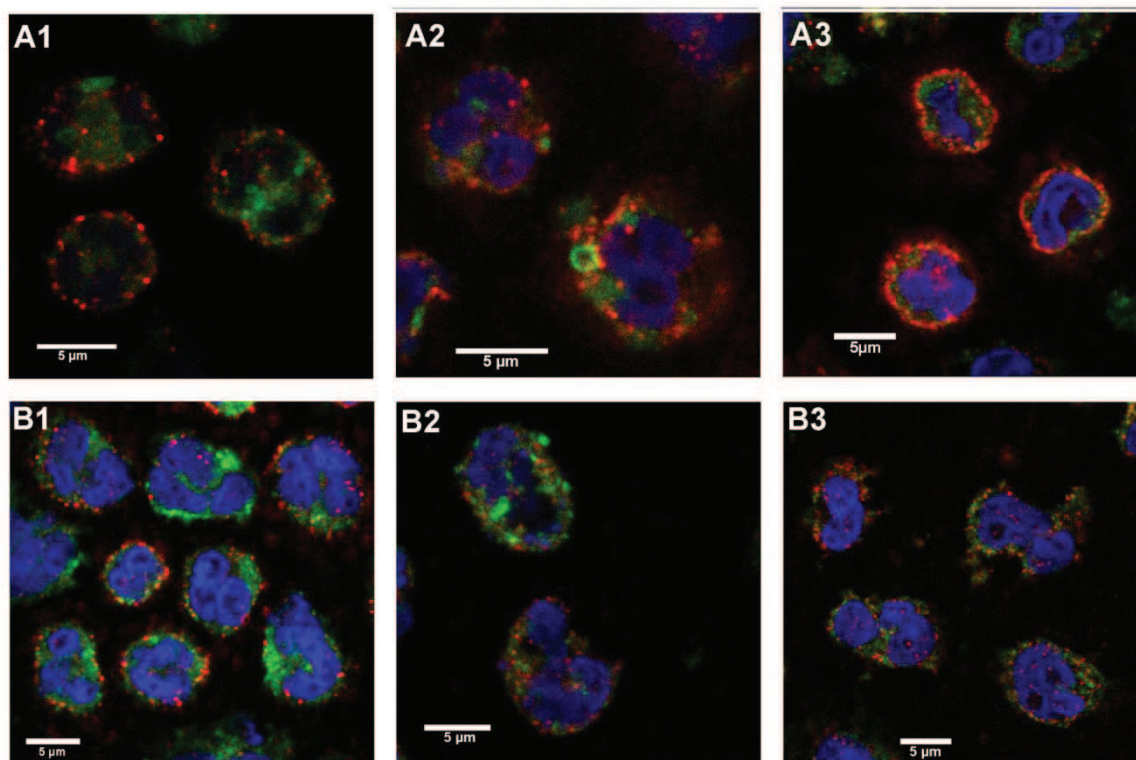
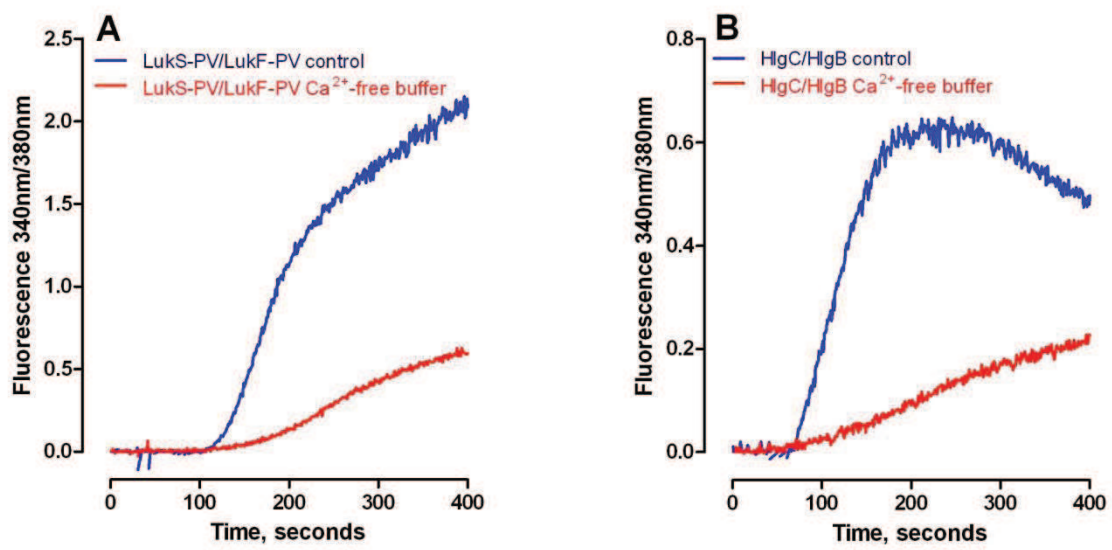
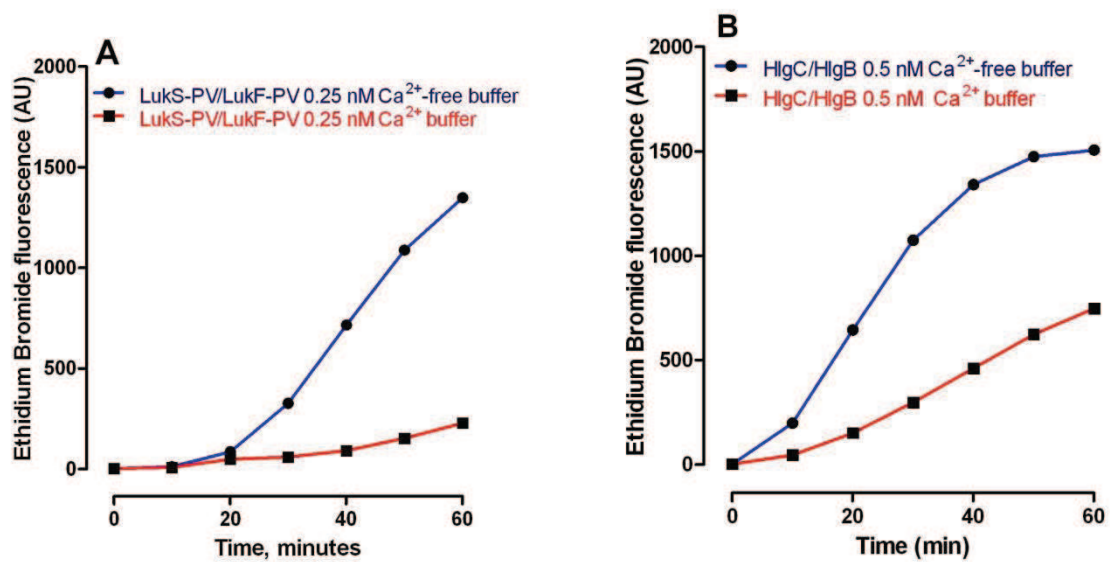


Figure 6



Supplementary figure 1



Supplementary figure 2

Tables

Human Neutrophils:	Control	1.2 nM C5a	20 nM W-54011
LukS-PV-Fluorescein labeled	0.21 ± 0.04 nM	0.35 ± 0.05 nM	0.49 ± 0.08 nM
LukS-PV-Fluorescein/ Luk-F-PV	0.17 ± 0.02 nM	0.30 ± 0.02 nM	0.48 ± 0.02 nM
LukS-PV / LukF-PV-Fluorescein labeled	15.35 ± 1.78 nM	15.17 ± 2.44 nM	18.3 ± 2.44 nM
Ki HlgC competition / LukS-PV-Fluorescein labeled	0.16 ± 0.05 nM	irrelevant	irrelevant
HlgC / HlgB Fluorescein labeled	0.87 ± 0.12 nM	1.16 ± 0.15 nM	0.68 ± 0.10 nM
U937-C5aR :	Control	1.2 nM C5a	20 nM W-54011
LukS-PV-Fluorescein labeled	0.32 ± 0.13 nM	0.43 ± 0.17 nM	0.37 ± 0.16 nM
LukS-PV-Fluorescein/ LukF-PV	0.29 ± 0.05 nM	0.38 ± 0.08 nM	0.58 ± 0.12 nM
LukS-PV / LukF-PV-Fluorescein labeled	35.34 ± 9.13 nM	35.16 ± 0.42 nM	29.22 ± 8.05 nM
Ki HlgC competition / LukS-PV-Fluorescein labeled	0.18 ± 0.14 nM	irrelevant	irrelevant
HlgC / HlgB Fluorescein labeled	2.16 ± 0.42 nM	2.21 ± 0.45 nM	1.33 ± 0.24 nM

Table 1. - Dissociation constants of the S-subunits of LukS-PV/LukF-PV and HlgC/HlgB in human neutrophils and in the U937-C5aR cell line alone or in the presence of the C5a peptide and the W-54011 antagonist.

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

Table 2. - Effect of the C5a peptide and the antagonist W-54011 on leukotoxin binding to C5aR in human neutrophils and in the U937-C5aR cell line. The high affinity antagonist of the C3a receptor, SB-290157 [35], had no significant effect on leukotoxin binding.

		HlgC/HlgB	LukS-PV/LukF-PV	LukS-PV/HlgB	HlgC/LukF-PV
Drug Target	Compound				
Acidic Endo-lysosome	Bafilomycin	52,9 +/- 5,8 (n=2)	92,7 +/- 2,6 (n=2)		
	GPN	61,9 +/- 2,0 (n=4)	95,2 +/- 4,8 (n=3)	82,8 +/- 11,4 (n=3)	110,3 +/- 8 (n=3)
Two-pore channel Endosome	Ned-19	155,3 +/- 12,0 (n=3)	102,5 +/- 7,5 (n=3)		
Neutral reticulum	Thapsigargin	50,4 +/- 3,5 (n=3)	55,1 +/- 4,8 (n=4)		
	Ionomycin	18,3 +/- 5,5 (n=5)	29,8 +/- 8,2 (n=4)		
SOCE	YM-58483	64,9 +/- 13,1 (n=3)	87,6 +/- 5,8 (n=3)		

Table 3. - Effect of internal Ca^{2+} stores alteration by various drugs on the leukotoxins-induced rise in free intracellular $[\text{Ca}^{2+}]_i$. The results represent the mean values +/- SEM of the percentage of the maximum $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in cells incubated with the respective drugs versus untreated cells in the same experiment. SOCE: store-operated Ca^{2+} entry.

Dans cette publication, les effets de HlgC/HlgB et de la LPV ont souligné que la formation d'un pore à la membrane plasmique ne représente pas l'effet majeur de ces leucotoxines bipartites. Bien que le récepteur de la sous-unité de classe S soit le C5aR, la fixation d'une seule sous-unité n'est pourtant pas suffisante pour déclencher une signalisation qui nécessite la présence de la sous-unité de classe F. De plus, les deux leucotoxines pouvant partager le même récepteur ne déclenchent pas les mêmes voies de signalisations calciques, ce qui a été montré par les effets différents des inhibiteurs sur la signalisation calcique déclenchée par les deux leucotoxines. La sous-unité de classe F semble être la clé pour définir la voie suivie. Enfin, ces leucotoxines semblent être internalisées, mais des analyses plus détaillées suivent ces travaux.

EFFET DE LA $[Ca^{2+}]$ EXTRACELLULAIRE SUR L'ACTION DE HLGC/HLGB ET DE LA LPV SUR LES HPMNS

Nous avons montré que les leucotoxines HlgC/HlgB et la LPV induisent la libération du Ca^{2+} des stocks intracellulaires, ce qui nous a conduit à nous interroger sur le rôle du Ca^{2+} extracellulaire sur l'effet des leucotoxines.

L'absence de Ca^{2+} extracellulaire réduit d'une manière très importante la modification de la $[Ca^{2+}]$ libre dans le cytosol (Figure III.2), ce qui montre que le Ca^{2+} extracellulaire joue un rôle important qui pourrait influencer la fixation de la toxine sur les hPMNs qui nécessiterait la présence du Ca^{2+} extracellulaire.

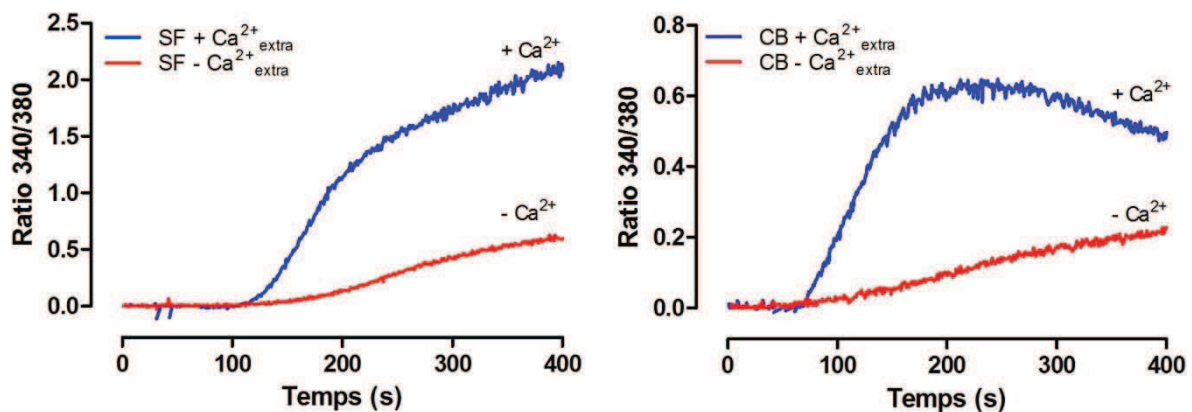


Figure III. 2 : Effets de HlgC/HlgB et la LPV sur la variation de la $[Ca^{2+}]_i$ libre en présence et en absence de Ca^{2+} extracellulaire.

Augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ suite à l'action de la LPV (gauche) et de HlgC/HlgB (droite) en présence (bleu) et en absence (rouge) de Ca^{2+} extracellulaire.

Ceci a été approfondi par cytométrie en flux en mesurant la fluorescence des toxines marquées fixées sur la membrane des hPMNs. En présence de Ca^{2+} extracellulaire, la fixation de LukS*-PV/LukF-PV et HlgC/HlgB* chute après 20 min suite à l'ajout des leucotoxines alors que la fluorescence atteint un plateau et reste stable en absence de Ca^{2+} extracellulaire. Cependant, en absence de la sous-unité de classe F, la fluorescence de LukS*-PV atteint le maximum et reste stable indépendamment du Ca^{2+} extracellulaire (Figure III.3). Ceci permet de refuter l'hypothèse de la fixation des leucotoxines dépendante du Ca^{2+} extracellulaire. Mais, cette diminution de la fluorescence corrèle avec les résultats montrant l'internalisation des leucotoxines par microscopie confocale. L'endocytose étant un mécanisme dépendant du calcium, la fixation des deux sous-unités induit l'internalisation de la leucotoxine avec son récepteur en présence de calcium, diminuant ainsi le nombre de récepteurs accessibles sur la membrane plasmique et empêchant une fixation supplémentaire de toxines marquées.

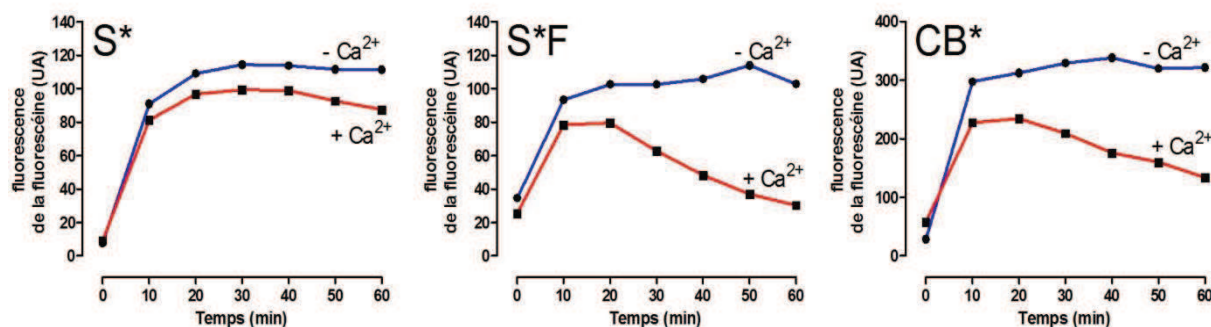


Figure III. 3 : Effet du Ca^{2+} extracellulaire sur la fixation des leucotoxines

Fixation de LukS*-PV (A), de LukS*-PV/LukF-PV (B) et de HlgC/HlgB*(C) en absence (bleu) et en présence (rouge) de Ca^{2+} extracellulaire.

De plus, l'internalisation des leucotoxines semble avoir un autre effet sur leur mode d'action. En effet, en présence de Ca^{2+} extracellulaire, l'entrée de bromure d'éthidium (BET) dans les cellules sous l'effet des leucotoxines diminue de manière remarquable (Figure III.4). Le BET est un marqueur des acides nucléiques qui ne peut rentrer dans les cellules que suite à l'endommagement de la membrane plasmique sous l'effet des leucotoxines. Ces résultats suggèrent que la présence de Ca^{2+} extracellulaire retarde l'altération de la membrane plasmique, et impose peut-être un autre chemin cellulaire aux leucotoxines.

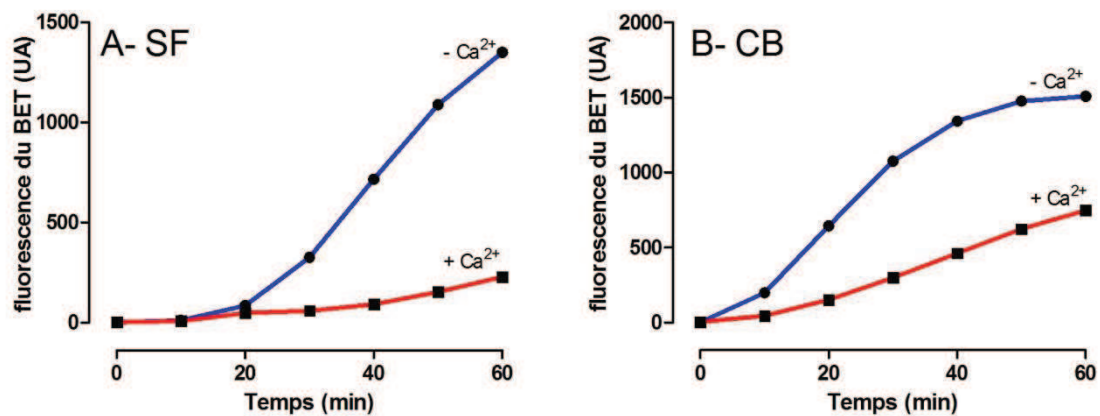


Figure III. 4 : Effet du Ca^{2+} extracellulaire sur l'entrée de BET dans les hPMNs

En présence de Ca^{2+} extracellulaire (rouge), la fluorescence du BET dans les hPMNs chute complètement pour LukS-PV/LukF-PV (A) et fortement pour HlgC/HlgB (B) par rapport aux courbes en absence de Ca^{2+} extracellulaire (bleu).

Ainsi, en absence de Ca^{2+} extracellulaire, la variation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ est inhibée alors que la dégradation de la membrane plasmique est amplifiée. La contradiction entre ces résultats obtenus d'une part sur la variation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ libre et d'autre part sur la fixation des leucotoxines et la perméabilisation de la membrane plasmique au BET, nous a amené à faire une analyse plus complète de la signalisation calcique des leucotoxines.

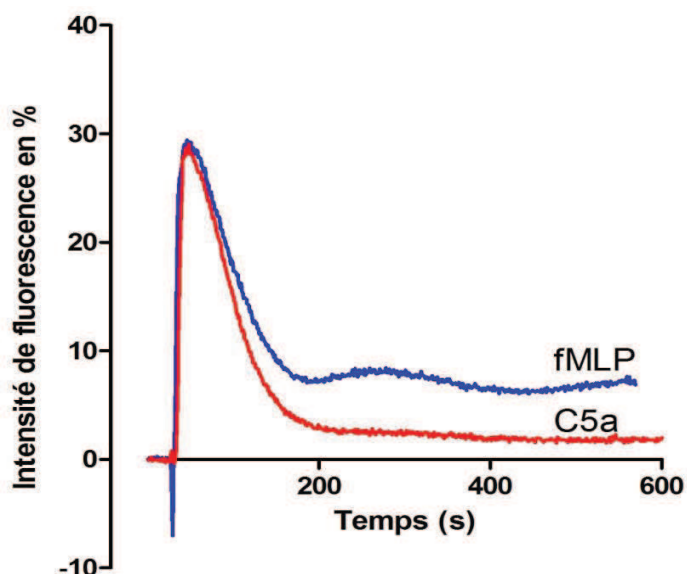
LA SIGNALISATION DES LEUCOTOXINES EST DIFFERENTE DE CELLE DU FMLP

Avant l'identification de C5aR comme récepteur de LukS-PV, il a été montré que les protéines G sont impliquées dans l'activité des hPMNs traités avec la LPV (Hensler et al., 1994), ce qui a orienté notre recherche dans le sens d'un rôle potentiel d'un GPCR dans la signalisation calcique des leucotoxines. Alors, les effets des leucotoxines ont été comparés à ceux du N-formyl-méthionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP), un peptide bactérien, connu pour son effet sur la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ libre dans le cytosol des neutrophiles et dont le mode d'action est largement étudié. Tout comme le C5a, le fMLP est un chemoattractant qui sur les neutrophiles reconnaît deux récepteurs : le « N-formyl peptide receptor » (FPR) et le « FPR like-1 » (FPRL1) (Rabiet et al., 2007). Ces récepteurs sont la cible des peptides formylés sécrétés par *S. aureus*, qui ont un effet activateur, et la protéine CHIPS, qui a un effet inhibiteur. L'activation de ces GPCRs ne déclenche pas exactement les mêmes voies de signalisation empruntées lors de l'activation du C5aR (Figure III.5). Lorsque le fMLP se fixe sur FPR, il induit une augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de la même manière que C5a. Cependant, lorsqu'il se fixe sur FPRL1, cette augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ provient surtout du milieu extracellulaire et est dépendante de l'adenosine 5'-diphosphate ribose cyclique (cADPR) qui est produit par la cyclase CD38 avec une faible libération du Ca^{2+} intracellulaire

(Rabiet et al., 2007). De plus, suite à l'internalisation, FPR et FPRL1 sont recyclés à la membrane plasmique et ne sont pas dégradés dans le lysosome.

Figure III. 5 : Comparaison de l'effet de 1 μ M de fMLP (bleu) et 1,2 nM de C5a (rouge) sur les hPMNs

La signalisation calcique induite par le fMLP montre un premier « pic » correspondant à une libération des stocks intracellulaires et un deuxième « pic » correspondant à l'entrée du Ca^{2+} extracellulaire. Le C5a induit également la libération des stocks intracellulaires mais l'entrée du Ca^{2+} extracellulaire n'est pas observée.



Les résultats obtenus en présence d'ionomycine (1 μ M) ou de thapsigargine (1 μ M), qui inhibent complètement l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induite par C5a, montrent que le fMLP est capable d'induire une entrée de Ca^{2+} extracellulaire dans les hPMNs même après la déplétion de tous les compartiments intracellulaires (Figure III.6). Les leucotoxines HlgC/HlgB et la LPV n'activent donc pas les mêmes voies que C5a ou le fMLP.

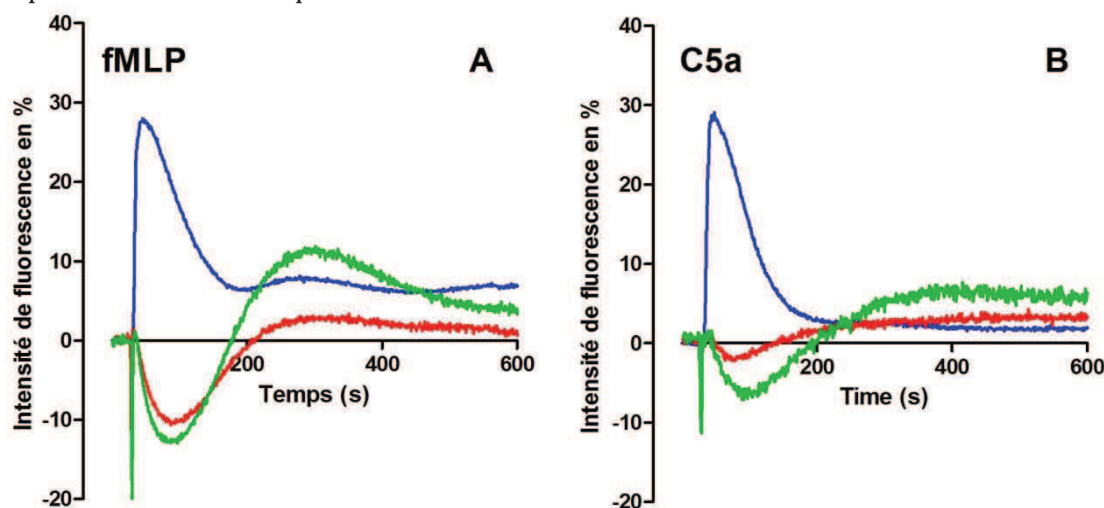


Figure III. 6 : Effets du fMLP et du C5a dans les hPMNs en présence de thapsigargine ou d'ionomycine

Effet de 1 μ M fMLP (bleu)(A) ou 1,2 nM de C5a (bleu)(B) en présence de 1 μ M de thapsigargine (rouge) ou 1 μ M d'ionomycine (vert) sur la mobilisation de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ libre. La thapsigargine inhibe l'effet du fMLP et du C5a. L'ionomycine, par contre inhibe la libération des stocks intracellulaires mais non l'entrée du Ca^{2+} extracellulaire.

LES LEUCOTOXINES METTENT EN JEU DES VOIES DE SIGNALISATIONS COMPLEXES

Le travail présenté dans l'article n 2 a permis de mettre en évidence des différences importantes dans les mécanismes d'action des leucotoxines HlgC/HlgB et la LPV. L'identification des différents compartiments intracellulaires impliqués dans leur signalisation calcique nous a incité à poursuivre l'analyse en utilisant, des inhibiteurs ciblant diverses voies et canaux dans le but d'affiner la compréhension du mécanisme mis en jeu. Nous avons analysé la participation éventuelle des canaux réticulaires sensibles à la ryanodine, des canaux présents à la membrane plasmique (Store Operated Channels : SOC) et à diverses phospholipases et protéines kinases dont l'activité enzymatique peut avoir des conséquences sur les différents canaux (Tableau III.1).

La Ryanodine est un alcaloïde qui inhibe des canaux calciques présents à la membrane du RE à fortes concentrations (ordre du micromolaire, ici 50 μM), sa présence n'a aucun effet sur la variation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ due à HlgC/HlgB (Figure III.7). Ceci suggère que la libération du Ca^{2+} du RE ne se fait pas par les RyRs. Elle pourrait se faire par les canaux activés par l'IP3 et le Ca^{2+} , mais indépendamment de l'IP3 car, la présence des inhibiteurs de la PLC, l'O-Tricyclo-[5.2.1.02, 6]-dec-9-yl dithiocarbonate (D609, 50 μM) et le U-73122 (10 μM) (Adibhatla et al., 2012; Bleasdale et al., 1990), ainsi qu'un inhibiteur de la PI3K, le 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY-294.002, 50 μM) (Vlahos et al., 1994), amplifient légèrement le signal calcique induit par les leucotoxines dans des conditions physiologiques (Figure III.7).

Par contre, la présence d'inhibiteurs des phospholipases A2 (PLA2) comme l'acide N-(p-Amylcinnamoyl) anthranilique (ACA, 10 μM) et le Bromoenol lactone (BEL, 25 μM)(iPLA2) (Ackermann et al., 1995; Harteneck et al., 2007), inhibe l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ due à HlgC/HlgB montrant que les PLA2 et plus particulièrement la phospholipase A2 indépendante du Ca^{2+} (iPLA2) sont impliquées dans la signalisation calcique de HlgC/HlgB. En effet, l'activité de la PLA2 est nécessaire à la fusion des vésicules le long de la voie d'endocytose, et ceci serait médié, au moins en partie, par la libération de l'acide arachidonique (Mayorga et al., 1993). Ainsi, la PLA2 pourrait jouer un rôle dans la signalisation calcique de HlgC/HlgB grâce à son rôle dans l'internalisation.

Des inhibiteurs très largement utilisés en tant qu'antagonistes de la calmoduline (CaM) comme le Trifluoperazine dihydrochloride (TFP, 50 μM), le N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide (W7, 100 μM) et le calmidazolium chloride (CMZ, 1 μM) induisent une amplification de l'effet de HlgC/HlgB (Figure III.7), montrant que la calmoduline pourrait réguler certains effecteurs activés par HlgC/HlgB (DeRiemer et al., 1985). Parmi le large spectre de

protéines activées par la calmoduline, elle régule l'activité de plusieurs kinases qui peuvent être impliquées dans le mécanisme d'internalisation comme la CamKII (Guettg et al., 2010; Tulapurkar et al., 2006), ce qui pourrait rejoindre notre hypothèse.

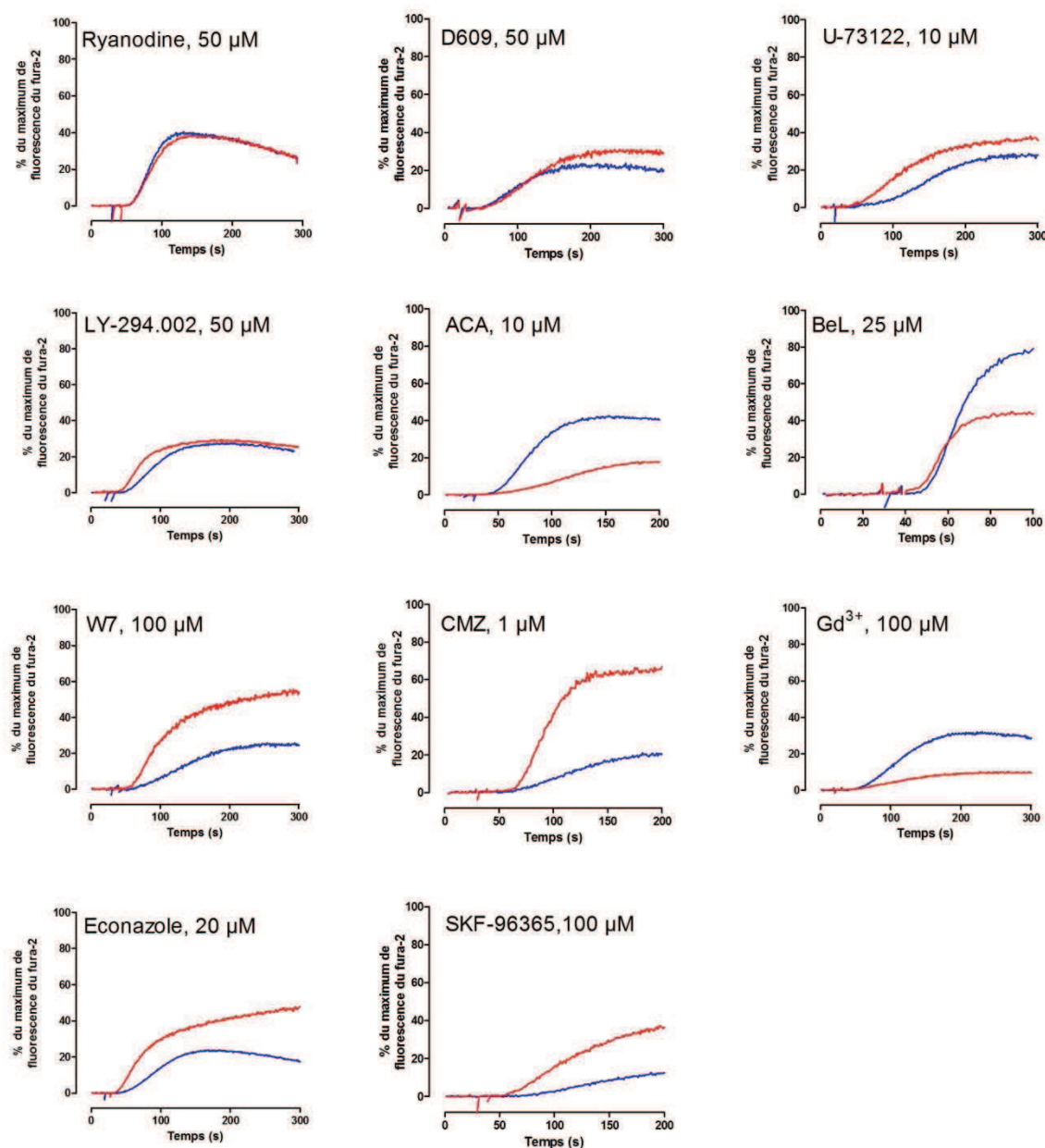


Figure III. 7 : Effets de divers inhibiteurs sur la signalisation calcique de HlgC/HlgB.

Le tracé bleu correspond à l'effet de HlgC/HlgB 0,5 nM et le tracé rouge à l'effet de HlgC/HlgB 0,5 nM en présence des différents inhibiteurs.

Le KB-R7943 (25 μM), un inhibiteur de l'échangeur Sodium-Calcium de la membrane plasmique (NCX) qui permet l'échange d'un Ca^{2+} contre 3 Na^{+} (Iwamoto et al., 1996), n'a aucun effet sur la

signalisation calcique de HlgC/HlgB éliminant le rôle de cet échangeur cationique dans la signalisation de HlgC/HlgB. Ce résultat exclut l'hypothèse d'une augmentation intracellulaire du Na^+ libre pouvant passer par un pore formé par la leukotoxine. Enfin le Gadolinium (Gd^{3+} , 100 μM), souvent utilisé comme inhibiteur des canaux SOC (Store-Operated Channels) inhibe l'action de HlgC/HlgB suggérant l'entrée de Ca^{2+} extracellulaire par des SOC. Néanmoins, l'Econazole (20 μM) et le SKF-96365 (100 μM) qui inhibent les canaux SOC, mais aussi empêchent le remplissage des stocks calciques intracellulaires (Harper and Daly, 1999; Mason et al., 1993; Wang, 2003), amplifient le signal provoqué par HlgC/HlgB (Figure III.7), ce qui rend plus difficile l'analyse de la participation des SOC à l'effet des leukotoxines.

Tableau III. 1 : Tableau récapitulatif des effets des différents inhibiteurs sur l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ par rapport à l'effet de la toxine.

Les hPMNs (3,5 millions/mL) sont incubés 5 min en présence de Ca^{2+} (1mM), puis un temps T avec les inhibiteurs avant l'ajout des leucotoxines. ND : non déterminé.

Inhibiteur	Cible	HlgC/HlgB (0,5/0,5 nM)	LukS-PV/LukF-PV (0,25/0,25 nM)
Ryanodine (50 μM) T= 5 min	RyRs	Pas d'effet (n=1)	ND
D609 (50μM) T= 10 min	PLC	Faible amplification (n=1)	Pas d'effet (n=1)
U73122 (10 μM) T= 10 min	PLC	Faible amplification (n=1)	Amplification (n=1)
LY-294.002 (50 μM) T= 10 min	PI3K	Faible amplification (n=3)	ND
ACA (10 μM) T= 5 min	PLA2, TRPs	Inhibition (n=2)	Inhibition (n=1)
BEL (25 μM) T= 5 min	iPLA2	Inhibition (n=2)	Inhibition (n=2)
TFP (50 μM) T= 10 min	CaM	Amplification (n=1)	ND
W7 (100 μM) T= 5 min	CaM	Amplification (n=1)	ND
CMZ (1 μM) T= 5 min	CaM	Amplification (n=1)	ND
Gd^{3+} (100 μM) T= 5 min	SOCs	Inhibition (n=2)	Inhibition (n=2)
Econazole (20 μM) T= 5 min	SOCs, Stocks intracellulaires	Amplification (n=2)	ND
SKF-96365 (100 μM) T= 10 min	SOCs, Stocks intracellulaires	Amplification (n=2)	ND
KB-R7943 (25 μM) T= 30 min	NCX	Pas d'effet (n=1)	ND

L'effet de LPV, est aussi inhibé par le blocage de PLA2 par ACA et BEL. Le blocage des SOCs par le Gd^{3+} diminue aussi l'effet de la LPV. En revanche l'activation de quelques PLC pourrait intervenir dans l'activité de cette toxine, car bien que le D609 n'a aucun effet, le U-73122 amplifie le signal calcique. Ces résultats doivent être complétés, car le travail présenté ici a été réalisé à une concentration de 0,25 nM de chaque sous-unité pour obtenir une réponse calcique d'amplitude équivalente à celle provoquée par 0,5 nM de chaque sous-unité de HlgC/HlgB. En effet, le mode d'action de la LPV pourrait aussi varier en fonction de la concentration de LukF-PV présente dans le milieu expérimental. Ainsi, l'ionomycine qui inhibe complètement la signalisation calcique de LukS-PV/LukF-PV à 0,25 nM/0,25 nM n'a aucun effet sur celle de LukS-PV/LukF-PV à 0,1 nM/1 nM (Figure III.8).

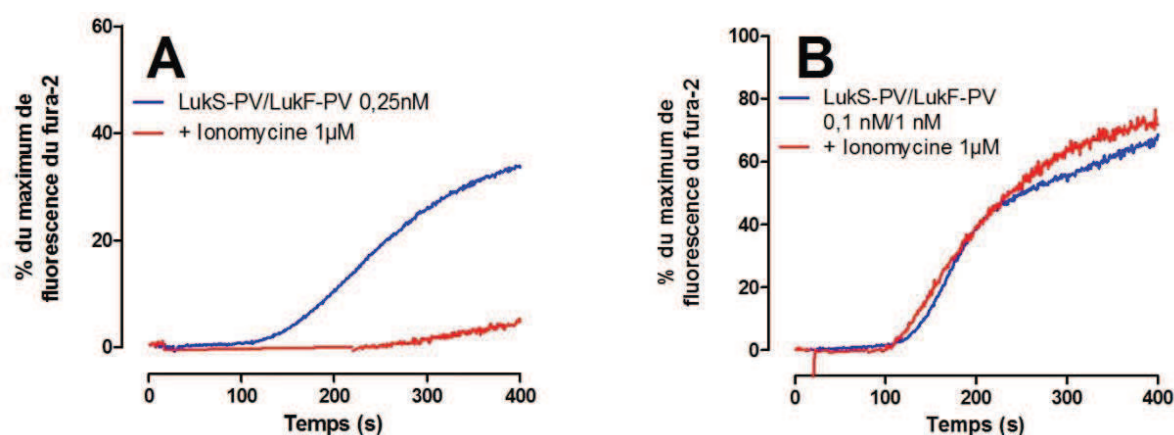


Figure III. 8 : Effet de l'ionomycine sur la signalisation de la LPV

La préincubation des cellules en présence d'ionomycine (1 μM) inhibe l'effet de la LPV à 0,25 nM de chaque sous-unité (A) (n=4), alors que c'est sans effet sur la signalisation de la LPV à 0,1 nM de LukS-PV et 1 nM de LukF-PV (B) (n=2). Les tracés correspondent à l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ due à la LPV en absence (bleu) et en présence (rouge) de l'ionomycine.

EFFETS CELLULAIRES DE HLGc/HLgB ET DE LA LPV

Suite à la fixation de ces leucotoxines à la membrane plasmique des hPMNs et suite à l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ qui se fait pendant les 10 premières minutes, la morphologie des cellules change en fonction du temps. La taille des cellules augmente et la complexité intracellulaire diminue en présence de Ca^{2+} extracellulaire (Figure III.9).

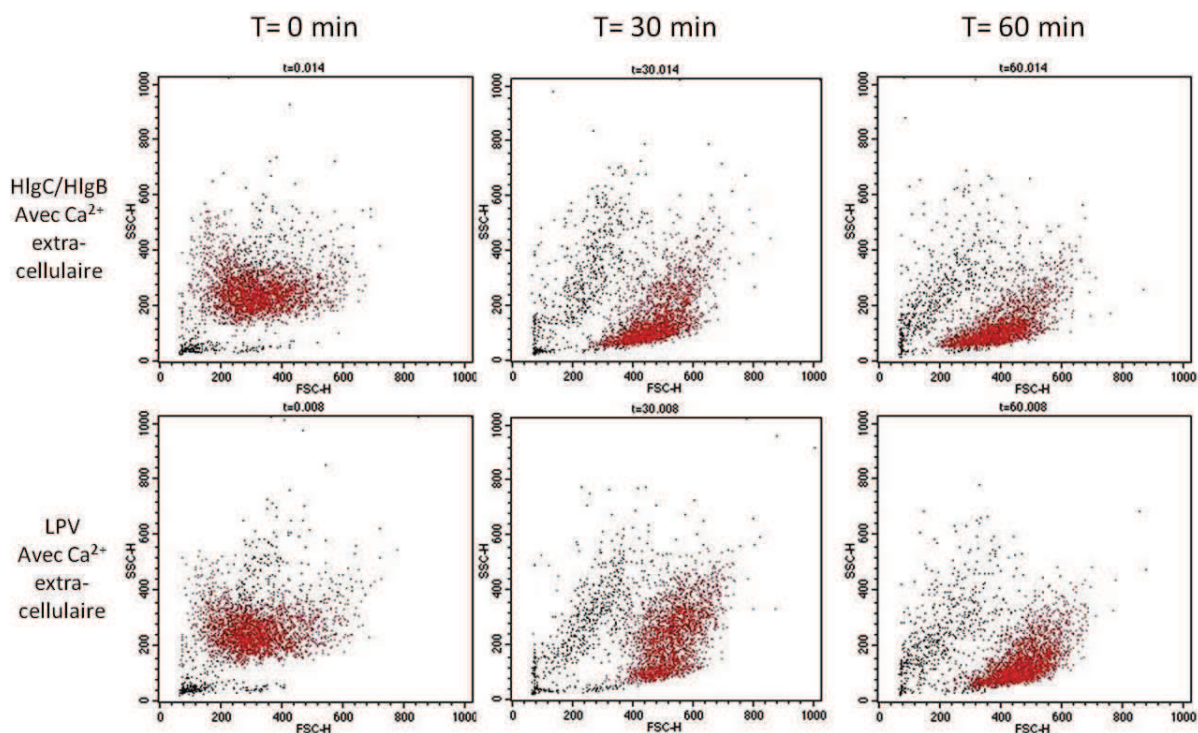


Figure III. 9 : Dot plots des hPMNs sous l'effet de HlgC/HlgB et la LPV à 30 et 60 min

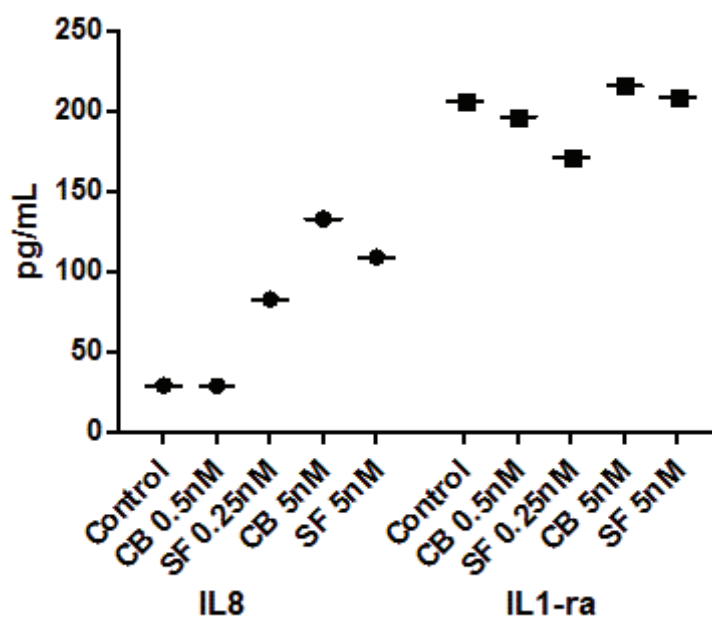
En cytométrie en flux, les paramètres de FSC (tailles des cellules, en abscisse) et SSC (complexité interne des cellules, en ordonné) permet de visualiser la morphologie des cellules, et connaître leur viabilité. Chaque point correspond à une cellule ($n = 3.000$). Les cellules en rouge sont les cellules viables n'ayant pas incorporé de bromure d'éthidium (BET) et dont l'évolution est suivie sous l'action des leucotoxines. Leur taille augmente tandis que leur granularité diminue. A $T=0$, les hPMNs forment une population homogène de cellules vivantes (rouge). A $T=30$ et 60 min, cette population, que ce soit dans le cas de HlgC/HlgB ou de la LPV, se divise en 2, dont une population de cellules mortes qui ont intégrées le BET (noir). Les cellules viables (rouge) ont alors une morphologie différente, leur complexité intracellulaire a diminué et le nuage de points est plus bas dans le dot plot.

La LPV permet la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires par les neutrophiles comme l'interleukine IL-8 et le leucotriène B4 (König et al., 1995; Werner et al., 2002) et les γ -hémolysines peuvent agir en synergie avec l'hémolysine α et l'hémolysine β pour activer l'inflammasome NLRP3 et la caspase-1 dans les macrophages (Munoz-Planillo et al., 2009). De plus le changement de la complexité intracellulaire des hPMNs suite à l'action de HlgC/HlgB et la

LPV pourrait correspondre à une dégranulation. Pour cela, la sécrétion de 11 cytokines (IL-1b, IL-1ra, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β , TNF- α) suite à l'action des leucotoxines a été recherchée par un dosage multiplexe. Seule l'IL-8 est sécrétée de manière détectable suite à l'effet de HlgC/HlgB et la LPV (Figure III.10). IL1-ra est sécrétée par les hPMNs, mais de manière indépendante de ces leucotoxines.

Figure III. 10 : Effets de HlgC/HlgB (CB) et la LPV (SF) sur la sécrétion de l'IL8 et l'IL1-ra par les hPMNs

La sécrétion d'IL-8 induite par HlgC/HlgB et la LPV est concentration dépendante (n=1). La variation de la sécrétion d'IL-1ra en absence et en présence de ces deux leucotoxines n'est pas significative.



IDENTIFICATION DES RESIDUS ESSENTIELS A LA FIXATION DE LUKS-PV A C5AR

Pour la liaison de C5a à C5aR, un modèle de liaison à deux sites a été proposé, dans lequel les résidus basiques dans le noyau de C5a interagissent d'abord avec les résidus acides dans l'extrémité N-terminale de C5aR, suivie de l'interaction de l'extrémité C-terminale de C5a avec une poche de liaison formée par des résidus hydrophobes des domaines transmembranaires et des résidus chargés à la base des ECLs du récepteur. Cette deuxième interaction est essentielle pour l'activation du récepteur (Monk et al., 2007; Postma et al., 2005; Siciliano et al., 1994; Zhang et al., 1997).

Spann et al. ont montré que LukS-PV interagit à la fois avec la région N-terminale de C5aR et la partie centrale et que cette dernière est nécessaire à l'activité de formation de pore (Spaan et al., 2013). Concernant LukS-PV, une stratégie d'« Alanine Scanning » par mutagenèse dirigée a été utilisée, afin de délimiter un domaine structural responsable de la fixation de LukS-PV à C5aR. Cette technique vise à déterminer la contribution d'un résidu spécifique en le mutant. L'acide aminé de substitution est généralement l'Alanine, dont la chaîne latérale est un méthyle relativement peu réactif et peu encombrant. Cette opération est répétée, afin de cribler des domaines entiers de la protéine. Les boucles du domaine Rim de LukS-PV ont été ciblées puisque c'est le domaine qui entre en contact avec les membranes des cellules. Les acides aminés à muter ont été choisis suite à la comparaison de séquence de LukS-PV avec les autres protéines de classe S, et notamment HlgC qui entre en compétition au même site membranaire.

ARTICLE N°3 : RESIDUES ESSENTIAL FOR PANTON-VALENTINE LEUKOCIDIN S COMPONENT BINDING TO ITS CELL RECEPTOR SUGGEST BOTH PLASTICITY AND ADAPTABILITY IN ITS INTERACTION SURFACE

Residues Essential for Pantone-Valentine Leukocidin S Component Binding to Its Cell Receptor Suggest Both Plasticity and Adaptability in Its Interaction Surface

Benoit-Joseph Laventie^{1‡}, Frédéric Guérin^{2,3}, Lionel Mourey^{2,3}, Mira Y. Tawk¹, Emmanuel Jover¹, Laurent Maveyraud^{2,3*}, Gilles Prévost^{1*}

1 Université de Strasbourg-CHRU, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, EA 7290 Virulence bactérienne précoce, Institut de Bactériologie, Strasbourg, France, **2** Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale (IPBS), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Toulouse, France, **3** Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, IPBS, Toulouse, France

Abstract

Panton-Valentine leukocidin (PVL), a bicomponent staphylococcal leukotoxin, is involved in the poor prognosis of necrotizing pneumonia. The present study aimed to elucidate the binding mechanism of PVL and in particular its cell-binding domain. The class S component of PVL, LukS-PV, is known to ensure cell targeting and exhibits the highest affinity for the neutrophil membrane ($K_d \sim 10^{-10}$ M) compared to the class F component of PVL, LukF-PV ($K_d \sim 10^{-9}$ M). Alanine scanning mutagenesis was used to identify the residues involved in LukS-PV binding to the neutrophil surface. Nineteen single alanine mutations were performed in the *rim* domain previously described as implicated in cell membrane interactions. Positions were chosen in order to replace polar or exposed charged residues and according to conservation between leukotoxin class S components. Characterization studies enabled to identify a cluster of residues essential for LukS-PV binding, localized on two loops of the *rim* domain. The mutations R73A, Y184A, T244A, H245A and Y250A led to dramatically reduced binding affinities for both human leukocytes and undifferentiated U937 cells expressing the C5a receptor. The three-dimensional structure of five of the mutants was determined using X-ray crystallography. Structure analysis identified residues Y184 and Y250 as crucial in providing structural flexibility in the receptor-binding domain of LukS-PV.

Citation: Laventie B-J, Guérin F, Mourey L, Tawk MY, Jover E, et al. (2014) Residues Essential for Pantone-Valentine Leukocidin S Component Binding to Its Cell Receptor Suggest Both Plasticity and Adaptability in Its Interaction Surface. PLoS ONE 9(3): e92094. doi:10.1371/journal.pone.0092094

Editor: Binh An Diep, University of California, San Francisco, United States of America

Received: December 12, 2013; **Accepted:** February 18, 2014; **Published:** March 18, 2014

Copyright: © 2014 Laventie et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from EA4438 to GP (Direction de la Recherche et des Etudes Doctorales, and B.J.L. was awarded by the French Ministry of Superior Education and Research. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: laurent.maveyraud@ipbs.fr (LM); prevost@unistra.fr (GP)

‡ Current address: Division of Molecular Microbiology Biozentrum, University of Basel, Basel, Switzerland

Introduction

Staphylococcus aureus largely relies on the secretion of toxins and other virulence factors such as superantigens and proteases for its virulence, targeting various actors of innate immunity [1,2]. Staphylococcal leukotoxins, a subfamily of pore-forming toxins, appear to simultaneously confer to *S. aureus* high virulence and protection against the host's immune system. With the exception of α -hemolysin, which is homo-heptameric [3], leukotoxins are bipartite toxins, formed by the non-covalent association of two distinct proteins, a class S and a class F component of approximately 31 and 34 kDa, respectively, into a likely octameric species [4,5,6,7]. To date, 7 bipartite leukotoxins have been identified in *S. aureus*: Pantone-Valentine leukocidin [8], LukM/LukF-PV [9], two γ -hemolysins [10,11], LukE/LukD [12] and a variant thereof [13], and more recently, LukH/LukG [14] also named LukAB [15]. *S. intermedius* has also been shown to express a LukS-I/LukF-I leukotoxin, [16], while certain related genes can be found in other *Staphylococcus* species.

Four of these leukotoxins are involved in human pathogenicity. Pantone-Valentine leukocidin (PVL) is associated with necrotizing skin infections, such as boils [17,18], and plays an important role in the poor prognosis of necrotizing pneumonia [19,20,21]. While the two γ -hemolysins HlgA/HlgB and HlgC/HlgB are not associated with a specific disease, they are nonetheless expressed by over 99% of *S. aureus* strains [22,23] and are thought to increase the severity of the infection [24,25]. LukE/LukD has been reported as a dermonecrotic toxin and involved in bullous impetigo [26]. The toxic action of leukotoxins results from a complex mechanism which has been described in the case of HlgA/HlgB [7,27,28,29] and is characterized by: (i) binding of the S class component on the target cell membrane, which requires the presence of a specific receptor, (ii) recruitment of the F class component, (iii) dimerization possibly accompanied by conformational rearrangement, (iv) formation of an octameric prepore, and (v) pore formation across the membrane. During this process, both class S and F proteins are faced with a dual environment: a hydrophilic milieu, when secreted by the bacteria upon infection, and a hydrophobic milieu, when forming the pore in the

membrane. Independently of pore formation, leukotoxins are able to rapidly activate cellular signalization [30,31], including an increase in intracellular calcium concentration and chemokine secretion [32].

At the molecular level, sequence identity varies from 55 to 79% within a given class, when excluding LukH (LukA) or LukG (LukB). When these proteins are included in the comparison, sequence identities drop to about 30–34% [14]. Similarity across classes remains below 30%. The three-dimensional structure of the soluble forms of several leukotoxin components are known [33,34,35,36] and display a similar fold, organized around a central domain formed by two six-stranded antiparallel β -sheets (Fig. 1). This so-called *cap* or *core β -sandwich* domain is the most conserved region, and is the location where most protein-protein interactions found in the pre-pore and pore occur. Two additional structural domains are also found: the *rim* domain anchors the protein to the membrane surface [7,37,38,39], while the *stem* domain, closely apposed to the *core β -sandwich* in the soluble form, contributes two β -strands to the pore β -barrel. Interestingly, the *rim* domain is the least conserved domain, possibly resulting in variable cell specificities, depending on the leukotoxin involved.

PVL displays a narrow cellular spectrum, restricted to human and rabbit polymorphonuclear neutrophil leukocytes, PMNs, monocytes, and macrophages [31]. The binding of LukS-PV has been shown to be a prerequisite for LukF-PV binding and the subsequent activation of PMNs. Native or recombinant LukS-PV displays a K_d as low as 0.07 nM on neutrophils and 0.02 nM on monocytes [31] which is the highest known affinity for leukotoxins. Since the binding of LukS-PV to the membrane is a saturable process, the necessary presence of a LukS-PV receptor on the cell surface was thus proposed [31,40]. This was recently confirmed by Spaan *et al.* who showed that the C5a receptor is required for the binding of LukS-PV to human neutrophils [41]. This receptor is also likely involved in the binding of HlgC, since both LukS-PV and HlgC were shown to compete for a common receptor [31]. In the case of LukE, receptors CCR5, CXCR1 and CXCR2 have been identified as binding partners on the cell surface [42,43], whereas LukH/LukG (LukA/LukB) binds to the CD11b subunit of the integrin Mac-1 [44].

In order to identify the LukS-PV residues involved in binding to the C5a receptor at the cell surface, an alanine scanning site-directed mutagenesis strategy was adopted. Indeed, mutation into alanine is considered to allow good conservation of molecular structures, whereas the removal of polar or charged residues often alters the interacting capacity of proteins. Charged or polar residues from the *rim* domain or residues that are conserved in LukS-PV and HlgC, but not in S component of other leukotoxins, were more specifically targeted. Nineteen residues were selected and investigated for their ability to bind to neutrophils as well as activate the latter and form a functional pore. Five of the most impaired mutants were crystallized and their three-dimensional structure determined.

Results

Selection of mutated positions

LukS-PV and HlgC were previously shown to display similar cellular spectra and to compete for a common membrane site when binding to cells [31]. Moreover, the *rim* domain was shown to likely interact with the cell membrane within the pore [7,45]. Therefore, the sequences of the *rim* domains of class S components were compared, in order to identify conserved positions in LukS-PV and HlgC, but not in other class S proteins (Fig. 1A). The *rim* domain encompasses three stretches of residues: S56–F76, A160–

S204 and M234–R263, with the least conserved regions being Y60–R73, F163–E197 and T240–V261, corresponding to loops in the LukS-PV structure (Fig. 1B, C). Positions corresponding to polar or charged residues, with their side-chain oriented towards the exterior of the protein (as depicted on the structure of wild-type LukS-PV (PDBID 1T5R), Fig. 1C), were thus selected for mutation as these residues are more likely to be involved in interactions either with the target cell membrane or with a receptor at the cell surface.

Production, purification and characterization of LukS-PV mutants

With the exception of the D195A and R241A mutants, all proteins were produced and purified to homogeneity, as assessed by Coomassie-blue stained SDS-PAGE. For the D195A and R241A mutants, production yields were too low to allow for purification, likely due to mutation-induced aggregation of the fusion protein.

Binding capacities of LukS-PV mutants

Binding capacities of wild-type or mutant LukS-PV to hPMNs were evaluated by competition experiments with a functional fluorescein-labeled LukS-PV G10C mutant (LukS-PV*). The K_d of LukS-PV* for hPMNs was measured at 0.066 ± 0.005 nM using flow cytometry (Fig. 2A), which is in good agreement with previously published data [31]. The concentration of wild-type or LukS-PV mutants required for 50% inhibition of labeled competitor binding (EC_{50}) was calculated, allowing to derive K_i values (Fig. 2B and Table 1).

Among the 17 tested mutations, twelve did not significantly alter LukS-binding to hPMNs, with the corresponding proteins displaying a binding capacity only affected by a factor smaller than 25-fold. The mutants exhibiting significantly decreased binding abilities with respect to wild-type LukS-PV were: R73A, Y184A, T244A, H245A, and Y250A, with K_i values ranging from 1.8 to 6.2 nM, *i.e.* a 69- to 238-fold increase compared to the K_i value of wild-type LukS-PV. No single mutation was found to completely prevent binding of LukS-PV (Table 1).

Undifferentiated U937 cells were mostly insensitive to the binding of LukS-PV, for concentrations of LukS-PV* up to 500 nM, yielding a calculated $K_d > 20$ μ M. By contrast, U937 cells expressing C5aR, the LukS-PV receptor, bound LukS-PV* with a K_d of 0.32 nM, thus 5-fold higher than for hPMNs. Furthermore, the five LukS-PV mutants R73A, Y184A, T244A, H245A and Y250A were strongly affected in their binding to U937-C5aR with calculated K_i ranging from 4 to 12 nM, compared to 1.12 nM for wild-type LukS-PV, thus confirming comparable influences of these mutations to those tested with hPMNs.

Ability of LukS-PV mutants to activate neutrophils

Activation of Fluo3-loaded hPMNs was evaluated by the ability of LukS-PV mutants to induce variations in intracellular calcium concentration [40,46]. A limiting concentration of wild-type LukS-PV or mutants was used (0.02 nM) with an excess of LukF-PV (10 nM). This concentration of LukF-PV was chosen as it is closed to the reported K_d value for the binding of LukF-PV to LukS-PV [47]. Wild-type LukS-PV and mutants led to an almost immediate increase in intracellular calcium concentration. Only four mutants, R73A, Y184A, T244A and Y250A, displayed an increased lag-time prior to calcium entry and a significantly reduced calcium entry slope, *i.e.* less than 55% of the LukS-PV control ($p < 0.001$, one-way ANOVA) (Fig. 3 and Table 1). LukS-PV mutants Y181A, K182A, Y246A and N248A also had a significantly decreased

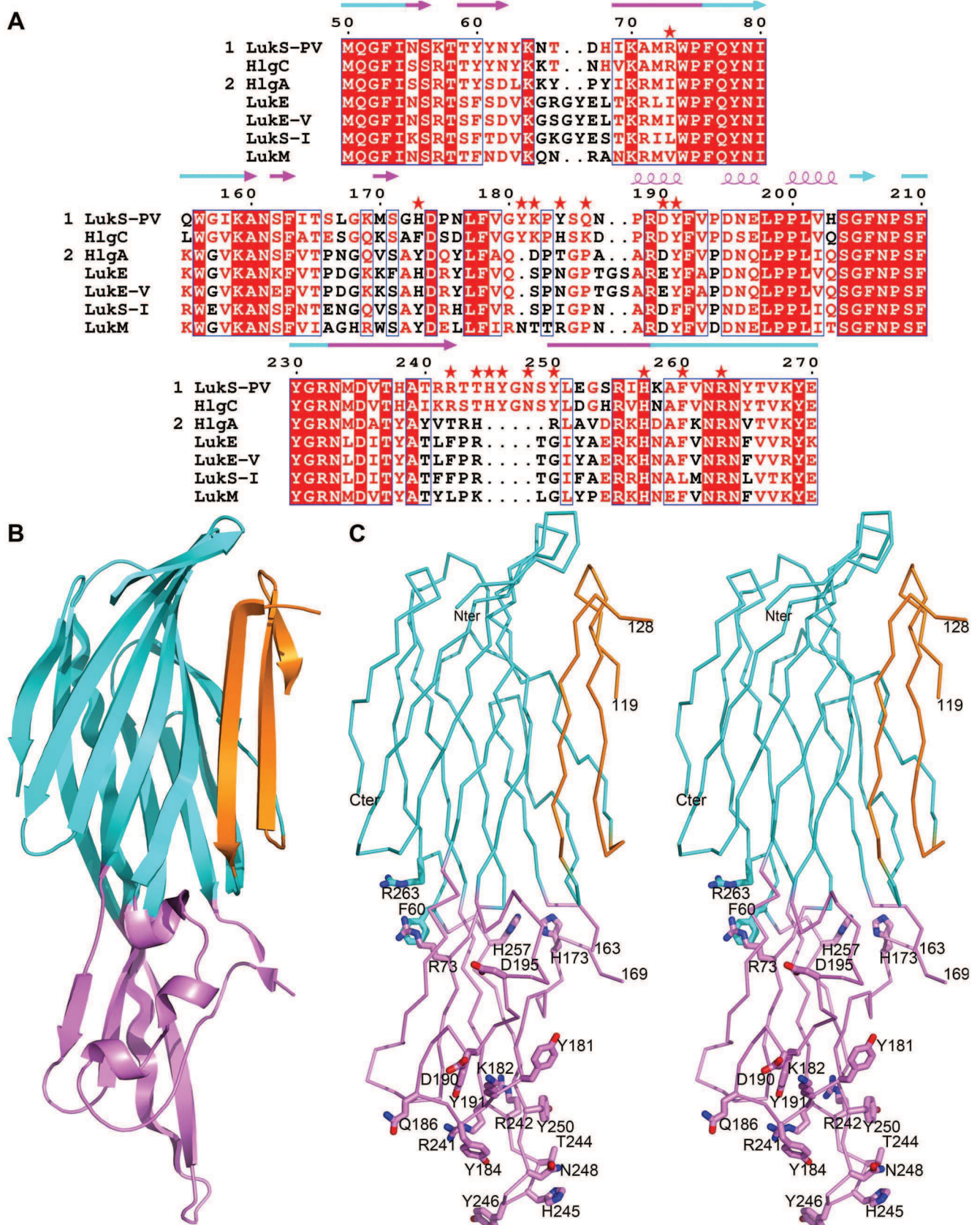


Figure 1. Positions selected for mutations in LukS-PV. A. Sequence alignment of the three stretches of residues constituting the rim domain of class S components of leukotoxins. Numbering corresponds to the mature LukS-PV protein. Red asterisks indicate positions selected for mutation. Strictly conserved residues are indicated on a red background, while similar residues in group 1 (LukS-PV and HlgC) or in group 2 (all others) are

indicated with red letters. The secondary structure of LukS-PV is indicated above the alignment, colored according to the corresponding structural domain: β -sandwich (cyan) and rim (purple). GenBank accession numbers are LukS-PV: CAA51251.1, HlgC: AAA26638.1, HlgA: AAA26637.1, LukE: CAA73667.1, LukE-V: BAB47174.1, LukS-I: CAA55782.1, LukM: BAA97866.1. B. Schematic representation of the three dimensional structure of LukS-PV [35], PDB entry 1T5R, highlighting the three structural domains: β -sandwich (cyan), stem (orange) and rim (purple). C. Stereo view of the $C\alpha$ trace of wild-type LukS-PV. Residues selected for mutations are displayed as sticks and labeled.

doi:10.1371/journal.pone.0092094.g001

calcium entry slope, from 65% to 75% of the control ($p < 0.05$, one-way ANOVA). LukS-PV Y191A was the only mutant to display a significantly increased ability to activate neutrophils, with a calcium entry slope of 135% of the control ($p < 0.01$, one-way ANOVA).

Pore-forming capacity of LukS-PV mutants

The pore-forming ability of the LukS-PV mutants was investigated by the measurement of ethidium entry through the pore using flow cytometry. All tested mutants formed pores, most with a slightly decreased ability (Fig. 4 and Table 1). Four mutants, R73A, Y184A, T244A and Y250A, had a significantly affected pore-forming activity, with at least a 50% reduction in ethidium bromide entry at 30 min. All other mutants had a pore forming activity close to that observed with wild-type LukS-PV. Interestingly, the LukS-PV Y191A mutant, which already exhibited

increased hPMN activation, also displayed a slightly increased pore-forming capacity (111%) compared to LukS-PV.

Structure determination of LukS-PV mutants

Six of the seventeen studied mutants were subjected to structural analysis: Y184A, T244A, H245A, Y246A, N248A, and Y250A. Crystals were obtained for all of the above but those obtained for the H245A LukS-PV mutant diffracted very poorly and were systematically split; therefore, the structure of this mutant could not be solved.

The T244A, Y246A and N248A mutated proteins crystallized in identical conditions (50% PEG 200, 0.1 M MES-NaOH, pH 7.50). The corresponding crystals belonged to the $P4_32_12$ space group, with similar cell parameters ($a = b \sim 94$ Å and $c \sim 308$ Å) and 4 molecules per asymmetric unit. These crystals diffracted X-rays at medium resolution (2.50 to 2.80 Å). Crystals

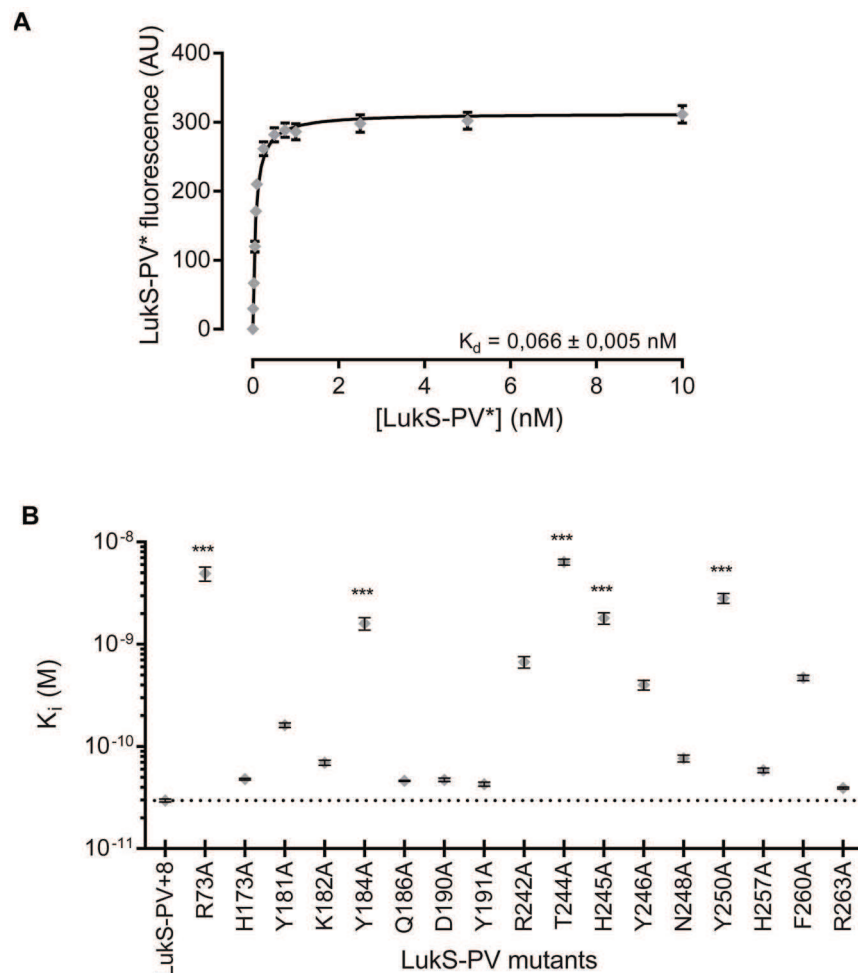


Figure 2. Binding properties of LukS-PV* and LukS-PV mutants to hPMNs and U937-C5aR cells. A. Flow cytometry measurement of LukS-PV* and fluorescein-labeled LukS-PV G10C binding to human PMNs and U937-C5aR cells ($n = 3$). B. Graphic representation of the K_i values obtained for wild-type or mutant LukS-PV. The dotted line corresponds to the value of wild-type LukS-PV. Error bars represent the 95% confidence interval. Statistical analysis: **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$ ($n = 3$). doi:10.1371/journal.pone.0092094.g002

Table 1. Binding properties as well as cellular and pore-forming activities of wild-type and LukS-PV mutants¹.

Mutation	$K_i \pm 95\%$ (pM) $\pm$ confidence interval	Relative affinity to LukS-PV	Ca ²⁺ entry slope (% of max/s) $\pm$ SEM	Ethidium entry (30 min) (% of control) $\pm$ SEM
LukS-PV	26 $\pm$ 1.1 (120 $\pm$ 23)	- -	1.4 $\pm$ 0.05	100
T244A ²	6,190 $\pm$ 560 (11,000 $\pm$ 2,000)	238 (92)	0.50 $\pm$ 0.093	25 $\pm$ 5.9
R73A ²	5,080 $\pm$ 1,000 (12,000 $\pm$ 5,200)	195 (100)	0.66 $\pm$ 0.065	41 $\pm$ 11
Y250A ²	2,970 $\pm$ 370 (5,700 $\pm$ 680)	114 (48)	0.77 $\pm$ 0.17	46 $\pm$ 14
Y184A ²	1,800 $\pm$ 110 (4,100 $\pm$ 470)	69 (34)	0.31 $\pm$ 0.056	11 $\pm$ 4.3
H245A ²	1,800 $\pm$ 260 (4,200 $\pm$ 900)	69 (35)	1.1 $\pm$ 0.059	80 $\pm$ 6.7
R242A	619 $\pm$ 92	24	1.2 $\pm$ 0.076	83 $\pm$ 4.3
F260A	427 $\pm$ 30	16	1.2 $\pm$ 0.11	88 $\pm$ 2.2
Y246A	365 $\pm$ 47	14	1.0 $\pm$ 0.098	80 $\pm$ 6.7
Y181A	155 $\pm$ 12	6	0.95 $\pm$ 0.045	54 $\pm$ 5.2
N248A	74 $\pm$ 8.2	2.8	0.93 $\pm$ 0.078	77 $\pm$ 7.6
K182A	68 $\pm$ 5.2	2.6	1.0 $\pm$ 0.062	79 $\pm$ 3.4
H257A	56 $\pm$ 4.5	2.2	1.3 $\pm$ 0.12	96 $\pm$ 5.5
H173A	45 $\pm$ 1.3	1.7	1.2 $\pm$ 0.073	73 $\pm$ 5.8
D190A	44 $\pm$ 2.6	1.7	1.3 $\pm$ 0.04	90 $\pm$ 3
Q186A	43 $\pm$ 0.67	1.7	1.1 $\pm$ 0.072	80 $\pm$ 4.4
Y191A	41 $\pm$ 2.9	1.6	1.9 $\pm$ 0.16	111 $\pm$ 2.4
R263A	38 $\pm$ 1.3	1.5	1.4 $\pm$ 0.068	90 $\pm$ 2.8

¹ K_i values, calcium entry slope and ethidium entry at 30 min were obtained for wild-type LukS-PV and all mutants with hPMNs. K_i values with U937-C5aR cells were obtained for wild-type LukS-PV and for the most affected mutants (values given in parenthesis).

²Mutations causing a significant decrease in LukS-PV affinity for hPMNs ($p < 0.001$, one-way ANOVA with Dunnett's post test).

doi:10.1371/journal.pone.0092094.t001

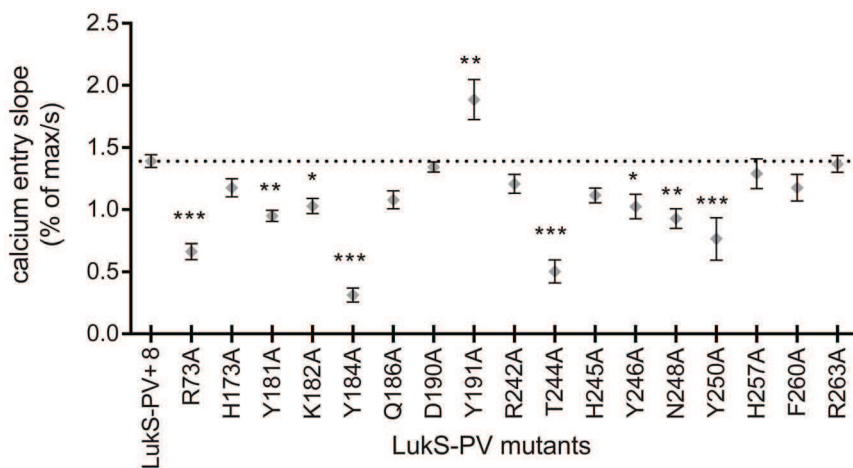


Figure 3. Biological activity of LukS-PV and corresponding mutants: rise of cytoplasmic calcium concentration due to human neutrophil activation. Values represent the calcium entry slope expressed in percent of maximum calcium fluorescence (after neutrophil lysis with Triton X-100 0.05% v/v) per second. Statistical analysis: ns, non-significant; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ (one-way ANOVA with Dunnett's post test, $n = 6$).

doi:10.1371/journal.pone.0092094.g003

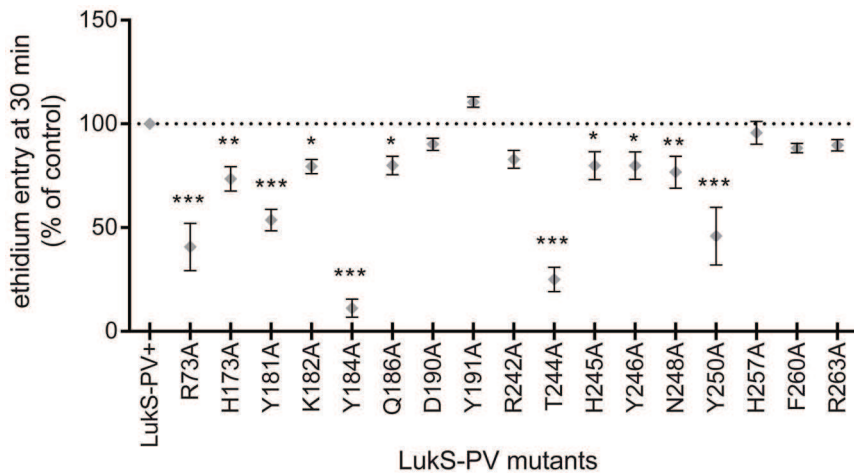


Figure 4. Pore-forming activity of LukS-PV and corresponding mutants. Flow cytometry analysis of ethidium entry in neutrophils 30 min after addition of LukS-PV (wild type or mutant, 0.02 nM) in combination with an excess of LukF-PV (10 nM). Neutrophils were incubated with 4 μ M ethidium bromide prior to toxin addition. Values of ethidium entry are expressed as percent of the control (wild type LukS-PV) activity. Statistical analysis: ns, non-significant; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ (one-way ANOVA with Dunnett's post test, $n = 3$). doi:10.1371/journal.pone.0092094.g004

of the Y184A mutant were obtained at a lower pH 6.50, but the conditions were otherwise identical. The latter belonged to the $P4_12_12$ space group with cell parameters $a = 104.86$ Å and $c = 106.87$ Å, 1 molecule per asymmetric unit, and diffracted up to 2.33 Å. The Y250A mutant crystallized in 5% PEG 6000, 0.1 M sodium citrate, pH 4.0. Crystals were orthorhombic, space group $P2_12_12$, with cell parameters $a = 85.30$ Å, $b = 84.29$ Å and $c = 38.09$ Å and 1 molecule per asymmetric unit. Crystals diffracted up to 1.55 Å. Since no crystal was isomorphous to the crystals of wild-type LukS-PV [35], molecular replacement was performed in all cases. This allowed the identification of a clear and unique solution. Refinement statistics are provided in Table 2.

The overall three-dimensional structures of the mutants were very similar to the wild-type structure. Indeed, all secondary structure elements were preserved and local differences were only observed in certain loops (Fig. 5A). The β -sandwich domain was the most conserved, with r.m.s. deviations after superposition of equivalent C α atoms below 0.63 Å. The stem domain appeared more flexible with r.m.s. deviations ranging from 0.21 Å to 2.21 Å.

In the case of the rim domain, wild-type LukS-PV and mutants T244A, Y246A and N248A displayed only small differences, with r.m.s. deviations comprised between 0.20 Å and 0.30 Å, whereas the structure of the rim domain of the Y184A and Y250A mutants were markedly different, with r.m.s. deviations of 1.10 Å and 1.28 Å, respectively, when compared to the wild-type LukS-PV structure (Fig. 5). These differences were mostly concentrated in the V169–Q186 and T244–N248 loops, with mutants Y184A and Y250A being the most divergent. Of particular note, the rim region was generally associated with weak electron density, and could not be completely built in most structures, except in the case of the Y250A mutant.

Discussion

Specific binding of LukS-PV to the surface of human neutrophils has been shown to require the presence of a functional C5a receptor [41], and occurs with an apparent affinity varying between 0.06 to 6 nM depending on the protein purification tag and the methodology used [31,40,41]. Non-specific binding to cellular or artificial membranes has also been shown to occur,

however only when using micromolar concentrations of LukS-PV [48]. All of the experiments described in the present study were performed at nanomolar concentrations of wild-type or mutant LukS-PV, ensuring that only specific binding to the surface of neutrophils, *i.e.* to the C5a receptor, could occur. This was confirmed through the use of undifferentiated U937 cells that do not naturally express C5aR and do not significantly bind LukS-PV* even at protein concentrations up to 500 nM, whereas this binding was observed with a K_d of 320 pM with U937 cells expressing human C5aR.

Among the seventeen LukS-PV mutants investigated, eight mutants (H173A, Q186A, D190A, Y191A, R242A, H257A, F260A and R263A) displayed only marginally altered biological properties. Five mutants (Y181A, K182A, H245A, Y246A and N248A) were partially affected. Four LukS-PV mutants (R73A, Y184A, T244A, and Y250A) displayed significant alterations for all measured parameters, *i.e.* at least 50-fold decrease in affinity for hPMN membranes, 2-fold decrease in the slope of Ca²⁺ influx and 2- to 10-fold reduction in pore-forming capacity. The most dramatically reduced affinity of the LukS-PV mutants for the hPMN membrane led to a reduced amount of bound leukotoxin, which resulted in a decreased number of both activated hPMNs and functional pores. However, none of the studied mutants was completely inactive. Indeed, the K_i of wild-type LukS-PV was 0.03 nM and even mutants displaying a 200-fold degradation in binding still displayed a K_i of about 10 nM, resulting in a dramatically reduced but still recordable biological activity. Comparable variations of K_i were observed when LukS-PV mutants were tested for binding to recombinant undifferentiated U937-C5aR (Figure 2). The absence of measurable binding to undifferentiated U937 cells indicates that the presence of the C5a receptor is required for the initial binding of LukS-PV and for subsequent events of toxin formation.

The rim domain is known to be responsible for the interaction of leukotoxins with target cell membranes while the structure of the γ -hemolysin pore [7] indicates that the loops extending at the bottom of the rim domain are likely involved in this interaction. In LukS-PV, this area would correspond to residues 181–186 and 241–251. Three of the four most sensitive residues (Y184, T244 and Y250) are found in this region, at close distance from each

Table 2. Crystallographic data and refinement statistics of the LukS-PV mutants¹.

	Y184A	T244A	Y246A	N248A	Y250A
Crystallization condition	40% PEG 200 NaMES 0.1 M pH 6.50	40% PEG 200 NaMES 0.1 M pH 7.50	40% PEG 200 NaMES 0.1 M pH 7.50	40% PEG 200 NaMES 0.1 M pH 7.50	5% PEG 6000 NaCitrate 0.1 M pH 4.00
Data collection and processing					
Beamline	ID29	ID23-EH2	ID14-EH1	ID23-EH2	ID14-EH4
Spacegroup	P4 ₁ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2
Cell parameters (Å)	a = 104.87 c = 106.89	a = 94.47 c = 310.31	a = 94.19 c = 306.44	a = 93.99 c = 309.39	a = 85.30 b = 89.29 c = 38.09
Resolution limits (Å)	47.60–2.20 (2.30–2.20)	46.70–2.75 (2.80–2.75)	47.05–2.50 (2.64–2.50)	46.99–2.80 (2.90–2.80)	30.84–1.55 (1.60–1.55)
Nb. of observations	222,233 (27,688)	231,080 (4,712)	213,925 (28,588)	291,382 (8,514)	299,073 (22,054)
Nb. of unique reflection	30,803 (3,759)	36,657 (1,606)	46,924 (6,622)	34,936 (3,263)	43,049 (3,855)
Multiplicity	7.2 (7.4)	6.3 (2.9)	4.6 (4.3)	8.3 (2.6)	6.9 (3.6)
Completeness	99.8 (99.7)	97.3 (83.0)	96.9 (95.7)	99.1 (94.6)	99.7 (99.9)
R _{sym}	0.070 (0.915)	0.110 (0.834)	0.149 (0.827)	0.122 (0.649)	0.067 (0.753)
I/σ	16.2 (2.7)	15.1 (2.0)	10.0 (1.8)	16.0 (1.9)	18.8 (3.2)
Refinement					
Resolution limits (Å)	47.60–2.20	46.70–2.75	47.05–2.50	46.99–2.80	30.84–1.55
Nb. of reflections	30,803	36,656	46,908	34,936	43,037
R _{factor}	0.210	0.198	0.185	0.224	0.167
R _{free}	0.218	0.246	0.228	0.245	0.189
Nb. of molecules/A.U.	1	4	4	4	1
Nb. of atoms					
Protein	2,171	8,804	8,761	8,719	2,242
Water	106	319	473	96	297
Others	12	none	none	none	30
R.m.s. deviations					
Bond lengths (Å)	0.010	0.010	0.010	0.008	0.009
Bond angles (°)	1.12	1.21	1.17	1.09	1.06
Peptide ω angles (°)	4.14	3.34	3.69	2.79	4.37
PDB ID	4IYT	4IYC	4J0O	4IZL	4IYA

¹Numbers in parentheses report statistics for the highest resolution shell.
doi:10.1371/journal.pone.0092094.t002

other (Fig. 1C). Residue R73, the fourth most affected residue, is located close to the β-sandwich domain (Fig. 1C). In close proximity to residues Y184, T244 and Y250, residues R242, H245 and Y246 also induced altered biological activities when mutated to alanine, albeit to a somewhat lesser extent. Binding affinities of LukS-PV Y184, T244 and Y250 mutants underwent a 14- to 61-fold decrease with respect to the value obtained for the wild-type protein. These results hence identify the bottom loop 240–250 as well as residue Y184 as being crucial for LukS-PV binding to the target cell membrane. Residues Y184, T244, Y250, R242, H245, and Y246 are located on poorly conserved regions among leukotoxins, except between LukS-PV and HlgC. Residues R73, H245, Y246 and N248 are specific to the two proteins, whereas Y184 of LukS-PV is replaced by a histidine residue in HlgC (Figure 1A). In these two proteins, a four-residue insertion is found in the loop T240–Y250 compared to other class S components. This loop has furthermore been shown to be essential for γ-hemolysin activity [49] which has a different cell-target spectrum, although its direct role in LukS-PV and HlgC activity has never been demonstrated until now. Indeed, our study provides clear evidence that the corresponding segment in LukS-PV is crucial for its binding to the C5a receptor. In this region, the only differences in sequence between LukS-PV and HlgC are located at positions

240 (Thr in LukS-PV and Ile in HlgC), 241 (Arg in LukS-PV and Lys in HlgC) and 243 (Thr in LukS-PV and Ser in HlgC). This T240–T243 stretch is strictly conserved among 40 known variants of LukS-PV. Such differences between LukS-PV, HlgC and other class S components may contribute to differences in their target cell spectrum as well as the binding capacities of PVL and HlgC/HlgB.

The three dimensional structures of five of the seventeen investigated LukS-PV mutants were obtained: Y184A, T244A, Y246A, N248A, and Y250A. This provided a unique opportunity to correlate their altered biological behavior to structural properties. In order to sample all possible conformations of LukS-PV, all structures, including the multiple structures resulting from non-crystallographic symmetry, were superimposed onto the A-chain of the wild-type LukS-PV structure (PDB entry 1T5R). With the 13 structures provided by this study, and since there are 8 molecules in the asymmetric unit of the wild-type crystals, 21 structures could be compared (Fig. 5A). The comparison clearly enabled to identify regions with the highest structural flexibility: the *stem* region and the three loops of the *rim* domain. In the structure of the soluble form of both S and F leukotoxin components, the *stem* region is comprised of a 3-stranded antiparallel β-sheet and a connecting loop (residues P121–F129

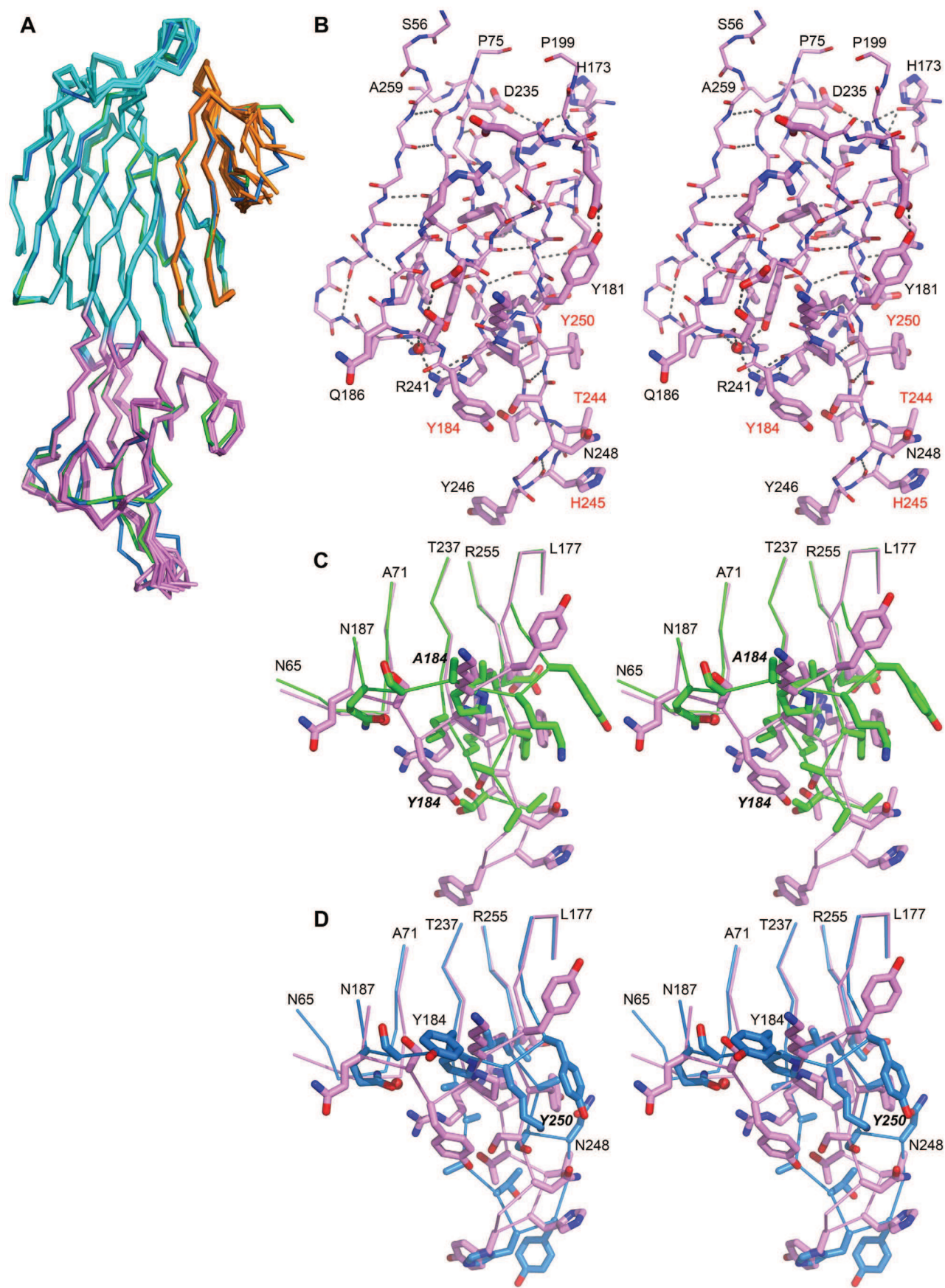


Figure 5. Structural variations of LukS-PV upon mutations in the rim domain. A. Superposition of the C α trace of all available structures of LukS-PV proteins, wild-type or mutants. The Y184A mutant structure is represented in green and the Y250A mutant structure in blue. For the other structures, the three structural domains are highlighted: β -sandwich (cyan), stem (orange) and rim (purple). B. Close-up stereo view of the rim domain of the LukS-PV wild-type structure, shown as stick (thin for main-chain and thick for side-chains). Residues labeled in red correspond to the most sensitive position as identified in this work. C. Stereo view of portion of the rim domain of wild-type LukS-PV (purple) and of the Y184A mutant structure (green). D. Stereo view of portion of the rim domain of wild-type LukS-PV (purple) and of the Y250A mutant structure (blue). Panels B to D, hydrogen bonds are represented as grey dots, the orientation of the image is the same as in A. Panels C and D, mutated positions are labeled in italic. doi:10.1371/journal.pone.0092094.g005

in LukS-PV), closely apposed against the β -sandwich domain. Our comparison of all available structures of the LukS-PV proteins indicates that this connecting loop is highly flexible. In all structures, except for the Y250A mutant, electron density was very weak in this region and the loop could not be built completely. This structural flexibility is not surprising since the *stem* region has to undergo major structural rearrangement when it deploys into the membrane and contributes two β -strands to the β -barrel pore.

The *rim* domain is built from three stretches of residues: S56–P75, A160–H203, and N233–H257 [35]. Both S56–P75 and N233–H257 segments are comprised of β -strands that extend from/into the β -sandwich domain. They form a 4-stranded β -sheet onto which residues A160–H203 are apposed. This latter stretch of residues includes a small 2-stranded β -sheet (N161–T165 and G168–G172) and a long loop (H173–H203) that includes three short helical segments (P188–Y191, D195–E197, and P200–H203). The conformation of this loop is stabilized by several intra-loop hydrogen bonds, whereas only a few interactions with the other regions of the *rim* domain were found (Fig. 5B). In most structures of LukS-PV, the *rim* domain conformation is well conserved, with the exception of the R241–A250 loop where certain local variations were observed (Fig. 5A). Other significant variations in the conformation of the *rim* domain were only found in the structure of the Y184A mutant, where residues V179–Q186 were affected (Fig. 5C), as well as in the conformation of the Y250A mutant, where two loops (V179–Q186 and R241–A250) showed structural variations (Fig. 5D). For both Y184A and Y250A mutants, crystallization was achieved in different conditions than those for wild-type LukS-PV and the other mutants, resulting in a different crystal packing. This alone suggests that the structures of mutants Y184A and Y250A differ from the others, preventing crystallization in similar conditions. As the result of the Y184A mutation, the hydrogen bond found in the wild-type LukS-PV structure between Y184OH and S249OG was lost, and the loop was reorganized with a displacement of 6.0 Å for the CA atom at position 184 (Fig. 5C). In the Y250A mutant structure, the removal of the tyrosine side chain allowed the displacement of the N248 side chain, which in turn drove the reorganization of residues R241–Y250. Space was therefore provided for the displacement of the V179–Q186 loop, which adopted a conformation close to that observed in the case of the Y184A mutant (Fig. 5D).

The structural variations observed in this study suggest that the *rim* domain of LukS-PV may have the ability to easily adapt its conformation in order to bind to the C5a receptor present in the target cell membrane. Our results show that the *rim* domain of LukS-PV likely displays the required plasticity for these events, and that tyrosine residues 184 and 250 may be of paramount importance in this process, since the corresponding mutants are among the most affected. Moreover, the functional studies performed herein indicate that loop 240–250 is crucial for the binding of LukS-PV to C5aR. Indeed, three of the five most sensitive residues identified (T244, H245 and Y250) are located in this loop and form a surface that could represent the principal binding site for the receptor (Figure 6). The fourth most affected

residue, Y184, also interacts with this loop. To date, no natural mutation of LukS-PV has been reported that would affect its specific binding to the membrane receptor. Recent results obtained with LukE have identified regions Q180–A193 and L234–R268 as essential for LukE/LukD cytotoxicity, but only region Q180–A193 as being required for binding to CXCR1 and CXCR2 [43], whereas in the case of LukH (LukA), residue 323 was found to be crucial for binding to CD11b [50]. This suggests that the mechanism of receptor recognition may not be unique among all leukotoxins. Moreover, binding of the S component of leukotoxins to its cognate receptor is not sufficient in itself to result in pore formation, which requires the recruitment of the F component and the formation of the adequate hetero-oligomer in order to form the prepore and, eventually, the pore. All of these steps, which potentially require specific and major interactions of LukS-PV with the extracellular region of C5aR, remain to be characterized at the molecular level. Such data along with a better understanding of these critical steps involved in LukS-PV binding are of crucial importance for pharmacological purposes.

Experimental Procedures

Bacterial strains and vectors

Escherichia coli XL1 Blue cells [*recA1 endA1 gyrA96 thi1 hsdR17 supE44 relA1 lac* (F' *proAB lacIqZAM15 Tn10 (tet^r)*)] (Stratagene, Agilent Technologies, Massy, France) were used as recipient cells for transformation with recombinant pGEX-6P-1~Panton-Valentine leukocidin genes (Genbank:X72700) (GE Healthcare Life Science, France, [5]). *E. coli* BL21 [F[−], *ompT*, *hsdS* (*rB[−]*, *mB[−]*), *gal*] was used for over-expression of the glutathione-S-transferase (GST)~leukotoxin fusion genes, according to the manufacturer's instructions (GE-Healthcare).

Alanine scanning site-directed mutagenesis

LukS-PV mutants were constructed by means of the Quick-Change mutagenesis protocol (Stratagene) using Phusion Hot Start DNA polymerase (Finnzyme, Espoo, Finland) and dedicated oligonucleotides as previously described [5]. All mutated genes were verified by DNA sequencing.

Expression and purification of leukotoxins

Wild-type and mutant leukotoxins were expressed and purified as previously described [30]. Briefly, recombinant BL21 *E. coli* cells were grown in 2×TY medium (bacto-tryptone 17 g/l, bacto-yeast extract 10 g/l, NaCl 5 g/l), and protein expression was induced with 0.2 mM IPTG. GST-fusion proteins were purified by affinity chromatography on glutathione-Sepharose 4B (GE Healthcare), followed by a SP-sepharose cation-exchange run on a Fast Protein Liquid Chromatography AKTAPurifyer, after removal of the glutathione S-transferase tag with PreScission protease (GE Healthcare). The identity and purity of proteins were confirmed by radial gel immunoprecipitation against native antigens (0.6% (w/v) agarose in phosphate buffered saline) and 10–15% (w/v) SDS-PAGE. Proteins were stored at −80°C.

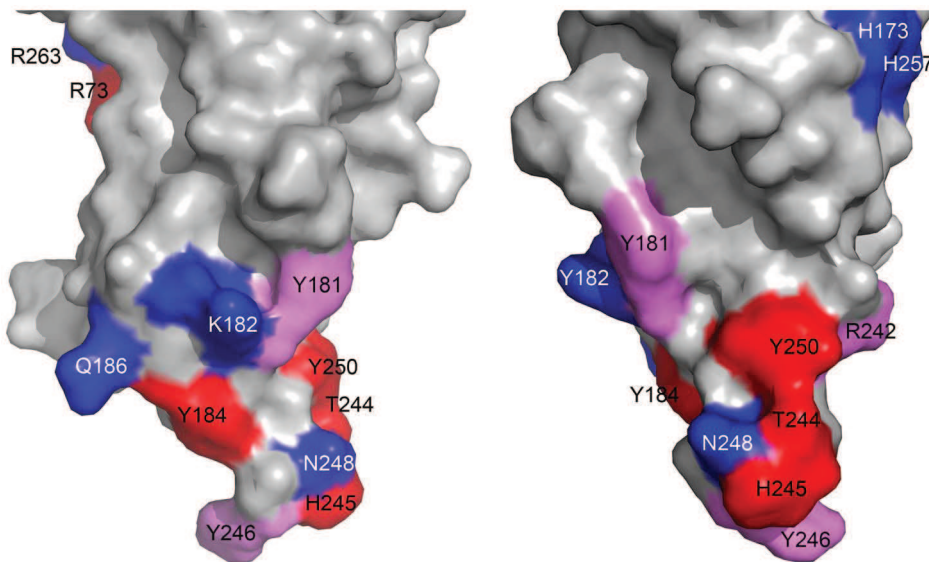


Figure 6. Molecular surface of the rim domain of LukS-PV. Residues identified in this study as important for the binding of LukS-PV on the C5a receptor (K_d increased more than 50 fold upon mutation to Ala) are depicted in red. Mutated residues affecting binding to a lesser extent (i.e. increase in K_d by a factor between 5 and 50) are depicted in pink whereas residues for which no effect on binding was found upon mutation (increase in K_d less than 3 fold) are depicted in blue (Table 1). Two orthogonal views around a vertical axis are presented, with the orientation on the left being the same as in figure 5.

doi:10.1371/journal.pone.0092094.g006

hPMN purification and activation

Blood samples of anonymous healthy volunteer donors were purchased at the “Etablissement Français du Sang, Strasbourg, France” in accordance with convention n°SG-CLI-003. Human polymorphonuclear neutrophil leukocytes (neutrophils) were purified from buffy coats as previously described [47], and suspended at 5×10^5 cells/ml (unless specified otherwise) in 10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM glucose, 0.1 mM EGTA pH 7.3. Human PMN activation was monitored by following the variation in intracellular free Ca^{2+} . Calcium changes were determined by recording the variations in emitted fluorescence of Fluo3-loaded neutrophils as previously described [31]. Briefly, neutrophils were incubated with 2 μM Fluo3-AM[®] (Molecular Probes, Eugene, USA) for 45 min at room temperature, then washed and resuspended twice in HEPES buffer. Five minutes prior to toxin addition, 1.1 mM CaCl_2 was added to hPMN suspensions (6×10^6 cells/ml). Variations in fluorescence intensity of Fluo3 were recorded with a spectrofluorometer (Deltascan, PTL, USA) at $\lambda_{\text{Ex}} = 488$ nm and $\lambda_{\text{Em}} = 530$ nm.

Undifferentiated U937 and U937-C5aR cell cultures

Undifferentiated U937 and U937-C5aR cells, which respectively do not express or stably express the C5aR receptor [51], were a generous gift from Pr. J.A. van Strijp (Utrecht University, The Netherlands). Cells were cultured as 50 ml suspension at 37°C under a 5% CO_2 atmosphere in 250 ml flasks in RPMI-1640 medium supplemented with 10% (v/v) of decompartmented fetal calf serum (Life Technologies, Carlsbad, USA) and 0.1% (w/v) of both penicillin and streptomycin (Invitrogen, Paisley, UK).

Pore formation measurements

Pore formation was revealed by the penetration of ethidium into cells [52]. Neutrophils (5×10^5 cells/ml) were pre-incubated for 10 min with 4 μM ethidium bromide. Measurements were initiated directly after the simultaneous addition of 0.1 nM of the S component and 10 nM of LukF-PV. Ethidium fluorescence

of 3×10^3 hPMNs was measured using a FacSort flow cytometer (Becton-Dickinson, Le Pont de Claix, France) equipped with a 15-mW, 488-nm, argon-ion laser. Data were acquired using CellQuest Pro software (Becton-Dickinson). Ethidium fluorescence of hPMNs after a 30-min incubation with PVL was calculated and normalized with respect to the wild-type LukS-PV control. The results for 3 different donors were averaged and expressed as percentages of fluorescence values recorded with dead cells. Baseline values were obtained for each series of data from a control without addition of toxin, and were systematically subtracted from the results of other assays.

Leukotoxin binding assays

K_d determination. The dissociation constants, K_d , were determined using a binding saturation experiment with increasing concentrations of fluorescein-labeled LukS-PV* (0.01 nM to 10 nM for hPMNs; 0.1 nM to 500 nM for U937 cells), as previously described [31]. The amount of labeled protein bound to the cell surface was measured by flow cytometry as cell fluorescence at $\lambda_{\text{Em}} = 530$ nm and expressed as the percentage of maximum fluorescence obtained at the highest concentration of LukS-PV*. Experimental data were fitted using GraphPad Prism version 5.04 for Windows (GraphPad Software, San Diego, USA). K_d values were calculated by a non-linear regression using the “One site - Specific binding” equation.

K_i determination. Fluorescein-labeled LukS-PV* (1 nM) was displaced by increasing concentrations of various non-labeled LukS-PV or mutants (0.03 nM to 500 nM). The amount of LukS-PV* bound to the cell surface was measured by flow cytometry as the amount of cell fluorescence at $\lambda_{\text{Em}} = 530$ nm. Fifty percent effective concentrations (EC_{50}) were calculated by GraphPad Prism using the non-linear regression “one site binding” equation. The equation of Cheng and Prusoff [53] was used to calculate the inhibition constant, K_i , from the EC_{50} value (parameters: K_d LukS-PV* = 0.066 nM; [LukS-PV*] = 1 nM).

$$K_i = \frac{EC_{50}}{1 + \frac{[LukS - PV^*]}{K_d}}$$

Protein crystallization and structure determination

Proteins were conditioned in 50 mM MES-NaOH buffer, 50 mM NaCl, pH 6.5 at approximately 10 mg/ml. Crystallization trials were implemented using the sitting drop method and a NanoDrop ExtY automated crystallization platform (Innovadyne) at 285 K. Drops were generated by mixing 200 nL of protein solution to the same volume of crystallization solution (Table 2).

Crystals were cryo-protected by brief immersion in the crystallization solution supplemented with 20% (v/v) ethylene glycol before being transferred into a gaseous nitrogen flux at 100 K. All data collections were performed at the European Radiation Synchrotron Facility (ESRF, Grenoble, France). Data processing was initially performed using autoPROC [54], and optimized with XDS [55] and SCALA [56] (Table 2). All subsequent operations were performed using the CCP4 program suite [57].

References

- Cheung GYC, Otto M (2012) The potential use of toxin antibodies as a strategy for controlling acute *Staphylococcus aureus* infections. *Expert Opin Ther Targets* 16: 601–612. doi: 10.1517/14728222.2012.682573.
- Watkins RR, David MZ, Salata RA (2012) Current concepts on the virulence mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* 61: 1179–1193. doi: 10.1099/jmm.0.043513-0.
- Gouaux JE, Braha O, Hobaugh MR, Song LZ, Cheley S, et al. (1994) Subunit stoichiometry of staphylococcal α -hemolysin in crystals and on membranes - a heptameric transmembrane pore. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 12828–12831.
- Jayasinghe L, 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.
- Joubert O, Voegelin J, Guillet V, Tranier S, Werner S, et al. (2007) Distinction between pore assembly by staphylococcal α -toxin versus leukotoxins. *J Biomed Biotechnol* 2007: 25935.
- Miles G, Movileanu L, Bayley H (2002) Subunit composition of a bicomponent toxin: staphylococcal leukocidin forms an octameric transmembrane pore. *Prot Science* 11: 894–902.
- Yamashita K, Kawai Y, Tanaka Y, Hirano N, Kaneko J, et al. (2011) Crystal structure of the octameric pore of staphylococcal γ -hemolysin reveals the β -barrel pore formation mechanism by two components. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 17314–17319. doi: 10.1073/pnas.1110402108.
- Woodin AM (1960) Purification of the two components of leucocidin from *Staphylococcus aureus*. *Biochem J* 75: 158–165.
- Kaneko J, Muramoto K, Kamio Y (1997) Gene of LukF-PV-like component of Pantón-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* P83 is linked with lukM. *Biosci Biotechnol Biochem* 61: 541–544.
- Cooney J, Kienle Z, Foster TJ, O'Toole PW (1993) The γ -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.
- Prévost G, Cribier B, Coupié P, Petiau P, Supersac G, et al. (1995) Pantón-Valentine leukocidin and γ -hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infect Immun* 63: 4121–4129.
- Gravet A, Colin DA, Keller D, Girardot R, Monteil H, et al. (1998) Characterization of a novel structural member, LukE-LukD, of the bicomponent staphylococcal leukotoxins family. *FEBS Lett* 436: 202–208.
- Morinaga N, Kaihou Y, Noda M (2003) Purification, cloning and characterization of variant LukE-LukD with strong leukocidal activity of staphylococcal bi-component leukotoxin family. *Microbiol Immunol* 47: 81–90.
- Ventura CL, Malachova N, Hammer CH, Nardone GA, Robinson MA, et al. (2010) Identification of a novel *Staphylococcus aureus* two-component leukotoxin using cell surface proteomics. *Plos One* 5: e11634. doi: 10.1371/journal.pone.0011634.
- Dumont AL, Nygaard TK, Watkins RL, Smith A, Kozhaya L, et al. (2011) Characterization of a new cytotoxin that contributes to *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Mol Microbiol* 79: 814–825. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07490.x.
- Prévost G, Bouakham T, Piémont Y, Monteil H (1995) Characterisation of a synergohymenotropic toxin produced by *Staphylococcus intermedius*. *FEBS Lett* 376: 135–140.
- Badiou C, Dumitrescu O, Croze M, Gillet Y, Dohin B, et al. (2008) Pantón-Valentine leukocidin is expressed at toxic levels in human skin abscesses. *Clin Microbiol Infect* 14: 1180–1183. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.02105.x.
- Cribier B, Prévost G, Coupié P, Finck-Barbançon V, Grosshans E, et al. (1992) *Staphylococcus aureus* leukocidin: a new virulence factor in cutaneous infections? An epidemiological and experimental study. *Dermatology* 185: 175–180.
- Diep BA, Chan L, Tattévin P, Kajikawa O, Martin TR, et al. (2010) Polymorphonuclear leukocytes mediate *Staphylococcus aureus* Pantón-Valentine leukocidin-induced lung inflammation and injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 5587–5592. doi: 10.1073/pnas.0912403107.
- Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet JC, Lina G, et al. (2002) Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Pantón-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet* 359: 753–759.
- Labandeira-Rey M, Couzon F, Boisset S, Brown EL, Bes M, et al. (2007) *Staphylococcus aureus* Pantón-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science* 315: 1130–1133.
- Prévost G, Coupié P, Prévost P, Gayet S, Petiau P, et al. (1995) Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins. *J Med Microbiol* 42: 237–245.
- von Eiff C, Friedrich AW, Peters G, Becker K (2004) Prevalence of genes encoding for members of the staphylococcal leukotoxin family among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 49: 157–162.
- Girgis DO, Sloop GD, Reed JM, O'Callaghan RJ (2005) Effects of toxin production in a murine model of *Staphylococcus aureus* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: 2064–2070.
- Supersac G, Piémont Y, Kubina M, Prévost G, Foster TJ (1998) Assessment of the role of γ -toxin in experimental endophthalmitis using a *hlg*-deficient mutant of *Staphylococcus aureus*. *Microb Pathog* 24: 241–251.
- Gravet A, Coupié P, Meunier O, Clyti E, Moreau B, et al. (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.
- Joubert O, Viero G, Keller D, Martinez E, Colin DA, et al. (2006) Engineered covalent leukotoxin heterodimers form functional pores: insights into S-F interactions. *Biochem J* 396: 381–389.
- Prévost G, Mourey L, Colin DA, Monteil H, Dalla Serra M, et al. (2006) Alpha-helix and β -barrel pore-forming toxins (leucocidins, α -, γ -, and δ -cytolysins) of *Staphylococcus aureus*. In: Alouf JE, Popoff MR, editors. *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins Third ed*: Academic Press. pp. 590–607.
- Viero G, Gropuzzo A, Joubert O, Keller D, Prévost G, et al. (2008) A molecular pin to study the dynamics of β -barrel formation in pore-forming toxins on erythrocytes: a sliding model. *Cell Mol Life Sci* 65: 312–323.
- Baba Moussa L, Werner S, Colin DA, Mourey L, Pédelacq JD, et al. (1999) Discoupling the Ca(2+)-activation from the pore-forming function of the bi-component Pantón-Valentine leukocidin in human PMNs. *FEBS Lett* 461: 280–286.

Acknowledgments

The authors thank Raymonde Girardot and Daniel Keller for their skillful technical assistance, Christiane Moog (INSERM U1110) for human PMNs, as well as Pr J.A van Strijp from Utrecht University (The Netherlands) for the generous gift of recombinant U937 cells. Authors also acknowledge Didier Colin for his help with data analysis. The equipment used for the crystallization experiments and X-ray crystallography is part of the Integrated Screening Platform of Toulouse (PICKT, IBSA). We thank the staff of synchrotron beam lines ID14-1, ID14-4, ID23-2, and ID29 at the European Synchrotron Radiation Facility (Grenoble, France).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: BJL EJ L. Mourey L. Maveyraud GP. Performed the experiments: BJL FG MYT L. Mourey L. Maveyraud. Analyzed the data: BJL FG MYT L. Mourey EJ L. Maveyraud GP. Wrote the paper: BJL L. Mourey L. Maveyraud GP.

31. Gauduchon V, Werner S, Prévost G, Monteil H, Colin DA (2001) Flow cytometric determination of Panton-Valentine leukocidin S component binding. *Infect Immun* 69: 2390–2395.
32. Tseng CW, Kyme P, Low J, Rocha MA, Alsabeh R, et al. (2009) *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin contributes to inflammation and muscle tissue injury. *Plos One* 4: e6387. doi: 10.1371/journal.pone.0006387.
33. Pédélec JD, Maveyraud L, Prévost G, Baba-Moussa L, Gonzalez A, et al. (1999) The structure of a *Staphylococcus aureus* leukocidin component (LukF-PV) reveals the fold of the water-soluble species of a family of transmembrane pore-forming toxins. *Structure* 7: 277–287.
34. Olson R, Nariya H, Yokota K, Kamio Y, Gouaux E (1999) Crystal structure of staphylococcal LukF delineates conformational changes accompanying formation of a transmembrane channel. *Nat Struct Biol* 6: 134–140.
35. Guillet V, Roblin P, Werner S, Coraiola M, Menestrina G, et al. (2004) Crystal structure of leucotoxin S component: new insight into the Staphylococcal β -barrel pore-forming toxins. *J Biol Chem* 279: 41028–41037.
36. Roblin P, Guillet V, Joubert O, Keller D, Erard M, et al. (2008) A covalent S-F heterodimer of leucotoxin reveals molecular plasticity of β -barrel pore-forming toxins. *Proteins* 71: 485–496. doi: 10.1002/prot.21900.
37. Valeva A, Palmer M, Bhakdi S (1997) Staphylococcal α -toxin: formation of the heptameric pore is partially cooperative and proceeds through multiple intermediate stages. *Biochemistry* 36: 13298–13304.
38. Vecsey-Semjen B, Lesieur C, Molloy R, van der Goot FG (1997) Conformational changes due to membrane binding and channel formation by staphylococcal α -toxin. *J Biol Chem* 272: 5709–5717.
39. Aman MJ, Karauzum H, Bowden MG, Nguyen TL (2010) Structural model of the pre-pore ring-like structure of Panton-Valentine leukocidin: providing dimensionality to biophysical and mutational data. *J Biomol Struct Dyn* 28: 1–12.
40. Colin DA, Mazurier I, Sire S, 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.
41. Spaan AN, Henry T, van Rooijen WJ, Perret M, Badiou C, et al. (2013) The staphylococcal toxin Panton-Valentine leukocidin targets human C5a receptors. *Cell Host Microbe* 13: 584–594. doi: 10.1016/j.chom.2013.04.006.
42. Alonzo F III, Kozhaya L, Rawlings SA, Reyes-Robles T, DuMont AL, et al. (2013) CCR5 is a receptor for *Staphylococcus aureus* leukotoxin ED. *Nature* 493: 51–55. doi: 10.1038/nature11724.
43. Reyes-Robles T, Alonzo F III, Kozhaya L, Lacy DB, Unutmaz D, et al. (2013) *Staphylococcus aureus* leukotoxin ED targets the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 to kill leukocytes and promote infection. *Cell Host Microbe* 14: 453–459. doi: 10.1016/j.chom.2013.09.005.
44. Dumont AL, Yoong P, Day CJ, Alonzo F III, McDonald WH, et al. (2013) *Staphylococcus aureus* LukAB cytotoxin kills human neutrophils by targeting the CD11b subunit of the integrin Mac-1. *Proc Natl Acad Sci USA*. doi: 10.1073/pnas.1305121110.
45. Song L, Hobaugh MR, Shustak C, Cheley S, Bayley H, et al. (1996) Structure of staphylococcal α -hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* 274: 1859–1866.
46. Finck-Barbançon V, Duportail G, Meunier O, Colin DA (1993) Pore formation by a two-component leukocidin from *Staphylococcus aureus* within the membrane of human polymorphonuclear leukocytes. *Biochim Biophys Acta* 1182: 275–282.
47. Meyer F, Girardot R, Piémont Y, Prévost G, Colin DA (2009) Analysis of the specificity of Panton-Valentine leukocidin and γ -hemolysin F component binding. *Infect Immun* 77: 266–273. doi: 10.1128/IAI.00402-0.
48. Ferreras M, Hoper F, Dalla Serra M, Colin DA, Prévost G, et al. (1998) The interaction of *Staphylococcus aureus* bi-component γ -hemolysins and leukocidins with cells and lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* 1414: 108–126.
49. Nariya H, Nishiyama A, Kamio Y (1997) Identification of the minimum segment in which the threonine246 residue is a potential phosphorylated site by protein kinase A for the LukS-specific function of staphylococcal leukocidin. *FEBS Lett* 415: 96–100.
50. Dumont AL, Yoong P, Liu X, Day CJ, Chumbler NM, et al. (2013) Identification of a crucial residue required for *Staphylococcus aureus* LukAB cytotoxicity and receptor recognition. *Infect Immun in press* doi: 10.1128/IAI.01444-13.
51. Kew RR, Peng T, DiMartino SJ, Madhavan D, Weinman SJ, et al. (1997) Undifferentiated U937 cells transfected with chemoattractant receptors: a model system to investigate chemotactic mechanisms and receptor structure/function relationships. *J Leukoc Biol* 61: 329–337.
52. Meunier O, Falkenrodt A, Monteil H, Colin DA (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.
53. Cheng Y, Prusoff WH (1973) Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 22: 3099–3108.
54. Vonrhein C, Flensburg C, Keller P, Sharff A, Smart O, et al. (2011) Data processing and analysis with the autoPROC toolbox. *Acta Crystallogr sect D Biol Crystallogr* 67: 293–302. doi: 10.1107/S0907444911007773
55. Kabsch W (2010) Xds. *Acta Crystallogr sect D Biol Crystallogr* 66: 125–132. doi: 10.1107/S0907444909047337
56. Evans P (2006) Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr sect D Biol Crystallogr* 62: 72–82.
57. Winn MD, Ballard CC, Cowtan KD, Dodson EJ, Emsley P, et al. (2011) Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr sect D Biol Crystallogr* 67: 235–242. doi: 10.1107/S0907444910045749
58. McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, et al. (2007) Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* 40: 658–674.
59. Emsley P, Cowtan K (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr sect D Biol Crystallogr* 60: 2126–2132.

DISCUSSION

CONCLUSION

Les leucotoxines ont reçu ce nom parce que l'on a longtemps considéré que leurs cibles primaires sont les leucocytes, pourtant ces molécules peuvent aussi agir sur plusieurs autres cibles cellulaires. Les neurones en grain du cervelet représentent une des ces cibles où la LPV, l' α -toxine et la γ -hémolysine HlgA/HlgB paraissent plus faiblement actives que HlgC/HlgB, qui provoque une forte libération de Glutamate.

Ces différences rendaient intéressant de comparer les effets de HlgC/HlgB à ceux de la LPV, considérée la plus active sur le type cellulaire le plus sensible. Notre étude a montré que malgré des ressemblances, ces deux leucotoxines, n'ont pas exactement le même mode d'action.

Il avait été montré que l'action des leucotoxines commence par la fixation de la sous-unité de classe S à la membrane plasmique des cellules cibles (Colin et al., 1994). Récemment, une approche basée sur la neutralisation par des anticorps spécifiques a permis l'identification de C5aR, comme récepteur de LukS-PV (Spaan et al., 2013). De plus, HlgC entre en compétition avec LukS-PV sur le même site de fixation (Gauduchon et al., 2001), ce qui fait de C5aR un récepteur potentiel de HlgC également. Notre étude présentée dans l'article n°2 nous a permis de valider cette hypothèse. En effet, HlgC et LukS-PV sont en compétition pour le même récepteur dans des cellules exprimant C5aR après transfection, mais aucune des deux ne fixe les cellules de la lignée U937 non transfectée.

L'approche de mutagenèse dirigée selon la technique d'« Alanine Scanning » a permis de montrer que les résidus R73, Y184, T244, H245 et Y250 de LukS-PV sont importants pour la fixation à son récepteur. Le résidu Y184 et la boucle T240-Y250, et plus particulièrement Y250, sont nécessaires à la plasticité du domaine Rim de LukS-PV lui permettant de changer de conformation lors de sa fixation à C5aR. L'interaction de LukS-PV avec, à la fois, la région N-terminale et la partie centrale de C5aR est nécessaire à son action (Spaan et al., 2013). Cependant, l'interaction directe entre ces résidus clés de LukS-PV et l'une ou l'autre des régions N-terminale ou centrale de C5aR n'a pas été démontrée directement. De plus, d'autres constituants de l'environnement lipidique de C5aR pourraient jouer un rôle dans l'interaction de la sous-unité de classe S et le récepteur, comme dans le cas de l' α -toxine (Valeva et al., 2006). L'interaction entre HlgC et C5aR n'a pas été analysée et les résidus clés de HlgC permettant cette interaction n'ont pas été identifiés. Mais, les expériences faites en présence de W-54011, un

antagoniste spécifique de l'action de C5a sur C5aR, suggèrent fortement que l'interaction de LukS-PV et de HlgC avec C5aR ne se fait pas de la même manière. Il ne nous est pas possible au stade actuel d'envisager la conséquence d'une fixation compétitive, mais différente au même récepteur. Dans nos expériences nous n'avons pas mesuré une activation de C5aR par l'une ou l'autre des sous-unités (HlgC ou LukS-PV) bien que cette possibilité ait été proposée par Colin et Monteil dès 2003 (Colin and Monteil, 2003). Pour aboutir aux effets définis ici la présence de la sous-unité de classe F est nécessaire. Un récepteur membranaire pour LukF-PV a été décrit par Meyer *et al.*, qui ont proposé que LukF-PV pouvait se fixer à la fois à son récepteur et au complexe LukS-PV-récepteur (C5aR) (Meyer et al., 2009). Ceci pourrait expliquer la différence de l'effet de la LPV en fonction de la concentration de LukF-PV, qui pourrait déclencher une signalisation à travers C5aR, le récepteur de LukS-PV, ou à partir du récepteur de LukF-PV. Enfin, bien que HlgC se fixe sur C5aR, cette leucotoxine cible un spectre cellulaire plus large que LukS-PV, suggérant soit la présence d'un autre récepteur protéique soit la présence d'un environnement lipidique permettant sa fixation en absence de C5aR.

La deuxième étape est la fixation de la sous-unité de classe F qui va permettre l'activation des changements en Ca^{2+} libre intracellulaire et la formation du pré-pore octamérique. L'association de n'importe quelle sous-unité S avec une sous-unité F peut former une leucotoxine active avec des affinités plus ou moins élevées. En échangeant les sous-unités de classe F de HlgC/HlgB et la LPV, nous avons pu démontrer que la présence de la sous-unité F est cruciale à l'action des leucotoxines puisque les voies intracellulaires activées suite à leur association sont définies par la sous-unité de classe F, dont le rôle était jusqu'à présent mal estimé.

Dans un troisième temps et dans des conditions physiologiques, HlgC/HlgB et la LPV semblent être internalisées, et cela va permettre une augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Cependant le mécanisme d'internalisation est encore inconnu, et notre attention est attirée par les différences qui se manifestent rapidement entre les deux leucotoxines et qui suggère un adressage différent de celles-ci.

Bien que C5aR soit considéré comme le récepteur majeur de la LPV et qu'il soit le récepteur le plus fréquent à la membrane des neutrophiles, le récepteur C5L2 a également été décrit comme récepteur de LukS-PV (Spaan et al., 2013). Le rôle de C5L2 est toujours énigmatique et controversé. Il n'induit aucune signalisation calcique suite à la liaison de C5a. Cependant, Hsu *et al.* ont montré qu'une interaction entre C5L2 et C5aR est nécessaire pour une internalisation optimale de C5aR suite à la fixation de C5a et l'activation des ERKs (Hsu et al., 2014). La

possibilité que C5L2 intervienne dans l'internalisation des leucotoxines n'a pas été recherchée, mais serait piste d'investigation une intéressante.

Comme nous avons pu le vérifier, l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$, ne suit pas le même schéma que celle induite par C5a ou le fMLP, l'autre peptide chimio-attractant analysé dont le récepteur est également un GPCR pourtant le récepteur des leucotoxines est bien le C5aR. Ces divergences rappellent la signalisation biaisée qui a été décrite pour plusieurs GPCR (Khoury et al., 2014), où des agonistes d'un même récepteur l'activent d'une manière différente. Et puisque les voies activées par les deux leucotoxines sont différentes, HlgC/HlgB et la LPV pourraient détourner C5aR différemment, avec l'aide de la sous-unité de classe F.

HlgC/HlgB, que ce soit sur les hPMNs ou les neurones en grain du cervelet de rat, permet la libération du Ca^{2+} des compartiments acides (endosomes-lysosomes) en impliquant probablement le NAADP (ou « Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate »), un messenger intracellulaire produit par CD38 qui est une ADP-ribosyl cyclase. Cette libération locale de Ca^{2+} déclenche la libération des stocks réticulaires par un mécanisme de « Calcium Induced Calcium Released » (CICR). La diminution de la concentration du Ca^{2+} dans le RE permet d'activer les canaux CRACs déclenchant une entrée de Ca^{2+} extracellulaire. En effet, l'activation des canaux CRACs fait intervenir deux partenaires : (1) les protéines « STromal Interaction Molecule 1 » (STIM1), initialement dispersées au niveau du RE, qui jouent le rôle de détecteurs de Ca^{2+} grâce à un domaine de fixation au Ca^{2+} dans leur partie N-terminale (Roos et al., 2005; Zhang et al., 2005) et (2) les protéines « Calcium release-activated calcium channel protein 1 » (ORAI 1), présentes initialement au niveau de la membrane plasmique sous forme de dimères inactifs (Zhang et al., 2006). Suite à la libération des stocks réticulaires, des protéines STIM1 se multimérisent et se concentrent dans des régions de jonction entre le RE et la membrane plasmique où ils entrent en contact avec ORAI1 permettant leur activation suite à la formation de canaux tétramériques (Soboloff et al., 2012). La colocalisation de ces protéines a été observée par microscopie confocale en présence de HlgC/HlgB au niveau des neurones en grains du cervelet de rat. L'activation de l'ADP-ribosylcyclase CD38, montrée sur ces neurones n'a pourtant pas été montrée pour les hPMNs. La LPV, quant à elle, déclenche la libération du Ca^{2+} à partir de stocks neutres et plus particulièrement du RE. L'inhibiteur des canaux CRACs, YM-58483, ne modifie pas l'intensité de l'effet de la LPV, mais l'effet de cette leucotoxine est déclenché plus rapidement. L'interprétation de ces résultats ne permet pas de comprendre le rôle des CRACs dans la signalisation de la LPV.

L'analyse pharmacologique réalisée dans le but d'affiner la compréhension du mode d'action de ces deux leucotoxines sur les hPMNs s'est avérée complexe. Des observations sans ambiguïté nous ont permis de conclure que les deux toxines, peut être à cause d'adressages spécifiques, mobilisent le Ca^{2+} à partir de compartiments différents. Nous avons utilisé certaines drogues pour analyser leur impact sur l'effet des toxines en fonction de leur cible réputée la plus spécifique. Les résultats que nous avons obtenus ne s'intègrent pas facilement avec tous les autres résultats, probablement parce que ces molécules exercent aussi un effet agoniste ou antagoniste sur d'autres cibles. Ainsi, l'ACA en plus de son effet sur les PLA2, pourrait bloquer différents canaux calciques de la famille des TRPs (Harteneck et al., 2007; Kraft et al., 2006), le BEL en plus de son effet sur la iPLA2 peut agir comme un inhibiteur de sérine protéase (Daniels et al., 1983) et le TFP ne peut pas être considéré comme un inhibiteur sélectif des interactions de la calmoduline (Luthra, 1982). Le Gd^{3+} est un inhibiteur de canaux cationiques non-sélectifs (Chakfe and Bourque, 2000), l'Econazole et le SKF-96365 peuvent également inhiber des canaux, autres que les SOCs, avec des plages de concentration similaires (Franzius et al., 1994). De plus, certains inhibiteurs, comme le TFP, peuvent avoir un effet plus ou moins toxique sur les cellules, ce qui rend difficile de différencier entre l'effet d'inhibition spécifique sur la cible et l'effet de fragilisation des cellules.

Ainsi, malgré le manque d'inhibiteurs spécifiques pour identifier les voies activées par les deux leucotoxines, HlgC/HlgB et la LPV semblent faire intervenir des voies complexes où les iPLA2 jouent un rôle ainsi que des canaux cationiques membranaires qui pourraient être des TRPs. En effet, plusieurs canaux de la famille des TRP (transient receptor potential) ; des TRPCs (Brechard and Tschirhart, 2008; Heiner et al., 2003; Itagaki et al., 2004; McMeekin et al., 2006), des TRPVs (Heiner et al., 2003; Itagaki et al., 2004), et TRPM2 (Brechard and Tschirhart, 2008) ; ont été identifiés sur les hPMNs. Certains de ces TRP sont considérés, comme les canaux CRACs, des SOCs (Brechard and Tschirhart, 2008). Au stade actuel, il est difficile d'établir un lien entre ces effets pharmacologiques et ce que nous connaissons de l'action des toxines. D'autant que l'interprétation de nos résultats part de l'association d'une sous-unité S avec le récepteur C5aR, mais n'analyse pas encore de manière détaillée l'apport de la sous-unité F. Comme nous l'avons mis en évidence, l'association de LukS-PV avec HlgB a des conséquences cellulaires qui semblent liées à l'identité de la sous-unité F, ce qui pourrait suggérer l'activation d'une signalisation différente.

Ces observations ouvrent la question de la formation d'un pore membranaire par ces leucotoxines. Elles ont toujours été décrites comme des PFTs, mais dans les conditions

physiologiques, où l'internalisation a pu être observée, l'intégrité de la membrane a été conservée plus longtemps, surtout pour la LPV. Ceci est en accord avec le comportement de la LPV sur les membranes synthétiques qui, contrairement à HlgC/HlgB, ne forme pas de pore perméable aux ions. Il serait probable que, en présence de Ca^{2+} à concentration physiologique, une internalisation rapide de HlgC/HlgB et/ou de la LPV puisse faciliter la constitution d'un pore dans les vésicules intracellulaires à l'image d'autres toxines comme la shiga-toxine (Bergan et al., 2012) ou le facteur PA de *Bacillus anthracis* (Lowe and Glomski, 2012).

L'activation des hPMNs induite par HlgC/HlgB et la LPV conduit à la libération de cytokines, probablement à cause de l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]$ dans le cytosol. L'IL-8 a été la première cytokine à être détectée pour ces deux leucotoxines, mais la recherche d'autres molécules inflammatoires semble une piste intéressante. La LPV induit la libération de cytokines et l'activation de l'inflammasome sur les macrophages (Perret et al., 2012). D'autres mécanismes pourraient également être déclenchés par les leucotoxines ou les produits libérés par le hPMNs. Nous avons régulièrement observé qu'en présence des leucotoxines le noyau polylobé des neutrophiles se condense, ce qui est accompagné d'autres changements morphologiques qui peuvent rappeler la NETose, qui consiste à former des NETs (Neutrophil Extracellular Traps) non lytiques. C'est un mécanisme de défense de l'immunité innée assuré par les neutrophiles (Cheng and Palaniyar, 2013), où de l'ADN nucléaire couvert par des molécules antimicrobiennes est expulsé dans le milieu extracellulaire *via* des vésicules pour immobiliser l'agent infectieux. En effet en présence de *S. aureus*, le noyau polylobé des PMNs devient rapidement arrondi et condensé, les membranes nucléaires internes et externes se séparent en même temps que la formation de vésicules, et se remplissent d'ADN nucléaire. Puis les vésicules sont extrudées intactes dans l'espace extracellulaire où elles libèrent la chromatine. Ce processus indépendant du mécanisme oxydatif, est très rapide (5-60 min), et ne nécessite pas la lyse des neutrophiles ou même la rupture de la membrane plasmique (Pilszczek et al., 2010). La LPV, comme LukG/LukH (Malachowa et al., 2013), semble induire ce mécanisme, ce qui pourrait être approfondi et recherché pour les autres leucotoxines (Pilszczek et al., 2010).

Enfin, la poursuite de la recherche des cellules cibles des leucotoxines permettrait de comprendre les mécanismes d'action et de réponse des leucotoxines sur des cellules spécialisées, et pourrait prévenir des dommages irréversibles des tissus comme la rétine. Le travail sur les yeux de lapins pigmentés, de race Argente de Champagne, se poursuit, ce qui a permis de montrer que LukS-PV se fixe sur un type cellulaire situé dans la couche neuronale de la rétine.

Notre étude sur le mode d'action de HlgC/HlgB et de la LPV, a permis d'élucider certains aspects des différentes étapes : la fixation, la signalisation calcique et les autres effets cellulaires. Cependant, les détails de ces différentes étapes sont loin d'être complètement compris.

La fixation de HlgC sur C5aR devrait être clarifiée en déterminant à la fois les régions de HlgC importantes pour sa fixation et la région de C5aR nécessaire à cette fixation. Ceci permettra de comprendre comment ces deux leucotoxines de classe S interagissent différemment avec C5aR pour générer des activités cellulaires différentes.

Par la suite, la voie d'endocytose des leucotoxines doit être étudiée aussi bien sur les neutrophiles que sur les neurones. En effet, C5aR activé par les leucotoxines pourrait s'internaliser par la voie clathrine dépendante comme dans le cas de C5a ou par une autre voie de signalisation comme la voie dépendante d'Arf6 ou même la voie dépendante de la cavéoline bien que l'expression de la cavéoline dans les hPMNs soit controversée (Sengelov et al., 1998; Yan et al., 1996), ou bien le mécanisme d'internalisation pourrait dépendre du type cellulaire. Les différentes voies d'internalisation font intervenir un grand nombre d'effecteurs dont certains ne sont pas encore identifiés. Mais des approches pharmacologiques ou de « silencing » de certains effecteurs bien caractérisés pourraient incriminer ou écarter certaines de ces voies.

Puis, cette internalisation déclenche une variation de la concentration de Ca^{2+} libre dans le cytosol. Ces mouvements calciques font intervenir une machinerie complexe, probablement un ensemble de kinases et de canaux calciques spécifiques de chaque type cellulaire, dont l'identification ne semble pas simple. Dans ce contexte, il a été montré que le PMA inhibe la fixation de LukS-PV sur les hPMNs mais cette inhibition peut être restaurée par la staurosporine, un inhibiteur de la PKC (Gauduchon et al., 2001). Avec la découverte du C5aR comme récepteur, une hypothèse, qui mériterait d'être vérifiée, peut être émise. Le PMA permet la phosphorylation de C5aR en activant la voie de la PKC (Rabiet et al., 2007), ce qui induit son internalisation, diminuant ainsi le nombre de sites de fixation de la leucotoxine accessibles à la membrane. L'identification des canaux calciques nécessiterait de trouver des inhibiteurs spécifiques des différents canaux calciques ou utiliser des approches de « silencing », mais qui ne pourront être faites que sur des lignées cellulaires.

Enfin, il serait intéressant de comprendre les autres effets cellulaires de ces leucotoxines, commençant par l'apoptose et la nérose qui ont déjà été décrits pour la LPV, pour comprendre dans quelles conditions ces deux phénomènes ont lieu et leur effet sur l'intégrité membranaire

des hPMNs (Genestier et al., 2005; Pilsczek et al., 2010). Les leucotoxines permettent également de déclencher le burst oxydatif, l'amorçage des hPMNs pour permettre l'action du fMLP (Colin and Monteil, 2003), ainsi que la libération de cytokines. Ces mécanismes de l'immunité innée, qui peuvent avoir des effets aussi bien sur les bactéries que sur les tissus de l'hôte, doivent également être étudiés et contrôlés.

CHAPITRE IV :
INHIBITION DE L'ACTION
DES LEUCOTOXINES DE
S. AUREUS

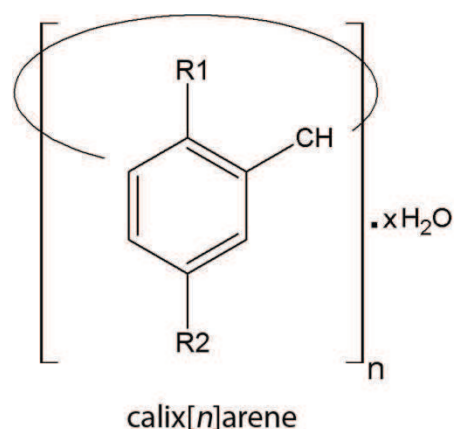
INTRODUCTION

Lors d'un criblage de molécules cycliques ayant un rayon hydrodynamique, une forme, une symétrie et des charges potentiellement compatibles avec la lumière des pores des leucotoxines, afin de les bloquer, une famille de molécules a été retenue. Entre cyclodextrines, doxorubicine peptides cycliques et calixarènes, ce sont ces derniers qui ont l'effet inhibiteur le plus important sur les leucotoxines.

Les calixarènes forment l'une des plus grandes classes de composés organiques macrocycliques synthétiques de la chimie supramoléculaire. Ils ont été découverts en 1872 par von Bayer, puis leur structure macrocyclique a été confirmée en 1944 par Zinke et Ziegler (Perret et al., 2006). Le mot « calixarène » est dérivé de « calix » ou calice en raison de la ressemblance de ce type de molécule à un vase et du mot « arène » qui fait référence à l'élément de base aromatique. Ils sont facilement préparés à partir de la réaction de tert-butyl-phénol et de formaldéhyde, avec le choix de la base, du solvant et de la température de réaction qui permettent la synthèse sélective des macrocycles contenant 4, 6 ou 8 unités phénoliques (Figure IV.1). La modification chimique est relativement simple grâce aux groupements différents au niveau de la fonction phénolique et de la position para sur le cycle aromatique. Ceci permet de les modifier de manière sélective avec des degrés variables de substitution à chaque face et d'une manière contrôlée (Perret and Coleman, 2011). Ainsi, certaines substitutions (ex: sulfonates $-SO_3H$) permettent la solubilisation des calixarènes qui sont en général peu solubles dans l'eau, ce qui présente un avantage pour leur application en biologie.

Figure IV. 1 : Structure type d'un calix[n]arène,

avec $n = 4, 5, 6, 7, 8$ ou 9



Les calixarènes sont utilisés dans des domaines très variés comme la chimie, la physique nucléaire, les nanotechnologies, l'imagerie et la biologie/médecine. Dans ce dernier domaine, les calixarènes peuvent être utilisés soit pour leur activité biologique propre soit comme squelette sur lequel sont greffés des pharmacophores (Perret and Coleman, 2011). La première activité biologique des calixarènes a été décrite en 1955 (Cornforth et al., 1955), où l'activité d'antituberculeux des calixarènes a été montrée. Quarante ans plus tard, d'autres activités antibactériennes (Ben Salem et al., 2011; Dibama et al., 2009; Formosa et al., 2012; Grare et al., 2010; Grare et al., 2007; Grare et al., 2006; Lamartine et al., 2002a; Mourer et al., 2009; Mourer et al., 2006; Mourer et al., 2012), anti-fongiques (Lamartine et al., 2002a) et anti-virales (Geller et al., 2010; Mourer et al., 2010; Tsou et al., 2010) ont été décrites. Les calixarènes ont également été utilisés : pour leurs propriétés anticoagulantes et anti-thrombotiques (De Silva et al., 2005), dans le mimétisme d'enzymes (Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (Shinkai et al., 1986), ATP-ase (Tian-Ming et al., 2002)), dans le mimétisme d'inhibiteurs d'enzymes (inhibition de la phosphatase alcaline (Vovk et al., 2004)), comme activateurs d'enzymes (comme la PLA₂) (Korchowiec et al., 2013), comme modulateurs de canaux membranaires (pompe sodium (Labyntseva et al., 2007; Veklich et al., 2006), canaux chlore (Droogmans et al., 1999; Droogmans et al., 1998; Singh et al., 1995)), le mimétisme d'anticorps (fixation de l'Héparine (Mecca et al., 2006)), pour la formation de canaux ioniques (Jin et al., 1998; Kobuke and Nagatani, 2000), la transfection d'ADN (Lalor et al., 2007), et pour leurs propriétés anticancéreuses (Fujimoto et al., 2000; Menger et al., 2004).

Ainsi, l'effet de trois calixarènes de base (Figure IV.2), le para-sulfonato-calix[4]arène (SC4), le para-sulfonato-calix[6]arène (SC6) et le para-sulfonato-calix[8]arène (SC8), sur l'action des leucotoxines a été évalué (Laventie et al., 2013). Ces calixarènes sont capables d'inhiber l'effet hémolytique de HlgA/HlgB et d'inhiber l'activité de formation de pore sur des membranes synthétiques (liposomes) et les membranes lipidiques planes (PLM). Sur les hPMNs, ces calixarènes inhibent l'action des leucotoxines, la fixation, l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ et la perméabilisation de la membrane au BET et ceci pour toutes les leucotoxines testées, bien qu'à des concentrations différentes. Bien que le but initial fût de trouver des molécules capables d'obturer le pore formé par les leucotoxines, les calixarènes inhibent l'action des leucotoxines différemment. Une interaction directe avec un ratio 1 :1 entre les toxines de classe S et les calixarènes a été montrée par résonance plasmonique de surface (RPS) et par spectrométrie de masse par ionisation Electrospray (nanoESI-MS). Les calixarènes se fixent donc sur les toxines de classe S et les empêchent de se fixer sur leurs récepteurs et ainsi inhibent leurs effets, ils peuvent également détacher la sous-unité S déjà fixée à la membrane en absence de sous-unité

de classe F. Ces calixarènes sont efficaces sur les différentes leucotoxines testées (la LPV, les γ -hémolysines HlgA/HlgB et HlgC/HgB et Luke/LukD) avec des affinités différentes en fonction des différentes toxines de classe S. Mais aussi, l'interaction de ces 3 calixarènes avec les leucotoxines est différente en fonction des calixarènes, c'est SC8 qui a l'effet inhibiteur le plus important suivi par celui de SC6, et un effet beaucoup plus faible pour SC4 (SC8 > SC6 >> SC4). De plus, ces calixarènes n'ont pas d'effet hémolytique ni leucocytotoxique à des concentrations inférieures à 500 μ M. Le SC8 est également efficace *in vivo*, il diminue l'inflammation due à une injection de leucotoxines dans les yeux de lapins (Laventie et al., 2013).

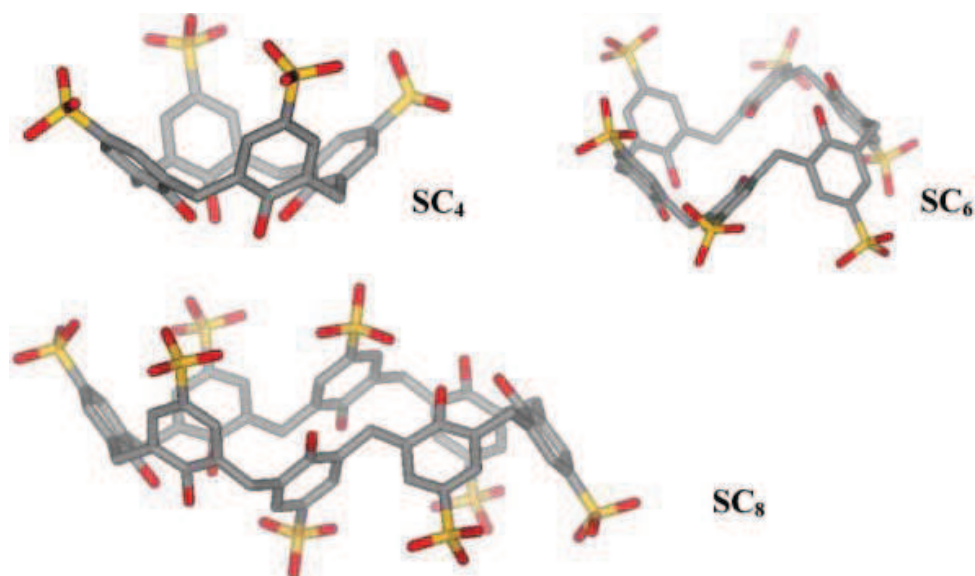


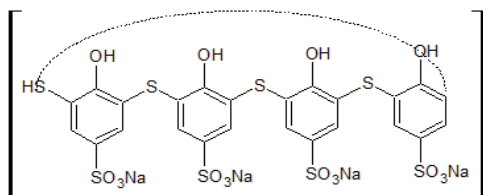
Figure IV. 2 : Structure de SC4, SC6 et SC8 (Perret et al., 2006).

Abréviations: SC4, 6 ou 8 : *para*-sulfonato-calix[n]arène avec $n = 4, 6$ ou 8 . Echelle : liaison C–C = 1,54 Å.

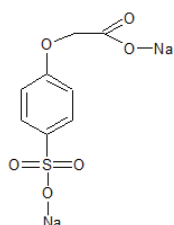
Les effets inhibiteurs de SC4, SC6 et SC8 sur les leucotoxines nous ont poussés à tester de nouveaux dérivés de calixarènes synthétisés par le Dr. Zouhair Asfari (Laboratoire de Chimie analytique et Sciences séparatives, UMR 7178, Cronenbourg, France). Le cycle de base des calix-[n]-arène avec n faible étant plus stable et de conformation unique dans l'espace, les nouveaux calixarènes testés sont des dérivés du SC4.

Sept dérivés du *para*-sulfonato-calix[4]arène (SC4) ont été synthétisés dans le but d'avoir une meilleure efficacité d'inhibition de l'effet des leucotoxines, visant des effets semblables voir meilleurs que le SC8 qui est plus difficile à synthétiser et surtout à modifier. Pour le « thia-calix[4]arène » (Thia-SC4), les atomes de carbone entre les cycles du calix[4]arène ont été substitués par des atomes de soufre (Figure IV.3). Le 1,3-dicarboxyméthoxy-*para*-sulfonate du sodium-calix[4]arène (DCM-SC4) comporte deux groupements carboxyméthoxy (-CH₂-COOH) qui ajoutent des charges négatives au SC4. La molécule de base qui forme ce calixarène, le « carboxyméthoxy-*para*-sulfonate phénol », a été testée comme contrôle.

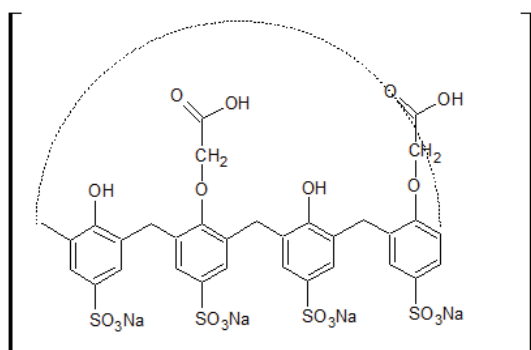
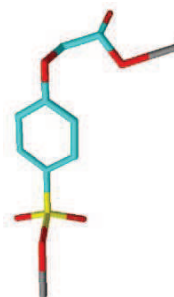
Aux 5 autres calixarènes des couronnes carbonées plus complexes ont été ajoutées. Le 1,3-dicarboxyméthoxy-2,4-monocouronne-6-*para*-sulfonate du sodium-calix[4]arène (MonoCouronne-SC4 ou MC-SC4) porte en plus du DCM-SC4 une couronne qui augmente la taille et stabilise la structure de ce dérivé du SC4 (Figure IV.3). Le *para*-sulfonate du sodium-bis-benzo-couronne-6-calix[4]arène (Bis-Benzo-SC4), le *para*-sulfonate du sodium-bis-naphto-couronne-6-calix[4]arène (Bis-Naphto-SC4) (Asfari et al., 1995), le *para*-sulfonate du sodium-bis-esculetin-couronne-6-calix[4]arène (Bis-Esculetin-SC4) et le *para*-sulfonate du sodium-bis-(dibenzo)-couronne-6-calix[4]arène (Bis-Dibenzo-SC4) comportent quant à eux deux couronnes avec un groupement benzo, naphto, esculétine (connu également sous le nom d'aesculetin ou de 6,7-dihydroxycoumarine) ou deux groupements benzo sur chaque couronne, respectivement (Figure IV.4). L'ajout des 2 couronnes augmente la taille et la rigidité des molécules.



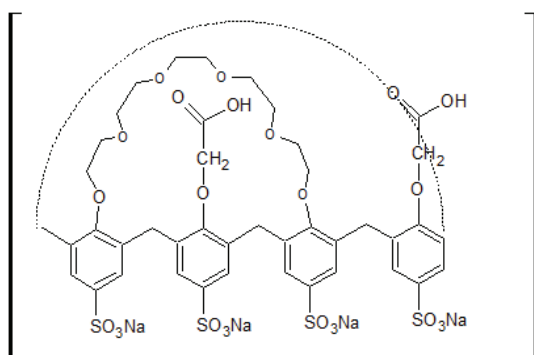
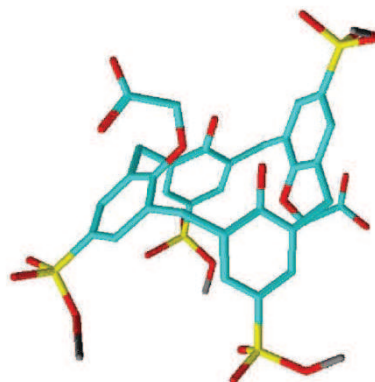
para-sulfonate du sodium-thia-calix[4]arène (Thia-SC4)



carboxyméthoxy-*para*-sulfonate phénol



1,3-dicarboxyméthoxy-*para*-sulfonate du sodium-calix[4]arène
(dicarboxyméthoxy-SC4 ou DCM-SC4)



1,3-dicarboxy-méthoxy-2,4-monocouronne-6-*para*-sulfonate du sodium-calix[4]arène
(MonoCouronne-SC4 ou MC-SC4)

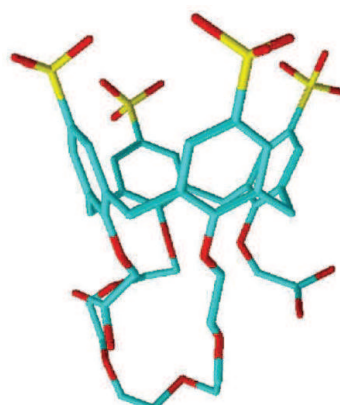
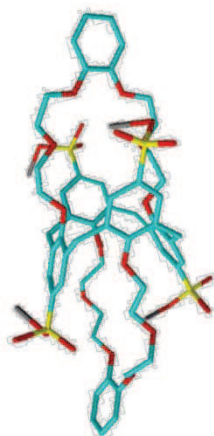
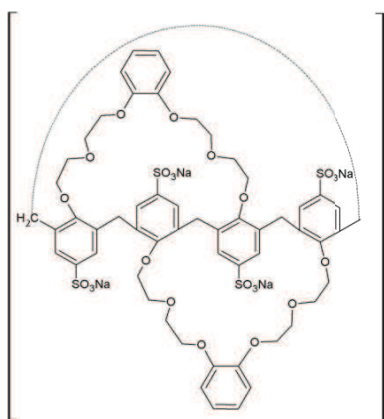
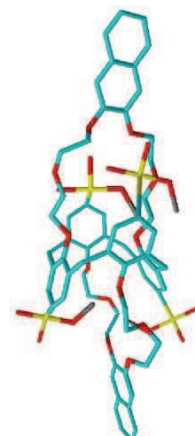
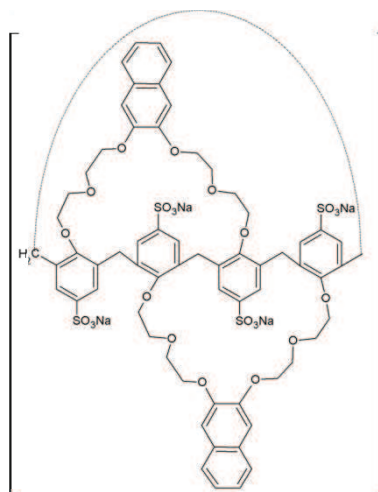


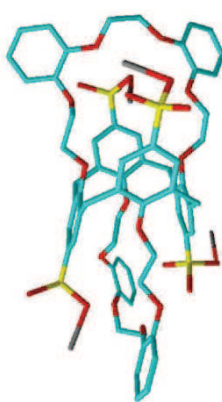
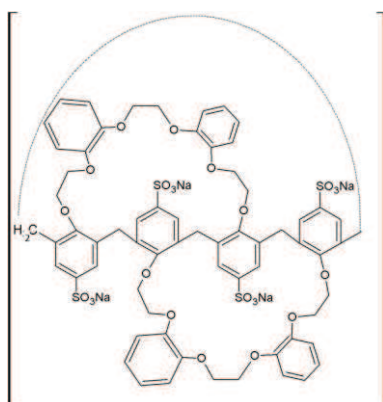
Figure IV. 3 : Structures planes (gauche) et 3D (droite) du Thia-SC4, du carboxyméthoxy-*p*-sulfonate phénol, du DCM-SC4 et du MC-SC4.



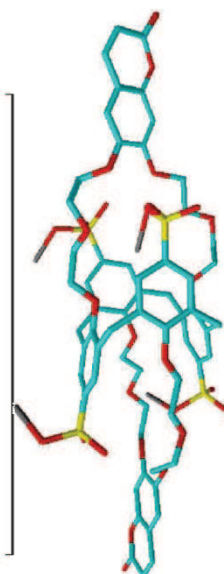
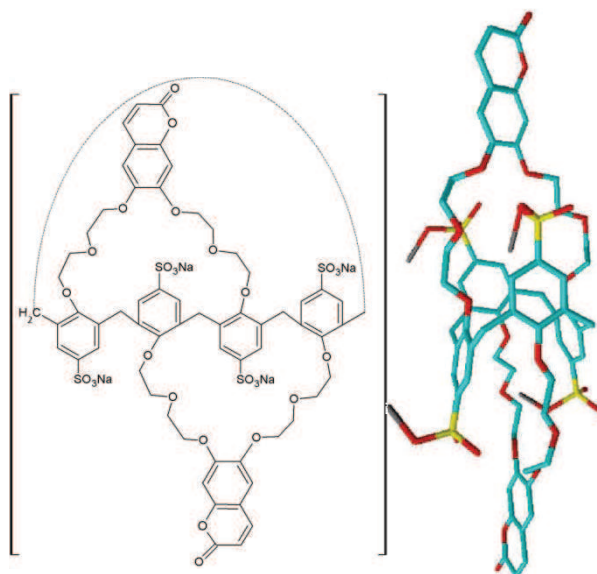
Para-sulfonate du sodium-bis-benzo-couronne-6-calix[4]arène (Bis-Benzo-SC4)



para-sulfonate du sodium-bis-naphto-couronne-6-calix[4]arène (Bis-Naphto-SC4)



Para-sulfonate du sodium- bis-(dibenzo)-couronne-6- calix[4]arène (Bis-Dibenzo-SC4)



Para-sulfonate du sodium-bis-esculetin-couronne-6-calix[4]arène (Bis-Esculetin-SC4)

Figure IV. 4 : Structures planes (gauche) et 3D (droite) du Bis-Benzo-SC4, du Bis-Naphto-SC4, du Bis-Dibenzo-SC4 et du Bis-Esculetin-SC4.

RESULTATS

INHIBITION DE L'ACTION DES LEUCOTOXINES SUR LES HPMNS

L'effet inhibiteur des nouveaux calixarènes a été testé au niveau des différentes étapes de l'action des leucotoxines : la fixation, l'activation des hPMNs (augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$) et la perméabilisation de la membrane au BET. Des gammes de concentration de calixarènes ont été testées pour chaque leucotoxine permettant de calculer des concentrations inhibitrices de 50% de l'effet des leucotoxines (IC50) et de comparer l'efficacité des différents calixarènes. Les IC50 des calixarènes sont déterminés à 30 minutes suite à l'application des leucotoxines pour les tests de fixation et de perméabilisation au BET. Pour le test d'activation des hPMNs, les IC50 sont déterminés suite à la mesure de la pente de l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$.

HlgC/HlgB ET LA LPV

La molécule de base, le carboxyméthoxy-*p*-sulfonate phénol, utilisée comme contrôle, n'a aucun effet sur l'action de HlgC/HlgB et la LPV sur la perméabilisation des hPMNs au BET ni sur la fixation de LukS*-PV à des concentrations allant jusqu'à 1mM de cette molécule.

Parmi les 7 autres molécules, seules 3 permettent d'avoir des effets inhibiteurs proches du SC8 pour HlgC/HlgB et la LPV que ce soit au niveau de la fixation, de la variation de la $[Ca^{2+}]_i$, ou de la perméabilisation de la membrane des hPMNs au BET. Les différentes IC50 sont représentées dans les tableaux en fonction des leucotoxines et des tests effectués et les calixarènes sont classés par ordre d'efficacité (Tableau IV.1). Deux SC8 (SC8 Acros et SC8 ZA(1)) synthétisés par deux laboratoires différents ont été utilisés comme contrôles, afin d'évaluer les effets des nouveaux calixarènes. En effet, le Bis-Benzo-SC4, le Bis-Naphto-SC4 et le Bis-Dibenzo-SC4 ont des IC50 inférieures à 1 μ M dans le cas de HlgC/HlgB pour les trois tests effectués. Ces IC50 sont légèrement inférieures à ceux des SC8 pour les tests de fixation et d'activation des hPMNs. Puis, le MonoCouronne-SC4 et le DCM-SC4 ont des IC50 d'environ 2 μ M pour le test de perméabilisation des membranes des hPMNs et enfin l'Esculetin-SC4 et le Thia-SC4 ont des IC50 plus importantes (6,5 et 9,5 μ M pour l'Esculetin-SC4 et 15 et 30 μ M pour le Thia-SC4 selon le test effectué).

Pour la LPV, le SC8 reste le calixarène le plus efficace avec des IC50 variant entre 2 et 16 μ M selon le test effectué (Tableau IV.1). Cependant, le Bis-Benzo-SC4, le Bis-Naphto-SC4 et le Bis-Dibenzo-SC4 ont des IC50 variant entre 6 et 25 μ M selon le test effectué et le calixarène utilisé. En absence de LukF-PV les IC50 de ces calixarènes sont encore plus faibles, ce qui est en accord avec les résultats publiés par Laventie *et al* montrant qu'en absence de LukF-PV, les calixarènes

sont même capables de libérer une partie des LukS*-PV déjà fixée à la membrane. Le MonoCouronne-SC4, le DCM-SC4 et le Thia-SC4 viennent par la suite avec des IC₅₀ entre 70 et 100 μ M pour le test de fixation, 100 et 200 μ M pour le test d'activation et de perméabilisation des hPMNs. L'Esculetin et le SC4 sont les calixarènes les moins efficaces avec des IC₅₀ supérieures à 300 μ M pour le test de fixation de LukS*-PV/LukF-PV et le test d'activation des hPMNs. Ainsi, le Bis-Benzo-SC4, le Bis-Naphto-SC4 et le Bis-Dibenzo-SC4 présentent des résultats encourageants, vu leur efficacité sur les deux leucotoxines. La Figure IV.5 montre les courbes d'inhibition de la perméabilisation de la membrane des hPMNs par HlgC/HlgB et la LPV. Les courbes correspondantes à ces trois calixarènes s'approchent des courbes des deux SC8 utilisés au contraire de l'Esculetin-SC4 qui a un effet moins important.

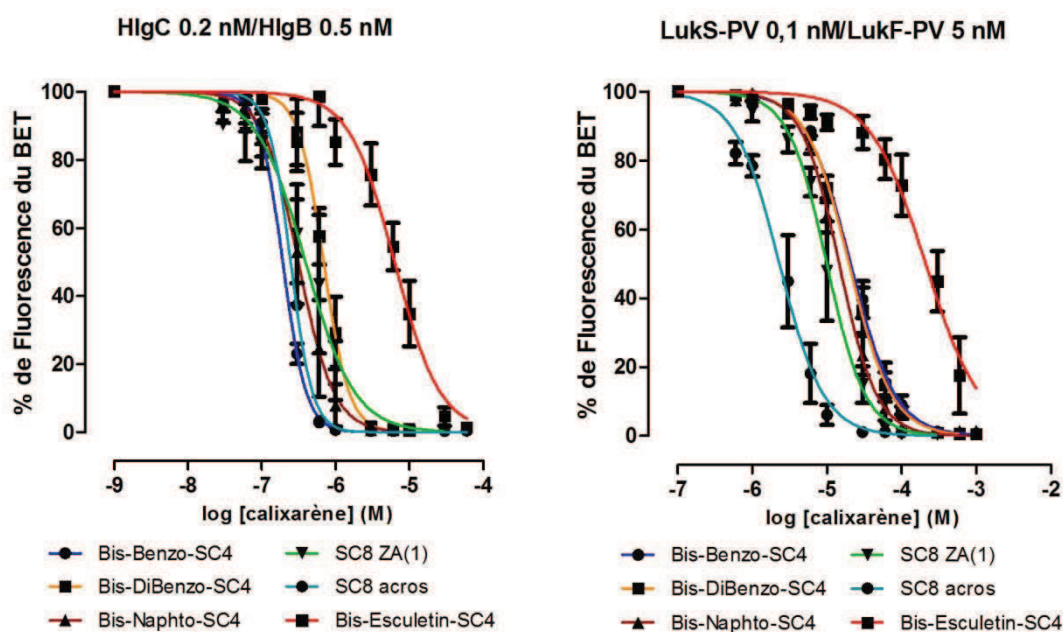


Figure IV. 5 : Effet des calixarènes sur la perméabilisation des hPMNs au BET due à HlgC/HlgB et la LPV.

La perméabilisation des hPMNs au BET est mesurée 30 min suite à l'application des leucotoxines en présence de concentrations croissantes de calixarènes. La fluorescence du bromure d'éthidium est mesurée en cytométrie en flux. Les courbes sont tracées grâce au logiciel PRISM par la formule de régression non linéaire « dose-response inhibition » permettant de calculer les IC₅₀ (n = 3). Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard de la moyenne (SEM ou standard error of the mean).

Fixation	HlgC/HlgB* (0,2nM/0,5nM)
Bis-Benzo-SC4	0,18 +/- 0,01 µM
Bis-Naphto-SC4	0,27 +/- 0,01 µM
Bis-DiBenzo-SC4	0,59 +/- 0,02 µM
SC8 Acros	0,90 +/- 0,08 µM
SC8 ZA(1)	1,63 +/- 0,16 µM
Bis-Esculetin-SC4	9,46 +/- 0,50 µM
Thia-SC4	31,94 +/- 2,10 µM

[Ca ²⁺] _i	HlgC/HlgB (0,2nM/0,5nM)
Bis-Benzo-SC4	0,20 +/- 0,01 µM
Bis-DiBenzo-SC4	0,58 +/- 0,04 µM
Bis-Naphto-SC4	0,62 +/- 0,09 µM
SC8 ZA(1)**	1,34 µM
SC8 Acros ***	1,83 +/- 0,13 µM
Bis-Esculetin-SC4	6,70 +/- 0,32 µM
Thia-SC4	34,62 +/- 4,52 µM
MC-SC4	ND
DCM-SC4	ND

BET
Bis-Benz
SC8 Acro
Bis-Napht
SC8 ZA(1
Bis-DiBe
MC-SC4
DCM-SC4
Bis-Escu
Thia-SC4

Fixation	LukS*-PV/LukF-PV (0,1nM/5nM)
SC8 Acros***	6,19 +/- 0,87 µM
Bis-Naphto-SC4	14,09 +/- 1,1 µM
Bis-DiBenzo-SC4**	15,6 µM
Bis-Benzo-SC4	23,68 +/- 1,44 µM
DCM-SC4 **	73,64 µM
Thia-SC4**	85,3 µM
MC-SC4**	104 µM
Bis-Esculetin-SC4***	347,1 +/- 8,75 µM

[Ca ²⁺] _i	LukS-PV/LukF-PV (0,1nM/5nM)
SC8 Acros	15,8 +/- 1,2 µM
Bis-Naphto-SC4	16,9 +/- 2,1 µM
SC8 ZA(1) ***	17,6 +/- 1,3 µM
Bis-DiBenzo-SC4	21,55 +/- 1,3 µM
Bis-Benzo-SC4	24,59 +/- 2,0 µM
Thia-SC4	188,4 +/- 14,9 µM
SC4 ***	347 +/- 52,13 µM
Bis-Esculetin-SC4	360,7 +/- 40,27 µM
MC-SC4	ND
DCM-SC4	ND

BET
SC8 Acro
SC8 ZA(1
Bis-Napht
Bis-DiBe
Bis-Benz
DCM-SC4
Thia-SC4
MC-SC4
Bis-Escu
SC4**

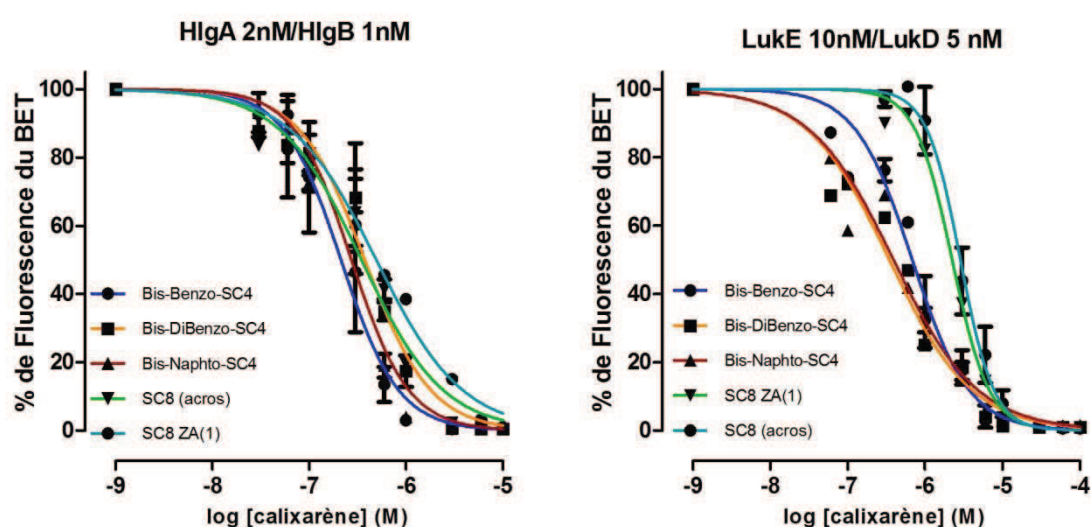
Fixation	LukS*-PV (0,1nM)
SC8 Acros ***	2,59 +/- 0,2 µM
SC8 ZA(1) ***	4,15 +/- 0,3 µM
Bis-Naphto-SC4	6,28 +/- 0,3 µM
Bis-DiBenzo-SC4	8,83 +/- 0,7 µM
Bis-Benzo-SC4	8,13 +/- 0,5 µM
Thia-SC4	49,12 +/- 2,4 µM
Bis-Esculetin-SC4	170,8 +/- 11,9 µM

Tableau IV. 1 : Résumé des IC50 des différents calixarènes

Les tableaux à gauche représentent le test de fixation des leucotoxines des hPMNs, les tableaux du milieu représentent le test d'activation de la [Ca²⁺]_i et les tableaux à gauche représentent le test de perméabilité au BET. LukS*-PV et HlgB* : leucotoxines marquées à la fluorescence.

LES AUTRES LEUCOTOXINES

Les effets des calixarènes, Bis-Benzo-SC4, Bis-Naphto-SC4, Bis-Dibenzo-SC4, SC8 Acros et SC8 ZA(1), sur la perméabilisation de la membrane des hPMNS au BET par HlgA/HlgB et Luke/LukD ont été recherchés. Les IC₅₀ du Bis-Benzo-SC4, Bis-Naphto-SC4, Bis-Dibenzo-SC4 et SC8 Acros ne sont pas significativement différentes (test ANOVA, post test Tukey, $\alpha=0,05$) pour HlgA/HlgB. Pour Luke/LukD, Bis-Benzo-SC4, Bis-Naphto-SC4, Bis-Dibenzo-SC4 sont plus efficaces que les SC8. Le Bis-Benzo-SC4, le Bis-Naphto-SC4 et le Bis-Dibenzo-SC4 sont donc également efficaces pour l'inhibition de l'effet de HlgA/HlgB et Luke/LukD avec des IC₅₀ inférieures à 1 μ M (Figure IV.6).



Bis-Benzo-SC4	0,21 +/- 0,03 μ M
Bis-Naphto-SC4	0,27 +/- 0,04 μ M
SC8 Acros	0,35 +/- 0,04 μ M
Bis-DiBenzo-SC4	0,38 +/- 0,04 μ M
SC8 ZA(1)*	0,49 μ M

Bis-DiBenzo-SC4	0,35 +/- 0,05 μ M
Bis-Naphto-SC4	0,39 +/- 0,07 μ M
Bis-Benzo-SC4	0,68 +/- 0,06 μ M
SC8 ZA(1)*	2,24 μ M
SC8 Acros	2,86 +/- 0,2 μ M

Figure IV. 6 : Effets des calixarènes sur HlgA/HlgB et Luke/LukD

La perméabilisation des hPMNs au BET est mesurée 30 min suite à l'application des leucotoxines HlgA/HlgB (à gauche) et Luke/LukD (à droite) en présence de concentrations croissantes de calixarènes. La fluorescence du bromure d'éthidium est mesurée en cytométrie en flux. Les courbes sont tracées grâce au logiciel PRISM par la formule de régression non linéaire « dose-response inhibition » permettant de calculer les IC₅₀. Les IC₅₀ correspondantes à chaque graphe sont présentées en dessous de ce dernier par ordre décroissant d'efficacité. Les barres d'erreurs représentent la SEM. Le Bis-Benzo-SC4, le Bis-Naphto-SC4 et le Bis-Dibenzo-SC4 sont aussi efficaces que SC8 pour HlgA/HlgB et plus efficaces pour Luke/LukD.
* : n=1 sinon n=2.

Le test d'hémolyse a été effectué à des concentrations de calixarènes allant de 1 μM à 2 mM en doublant à chaque fois la concentration du calixarène. Le Bis-DiBenzo-SC4 et le Bis-Esculetin-SC4 ne présentent aucun effet hémolytique jusqu'à 2mM. Le Bis-Benzo-SC4 et le Bis-Naphto-SC4 ne sont pas hémolytiques jusqu'à une concentration de 1mM mais, à 2mM, ils sont responsables de 27% d'hémolyse. Le Thia-SC4 commence à être hémolytique à 250 μM , SC8 Acros et SC8 ZA(1) à 500 μM , ce qui est en accord avec les résultats déjà publiés (Laventie et al., 2013) (Figure IV.7).

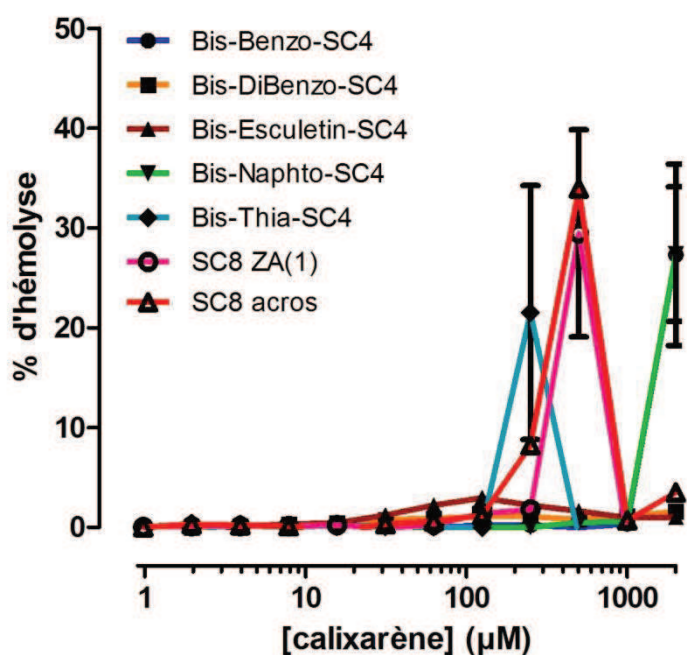


Figure IV. 7 : Test d'hémolyse des calixarènes.

Le Thia-SC4 présente une hémolyse à 250 μM , le SC8 Acros et le SC8 ZA(1) à 500 μM , et le Bis-Benzo-SC4 et le Bis-Naphto-SC4 à 2 mM. Les barres d'erreurs représentent les SEM ($n=3$ sauf pour Bis-Dibenzo-SC4, $n=2$ et SC8 Acros, $n=1$).

Cependant, une précipitation de l'hémoglobine a été observée à partir de 500 μM pour le Thia-SC4 et 1mM de SC8 Acros et SC8 ZA(1). Ceci indique une acidification du milieu ce qui a été montré suite à la mesure du pH des dilutions de calixarènes. SC4, les deux SC8, le Thia-SC4 et le DCM-SC4 ont un pH inférieur à 2, le Bis-Naphto-SC4 a un pH de 4,8, le Bis-Benzo-SC4 a un pH de 4,6, le MC-SC4 et le Bis-Esculetin-SC4 ont un pH de 5,5 ; le Bis-Dibenzo-SC4 a un pH de 6,3 et le

carboxyméthoxy-*p*-sulfonate phénol a un pH basique supérieur à 9. Les solutions de calixarènes à pH acide ont alors été neutralisées par de la soude (pH final allant de 7,1 à 7,6) et l'activité hémolytique a été retestée. Ainsi, après neutralisation, tous ces calixarènes ne sont pas significativement hémolytiques jusqu'à 2mM, sauf le SC8 Acros et le SC8 ZA(1) qui présentent respectivement 10 % et 33 % d'hémolyse à 2 mM.

EVALUATION DE L'EFFET LEUCOCYTOTOXIQUE DES CALIXARENES

Le Bis-Benzo-SC4, le Bis-Naphto-SC4, le Bis-Dibenzo-SC4 et le Thia-SC4 ne montrent aucun effet leucocytoxique jusqu'à 300 μ M suite à une incubation allant jusqu'à 2 h (Figure IV.8). Le SC8 ZA(1) est responsable d'un changement de la morphologie de 9 % des cellules à 300 μ M suite à une incubation d'1h, et de 4 % à 100 μ M et 47 % à 300 μ M après une incubation de 2 h. Cependant, ces concentrations restent 10 à 30 x supérieures à l'IC₅₀ du SC8 ZA(1).

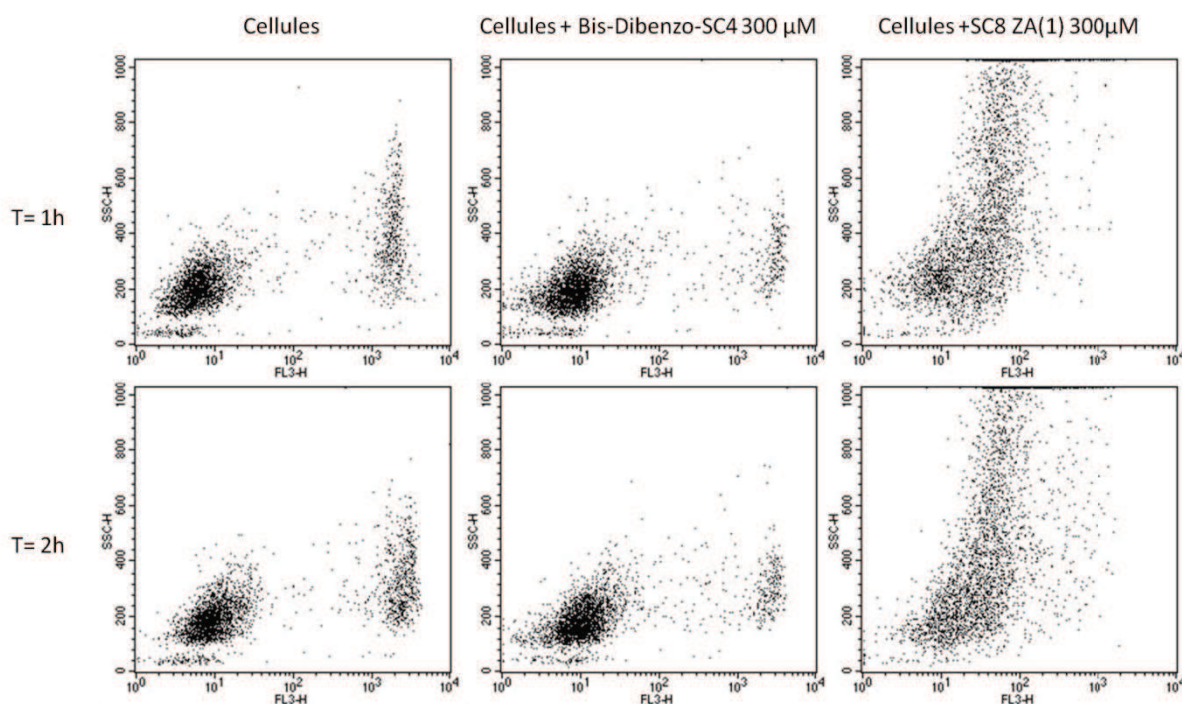


Figure IV. 8 : Effets du Bis-Dibenzo-SC4 et du SC8 ZA(1) sur les hPMNs.

L'effet des calixarènes sur les hPMNs a été suivi par cytométrie en flux en présence de BET, FL3-H correspond à la fluorescence du BET intégré dans les cellules (an abscisse) et SSC correspond à la complexité interne (en ordonné) (cellules n = 3.000). Le Bis-Dibenzo-SC4 à 300 μ M n'a pas d'effet sur la morphologie des cellules après 1h et 2h d'incubation, alors que le SC8 ZA(1) perturbe la morphologie des cellules.

REEVALUATION DE L'EFFET INHIBITEUR DES CALIXARENES

Bien qu'un effet hémolytique ne soit pas détecté à des concentrations allant jusqu'à 50 fois leur IC₅₀ pour le Bis-Benzo-SC4 et le Bis-Naphto-SC4, et 25 fois pour les SC8, l'effet des calixarènes neutralisés ou non sur la fixation de LukS*-PV (1 nM) sur les hPMNs a été retesté (Tableau IV.2).

Tableau IV. 2 : IC₅₀ des calixarènes sur la fixation de 1 nM de LukS*-PV sur les hPMNs avant et après neutralisation des calixarènes.

LukS*-PV	IC 50 (μM)	
	avant neutralisation	après neutralisation
SC8 Acros	4,89 (n=1)	7,87 +/- 0,59 μM (n=2)
SC8 ZA (1)	-	11,45 +/- 0,98 μM (n=3)
Bis-Dibenzo-SC4	26,32 (n=1)	18,48 +/- 2,17 μM (n=4)
Bis-Naphto-SC4	19,13 +/- 1,3 μM (n=2)	30,32 +/- 1,79 μM (n=3)
Bis-Benzo-SC4	46,63 (n=1)	40,88 +/- 4,96 μM (n=3)
Thia-SC4	193,8 (n=1)	164,3 +/- 46,13 μM (n=3)
SC4 ZA	-	262,2 +/- 12,7 μM (n=2)
DCM-SC4	138 +/- 5,16 μM (n=3)	371,7 +/- 26,63 μM (n=2)
Bis-Esculetin-SC4	-	405,5 +/- 231,29 μM (n=2)
MC-SC4	211,8 +/- 8,21 μM (n=3)	481 +/- 25,65 μM (n=2)
SC4 Acros	345,5 (n=1)	496,9 +/- 24,72 μM (n=2)

Les meilleurs calixarènes pour l'inhibition de la fixation de LukS*-PV sont toujours les SC8, suivis par le Bis-DiBenzo-SC4, le Bis-Naphto-SC4, le Bis-benzo-SC4 qui sont bien plus efficaces que le reste des calixarènes. Les IC₅₀ du SC8 Acros, le Bis-DiBenzo-SC4, le Bis-Naphto-SC4, le Bis-benzo-SC4 et le Thia-SC4 ne sont pas significativement différents avant et après neutralisation (t-test, α=0,05), alors que les IC₅₀ du DCM-SC4 et MC-SC4 augmentent suite à la neutralisation (t-test, α=0,05).

L'effet du SC8 ZA(1), Bis-DiBenzo-SC4, Bis-Naphto-SC4, Bis-Benzo-SC4, Thia-SC4 et SC4 neutralisés sur la perméabilisation de la membrane de hPMNs au BET par les différentes leucotoxines a été également vérifié (Tableau IV.3). Les nouveaux calixarènes, le Bis-DiBenzo-SC4, le Bis-Naphto-SC4 et le Bis-Benzo-SC4, sont aussi efficaces que le SC8 dans l'inhibition de l'effet des leucotoxines HlgC/HlgB, HlgA/HlgB et LukE/LukD (test ANOVA, post test Dunnett,

$\alpha=0,05$), ce qui n'est pas le cas du Thia-SC4 qui a pourtant un effet inhibiteur meilleur que le SC4. Pour la LPV, le SC8 reste le calixarène le plus efficace, mais le Bis-DiBenzo-SC4, le Bis-Naphto-SC4 et le Bis-Benzo-SC4 présentent un effet qui s'approche du SC8 et ils sont plus efficaces que le Thia-SC4 qui a son tour présente une amélioration par rapport au SC4.

Tableau IV. 3 : Effet des calixarènes sur la perméabilisation de la membrane de hPMNs au BET.

Les IC50 sont calculées grâce au logiciel PRISM par la formule de régression non linéaire « dose-réponse inhibition ». Les calixarènes sont classés pour chaque leucotoxine par ordre décroissant de leur efficacité. L'erreur correspond à la SEM. * : n=4 sinon n=3.

BET	LukS-PV/LukF-PV (0,2nM/2nM)	BET	HlgC/HlgB (0,5nM/0,5nM)
SC8 ZA (1)	8,08 +/- 0,38 μ M	SC8 ZA(1)*	0,24 +/- 0,02 μ M
Bis-Naphto-SC4	27,09 +/- 4,2 μ M	Bis-Benzo-SC4*	0,31 +/- 0,03 μ M
Bis-DiBenzo-SC4	37,21 +/- 4,7 μ M	Bis-Naphto-SC4	0,56 +/- 0,04 μ M
Bis-Benzo-SC4	56,73 +/- 5,2 μ M	Bis-DiBenzo-SC4*	0,80 +/- 0,09 μ M
Thia-SC4	208,3 +/- 9,03 μ M	Thia-SC4*	25,18 +/- 3,32 μ M
SC4 ZA	448,8 +/- 21,19 μ M	SC4 ZA*	34,52 +/- 3,16 μ M

BET	HlgA/HlgB (2nM/2nM)	BET	LukE/LukD (5nM/20nM)
Bis-Benzo-SC4	0,17 +/- 0,02 μ M	SC8 ZA (1)	0,31 +/- 0,004 μ M
Bis-Naphto-SC4	0,24 +/- 0,01 μ M	Bis-Benzo-SC4	0,42 +/- 0,01 μ M
SC8 ZA(1)	0,35 +/- 0,02 μ M	Bis-Naphto-SC4	0,75 +/- 0,06 μ M
Bis-DiBenzo-SC4	0,56 +/- 0,03 μ M	Bis-DiBenzo-SC4	0,90 +/- 0,06 μ M
Thia-SC4	14,00 +/- 0,77 μ M	Thia-SC4	8,14 +/- 0,56 μ M
SC4 ZA	37,57 +/- 2,28 μ M	SC4 ZA	18,61 +/- 1,55 μ M

RECHERCHE D'UN EFFET ANTIBIOTIQUE DE CES CALIXARENES

Une activité antibactérienne de certains calixarènes sur *Corynebacterium* (Lamartine et al., 2002b), *Mycobacterium* (Mourer et al., 2012), *Staphylococcus* (Ben Salem et al., 2011) et d'autres genres bactériens (Grare et al., 2010) ont été décrits. Une éventuelle activité antibactérienne des nouveaux calixarènes a été recherchée. Le Bis-Benzo-SC4, Bis-DiBenzo-SC4, Bis-Naphto-SC4, Bis-Esculetin-SC4 et SC8 ZA(1), utilisés à 50 μ g, n'ont aucun effet sur la croissance de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* et *Serratia marenscens*.

CONCLUSION

Suite aux résultats de l'évaluation de l'effet des calixarènes commercialisés SC4, SC6 et SC8 sur l'action des leucotoxines de *S. aureus* (Laventie et al., 2013), de nouveaux calixarènes plus efficaces ont été recherchés. Bien que le SC8 soit le plus efficace, ce sont des dérivés du SC4 qui ont été synthétisés puisque ce dernier présente l'intérêt d'une masse faible, d'une structure rigide, d'une antigénicité probablement plus faible encore, sans altérer fortement les possibilités de dérivation et une énantiomérisation simple comparée à SC6 ou SC8 ; et surtout sa structure ne permet la formation dans l'espace que d'une forme énantiomérique, donc une interaction plus simple à caractériser. Ainsi, le carboxyméthoxy-*p*-sulfonate phénol et 7 dérivés du SC4, le Thia-SC4, le Dicarboxyméthoxy-SC4 (DCM-SC4), le MonoCouronne-SC4 (MC-SC4), le Bis-Benzo-SC4, le Bis-Dibenzo-SC4, le Bis-Naphto-SC4 et le Bis-Esculetin-SC4, ont été testés et leurs effets ont été comparés à ceux du SC4 et du SC8.

Le carboxyméthoxy-*p*-sulfonate phénol n'a aucun effet sur l'activité des leucotoxines. Le Thia-SC4, le DCM-SC4, le MC-SC4 et le Bis-Esculetin-SC4 présentent une amélioration dans l'inhibition de l'effet des leucotoxines par rapport à SC4, mais restent moins efficaces que le SC8. Cependant, le Bis-Benzo-SC4, le Bis-Dibenzo-SC4, le Bis-Naphto-SC4 présentent des résultats comparables au SC8 (tests ANOVA, post test Dunnett, $\alpha=0,05$). Ces trois nouveaux calixarènes sont capables d'inhiber l'action des leucotoxines HlgA/HlgB, HlgC/HlgB, LukE/LukD et la LPV, sachant que l'inhibition de la fixation et de l'activité de cette dernière nécessite des concentrations plus élevées. L'efficacité de ces calixarènes a pu être montrée par trois tests différents : la fixation des leucotoxines à la membrane des hPMNs, l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ et la perméabilisation de la membrane plasmique des hPMNs au bromure d'éthidium, où les IC50 des différents calixarènes sont du même ordre de grandeur. Les IC50 du Bis-Benzo-SC4, Bis-Dibenzo-SC4, Bis-Naphto-SC4 comme le SC8 sont $\leq$ à 1 μ M pour HlgA/HlgB, HlgC/HlgB, LukE/LukD, et $<$ à 50 μ M pour la LPV, alors que l'IC50 du Thia-SC4 est $<$ à 15 μ M pour HlgA/HlgB, HlgC/HlgB, LukE/LukD, et $<$ à 200 μ M pour la LPV. Ainsi, pour HlgA/HlgB, HlgC/HlgB, LukE/LukD, le Bis-Benzo-SC4, le Bis-Dibenzo-SC4 et le Bis-Naphto-SC4 sont aussi efficaces que le SC8 et sont 30 x plus efficaces que le SC4 alors que le Thia-SC4 n'est que 2 x plus efficace que le SC4. Et pour la LPV, le SC8 reste le calixarène le plus efficace mais le Bis-Benzo-SC4, le Bis-Dibenzo-SC4 et le Bis-Naphto-SC4 sont 8 à 16 fois plus efficaces que le SC4 alors que le Thia-SC4 n'est que 2 fois plus efficace que ce dernier.

Bien que le Bis-Benzo-SC4, le Bis-Dibenzo-SC4 et le Bis-Naphto-SC4 ne soient pas aussi efficaces que le SC8 pour l'inhibition des effets de la LPV, ils présentent plusieurs avantages par rapport à

ce dernier. Le Bis-Benzo-SC4, le Bis-Dibenzo-SC4 et le Bis-Naphto-SC4 sont très solubles ce qui n'est pas le cas du SC8. Le pH de la solution de SC8 est inférieur à 2, alors que celui du Bis-Dibenzo-SC4 est neutre et ceux du Bis-Benzo-SC4 et du Bis-Naphto-SC4 sont de 5. De plus, le Bis-Benzo-SC4, le Bis-Dibenzo-SC4 et le Bis-Naphto-SC4 ne présentent aucun effet hémolytique ni leucotoxique jusqu'à des concentrations de 2 mM et 1mM, respectivement. Tandis que, le SC8 présente une hémolyse à partir d'une concentration de 500 μ M ou à partir de 2 mM si la solution est neutralisée et un effet leucotoxique à 300 μ M même après neutralisation de la solution de SC8.

Ainsi, les nouveaux calixarènes testés sont solubles, neutres, non toxiques, moins coûteux en synthèse et aussi efficaces que le SC8 sur toutes les leucotoxines testées. L'intérêt de ces molécules c'est qu'elles peuvent être utilisées en tant qu'auxiliaires de l'antibiothérapie ou comme prévention vis-à-vis de populations à risque. En effet, l'utilisation de ces calixarènes pourrait diminuer fortement la réponse inflammatoire causée par certains facteurs de virulence, sachant que cette dernière nuit à l'efficacité d'une thérapie antibiotique dédiée et peut causer des dégâts à des tissus, ou des organes. De plus, ces calixarènes, vu leur masse, peuvent présenter une meilleure diffusion cellulaire par rapport à des anticorps dirigés contre les leucotoxines. Enfin, le SC4 présente une antigénicité très faible (Grote Gansey et al., 1999), ce qui pourrait être le cas des nouveaux dérivés, contrairement aux antibiotiques.

PERSPECTIVES

SC4, SC6 et SC8 interagissent directement avec la sous-unité de classe S des leucotoxines, avec une stoechiométrie de 1:1 mesurée par des méthodes de nanoESI-MS et SPR. De plus, des expériences de « molecular docking » ont montré que l'un des sites probables d'interaction des SC6 et SC8 est situé près d'une saillie hydrophobe de la structure tridimensionnelle séparant le domaine beta-sandwich du domaine rim de la face externe de ce qui deviendra le pore, mais toujours et uniquement sur les composés S des leucotoxines. L'interaction physique et la stoechiométrie des nouveaux calixarènes, Bis-Benzo-SC4, Bis-Dibenzo-SC4 et Bis-Naphto-SC4, avec leurs cibles doivent être ainsi définies. L'impact de l'interaction des calixarènes avec les composés S des leucotoxines staphylococciques sera évalué par la technique de Differential Scanning Fluorescence (DSF) et les constantes d'affinité/dissociation de l'interaction de ces calixarènes avec leurs cibles moléculaires vont être déterminées par microcalorimétrie, molecular docking et ESI-MS.

Le modèle expérimental développé par Laventie et al. (Laventie et al., 2013) sera réactivé et amélioré pour évaluer les propriétés inhibitrices des nouveaux calixarènes. Par ailleurs, la stabilité de ces calixarènes dans l'eau et dans le sérum, par la conservation de l'activité inhibitrice et la conservation de la masse initiale, sera évaluée.

Enfin, tous les dérivés du SC4 testés ci-dessus ont permis au moins une amélioration de l'effet du SC4, ce qui est un encouragement à la recherche de dérivés efficaces de masse plus faible. Une nouvelle molécule, le para-sulfonate-bis-DiBenzo-couronne-6-thia-calix[4]arène qui regroupera les propriétés du Thia-SC4 et du Bis-DiBenzo-SC4 sera synthétisée et son effet sur les leucotoxines sera évalué.

CHAPITRE V : CONCLUSION

Les γ -hémolysines sont décrites comme des facteurs de virulence aggravant la sévérité de l'infection à *S. aureus* et participent au processus d'inflammation (Girgis et al., 2005; Supersac et al., 1998). Cependant, aucune association clinique précise n'est décrite en raison de la prévalence élevée de ces leucotoxines qui empêche les études épidémiologiques et l'évaluation de leurs rôles dans les maladies humaines spécifiques ou leur association avec des critères de gravité. Néanmoins, leur prévalence élevée suggère que ces facteurs jouent un rôle clé dans la colonisation et/ou les maladies (Vandenesch et al., 2012).

Le rôle de la LPV dans les infections CA-MRSA expérimentales est encore controversé (Bubeck Wardenburg et al., 2007; Labandeira-Rey et al., 2007). Cependant, de par son épidémiologie et son histoire, la LPV a été associée à des infections de la peau et des tissus mous (comme les furuncles, l'anthrax, et les panaris à staphylocoque)(Lina et al., 1999; Prévost et al., 1995b), la formation d'abcès (Munckhof et al., 2008b; Tong et al., 2010), l'ostéomyélite chez les enfants (Bocchini et al., 2006), la septicémie (Adem et al., 2005; Mongkolrattanothai et al., 2003) et la pneumonie nécrosante (Gillet et al., 2008; Gillet et al., 2002; Gillet et al., 2007; Li et al., 2011). En effet, la LPV augmente la faculté de *S. aureus* à causer une nécrose sévère des poumons, un œdème pulmonaire, une hémorragie alvéolaire, une hémoptysie et le décès (Diep et al., 2010; Diep et al., 2013). La LPV joue aussi un rôle dans la dissémination hématogène de *S. aureus* dans les poumons lors d'une septicémie sévère (Crémieux et al., 2014).

De nombreuses études ont rapporté une association entre le locus de la LPV et les maladies invasives, ce qui a fait de la LPV un marqueur épidémiologique de la sévérité de l'infection. Ceci a conduit Shallcross *et al.* à passer en revue les données internationales publiées avant octobre 2011, qui suggèrent l'association entre les gènes de la LPV et la colonisation, la maladie, et le rétablissement suite à une pneumonie, bactériémie, infection musculo-squelettique, et les maladies de la peau et des tissus mous causées par *S. aureus* (Shallcross et al., 2013). Les résultats de cette étude ont montré que l'association de la LPV aux infections de la peau et des tissus mous est forte et indépendante du type de souche qu'elles soient des MRSA ou des MSSA (Methicillin-Sensitive *Staphylococcus Aureus*) (Holmes et al., 2005; Mesrati et al., 2010; Otter and French, 2010; Shallcross et al., 2010), et que ces infections sont plus susceptibles de nécessiter une intervention chirurgicale que ne le sont celles causées par des souches LPV(-). Dans le cas d'infections causées par des souches LPV(+) chez les sujets adultes, il n'y a pas de vraie possibilité de prédire le résultat clinique pour une pneumonie à staphylocoques, pour les maladies musculo-squelettiques, ou pour les bactériémies. Au contraire, chez les enfants atteints

de maladies musculo-squelettiques, les souches LPV+ sont associées à un traitement chirurgical, un long séjour à l'hôpital et à une ostéomyélite chronique. La LPV n'est cependant pas un déterminant principal de la sévérité ou l'évolution de l'infection, ou du rétablissement (Bae et al., 2009; Lalani et al., 2008; Sharma-Kuinkel et al., 2012).

D'autres facteurs de virulence de *S. aureus* ont été également corrélés à des pathologies. La toxine α est un facteur de virulence essentiel dans les abcès de cerveau (Kielian et al., 2001), les infections de la peau et des tissus mous (Kobayashi et al., 2011) et les pneumonies (Bubeck Wardenburg et al., 2007). Elle joue un rôle dans la dissémination hématogène de *S. aureus* dans les poumons et augmente significativement la mortalité lors d'une septicémie sévère (Crémieux et al., 2014). LukA/LukB semble jouer un rôle important dans la survie de *S. aureus* dans le sang humain et permet l'augmentation de la charge bactérienne dans les reins dans un modèle murin d'infection de la circulation sanguine (Dumont et al., 2010). De même LukE/LukD augmente la virulence de *S. aureus* et la létalité dans un modèle murin d'infection de la circulation sanguine (Alonzo et al., 2012). Les modulines solubles dans le phénol sont considérées comme des facteurs associés à la virulence qui jouent un rôle important dans la pathogenèse de *S. aureus*. Ces peptides induisent la production de cytokines pro-inflammatoires, recrutent, activent et lysent les PMNs, lysent les érythrocytes et facilitent la structuration et le détachement des biofilms et permettent la dissémination de l'infection (Li et al., 2014).

Cependant, les études *in vivo* pour évaluer l'impact des leucotoxines sur les infections à *S. aureus* ont été effectuées sur les lapins et les souris comme modèles animaux, ce qui a abouti à des résultats controversés. En fait, la LPV est très peu cytotoxique sur les cellules murines (Loffler et al., 2010), ce qui remet en question les résultats montrant un effet de la LPV dans des modèles murins de pneumonie et d'infections de la peau et des tissus mous (Brown et al., 2009; Bubeck Wardenburg et al., 2007; Labandeira-Rey et al., 2007; Otto, 2010a; Tseng et al., 2009; Vandenesch et al., 2010). En effet, il semble que les C5aR des murins et des macaques ne sont pas reconnus par la LPV, au contraire des C5aR de lapin et de l'humain (Spaan et al., 2013). Cependant, dans certains cas, des modèles d'infection chez le lapin ont également conduit à des résultats controversés concernant le rôle de la LPV (Crémieux et al., 2009; Diep et al., 2008; Kobayashi et al., 2011; Lipinska et al., 2011). Ainsi, ces phénotypes peuvent être liés à un fort inoculum utilisé dans ces études (Vandenesch et al., 2012), au mode d'administration des bactéries, au respect du déroulement de l'infection, peut être aussi à un contrôle génétique rigoureux des souches mutées utilisées et au type d'infection qui peut être plus ou moins corrélable à la clinique.

La plupart des facteurs de virulence de *S. aureus* ont une activité dans l'évasion du système immunitaire, la colonisation ou la dissémination. Au contraire, les toxines s'attaquant directement au système immunitaire et aux cellules de l'hôte.

Dans la mesure où les PMNs sont la composante cellulaire la plus importante du système immunitaire inné et donc, le principal moyen de défense contre les infections à *S. aureus*. Il a été proposé que la LPV contribue à la virulence de la bactérie en provoquant la lyse des PMNs et d'autres cellules myéloïdes. Ceci conduit à la libération d'espèces réactives de l'oxygène (H_2O_2 , O_2^-) et de protéases qui vont provoquer une nécrose du tissu environnant et la libération par les leucocytes de cytokines pro-inflammatoires qui amplifient le recrutement, et au final la nécrose (Diep et al., 2010; Tseng et al., 2009).

Cependant, certaines études ont montré que la cytolyse des PMNs *in vitro* nécessite une concentration de LPV qui ne peut pas être obtenue *in vivo* (Badiou et al., 2008; Badiou et al., 2010; Graves et al., 2010), pourtant la LPV induit la libération de molécules pro-inflammatoires par les PMNs. L'effet de la LPV semble être causé par l'activation des voies de transduction du signal plutôt que par la cytolyse. En plus, à des concentrations sub-lytiques, les leucotoxines peuvent amorcer les PMNs permettant une libération d'espèces réactives de l'oxygène par des peptides formylés (Colin and Monteil, 2003; Graves et al., 2012). Ces PMNs amorcés par la LPV montrent une meilleure capacité à se lier et à tuer *S. aureus* (Graves et al., 2012). Toutes ces observations soulignent que, malgré la somme des connaissances acquises, les mécanismes pouvant rendre *S. aureus* particulièrement virulent doivent encore être mis en lumière.

Notre étude sur HlgC/HlgB et la LPV nous a permis de confirmer que l'activité principale des leucotoxines ne réside pas forcément dans leur capacité de former des pores et que leurs activités cellulaires sont beaucoup plus larges. De plus, les résultats obtenus suggèrent que les leucotoxines pourraient déclencher des mécanismes de défenses cellulaires chez les PMNs. Ces leucotoxines sont capables de cibler d'autres types cellulaires que les leucocytes, mais à des concentrations plus élevées. Les conditions qui permettraient d'atteindre ces concentrations *in vivo* ne sont pas encore connues.

Outre plusieurs espèces de staphylocoque à coagulase négative, d'autres espèces bactériennes produisent des leucotoxines, notamment des bactéries Gram- comme *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* et *Fusobacterium necrophorum* (Brown et al., 1997; Johansson, 2011; Lally et al., 1999; Tan et al., 1996). Ces bactéries sont des commensaux

des voies respiratoires, gastro-intestinaux, des organes reproducteurs ou des cavités orales des animaux et des humains. Certaines leucotoxines de ces bactéries sont des PFTs de la famille des RTX (repeats-in-toxin), qui peuvent, à faible concentration, activer les PMNs en augmentant la $[Ca^{2+}]_i$, en stimulant le burst oxydatif, la dégranulation et la libération du contenu des lysosomes, l'altération du cytosquelette et elles peuvent aussi induire une mort cellulaire programmée comme l'apoptose (Narayanan et al., 2002). Ces leucotoxines semblent augmenter l'effet virulent de ces bactéries en leur permettant d'échapper au système immunitaire de l'hôte et en détruisant les leucocytes d'une part, et d'autre part, en modulant la réponse inflammatoire de l'hôte de manière à ce que les médiateurs de l'inflammation et des cellules immuno-effectrices activées finissent par jouer un rôle central dans la physiopathologie de la maladie (Narayanan et al., 2002).

CONCLUSION GENERALE

HlgC/HlgB et la LPV de *S. aureus* ciblent le récepteur C5aR du système du complément, un système clé de l'immunité innée. La conséquence de ce ciblage est probablement de dévier une réponse cellulaire qui pourrait être fatale à la bactérie, comme dans le cas de la protéine CHIPS qui inhibe le chimiotactisme en ciblant les mêmes récepteurs. De plus, ces toxines bien qu'elles appartiennent à la même famille de facteurs de virulence, agissent de manière différente et ont un impact différent, probablement pour augmenter l'efficacité de la bactérie lors des infections.

D'un autre côté, les différentes infections qui touchent l'homme ont permis de forger son immunité à travers les millénaires. Ainsi, la présence des leucotoxines semble activer les PMNs pour un meilleur effet bactéricide (Graves et al., 2012). Cependant, une forte activation des PMNs peut avoir un effet néfaste sur les tissus adjacents et apporter des nutriments essentiels à la bactérie.

Ainsi, entre l'attaque effectuée par *S. aureus* et la défense mise en place par l'immunité innée, il est difficile de prédire le résultat d'une infection qui dépend de plusieurs facteurs. En tout cas, la présence des leucotoxines pendant les infections joue un rôle dans le dommage tissulaire même en absence de la bactérie, d'où le rôle des stratégies anti-staphylococciques qui se développent ces dernières années vers la vaccination et l'immunothérapie. Toutes les deux ciblent des facteurs de virulence.

Cette thèse a permis d'approfondir les connaissances fondamentales du mode d'action des leucotoxines et surtout de mettre en avant des mécanismes indépendants de la formation du pore. Dans la suite de la thèse de Benoît-Joseph Laventie, qui a montré la présence d'une région

de LukS-PV nécessaire à sa fixation aux hPMNs, j'ai montré plus particulièrement que cette région est nécessaire à la fixation de LukS-PV aux récepteurs C5aR sur les cellules U937 transfectées avec le C5aR, sachant que LukS-PV ne se fixe pas sur les cellules U937 non transfectées.

Nous avons pu montrer aussi que HlgC/HlgB et la LPV ont un effet activateur sur les hPMNs indépendamment de la formation d'un pore. En effet, ces deux leucotoxines induisent une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ suite à leur internalisation. Malgré les grandes similarités entre ces deux leucotoxines et la fixation de leur sous-unité de classe S sur le même récepteur, les sous-unités de classe F permettent à chaque leucotoxine d'activer des voies différentes. Ainsi, la sous-unité de classe F semble déterminer la formation de pores et l'activation des cellules (Tableau V.1).

Cette thèse a permis également de montrer qu'outre les leucocytes, les leucotoxines peuvent avoir de nombreuses cibles cellulaires comme les neurones en grain du cervelet et les DRG. Ainsi, lors des infections, certains effets, comme la douleur par exemple, pourraient être dus à l'activation des neurones par les leucotoxines. Cependant, ces mêmes effets pourraient être le résultat de la réaction inflammatoire déclenchée. Il est donc important de comprendre tous les effets des leucotoxines sur les neurones pour pouvoir les contrer.

Cela suggère de nouvelles investigations tant à propos des interactions avec la membrane, des cascades de signalisation qui incluront probablement des kinases, que sur le trafic intracellulaire des leucotoxines. Par ailleurs, en considérant que la programmation cellulaire entre un leucocyte polynucléaire et un neurone est très dissemblable, cela accroît encore le champ des recherches futures.

La compréhension du mode d'action de ces facteurs de virulence et l'élaboration de mesures pour contrer leur activité sont essentielles dans le traitement des infections par *S.aureus*. Dans la suite du travail de Benoît-Joseph Laventie, qui a montré l'effet inhibiteur des *para*-sulfonato-calixarènes sur les leucotoxines, cette thèse a permis d'évaluer l'effet inhibiteur de nouveaux calixarènes. Ces nouveaux calixarènes dérivés du SC4 sont solubles, neutres, non toxiques, moins coûteux en synthèse et pourraient montrer un potentiel à être utilisés comme auxiliaires aux antibiothérapies suite à des tests supplémentaires *in vivo*. A cette fin, le dépôt d'un brevet est en cours de préparation.

Tableau V. 1 : Effets cellulaires des différents couples de leucotoxines.

Malgré les grandes similarités entre HlgC/HlgB et la LPV, les sous-unités de classe F permettent à chaque leucotoxine d'activer des voies différentes et semblent déterminer la formation de pores et l'activation des cellules. Les effets cellulaires des couples HlgC/HlgB, HlgC/LukF-PV, LukS-PV/LukF-PV et LukS-PV/HlgB sont résumés dans ce tableau. (ND : non déterminé)

	HlgB	LukF-PV
HlgC	• Internalisation • Mobilisation du Ca^{2+} des stocks acides et du RE • Inhibiteurs de SOCs, inhibent l'effet calcique de la leucotoxine • Formation de pores sur les membranes lipidiques synthétiques • Formation de pores sur les liposomes • Formation de pores sur les U937-C5aR • Pas d'amorçage des PMNs pour le burst oxydatif	• ND • Mobilisation du Ca^{2+} du RE • ND • Pas de formation de pores sur les membranes lipidiques synthétiques • Pas de formation de pores sur les liposomes • Pas de formation de pores sur les U937-C5aR • Amorçage des PMNs pour le burst oxydatif
LukS-PV	• ND • Mobilisation du Ca^{2+} des stocks acides et du RE • ND • Formation de pores sur les membranes lipidiques synthétiques • Formation de pores sur les liposomes • Formation de pores sur les U937-C5aR • Pas d'amorçage des PMNs pour le burst oxydatif	• Internalisation • Mobilisation du Ca^{2+} du RE • Inhibiteurs de SOCs, accélèrent l'effet calcique de la leucotoxine • Pas de formation de pores sur les membranes lipidiques synthétiques • Pas de formation de pores sur les liposomes • Pas de formation de pores sur les U937-C5aR • Amorçage des PMNs pour le burst oxydatif

CHAPITRE VI : BIBLIOGRAPHIE

- Aboulaich, N., Vainonen, J.P., Stralfors, P., and Vener, A.V. (2004). Vectorial proteomics reveal targeting, phosphorylation and specific fragmentation of polymerase I and transcript release factor (PTRF) at the surface of caveolae in human adipocytes. *Biochem J* 383, 237-248.
- Abrami, L., Lindsay, M., Parton, R.G., Leppla, S.H., and van der Goot, F.G. (2004). Membrane insertion of anthrax protective antigen and cytoplasmic delivery of lethal factor occur at different stages of the endocytic pathway. *J Cell Biol* 166, 645-651.
- 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.
- Abrami, L., Reig, N., and van der Goot, F.G. (2005). Anthrax toxin: the long and winding road that leads to the kill. *Trends Microbiol* 13, 72-78.
- Ackermann, E.J., Conde-Frieboes, K., and Dennis, E.A. (1995). Inhibition of macrophage Ca(2+)-independent phospholipase A2 by bromoenol lactone and trifluoromethyl ketones. *J Biol Chem* 270, 445-450.
- Adem, P.V., Montgomery, C.P., Husain, A.N., Koogler, T.K., Arangelovich, V., Humilier, M., Boyle-Vavra, S., and Daum, R.S. (2005). *Staphylococcus aureus* sepsis and the Waterhouse-Friderichsen syndrome in children. *N Engl J Med* 353, 1245-1251.
- Adibhatla, R.M., Hatcher, J.F., and Gusain, A. (2012). Tricyclodecan-9-yl-xanthogenate (D609) mechanism of actions: a mini-review of literature. *Neurochem Res* 37, 671-679.
- Aires-de-Sousa, M., Conceicao, T., and de Lencastre, H. (2006). Unusually high prevalence of nosocomial Pantone-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* isolates in Cape Verde Islands. *J Clin Microbiol* 44, 3790-3793.
- Ait-Slimane, T., Galmes, R., Trugnan, G., and Maurice, M. (2009). Basolateral internalization of GPI-anchored proteins occurs via a clathrin-independent flotillin-dependent pathway in polarized hepatic cells. *Mol Biol Cell* 20, 3792-3800.
- Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801.
- Alessandrini, A., Viero, G., Dalla Serra, M., Prévost, G., and Facci, P. (2013). gamma-Hemolysin oligomeric structure and effect of its formation on supported lipid bilayers: an AFM investigation. *Biochim Biophys Acta* 1828, 405-411.
- Alexander, S.P., Mathie, A., and Peters, J.A. (2008). Guide to Receptors and Channels (GRAC), 3rd edition. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 2, S1-209.
- Alexandrakis, G., Alfonso, E.C., and Miller, D. (2000). Shifting trends in bacterial keratitis in south Florida and emerging resistance to fluoroquinolones. *Ophthalmology* 107, 1497-1502.
- Alonso, V., and Friedman, P.A. (2013). Minireview: ubiquitination-regulated G protein-coupled receptor signaling and trafficking. *Mol Endocrinol* 27, 558-572.

- Alonzo, F., 3rd, Benson, M.A., Chen, J., Novick, R.P., Shopsin, B., and Torres, V.J. (2012). *Staphylococcus aureus* leucocidin ED contributes to systemic infection by targeting neutrophils and promoting bacterial growth in vivo. *Mol Microbiol* 83, 423-435.
- Alonzo, F., 3rd, Kozhaya, L., Rawlings, S.A., Reyes-Robles, T., DuMont, A.L., Myszka, D.G., Landau, N.R., Unutmaz, D., and Torres, V.J. (2013). CCR5 is a receptor for *Staphylococcus aureus* leukotoxin ED. *Nature* 493, 51-55.
- Aman, M.J., Karauzum, H., Bowden, M.G., and Nguyen, T.L. (2010). Structural model of the pre-pore ring-like structure of Panton-Valentine leukocidin: providing dimensionality to biophysical and mutational data. *J Biomol Struct Dyn* 28, 1-12.
- Andersen, P.S., Pedersen, J.K., Fode, P., Skov, R.L., Fowler, V.G., Jr., Stegger, M., and Christensen, K. (2012). Influence of host genetics and environment on nasal carriage of *staphylococcus aureus* in danish middle-aged and elderly twins. *J Infect Dis* 206, 1178-1184.
- Arab, S., and Lingwood, C.A. (1996). Influence of phospholipid chain length on verotoxin/globotriaosyl ceramide binding in model membranes: Comparison of a supported bilayer film and liposomes. *Glycoconjugate Journal* 13, 159-166.
- Arab, S., and Lingwood, C.A. (1998). Intracellular targeting of the endoplasmic reticulum nuclear envelope by retrograde transport may determine cell hypersensitivity to verotoxin via globotriaosyl ceramide fatty acid isoform traffic. *Journal of Cellular Physiology* 177, 646-660.
- Arciola, C.R., Campoccia, D., Speziale, P., Montanaro, L., and Costerton, J.W. (2012). Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials* 33, 5967-5982.
- Arcus, V.L., Langley, R., Proft, T., Fraser, J.D., and Baker, E.N. (2002). The Three-dimensional structure of a superantigen-like protein, SET3, from a pathogenicity island of the *Staphylococcus aureus* genome. *J Biol Chem* 277, 32274-32281.
- Arora, P., Kalra, V.K., and Pappas, A. (2012). Multiple brain abscesses in a neonate after blood stream infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Pediatr* 161, 563-563 e561.
- Asfari, Z., Bressot, C., Vicens, J., Hill, C., Dozol, J.-F., Rouquette, H., Eymard, S., Lamare, V., and Tournois, B. (1995). Doubly Crowned Calix[4]arenes in the 1,3-Alternate Conformation as Cesium-Selective Carriers in Supported Liquid Membranes. *Analytical Chemistry* 67, 3133-3139.
- 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 Ca(2+)-activation from the pore-forming function of the bi-component Panton-Valentine leukocidin in human PMNs. *FEBS Lett* 461, 280-286.
- Baba, T., Takeuchi, F., Kuroda, M., Yuzawa, H., Aoki, K., Oguchi, A., Nagai, Y., Iwama, N., Asano, K., Naimi, T., *et al.* (2002). Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet* 359, 1819-1827.
- Badiou, C., Dumitrescu, O., Croze, M., Gillet, Y., Dohin, B., Slayman, D.H., Allaouchiche, B., Etienne, J., Vandenesch, F., and Lina, G. (2008). Panton-Valentine leukocidin is expressed at toxic levels in human skin abscesses. *Clin Microbiol Infect* 14, 1180-1183.

- Badiou, C., Dumitrescu, O., George, N., Forbes, A.R., Drougka, E., Chan, K.S., Ramdani-Bouguessa, N., Meugnier, H., Bes, M., Vandenesch, F., *et al.* (2010). Rapid detection of *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin in clinical specimens by enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic tests. *J Clin Microbiol* 48, 1384-1390.
- Bae, I.G., Tonthat, G.T., Stryjewski, M.E., Rude, T.H., Reilly, L.F., Barriere, S.L., Genter, F.C., Corey, G.R., and Fowler, V.G., Jr. (2009). Presence of genes encoding the panton-valentine leukocidin exotoxin is not the primary determinant of outcome in patients with complicated skin and skin structure infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: results of a multinational trial. *J Clin Microbiol* 47, 3952-3957.
- Baggiolini, M., Dewald, B., and Moser, B. (1997). Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 15, 675-705.
- Balasubramanian, N., Scott, D.W., Castle, J.D., Casanova, J.E., and Schwartz, M.A. (2007). Arf6 and microtubules in adhesion-dependent trafficking of lipid rafts. *Nat Cell Biol* 9, 1381-1391.
- Balistreri, C.R., Caruso, C., Grimaldi, M.P., Listi, F., Vasto, S., Orlando, V., Campagna, A.M., Lio, D., and Candore, G. (2007). CCR5 receptor: biologic and genetic implications in age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1100, 162-172.
- Bamberg, C.E., Mackay, C.R., Lee, H., Zahra, D., Jackson, J., Lim, Y.S., Whitfeld, P.L., Craig, S., Corsini, E., Lu, B., *et al.* (2010). The C5a receptor (C5aR) C5L2 is a modulator of C5aR-mediated signal transduction. *J Biol Chem* 285, 7633-7644.
- Barlic, J., Khandaker, M.H., Mahon, E., Andrews, J., DeVries, M.E., Mitchell, G.B., Rahimpour, R., Tan, C.M., Ferguson, S.S., and Kelvin, D.J. (1999). beta-arrestins regulate interleukin-8-induced CXCR1 internalization. *J Biol Chem* 274, 16287-16294.
- Barrio, M.B., Rainard, P., and Prévost, G. (2006). LukM/LukF'-PV is the most active *Staphylococcus aureus* leukotoxin on bovine neutrophils. *Microbes Infect* 8, 2068-2074.
- Barrows, B.D., Griffiths, J.S., and Aroian, R.V. (2006). *Caenorhabditis elegans* carbohydrates in bacterial toxin resistance. *Methods Enzymol* 417, 340-358.
- Bartlett, A.H., and Hulten, K.G. (2010). *Staphylococcus aureus* pathogenesis: secretion systems, adhesins, and invasins. *Pediatr Infect Dis J* 29, 860-861.
- Bastiani, M., Liu, L., Hill, M.M., Jedrychowski, M.P., Nixon, S.J., Lo, H.P., Abankwa, D., Luetterforst, R., Fernandez-Rojo, M., Breen, M.R., *et al.* (2009). MURC/Cavin-4 and cavin family members form tissue-specific caveolar complexes. *J Cell Biol* 185, 1259-1273.
- 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.
- Ben Salem, A., Sautrey, G., Fontanay, S., Duval, R.E., and Regnouf-de-Vains, J.B. (2011). Molecular drug-organiser: synthesis, characterization and biological evaluation of penicillin V and/or nalidixic acid calixarene-based podands. *Bioorg Med Chem* 19, 7534-7540.

- Ben Zakour, N.L., Beatson, S.A., van den Broek, A.H., Thoday, K.L., and Fitzgerald, J.R. (2012). Comparative genomics of the *Staphylococcus intermedius* group of animal pathogens. *Front Cell Infect Microbiol* 2, 44.
- Bénard, M., Gonzalez, B.J., Schouft, M.T., Falluel-Morel, A., Vaudry, D., Chan, P., Vaudry, H., and Fontaine, M. (2004). Characterization of C3a and C5a receptors in rat cerebellar granule neurons during maturation. Neuroprotective effect of C5a against apoptotic cell death. *J Biol Chem* 279, 43487-43496.
- Bera, A., Herbert, S., Jakob, A., Vollmer, W., and Gotz, F. (2005). Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 55, 778-787.
- Berg, K.A., Maayani, S., Goldfarb, J., Scaramellini, C., Leff, P., and Clarke, W.P. (1998). Effector pathway-dependent relative efficacy at serotonin type 2A and 2C receptors: evidence for agonist-directed trafficking of receptor stimulus. *Mol Pharmacol* 54, 94-104.
- Bergan, J., Dyve Lingelem, A.B., Simm, R., Skotland, T., and Sandvig, K. (2012). Shiga toxins. *Toxicon* 60, 1085-1107.
- Bergsbaken, T., Fink, S.L., and Cookson, B.T. (2009). Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol* 7, 99-109.
- Bernheimer, A.W., Avigad, L.S., and Kim, K.S. (1974). Staphylococcal sphingomyelinase (beta-hemolysin). *Ann N Y Acad Sci* 236, 292-306.
- Berridge, M.J., Lipp, P., and Bootman, M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 11-21.
- Bertini, R., Barcelos, L.S., Beccari, A.R., Cavalieri, B., Moriconi, A., Bizzarri, C., Di Benedetto, P., Di Giacinto, C., Gloaguen, I., Galliera, E., *et al.* (2012). Receptor binding mode and pharmacological characterization of a potent and selective dual CXCR1/CXCR2 non-competitive allosteric inhibitor. *Br J Pharmacol* 165, 436-454.
- Bestebroer, J., Poppelier, M.J., Ulfman, L.H., Lenting, P.J., Denis, C.V., van Kessel, K.P., van Strijp, J.A., and de Haas, C.J. (2007). Staphylococcal superantigen-like 5 binds PSGL-1 and inhibits P-selectin-mediated neutrophil rolling. *Blood* 109, 2936-2943.
- Bhakdi, S., Bayley, H., Valeva, A., Walev, I., Walker, B., Kehoe, M., and Palmer, M. (1996). Staphylococcal alpha-toxin, streptolysin-O, and *Escherichia coli* hemolysin: prototypes of pore-forming bacterial cytolytic toxins. *Arch Microbiol* 165, 73-79.
- 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.
- Bhakdi, S., and Trnham-Jensen, J. (1987). Damage to mammalian cells by proteins that form transmembrane pores. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 107, 147-223.
- Binnington, B., Lingwood, D., Nutikka, A., and Lingwood, C.A. (2002). Effect of globotriaosyl ceramide fatty acid alpha-hydroxylation on the binding by verotoxin 1 and verotoxin 2. *Neurochemical Research* 27, 807-813.

Black, R.A., and White, J.M. (1998). ADAMs: focus on the protease domain. *Curr Opin Cell Biol* 10, 654-659.

Blanpain, C., Migeotte, I., Lee, B., Vakili, J., Doranz, B.J., Govaerts, C., Vassart, G., Doms, R.W., and Parmentier, M. (1999). CCR5 binds multiple CC-chemokines: MCP-3 acts as a natural antagonist. *Blood* 94, 1899-1905.

Bleasdale, J.E., Thakur, N.R., Gremban, R.S., Bundy, G.L., Fitzpatrick, F.A., Smith, R.J., and Bunting, S. (1990). Selective inhibition of receptor-coupled phospholipase C-dependent processes in human platelets and polymorphonuclear neutrophils. *J Pharmacol Exp Ther* 255, 756-768.

Blobel, C.P. (1997). Metalloprotease-disintegrins: links to cell adhesion and cleavage of TNF alpha and Notch. *Cell* 90, 589-592.

Blobel, C.P. (2005). ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 32-43.

Blobel, C.P., and White, J.M. (1992). Structure, function and evolutionary relationship of proteins containing a disintegrin domain. *Curr Opin Cell Biol* 4, 760-765.

Boakes, E., Kearns, A.M., Ganner, M., Perry, C., Hill, R.L., and Ellington, M.J. (2011). Distinct bacteriophages encoding Panton-Valentine leukocidin (PVL) among international methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones harboring PVL. *J Clin Microbiol* 49, 684-692.

Bocchini, C.E., Hulten, K.G., Mason, E.O., Jr., Gonzalez, B.E., Hammerman, W.A., and Kaplan, S.L. (2006). Panton-Valentine leukocidin genes are associated with enhanced inflammatory response and local disease in acute hematogenous *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in children. *Pediatrics* 117, 433-440.

Bohach, G.A., Fast, D.J., Nelson, R.D., and Schlievert, P.M. (1990). Staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins involved in toxic shock syndrome and related illnesses. *Crit Rev Microbiol* 17, 251-272.

Bohdanowicz, M., and Grinstein, S. (2013). Role of phospholipids in endocytosis, phagocytosis, and macropinocytosis. *Physiol Rev* 93, 69-106.

Boles, B.R., and Horswill, A.R. (2008). Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog* 4, e1000052.

Bonizzi, G., and Karin, M. (2004). The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 25, 280-288.

Boucrot, E., Howes, M.T., Kirchhausen, T., and Parton, R.G. (2011). Redistribution of caveolae during mitosis. *J Cell Sci* 124, 1965-1972.

Bownik, A. (2006). In vitro effects of staphylococcal leukocidin LukE/LukD on the proliferative ability of lymphocytes isolated from common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Shellfish Immunol* 20, 656-659.

Bownik, A., Siwicki, A.K., Rymuszka, A., and Sierosawska, A. (2004). Influence of staphylococcal leukocidins on phagocyte and lymphocyte activity - a comparative study. *POLISH JOURNAL OF FOOD AND NUTRITION SCIENCES* 13/54, 5-8.

- Bownik, A., Siwicki, A.K., Szmigielski, S., Sobiczewska, E., Prévost, G., Monteil, H., Colin, D.A., Studnicka, M., and Jeliaszewicz, J. (2000). Cytotoxin effects of staphylococcal leukocidins on isolated fish macrophages and lymphocytes *in vitro*. *Bull Pol Ac Sci* 48, 63–76.
- Boyer, L., Doye, A., Rolando, M., Flatau, G., Munro, P., Gounon, P., Clement, R., Pulcini, C., Popoff, M.R., Mettouchi, A., *et al.* (2006). Induction of transient macroapertures in endothelial cells through RhoA inhibition by *Staphylococcus aureus* factors. *J Cell Biol* 173, 809–819.
- Bradley, K.A., Mogridge, J., Mourez, M., Collier, R.J., and Young, J.A. (2001). Identification of the cellular receptor for anthrax toxin. *Nature* 414, 225–229.
- Braff, M.H., Jones, A.L., Skerrett, S.J., and Rubens, C.E. (2007). *Staphylococcus aureus* exploits cathelicidin antimicrobial peptides produced during early pneumonia to promote staphylokinase-dependent fibrinolysis. *J Infect Dis* 195, 1365–1372.
- Braun, L., Christophe, T., and Boulay, F. (2003). Phosphorylation of key serine residues is required for internalization of the complement 5a (C5a) anaphylatoxin receptor via a beta-arrestin, dynamin, and clathrin-dependent pathway. *J Biol Chem* 278, 4277–4285.
- Brechard, S., and Tschirhart, E.J. (2008). Regulation of superoxide production in neutrophils: role of calcium influx. *J Leukoc Biol* 84, 1223–1237.
- Breen, M.R., Camps, M., Carvalho-Simoes, F., Zorzano, A., and Pilch, P.F. (2012). Cholesterol depletion in adipocytes causes caveolae collapse concomitant with proteosomal degradation of cavin-2 in a switch-like fashion. *PLoS One* 7, e34516.
- Breit, A., Buch, T.R., Boekhoff, I., Solinski, H.J., Damm, E., and Gudermann, T. (2011). Alternative G protein coupling and biased agonism: new insights into melanocortin-4 receptor signalling. *Mol Cell Endocrinol* 331, 232–240.
- Breurec, S., Fall, C., Pouillot, R., Boisier, P., Brisse, S., Diene-Sarr, F., Djibo, S., Etienne, J., Fonkoua, M.C., Perrier-Gros-Claude, J.D., *et al.* (2011). Epidemiology of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* lineages in five major African towns: high prevalence of Panton-Valentine leukocidin genes. *Clin Microbiol Infect* 17, 633–639.
- Brigotti, M., Carnicelli, D., Arfilli, V., Tamassia, N., Borsetti, F., Fabbri, E., Tazzari, P.L., Ricci, F., Pagliaro, P., Spisni, E., *et al.* (2013). Identification of TLR4 as the receptor that recognizes Shiga toxins in human neutrophils. *J Immunol* 191, 4748–4758.
- Bronner, S., Jehl, F., Peter, J.D., Ploy, M.C., Renault, C., Arvis, P., Monteil, H., and Prevost, G. (2003). Moxifloxacin efficacy and vitreous penetration in a rabbit model of *Staphylococcus aureus* endophthalmitis and effect on gene expression of leucotoxins and virulence regulator factors. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 1621–1629.
- Bronner, S., Stoessel, P., Gravet, A., Monteil, H., and Prevost, G. (2000). Variable expressions of *Staphylococcus aureus* bicomponent leucotoxins semiquantified by competitive reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol* 66, 3931–3938.
- Brown, E.L., Dumitrescu, O., Thomas, D., Badiou, C., Koers, E.M., Choudhury, P., Vazquez, V., Etienne, J., Lina, G., Vandenesch, F., *et al.* (2009). The Panton-Valentine leukocidin vaccine protects mice against lung and skin infections caused by *Staphylococcus aureus* USA300. *Clin Microbiol Infect* 15, 156–164.

- Brown, F.D., Rozelle, A.L., Yin, H.L., Balla, T., and Donaldson, J.G. (2001). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Arf6-regulated membrane traffic. *J Cell Biol* **154**, 1007-1017.
- Brown, J.E., Rothman, S.W., and Doctor, B.P. (1980). INHIBITION OF PROTEIN-SYNTHESIS IN INTACT HELA-CELLS BY *SHIGELLA-DYSENTERIAE*-1 TOXIN. *Infection and Immunity* **29**, 98-107.
- Brown, J.F., Leite, F., and Czuprynski, C.J. (1997). Binding of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin to bovine leukocytes. *Infect Immun* **65**, 3719-3724.
- Bubeck Wardenburg, J., Bae, T., Otto, M., Deleo, F.R., and Schneewind, O. (2007). Poring over pores: alpha-hemolysin and Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Nat Med* **13**, 1405-1406.
- Bucci, C., Parton, R.G., Mather, I.H., Stunnenberg, H., Simons, K., Hoflack, B., and Zerial, M. (1992). The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* **70**, 715-728.
- Bujny, M.V., Popoff, V., Johannes, L., and Cullen, P.J. (2007). The retromer component sorting nexin-1 is required for efficient retrograde transport of Shiga toxin from early endosome to the trans Golgi network. *Journal of Cell Science* **120**, 2010-2021.
- Bukowski, M., Wladyka, B., and Dubin, G. (2010). Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *Toxins (Basel)* **2**, 1148-1165.
- Calderwood, S.B., Auclair, F., Donohuerolfe, A., Keusch, G.T., and Mekalanos, J.J. (1987). NUCLEOTIDE-SEQUENCE OF THE SHIGA-LIKE TOXIN GENES OF *ESCHERICHIA-COLI*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 4364-4368.
- Calebiro, D., Nikolaev, V.O., and Lohse, M.J. (2010). Imaging of persistent cAMP signaling by internalized G protein-coupled receptors. *J Mol Endocrinol* **45**, 1-8.
- Callegan, M.C., Engelbert, M., Parke, D.W., 2nd, Jett, B.D., and Gilmore, M.S. (2002). Bacterial endophthalmitis: epidemiology, therapeutics, and bacterium-host interactions. *Clin Microbiol Rev* **15**, 111-124.
- Camps, M., Carozzi, A., Schnabel, P., Scheer, A., Parker, P.J., and Gierschik, P. (1992). Isozyme-selective stimulation of phospholipase C-beta 2 by G protein beta gamma-subunits. *Nature* **360**, 684-686.
- Cardelli, J. (2001). Phagocytosis and macropinocytosis in Dictyostelium: phosphoinositide-based processes, biochemically distinct. *Traffic* **2**, 311-320.
- Caron, E. (2003). Cellular functions of the Rap1 GTP-binding protein: a pattern emerges. *J Cell Sci* **116**, 435-440.
- Caron, E., Self, A.J., and Hall, A. (2000). The GTPase Rap1 controls functional activation of macrophage integrin alphaMbeta2 by LPS and other inflammatory mediators. *Curr Biol* **10**, 974-978.
- Cedergren, L., Andersson, R., Jansson, B., Uhlen, M., and Nilsson, B. (1993). Mutational analysis of the interaction between staphylococcal protein A and human IgG1. *Protein Eng* **6**, 441-448.
- Chakfe, Y., and Bourque, C.W. (2000). Excitatory peptides and osmotic pressure modulate mechanosensitive cation channels in concert. *Nat Neurosci* **3**, 572-579.

Chardin, P., Boquet, P., Madaule, P., Popoff, M.R., Rubin, E.J., and Gill, D.M. (1989). The mammalian G protein rhoC is ADP-ribosylated by *Clostridium botulinum* exoenzyme C3 and affects actin microfilaments in Vero cells. *EMBO J* 8, 1087-1092.

Chavakis, T., Hussain, M., Kanse, S.M., Peters, G., Bretzel, R.G., Flock, J.I., Herrmann, M., and Preissner, K.T. (2002). *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nat Med* 8, 687-693.

Chavakis, T., Wiechmann, K., Preissner, K.T., and Herrmann, M. (2005). *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium: the role of bacterial "secretable expanded repertoire adhesive molecules" (SERAM) in disturbing host defense systems. *Thromb Haemost* 94, 278-285.

Chen, J.L., Ahluwalia, J.P., and Stamnes, M. (2002). Selective effects of calcium chelators on anterograde and retrograde protein transport in the cell. *Journal of Biological Chemistry* 277, 35682-35687.

Chen, L., Shopsin, B., Zhao, Y., Smyth, D., Wasserman, G.A., Fang, C., Liu, L., and Kreiswirth, B.N. (2012). Real-time nucleic acid sequence-based amplification assay for rapid detection and quantification of agr functionality in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol* 50, 657-661.

Cheng, O.Z., and Palaniyar, N. (2013). NET balancing: a problem in inflammatory lung diseases. *Front Immunol* 4, 1.

Cheng, Y., and Prusoff, W.H. (1973). Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 22, 3099-3108.

Cherla, R.P., Lee, S.Y., Mulder, R.A., Lee, M.S., and Tesh, V.L. (2009). Shiga toxin 1-induced proinflammatory cytokine production is regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin signaling pathway. *Infect Immun* 77, 3919-3931.

Chilcoat, C.D., Sharief, Y., and Jones, S.L. (2008). Tonic protein kinase A activity maintains inactive beta2 integrins in unstimulated neutrophils by reducing myosin light-chain phosphorylation: role of myosin light-chain kinase and Rho kinase. *J Leukoc Biol* 83, 964-971.

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.

Choudhury, A., Sharma, D.K., Marks, D.L., and Pagano, R.E. (2004). Elevated endosomal cholesterol levels in Niemann-Pick cells inhibit rab4 and perturb membrane recycling. *Mol Biol Cell* 15, 4500-4511.

Clapham, D.E. (1995). Calcium signaling. *Cell* 80, 259-268.

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.

- Conner, S.D., and Schmid, S.L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422, 37-44.
- 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.
- 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.
- Corvaglia, A.R., Francois, P., Bertrand, X., Quentin, R., Hernandez, D., and van der Mee-Marquet, N. (2013). Whole-Genome Sequences of Two *Staphylococcus aureus* ST398 Strains of Human Origin, S94 and S100. *Genome Announc* 1.
- Cossart, P., and Lecuit, M. (1998). Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. *EMBO J* 17, 3797-3806.
- Costerton, J.W., Montanaro, L., and Arciola, C.R. (2005). Biofilm in implant infections: its production and regulation. *Int J Artif Organs* 28, 1062-1068.
- Crass, B.A., and Bergdoll, M.S. (1986). Involvement of staphylococcal enterotoxins in nonmenstrual toxic shock syndrome. *J Clin Microbiol* 23, 1138-1139.
- Crawford, H.C., Dempsey, P.J., Brown, G., Adam, L., and Moss, M.L. (2009). ADAM10 as a therapeutic target for cancer and inflammation. *Curr Pharm Des* 15, 2288-2299.
- Crémieux, A.C., Dumitrescu, O., Lina, G., Vallee, C., Cote, J.F., Muffat-Joly, M., Lilin, T., Etienne, J., Vandenesch, F., and Saleh-Mghir, A. (2009). Pantone-valentine leukocidin enhances the severity of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* rabbit osteomyelitis. *PLoS One* 4, e7204.
- Crémieux, A.C., Saleh-Mghir, A., Danel, C., Couzon, F., Dumitrescu, O., Lilin, T., Perronne, C., Etienne, J., Lina, G., and Vandenesch, F. (2014). alpha-Hemolysin, Not Pantone-Valentine Leukocidin, Impacts Rabbit Mortality from Severe Sepsis With Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Osteomyelitis. *J Infect Dis* 209, 1773-1780.
- Czech, A., Yamaguchi, T., Bader, L., Linder, S., Kaminski, K., Sugai, M., and Aepfelbacher, M. (2001). Prevalence of Rho-inactivating epidermal cell differentiation inhibitor toxins in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *J Infect Dis* 184, 785-788.
- Dal Molin, F., Tonello, F., Ladant, D., Zornetta, I., Zamparo, I., Di Benedetto, G., Zaccolo, M., and Montecucco, C. (2006). Cell entry and cAMP imaging of anthrax edema toxin. *EMBO J* 25, 5405-5413.
- Dalla Serra, M., Coraiola, M., Viero, G., Comai, M., Potrich, C., Ferreras, M., Baba-Moussa, L., Colin, D.A., Menestrina, G., Bhakdi, S., et al. (2005). *Staphylococcus aureus* bicomponent gamma-hemolysins, HlgA, HlgB, and HlgC, can form mixed pores containing all components. *J Chem Inf Model* 45, 1539-1545.
- Damaj, B.B., McColl, S.R., Neote, K., Songqing, N., Ogborn, K.T., Hebert, C.A., and Naccache, P.H. (1996). Identification of G-protein binding sites of the human interleukin-8 receptors by functional mapping of the intracellular loops. *FASEB J* 10, 1426-1434.
- Damke, H. (1996). Dynamin and receptor-mediated endocytosis. *FEBS Lett* 389, 48-51.

- Daniels, S.B., Cooney, E., Sofia, M.J., Chakravarty, P.K., and Katzenellenbogen, J.A. (1983). Haloenol lactones. Potent enzyme-activated irreversible inhibitors for alpha-chymotrypsin. *J Biol Chem* 258, 15046-15053.
- David, M.Z., Medvedev, S., Hohmann, S.F., Ewigman, B., and Daum, R.S. (2012). Increasing burden of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* hospitalizations at US academic medical centers, 2003-2008. *Infect Control Hosp Epidemiol* 33, 782-789.
- Davoust, N., Jones, J., Stahel, P.F., Ames, R.S., and Barnum, S.R. (1999). Receptor for the C3a anaphylatoxin is expressed by neurons and glial cells. *Glia* 26, 201-211.
- de Haas, C.J., Veldkamp, K.E., Peschel, A., Weerkamp, F., Van Wamel, W.J., Heezius, E.C., Poppelier, M.J., Van Kessel, K.P., and van Strijp, J.A. (2004). Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial antiinflammatory agent. *J Exp Med* 199, 687-695.
- De Silva, E., Ficheux, D., and Coleman, A.W. (2005). Anti-thrombotic activity of water-soluble calix[n]arenes. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 52, 201-206.
- Degrandis, S., Ginsberg, J., Toone, M., Climie, S., Friesen, J., and Brunton, J. (1987). NUCLEOTIDE-SEQUENCE AND PROMOTER MAPPING OF THE *ESCHERICHIA-COLI* SHIGA-LIKE TOXIN OPERON OF BACTERIOPHAGE-H-19B. *Journal of Bacteriology* 169, 4313-4319.
- Del Nery, E., Miserey-Lenkei, S., Falguieres, T., Nizak, C., Johannes, L., Perez, F., and Goud, B. (2006). Rab6A and Rab6A ' GTPases play non-overlapping roles in membrane trafficking. *Traffic* 7, 394-407.
- DeLeo, F.R., and Chambers, H.F. (2009). Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. *J Clin Invest* 119, 2464-2474.
- DeLeo, F.R., Otto, M., Kreiswirth, B.N., and Chambers, H.F. (2010). Community-associated meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 375, 1557-1568.
- Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R.E., Hill, C.M., *et al.* (1996). Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381, 661-666.
- DeRiemer, S.A., Schweitzer, B., and Kaczmarek, L.K. (1985). Inhibitors of calcium-dependent enzymes prevent the onset of afterdischarge in the peptidergic bag cell neurons of Aplysia. *Brain Res* 340, 175-180.
- Dibama, H.M., Clarot, I., Fontanay, S., Salem, A.B., Mourer, M., Finance, C., Duval, R.E., and Regnouf-de-Vains, J.B. (2009). Towards calixarene-based prodrugs: Drug release and antibacterial behaviour of a water-soluble nalidixic acid/calix[4]arene ester adduct. *Bioorg Med Chem Lett* 19, 2679-2682.
- Diep, B.A., Chan, L., Tattevin, P., Kajikawa, O., Martin, T.R., Basuino, L., Mai, T.T., Marbach, H., Braughton, K.R., Whitney, A.R., *et al.* (2010). Polymorphonuclear leukocytes mediate *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin-induced lung inflammation and injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 5587-5592.
- Diep, B.A., Gillet, Y., Etienne, J., Lina, G., and Vandenesch, F. (2013). Panton-Valentine leucocidin and pneumonia. *Lancet Infect Dis* 13, 566.

- Diep, B.A., Palazzolo-Ballance, A.M., Tattevin, P., Basuino, L., Braughton, K.R., Whitney, A.R., Chen, L., Kreiswirth, B.N., Otto, M., DeLeo, F.R., *et al.* (2008). Contribution of Pantone-Valentine leukocidin in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *PLoS One* 3, e3198.
- Dinarello, C.A. (1998). Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme. *Ann N Y Acad Sci* 856, 1-11.
- Dinges, M.M., Orwin, P.M., and Schlievert, P.M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 13, 16-34, table of contents.
- Doery, H.M., Magnusson, B.J., Cheyne, I.M., and Sulasekham, J. (1963). A phospholipase in staphylococcal toxin which hydrolyses sphingomyelin. *Nature* 198, 1091-1092.
- Doherty, G.J., and McMahon, H.T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem* 78, 857-902.
- Domanska, U.M., Kruizinga, R.C., den Dunnen, W.F., Timmer-Bosscha, H., de Vries, E.G., and Walenkamp, A.M. (2010). The chemokine network, a newly discovered target in high grade gliomas. *Crit Rev Oncol Hematol* 79, 154-163.
- Donta, S.T., Tomicic, T.K., and Donohue, A. (1995). INHIBITION OF SHIGA-LIKE TOXINS BY BREFELDIN-A. *Journal of Infectious Diseases* 171, 721-724.
- Doranz, B.J., Rucker, J., Yi, Y., Smyth, R.J., Samson, M., Peiper, S.C., Parmentier, M., Collman, R.G., and Doms, R.W. (1996). A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 85, 1149-1158.
- Dove, S.K., Dong, K., Kobayashi, T., Williams, F.K., and Michell, R.H. (2009). Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate and Fab1p/PIKfyve under PIP₂ endo-lysosome function. *Biochem J* 419, 1-13.
- Drams, S., and Cossart, P. (2003). Listeriolysin O-mediated calcium influx potentiates entry of *Listeria monocytogenes* into the human Hep-2 epithelial cell line. *Infect Immun* 71, 3614-3618.
- 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.
- Droogmans, G., Prenen, J., Eggermont, J., Voets, T., and Nilius, B. (1998). Voltage-dependent block of endothelial volume-regulated anion channels by calix[4]arenes. *Am J Physiol* 275, C646-652.
- Dubin, G. (2002). Extracellular proteases of *Staphylococcus spp.* *Biol Chem* 383, 1075-1086.
- 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., *et al.* (1998). Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor. *Science* 280, 734-737.
- Dumont, A.L., Nygaard, T.K., Watkins, R.L., Smith, A., Kozhaya, L., Kreiswirth, B.N., Shopsin, B., Unutmaz, D., Voyich, J.M., and Torres, V.J. (2010). Characterization of a new cytotoxin that contributes to *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Mol Microbiol* 79, 814-825.
- Dumont, A.L., and Torres, V.J. (2013). Cell targeting by the *Staphylococcus aureus* pore-forming toxins: it's not just about lipids. *Trends Microbiol.*

- DuMont, A.L., Yoong, P., Day, C.J., Alonzo, F., 3rd, McDonald, W.H., Jennings, M.P., and Torres, V.J. (2013a). *Staphylococcus aureus* LukAB cytotoxin kills human neutrophils by targeting the CD11b subunit of the integrin Mac-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 10794-10799.
- DuMont, A.L., Yoong, P., Surewaard, B.G., Benson, M.A., Nijland, R., van Strijp, J.A., and Torres, V.J. (2013b). *Staphylococcus aureus* elaborates leukocidin AB to mediate escape from within human neutrophils. *Infect Immun* **81**, 1830-1841.
- Duran, J.M., Valderrama, F., Castel, S., Magdalena, J., Tomas, M., Hosoya, H., Renau-Piqueras, J., Malhotra, V., and Egea, G. (2003). Myosin motors and not actin comets are mediators of the actin-based Golgi-to-endoplasmic reticulum protein transport. *Molecular Biology of the Cell* **14**, 445-459.
- Dyve Lingelem, A.B., Bergan, J., and Sandvig, K. (2012). Inhibitors of intravesicular acidification protect against Shiga toxin in a pH-independent manner. *Traffic* **13**, 443-454.
- Ebright, J.R., Pace, M.T., and Niazi, A.F. (2001). Septic thrombosis of the cavernous sinuses. *Arch Intern Med* **161**, 2671-2676.
- Echarri, A., Muriel, O., Pavon, D.M., Azegrouz, H., Escolar, F., Terron, M.C., Sanchez-Cabo, F., Martinez, F., Montoya, M.C., Llorca, O., *et al.* (2012). Caveolar domain organization and trafficking is regulated by Abl kinases and mDia1. *J Cell Sci* **125**, 3097-3113.
- Ehlers, M.R. (2000). CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity. *Microbes Infect* **2**, 289-294.
- Escrevente, C., Morais, V.A., Keller, S., Soares, C.M., Altevogt, P., and Costa, J. (2008). Functional role of N-glycosylation from ADAM10 in processing, localization and activity of the enzyme. *Biochim Biophys Acta* **1780**, 905-913.
- Fagerholm, S., Morrice, N., Gahmberg, C.G., and Cohen, P. (2002). Phosphorylation of the cytoplasmic domain of the integrin CD18 chain by protein kinase C isoforms in leukocytes. *J Biol Chem* **277**, 1728-1738.
- Farrens, D.L., Altenbach, C., Yang, K., Hubbell, W.L., and Khorana, H.G. (1996). Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. *Science* **274**, 768-770.
- Fedtko, I., Gotz, F., and Peschel, A. (2004). Bacterial evasion of innate host defenses--the *Staphylococcus aureus* lesson. *Int J Med Microbiol* **294**, 189-194.
- Feinstein, T.N., Wehbi, V.L., Ardura, J.A., Wheeler, D.S., Ferrandon, S., Gardella, T.J., and Vilardaga, J.P. (2011). Retromer terminates the generation of cAMP by internalized PTH receptors. *Nat Chem Biol* **7**, 278-284.
- Feniger-Barish, R., Ran, M., Zaslaver, A., and Ben-Baruch, A. (1999). Differential modes of regulation of cxc chemokine-induced internalization and recycling of human CXCR1 and CXCR2. *Cytokine* **11**, 996-1009.
- Ferguson, S.S., Barak, L.S., Zhang, J., and Caron, M.G. (1996). G-protein-coupled receptor regulation: role of G-protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Can J Physiol Pharmacol* **74**, 1095-1110.
- Ferguson, S.S., and Caron, M.G. (1998). G protein-coupled receptor adaptation mechanisms. *Semin Cell Dev Biol* **9**, 119-127.

- Fernandez-Rojo, M.A., Restall, C., Ferguson, C., Martel, N., Martin, S., Bosch, M., Kassan, A., Leong, G.M., Martin, S.D., McGee, S.L., *et al.* (2012). Caveolin-1 orchestrates the balance between glucose and lipid-dependent energy metabolism: implications for liver regeneration. *Hepatology* 55, 1574-1584.
- Ferrandon, S., Feinstein, T.N., Castro, M., Wang, B., Bouley, R., Potts, J.T., Gardella, T.J., and Vilardaga, J.P. (2009). Sustained cyclic AMP production by parathyroid hormone receptor endocytosis. *Nat Chem Biol* 5, 734-742.
- 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.
- Finck-Barbançon, V., Duportail, G., Meunier, O., and Colin, D.A. (1993). Pore formation by a two-component leukocidin from *Staphylococcus aureus* within the membrane of human polymorphonuclear leukocytes. *Biochim Biophys Acta* 1182, 275-282.
- Foletti, D., Strop, P., Shaughnessy, L., Hasa-Moreno, A., Casas, M.G., Russell, M., Bee, C., Wu, S., Pham, A., Zeng, Z., *et al.* (2013). Mechanism of action and in vivo efficacy of a human-derived antibody against *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin. *J Mol Biol* 425, 1641-1654.
- Formosa, C., Grare, M., Jauvert, E., Coutable, A., Regnouf-de-Vains, J.B., Mourer, M., Duval, R.E., and Dague, E. (2012). Nanoscale analysis of the effects of antibiotics and CX1 on a *Pseudomonas aeruginosa* multidrug-resistant strain. *Sci Rep* 2, 575.
- Foster, S.J. (1995). Molecular characterization and functional analysis of the major autolysin of *Staphylococcus aureus* 8325/4. *J Bacteriol* 177, 5723-5725.
- Foster, T.J. (2005). Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol* 3, 948-958.
- Foster, T.J., and Hook, M. (1998). Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 6, 484-488.
- Franchi, L., Amer, A., Body-Malapel, M., Kanneganti, T.D., Ozoren, N., Jagirdar, R., Inohara, N., Vandenabeele, P., Bertin, J., Coyle, A., *et al.* (2006). Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. *Nat Immunol* 7, 576-582.
- Franke, G.C., Bockenholt, A., Sugai, M., Rohde, H., and Aepfelbacher, M. (2010). Epidemiology, variable genetic organization and regulation of the EDIN-B toxin in *Staphylococcus aureus* from bacteraemic patients. *Microbiology* 156, 860-872.
- Franzius, D., Hoth, M., and Penner, R. (1994). Non-specific effects of calcium entry antagonists in mast cells. *Pflügers Arch* 428, 433-438.
- Fraser, M.E., Chernaia, M.M., Kozlov, Y.V., and James, M.N.G. (1994). CRYSTAL-STRUCTURE OF THE HOLOTOXIN FROM *SHIGELLA-DYSENTERIAE* AT 2.5-ANGSTROM RESOLUTION. *Nature Structural Biology* 1, 59-64.
- Fraunholz, M., and Sinha, B. (2012). Intracellular *Staphylococcus aureus*: live-in and let die. *Front Cell Infect Microbiol* 2, 43.

Fredriksson, R., Lagerstrom, M.C., Lundin, L.G., and Schioth, H.B. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63, 1256-1272.

Freeman, A.K., and Morrison, D.K. (2011). 14-3-3 Proteins: diverse functions in cell proliferation and cancer progression. *Semin Cell Dev Biol* 22, 681-687.

Freer, J.H., and Birkbeck, T.H. (1982). Possible conformation of delta-lysin, a membrane-damaging peptide of *Staphylococcus aureus*. *J Theor Biol* 94, 535-540.

Freidlin, J., Acharya, N., Lietman, T.M., Cevallos, V., Whitcher, J.P., and Margolis, T.P. (2007). Spectrum of eye disease caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Am J Ophthalmol* 144, 313-315.

Frick, M., Bright, N.A., Riento, K., Bray, A., Merrified, C., and Nichols, B.J. (2007). Coassembly of flotillins induces formation of membrane microdomains, membrane curvature, and vesicle budding. *Curr Biol* 17, 1151-1156.

Friedrich, R., Panizzi, P., Fuentes-Prior, P., Richter, K., Verhamme, I., Anderson, P.J., Kawabata, S., Huber, R., Bode, W., and Bock, P.E. (2003). Staphylocoagulase is a prototype for the mechanism of cofactor-induced zymogen activation. *Nature* 425, 535-539.

Fromageau, A., Gilbert, F.B., Prévost, G., and Rainard, P. (2010). Binding of the *Staphylococcus aureus* leucotoxin LukM to its leucocyte targets. *Microb Pathog* 49, 354-362.

Frost, L.S., Leplae, R., Summers, A.O., and Toussaint, A. (2005). Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol* 3, 722-732.

Fueyo, J.M., Mendoza, M.C., Rodicio, M.R., Muniz, J., Alvarez, M.A., and Martin, M.C. (2005). Cytotoxin and pyrogenic toxin superantigen gene profiles of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical mastitis in dairy cows and relationships with macrorestriction genomic profiles. *J Clin Microbiol* 43, 1278-1284.

Fujimoto, K., Miyata, T., and Aoyama, Y. (2000). Saccharide-directed cell recognition and molecular delivery using macrocyclic saccharide clusters: Masking of hydrophobicity to enhance the saccharide specificity. *Journal of the American Chemical Society* 122, 3558-3559.

Galy, R., Bergeret, F., Keller, D., Mourey, L., Prévost, G., and Maveyraud, L. (2012). Crystallization and preliminary crystallographic studies of both components of the staphylococcal LukE-LukD leukotoxin. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 68, 663-667.

Gao, H., Neff, T.A., Guo, R.F., Speyer, C.L., Sarma, J.V., Tomlins, S., Man, Y., Riedemann, N.C., Hoesel, L.M., Younkin, E., *et al.* (2005). Evidence for a functional role of the second C5a receptor C5L2. *FASEB J* 19, 1003-1005.

Garbe, P.L., Arko, R.J., Reingold, A.L., Graves, L.M., Hayes, P.S., Hightower, A.W., Chandler, F.W., and Broome, C.V. (1985). *Staphylococcus aureus* isolates from patients with nonmenstrual toxic shock syndrome. Evidence for additional toxins. *JAMA* 253, 2538-2542.

Garcia, K.C., and Adams, E.J. (2005). How the T cell receptor sees antigen--a structural view. *Cell* 122, 333-336.

- Garcia, K.C., Teyton, L., and Wilson, I.A. (1999). Structural basis of T cell recognition. *Annu Rev Immunol* 17, 369-397.
- Garred, O., Dubinina, E., Polesskaya, A., Olsnes, S., Kozlov, J., and Sandvig, K. (1997). Role of the disulfide bond in Shiga toxin A-chain for toxin entry into cells. *Journal of Biological Chemistry* 272, 11414-11419.
- Garred, O., Vandeurs, B., and Sandvig, K. (1995). FURIN-INDUCED CLEAVAGE AND ACTIVATION OF SHIGA TOXIN. *Journal of Biological Chemistry* 270, 10817-10821.
- Gasque, P. (2004). Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Mol Immunol* 41, 1089-1098.
- Gauduchon, V., Werner, S., Prévost, G., Monteil, H., and Colin, D.A. (2001). Flow cytometric determination of Panton-Valentine leukocidin S component binding. *Infect Immun* 69, 2390-2395.
- Geisbrecht, B.V., Hamaoka, B.Y., Perman, B., Zemla, A., and Leahy, D.J. (2005). The crystal structures of EAP domains from *Staphylococcus aureus* reveal an unexpected homology to bacterial superantigens. *J Biol Chem* 280, 17243-17250.
- Gekara, N.O., and Weiss, S. (2004). Lipid rafts clustering and signalling by listeriolysin O. *Biochem Soc Trans* 32, 712-714.
- Gekara, N.O., Westphal, K., Ma, B., Rohde, M., Groebe, L., and Weiss, S. (2007). The multiple mechanisms of Ca²⁺ signalling by listeriolysin O, the cholesterol-dependent cytolysin of *Listeria monocytogenes*. *Cell Microbiol* 9, 2008-2021.
- Geller, C., Fontanay, S., Mourer, M., Dibama, H.M., Regnouf-de-Vains, J.B., Finance, C., and Duval, R.E. (2010). Antiseptic properties of two calix[4]arenes derivatives on the human coronavirus 229E. *Antiviral Res* 88, 343-346.
- Genestier, A.L., Michallet, M.C., Prévost, G., Bellot, G., Chalabreysse, L., Peyrol, S., Thivolet, F., Etienne, J., Lina, G., Vallette, F.M., *et al.* (2005). *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. *J Clin Invest* 115, 3117-3127.
- Gerard, C., and Rollins, B.J. (2001). Chemokines and disease. *Nat Immunol* 2, 108-115.
- Gerard, N.P., and Gerard, C. (1991). The chemotactic receptor for human C5a anaphylatoxin. *Nature* 349, 614-617.
- Gibert, M., Monier, M.N., Ruez, R., Hale, M.L., Stiles, B.G., Benmerah, A., Johannes, L., Lamaze, C., and Popoff, M.R. (2010). Endocytosis and toxicity of clostridial binary toxins depend on a clathrin-independent pathway regulated by Rho-GDI. *Cell Microbiol* 13, 154-170.
- Gill, S.R., Fouts, D.E., Archer, G.L., Mongodin, E.F., Deboy, R.T., Ravel, J., Paulsen, I.T., Kolonay, J.F., Brinkac, L., Beanan, M., *et al.* (2005). Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J Bacteriol* 187, 2426-2438.
- Gillet, Y., Etienne, J., Lina, G., and Vandenesch, F. (2008). Association of necrotizing pneumonia with Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus*, regardless of methicillin resistance. *Clin Infect Dis* 47, 985-986.

- Gillet, Y., Issartel, B., Vanhems, P., Fournet, J.C., Lina, G., Bes, M., Vandenesch, F., Piemont, Y., Brousse, N., Floret, D., *et al.* (2002). Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Pantón-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet* 359, 753-759.
- Gillet, Y., Vanhems, P., Lina, G., Bes, M., Vandenesch, F., Floret, D., and Etienne, J. (2007). Factors predicting mortality in necrotizing community-acquired pneumonia caused by *Staphylococcus aureus* containing Pantón-Valentine leukocidin. *Clin Infect Dis* 45, 315-321.
- Girgis, D.O., Sloop, G.D., Reed, J.M., and O'Callaghan, R.J. (2005). Effects of toxin production in a murine model of *Staphylococcus aureus* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 2064-2070.
- Givan, A.L., Fisher, J.L., Waugh, M., Ernstoff, M.S., and Wallace, P.K. (1999). A flow cytometric method to estimate the precursor frequencies of cells proliferating in response to specific antigens. *J Immunol Methods* 230, 99-112.
- Glebov, O.O., Bright, N.A., and Nichols, B.J. (2006). Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nat Cell Biol* 8, 46-54.
- Gonzalez, M.R., Bischofberger, M., Pernot, L., van der Goot, F.G., and Freche, B. (2008). Bacterial pore-forming toxins: the (w)hole story? *Cell Mol Life Sci* 65, 493-507.
- Goodman, O.B., Jr., Krupnick, J.G., Santini, F., Gurevich, V.V., Penn, R.B., Gagnon, A.W., Keen, J.H., and Benovic, J.L. (1996). Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* 383, 447-450.
- Gouaux, E. (1998). alpha-Hemolysin from *Staphylococcus aureus*: an archetype of beta-barrel, channel-forming toxins. *J Struct Biol* 121, 110-122.
- Gouaux, E., Hobaugh, M., and Song, L. (1997). alpha-Hemolysin, gamma-hemolysin, and leukocidin from *Staphylococcus aureus*: distant in sequence but similar in structure. *Protein Sci* 6, 2631-2635.
- Grant, B.D., and Donaldson, J.G. (2009). Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 597-608.
- Grare, M., Dibama, H.M., Lafosse, S., Ribon, A., Mourer, M., Regnouf-de-Vains, J.B., Finance, C., and Duval, R.E. (2010). Cationic compounds with activity against multidrug-resistant bacteria: interest of a new compound compared with two older antiseptics, hexamidine and chlorhexidine. *Clin Microbiol Infect* 16, 432-438.
- Grare, M., Mourer, M., Fontanay, S., Regnouf-de-Vains, J.B., Finance, C., and Duval, R.E. (2007). In vitro activity of para-guanidinoethylcalix[4]arene against susceptible and antibiotic-resistant Gram-negative and Gram-positive bacteria. *J Antimicrob Chemother* 60, 575-581.
- Grare, M., Mourer, M., Regnouf de Vains, J.B., Finance, C., and Duval, R.E. (2006). [Towards new antibacterial drugs. Interest of para-guanidinoethylcalix[4]arene]. *Pathol Biol (Paris)* 54, 470-476.
- Graves, S.F., Kobayashi, S.D., Braughton, K.R., Diep, B.A., Chambers, H.F., Otto, M., and DeLeo, F.R. (2010). Relative contribution of Pantón-Valentine leukocidin to PMN plasma membrane permeability and lysis caused by USA300 and USA400 culture supernatants. *Microbes Infect* 12, 446-456.
- Graves, S.F., Kobayashi, S.D., Braughton, K.R., Whitney, A.R., Sturdevant, D.E., Rasmussen, D.L., Kirpotina, L.N., Quinn, M.T., and DeLeo, F.R. (2012). Sublytic concentrations of *Staphylococcus aureus*

Panton-Valentine leukocidin alter human PMN gene expression and enhance bactericidal capacity. *J Leukoc Biol* 92, 361-374.

Gravet, A., Colin, D.A., Keller, D., Girardot, R., Monteil, H., 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., 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.

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.

Green, B.D., Battisti, L., Koehler, T.M., Thorne, C.B., and Ivins, B.E. (1985). Demonstration of a capsule plasmid in *Bacillus anthracis*. *Infect Immun* 49, 291-297.

Gregory, K.J., Hall, N.E., Tobin, A.B., Sexton, P.M., and Christopoulos, A. (2010). Identification of orthosteric and allosteric site mutations in M2 muscarinic acetylcholine receptors that contribute to ligand-selective signaling bias. *J Biol Chem* 285, 7459-7474.

Gronholm, M., Jahan, F., Marchesan, S., Karvonen, U., Aatonen, M., Narumanchi, S., and Gahmberg, C.G. (2011). TCR-induced activation of LFA-1 involves signaling through Tiam1. *J Immunol* 187, 3613-3619.

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.

Gruenberg, J., and Stenmark, H. (2004). The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 317-323.

Grumann, D., Nubel, U., and Broker, B.M. (2013). *Staphylococcus aureus* toxins - Their functions and genetics. *Infect Genet Evol*.

Guetg, N., Abdel Aziz, S., Holbro, N., Turecek, R., Rose, T., Seddik, R., Gassmann, M., Moes, S., Jenoe, P., Oertner, T.G., *et al.* (2010). NMDA receptor-dependent GABAB receptor internalization via CaMKII phosphorylation of serine 867 in GABAB1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 13924-13929.

Guillet, V., Keller, D., Prévost, G., and Mourey, L. (2004). Crystallization and preliminary crystallographic data of a leucotoxin S component from *Staphylococcus aureus*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 310-313.

Guo, R.F., and Ward, P.A. (2005). Role of C5a in inflammatory responses. *Annu Rev Immunol* 23, 821-852.

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

- Gustincich, S., and Schneider, C. (1993). Serum deprivation response gene is induced by serum starvation but not by contact inhibition. *Cell Growth Differ* 4, 753-760.
- Ha, S.D., Ham, B., Mogridge, J., Saftig, P., Lin, S., and Kim, S.O. (2010). Cathepsin B-mediated autophagy flux facilitates the anthrax toxin receptor 2-mediated delivery of anthrax lethal factor into the cytoplasm. *J Biol Chem* 285, 2120-2129.
- Haga, Y., Miwa, N., Jahangeer, S., Okada, T., and Nakamura, S. (2009). CtBP1/BARS is an activator of phospholipase D1 necessary for agonist-induced macropinocytosis. *EMBO J* 28, 1197-1207.
- Haggar, A., Ehrnfelt, C., Holgersson, J., and Flock, J.I. (2004). The extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* inhibits neutrophil binding to endothelial cells. *Infect Immun* 72, 6164-6167.
- Hall, R.A., Premont, R.T., and Lefkowitz, R.J. (1999). Heptahelical receptor signaling: beyond the G protein paradigm. *J Cell Biol* 145, 927-932.
- Hamon, M.A., Batsche, E., Regnault, B., Tham, T.N., Seveau, S., Muchardt, C., and Cossart, P. (2007). Histone modifications induced by a family of bacterial toxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 13467-13472.
- Hancock, R.E., and Diamond, G. (2000). The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol* 8, 402-410.
- Hancock, R.E., and Scott, M.G. (2000). The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8856-8861.
- Hanscom, T.A. (2004). Postoperative endophthalmitis. *Clin Infect Dis* 38, 542-546.
- Hansen, C.G., Howard, G., and Nichols, B.J. (2011). Pacsin 2 is recruited to caveolae and functions in caveolar biogenesis. *J Cell Sci* 124, 2777-2785.
- Hansen, C.G., and Nichols, B.J. (2010). Exploring the caves: cavins, caveolins and caveolae. *Trends Cell Biol* 20, 177-186.
- Hanyaloglu, A.C., and von Zastrow, M. (2008). Regulation of GPCRs by endocytic membrane trafficking and its potential implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48, 537-568.
- Harper, J.L., and Daly, J.W. (1999). Inhibitors of store-operated calcium channels: Imidazoles, phenothiazines, and other tricyclics. *Drug Development Research* 47, 107-117.
- Harteneck, C., Frenzel, H., and Kraft, R. (2007). N-(p-aminocinnamoyl)anthranilic acid (ACA): a phospholipase A(2) inhibitor and TRP channel blocker. *Cardiovasc Drug Rev* 25, 61-75.
- Haveri, M., Roslof, A., Rantala, L., and Pyorala, S. (2007). Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. *J Appl Microbiol* 103, 993-1000.
- He, R., Browning, D.D., and Ye, R.D. (2001). Differential roles of the NPXXY motif in formyl peptide receptor signaling. *J Immunol* 166, 4099-4105.
- Head, B.P., Hu, Y., Finley, J.C., Saldana, M.D., Bonds, J.A., Miyanojara, A., Niesman, I.R., Ali, S.S., Murray, F., Insel, P.A., et al. (2011). Neuron-targeted caveolin-1 protein enhances signaling and promotes arborization of primary neurons. *J Biol Chem* 286, 33310-33321.

Head, B.P., Peart, J.N., Panneerselvam, M., Yokoyama, T., Pearn, M.L., Niesman, I.R., Bonds, J.A., Schilling, J.M., Miyanohara, A., Headrick, J., *et al.* (2010). Loss of caveolin-1 accelerates neurodegeneration and aging. *PLoS One* 5, e15697.

Heiner, I., Eisfeld, J., Halaszovich, C.R., Wehage, E., Jungling, E., Zitt, C., and Luckhoff, A. (2003). Expression profile of the transient receptor potential (TRP) family in neutrophil granulocytes: evidence for currents through long TRP channel 2 induced by ADP-ribose and NAD. *Biochem J* 371, 1045-1053.

Henley, J.R., Krueger, E.W., Oswald, B.J., and McNiven, M.A. (1998). Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J Cell Biol* 141, 85-99.

Hensler, T., Koller, M., Prévost, G., Piémont, Y., and König, W. (1994). 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.

Herron-Olson, L., Fitzgerald, J.R., Musser, J.M., and Kapur, V. (2007). Molecular correlates of host specialization in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 2, e1120.

Hicke, L. (1999). Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels. *Trends Cell Biol* 9, 107-112.

Hildebrand, A., Pohl, M., and Bhakdi, S. (1991). *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. Dual mechanism of binding to target cells. *J Biol Chem* 266, 17195-17200.

Hill, M.M., Bastiani, M., Luetterforst, R., Kirkham, M., Kirkham, A., Nixon, S.J., Walser, P., Abankwa, D., Oorschot, V.M., Martin, S., *et al.* (2008). PTRF-Cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function. *Cell* 132, 113-124.

Hiraoka, Y., Ohno, M., Yoshida, K., Okawa, K., Tomimoto, H., Kita, T., and Nishi, E. (2007). Enhancement of alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein by a metalloendopeptidase nardilysin. *J Neurochem* 102, 1595-1605.

Hoiby, N., Ciofu, O., Johansen, H.K., Song, Z.J., Moser, C., Jensen, P.O., Molin, S., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., and Bjarnsholt, T. (2011). The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci* 3, 55-65.

Holden, M.T., Feil, E.J., Lindsay, J.A., Peacock, S.J., Day, N.P., Enright, M.C., Foster, T.J., Moore, C.E., Hurst, L., Atkin, R., *et al.* (2004). Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 9786-9791.

Holmes, A., Ganner, M., McGuane, S., Pitt, T.L., Cookson, B.D., and Kearns, A.M. (2005). *Staphylococcus aureus* isolates carrying Panton-Valentine leucocidin genes in England and Wales: frequency, characterization, and association with clinical disease. *J Clin Microbiol* 43, 2384-2390.

Hong, J., Doebele, R.C., Lingen, M.W., Quilliam, L.A., Tang, W.J., and Rosner, M.R. (2007). Anthrax edema toxin inhibits endothelial cell chemotaxis via Epac and Rap1. *J Biol Chem* 282, 19781-19787.

Hotchkiss, K.A., Basile, C.M., Spring, S.C., Bonuccelli, G., Lisanti, M.P., and Terman, B.I. (2005). TEM8 expression stimulates endothelial cell adhesion and migration by regulating cell-matrix interactions on collagen. *Exp Cell Res* 305, 133-144.

- Howes, M.T., Kirkham, M., Riches, J., Cortese, K., Walser, P.J., Simpson, F., Hill, M.M., Jones, A., Lundmark, R., Lindsay, M.R., *et al.* (2010a). Clathrin-independent carriers form a high capacity endocytic sorting system at the leading edge of migrating cells. *J Cell Biol* **190**, 675-691.
- Howes, M.T., Mayor, S., and Parton, R.G. (2010b). Molecules, mechanisms, and cellular roles of clathrin-independent endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* **22**, 519-527.
- Hsu, W.C., Yang, F.C., Lin, C.H., Hsieh, S.L., and Chen, N.J. (2014). C5L2 is required for C5a-triggered receptor internalization and ERK signaling. *Cell Signal* **26**, 1409-1419.
- Huber-Lang, M., Sarma, J.V., Rittirsch, D., Schreiber, H., Weiss, M., Flierl, M., Younkin, E., Schneider, M., Suger-Wiedeck, H., Gebhard, F., *et al.* (2005). Changes in the novel orphan, C5a receptor (C5L2), during experimental sepsis and sepsis in humans. *J Immunol* **174**, 1104-1110.
- Huber-Lang, M.S., Sarma, J.V., McGuire, S.R., Lu, K.T., Padgaonkar, V.A., Younkin, E.M., Guo, R.F., Weber, C.H., Zuiderweg, E.R., Zetoune, F.S., *et al.* (2003). Structure-function relationships of human C5a and C5aR. *J Immunol* **170**, 6115-6124.
- Huotari, J., and Helenius, A. (2011). Endosome maturation. *EMBO J* **30**, 3481-3500.
- Huseby, M.J., Kruse, A.C., Digre, J., Kohler, P.L., Vocke, J.A., Mann, E.E., Bayles, K.W., Bohach, G.A., Schlievert, P.M., Ohlendorf, D.H., *et al.* (2010). Beta toxin catalyzes formation of nucleoprotein matrix in staphylococcal biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 14407-14412.
- Hwang, E.M., Kim, S.K., Sohn, J.H., Lee, J.Y., Kim, Y., Kim, Y.S., and Mook-Jung, I. (2006). Furin is an endogenous regulator of alpha-secretase associated APP processing. *Biochem Biophys Res Commun* **349**, 654-659.
- Hynes, R.O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673-687.
- Iacovache, I., Paumard, P., Scheib, H., Lesieur, C., Sakai, N., Matile, S., Parker, M.W., and van der Goot, F.G. (2006). A rivet model for channel formation by aerolysin-like pore-forming toxins. *EMBO J* **25**, 457-466.
- Inoue, S., Sugai, M., Murooka, Y., Paik, S.Y., Hong, Y.M., Ohgai, H., and Suganaka, H. (1991). Molecular cloning and sequencing of the epidermal cell differentiation inhibitor gene from *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun* **174**, 459-464.
- Issa, N.C., and Thompson, R.L. (2001). Staphylococcal toxic shock syndrome. Suspicion and prevention are keys to control. *Postgrad Med* **110**, 55-56, 59-62.
- Itagaki, K., Kannan, K.B., Singh, B.B., and Hauser, C.J. (2004). Cytoskeletal reorganization internalizes multiple transient receptor potential channels and blocks calcium entry into human neutrophils. *J Immunol* **172**, 601-607.
- Iwamoto, T., Watano, T., and Shigekawa, M. (1996). A novel isothiourea derivative selectively inhibits the reverse mode of Na⁺/Ca²⁺ exchange in cells expressing NCX1. *J Biol Chem* **271**, 22391-22397.
- Izumi, Y., Hirai, S., Tamai, Y., Fujise-Matsuoka, A., Nishimura, Y., and Ohno, S. (1997). A protein kinase Cdelta-binding protein SRBC whose expression is induced by serum starvation. *J Biol Chem* **272**, 7381-7389.

- Jackson, M.P., Newland, J.W., Holmes, R.K., and O'Brien, A.D. (1987). Nucleotide sequence analysis of the structural genes for Shiga-like toxin I encoded by bacteriophage 933J from *Escherichia coli*. *Microb Pathog* 2, 147-153.
- Jaffe, A.B., and Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 247-269.
- Jarrahian, A., Watts, V.J., and Barker, E.L. (2004). D2 dopamine receptors modulate Galpha-subunit coupling of the CB1 cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 308, 880-886.
- 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.
- Jenssen, H., Hamill, P., and Hancock, R.E. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 19, 491-511.
- Ji, G., Beavis, R., and Novick, R.P. (1997). Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science* 276, 2027-2030.
- Ji, G., Beavis, R.C., and Novick, R.P. (1995). Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 12055-12059.
- Jin, T., Bokarewa, M., Foster, T., Mitchell, J., Higgins, J., and Tarkowski, A. (2004). *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. *J Immunol* 172, 1169-1176.
- Jin, T., Kinjo, M., Kobayashi, Y., and Hirata, H. (1998). Ion transport activity of calix[n]arene (n = 4, 5, 6, 7, 8) esters toward alkali-metal cations in a phospholipid bilayer membrane. *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions* 94, 3135-3140.
- Johannes, L., and Romer, W. (2010). Shiga toxins--from cell biology to biomedical applications. *Nat Rev Microbiol* 8, 105-116.
- Johansson, A. (2011). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin: a powerful tool with capacity to cause imbalance in the host inflammatory response. *Toxins (Basel)* 3, 242-259.
- 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.
- Joubert, O., Viero, G., Keller, D., Martinez, E., Colin, D.A., Monteil, H., Mourey, L., Dalla Serra, M., and Prévost, G. (2006). Engineered covalent leucotoxin heterodimers form functional pores: insights into S-F interactions. *Biochem J* 396, 381-389.
- Joubert, O., Voegelin, J., Guillet, V., Tranier, S., Werner, S., Colin, D.A., Dalla Serra, M., Keller, D., Monteil, H., Mourey, L., *et al.* (2007). Distinction between pore assembly by staphylococcal alpha-toxin versus leukotoxins. *J Biomed Biotechnol* 2007, 25935.
- Kahsai, A.W., Xiao, K., Rajagopal, S., Ahn, S., Shukla, A.K., Sun, J., Oas, T.G., and Lefkowitz, R.J. (2011). Multiple ligand-specific conformations of the beta2-adrenergic receptor. *Nat Chem Biol* 7, 692-700.

- Kaneko, J., and Kamio, Y. (2004). Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes. *Biosci Biotechnol Biochem* 68, 981-1003.
- 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 Pantone-Valentine leukocidin genes. *Gene* 215, 57-67.
- Kaneko, J., Muramoto, K., and Kamio, Y. (1997a). Gene of LukF-PV-like component of Pantone-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* P83 is linked with lukM. *Biosci Biotechnol Biochem* 61, 541-544.
- Kaneko, J., Ozawa, T., Tomita, T., and Kamio, Y. (1997b). Sequential binding of Staphylococcal gamma-hemolysin to human erythrocytes and complex formation of the hemolysin on the cell surface. *Biosci Biotechnol Biochem* 61, 846-851.
- Karavolos, M.H., Horsburgh, M.J., Ingham, E., and Foster, S.J. (2003). Role and regulation of the superoxide dismutases of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 149, 2749-2758.
- Katagiri, Y.U., Mori, T., Nakajima, H., Katagiri, C., Taguchi, T., Takeda, T., Kiyokawa, N., and Fujimoto, J. (1999). Activation of Src family kinase Yes induced by Shiga toxin binding to globotriaosyl ceramide (Gb3/CD77) in low density, detergent-insoluble microdomains. *Journal of Biological Chemistry* 274, 35278-35282.
- Katzmann, D.J., Babst, M., and Emr, S.D. (2001). Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* 106, 145-155.
- Katzmann, D.J., Odorizzi, G., and Emr, S.D. (2002). Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 893-905.
- Kayal, S., Lilienbaum, A., Poyart, C., Memet, S., Israel, A., and Berche, P. (1999). Listeriolysin O-dependent activation of endothelial cells during infection with *Listeria monocytogenes*: activation of NF-kappa B and upregulation of adhesion molecules and chemokines. *Mol Microbiol* 31, 1709-1722.
- Kenakin, T. (1995). Agonist-receptor efficacy. II. Agonist trafficking of receptor signals. *Trends Pharmacol Sci* 16, 232-238.
- Kenakin, T., and Miller, L.J. (2010). Seven transmembrane receptors as shapeshifting proteins: the impact of allosteric modulation and functional selectivity on new drug discovery. *Pharmacol Rev* 62, 265-304.
- Kenakin, T.P. (2012). Biased signalling and allosteric machines: new vistas and challenges for drug discovery. *Br J Pharmacol* 165, 1659-1669.
- Kennedy, A.D., Otto, M., Braughton, K.R., Whitney, A.R., Chen, L., Mathema, B., Mediavilla, J.R., Byrne, K.A., Parkins, L.D., Tenover, F.C., *et al.* (2008). Epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: recent clonal expansion and diversification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 1327-1332.
- Kerr, I.D., Dufourcq, J., Rice, J.A., Fredkin, D.R., and Sansom, M.S. (1995). Ion channel formation by synthetic analogues of staphylococcal delta-toxin. *Biochim Biophys Acta* 1236, 219-227.

- Kerr, M.C., and Teasdale, R.D. (2009). Defining macropinocytosis. *Traffic* 10, 364-371.
- Kessler, C.M., Nussbaum, E., and Tuazon, C.U. (1991). Disseminated intravascular coagulation associated with *Staphylococcus aureus* septicemia is mediated by peptidoglycan-induced platelet aggregation. *J Infect Dis* 164, 101-107.
- Kew, R.R., Peng, T., DiMartino, S.J., Madhavan, D., Weinman, S.J., Cheng, D., and Prossnitz, E.R. (1997). Undifferentiated U937 cells transfected with chemoattractant receptors: a model system to investigate chemotactic mechanisms and receptor structure/function relationships. *J Leukoc Biol* 61, 329-337.
- Khanal, B., Deb, M., Panda, A., and Sethi, H.S. (2005). Laboratory diagnosis in ulcerative keratitis. *Ophthalmic Res* 37, 123-127.
- Khoury, E., Clement, S., and Laporte, S.A. (2014). Allosteric and Biased G Protein-Coupled Receptor Signaling Regulation: Potentials for New Therapeutics. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5, 68.
- Kiarash, A., Boyd, B., and Lingwood, C.A. (1994). GLYCOSPHINGOLIPID RECEPTOR FUNCTION IS MODIFIED BY FATTY-ACID CONTENT - VEROTOXIN-1 AND VEROTOXIN-2C PREFERENTIALLY RECOGNIZE DIFFERENT GLOBOTRIAOSYL CERAMIDE FATTY-ACID HOMOLOGS. *Journal of Biological Chemistry* 269, 11138-11146.
- Kielian, T., Cheung, A., and Hickey, W.F. (2001). Diminished virulence of an alpha-toxin mutant of *Staphylococcus aureus* in experimental brain abscesses. *Infect Immun* 69, 6902-6911.
- Kim, C.H. (2004). Chemokine-chemokine receptor network in immune cell trafficking. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 4, 343-361.
- Kintzer, A.F., Thoren, K.L., Sterling, H.J., Dong, K.C., Feld, G.K., Tang, H., Zhang, T.T., Williams, E.R., Berger, J.M., and Krantz, B.A. (2009). The protective antigen component of anthrax toxin forms functional octameric complexes. *J Mol Biol* 392, 614-629.
- Klein, E., Smith, D.L., and Laxminarayan, R. (2007). Hospitalizations and deaths caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, United States, 1999-2005. *Emerg Infect Dis* 13, 1840-1846.
- Kobayashi, S.D., Malachowa, N., Whitney, A.R., Braughton, K.R., Gardner, D.J., Long, D., Bubeck Wardenburg, J., Schneewind, O., Otto, M., and Deleo, F.R. (2011). Comparative analysis of USA300 virulence determinants in a rabbit model of skin and soft tissue infection. *J Infect Dis* 204, 937-941.
- Kobuke, Y., and Nagatani, T. (2000). A supramolecular ion channel based on amphiphilic cholic acid derivatives. *Chemistry Letters*, 298-299.
- Kojro, E., Gimpl, G., Lammich, S., Marz, W., and Fahrenholz, F. (2001). Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5815-5820.
- Kondo, I., Sakurai, S., and Sarai, Y. (1974). New type of exfoliatin obtained from staphylococcal strains, belonging to phage groups other than group II, isolated from patients with impetigo and Ritter's disease. *Infect Immun* 10, 851-861.
- 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.

- Konrad, F.M., and Reutershan, J. (2012). CXCR2 in acute lung injury. *Mediators Inflamm* 2012, 740987.
- Kopp, P.M., Bate, N., Hansen, T.M., Brindle, N.P., Praekelt, U., Debrand, E., Coleman, S., Mazzeo, D., Gault, B.T., Gingras, A.R., *et al.* (2010). Studies on the morphology and spreading of human endothelial cells define key inter- and intramolecular interactions for talin1. *Eur J Cell Biol* 89, 661-673.
- Korchowiec, B., Gorczyca, M., Ben Salem, A., Regnouf de Vains, J.B., and Rogalska, E. (2013). Interaction of a beta-lactam calixarene derivative with a model eukaryotic membrane affects the activity of PLA2. *Colloids Surf B Biointerfaces* 103, 217-222.
- Kotowski, S.J., Hopf, F.W., Seif, T., Bonci, A., and von Zastrow, M. (2011). Endocytosis promotes rapid dopaminergic signaling. *Neuron* 71, 278-290.
- Kouranti, I., Sachse, M., Arouche, N., Goud, B., and Echard, A. (2006). Rab35 regulates an endocytic recycling pathway essential for the terminal steps of cytokinesis. *Curr Biol* 16, 1719-1725.
- Kovbasnjuk, O., Edidin, M., and Donowitz, M. (2001). Role of lipid rafts in Shiga toxin 1 interaction with the apical surface of Caco-2 cells. *Journal of Cell Science* 114, 4025-4031.
- Kraft, K., Olbrich, H., Majoul, I., Mack, M., Proudfoot, A., and Oppermann, M. (2001). Characterization of sequence determinants within the carboxyl-terminal domain of chemokine receptor CCR5 that regulate signaling and receptor internalization. *J Biol Chem* 276, 34408-34418.
- Kraft, R., Grimm, C., Frenzel, H., and Harteneck, C. (2006). Inhibition of TRPM2 cation channels by N-(p-aminocinnamoyl)anthranilic acid. *Br J Pharmacol* 148, 264-273.
- Kraiczy, P., and Wurzner, R. (2006). Complement escape of human pathogenic bacteria by acquisition of complement regulators. *Mol Immunol* 43, 31-44.
- Kraus, D., and Peschel, A. (2008). *Staphylococcus aureus* evasion of innate antimicrobial defense. *Future Microbiol* 3, 437-451.
- Krupnick, J.G., and Benovic, J.L. (1998). The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38, 289-319.
- Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 30, 16-34.
- Kumari, S., Mg, S., and Mayor, S. (2010). Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. *Cell Res* 20, 256-275.
- Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., Cui, L., Oguchi, A., Aoki, K., Nagai, Y., *et al.* (2001). Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 357, 1225-1240.
- Labandeira-Rey, M., Couzon, F., Boisset, S., Brown, E.L., Bes, M., Benito, Y., Barbu, E.M., Vazquez, V., Hook, M., Etienne, J., *et al.* (2007). *Staphylococcus aureus* Pantón-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science* 315, 1130-1133.

- Labyntseva, R.D., Slinchenko, N.M., Veklich, T.O., Rodik, R.V., Cherenok, S.O., Boiko, V.I., Kal'chenko, V.I., and Kosterin, S.O. (2007). [Comparative study of calixarene effect on Mg²⁺ -dependent ATP-hydrolase enzymatic systems from smooth muscle cells of the uterus]. *Ukr Biokhim Zh* 79, 44-54.
- Lalani, T., Federspiel, J.J., Boucher, H.W., Rude, T.H., Bae, I.G., Rybak, M.J., Tonthat, G.T., Corey, G.R., Stryjewski, M.E., Sakoulas, G., *et al.* (2008). Associations between the genotypes of *Staphylococcus aureus* bloodstream isolates and clinical characteristics and outcomes of bacteremic patients. *J Clin Microbiol* 46, 2890-2896.
- Lally, E.T., Hill, R.B., Kieba, I.R., and Korostoff, J. (1999). The interaction between RTX toxins and target cells. *Trends Microbiol* 7, 356-361.
- Lalor, R., DiGesso, J.L., Mueller, A., and Matthews, S.E. (2007). Efficient gene transfection with functionalised multicalixarenes. *Chem Commun (Camb)*, 4907-4909.
- Lam, A.K., and Galione, A. (2013). The endoplasmic reticulum and junctional membrane communication during calcium signaling. *Biochim Biophys Acta* 1833, 2542-2559.
- Lamartine, R., Tsukada, M., Wilson, D., and Shirata, A. (2002a). Antimicrobial activity of calixarenes. In *Comptes Rendus Chimie (Elsevier)*, pp. pp. 163-169(167).
- Lamartine, R., Tsukada, M., Wilson, D., and Shirata, A. (2002b). Antimicrobial activity of calixarenes. In *Comptes Rendus Chimie Elsevier*, ed. (Lyon, Elsevier), pp. pages 163-169.
- Lamaze, C., Dujeancourt, A., Baba, T., Lo, C.G., Benmerah, A., and Dautry-Varsat, A. (2001). Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol Cell* 7, 661-671.
- Lang, D.M., Lommel, S., Jung, M., Ankerhold, R., Petrausch, B., Laessing, U., Wiechers, M.F., Plattner, H., and Stuermer, C.A. (1998). Identification of reggie-1 and reggie-2 as plasmamembrane-associated proteins which cocluster with activated GPI-anchored cell adhesion molecules in non-caveolar micropatches in neurons. *J Neurobiol* 37, 502-523.
- Langley, R., Wines, B., Willoughby, N., Basu, I., Proft, T., and Fraser, J.D. (2005). The staphylococcal superantigen-like protein 7 binds IgA and complement C5 and inhibits IgA-Fc alpha RI binding and serum killing of bacteria. *J Immunol* 174, 2926-2933.
- LaPointe, P., Wei, X., and Gariepy, J. (2005). A role for the protease-sensitive loop region of shiga-like toxin 1 in the retrotranslocation of its A(1) domain from the endoplasmic reticulum lumen. *Journal of Biological Chemistry* 280, 23310-23318.
- Laporte, S.A., Oakley, R.H., Zhang, J., Holt, J.A., Ferguson, S.S., Caron, M.G., and Barak, L.S. (1999). The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3712-3717.
- Lauvrak, S.U., Torgersen, M.L., and Sandvig, K. (2004). Efficient endosome-to-Golgi transport of Shiga toxin is dependent on dynamin and clathrin. *Journal of Cell Science* 117, 2321-2331.
- Lauvrak, S.U., Walchli, S., Iversen, T.G., Slagsvold, H.H., Torgersen, M.L., Spilsberg, B., and Sandvig, K. (2006). Shiga toxin regulates its entry in a syk-dependent manner. *Molecular Biology of the Cell* 17, 1096-1109.

- Laventie, B.J., Potrich, C., Atmanene, C., Saleh, M., Joubert, O., Viero, G., Bachmeyer, C., Antonini, V., Mancini, I., Cianferani-Sanglier, S., *et al.* (2013). p-Sulfonato-calix[n]arenes inhibit staphylococcal bicomponent leukotoxins by supramolecular interactions. *Biochem J* 450, 559-571.
- Laventie, B.J., Rademaker, H.J., Saleh, M., de Boer, E., Janssens, R., Bourcier, T., Subilia, A., Marcellin, L., van Haperen, R., Lebbink, J.H., *et al.* (2011). Heavy chain-only antibodies and tetravalent bispecific antibody neutralizing *Staphylococcus aureus* leukotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 16404-16409.
- Lebon, A., Verkaik, N.J., de Vogel, C.P., Hooijkaas, H., Verbrugh, H.A., van Wamel, W.J., Jaddoe, V.W., Hofman, A., Hermans, P.W., Mitchell, T.J., *et al.* (2011). The inverse correlation between *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* colonization in infants is not explained by differences in serum antibody levels in the Generation R Study. *Clin Vaccine Immunol* 18, 180-183.
- Lee, H., Whitfeld, P.L., and Mackay, C.R. (2008a). Receptors for complement C5a. The importance of C5aR and the enigmatic role of C5L2. *Immunol Cell Biol* 86, 153-160.
- Lee, K.H., Fitton, J.E., and Wuthrich, K. (1987). Nuclear magnetic resonance investigation of the conformation of delta-haemolysin bound to dodecylphosphocholine micelles. *Biochim Biophys Acta* 911, 144-153.
- Lee, L.Y., Hook, M., Haviland, D., Wetsel, R.A., Yonter, E.O., Syribeys, P., Vernachio, J., and Brown, E.L. (2004a). Inhibition of complement activation by a secreted *Staphylococcus aureus* protein. *J Infect Dis* 190, 571-579.
- Lee, L.Y., Liang, X., Hook, M., and Brown, E.L. (2004b). Identification and characterization of the C3 binding domain of the *Staphylococcus aureus* extracellular fibrinogen-binding protein (Efb). *J Biol Chem* 279, 50710-50716.
- Lee, S.-Y., Lee, M.-S., Cherla, R.P., and Tesh, V.L. (2008b). Shiga toxin 1 induces apoptosis through the endoplasmic reticulum stress response in human monocytic cells. *Cellular Microbiology* 10, 770-780.
- Lee, S.K., Li, W., Ryu, S.E., Rhim, T., and Ahnn, J. (2010). Vacuolar (H⁺)-ATPases in *Caenorhabditis elegans*: what can we learn about giant H⁺ pumps from tiny worms? *Biochim Biophys Acta* 1797, 1687-1695.
- Lefkowitz, R.J. (1993). G protein-coupled receptor kinases. *Cell* 74, 409-412.
- Lefkowitz, R.J., Pitcher, J., Krueger, K., and Daaka, Y. (1998). Mechanisms of beta-adrenergic receptor desensitization and resensitization. *Adv Pharmacol* 42, 416-420.
- Lefkowitz, R.J., and Shenoy, S.K. (2005). Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* 308, 512-517.
- Legeay, G., Poncin-Epaillard, F., and Arciola, C.R. (2006). New surfaces with hydrophilic/hydrophobic characteristics in relation to (no)bioadhesion. *Int J Artif Organs* 29, 453-461.
- Leppla, S.H. (1982). Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentrations of eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 3162-3166.
- Li, H.T., Zhang, T.T., Huang, J., Zhou, Y.Q., Zhu, J.X., and Wu, B.Q. (2011). Factors associated with the outcome of life-threatening necrotizing pneumonia due to community-acquired *Staphylococcus aureus* in adult and adolescent patients. *Respiration* 81, 448-460.

- Li, R., Coulthard, L.G., Wu, M.C., Taylor, S.M., and Woodruff, T.M. (2013). C5L2: a controversial receptor of complement anaphylatoxin, C5a. *FASEB J* 27, 855-864.
- Li, S., Huang, H., Rao, X., Chen, W., Wang, Z., and Hu, X. (2014). Phenol-soluble modulins: novel virulence-associated peptides of staphylococci. *Future Microbiol* 9, 203-216.
- Lim, J., and Hotchin, N.A. (2012). Signalling mechanisms of the leukocyte integrin α M β 2: current and future perspectives. *Biol Cell* 104, 631-640.
- Lim, J., Wiedemann, A., Tzircotis, G., Monkley, S.J., Critchley, D.R., and Caron, E. (2007). An essential role for talin during α (M) β (2)-mediated phagocytosis. *Mol Biol Cell* 18, 976-985.
- Lin, L.L., Wartmann, M., Lin, A.Y., Knopf, J.L., Seth, A., and Davis, R.J. (1993). cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* 72, 269-278.
- Lina, G., Bohach, G.A., Nair, S.P., Hiramatsu, K., Jouvin-Marche, E., and Mariuzza, R. (2004). Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. *J Infect Dis* 189, 2334-2336.
- Lina, G., Piemont, Y., Godail-Gamot, F., Bes, 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.
- Lindberg, A.A., Brown, J.E., Stromberg, N., Westlingryd, M., Schultz, J.E., and Karlsson, K.A. (1987). IDENTIFICATION OF THE CARBOHYDRATE RECEPTOR FOR SHIGA TOXIN PRODUCED BY *SHIGELLA-DYSENTERIAE* TYPE-1. *Journal of Biological Chemistry* 262, 1779-1785.
- Lindsay, J.A., and Holden, M.T. (2006). Understanding the rise of the superbug: investigation of the evolution and genomic variation of *Staphylococcus aureus*. *Funct Integr Genomics* 6, 186-201.
- Ling, H., Boodhoo, A., Hazes, B., Cummings, M.D., Armstrong, G.D., Brunton, J.L., and Read, R.J. (1998). Structure of the Shiga-like toxin I B-pentamer complexed with an analogue of its receptor Gb(3). *Biochemistry* 37, 1777-1788.
- Lingwood, C.A., Binnington, B., Manis, A., and Branch, D.R. (2010a). Globotriaosyl ceramide receptor function - Where membrane structure and pathology intersect. *Febs Letters* 584, 1879-1886.
- Lingwood, C.A., Law, H., Richardson, S., Petric, M., Brunton, J.L., Degrandis, S., and Karmali, M. (1987). GLYCOLIPID BINDING OF PURIFIED AND RECOMBINANT *ESCHERICHIA-COLI* PRODUCED VEROTOXIN INVITRO. *Journal of Biological Chemistry* 262, 8834-8839.
- Lingwood, C.A., Manis, A., Mahfoud, R., Khan, F., Binnington, B., and Mylvaganam, M. (2010b). New aspects of the regulation of glycosphingolipid receptor function. *Chemistry and Physics of Lipids* 163, 27-35.
- Lingwood, D., Binnington, B., Rog, T., Vattulainen, I., Grzybek, M., Coskun, U., Lingwood, C.A., and Simons, K. (2011). Cholesterol modulates glycolipid conformation and receptor activity. *Nature Chemical Biology* 7, 260-262.
- Lipinska, U., Hermans, K., Meulemans, L., Dumitrescu, O., Badiou, C., Duchateau, L., Haesebrouck, F., Etienne, J., and Lina, G. (2011). Panton-Valentine leukocidin does play a role in the early stage of *Staphylococcus aureus* skin infections: a rabbit model. *PLoS One* 6, e22864.

- Liu, G.Y., Essex, A., Buchanan, J.T., Datta, V., Hoffman, H.M., Bastian, J.F., Fierer, J., and Nizet, V. (2005). *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *J Exp Med* 202, 209-215.
- Liu, L., and Pilch, P.F. (2008). A critical role of cavin (polymerase I and transcript release factor) in caveolae formation and organization. *J Biol Chem* 283, 4314-4322.
- Liu, Y.W., Surka, M.C., Schroeter, T., Lukiyanchuk, V., and Schmid, S.L. (2008). Isoform and splice-variant specific functions of dynamin-2 revealed by analysis of conditional knock-out cells. *Mol Biol Cell* 19, 5347-5359.
- Löffler, B., Hussain, M., Grundmeier, M., Bruck, M., Holzinger, D., Varga, G., Roth, J., Kahl, B.C., Proctor, R.A., and Peters, G. (2010). *Staphylococcus aureus* panton-valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. *PLoS Pathog* 6, e1000715.
- Lopez-Illasaca, M., Crespo, P., Pellici, P.G., Gutkind, J.S., and Wetzker, R. (1997). Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase gamma. *Science* 275, 394-397.
- Lowe, D.E., and Glomski, I.J. (2012). Cellular and physiological effects of anthrax exotoxin and its relevance to disease. *Front Cell Infect Microbiol* 2, 76.
- Lowy, F.D. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 339, 520-532.
- Luthra, M.G. (1982). Trifluoperazine inhibition of calmodulin-sensitive Ca²⁺-ATPase and calmodulin insensitive (Na⁺ + K⁺)- and Mg²⁺-ATPase activities of human and rat red blood cells. *Biochim Biophys Acta* 692, 271-277.
- Luttrell, L.M., Daaka, Y., and Lefkowitz, R.J. (1999). Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Cell Biol* 11, 177-183.
- Ma, X.X., Ito, T., Kondo, Y., Cho, M., Yoshizawa, Y., Kaneko, J., Katai, A., Higashiide, M., Li, S., and Hiramatsu, K. (2008). Two different Panton-Valentine leukocidin phage lineages predominate in Japan. *J Clin Microbiol* 46, 3246-3258.
- Mack, D., Becker, P., Chatterjee, I., Dobinsky, S., Knobloch, J.K., Peters, G., Rohde, H., and Herrmann, M. (2004). Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses. *Int J Med Microbiol* 294, 203-212.
- Maghazachi, A.A. (1999). Intracellular signalling pathways induced by chemokines in natural killer cells. *Cell Signal* 11, 385-390.
- 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.
- Malachowa, N., and DeLeo, F.R. (2010). Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell Mol Life Sci* 67, 3057-3071.
- Malachowa, N., Kobayashi, S.D., Braughton, K.R., Whitney, A.R., Parnell, M.J., Gardner, D.J., and Deleo, F.R. (2012). *Staphylococcus aureus* leukotoxin GH promotes inflammation. *J Infect Dis* 206, 1185-1193.

- Malachowa, N., Kobayashi, S.D., Freedman, B., Dorward, D.W., and DeLeo, F.R. (2013). *Staphylococcus aureus* leukotoxin GH promotes formation of neutrophil extracellular traps. *J Immunol* 191, 6022-6029.
- Mallard, F., Tang, B.L., Galli, T., Tenza, D., Saint-Pol, A., Yue, X., Antony, C., Hong, W.J., Goud, B., and Johannes, L. (2002). Early/recycling endosomes-to-TGN transport involves two SNARE complexes and a Rab6 isoform. *Journal of Cell Biology* 156, 653-664.
- Marraffini, L.A., Dedent, A.C., and Schneewind, O. (2006). Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 192-221.
- Martchenko, M., Jeong, S.Y., and Cohen, S.N. (2010). Heterodimeric integrin complexes containing beta1-integrin promote internalization and lethality of anthrax toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 15583-15588.
- Martinon, F., Burns, K., and Tschopp, J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* 10, 417-426.
- Martinon, F., and Tschopp, J. (2005). NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol* 26, 447-454.
- Mason, M.J., Mayer, B., and Hymel, L.J. (1993). Inhibition of Ca²⁺ transport pathways in thymic lymphocytes by econazole, miconazole, and SKF 96365. *Am J Physiol* 264, C654-662.
- Masschalck, B., Deckers, D., and Michiels, C.W. (2002). Lytic and nonlytic mechanism of inactivation of gram-positive bacteria by lysozyme under atmospheric and high hydrostatic pressure. *J Food Prot* 65, 1916-1923.
- Masschalck, B., and Michiels, C.W. (2003). Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria. *Crit Rev Microbiol* 29, 191-214.
- Maxfield, F.R., and McGraw, T.E. (2004). Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 121-132.
- Mayadas, T.N., and Cullere, X. (2005). Neutrophil beta2 integrins: moderators of life or death decisions. *Trends Immunol* 26, 388-395.
- Mayer-Scholl, A., Averhoff, P., and Zychlinsky, A. (2004). How do neutrophils and pathogens interact? *Curr Opin Microbiol* 7, 62-66.
- Mayor, S., and Pagano, R.E. (2007). Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 603-612.
- Mayorga, L.S., Colombo, M.I., Lennartz, M., Brown, E.J., Rahman, K.H., Weiss, R., Lennon, P.J., and Stahl, P.D. (1993). Inhibition of endosome fusion by phospholipase A2 (PLA2) inhibitors points to a role for PLA2 in endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10255-10259.
- McCormick, J.K., Yarwood, J.M., and Schlievert, P.M. (2001). Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annu Rev Microbiol* 55, 77-104.
- McMeekin, S.R., Dransfield, I., Rossi, A.G., Haslett, C., and Walker, T.R. (2006). E-selectin permits communication between PAF receptors and TRPC channels in human neutrophils. *Blood* 107, 4938-4945.

- McNeil, P.L., and Steinhardt, R.A. (2003). Plasma membrane disruption: repair, prevention, adaptation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 697-731.
- Mecca, T., Consoli, G.M., Geraci, C., La Spina, R., and Cunsolo, F. (2006). Polycationic calix[8]arenes able to recognize and neutralize heparin. *Org Biomol Chem* 4, 3763-3768.
- Medzhitov, R., and Janeway, C., Jr. (2000). Innate immunity. *N Engl J Med* 343, 338-344.
- Mellor, I.R., Thomas, D.H., and Sansom, M.S. (1988). Properties of ion channels formed by *Staphylococcus aureus* delta-toxin. *Biochim Biophys Acta* 942, 280-294.
- Melton, J.A., Parker, M.W., Rossjohn, J., Buckley, J.T., and Tweten, R.K. (2004). The identification and structure of the membrane-spanning domain of the *Clostridium septicum* alpha toxin. *J Biol Chem* 279, 14315-14322.
- Menger, F.M., Bian, J., Sizova, E., Martinson, D.E., and Seredyuk, V.A. (2004). Bolaforms with fourteen galactose units: a proposed site-directed cohesion of cancer cells. *Org Lett* 6, 261-264.
- Mesrati, I., Saidani, M., Ennigrou, S., Zouari, B., and Ben Redjeb, S. (2010). Clinical isolates of Pantone-Valentine leucocidin- and gamma-haemolysin-producing *Staphylococcus aureus*: prevalence and association with clinical infections. *J Hosp Infect* 75, 265-268.
- Meunier, O., Falkenrodt, A., Monteil, H., and Colin, D.A. (1995). Application of flow cytometry in toxinology: pathophysiology of human polymorphonuclear leukocytes damaged by a pore-forming toxin from *Staphylococcus aureus*. *Cytometry* 21, 241-247.
- Meyer, F., Girardot, R., Piémont, Y., Prévost, G., and Colin, D.A. (2009). Analysis of the specificity of Pantone-Valentine leucocidin and gamma-hemolysin F component binding. *Infect Immun* 77, 266-273.
- Mikesell, P., Ivins, B.E., Ristroph, J.D., and Dreier, T.M. (1983). Evidence for plasmid-mediated toxin production in *Bacillus anthracis*. *Infect Immun* 39, 371-376.
- 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.
- Millan, J., Cain, R.J., Reglero-Real, N., Bigarella, C., Marcos-Ramiro, B., Fernandez-Martin, L., Correias, I., and Ridley, A.J. (2010). Adherens junctions connect stress fibres between adjacent endothelial cells. *BMC Biol* 8, 11.
- Milligan, G. (2008). A day in the life of a G protein-coupled receptor: the contribution to function of G protein-coupled receptor dimerization. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1, S216-229.
- Milligan, G., Wilson, S., and Lopez-Gimenez, J.F. (2005). The specificity and molecular basis of alpha1-adrenoceptor and CXCR chemokine receptor dimerization. *J Mol Neurosci* 26, 161-168.
- Milne, J.C., Furlong, D., Hanna, P.C., Wall, J.S., and Collier, R.J. (1994). Anthrax protective antigen forms oligomers during intoxication of mammalian cells. *J Biol Chem* 269, 20607-20612.
- Miwa, K., Fukuyama, M., Ida, N., Igarashi, H., and Uchiyama, T. (2003). Preparation of a superantigen-adsorbing device and its superantigen removal efficacies in vitro and in vivo. *Int J Infect Dis* 7, 21-26.
- Mock, M., and Fouet, A. (2001). Anthrax. *Annu Rev Microbiol* 55, 647-671.

- Mogridge, J., Cunningham, K., and Collier, R.J. (2002a). Stoichiometry of anthrax toxin complexes. *Biochemistry* 41, 1079-1082.
- Mogridge, J., Cunningham, K., Lacy, D.B., Mourez, M., and Collier, R.J. (2002b). The lethal and edema factors of anthrax toxin bind only to oligomeric forms of the protective antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7045-7048.
- Mohan, M.L., Vasudevan, N.T., Gupta, M.K., Martelli, E.E., and Naga Prasad, S.V. (2012). G-protein coupled receptor resensitization-appreciating the balancing act of receptor function. *Curr Mol Pharmacol*.
- Molinari, G., Rohde, M., Wilde, C., Just, I., Aktories, K., and Chhatwal, G.S. (2006). Localization of the C3-Like ADP-ribosyltransferase from *Staphylococcus aureus* during bacterial invasion of mammalian cells. *Infect Immun* 74, 3673-3677.
- Mongkolrattanothai, K., Boyle, S., Kahana, M.D., and Daum, R.S. (2003). Severe *Staphylococcus aureus* infections caused by clonally related community-acquired methicillin-susceptible and methicillin-resistant isolates. *Clin Infect Dis* 37, 1050-1058.
- Moniatte, M., van der Goot, F.G., Buckley, J.T., Pattus, F., and van Dorsselaer, A. (1996). Characterisation of the heptameric pore-forming complex of the *Aeromonas* toxin aerolysin using MALDI-TOF mass spectrometry. *FEBS Lett* 384, 269-272.
- Monier, S., Jollivet, F., Janoueix-Lerosey, I., Johannes, L., and Goud, B. (2002). Characterization of novel Rab6-interacting proteins involved in endosome-to-TGN transport. *Traffic* 3, 289-297.
- Monk, P.N., Scola, A.M., Madala, P., and Fairlie, D.P. (2007). Function, structure and therapeutic potential of complement C5a receptors. *Br J Pharmacol* 152, 429-448.
- Montoya, M., and Gouaux, E. (2003). Beta-barrel membrane protein folding and structure viewed through the lens of alpha-hemolysin. *Biochim Biophys Acta* 1609, 19-27.
- Moreau, D., Kumar, P., Wang, S.C., Chaumet, A., Chew, S.Y., Chevalley, H., and Bard, F. (2011). Genome-Wide RNAi Screens Identify Genes Required for Ricin and PE Intoxications. *Developmental Cell* 21, 231-244.
- Moren, B., Shah, C., Howes, M.T., Schieber, N.L., McMahon, H.T., Parton, R.G., Daumke, O., and Lundmark, R. (2012). EHD2 regulates caveolar dynamics via ATP-driven targeting and oligomerization. *Mol Biol Cell* 23, 1316-1329.
- Mori, T., Kiyokawa, N., Katagiri, Y.U., Taguchi, T., Suzuki, T., Sekino, T., Sato, N., Ohmi, K., Nakajima, H., Takeda, T., *et al.* (2000). Globotriaosyl ceramide (CD77/Gb3) in the glycolipid-enriched membrane domain participates in B-cell receptor-mediated apoptosis by regulating Lyn kinase activity in human B cells. *Experimental Hematology* 28, 1260-1268.
- Morinaga, N., Kaihou, Y., and Noda, M. (2003). Purification, cloning and characterization of variant LukE-LukD with strong leukocidal activity of staphylococcal bi-component leukotoxin family. *Microbiol Immunol* 47, 81-90.
- Moser, M., Bauer, M., Schmid, S., Ruppert, R., Schmidt, S., Sixt, M., Wang, H.V., Sperandio, M., and Fassler, R. (2009). Kindlin-3 is required for beta2 integrin-mediated leukocyte adhesion to endothelial cells. *Nat Med* 15, 300-305.

- Mourer, M., Dibama, H.M., Fontanay, S., Grare, M., Duval, R.E., Finance, C., and Regnouf-de-Vains, J.B. (2009). p-Guanidinoethyl calixarene and parent phenol derivatives exhibiting antibacterial activities. Synthesis and biological evaluation. *Bioorg Med Chem* 17, 5496-5509.
- Mourer, M., Duval, R.E., Finance, C., and Regnouf-de-Vains, J.B. (2006). Functional organisation and gain of activity: the case of the antibacterial tetra-para-guanidinoethyl-calix[4]arene. *Bioorg Med Chem Lett* 16, 2960-2963.
- Mourer, M., Massimba Dibama, H., Constant, P., Daffe, M., and Regnouf-de-Vains, J.B. (2012). Anti-mycobacterial activities of some cationic and anionic calix[4]arene derivatives. *Bioorg Med Chem* 20, 2035-2041.
- Mourer, M., Psychogios, N., Laumond, G., Aubertin, A.M., and Regnouf-de-Vains, J.B. (2010). Synthesis and anti-HIV evaluation of water-soluble calixarene-based bithiazolyl podands. *Bioorg Med Chem* 18, 36-45.
- Mueller, A., and Strange, P.G. (2004). The chemokine receptor, CCR5. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 35-38.
- Mullershausen, F., Zecri, F., Cetin, C., Billich, A., Guerini, D., and Seuwen, K. (2009). Persistent signaling induced by FTY720-phosphate is mediated by internalized S1P1 receptors. *Nat Chem Biol* 5, 428-434.
- Munckhof, W.J., Krishnan, A., Kruger, P., and Looke, D. (2008a). Cavernous sinus thrombosis and meningitis from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Intern Med J* 38, 283-287.
- Munckhof, W.J., Nimmo, G.R., Carney, J., Schooneveldt, J.M., Huygens, F., Inman-Bamber, J., Tong, E., Morton, A., and Giffard, P. (2008b). Methicillin-susceptible, non-multiresistant methicillin-resistant and multiresistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: a clinical, epidemiological and microbiological comparative study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 27, 355-364.
- Munoz-Planillo, R., Franchi, L., Miller, L.S., and Nunez, G. (2009). A critical role for hemolysins and bacterial lipoproteins in *Staphylococcus aureus*-induced activation of the Nlrp3 inflammasome. *J Immunol* 183, 3942-3948.
- Muriel, O., Echarri, A., Hellriegel, C., Pavon, D.M., Beccari, L., and Del Pozo, M.A. (2011). Phosphorylated filamin A regulates actin-linked caveolae dynamics. *J Cell Sci* 124, 2763-2776.
- Musser, J.M., and Kapur, V. (1992). Clonal analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from intercontinental sources: association of the mec gene with divergent phylogenetic lineages implies dissemination by horizontal transfer and recombination. *J Clin Microbiol* 30, 2058-2063.
- Muzumdar, D., Jhavar, S., and Goel, A. (2011). Brain abscess: an overview. *Int J Surg* 9, 136-144.
- Naesens, R., Ronsyn, M., Druwe, P., Denis, O., Ieven, M., and Jeurissen, A. (2009). Central nervous system invasion by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* 58, 1247-1251.

- Naik, N., Giannini, E., Brouchon, L., and Boulay, F. (1997). Internalization and recycling of the C5a anaphylatoxin receptor: evidence that the agonist-mediated internalization is modulated by phosphorylation of the C-terminal domain. *J Cell Sci* 110 (Pt 19), 2381-2390.
- Naimi, T.S., LeDell, K.H., Como-Sabetti, K., Borchardt, S.M., Boxrud, D.J., Etienne, J., Johnson, S.K., Vandenesch, F., Fridkin, S., O'Boyle, C., *et al.* (2003). Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *JAMA* 290, 2976-2984.
- Nakajima, H., Kiyokawa, N., Katagiri, Y.U., Taguchi, T., Suzuki, T., Sekino, T., Mimori, K., Ebata, T., Saito, M., Nakao, H., *et al.* (2001). Kinetic analysis of binding between shiga toxin and receptor glycolipid Gb3Cer by surface plasmon resonance. *Journal of Biological Chemistry* 276, 42915-42922.
- Nanda, A., Carson-Walter, E.B., Seaman, S., Barber, T.D., Stampfl, J., Singh, S., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., and St Croix, B. (2004). TEM8 interacts with the cleaved C5 domain of collagen alpha 3(VI). *Cancer Res* 64, 817-820.
- Narayanan, S.K., Nagaraja, T.G., Chengappa, M.M., and Stewart, G.C. (2002). Leukotoxins of gram-negative bacteria. *Vet Microbiol* 84, 337-356.
- Narita, S., Kaneko, J., Chiba, J., Piémont, Y., Jarraud, S., Etienne, J., and Kamio, Y. (2001). Phage conversion of Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus*: molecular analysis of a PVL-converting phage, phiSLT. *Gene* 268, 195-206.
- Naslavsky, N., Rahajeng, J., Sharma, M., Jovic, M., and Caplan, S. (2006). Interactions between EHD proteins and Rab11-FIP2: a role for EHD3 in early endosomal transport. *Mol Biol Cell* 17, 163-177.
- Naslavsky, N., Weigert, R., and Donaldson, J.G. (2003). Convergence of non-clathrin- and clathrin-derived endosomes involves Arf6 inactivation and changes in phosphoinositides. *Mol Biol Cell* 14, 417-431.
- Naslavsky, N., Weigert, R., and Donaldson, J.G. (2004). Characterization of a nonclathrin endocytic pathway: membrane cargo and lipid requirements. *Mol Biol Cell* 15, 3542-3552.
- Nassi, S., Collier, R.J., and Finkelstein, A. (2002). PA63 channel of anthrax toxin: an extended beta-barrel. *Biochemistry* 41, 1445-1450.
- Nataf, S., Davoust, N., and Barnum, S.R. (1998). Kinetics of anaphylatoxin C5a receptor expression during experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 91, 147-155.
- 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.
- Ng, W.L., and Bassler, B.L. (2009). Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu Rev Genet* 43, 197-222.
- 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.
- Nicholls, D.G. (2005). Mitochondria and calcium signaling. *Cell Calcium* 38, 311-317.

- Nickerson, D.P., Russell, M.R., and Odorizzi, G. (2007). A concentric circle model of multivesicular body cargo sorting. *EMBO Rep* 8, 644-650.
- Nixon, S.J., Carter, A., Wegner, J., Ferguson, C., Floetenmeyer, M., Riches, J., Key, B., Westerfield, M., and Parton, R.G. (2007). Caveolin-1 is required for lateral line neuromast and notochord development. *J Cell Sci* 120, 2151-2161.
- Novick, R.P., and Geisinger, E. (2008). Quorum sensing in staphylococci. *Annu Rev Genet* 42, 541-564.
- O'Callaghan, R.J., McCormick, C.C., Caballero, A.R., Marquart, M.E., Gatlin, H.P., and Fratkin, J.D. (2007). Age-related differences in rabbits during experimental *Staphylococcus aureus* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48, 5125-5131.
- O'Neill, A.J., Larsen, A.R., Skov, R., Henriksen, A.S., and Chopra, I. (2007). Characterization of the epidemic European fusidic acid-resistant impetigo clone of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 45, 1505-1510.
- Oh, P., McIntosh, D.P., and Schnitzer, J.E. (1998). Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J Cell Biol* 141, 101-114.
- Ohno, M., Hirata, T., Enomoto, M., Araki, T., Ishimaru, H., and Takahashi, T.A. (2000). A putative chemoattractant receptor, C5L2, is expressed in granulocyte and immature dendritic cells, but not in mature dendritic cells. *Mol Immunol* 37, 407-412.
- Okazaki, M., Ferrandon, S., Vilardaga, J.P., Bouxsein, M.L., Potts, J.T., Jr., and Gardella, T.J. (2008). Prolonged signaling at the parathyroid hormone receptor by peptide ligands targeted to a specific receptor conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 16525-16530.
- Okinaga, S., Slattery, D., Humbles, A., Zsengeller, Z., Morteau, O., Kinrade, M.B., Brodbeck, R.M., Krause, J.E., Choe, H.R., Gerard, N.P., *et al.* (2003). C5L2, a nonsignaling C5A binding protein. *Biochemistry* 42, 9406-9415.
- Okuda, T., Tokuda, N., Numata, S., Ito, M., Ohta, M., Kawamura, K., Wiels, J., Urano, T., Tajima, O., and Furukawa, K. (2006). Targeted disruption of Gb3/CD77 synthase gene resulted in the complete deletion of globo-series glycosphingolipids and loss of sensitivity to vVerotoxins. *Journal of Biological Chemistry* 281, 10230-10235.
- Olofsson, A., Hebert, H., and Thelestam, M. (1993). The projection structure of perfringolysin O (*Clostridium perfringens* theta-toxin). *FEBS Lett* 319, 125-127.
- Olson, R., Nariya, H., Yokota, K., Kamio, Y., and Gouaux, E. (1999). Crystal structure of staphylococcal LukF delineates conformational changes accompanying formation of a transmembrane channel. *Nat Struct Biol* 6, 134-140.
- Omoe, K., Hu, D.L., Ono, H.K., Shimizu, S., Takahashi-Omoe, H., Nakane, A., Uchiyama, T., Shinagawa, K., and Imanishi, K. (2013). Emetic potentials of newly identified staphylococcal enterotoxin-like toxins. *Infect Immun* 81, 3627-3631.
- Omuse, G., Shivachi, P., Kariuki, S., and Revathi, G. (2013). Prevalence of Pantone Valentine Leukocidin in Carriage and Infective Strains of *Staphylococcus aureus* at a Referral Hospital in Kenya. *Open Journal of Medical Microbiology* 3, 5-11.

- Oppermann, M. (2004). Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation. *Cell Signal* 16, 1201-1210.
- Orth, J.D., Krueger, E.W., Cao, H., and McNiven, M.A. (2002). The large GTPase dynamin regulates actin comet formation and movement in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 167-172.
- Orwin, P.M., Leung, D.Y., Tripp, T.J., Bohach, G.A., Earhart, C.A., Ohlendorf, D.H., and Schlievert, P.M. (2002). Characterization of a novel staphylococcal enterotoxin-like superantigen, a member of the group V subfamily of pyrogenic toxins. *Biochemistry* 41, 14033-14040.
- Otter, J.A., and French, G.L. (2010). Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Lancet Infect Dis* 10, 227-239.
- Otter, J.A., Kearns, A.M., French, G.L., and Ellington, M.J. (2010). Panton-Valentine leukocidin-encoding bacteriophage and gene sequence variation in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 16, 68-73.
- Otto, M. (2001). *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* peptide pheromones produced by the accessory gene regulator agr system. *Peptides* 22, 1603-1608.
- Otto, M. (2010a). Basis of virulence in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Microbiol* 64, 143-162.
- Otto, M. (2010b). *Staphylococcus* colonization of the skin and antimicrobial peptides. *Expert Rev Dermatol* 5, 183-195.
- 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.
- Park, S.H., Das, B.B., Casagrande, F., Tian, Y., Nothnagel, H.J., Chu, M., Kiefer, H., Maier, K., De Angelis, A.A., Marassi, F.M., *et al.* (2012). Structure of the chemokine receptor CXCR1 in phospholipid bilayers. *Nature* 491, 779-783.
- Parker, M.W., and Feil, S.C. (2005). Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Prog Biophys Mol Biol* 88, 91-142.
- 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.
- Parton, R.G., and del Pozo, M.A. (2013). Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 98-112.
- Parton, R.G., and Simons, K. (2007). The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 185-194.
- Patel, P.C., and Harrison, R.E. (2008). Membrane ruffles capture C3bi-opsonized particles in activated macrophages. *Mol Biol Cell* 19, 4628-4639.
- Patti, J.M., Allen, B.L., McGavin, M.J., and Hook, M. (1994). MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol* 48, 585-617.
- Payne, C.K., Jones, S.A., Chen, C., and Zhuang, X. (2007). Internalization and trafficking of cell surface proteoglycans and proteoglycan-binding ligands. *Traffic* 8, 389-401.

- Pédélecq, 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* leukocidin component (LukF-PV) reveals the fold of the water-soluble species of a family of transmembrane pore-forming toxins. *Structure* 7, 277-287.
- Pelkmans, L., Burli, T., Zerial, M., and Helenius, A. (2004). Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell* 118, 767-780.
- Pelkmans, L., and Zerial, M. (2005). Kinase-regulated quantal assemblies and kiss-and-run recycling of caveolae. *Nature* 436, 128-133.
- Pellizzari, A., Pang, H., and Lingwood, C.A. (1992). BINDING OF VEROCYTOTOXIN-1 TO ITS RECEPTOR IS INFLUENCED BY DIFFERENCES IN RECEPTOR FATTY-ACID CONTENT. *Biochemistry* 31, 1363-1370.
- Pellizzari, R., Guidi-Rontani, C., Vitale, G., Mock, M., and Montecucco, C. (1999). Anthrax lethal factor cleaves MKK3 in macrophages and inhibits the LPS/IFN γ -induced release of NO and TNF α . *FEBS Lett* 462, 199-204.
- Pernet-Gallay, K., Antony, C., Johannes, L., Bornens, M., Goud, B., and Rios, R.M. (2002). The overexpression of GMAP-210 blocks anterograde and retrograde transport between the ER and the Golgi apparatus. *Traffic* 3, 822-832.
- Perret, F., and Coleman, A.W. (2011). Biochemistry of anionic calix[n]arenes. *Chem Commun (Camb)* 47, 7303-7319.
- Perret, F., Lazar, A.N., and Coleman, A.W. (2006). Biochemistry of the para-sulfonato-calix[n]arenes. *Chem Commun (Camb)*, 2425-2438.
- Perret, M., Badiou, C., Lina, G., Burbaud, S., Benito, Y., Bes, M., Cottin, V., Couzon, F., Juruj, C., Dauwalder, O., *et al.* (2012). Cross-talk between *Staphylococcus aureus* leukocidins-intoxicated macrophages and lung epithelial cells triggers chemokine secretion in an inflammasome-dependent manner. *Cell Microbiol* 14, 1019-1036.
- Peschel, A. (2002). How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends Microbiol* 10, 179-186.
- Petty, H.R., and Todd, R.F., 3rd (1996). Integrins as promiscuous signal transduction devices. *Immunol Today* 17, 209-212.
- Pilsczek, F.H., Salina, D., Poon, K.K., Fahey, C., Yipp, B.G., Sibley, C.D., Robbins, S.M., Green, F.H., Surette, M.G., Sugai, M., *et al.* (2010). A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* 185, 7413-7425.
- Pin, J.P., Kniazeff, J., Liu, J., Binet, V., Goudet, C., Rondard, P., and Prezeau, L. (2005). Allosteric functioning of dimeric class C G-protein-coupled receptors. *FEBS J* 272, 2947-2955.
- Platta, H.W., and Stenmark, H. (2011). Endocytosis and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 23, 393-403.
- Plow, E.F., and Zhang, L. (1997). A MAC-1 attack: integrin functions directly challenged in knockout mice. *J Clin Invest* 99, 1145-1146.

- Poggi, A., Carosio, R., Rubartelli, A., and Zocchi, M.R. (2002). Beta(3)-mediated engulfment of apoptotic tumor cells by dendritic cells is dependent on CAMKII: inhibition by HIV-1 Tat. *J Leukoc Biol* 71, 531-537.
- Pollok-Kopp, B., Schwarze, K., Baradari, V.K., and Oppermann, M. (2003). Analysis of ligand-stimulated CC chemokine receptor 5 (CCR5) phosphorylation in intact cells using phosphosite-specific antibodies. *J Biol Chem* 278, 2190-2198.
- Popoff, V., Mardones, G.A., Tenza, D., Rojas, R., Lamaze, C., Bonifacino, J.S., Raposo, G., and Johannes, L. (2007). The retromer complex and clathrin define an early endosomal retrograde exit site. *Journal of Cell Science* 120, 2022-2031.
- Postma, B., Kleibeuker, W., Poppelier, M.J., Boonstra, M., Van Kessel, K.P., Van Strijp, J.A., and de Haas, C.J. (2005). Residues 10-18 within the C5a receptor N terminus compose a binding domain for chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 280, 2020-2027.
- Poteryaev, D., Datta, S., Ackema, K., Zerial, M., and Spang, A. (2010). Identification of the switch in early-to-late endosome transition. *Cell* 141, 497-508.
- Potrich, C., Bastiani, H., Colin, D.A., Huck, S., Prévost, G., and Dalla Serra, M. (2009). The influence of membrane lipids in *Staphylococcus aureus* gamma-hemolysins pore formation. *J Membr Biol* 227, 13-24.
- Powelka, A.M., Sun, J., Li, J., Gao, M., Shaw, L.M., Sonnenberg, A., and Hsu, V.W. (2004). Stimulation-dependent recycling of integrin beta1 regulated by ARF6 and Rab11. *Traffic* 5, 20-36.
- Praekelt, U., Kopp, P.M., Rehm, K., Linder, S., Bate, N., Patel, B., Debrand, E., Manso, A.M., Ross, R.S., Conti, F., *et al.* (2012). New isoform-specific monoclonal antibodies reveal different sub-cellular localisations for talin1 and talin2. *Eur J Cell Biol* 91, 180-191.
- Premont, R.T., and Gainetdinov, R.R. (2007). Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annu Rev Physiol* 69, 511-534.
- Prévost, G. (1995). Toxins in *Staphylococcus aureus* pathogenesis. In *Microbial Toxins Molecular and Cellular Biology*, T. Proft, ed. (Norfolk, England), pp. 243-284.
- 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., and Monteil, H. (2003). Staphylococcal epidermolysins. *Curr Opin Infect Dis* 16, 71-76.
- 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.
- Pust, S., Barth, H., and Sandvig, K. (2010). Clostridium botulinum C2 toxin is internalized by clathrin- and Rho-dependent mechanisms. *Cell Microbiol* 12, 1809-1820.

- Raa, H., Grimmer, S., Schwudke, D., Bergan, J., Walchli, S., Skotland, T., Shevchenko, A., and Sandvig, K. (2009). Glycosphingolipid Requirements for Endosome-to-Golgi Transport of Shiga Toxin. *Traffic* 10, 868-882.
- Rabiet, M.J., Huet, E., and Boulay, F. (2007). The N-formyl peptide receptors and the anaphylatoxin C5a receptors: an overview. *Biochimie* 89, 1089-1106.
- Radhakrishna, H., and Donaldson, J.G. (1997). ADP-ribosylation factor 6 regulates a novel plasma membrane recycling pathway. *J Cell Biol* 139, 49-61.
- Rainard, P., Corrales, J.C., Barrio, M.B., Cochard, T., and Poutrel, B. (2003). Leucotoxic activities of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows, ewes, and goats with mastitis: importance of LukM/LukF'-PV leukotoxin. *Clin Diagn Lab Immunol* 10, 272-277.
- Rainey, G.J., Wigelsworth, D.J., Ryan, P.L., Scobie, H.M., Collier, R.J., and Young, J.A. (2005). Receptor-specific requirements for anthrax toxin delivery into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13278-13283.
- Rasmussen, S.G., DeVree, B.T., Zou, Y., Kruse, A.C., Chung, K.Y., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Chae, P.S., Pardon, E., Calinski, D., *et al.* (2011). Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* 477, 549-555.
- Ratner, A.J., Hippe, K.R., Aguilar, J.L., Bender, M.H., Nelson, A.L., and Weiser, J.N. (2006). Epithelial cells are sensitive detectors of bacterial pore-forming toxins. *J Biol Chem* 281, 12994-12998.
- Reeves, C.V., Dufraine, J., Young, J.A., and Kitajewski, J. (2010). Anthrax toxin receptor 2 is expressed in murine and tumor vasculature and functions in endothelial proliferation and morphogenesis. *Oncogene* 29, 789-801.
- Regev-Yochay, G., Dagan, R., Raz, M., Carmeli, Y., Shainberg, B., Derazne, E., Rahav, G., and Rubinstein, E. (2004). Association between carriage of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in Children. *JAMA* 292, 716-720.
- Reisbig, R., Olsnes, S., and Eiklid, K. (1981). THE CYTO-TOXIC ACTIVITY OF SHIGELLA TOXIN - EVIDENCE FOR CATALYTIC INACTIVATION OF THE 60-S-RIBOSOMAL SUBUNIT. *Journal of Biological Chemistry* 256, 8739-8744.
- Reutershan, J., Morris, M.A., Burcin, T.L., Smith, D.F., Chang, D., Saprito, M.S., and Ley, K. (2006). Critical role of endothelial CXCR2 in LPS-induced neutrophil migration into the lung. *J Clin Invest* 116, 695-702.
- Reyes-Robles, T., Alonzo, F., 3rd, Kozhaya, L., Lacy, D.B., Unutmaz, D., and Torres, V.J. (2013). *Staphylococcus aureus* Leukotoxin ED Targets the Chemokine Receptors CXCR1 and CXCR2 to Kill Leukocytes and Promote Infection. *Cell Host Microbe* 14, 453-459.
- Richardson, R.M., Marjoram, R.J., Barak, L.S., and Snyderman, R. (2003). Role of the cytoplasmic tails of CXCR1 and CXCR2 in mediating leukocyte migration, activation, and regulation. *J Immunol* 170, 2904-2911.
- Richardson, R.M., Pridgen, B.C., Haribabu, B., Ali, H., and Snyderman, R. (1998). Differential cross-regulation of the human chemokine receptors CXCR1 and CXCR2. Evidence for time-dependent signal generation. *J Biol Chem* 273, 23830-23836.

- Richter, T., Floetenmeyer, M., Ferguson, C., Galea, J., Goh, J., Lindsay, M.R., Morgan, G.P., Marsh, B.J., and Parton, R.G. (2008). High-resolution 3D quantitative analysis of caveolar ultrastructure and caveola-cytoskeleton interactions. *Traffic* 9, 893-909.
- Ridley, A.J., and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70, 389-399.
- Riegel, P., Jesel-Morel, L., Laventie, B., Boisset, S., Vandenesch, F., and Prevost, G. (2011). Coagulase-positive *Staphylococcus pseudintermedius* from animals causing human endocarditis. *Int J Med Microbiol* 301, 237-239.
- Riento, K., Frick, M., Schafer, I., and Nichols, B.J. (2009). Endocytosis of flotillin-1 and flotillin-2 is regulated by Fyn kinase. *J Cell Sci* 122, 912-918.
- Ritter, S.L., and Hall, R.A. (2009). Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 819-830.
- Rittirsch, D., Flierl, M.A., Nadeau, B.A., Day, D.E., Huber-Lang, M., Mackay, C.R., Zetoune, F.S., Gerard, N.P., Cianflone, K., Kohl, J., *et al.* (2008). Functional roles for C5a receptors in sepsis. *Nat Med* 14, 551-557.
- Robinson, F.L., and Dixon, J.E. (2006). Myotubularin phosphatases: policing 3-phosphoinositides. *Trends Cell Biol* 16, 403-412.
- Roche, F.M., Massey, R., Peacock, S.J., Day, N.P., Visai, L., Speziale, P., Lam, A., Pallen, M., and Foster, T.J. (2003a). Characterization of novel LPXTG-containing proteins of *Staphylococcus aureus* identified from genome sequences. *Microbiology* 149, 643-654.
- Roche, M., Humphreys, H., Smyth, E., Phillips, J., Cunney, R., McNamara, E., O'Brien, D., and McArdle, O. (2003b). A twelve-year review of central nervous system bacterial abscesses; presentation and aetiology. *Clin Microbiol Infect* 9, 803-809.
- Rogolsky, M. (1979). Nonenteric toxins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Rev* 43, 320-360.
- Rooijakkers, S.H., Ruyken, M., Roos, A., Daha, M.R., Presanis, J.S., Sim, R.B., van Wamel, W.J., van Kessel, K.P., and van Strijp, J.A. (2005a). Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. *Nat Immunol* 6, 920-927.
- Rooijakkers, S.H., van Kessel, K.P., and van Strijp, J.A. (2005b). Staphylococcal innate immune evasion. *Trends Microbiol* 13, 596-601.
- Rooijakkers, S.H., and van Strijp, J.A. (2007). Bacterial complement evasion. *Mol Immunol* 44, 23-32.
- Rooijakkers, S.H., van Wamel, W.J., Ruyken, M., van Kessel, K.P., and van Strijp, J.A. (2005c). Anti-opsonic properties of staphylokinase. *Microbes Infect* 7, 476-484.
- Roos, D., van Bruggen, R., and Meischl, C. (2003). Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes Infect* 5, 1307-1315.
- Roos, J., DiGregorio, P.J., Yeromin, A.V., Ohlsen, K., Liudyno, M., Zhang, S., Safrina, O., Kozak, J.A., Wagner, S.L., Cahalan, M.D., *et al.* (2005). STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *J Cell Biol* 169, 435-445.

- Ross, G.D. (2000). Regulation of the adhesion versus cytotoxic functions of the Mac-1/CR3/ α M β 2-integrin glycoprotein. *Crit Rev Immunol* 20, 197-222.
- Rossi, D., and Zlotnik, A. (2000). The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 18, 217-242.
- Ruimy, R., Angebault, C., Djossou, F., Dupont, C., Epelboin, L., Jarraud, S., Lefevre, L.A., Bes, M., Lixandru, B.E., Bertine, M., *et al.* (2010). Are host genetics the predominant determinant of persistent nasal *Staphylococcus aureus* carriage in humans? *J Infect Dis* 202, 924-934.
- Sabroe, I., Prince, L.R., Dower, S.K., Walmsley, S.R., Chilvers, E.R., and Whyte, M.K. (2004). What can we learn from highly purified neutrophils? *Biochem Soc Trans* 32, 468-469.
- Saftig, P., and Reiss, K. (2010). The "A Disintegrin And Metalloproteases" ADAM10 and ADAM17: novel drug targets with therapeutic potential? *Eur J Cell Biol* 90, 527-535.
- Sahu, A., and Lambris, J.D. (2001). Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity. *Immunol Rev* 180, 35-48.
- Samaj, J., Baluska, F., Voigt, B., Schlicht, M., Volkmann, D., and Menzel, D. (2004). Endocytosis, actin cytoskeleton, and signaling. *Plant Physiol* 135, 1150-1161.
- Sanderson, M.P., Erickson, S.N., Gough, P.J., Garton, K.J., Wille, P.T., Raines, E.W., Dunbar, A.J., and Dempsey, P.J. (2005). ADAM10 mediates ectodomain shedding of the betacellulin precursor activated by p-aminophenylmercuric acetate and extracellular calcium influx. *J Biol Chem* 280, 1826-1837.
- Sandvig, K., Bergan, J., Dyve, A.-B., Skotland, T., and Torgersen, M.L. (2010a). Endocytosis and retrograde transport of Shiga toxin. *Toxicon* 56, 1181-1185.
- Sandvig, K., Garred, O., Prydz, K., Kozlov, J.V., Hansen, S.H., and Vandeurs, B. (1992). RETROGRADE TRANSPORT OF ENDOCYTOSED SHIGA TOXIN TO THE ENDOPLASMIC-RETICULUM. *Nature* 358, 510-512.
- Sandvig, K., Garred, O., vanHelvoort, A., vanMeer, G., and vanDeurs, B. (1996). Importance of glycolipid synthesis for butyric acid-induced sensitization to shiga toxin and intracellular sorting of toxin in A431 cells. *Molecular Biology of the Cell* 7, 1391-1404.
- Sandvig, K., Olsnes, S., Brown, J.E., Petersen, O.W., and Vandeurs, B. (1989). ENDOCYTOSIS FROM COATED PITS OF SHIGA TOXIN - A GLYCOLIPID-BINDING PROTEIN FROM SHIGELLA-DYSENTERIAE 1. *Journal of Cell Biology* 108, 1331-1343.
- Sandvig, K., Prydz, K., Ryd, M., and Vandeurs, B. (1991). ENDOCYTOSIS AND INTRACELLULAR-TRANSPORT OF THE GLYCOLIPID-BINDING LIGAND SHIGA TOXIN IN POLARIZED MDCK CELLS. *Journal of Cell Biology* 113, 553-562.
- Sandvig, K., Pust, S., Skotland, T., and van Deurs, B. (2011). Clathrin-independent endocytosis: mechanisms and function. *Curr Opin Cell Biol* 23, 413-420.
- Sandvig, K., Ryd, M., Garred, O., Schweda, E., Holm, P.K., and Vandeurs, B. (1994). RETROGRADE TRANSPORT FROM THE GOLGI-COMPLEX TO THE ER OF BOTH SHIGA TOXIN AND THE NONTXIC SHIGA B-FRAGMENT IS REGULATED BY BUTYRIC-ACID AND CAMP. *Journal of Cell Biology* 126, 53-64.

- Sandvig, K., Torgersen, M.L., Engedal, N., Skotland, T., and Iversen, T.-G. (2010b). Protein toxins from plants and bacteria: Probes for intracellular transport and tools in medicine. *Febs Letters* **584**, 2626-2634.
- Sandvig, K., Torgersen, M.L., Raa, H.A., and van Deurs, B. (2008). Clathrin-independent endocytosis: from nonexistent to an extreme degree of complexity. *Histochem Cell Biol* **129**, 267-276.
- Schaberg, D.R., and Zervos, M.J. (1986). Intergeneric and interspecies gene exchange in gram-positive cocci. *Antimicrob Agents Chemother* **30**, 817-822.
- Schauber, J., and Gallo, R.L. (2009). Antimicrobial peptides and the skin immune defense system. *J Allergy Clin Immunol* **124**, R13-18.
- Schlievert, P.M. (1986). Staphylococcal enterotoxin B and toxic-shock syndrome toxin-1 are significantly associated with non-menstrual TSS. *Lancet* **1**, 1149-1150.
- Schlormann, W., Steiniger, F., Richter, W., Kaufmann, R., Hause, G., Lemke, C., and Westermann, M. (2010). The shape of caveolae is omega-like after glutaraldehyde fixation and cup-like after cryofixation. *Histochem Cell Biol* **133**, 223-228.
- Schmid, E.M., and McMahon, H.T. (2007). Integrating molecular and network biology to decode endocytosis. *Nature* **448**, 883-888.
- Schmidt, S., Nakchbandi, I., Ruppert, R., Kawelke, N., Hess, M.W., Pfaller, K., Jurdic, P., Fassler, R., and Moser, M. (2011). Kindlin-3-mediated signaling from multiple integrin classes is required for osteoclast-mediated bone resorption. *J Cell Biol* **192**, 883-897.
- Scholl, P., Diez, A., Mourad, W., Parsonnet, J., Geha, R.S., and Chatila, T. (1989). Toxic shock syndrome toxin 1 binds to major histocompatibility complex class II molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 4210-4214.
- Schoneberg, T., Schultz, G., and Gudermann, T. (1999). Structural basis of G protein-coupled receptor function. *Mol Cell Endocrinol* **151**, 181-193.
- Scobie, H.M., Rainey, G.J., Bradley, K.A., and Young, J.A. (2003). Human capillary morphogenesis protein 2 functions as an anthrax toxin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5170-5174.
- Scobie, H.M., and Young, J.A. (2005). Interactions between anthrax toxin receptors and protective antigen. *Curr Opin Microbiol* **8**, 106-112.
- Scola, A.M., Higginbottom, A., Partridge, L.J., Reid, R.C., Woodruff, T., Taylor, S.M., Fairlie, D.P., and Monk, P.N. (2007). The role of the N-terminal domain of the complement fragment receptor C5L2 in ligand binding. *J Biol Chem* **282**, 3664-3671.
- Scola, A.M., Johswich, K.O., Morgan, B.P., Klos, A., and Monk, P.N. (2009). The human complement fragment receptor, C5L2, is a recycling decoy receptor. *Mol Immunol* **46**, 1149-1162.
- Scott, M.G., Benmerah, A., Muntaner, O., and Marullo, S. (2002). Recruitment of activated G protein-coupled receptors to pre-existing clathrin-coated pits in living cells. *J Biol Chem* **277**, 3552-3559.
- Seals, D.F., and Courtneidge, S.A. (2003). The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev* **17**, 7-30.

Segal, A.W. (2005). How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* 23, 197-223.

Seidah, N.G., Donohue-Rolfe, A., Lazure, C., Auclair, F., Keusch, G.T., and Chretien, M. (1986). COMPLETE AMINO-ACID-SEQUENCE OF SHIGELLA TOXIN B-CHAIN - A NOVEL POLYPEPTIDE CONTAINING 69 AMINO-ACIDS AND ONE DISULFIDE BRIDGE. *Journal of Biological Chemistry* 261, 13928-13931.

Sekiya, K., Satoh, R., Danbara, H., and Futaesaku, Y. (1993). A ring-shaped structure with a crown formed by streptolysin O on the erythrocyte membrane. *J Bacteriol* 175, 5953-5961.

Sengelov, H., Voldstedlund, M., Vinten, J., and Borregaard, N. (1998). Human neutrophils are devoid of the integral membrane protein caveolin. *J Leukoc Biol* 63, 563-566.

Senju, Y., Itoh, Y., Takano, K., Hamada, S., and Suetsugu, S. (2011). Essential role of PACSIN2/syndapin-II in caveolae membrane sculpting. *J Cell Sci* 124, 2032-2040.

Shallcross, L.J., Fragaszy, E., Johnson, A.M., and Hayward, A.C. (2013). The role of the Pantone-Valentine leukocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 13, 43-54.

Shallcross, L.J., Williams, K., Hopkins, S., Aldridge, R.W., Johnson, A.M., and Hayward, A.C. (2010). Pantone-Valentine leukocidin associated staphylococcal disease: a cross-sectional study at a London hospital, England. *Clin Microbiol Infect* 16, 1644-1648.

Sharma-Kuinkel, B.K., Ahn, S.H., Rude, T.H., Zhang, Y., Tong, S.Y., Ruffin, F., Genter, F.C., Braughton, K.R., Deleo, F.R., Barriere, S.L., *et al.* (2012). Presence of genes encoding pantone-valentine leukocidin is not the primary determinant of outcome in patients with hospital-acquired pneumonia due to *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 50, 848-856.

Sharma, M., Naslavsky, N., and Caplan, S. (2008). A role for EHD4 in the regulation of early endosomal transport. *Traffic* 9, 995-1018.

Sharman, J.L., Mpamhanga, C.P., Spedding, M., Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Laudet, V., and Harmar, A.J. (2011). IUPHAR-DB: new receptors and tools for easy searching and visualization of pharmacological data. *Nucleic Acids Res* 39, D534-538.

Sharp, J.A., Echague, C.G., Hair, P.S., Ward, M.D., Nyalwidhe, J.O., Geoghegan, J.A., Foster, T.J., and Cunliffe, K.M. (2012). *Staphylococcus aureus* surface protein SdrE binds complement regulator factor H as an immune evasion tactic. *PLoS One* 7, e38407.

Sharples, R.A., Vella, L.J., Nisbet, R.M., Naylor, R., Perez, K., Barnham, K.J., Masters, C.L., and Hill, A.F. (2008). Inhibition of gamma-secretase causes increased secretion of amyloid precursor protein C-terminal fragments in association with exosomes. *FASEB J* 22, 1469-1478.

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

Shi, C., Zhang, X., Chen, Z., Sulaiman, K., Feinberg, M.W., Ballantyne, C.M., Jain, M.K., and Simon, D.I. (2004). Integrin engagement regulates monocyte differentiation through the forkhead transcription factor Foxp1. *J Clin Invest* 114, 408-418.

- Shinkai, S., Mori, S., Koreishi, H., Tsubaki, T., and Manabe, O. (1986). Hexasulfonated calix[6]arene derivatives: a new class of catalysts, surfactants, and host molecules. *J Am Chem Soc* *108*, 2409-2416.
- Siciliano, S.J., Rollins, T.E., DeMartino, J., Konteatis, Z., Malkowitz, L., Van Riper, G., Bondy, S., Rosen, H., and Springer, M.S. (1994). Two-site binding of C5a by its receptor: an alternative binding paradigm for G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 1214-1218.
- Sifri, C.D., Park, J., Helm, G.A., Stemper, M.E., and Shukla, S.K. (2007). Fatal brain abscess due to community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300. *Clin Infect Dis* *45*, e113-117.
- Signoret, N., Rosenkilde, M.M., Klasse, P.J., Schwartz, T.W., Malim, M.H., Hoxie, J.A., and Marsh, M. (1998). Differential regulation of CXCR4 and CCR5 endocytosis. *J Cell Sci* *111* (Pt 18), 2819-2830.
- Simon, D.I. (2011). Opening the field of integrin biology to "biased agonism". *Circ Res* *109*, 1199-1201.
- Singh, A.K., Venglarik, C.J., and Bridges, R.J. (1995). Development of chloride channel modulators. *Kidney Int* *48*, 985-993.
- Siqueira, J.A., Speeg-Schatz, C., Freitas, F.I., Sahel, J., Monteil, H., and Prevost, G. (1997). Channel-forming leucotoxins from *Staphylococcus aureus* cause severe inflammatory reactions in a rabbit eye model. *J Med Microbiol* *46*, 486-494.
- Sivertsen, B., Holliday, N., Madsen, A.N., and Holst, B. (2013). Functionally biased signalling properties of 7TM receptors - opportunities for drug development for the ghrelin receptor. *Br J Pharmacol* *170*, 1349-1362.
- Siwicki, A.K., Bownick, A., Prévost, G., Szmigielski, S., Malaczewska, J., and Mikulska-Skupien, E. (2003). IN VITRO EFFECT OF STAPHYLOCOCCAL LEUKOCIDINS (LUKE, LUKD) ON THE PROLIFERATIVE RESPONSES OF BLOOD LYMPHOCYTES IN DOG (CANIS FAMILIARIS). In BULLETIN OF THE VETERINARY INSTITUTE IN PULAWY, J. Roszkowski, ed. (PULAWY), pp. 395-401.
- Skovronsky, D.M., Moore, D.B., Milla, M.E., Doms, R.W., and Lee, V.M. (2000). Protein kinase C-dependent alpha-secretase competes with beta-secretase for cleavage of amyloid-beta precursor protein in the trans-golgi network. *J Biol Chem* *275*, 2568-2575.
- Slagsvold, T., Pattni, K., Malerod, L., and Stenmark, H. (2006). Endosomal and non-endosomal functions of ESCRT proteins. *Trends Cell Biol* *16*, 317-326.
- Smith-Garvin, J.E., Koretzky, G.A., and Jordan, M.S. (2009). T cell activation. *Annu Rev Immunol* *27*, 591-619.
- Smith, D.C., Sillence, D.J., Falguieres, T., Jarvis, R.M., Johannes, L., Lord, J.M., Platt, F.M., and Roberts, L.M. (2006). The association of Shiga-like toxin with detergent-resistant membranes is modulated by glucosylceramide and is an essential requirement in the endoplasmic reticulum for a cytotoxic effect. *Molecular Biology of the Cell* *17*, 1375-1387.
- Smith, H., and Stanley, J.L. (1962). Purification of the third factor of anthrax toxin. *J Gen Microbiol* *29*, 517-521.
- Soboloff, J., Rothberg, B.S., Madesh, M., and Gill, D.L. (2012). STIM proteins: dynamic calcium signal transducers. *Nat Rev Mol Cell Biol* *13*, 549-565.

- Somand, D., and Meurer, W. (2009). Central nervous system infections. *Emerg Med Clin North Am* 27, 89-100, ix.
- 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.
- Sonnichsen, B., De Renzis, S., Nielsen, E., Rietdorf, J., and Zerial, M. (2000). Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J Cell Biol* 149, 901-914.
- Spaan, A.N., Henry, T., van Rooijen, W.J., Perret, M., Badiou, C., Aerts, P.C., Kemmink, J., de Haas, C.J., van Kessel, K.P., Vandenesch, F., *et al.* (2013). The staphylococcal toxin panton-valentine leukocidin targets human c5a receptors. *Cell Host Microbe* 13, 584-594.
- Speziale, P., Pietrocola, G., Rindi, S., Provenzano, M., Provenza, G., Di Poto, A., Visai, L., and Arciola, C.R. (2009). Structural and functional role of *Staphylococcus aureus* surface components recognizing adhesive matrix molecules of the host. *Future Microbiol* 4, 1337-1352.
- Springer, T.A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76, 301-314.
- 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.
- Stagg, S.M., LaPointe, P., and Balch, W.E. (2007). Structural design of cage and coat scaffolds that direct membrane traffic. *Curr Opin Struct Biol* 17, 221-228.
- Stahel, P.F., Frei, K., Eugster, H.P., Fontana, A., Hummel, K.M., Wetsel, R.A., Ames, R.S., and Barnum, S.R. (1997). TNF-alpha-mediated expression of the receptor for anaphylatoxin C5a on neurons in experimental *Listeria* meningoencephalitis. *J Immunol* 159, 861-869.
- Stahlhut, M., and van Deurs, B. (2000). Identification of filamin as a novel ligand for caveolin-1: evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* 11, 325-337.
- Stanley, J.L., Sargeant, K., and Smith, H. (1960). Purification of factors I and II of the anthrax toxin produced in vivo. *J Gen Microbiol* 22, 206-218.
- Stassen, M., Muller, C., Richter, C., Neudorfl, C., Hultner, L., Bhakdi, S., Walev, I., and Schmitt, E. (2003). The streptococcal exotoxin streptolysin O activates mast cells to produce tumor necrosis factor alpha by p38 mitogen-activated protein kinase- and protein kinase C-dependent pathways. *Infect Immun* 71, 6171-6177.
- Stehno-Bittel, L., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Perez-Terzic, C., and Clapham, D.E. (1995a). The G protein beta gamma subunit transduces the muscarinic receptor signal for Ca²⁺ release in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 270, 30068-30074.
- Stehno-Bittel, L., Perez-Terzic, C., and Clapham, D.E. (1995b). Diffusion across the nuclear envelope inhibited by depletion of the nuclear Ca²⁺ store. *Science* 270, 1835-1838.
- Stein, P.E., Boodhoo, A., Tyrrell, G.J., Brunton, J.L., and Read, R.J. (1992). CRYSTAL-STRUCTURE OF THE CELL-BINDING B-OLIGOMER OF VEROTOXIN-1 FROM *ESCHERICHIA-COLI*. *Nature* 355, 748-750.

- Stewart, P.S., and Costerton, J.W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358, 135-138.
- Stoeber, M., Stoeck, I.K., Hanni, C., Bleck, C.K., Balistreri, G., and Helenius, A. (2012). Oligomers of the ATPase EHD2 confine caveolae to the plasma membrane through association with actin. *EMBO J* 31, 2350-2364.
- Stoeck, A., Keller, S., Riedle, S., Sanderson, M.P., Runz, S., Le Naour, F., Gutwein, P., Ludwig, A., Rubinstein, E., and Altevogt, P. (2006). A role for exosomes in the constitutive and stimulus-induced ectodomain cleavage of L1 and CD44. *Biochem J* 393, 609-618.
- Stoyanov, B., Volinia, S., Hanck, T., Rubio, I., Loubtchenkov, M., Malek, D., Stoyanova, S., Vanhaesebroeck, B., Dhand, R., Nurnberg, B., *et al.* (1995). Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. *Science* 269, 690-693.
- Streilein, J.W. (2003). Ocular immune privilege: therapeutic opportunities from an experiment of nature. *Nat Rev Immunol* 3, 879-889.
- Strockbine, N.A., Jackson, M.P., Sung, L.M., Holmes, R.K., and O'Brien, A.D. (1988). CLONING AND SEQUENCING OF THE GENES FOR SHIGA TOXIN FROM *SHIGELLA-DYSENTERIAE* TYPE-1. *Journal of Bacteriology* 170, 1116-1122.
- Strockbine, N.A., Marques, L.R.M., Newland, J.W., Smith, H.W., Holmes, R.K., and O'Brien, A.D. (1986). 2 TOXIN-CONVERTING PHAGES FROM *ESCHERICHIA-COLI* O157-H7 STRAIN-933 ENCODE ANTIGENICALLY DISTINCT TOXINS WITH SIMILAR BIOLOGIC ACTIVITIES. *Infection and Immunity* 53, 135-140.
- Sugai, M., Hashimoto, K., Kikuchi, A., Inoue, S., Okumura, H., Matsumoto, K., Goto, Y., Ohgai, H., Moriishi, K., Syuto, B., *et al.* (1992). Epidermal cell differentiation inhibitor ADP-ribosylates small GTP-binding proteins and induces hyperplasia of epidermis. *J Biol Chem* 267, 2600-2604.
- 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., Sato, T., and Kamio, Y. (1999). Assembly of *Staphylococcus aureus* leukocidin into a pore-forming ring-shaped oligomer on human polymorphonuclear leukocytes and rabbit erythrocytes. *Biosci Biotechnol Biochem* 63, 884-891.
- Sundstrom, C., and Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer* 17, 565-577.
- Supersac, G., 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.
- 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.
- Suvorova, E.S., Gripentrog, J.M., and Miettinen, H.M. (2005). Different endocytosis pathways of the C5a receptor and the N-formyl peptide receptor. *Traffic* 6, 100-115.

- Svensson, L., Howarth, K., McDowall, A., Patzak, I., Evans, R., Ussar, S., Moser, M., Metin, A., Fried, M., Tomlinson, I., *et al.* (2009). Leukocyte adhesion deficiency-III is caused by mutations in KINDLIN3 affecting integrin activation. *Nat Med* 15, 306-312.
- Swaminath, G., Deupi, X., Lee, T.W., Zhu, W., Thian, F.S., Kobilka, T.S., and Kobilka, B. (2005). Probing the beta2 adrenoceptor binding site with catechol reveals differences in binding and activation by agonists and partial agonists. *J Biol Chem* 280, 22165-22171.
- 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 Bakteriell* 288, 383-394.
- Tadokoro, S., Shattil, S.J., Eto, K., Tai, V., Liddington, R.C., de Pereda, J.M., Ginsberg, M.H., and Calderwood, D.A. (2003). Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science* 302, 103-106.
- Taglietti, F., Campanile, F., Capone, A., Di Caro, A., Grilli, E., Stazi, G., Bertuccio, T., Petrosillo, N., and Stefani, S. (2012). Daptomycin efficacy in the central nervous system of a patient with disseminated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection: a case report. *J Med Case Rep* 6, 264.
- Tai, G.H., Lu, L., Wang, T.L., Tang, B.L., Goud, B., Johannes, L., and Hong, W.J. (2004). Participation of the syntaxin 5/Ykt6/GS28/GS15 SNARE complex in transport from the early/recycling endosome to the trans-Golgi network. *Molecular Biology of the Cell* 15, 4011-4022.
- Takeda, S. (2009). Three-dimensional domain architecture of the ADAM family proteinases. *Semin Cell Dev Biol* 20, 146-152.
- Takenouchi, H., Kiyokawa, N., Taguchi, T., Matsui, J., Katagiri, Y.U., Okita, H., Okuda, K., and Fujimoto, J. (2004). Shiga toxin binding to globotriaosyl ceramide induces intracellular signals that mediate cytoskeleton remodeling in human renal carcinoma-derived cells. *Journal of Cell Science* 117, 3911-3922.
- Tam, P.J., and Lingwood, C.A. (2007). Membrane-cytosolic translocation of verotoxin A(1) subunit in target cells. *Microbiology-Sgm* 153, 2700-2710.
- Tan, Q., Zhu, Y., Li, J., Chen, Z., Han, G.W., Kufareva, I., Li, T., Ma, L., Fenalti, G., Zhang, W., *et al.* (2013). Structure of the CCR5 chemokine receptor-HIV entry inhibitor maraviroc complex. *Science* 341, 1387-1390.
- Tan, Z.L., Nagaraja, T.G., and Chengappa, M.M. (1996). *Fusobacterium necrophorum* infections: virulence factors, pathogenic mechanism and control measures. *Vet Res Commun* 20, 113-140.
- Tao, L., Zhang, Y., Xi, X., and Kieffer, N. (2010). Recent advances in the understanding of the molecular mechanisms regulating platelet integrin alphaIIb beta3 activation. *Protein Cell* 1, 627-637.
- Tesh, V.L. (2010). Induction of apoptosis by Shiga toxins. *Future Microbiology* 5, 431-453.
- Thoendel, M., Kavanaugh, J.S., Flack, C.E., and Horswill, A.R. (2011). Peptide signaling in the staphylococci. *Chem Rev* 111, 117-151.
- Thompson, M.R., Steinberg, M.S., Gemski, P., Formal, S.B., and Doctor, B.P. (1976). INHIBITION OF INVITRO PROTEIN-SYNTHESIS BY *SHIGELLA-DYSENTERIAE*-1 TOXIN. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 71, 783-788.

- Tian-Ming, Y., Zhi-Feng, Y., Li, W., Jin-Ying, G., Si-De, Y., and Xian-Fa, S. (2002). Supramolecular interaction between water-soluble calix[4]arene and ATP--the catalysis of calix[4]arene for hydrolysis of ATP. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 58, 3033-3038.
- Tippmann, F., Hundt, J., Schneider, A., Endres, K., and Fahrenholz, F. (2009). Up-regulation of the alpha-secretase ADAM10 by retinoic acid receptors and acitretin. *FASEB J* 23, 1643-1654.
- Todd, R.F., 3rd, and Petty, H.R. (1997). Beta 2 (CD11/CD18) integrins can serve as signaling partners for other leukocyte receptors. *J Lab Clin Med* 129, 492-498.
- Tomassian, T., Humphries, L.A., Liu, S.D., Silva, O., Brooks, D.G., and Miceli, M.C. (2011). Caveolin-1 orchestrates TCR synaptic polarity, signal specificity, and function in CD8 T cells. *J Immunol* 187, 2993-3002.
- Tong, S.Y., Lilliebridge, R.A., Bishop, E.J., Cheng, A.C., Holt, D.C., McDonald, M.I., Giffard, P.M., Currie, B.J., and Boutlis, C.S. (2010). Clinical correlates of Panton-Valentine leukocidin (PVL), PVL isoforms, and clonal complex in the *Staphylococcus aureus* population of Northern Australia. *J Infect Dis* 202, 760-769.
- Torgersen, M.L., Engedal, N., Pedersen, A.-M.G., Husebye, H., Espevik, T., and Sandvig, K. (2011). Toll-like receptor 4 facilitates binding of Shiga toxin to colon carcinoma and primary umbilical vein endothelial cells. *Fems Immunology and Medical Microbiology* 61, 63-75.
- Torgersen, M.L., Walchli, S., Grimmer, S., Skanland, S.S., and Sandvig, K. (2007). Protein kinase C delta is activated by Shiga toxin and regulates its transport. *Journal of Biological Chemistry* 282, 16317-16328.
- Torrecilla, I., and Tobin, A.B. (2006). Co-ordinated covalent modification of G-protein coupled receptors. *Curr Pharm Des* 12, 1797-1808.
- Tousseyn, T., Thathiah, A., Jorissen, E., Raemaekers, T., Konietzko, U., Reiss, K., Maes, E., Snellinx, A., Serneels, L., Nyabi, O., *et al.* (2009). ADAM10, the rate-limiting protease of regulated intramembrane proteolysis of Notch and other proteins, is processed by ADAMS-9, ADAMS-15, and the gamma-secretase. *J Biol Chem* 284, 11738-11747.
- Tsai, W.C., Strieter, R.M., Mehrad, B., Newstead, M.W., Zeng, X., and Standiford, T.J. (2000). CXC chemokine receptor CXCR2 is essential for protective innate host response in murine *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Infect Immun* 68, 4289-4296.
- Tseng, C.W., Kyme, P., Low, J., Rocha, M.A., Alsabeh, R., Miller, L.G., Otto, M., Arditi, M., Diep, B.A., Nizet, V., *et al.* (2009). *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin contributes to inflammation and muscle tissue injury. *PLoS One* 4, e6387.
- Tsou, L.K., Dutschman, G.E., Gullen, E.A., Telpoukhovskaia, M., Cheng, Y.C., and Hamilton, A.D. (2010). Discovery of a synthetic dual inhibitor of HIV and HCV infection based on a tetrabutoxycalix[4]arene scaffold. *Bioorg Med Chem Lett* 20, 2137-2139.
- Tulapurkar, M.E., Zundorf, G., and Reiser, G. (2006). Internalization and desensitization of a green fluorescent protein-tagged P2Y nucleotide receptor are differently controlled by inhibition of calmodulin-dependent protein kinase II. *J Neurochem* 96, 624-634.

- Tweten, R.K., Parker, M.W., and Johnson, A.E. (2001). The cholesterol-dependent cytolysins. *Curr Top Microbiol Immunol* 257, 15-33.
- Tzircotis, G., Braga, V.M., and Caron, E. (2011). RhoG is required for both FcγR- and CR3-mediated phagocytosis. *J Cell Sci* 124, 2897-2902.
- Ulloa-Aguirre, A., Crepieux, P., Poupon, A., Maurel, M.C., and Reiter, E. (2011). Novel pathways in gonadotropin receptor signaling and biased agonism. *Rev Endocr Metab Disord* 12, 259-274.
- Valderrama, F., Duran, J.M., Babia, T., Barth, H., Renau-Piqueras, J., and Egea, G. (2001). Actin microfilaments facilitate the retrograde transport from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum in mammalian cells. *Traffic* 2, 717-726.
- Valeva, A., Hellmann, N., Walev, I., Strand, D., Plate, M., Boukhallouk, F., Brack, A., Hanada, K., Decker, H., and Bhakdi, S. (2006). Evidence that clustered phosphocholine head groups serve as sites for binding and assembly of an oligomeric protein pore. *J Biol Chem* 281, 26014-26021.
- 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.
- van Belkum, A., Melles, D.C., Nouwen, J., van Leeuwen, W.B., van Wamel, W., Vos, M.C., Wertheim, H.F., and Verbrugh, H.A. (2009a). Co-evolutionary aspects of human colonisation and infection by *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol* 9, 32-47.
- van Belkum, A., Verkaik, N.J., de Vogel, C.P., Boelens, H.A., Verveer, J., Nouwen, J.L., Verbrugh, H.A., and Wertheim, H.F. (2009b). Reclassification of *Staphylococcus aureus* nasal carriage types. *J Infect Dis* 199, 1820-1826.
- van der Sluijs, P., Hull, M., Webster, P., Male, P., Goud, B., and Mellman, I. (1992). The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell* 70, 729-740.
- Vandenesch, F., Couzon, F., Boisset, S., Benito, Y., Brown, E.L., Lina, G., Etienne, J., and Bowden, M.G. (2010). The Panton-Valentine leukocidin is a virulence factor in a murine model of necrotizing pneumonia. *J Infect Dis* 201, 967-969; author reply 969-970.
- Vandenesch, F., Lina, G., and Henry, T. (2012). *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? *Front Cell Infect Microbiol* 2, 12.
- Vandenesch, F., Naimi, T., Enright, M.C., Lina, G., Nimmo, G.R., Heffernan, H., Liassine, N., Bes, M., Greenland, T., Reverdy, M.E., *et al.* (2003). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis* 9, 978-984.
- Vecsey-Semjen, 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.

- Veklich, T.O., Kosterin, S.O., Rodik, R.V., Cherenok, S.O., Boiko, V.I., and Kal'chenko, V.I. (2006). [Effect of calixarene-phosphonic acid on Na⁺, K⁺-ATPase activity in plasma membranes of the smooth-muscle cells]. *Ukr Biokhim Zh* 78, 70-86.
- Veldkamp, K.E., Heezius, H.C., Verhoef, J., van Strijp, J.A., and van Kessel, K.P. (2000). Modulation of neutrophil chemokine receptors by *Staphylococcus aureus* supernate. *Infect Immun* 68, 5908-5913.
- Venkatakrishnan, A.J., Deupi, X., Lebon, G., Tate, C.G., Schertler, G.F., and Babu, M.M. (2013). Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature* 494, 185-194.
- Ventura, C.L., Malachowa, N., Hammer, C.H., Nardone, G.A., Robinson, M.A., Kobayashi, S.D., and DeLeo, F.R. (2010). Identification of a novel *Staphylococcus aureus* two-component leukotoxin using cell surface proteomics. *PLoS One* 5, e11634.
- Verdon, J., Girardin, N., Lacombe, C., Berjeaud, J.M., and Hechard, Y. (2009). delta-hemolysin, an update on a membrane-interacting peptide. *Peptides* 30, 817-823.
- Viero, G., Cunaccia, R., Prévost, G., Werner, S., Monteil, H., Keller, D., Joubert, O., Menestrina, G., and Dalla Serra, M. (2006). Homologous versus heterologous interactions in the bicomponent staphylococcal gamma-haemolysin pore. *Biochem J* 394, 217-225.
- Villardaga, J.P., Gardella, T.J., Wehbi, V.L., and Feinstein, T.N. (2012). Non-canonical signaling of the PTH receptor. *Trends Pharmacol Sci* 33, 423-431.
- Vinten, J., Johnsen, A.H., Roepstorff, P., Harpoth, J., and Trandum-Jensen, J. (2005). Identification of a major protein on the cytosolic face of caveolae. *Biochim Biophys Acta* 1717, 34-40.
- Violin, J.D., and Lefkowitz, R.J. (2007). Beta-arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci* 28, 416-422.
- Vitale, G., Bernardi, L., Napolitani, G., Mock, M., and Montecucco, C. (2000). Susceptibility of mitogen-activated protein kinase kinase family members to proteolysis by anthrax lethal factor. *Biochem J* 352 Pt 3, 739-745.
- Vlahos, C.J., Matter, W.F., Hui, K.Y., and Brown, R.F. (1994). A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 269, 5241-5248.
- von Zastrow, M. (2003). Mechanisms regulating membrane trafficking of G protein-coupled receptors in the endocytic pathway. *Life Sci* 74, 217-224.
- Vovk, A.I., Kalchenko, V.I., Cherenok, S.A., Kukhar, V.P., Muzychka, O.V., and Lozynsky, M.O. (2004). Calix[4]arene methylenebisphosphonic acids as calf intestine alkaline phosphatase inhibitors. *Org Biomol Chem* 2, 3162-3166.
- Vuong, C., Saenz, H.L., Gotz, F., and Otto, M. (2000). Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 182, 1688-1693.
- Wadhwa, R., Thakur, J.D., Nanda, A., and Guthikonda, B. (2012). Sterile hemorrhagic brain abscess in infective endocarditis. *Neurol India* 60, 240-242.

- Walchli, S., Skanland, S.S., Gregers, T.F., Lauvrak, S.U., Torgersen, M.L., Ying, M., Kuroda, S.i., Maturana, A., and Sandvig, K. (2008). The mitogen-activated protein kinase p38 links Shiga toxin-dependent signaling and trafficking. *Molecular Biology of the Cell* 19, 95-104.
- 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.
- Walev, I., Reske, K., Palmer, M., Valeva, A., and Bhakdi, S. (1995). Potassium-inhibited processing of IL-1 beta in human monocytes. *EMBO J* 14, 1607-1614.
- Walseng, E., Bakke, O., and Roche, P.A. (2008). Major histocompatibility complex class II-peptide complexes internalize using a clathrin- and dynamin-independent endocytosis pathway. *J Biol Chem* 283, 14717-14727.
- Wang, J.P. (2003). Characterization of maleimide-activated Ca²⁺ entry in neutrophils. *Biochem Pharmacol* 65, 1923-1929.
- Wang, J.T., Kerr, M.C., Karunaratne, S., Jeanes, A., Yap, A.S., and Teasdale, R.D. (2010). The SNX-PX-BAR family in macropinocytosis: the regulation of macropinosome formation by SNX-PX-BAR proteins. *PLoS One* 5, e13763.
- Warny, M., and Kelly, C.P. (1999). Monocytic cell necrosis is mediated by potassium depletion and caspase-like proteases. *Am J Physiol* 276, C717-724.
- Wei, H., Ahn, S., Shenoy, S.K., Karnik, S.S., Hunyady, L., Luttrell, L.M., and Lefkowitz, R.J. (2003). Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10782-10787.
- Weigert, R., Yeung, A.C., Li, J., and Donaldson, J.G. (2004). Rab22a regulates the recycling of membrane proteins internalized independently of clathrin. *Mol Biol Cell* 15, 3758-3770.
- Welch, H.C., Coadwell, W.J., Ellson, C.D., Ferguson, G.J., Andrews, S.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Hawkins, P.T., and Stephens, L.R. (2002). P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P₃- and Gbetagamma-regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *Cell* 108, 809-821.
- 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.
- Wertheim, H.F., Melles, D.C., Vos, M.C., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Verbrugh, H.A., and Nouwen, J.L. (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* 5, 751-762.
- White, J., Johannes, L., Mallard, F., Girod, A., Grill, S., Reinsch, S., Keller, P., Tzschaschel, B., Echard, A., Goud, B., *et al.* (1999). Rab6 coordinates a novel Golgi to ER retrograde transport pathway in live cells. *Journal of Cell Biology* 147, 743-759.
- Wickstrom, S.A., Lange, A., Hess, M.W., Polleux, J., Spatz, J.P., Kruger, M., Pfaller, K., Lambacher, A., Bloch, W., Mann, M., *et al.* (2010). Integrin-linked kinase controls microtubule dynamics required for plasma membrane targeting of caveolae. *Dev Cell* 19, 574-588.

- Wiedemann, A., Patel, J.C., Lim, J., Tsun, A., van Kooyk, Y., and Caron, E. (2006). Two distinct cytoplasmic regions of the beta2 integrin chain regulate RhoA function during phagocytosis. *J Cell Biol* 172, 1069-1079.
- Wilcke, M., Johannes, L., Galli, T., Mayau, V., Goud, B., and Salamero, J. (2000). Rab11 regulates the compartmentalization of early endosomes required for efficient transport from early endosomes to the trans-golgi network. *Journal of Cell Biology* 151, 1207-1220.
- Wilde, C., Chhatwal, G.S., Schmalzing, G., Aktories, K., and Just, I. (2001). A novel C3-like ADP-ribosyltransferase from *Staphylococcus aureus* modifying RhoE and Rnd3. *J Biol Chem* 276, 9537-9542.
- Wiley, B.B., and Rogolsky, M. (1977). Molecular and serological differentiation of staphylococcal exfoliative toxin synthesized under chromosomal and plasmid control. *Infect Immun* 18, 487-494.
- Wiley, H.S., and Burke, P.M. (2001). Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by endocytic trafficking. *Traffic* 2, 12-18.
- Wilke, G.A., and Bubeck Wardenburg, J. (2010). Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 13473-13478.
- Wilkinson, B., Crossley, K., and Archer, G., eds. (1997). *The staphylococci in human disease* (New York, Churchill Livingstone).
- Williams, L.M., and Ridley, A.J. (2000). Lipopolysaccharide induces actin reorganization and tyrosine phosphorylation of Pyk2 and paxillin in monocytes and macrophages. *J Immunol* 164, 2028-2036.
- Williams, P., and Camara, M. (2009). Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr Opin Microbiol* 12, 182-191.
- Williams, R.J., Ward, J.M., Henderson, B., Poole, S., O'Hara, B.P., Wilson, M., and Nair, S.P. (2000). Identification of a novel gene cluster encoding staphylococcal exotoxin-like proteins: characterization of the prototypic gene and its protein product, SET1. *Infect Immun* 68, 4407-4415.
- 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.
- Wirtz, C., Witte, W., Wolz, C., and Goerke, C. (2009). Transcription of the phage-encoded Pantone-Valentine leukocidin of *Staphylococcus aureus* is dependent on the phage life-cycle and on the host background. *Microbiology* 155, 3491-3499.
- Wiseman, G.M. (1968). The nature of staphylococcal beta hemolysin. II. Effect on mammalian cells. *Can J Microbiol* 14, 179-181.
- Wiseman, G.M., and Caird, J.D. (1967). The nature of staphylococcal beta hemolysin. I. Mode of action. *Can J Microbiol* 13, 369-376.
- Wojciak-Stothard, B., and Ridley, A.J. (2002). Rho GTPases and the regulation of endothelial permeability. *Vascul Pharmacol* 39, 187-199.

- Wolfe, B.L., and Trejo, J. (2007). Clathrin-dependent mechanisms of G protein-coupled receptor endocytosis. *Traffic* 8, 462-470.
- 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.
- Woodin, A.M., ed. (1972). *Staphylococcal leucocidin* (New York).
- Woodman, P.G., and Futter, C.E. (2008). Multivesicular bodies: co-ordinated progression to maturity. *Curr Opin Cell Biol* 20, 408-414.
- Woodruff, T.M., Nandakumar, K.S., and Tedesco, F. (2011). Inhibiting the C5-C5a receptor axis. *Mol Immunol* 48, 1631-1642.
- Xu, S.X., and McCormick, J.K. (2012). Staphylococcal superantigens in colonization and disease. *Front Cell Infect Microbiol* 2, 52.
- Xue, Z.H., Zhao, C.Q., Chua, G.L., Tan, S.W., Tang, X.Y., Wong, S.C., and Tan, S.M. (2010). Integrin α M β 2 clustering triggers phosphorylation and activation of protein kinase C δ that regulates transcription factor Foxp1 expression in monocytes. *J Immunol* 184, 3697-3709.
- Yamada, T., Tochimaru, N., Nakasuji, S., Hata, E., Kobayashi, H., Eguchi, M., Kaneko, J., Kamio, Y., Kaidoh, T., and Takeuchi, S. (2005). Leukotoxin family genes in *Staphylococcus aureus* isolated from domestic animals and prevalence of lukM-lukF-PV genes by bacteriophages in bovine isolates. *Vet Microbiol* 110, 97-103.
- Yamaguchi, T., Hayashi, T., Takami, H., Ohnishi, M., Murata, T., Nakayama, K., Asakawa, K., Ohara, M., Komatsuzawa, H., and Sugai, M. (2001). Complete nucleotide sequence of a *Staphylococcus aureus* exfoliative toxin B plasmid and identification of a novel ADP-ribosyltransferase, EDIN-C. *Infect Immun* 69, 7760-7771.
- Yamaguchi, T., Nishifuji, K., Sasaki, M., Fudaba, Y., Aepfelbacher, M., Takata, T., Ohara, M., Komatsuzawa, H., Amagai, M., and Sugai, M. (2002). Identification of the *Staphylococcus aureus* etd pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B. *Infect Immun* 70, 5835-5845.
- Yamashita, K., Kawai, Y., Tanaka, Y., Hirano, N., Kaneko, J., Tomita, N., Ohta, M., Kamio, Y., Yao, M., and Tanaka, I. (2011). Crystal structure of the octameric pore of staphylococcal gamma-hemolysin reveals the beta-barrel pore formation mechanism by two components. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 17314-17319.
- Yan, S.R., Fumagalli, L., and Berton, G. (1996). Activation of SRC family kinases in human neutrophils. Evidence that p58C-FGR and p53/56LYN redistributed to a Triton X-100-insoluble cytoskeletal fraction, also enriched in the caveolar protein caveolin, display an enhanced kinase activity. *FEBS Lett* 380, 198-203.
- Yarwood, J.M., Bartels, D.J., Volper, E.M., and Greenberg, E.P. (2004). Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol* 186, 1838-1850.

- Yoong, P., and Pier, G.B. (2010). Antibody-mediated enhancement of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 2241-2246.
- Yoong, P., and Pier, G.B. (2012). Immune-activating properties of Panton-Valentine leukocidin improve the outcome in a model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Infect Immun* 80, 2894-2904.
- Yoong, P., and Torres, V.J. (2013). The effects of *Staphylococcus aureus* leukotoxins on the host: cell lysis and beyond. *Curr Opin Microbiol* 16, 63-69.
- Yoshie, O., Imai, T., and Nomiyama, H. (2001). Chemokines in immunity. *Adv Immunol* 78, 57-110.
- Yu, M., and Haslam, D.B. (2005). Shiga toxin is transported from the endoplasmic reticulum following interaction with the luminal chaperone HEDJ/ERdj3. *Infection and Immunity* 73, 2524-2532.
- Zanger, P., Nurjadi, D., Schleucher, R., Scherbaum, H., Wolz, C., Kremsner, P.G., and Schulte, B. (2012). Import and spread of Panton-Valentine Leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* through nasal carriage and skin infections in travelers returning from the tropics and subtropics. *Clin Infect Dis* 54, 483-492.
- Zhang, J., Ferguson, S.S., Barak, L.S., Bodduluri, S.R., Laporte, S.A., Law, P.Y., and Caron, M.G. (1998a). Role for G protein-coupled receptor kinase in agonist-specific regulation of mu-opioid receptor responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7157-7162.
- Zhang, S.L., Yeromin, A.V., Zhang, X.H., Yu, Y., Safrina, O., Penna, A., Roos, J., Stauderman, K.A., and Cahalan, M.D. (2006). Genome-wide RNAi screen of Ca(2+) influx identifies genes that regulate Ca(2+) release-activated Ca(2+) channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9357-9362.
- Zhang, S.L., Yu, Y., Roos, J., Kozak, J.A., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H., Stauderman, K.A., and Cahalan, M.D. (2005). STIM1 is a Ca2+ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca2+ store to the plasma membrane. *Nature* 437, 902-905.
- Zhang, X., Boyar, W., Toth, M.J., Wennogle, L., and Gonnella, N.C. (1997). Structural definition of the C5a C terminus by two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Proteins* 28, 261-267.
- Zhang, X.P., Kamata, T., Yokoyama, K., Puzon-McLaughlin, W., and Takada, Y. (1998b). Specific interaction of the recombinant disintegrin-like domain of MDC-15 (metargidin, ADAM-15) with integrin α v β 3. *J Biol Chem* 273, 7345-7350.
- Zipfel, P.F., Skerka, C., Hellwage, J., Jokiranta, S.T., Meri, S., Brade, V., Kraiczy, P., Noris, M., and Remuzzi, G. (2002). Factor H family proteins: on complement, microbes and human diseases. *Biochem Soc Trans* 30, 971-978.
- Zuiderweg, E.R., and Fesik, S.W. (1989). Heteronuclear three-dimensional NMR spectroscopy of the inflammatory protein C5a. *Biochemistry* 28, 2387-2391.
- Zuiderweg, E.R., Nettesheim, D.G., Mollison, K.W., and Carter, G.W. (1989). Tertiary structure of human complement component C5a in solution from nuclear magnetic resonance data. *Biochemistry* 28, 172-185.

LISTE DES COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS INTERNATIONALES :

- (1) JOVER E, TAWK MY, LAVENTIE BJ, POULAIN B, PREVOST G. ***Staphylococcus aureus Leukotoxins Trigger Free Intracellular Ca²⁺ Increase in Neurons, Signaling through Acidic Stores and Store-Operated Channels***. Cell Microbiol. 2013 May;15(5):742-58. doi: 10.1111/cmi.12069. Epub 2012 Dec 6.
- (2) LAVENTIE BJ, GUERIN F, MOUREY L, TAWK MY, JOVER E, MAVEYRAUD L, AND PRÉVOST G. ***Residues essential for panton-valentine leukocidin s component binding to its cell receptor suggest both plasticity and adaptability in its interaction surface***. PLoS One. 2014 Mar 18;9(3):e92094. doi: 10.1371/journal.pone.0092094. eCollection 2014.
- (3) TAWK MY, ZIMMERMANN-MEISSE G, BOSSU JL, POTRICH C, BOURCIER T, DALLA SERRA M, POULAIN B, PREVOST G, JOVER E. ***Internalization of staphylococcal leukotoxins that bind the C5aR is required for the initiation of intracellular Ca²⁺ mobilization***. En préparation.
- (4) Demande de protection intellectuelle : **Molécules macrocycliques sulfonatéés à quatre unités phénol inhibitrices de toxines bactériennes formant des pores/leucotoxines de *Staphylococcus aureus***

PUBLICATIONS NATIONALES :

- (5) Tawk M, Laventie BJ, Jover E, Poulain B, Prévost G. ***Staphylococcus aureus Gamma-hemolysin: more than just a pore forming toxin***. Société Française d'Etudes des Toxines ; E-Book RT18 (2010) Avancées et nouvelles technologies en Toxinologie - Advances and new technologies in Toxinology, <http://sfet.asso.fr/images/stories/SFET/pdf/Ebook-RT18-2010-signets-110322.pdf>, 139-147.
- (6) PREVOST G, TAWK M, DALLA SERRA M, POULAIN B, CIANFERANI S, LAVENTIE BJ, JOVER E. ***Ways for partial and total inhibition of staphylococcal bicomponent leucotoxins***. Société Française d'Etudes des Toxines ; E-Book RT19 (2011) Toxines et transferts ioniques - Toxins and ion transfers, <http://sfet.asso.fr/images/stories/SFET/pdf/Ebook-RT19-2011-signets.pdf>, 81-88.
- (7) JOVER E, LAVENTIE BJ, TAWK M, POULAIN B, PREVOST G. ***Neurotoxicity of Staphylococcus aureus leucotoxins: interaction with the store operated calcium entry complex in central and sensory neurons***; E-Book RT19 (2011) Toxines et transferts ioniques - Toxins and ion transfers, <http://sfet.asso.fr/images/stories/SFET/pdf/Ebook-RT19-2011-signets.pdf>, 141-145.

COMMUNICATIONS ORALES :

- "*Staphylococcus aureus γ-hemolysin: more than just a pore forming toxin*"

Tawk M, Laventie BJ, Jover E, Prévost G.

Communication orale à la 18ème Rencontre en Toxinologie organisée par la Société Française d'Etudes des Toxines (SFET) « Advances and new technologies in Toxinology". Institut Pasteur – Paris – 14 décembre 2010.

- “*Staphylococcus aureus* γ -hemolysin: more than just a pore forming toxin”

Tawk M, Laventie BJ, Jover E, Prévost G.

Communication orale au Séminaire de Microbiologie de Strasbourg organisé par l'Ecole doctorale Vie et Santé de Strasbourg. Université de Strasbourg – Strasbourg – 31 mars 2011.

POSTERS :

- “*HlgC/HlgB and PVL Induce Calcium Influx In hPMNs Through Different Pathways*”

Tawk M, Jover E, Laventie BJ, Girardot R, Poulain B, Prévost G.

Poster au Séminaire de Microbiologie de Strasbourg SMS 2012 organisé par l'Ecole doctorale Vie et Santé de Strasbourg. Université de Strasbourg – Strasbourg – 15 mars 2012.

- “*HlgC/HlgB and PVL Induce Calcium Influx In hPMNs Through Different Pathways*”

Tawk M, Jover E, Laventie BJ, Girardot R, Poulain B, Prévost G.

Poster au 2^{ème} Congrès sur les Protéines formant des Pores : Pores 2012, Prato, Italie- du 17 au 20 avril 2012.

- “*HlgC/HlgB and PVL Induce Calcium Influx In hPMNs Through Different Pathways*”

Tawk M, Jover E, Laventie BJ, Girardot R, Poulain B, Prévost G.

Poster au Séminaire de Microbiologie de Strasbourg SMS 2013 organisé par l'Ecole doctorale Vie et Santé de Strasbourg. Université de Strasbourg – Strasbourg – 11 avril 2013.

- “*HlgC/HlgB and PVL Induce Different Calcium Signaling Pathways In hPMNs following their binding to C5a Receptor*”

Tawk M, Jover E, Laventie BJ, Bourcier T, Poulain B, Prévost G.

Poster au Congrès Etox16 (European Workshop on Bacterial Protein Toxins 16): Freiburg, Allemagne du 22 au 26 juin 2013.

FINANCEMENTS DE LA THESE :

Septembre 2010 – Août 2012 : Fondation de France – Bourse Berthe Fouassier

Octobre 2012 – Septembre 2013 : Bourse Région Alsace

Novembre 2013 – Janvier 2014 : Salariée sur contrats de l'EA-7290



Mira TAWK

Action et contrôle des leucotoxines de *Staphylococcus aureus* sur les cellules cibles



Résumé

La γ -hémolysine HlgC/HlgB et la leucocidine de Panton et Valentine (LPV) sont deux toxines formant des pores de la famille des leucotoxines bipartites (formées de deux sous-unités de classe S et F) sécrétées par *S. aureus* qui ciblent directement les polynucléaires neutrophiles humains (hPNNs) et qui augmentent le pouvoir pathogène de la bactérie. Ces leucotoxines sont également capables de cibler d'autres types cellulaires comme les neurones en grain du cervelet de rat et les DRG. D'abord, le composé de classe S de ces leucotoxines se fixe à un récepteur membranaire, le C5aR. Des substitutions en Alanine par mutagenèse dirigée ont permis la caractérisation d'un cluster d'acides aminés essentiels pour la fixation de LukS-PV à C5aR, localisé sur 2 boucles du domaine « Rim ». Puis, suite à la fixation de la sous-unité de classe F, HlgC/HlgB et la LPV semblent être internalisées, permettant une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$. Malgré les grandes similarités entre ces deux leucotoxines les sous-unités de classe F permettent à chaque leucotoxine d'activer des voies calciques différentes. Des dérivés du para-sulfonato-calix[4]arène ont un effet inhibiteur de ces toxines et pourraient montrer un potentiel à être utilisés comme auxiliaires aux antibiothérapies.

Mots clés : *Staphylococcus aureus*, Leucocidine de Panton et Valentine, γ -hémolysine, neutrophiles humains, neurones en grain du cervelet, DRG, signalisation calcique, inhibiteurs, para-sulfonato-calix[n]arènes.

Abstract

The γ -hemolysin HlgC/HlgB and the Panton and Valentine leukocidin (PVL) are two pore-forming toxins of the family of bicomponent leukotoxins secreted by *S. aureus* that directly target human neutrophils (hPNNs) and increase the pathogenicity of the bacteria. These leukotoxins also are capable of targeting other cell types such as rat cerebellar granular neurons and DRG. First, the compound of the class S binds to a membrane receptor, C5aR. Alanine-scanning mutagenesis allowed the characterization of a cluster of amino acids localized on two loops of the "Rim" domain essential for LukS-PV binding to C5aR. Then, after the class F subunit binding, HlgC/HlgB and PVL appear to be internalized, allowing an increase in $[Ca^{2+}]_i$. Despite the similarities between these two subunits, the class F component allows each leukotoxin to activate different pathways. Derivatives of para-sulfonato-calix[4]arene have an inhibitory effect on these toxins and may offer a potential to be used as auxiliary to antibiotherapy.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Leukocidin of Panton and Valentine, γ -haemolysin, human neutrophils, primary sensory neurones, DRG, calcium pathways, inhibitors, para-sulfonato-calix[n]arenes.