

UNIVERSITE LOUIS PASTEUR - STRASBOURG 1

UNIVERSITE NATIONALE DU BENIN

1999

N° 0 6 7 1 7 1 2 X

THESE EN COTUTELLE

présentée à

L'UNIVERSITE NATIONALE DU BENIN - COTONOU

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE NATIONALE DU BENIN

Domaine : MICROBIOLOGIE - BIOLOGIE MOLECULAIRE

par

Lamine Saïd BABA-MOUSSA

**MECANISME D'ACTION DES LEUCOTOXINES A DEUX COMPOSES DE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS : OLIGOMERISATION ET DECOUPLAGE DE
L'ACTIVITE FORMANT DES PORES.
APPROCHE EPIDEMIOLOGIQUE DES INFECTIONS A STAPHYLOCOCCUS
AUREUS EN AFRIQUE DE L'OUEST**

Soutenue le 15 Juillet 1999, devant la commission d'examen :

M. H. MONTEIL	Université Louis Pasteur	Directeur de Thèse
M. A. SANNI	Université Nationale du Bénin	Directeur de Thèse
M. C. HOUNTONDI	Université Paris VI	Rapporteur
M. J. SETONDI	Université Nationale du Bénin	Rapporteur
M. J. H. WEIL	Université Louis Pasteur	Rapporteur
M. G. PREVOST	Université Louis Pasteur	Examineur

Institut de Bactériologie, LTAB, UPRES EA 1318, 3, rue Koeberlé, F-67000 STRASBOURG
Département de Biochimie et de Biologie Cellulaire, Fa.S.T-UNB 04 BP 0320 COTONOU-Bénin

UNIVERSITE LOUIS PASTEUR - STRASBOURG 1

UNIVERSITE NATIONALE DU BENIN

1999

N° 0 6 7 1 7 1 2 X

THESE EN COTUTELLE

présentée à

L'UNIVERSITE NATIONALE DU BENIN - COTONOU

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE NATIONALE DU BENIN

Domaine : MICROBIOLOGIE - BIOLOGIE MOLECULAIRE

par

Lamine Saïd BABA-MOUSSA

**MECANISME D'ACTION DES LEUCOTOXINES A DEUX COMPOSES DE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS : OLIGOMERISATION ET DECOUPLAGE DE
L'ACTIVITE FORMANT DES PORES.
APPROCHE EPIDEMIOLOGIQUE DES INFECTIONS A STAPHYLOCOCCUS
AUREUS EN AFRIQUE DE L'OUEST**

Soutenue le 15 Juillet 1999, devant la commission d'examen :

M. H. MONTEIL	Université Louis Pasteur	Directeur de Thèse
M. A. SANNI	Université Nationale du Bénin	Directeur de Thèse
M. C. HOUNTONDI	Université Paris VI	Rapporteur
M. J. SETONDI	Université Nationale du Bénin	Rapporteur
M. J. H. WEIL	Université Louis Pasteur	Rapporteur
M. G. PREVOST	Université Louis Pasteur	Examineur

Institut de Bactériologie, LTAB, UPRES EA 1318, 3, rue Koeberlé, F-67000 STRASBOURG
Département de Biochimie et de Biologie Cellulaire, Fa.S.T-UNB 04 BP 0320 COTONOU-Bénin

Je dédie cette Thèse :

A mon frère Ismaël BABA-MOUSSA

3 Octobre 1973 - 25 avril 1999.

Que ton âme repose en paix !

A ma mère Ramatou BABA-MOUSSA qui n'a ménagé aucun effort pour soutenir mes études en France. Que Dieu te prête longue vie et bonne santé pour que tu nous accompagnes aussi loin que possible.

A mon père Sidicou BABA-MOUSSA pour la rigueur et le goût du travail que tu nous a donné. Que le Seigneur t'accorde longévité, santé et bonheur pour que tu nous accompagnes aussi loin que possible.

A mes frères :

Abib Mohamed à qui je présente mes félicitations pour son nouveau-né (Akyle).

Abdel Rahamane : j'espère que tu pourras soutenir ta thèse en décembre comme prévu.

Abdel Kader à qui je souhaite beaucoup de courage pour sa soutenance. Je suis de tout coeur avec toi.

A Mlle Aboudou Nadia et sa famille pour leur soutien moral et leur amitié.

A tous les miens.

REMERCIEMENTS :

A Monsieur le Professeur H. Monteil, Directeur de L'Institut de Bactériologie : je vous remercie pour l'accueil que vous m'avez réservé dans votre laboratoire. Vous avez accepté de diriger ce travail malgré vos multiples responsabilités. Je vous remercie de votre bienveillance et de votre disponibilité d'esprit. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur Ambaliou Sanni, Chef du Département de Biochimie et de Biologie Cellulaire de L'UNB : vous avez accepté de co-diriger ce travail en m'accueillant dans votre laboratoire. Je vous remercie pour votre disponibilité et pour l'encadrement enthousiaste dont j'ai bénéficié lors de mes différents séjours à Cotonou. Trouvez dans ce travail ma reconnaissance profonde.

A Monsieur le Professeur J. H. Weil, Directeur de l'Institut de Biologie Moléculaire des Plantes : vous nous faites l'honneur d'être rapporteur de ce travail, nous vous en remercions. Sans votre engagement d'enseignement au Bénin cette thèse en cotutelle n'aurait pas été possible. Vos enseignements et vos travaux dans le domaine de la Biochimie sont pour nous une référence.

A Monsieur le Professeur C. Hountondji : nous vous remercions d'avoir accepté de juger ce travail et de nous faire l'honneur de siéger dans ce Jury de thèse.

A Monsieur le Professeur J. Sètonджи : l'initiative des relations entre Strasbourg et Cotonou vous revient. Nous vous remercions d'avoir accepté de participer à ce Jury de thèse.

A Monsieur G. Prévost : je te remercie d'avoir encadrer cette thèse du début à la fin avec toute la rigueur scientifique qui te caractérise. Je te remercie pour le soutien moral et matériel que tu m'as apporté pendant les moments difficiles que j'ai traversés. Ton amitié et tes encouragements ont été très précieux pour l'accomplissement de cette thèse. J'espère que ce

travail sera le point de départ d'une longue et fructueuse collaboration scientifique entre notre laboratoire au Bénin et l'Institut de Bactériologie.

Au Professeur Yves Boulanger, Directeur de l'Ecole Supérieure de Biotechnologie : vous avez contribué au développement de la Biochimie et de la Biologie Moléculaire au Bénin. Je vous remercie pour votre engagement d'enseignement au Bénin sans lequel cette thèse en cotutelle n'aurait pas été possible.

Mme Danièle Prévost pour sa gentillesse et sa sympathie.

A mon oncle Mohamed BABA-MOUSSA de La Rochelle et sa famille pour tout le soutien qu'ils nous ont apporté lors du décès de notre frère Ismaël.

A Mesdames Elsie BOHR, Sylvianne Randane et la famille Fichter pour leur assistance durant tout mon séjour en France.

A Monsieur D. A. Colin, pour ses conseils précieux dans le domaine de la cytométrie en flux et sa disponibilité dans l'analyse des mutants.

A Stéphane Bronner, pour sa sincère amitié et pour les bons moments que nous avons passés pendant ces dix années. Je pars avec beaucoup de regrets, mais j'espère t'accueillir très prochainement à Cotonou.

A Sandra Werner, pour sa collaboration pendant ces deux dernières années. Je te remercie particulièrement pour l'aide que tu m'as apportée pendant ce dernier mois. J'espère que d'ici la fin de ta thèse notre collection de mutants aura doublé. Je te souhaite une bonne continuation et beaucoup de réussite pour ton avenir.

A Daniel Keller, pour sa collaboration efficace et pour ses conseils techniques et sa perpétuelle gentillesse.

A Raymonde Girardot dite “ Rosemonde“ pour ton aide dans la réalisation de certaines expériences de cytométrie en flux, et pour ton humour.

A Leila Staali à qui je souhaite beaucoup de courage et de la patience.

A Julie, pour sa bonne humeur. Je te souhaite bonne continuation.

A Mme Colette Harf-Monteil pour sa gentillesse et ses conseils avisés.

A Mimi Haubensack pour sa sympathie.

A Alain Gravet pour son aide dans le diagnostic et la mise en forme de la bibliographie.

A Monsieur Philippe Riegel pour les longues discussions sportives. J'espère que nous continuerons à échanger nos points de vue sur le championnat de France. Le monde devient petit grâce à l'internet.

A Mme Véronique Blanloeil du secrétariat scientifique pour sa patience.

A Monsieur Pierre Dietz du service photo de l'Institut de Bactériologie.

A tout le personnel de l'Institut de Bactériologie.

A Nicodem Chabi pour ton aide technique et ta disponibilité lors de mes différents séjours à Cotonou et surtout pour l'amitié sincère que tu me portes.

A tout le personnel du Laboratoire de Biochimie et de Biologie cellulaire de Cotonou : Eдорh, Ahissou, Richard, Mme Ayi, Mme Kpassou, Cina, Clarisse, Madjid.

Mes remerciements particuliers à tout le personnel du Laboratoire National, de la Clinique Saint Luc et du CNHU à Cotonou pour leur collaboration à la collecte des souches de staphylocoques.

Nos remerciements à Mme Prince David et au Dr Dagnra du CHU de Lomè-Tokoin pour leur participation à la réalisation de l'enquête épidémiologique.

Nos remerciements à Mr et Mme Befort et au Professeur Edoh d'Abidjan pour la collecte des souches de staphylocoque en Côte d'Ivoire.

Enfin, nous remercions le Gouvernement Béninois et l'Ambassade de France au Bénin pour leur soutien financier.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	1
ABREVIATIONS	7
INTRODUCTION GENERALE	9
I. GENERALITES SUR <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	11
<i>I.1. Identification</i>	11
<i>I.2. Ecologie</i>	12
<i>I.3. Les infections à <i>Staphylococcus aureus</i></i>	12
I.3.1. Les suppurations localisées	12
I.3.2. Les staphylococcies systémiques	13
I.3.3. Les manifestations digestives	13
II. FACTEURS DE PATHOGENICITE DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> :.....	13
<i>II.1. Facteurs de virulence</i>	13
II.1.1. Les Toxines	13
II.1.1.1. L' Alpha-toxine	13
II.1.1.2. La Bêta-toxine	13
II.1.1.3. La Gamma-hémolysine	13
II.1.1.4. La Delta-toxine	13
II.1.1.5. Les Leucotoxines	13
II.1.1.6. Les Entérotoxines	15
II.1.1.7. Toxine du Syndrome de choc Toxique (TSST-1)	15
II.1.1.8. Les Epidermolysines A et B (ETA, ETB)	15
II.1.1.9. La Coagulase	16
<i>II.2. Les Facteurs d'adhésion</i>	16
II.2.1. La Protéine A	16
II.2.2. Les Adhésines	16
II.2.3. Les "Fibronectin binding protein"	17
II.2.4. Les "Laminin binding protein"	17
II.2.5. La "Collagen binding protein"	17
II.2.6. Les "Fibrinogen binding protein"	17

III. PRINCIPAUX TYPES DE TOXINES FORMANT DES PORES ET LES EVENEMENTS CONDUISANT A LA PERMEABILITE MEMBRANAIRE.....	17
<i>III.1. Les toxines formant des pores: introduction.....</i>	17
<i>III.2. Les toxines à hélices alpha hydrophobes et amphipatiques.....</i>	18
III.2.1. La Colicine A d' <i>E. coli</i>	20
III.2.1.1. Interaction avec la membrane plasmique.....	20
III.2.1.2. Insertion dans la membrane plasmique.....	20
III.2.1.3. Formation du pore.....	23
<i>III.3. Les toxines à feuilletts β prépondérants</i>	23
III.3.1. L' α -toxine de <i>Staphylococcus aureus</i>	25
III.3.1.1. Structure de l' α -toxine.....	25
III.3.1.2. Mode d'action de la toxine.....	25
III.3.2. Les Leucotoxines à deux composés.....	28
III.3.2.1. Principaux membres.....	28
III.3.2.1.1. La Leucocidine de Panton et Valentine.....	28
III.3.2.1.2. La Gamma-hémolysine.....	31
III.3.2.1.3. La leucotoxine LukM-LukF-PV like (ou LukF').....	31
III.3.2.1.4. La leucotoxine LukE-LukD.....	32
III.3.2.1.5. La leucotoxine LukS-I-LukF-I de <i>Staphylococcus intermedius</i>	32
III.3.2.1.6. La Leucotoxine R.....	32
III.3.2.2. Mode d'action des leucotoxines.....	32
<i>III.4. Conclusion sur les toxines formant des pores.....</i>	35
IV. NOS TRAVAUX.....	36
MATERIELS ET METHODES	37
MATERIELS	38
I. LES SOUCHES BACTERIENNES	38
II. LES VECTEURS.....	40
<i>II.1. Les vecteurs pUC19 et pCU1).....</i>	40
<i>II.2. Le vecteur pCRTMII</i>	40
<i>II.3. Le vecteur d'expression pGEX6P-1</i>	40
III. LES MILIEUX DE CULTURE	42
METHODES RELATIVES A L'ETUDE DE L'ADN.....	44
I. LES METHODES DE PREPARATION DE L'ADN	44
<i>I.1. Préparation d'ADN génomique de S. aureus</i>	44
<i>I.2. Les méthodes de préparation d'ADN plasmidique.....</i>	44
I.2.1. Maxipréparation d'ADN par la méthode chromatographique (Plasmid Combi kit, Qiagen).....	44

I.2.2. Maxi-préparation d'ADN plasmidique sur gradient de chlorure de césium	45
I.2.3. Minipréparation d'ADN plasmidique à partir d' <i>E. coli</i>	45
I.3. Préparation d'ADN bactérien total intact en vue de l'électrophorèse en champs pulsés	45
II. MODIFICATIONS ENZYMATIQUES DE L'ADN.....	46
II.1. Hydrolyses de restriction	46
II.2. Déphosphorylation des extrémités 5'-phosphate d'un plasmide.....	46
II.3. Ligation de deux fragments d'ADN.....	46
III. ELECTROPHORESE DE FRAGMENTS D'ADN.....	47
III.1. Séparation des fragments d'ADN sur gel d'agarose.....	47
III.2. Electroélution d'un fragment d'ADN à partir d'un gel d'agarose.....	47
III.3. Electrophorèse en champs pulsés.....	47
III.3.1. Préparation de l'ADN.....	47
III.3.2. Hydrolyse de l'ADN.....	47
III.3.3. Electrophorèse en champ pulsés.....	47
IV. AMPLIFICATION D'UN FRAGMENT D'ADN PAR LA METHODE DE PCR	49
IV.1. Principe de la méthode	49
IV.2. La réaction.....	49
IV.3. PCR asymétrique, megaprimer et application à la mutagenèse dirigée	49
V. MUTAGENESE DIRIGEE PAR LA METHODE "QUICK CHANGE™ SITE DIRECTED MUTAGENESIS"	51
V.1. Principe de la Méthode	51
V.2. La réaction.....	51
V.3. Le criblage des mutants.....	52
VI. SEQUENÇAGE D'UN ADN PAR LA METHODE DE SANGER	52
VI.1. Principe et application de la méthode	52
VI.2. Gel de séquence selon Sanger	52
VII. TRANSFORMATION DES BACTERIES	52
VII.1. Transformation d' <i>Escherichia coli</i> NM522.....	52
VII.1.1. Obtention des bactéries compétentes.....	52
VII.1.2. Transformation de la souche NM522 par le plasmide pCU1	53
VII.2. Transformation de cellules <i>Epicurian coli</i> XL-1 Blue supercompétentes	53
VII.3. Transformation de <i>E. coli</i> BL21 par électroporation	53
VII.3.1. Obtention des bactéries compétentes.....	53
VII.3.2. Electroporation d' <i>E. coli</i> BL21 par le vecteur pGEX6P-1	53
VII.4. Transformation des souches de <i>S. aureus</i> par électroporation	54
METHODES RELATIVES A L'ETUDE DES PROTEINES.....	54
I. PURIFICATION DES LEUCOTOXINES.....	54
I.1. Purification de leucotoxines à partir de souches de <i>S. aureus</i>	54
I.2. Purification des leucotoxines sous forme de protéines fusion à partir d' <i>E. coli</i> BL21	54
I.2.1. Principe de la méthode.....	54
I.2.2. Obtention du lysat bactérien.....	55

I.2.3. Dosage de l'activité enzymatique de la GST	55
I.2.4. Purification de la protéine de fusion sur colonne de Sépharose 4B	56
I.2.5. Clivage de la protéine de fusion par la PreScission®Protease.....	56
II. TECHNIQUES D'ANALYSE DES PROTEINES	56
II.1. Immunoréplique (Western Blot) sur membrane de nitrocellulose.....	56
II.1.1. Préparation du lysat bactérien.....	56
II.1.2. Séparation et transfert sur membrane de nitrocellulose	57
II.1.3. Détection des protéines	57
II.2. Electrophorèse dénaturante des protéines : méthode PhastSystem™	57
II.3. Immunoprécipitation des leucotoxines par une diffusion radiale en gel des protéines	58
II.4. Dosage de protéines par la méthode de Bradford.....	58
III. DETECTION DE LA PRESENCE D'UN RESIDU CYSTEINE EN SURFACE D'UNE PROTEINE MUTEE	59
III.1. Principe de la réaction.....	59
III.2. Mode opératoire.....	59
III.3. Réaction d'oxydation : formation de ponts disulfure.....	59
IV. MARQUAGES DE PROTEINES	59
IV.1. Marquage aléatoire d'une protéine à la fluorescéine	59
IV.2. Marquage d'une protéine contenant une cystéine à la fluorescéine	60
IV.3. Marquage d'une protéine contenant une cystéine à l'AMSD	60
V. ACTIVITES BIOLOGIQUES DES LEUCOTOXINES DE <i>S. AUREUS</i>	61
V.1. Activité leucocytotoxique sur les polynucléaires humains.....	61
V.1.1. Principe de la méthode.....	61
V.1.2. Préparation des polynucléaires humains.....	61
V.1.3. Activité leucocytolytique des leucotoxines	61
V.2. Activité hémolytique sur les hématies d'homme et de lapin	63
VI. ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX.....	63
VI.1. Principe du cytomètre	63
VI.2. Description du cytomètre en flux	63
VI.3. Chargement des cellules par le Fluo-3/Fluo-4.....	65
VI.4. Détermination de la formation de pores aspécifiques en présence d'éthidium.....	65
VI.5. Observations des modifications subies par les cellules.....	65
VI.6. Détermination de la taille des pores formés par les leucotoxines.....	66
VI.7. Etude de la capacité de Fixation des leucotoxines mutantes	66
VII. DOSAGE DE L'INTERLEUKINE 8 (IL-8) HUMAINE	67
VIII. MODELES EXPERIMENTAUX	67
VIII.1. Dermonécrose chez le lapin.....	67
VIII.2. Injections de toxines dans l'humeur vitrée du lapin	67

RESULTATS.....	69
CHAPITRE I.....	70
IMPORTANCE D'UN FEUILLET B PREDIT DANS LES COMPOSES DE CLASSE S DES LEUCOTOXINES DE S. AUREUS.....	70
I. INTRODUCTION.....	72
II. ARTICLE N°1.....	73
III. DISCUSSION.....	86
IV. APPROFONDISSEMENTS DE L'ETUDE DU B-FEUILLET PREDIT A L'EXTREMITE N-TERMINALE DES COMPOSES DE CLASSE S.....	87
<i>IV.1. Objectifs.....</i>	87
<i>IV.2. Choix de nouvelles mutations.....</i>	89
<i>IV.3. Activités biologiques des protéines mutées LukS-PV Gly10Cys et Ser22Cys.....</i>	89
<i>IV.4. Etude de l'accessibilité des résidus cystéine au DTNB.....</i>	92
<i>IV.5. Dimérisation des mutants LukS-PV Gly10Cys et Ser22Cys.....</i>	92
<i>IV.6. Activités biologiques de certains mutants de LukS-PV.....</i>	94
V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	94
CHAPITRE II.....	97
RESOLUTION DE LA STRUCTURE DES PROTEINES COMPOSANT LES LEUCOTOXINES.....	97
I. INTRODUCTION.....	98
II. ARTICLE N°2.....	99
III. CONCLUSION ET PERSPECTIVES OFFERTES PAR LA RESOLUTION DE LA STRUCTURE 3D DE LUKF-PV112	
CHAPITRE III.....	115
TENTATIVE DE DECOUPLAGE DE L'ACTIVITE CALCIUM-INDUCTRICE DE L'ACTIVITE FORMANT DES PORES DES LEUCOTOXINES A DEUX COMPOSES SUR LES POLYNUCLEAIRES HUMAINS.....	115
I. INTRODUCTION.....	116
II. ARTICLE N°3.....	117
III. DISCUSSION.....	137
IV. PERSPECTIVES.....	138
CHAPITRE IV.....	140
APPROCHE EPIDEMIOLOGIQUE DES INFECTIONS A STAPHYLOCOCCUS AUREUS EN AFRIQUE DE L'OUEST.....	140

I. PRESENTATION	141
II. ARTICLE N°4.....	142
III. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	161
CONCLUSION GENERALE.....	162
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	165
LISTE DES FIGURES ET DES TABLES.....	184

ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AMSD	4-Acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2' disulfonic acid disodium salt
BBP	Bleu de bromophénol
Bet	Bromure d'éthidium
BFP	BSA, Ficoll, PVP
BSA	Sérum albumine bovine
Ci	Curie
CIP	Calf Intestinal Phosphatase
CNDB	1-Chloro-2,4-dinitrobenzene
dATP	Désoxyadénosine triphosphate
dCTP	Désoxycytosine triphosphate
ddNTP	2',3'-Didésoxyribonucléotide triphosphate
DEAE	Diéthylaminoéthyl
dGTP	Désoxyguanosine triphosphate
dNTP	Désoxyribonucléotides 5' triphosphate
DO	Densité optique
DTAF	4,6 Dichlorotriazinyl amino-fluorescein
DTNB	Dithionitrobenzoate
DTT	Dithiothréitol
dTTP	Désoxythymidine triphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylène diamine tétraacétate
EGTA	Ethylène glycol-bis (β -amino éthyl éther) N, N, N' tétraacétate
FITC	Fluorescein 5, isothiocyanate
GST	Glutathion-S-transférase
FnBP	Fibronectin binding protein
<i>hlg</i>	Locus codant la gamma-hémolysine
HlgA, B, C	Composés A, B, C, constituants de la gamma-hémolysine
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LPV	Leucocidine de Panton et Valentine
<i>luk-PV</i>	Locus codant la leucocidine de Panton et Valentine

<i>lukS</i> -PV, <i>lukF</i> -PV	Gènes codant les composés S et F de la LPV, respectivement
MOPS	Acide 3-[N-morpholino] propane sulfonique
pb	Paire de base
PEG	Polyéthylène glycol
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PM	Poids moléculaire
PN	Leucocytes polynucléaires neutrophiles
p/v	Poids pour volume
PVP	Polyvinyl pyrrolidone
RNase A	Ribonucléase pancréatique
rpm	Révolution par minute
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis
SMM	Saccharose, acide malique, magnésium
SMMP	Saccharose, acide malique, magnésium, Penassay broth
SSC	Saline Sodium Citrate
SSPE	Saline Sodium Phosphate EDTA
TEMED	N, N, N', N'-tétraméthyl-éthylène diamine
<i>tet</i>	gène codant la résistance à la tétracycline
UV	Ultraviolet
v/v	Volume pour volume
X-Gal	5-bromo 4-chloro 3-indolyl β D-galactopyranoside

INTRODUCTION GENERALE

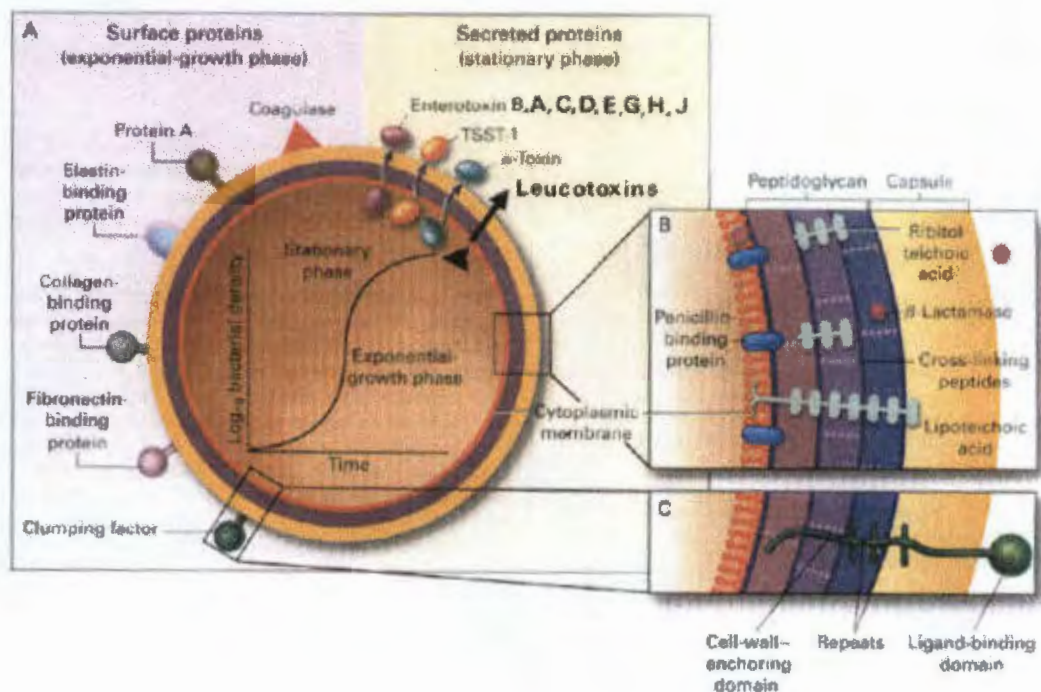


Figure 1 : *Staphylococcus aureus* et ses composants externes.

La synthèse de la majorité des protéines sécrétées sont régulées par plusieurs loci interdépendants : *agr*, *sar*, *rap*, *sig*. En rose, les protéines synthétisées durant la phase exponentielle, en jaune les protéines synthétisées en fin de phase exponentielle (schéma modifié d'après Lowy, 1998).

I. Généralités sur *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (*S.aureus*) appartient à la famille des *Micrococcaceae* (Avril et al., 1992). Ce sont des cocci à Gram positif producteurs d'une catalase, d'acétoïne et de coagulase, utilisant le mannitol mais dépourvus de β -galactosidase. C'est une espèce saprophyte, ubiquitaire, et présente chez l'homme à l'état commensal. Vingt-cinq à 50% des individus sont des porteurs sains de ce germe dans leurs fausses nasales et sur les surfaces humides de la peau. Lorsque les conditions physiologiques deviennent favorables, *S. aureus* peut coloniser des organes profonds tels que les os, les valves cardiaques, les poumons, le liquide céphalo-rachidien, le tube digestif, etc... Cet agent est responsable d'environ 20% des infections nosocomiales (Emori and Gaynes, 1993) et la multirésistance de nombre de ces souches aux différentes familles d'antibiotiques est une cause d'échecs thérapeutiques et de morbidité en milieu hospitalier. Ces aléas augmentent les séjours et les coûts d'hospitalisation.

S. aureus est une bactérie d'un intérêt médical important. Elle pose un problème de santé publique tant en raison des infections communautaires qu'en raison des risques de dissémination de certaines souches qui sont de plus en plus multi-résistantes aux antibiotiques et antiseptiques, à l'origine d'un grand nombre d'infections nosocomiales.

S. aureus est responsable de plusieurs types d'infection chez l'homme et les animaux avec de nombreux syndromes et signes cliniques différents : épidermolyse, impétigo, syndrome de choc toxique, abcès, furoncles (Couppié et al., 1997), dermatoses, ostéomyélites, atteintes polyviscérales, septicémies, infections respiratoires et neuroméningées, toxi-infections alimentaires (Bergdoll, 1983). Cette bactérie produit une variété de facteurs de survie et de virulence (toxines, enzymes, facteurs d'adhésion et d'opsonisation) qui sont impliqués dans sa pathogénie (**Figure 1**). La diversité et le nombre de ces facteurs de virulence expliquent certainement le polymorphisme des lésions provoquées par cette bactérie.

Les modalités de l'infection par les souches de *Staphylococcus aureus* ne sont pas encore très bien connues. Il est donc important pour nous d'étudier les différents mécanismes par lesquels ces bactéries provoquent les infections, afin de pouvoir mieux les combattre, de façon préventive ou curative. Des études épidémiologiques combinées à la toxinotypie permettent d'établir des associations entre les syndromes cliniques et la production des différents facteurs de virulence.

I.1. Identification

Après la coloration de Gram qui révèle des bactéries coccoïdes groupées en amas dont l'épaisse paroi retient le violet de gentiane, l'identification de *S. aureus* se fait souvent en laboratoire sur le milieu de Chapman qui contient du mannitol. *S. aureus* utilise le mannitol et acidifie le milieu qui vire du jaune au rouge en présence d'un indicateur de pH : ce milieu est

également riche en sel, ce qui permet de sélectionner ce germe légèrement halophile (Flandrois et al., 1997).

Les staphylocoques se distinguent des streptocoques par la production d'une catalase. D'autres caractéristiques biochimiques comme la production d'enzymes telles que les DNases, les protéases et surtout la coagulase permettent d'identifier *S. aureus*. La présence de protéine A peut également être recherchée.

I.2. Ecologie

C'est une bactérie ubiquitaire qui colonise l'homme dès sa naissance, au niveau des zones humides de la peau, du tube digestif et des régions périnéales, mais se trouve également dans les sols, l'air, et l'eau.

S. aureus vit à l'état commensal au niveau des muqueuses de l'homme et des animaux. Elle peut être cultivée en conditions aérobie ou anaérobie et s'adapte facilement à de grandes variations de pH (4,8-9,4) et de température de croissance (10-45°C) (Flandrois et al., 1997).

Staphylococcus aureus peut survivre longtemps dans l'environnement et croître en milieu salin [7,5 % (p/v) NaCl] ce qui permet l'utilisation de milieux sélectifs. Leur paroi est constituée en particulier de peptidoglycane et d'acide teichoïque. Cette paroi joue un rôle dans l'induction de cytokines produites par les lymphocytes. La plupart des souches perdent leur capsule en culture sur milieux riches.

I.3. Les infections à *Staphylococcus aureus*

Le polymorphisme des infections est une caractéristique que l'on rencontre que pour des bactéries comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* souvent responsables d'infections nosocomiales. Les infections à *S. aureus* concernent la plupart des organes à des degrés variables et sont souvent suppuratives et nécrotiques. Ces dernières peuvent se classer de la manière suivante :

I.3.1. Les suppurations localisées (Maleville et al., 1990)

Elles peuvent être cutanées. Les plus fréquentes sont les furoncles, les panaris, les abcès, les escarres, les anthrax, et l'impétigo. Ce dernier syndrome peut exister, sous plusieurs formes cliniques dont les principales sont : le syndrome de la peau ébouillantée contagieux qui intervient essentiellement chez l'enfant ou la forme bulleuse rencontrée le plus souvent chez le nouveau-né. Ces différentes infections cutanées atteignent spécifiquement certaines structures telles que l'épiderme, le derme, l'hypoderme, les glandes sudorales, les follicules pileux (Cribier et al., 1992b).....

On distingue aussi des infections des séreuses et des viscères telles que les ostéomyélites (souvent post-chirurgicales), les abcès du poumon, des méningites, de rares endocardites.

I.3.2. Les staphylococques systémiques

Elles présentent plusieurs tableaux cliniques. Elles peuvent être secondaires à n'importe quel foyer infecté. Elles sont caractérisées par d'importantes métastases. On distingue :

- les pleuropneumonies, les ostéomyélites, les méningites, les endocardites
- les septicémies aiguës fulminantes
- le syndrome de choc toxique.

I.3.3. Les manifestations digestives

Les plus fréquentes sont les toxi-infections alimentaires causées par les entérotoxines (A ou B) produites par *S. aureus* (Bergdoll, 1983). Les signes cliniques sont le vomissement rapide après l'ingestion d'aliments souillés, des douleurs abdominales, un malaise, des diarrhées.

On distingue aussi des entérocolites aiguës pseudomembraneuses qui sont peu fréquentes, mais aussi des diarrhées post-antibiothérapie, qui doivent être documentées en tenant compte de la forte fréquence d'isolement de *Clostridium difficile* (Surgalla and Dack, 1955).

II. Facteurs de pathogénicité de *Staphylococcus aureus* :

II.1. Facteurs de virulence

II.1.1. Les Toxines

II.1.1.1. L' Alpha-toxine (cf III.3.1)

II.1.1.2. La Bêta-toxine

C'est une hémolysine thermostable (29 kDa) qui résiste aux variations physico-chimiques. Elle a une activité phospholipase de type C (sphingomyélinase) qui déstabilise les membranes des cellules de mouton, de chèvre et de bœuf (Fleurette, 1989). Elle est surtout produite par les souches d'origine animale (94 %), alors que la production est plus rare (18 %) chez les souches d'origine humaine (Möllby, 1989).

II.1.1.3. La Gamma-hémolysine (cf III.3.2.1.2)

II.1.1.4. La Delta-toxine

Cette toxine de 26 acides aminés a une structure en hélice-alpha amphiphile et agit comme un détergent (Linder and Bernheimer, 1991). Elle n'a pas de spécificité cellulaire, mais détruit surtout les érythrocytes d'homme et de cheval. Son action est totalement inhibée par le sérum sanguin, le fibrinogène, les globulines sériques alpha et bêta et les phospholipides. Elle est synthétisée par 93 % des souches animales contre 40 % des souches humaines (Möllby, 1989).

II.1.1.5. Les Leucotoxines (cf III.3.2)

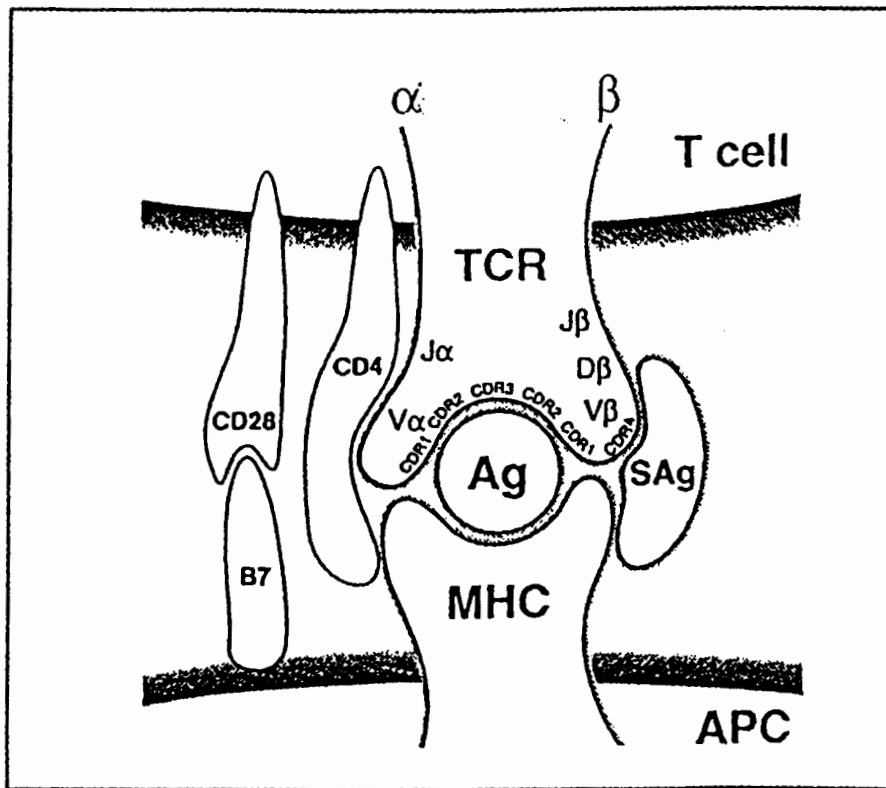


Figure 2 : Modèle de l'interaction des superantigènes (sAg) et des antigènes (Ag) avec les récepteurs des cellules T et les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (Hla DR) de classe II (MHC) portées par les cellules présentatrices de l'antigène (APC).

II. 1.1.6. Les Entérotoxines

Les entérotoxines sont des protéines thermostables (26-30 kDa) qui comprennent plusieurs types antigéniques : A, B, C1, C2, C3, D, E, G, H et J. Deux tiers environ des souches de *Staphylococcus aureus* produisent indifféremment une ou plusieurs de ces entérotoxines (Bergdoll, 1983; Bergdoll et al., 1981; Jaulhac et al., 1992). Les types A et B sont souvent impliqués dans les toxi-infections alimentaires à *Staphylococcus aureus*. Ces intoxications alimentaires se produisent lors de la consommation de produits laitiers non pasteurisés, de pâtisseries, de sauces, de charcuteries et de viandes contaminées par les toxines ou les bactéries productrices. Elles semblent induire une excrétion locale de diverses cytokines qui pourraient avoir un rôle dans l'apparition des symptômes observés (Fleurette, 1989).

En bloquant l'interaction entre le complexe majeur d'histocompatibilité II et le récepteur cellulaire du lymphocyte T (**Figure 2**), les entérotoxines stimulent l'activation de plusieurs sous-classes lymphocytaires V β -dépendant, ce qui entraîne la libération de médiateurs de l'inflammation tels que des cytokines, des interleukines et des interférons qui sont impliqués dans l'apparition des symptômes du choc staphylococcique.

II.1.1.7. Toxine du Syndrome de choc Toxique (TSST-1)

Cette toxine fut retrouvée dans plus de 90% des souches de *Staphylococcus aureus* impliquées dans des chocs toxiques dont l'origine est une contamination par des tampons vaginaux (Todd, 1988) ou des souches contaminant des plaies d'apparence bénigne. Cependant, une enquête a révélé que 11 % des porteurs sains à *S. aureus* possède une souche qui peut produire la TSST-1 (Jaulhac et al., 1991). Les chocs toxiques se caractérisent par des maux de tête, la diarrhée, la conjonctivite, mais les trois symptômes déterminants sont une forte fièvre (< 39°C), une hypotension artérielle, et une érythrodermie desquamative diffuse ou limitée.

II.1.1.8. Les Epidermolysines A et B (ETA, ETB)

Encore appelées Exfoliatines, ces toxines sont responsables chez le nouveau-né et le jeune enfant, du syndrome staphylococcique de la peau ébouillantée et de l'impétigo bulleux (Piémont et al., 1988; Ritter von Rittershain, 1878). Elles ont un tropisme cutané et se fixent sur certaines protéines intracellulaires des kératinocytes (Brian et al., 1993), ce qui se traduit par un clivage intra-épidermique entre le *stratum granulosum* et le *stratum spinosum* entraînant ainsi des lésions bulleuses (Piémont et al., 1988; Wuepper et al., 1975). Seulement 5% des souches de *Staphylococcus aureus* produisent ces toxines (Piémont et al., 1984).

La toxine ETA a été cristallisée et sa structure tridimensionnelle déduite (Cavarelli et al., 1997). Elle semble être l'unique membre d'une nouvelle famille de protéases à sérine active de type trypsine. Toutefois, certains auteurs proposent un rôle de superantigène qui ne semble pas lié aux symptômes cliniques majeurs, observés lors de la maladie (Choi et al., 1989).

Deux autres types d'exfoliatine ont été décrits, l'un chez *S.aureus* (Sato et al., 1994) et l'autre chez *Staphylococcus hyicus* (Sato et al., 1994). La séquence et la caractérisation du mode d'action de ces toxines n'est pas encore connu.

II.1.1.9. La Coagulase

C'est l'un des principaux facteurs qui permettent de distinguer *Staphylococcus aureus* des autres espèces de staphylocoques. Elle provoque la coagulation du plasma de lapin citraté. Elle peut également agir sur la prothrombine. Son action consiste à protéger le staphylocoque de la phagocytose en l'englobant de fibrine et favoriserait ainsi sa multiplication et son essaimage.

II.2. Les Facteurs d'adhésion

II.2.1. La Protéine A

C'est une protéine de 48 kDa de masse molaire, produite par la grande majorité (95%) des souches de *Staphylococcus aureus* rencontrées chez l'homme, mais existant sous forme de variants (Finck-Barbançon et al., 1992; Lofdahl et al., 1983; Patel et al., 1987). Elle est généralement intégrée à la paroi des bactéries. Elle se lie aux fragments Fc de toutes les sous classes d'immunoglobulines G sauf les IgG3. Toutefois, des variants tronqués fixent préférentiellement à certaines sous-classes d'IgG (Finck-Barbançon et al., 1992). Cette protéine joue donc un rôle dans le système de défense de la bactérie en empêchant la phagocytose et l'activation du complément (Gemmell et al., 1990; Peterson et al., 1977). La protéine A est souvent utilisée en chromatographie d'affinité et pour l'immunodiagnostic.

II.2.2. Les Adhésines

Ce sont des protéines transmembranaires situées à la surface de la bactérie et qui interagissent avec les protéines cellulaires de l'hôte. Elles peuvent reconnaître des éléments de la matrice extracellulaire de l'hôte. C'est pourquoi elles sont appelées **MSCRAMMs** (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) (Patti et al., 1995) (Foster and Höök, 1998). Ces adhésines jouent un rôle important dans la pathogénie de *Staphylococcus aureus*, car elles sont impliquées dans l'initiation et l'évolution de la plupart des infections à *S. aureus* en permettant l'adhésion de la bactérie sur les différents tissus cellulaires (Patti et al., 1994). On distingue les Adhésines associées aux endocardites à *S. aureus* (Baddour, 1994), les Adhésines associées à des ostéomyélites et à des cas d'arthrite (Switalski et al., 1993), mais des recherches exhaustives restent à effectuer. *S. aureus* se fixe au niveau des cartilages grâce à des MSCRAMMs qui se lient au collagène favorisant le développement d'arthrites septiques (Patti et al., 1994). Dans le cas des ostéomyélites, des MSCRAMMs reconnaissent une sialoprotéine osseuse (Ryden et al., 1989).

II.2.3. Les "Fibronectin binding protein"

Kuusuela fut le premier à montrer dès 1978 que *S. aureus* se lie à la fibronectine (Fn) qui joue un rôle très important dans l'adhésion des cellules eucaryotes au substrat (Kuusuela, 1978). Cette fixation s'effectue grâce à deux molécules, clonées et séquencées, appelées FnBP A (Foster and Höök, 1998) et FnBP B (Jonsson et al., 1991; Signas et al., 1989). Grâce à ces protéines, *S. aureus* se lie directement aux tissus par la fibronectine insoluble qui leur est associée ou indirectement par la fibronectine soluble qui se fixe sur les tissus par des interactions fibronectine - fibrine, fibronectine - collagène, ou fibronectine - fibronectine (Kuypers and Proctor, 1989). Cette fixation de la fibronectine constitue une étape cruciale dans la colonisation des tissus de l'hôte et le développement des infections à *Staphylococcus aureus*.

II.2.4. Les "Laminin binding protein"

Staphylococcus aureus se fixe sur la laminine grâce à des molécules appelés "laminin binding protein" situées à la surface de la bactérie (Lopes et al., 1985). Ces molécules permettraient l'interaction de *S. aureus* avec les membranes basales et la traversée des tissus selon le même processus que les cellules cancéreuses métastatiques, les macrophages ou les leucocytes qui possèdent également des récepteurs à la laminine.

II.2.5. La "Collagen binding protein"

Le collagène est un constituant majeur des matrices extracellulaires. Il existe plusieurs formes de collagène : le type I rencontré dans la dentine, le type II (cartilage), type IV (membranes basales). La bactérie *Staphylococcus aureus* se fixe au collagène (Holderbaum et al., 1986; Speziale et al., 1986) grâce à une adhésine codée par le gène *cna* (Patti et al., 1994). Cette adhésine est nécessaire et suffisante pour permettre à *S. aureus* d'adhérer aux cartilages (Switalski et al., 1993) et être à l'origine d'arthrites septiques (Patti et al., 1994).

II.2.6. Les "Fibrinogen binding protein"

S. aureus se fixe au fibrinogène grâce à plusieurs types de ligands : deux coagulases de poids moléculaires respectifs 87 kDa et 60 kDa (Boden and Flock, 1992), le «clumping factor» de 130 kDa appelé encore facteur d'adhésion au fibrinogène (FAF) (McDevitt et al., 1992) et une protéine de 19 kDa (Boden and Flock, 1994). Ce sont des molécules extracellulaires présentes dans les surnageants de culture de staphylocoque.

III. Principaux types de toxines formant des pores et les événements conduisant à la perméabilité membranaire

III.1. Les toxines formant des pores: introduction

Les bactéries pathogènes possèdent un arsenal de toxines qui vont favoriser l'acquisition des nutriments, permettre la multiplication bactérienne, et favoriser le contournement des

défenses de l'hôte. Parmi celles-ci, les toxines formant des pores constituent le groupe de toxines bactériennes le plus important puisqu'au nombre actuel de plus de 150, elles sont produites par la plupart des bactéries pathogènes. Leurs sites d'action peuvent être situés à deux niveaux, ce qui permet de les classer en deux grands groupes :

- le premier groupe est constitué par les toxines qui agissent au niveau des membranes des cellule-cibles pour rompre la perméabilité membranaire ou pour les activer en mettant en jeu des éléments de la transduction du signal (Li, 1992)
- le deuxième groupe est constitué par les toxines qui s'insèrent dans la membrane, pour pénétrer éventuellement dans le compartiment intracellulaire ou permettre la pénétration d'une protéine comparse (Montecucco et al., 1994) dont l'activité enzymatique peut annihiler le métabolisme cellulaire (Collier, 1990).

Ces toxines sont des protéines sécrétées sous forme de molécules hydrosolubles. Cet état paraît incompatible avec leur rôle d'interaction avec les membranes constituées de bicouches lipidiques hydrophobes. Quel que soit leur site d'action, ces toxines doivent forcément interagir avec la membrane, afin d'atteindre leurs cibles. Elles doivent pouvoir évoluer d'un état soluble à un état hydrophobe grâce à des modifications conformationnelles concertées permettant de redéployer les structures.

Ces toxines sont souvent sécrétées sous forme de monomères (Lesieur et al., 1997), qui après la fixation s'oligomérisent à la surface de la membrane pour former des pores grâce à l'insertion transmembranaire d'une structure présentant une surface hydrophobe et modifier sa perméabilité. Ces monomères peuvent être identiques dans de nombreux cas comme pour l'alpha-toxine de *Staphylococcus aureus*, ou différents par leur structure primaire dans le cas des leucotoxines. (Prévost et al., 1998; Song et al., 1996).

Parmi les toxines formant des pores on peut également inclure la toxine diphtérique (hélice α), la toxine LT d'*E. coli* et l'exotoxine A de *Pseudomonas aeruginosa* dont la/les sous unités B permettent au fragment A de passer du phagolysosome dans le cytoplasme. De même le facteur PA (Protective Antigen) (Petosa et al., 1994) qui est une protéine à feuillet β , permet l'entrée des facteurs œdémateux (EF) et léthal (LF) de la toxine de l'anthrax (charbon). L'aérolysine d'*Aeromonas hydrophyla* (Chakraborty et al., 1990) est synthétisée sous la forme d'un protomère de 51 kDa. Elle est ensuite activée à la surface de la cellule par une protéase de type furine avant de créer un pore heptamérique dans les membranes de nombreuses cellules.

Les mécanismes d'action de ces toxines formant des pores diffèrent selon leur composition structurale et leurs sites d'action, on peut distinguer deux sous-groupes en fonction de leurs structures secondaires.

III.2. Les toxines à hélices alpha hydrophobes et amphipatiques.

On rencontre dans ce groupe de protéines, l'exotoxine A de *Pseudomonas aeruginosa*, nombre de bactériocines comme les colicines d'*E. coli*, la Cri δ -endotoxine de *Bacillus*

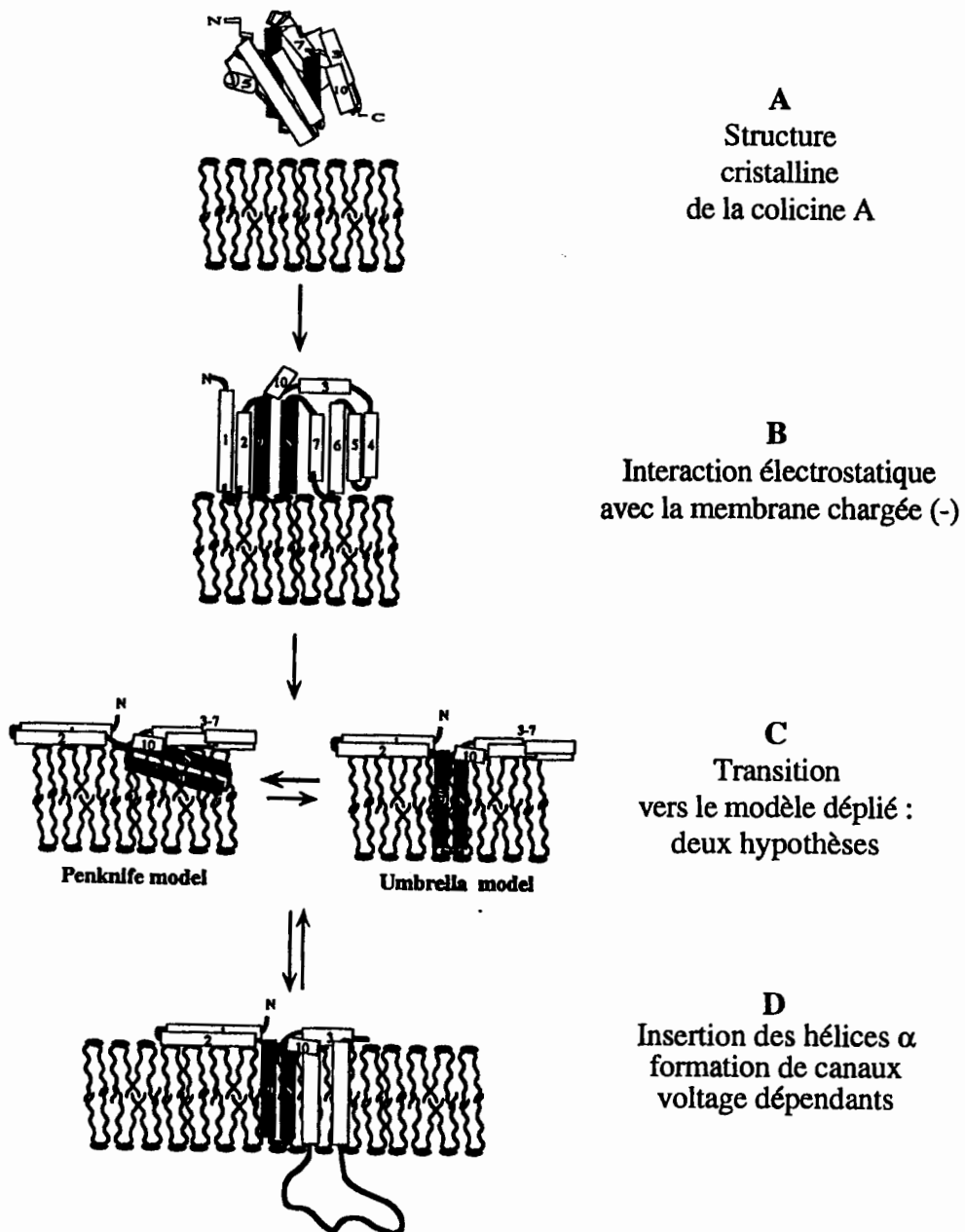


Figure 3 : Schéma de formation des pores par les colicines. La structure exacte du canal ouvert n'est pas encore déterminée, de même que le nombre d'hélices qui pénètrent la membrane sous l'influence du potentiel de membrane (D'après Lesieur *et al.* 1997, # 168).

thuringiensis. (Li et al., 1991). Il existe une grande similitude entre les domaines d'interaction avec la membrane de ces différentes protéines (Parker and Pattus, 1993). Ces domaines sont constitués de plusieurs hélices- α : disposées en trois couches soit 10 pour la colicine A d'*E. coli* (6 pour l'exotoxine A de *Pseudomonas aeruginosa*). Les couches externes sont constituées par au moins deux hélices- α amphipatiques et antiparallèles qui encadrent le plan interne constitué par une ou deux hélices α hydrophobes (Cramer et al., 1995). Cette disposition permet à la protéine de pouvoir traverser la bicouche lipidique de la membrane par des phénomènes de repliement et de dépliement qui lui permettent d'exposer tantôt les structures hydrophobes tantôt les structures hydrophiles en fonction de l'environnement. On observe de multiples changements conformationnels jusqu'à l'insertion dans la membrane (Parker et al., 1990). Ces changements conformationnels augmentent la flexibilité de la protéine, mais n'affectent pas sa structure secondaire (Bychkova and Ptitsyn, 1993). Les fortes variations de pH, des températures élevées ou la présence de charges négatives à la surface de la membrane favorisent le repliement de la protéine (London, 1992; van der Goot et al., 1992). Nous allons illustrer le mode d'insertion de ces protéines dans la membrane en prenant pour exemple la colicine A de *E. coli*.

III.2.1. La Colicine A d'*E. coli*

C'est une toxine formant des pores, codée par un plasmide. Le domaine responsable de la formation des pores a un poids moléculaire de 21 kDa et est constitué d'un paquet de 10 hélices α : 2 hélices α hydrophobes (hélices 8 et 9) et 8 hélices α amphipatiques (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, et 10) (Parker et al., 1989; Wiener et al., 1997). Elle a pour cibles les membranes bactériennes et son action se traduit par la formation de canaux voltage dépendant au niveau de la membrane interne (Cramer et al., 1995; Lakey et al., 1994). Cette protéine s'insère dans la membrane en trois étapes (**Figure 3**) :

III.2.1.1. Interaction avec la membrane plasmique

La toxine interagit de façon électrostatique avec les charges négatives des groupements phosphate des lipides de la bicouche (Cramer et al., 1995; Lakey et al., 1994) par l'intermédiaire des hélices hydrophobes 8 et 9 (**Figure 3**). On observe alors une baisse locale du pH qui crée un environnement favorable à une flexibilité de la protéine.

III.2.1.2. Insertion dans la membrane plasmique

Cette flexibilité de la protéine permet l'insertion des hélices 8 et 9. Il y a formation d'une boucle hélicoïdale qui peut adopter deux orientations possibles : soit elle s'insère parallèlement au plan de la membrane (modèle "penknife") (Lakey et al., 1993), soit elle s'insère perpendiculairement au plan de la membrane (modèle du "parapluie") (Parker et al., 1990).



Figure 4 : Structure tridimensionnelle de la proaérolysine obtenue à 2,8 Å de résolution (D'après Parker, 1994). Cette protéine de 52 kDa sera activée et perdra son domaine I par une protéolyse de type furine. La structure du pore formé par cette toxine n'est pas encore élucidée.

A



B

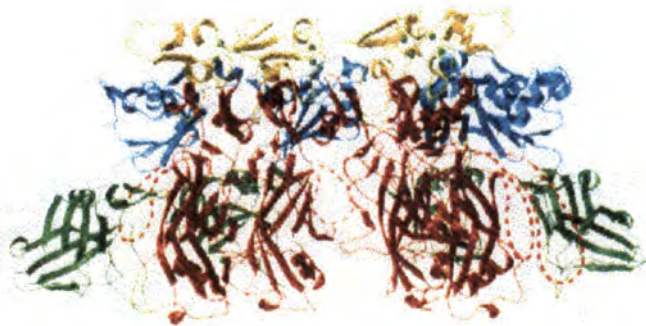


Figure 5 :Structure tridimensionnelle, obtenue à une résolution de 2,1 Å, de l'heptamère hydrosoluble formé par le facteur PA ("Protective Antigen") de la toxine du charbon ou anthrax [D'après Petosa *et al.*, 1994].

III.2.1.3. Formation du pore

Dans le cas du modèle du parapluie, en présence d'un potentiel membranaire la pénétration d'un certain nombre d'hélices α amphipatiques à l'intérieur de la membrane entraîne la formation d'un pore dont on ne connaît pas encore la structure exacte. (Parker et al., 1990). Le nombre exact d'hélices qui s'insèrent dans la membrane n'est pas encore définitivement connu (5 à 8).

III.3. Les toxines à feuillets β prépondérants

Ce groupe comprend entre autres l'aérolysine d'*Aeromonas hydrophila* (Figure 4), le protective antigen de la toxine du charbon (Figure 5), l' α -toxine de *Clostridium septicum*, l' α -toxine de *Staphylococcus aureus*, la cytotoxine de *Pseudomonas aeruginosa* (Lesieur et al., 1997), et les leucotoxines à deux composés de *Staphylococcus aureus*. Contrairement au groupe précédent, ces toxines ne contiennent pas d'hélices α hydrophobes. Ce sont des toxines riches en feuillets β (55–75%). Leur mode d'action consiste en une rupture de la perméabilité membranaire en créant des pores ou des canaux dans cette membrane. Il semble que ce soit aussi des activateurs cellulaires. Les structures d'un certain nombre de toxines appartenant à ce sous-groupe ont été récemment élucidées (Li et al., 1996; Morgan et al., 1993; Parker et al., 1994; Song et al., 1996). La spectroscopie et la cristallographie couplée aux Rayons X ont permis de montrer que la structure de ces toxines à feuillets β prépondérants est proche de celle des porines. Les porines sont en réalité constituées de trimères de tonneaux β . Chaque tonneau est formé par un paquet de 16 à 18 brins β tous antiparallèles entre eux et formant des liaisons hydrogènes avec leurs voisins (Schulz, 1996).

L'une des questions essentielles consiste à décrire comment des protéines synthétisées sous forme de monomères solubles et ne possédant pas de caractères hydrophobes très marqués qui vont s'insérer dans la membrane plasmique et s'adapter à un environnement hydrophobe.

La solution adoptée par ces toxines se trouve dans leur organisation tridimensionnelle. Dans la partie médiane de la séquence de ces protéines se trouvent deux longs β -feuillets consécutifs antiparallèles et de même longueur. Ces brins β , renferment une alternance de résidus polaires et de résidus non polaires. Les brins β de chaque monomère s'assemblent en exposant leurs résidus non polaires vers l'extérieur, afin de constituer une surface hydrophobe capable d'interagir avec la membrane, les résidus polaires étant rejetés vers l'intérieur, ils constituent ainsi la lumière du pore plus ou moins hydrophile. Après l'oligomérisation des monomères la structure formée peut s'insérer dans la membrane plasmique et former des pores (Song et al., 1996).

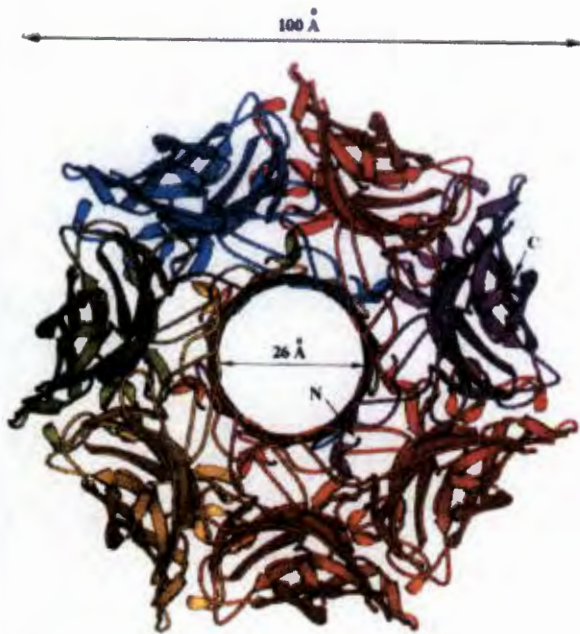
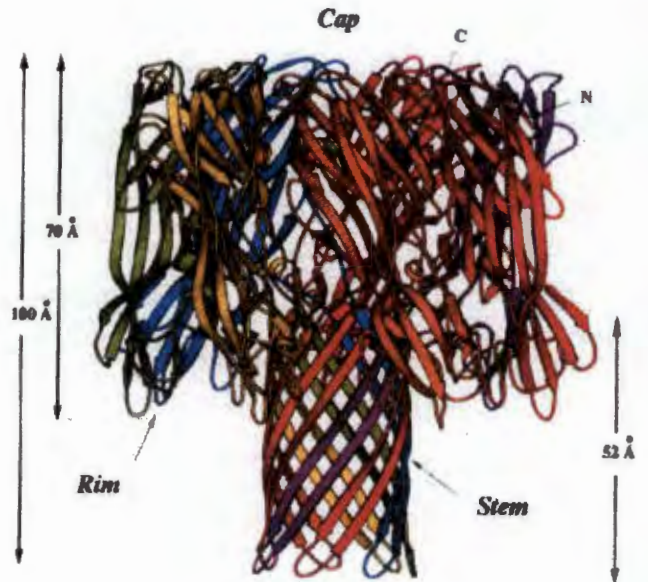
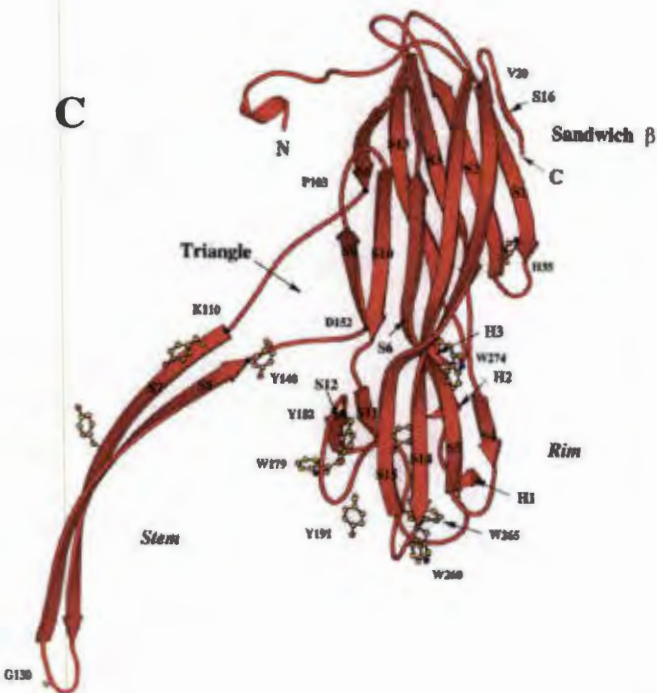
A**B****C**

Figure 6 : Structure tridimensionnelle du pore formé par l'alpha-toxine de *Staphylococcus aureus* obtenue avec une résolution de 1,9 Å
A : vue supérieure du pore heptamérique avec la lumière de celui-ci. **B** : vue de profil, le pore s'insère dans la membrane au niveau du *Stem* et de la partie inférieure du *Rim*, laissant émerger la partie supérieure (*Cap*) hors de la membrane. **C** : structure, par extraction de l'heptamère d'un monomère de l'alpha-toxine ; cependant il est peu probable que le *Stem* et l'extrémité N-terminale de l'alpha-toxine soient ainsi stabilisées dans la forme hydrosoluble (d'après Song *et al.*, 1996).

III.3.1. L' α -toxine de *Staphylococcus aureus*

III.3.1.1. Structure de l' α -toxine

L' α -toxine est une exotoxine sécrétée sous forme de monomère soluble constitué de 293 acides aminés d'une masse totale de 33,4 kDa (Bhakdi et al., 1996). L'analyse par protéolyse limitée a montré que le monomère de l' α -toxine est constitué de deux régions de masses apparentes égales séparées par une région riche en glycine située entre la **lysine 110** et la **tyrosine 148 (K110-Y148)** et formant ainsi une boucle (Gouaux et al., 1998). Cette boucle devient inaccessible à la protéolyse lorsque l' α -toxine se lie à la membrane et elle semble pénétrer dans la bicouche lipidique. Ceci a été mis en évidence par la perte de fluorescence du mutant cystéine de l' α -toxine (G130C) (Ward et al., 1994). Chaque protomère est constitué de 16 brins β antiparallèles et de 4 hélices α (Gouaux et al., 1998). Le reste de la structure est formé d'hélices non α et des éléments non β (Gouaux et al., 1998). L'oligomérisation de ces protomères aboutit à une structure qui ressemble à un champignon haut de 100 Å et dont le diamètre de la surface supérieure est de 100 Å. L'observation de cette structure vue du haut donne l'image d'un canal ionique dont le diamètre varie de 46 à 15Å en s'enfonçant vers l'espace intracellulaire (Song et al., 1996). Cette structure en champignon (**Figure 6**) peut être divisée en 3 régions principales (Song et al., 1996) :

1- le **Cap** (chapeau) qui représente la surface supérieure du champignon. Chacun des 7 protomères participe à cette région par la contribution d'un β sandwich. Le cap comprend donc 7 β sandwich. C'est une région hydrophile.

2- le **Rim** a une hauteur de 70 Å et constitue la couronne. Elle représente la face inférieure de chapeau. Cette région est riche en structure non β et non α . Cette région pourrait être impliquée dans les changements conformationnels qui conduisent à l'oligomérisation. Elle semble s'ancrer dans la face externe de la membrane

3- le **Stem** constitue le pied du champignon a une hauteur de 52 Å et un diamètre externe de 26 Å. Il définit le canal ionique transmembranaire formé par l'association de 14 brins β antiparallèles formant ainsi un tonneau β .

La fente située entre le Stem et le Rim constitue une zone riche en acides aminés aromatiques et en acides aminés basiques. Elle constituerait un site d'interaction avec les têtes phospholipidiques de la bicouche lipidique, voire avec des ligands membranaires.

III.3.1.2. Mode d'action de la toxine

L' α -toxine a une action sur une large gamme de cellule-cibles. C'est une hémolysine importante dans la pathogénie de *Staphylococcus aureus*. Elle a une forte activité hémolytique

sur les érythrocytes de lapin et dans une moindre mesure sur ceux de l'homme, du chien, de la souris et du mouton. Son activité a également été démontrée sur les lymphocytes (Bhakdi and Trantum-Jensen, 1991; Jonas et al., 1994), les plaquettes, les kératinocytes et les fibroblastes humains (Abrami et al., 1998). C'est aussi une protéine faiblement dermonécrotique et cytolytique. Elle est produite par la plupart des souches de *Staphylococcus aureus* (>90 %). Les monomères s'oligomérisent à la surface des cellule-cibles au niveau de la membrane plasmique pour y former un pore heptamérique d'une masse moléculaire de 234,4 kDa (Bhakdi et al., 1996). La formation du pore induit un flux d'ions (Na^+ , K^+ , Cl^-), une perte d'eau et de molécules de faible poids moléculaire. Ceci se traduit par une lyse de la cellule. La sensibilité à l' α -toxine des cellule-cibles telles que les érythrocytes d'homme et les plaquettes d'homme et de lapin est variable, ce qui suggère que ces cellules possèdent un ligand membranaire particulier pour cette toxine (Hildebrand et al., 1991), mais celui-ci n'a été que faiblement recherché. Le processus de formation du pore peut se résumer en quatre étapes (Gouaux et al., 1998). Le monomère de l' α -toxine soluble est libre en solution sans aucune interaction. Il se lie ensuite à la membrane plasmique en faible concentration probablement en interaction avec un ligand membranaire qui n'est pas encore identifié, puis débute une oligomérisation avec les monomères adjacents. Il y a donc une oligomérisation des monomères par des interactions non covalentes. Les domaines de chaque monomère qui contribuent à la formation du pore suivent de multiples modifications conformationnelles avant la formation d'un pré-pore. Ce mécanisme d'assemblage a été bloqué en utilisant divers mutants de l' α -toxine déficients dans l'oligomérisation (Gouaux et al., 1998). Ce pré-pore est non lytique. La dernière étape consiste en une consolidation et à la configuration finale du pore heptamérique par l'insertion d'une partie de l'oligomère à l'intérieur de la membrane plasmique.

- La région riche en glycine située entre la **lysine 110** et la **tyrosine 148** participe à l'ancrage dans la membrane plasmique, ceci a été démontré par la variation de fluorescence selon la polarité de l'environnement (blue-shift) du mutant G130C marqué à l'acrylodan (Valeva et al., 1996; Walker and Bayley, 1995).

- Des mutations de la région N-terminale de l' α -toxine et de la boucle riche en glycine conduisent à des molécules dont l'assemblage s'arrête au stade de pré-pore et qui sont non lytiques. Ceci laisse penser que cette région N-terminale et la boucle coopèrent dans la consolidation du pré-pore et l'insertion dans la membrane.

- La mutation de l'histidine 35 en acide glutamique (His35Gln) et en asparagine (His35Asn) dans l' α -toxine provoque un blocage de l'oligomérisation au stade de pré-pore (Walker and Bayley, 1995)

- Le remplacement de l'histidine 35 par d'autres acides aminés telle que la proline, la leucine,

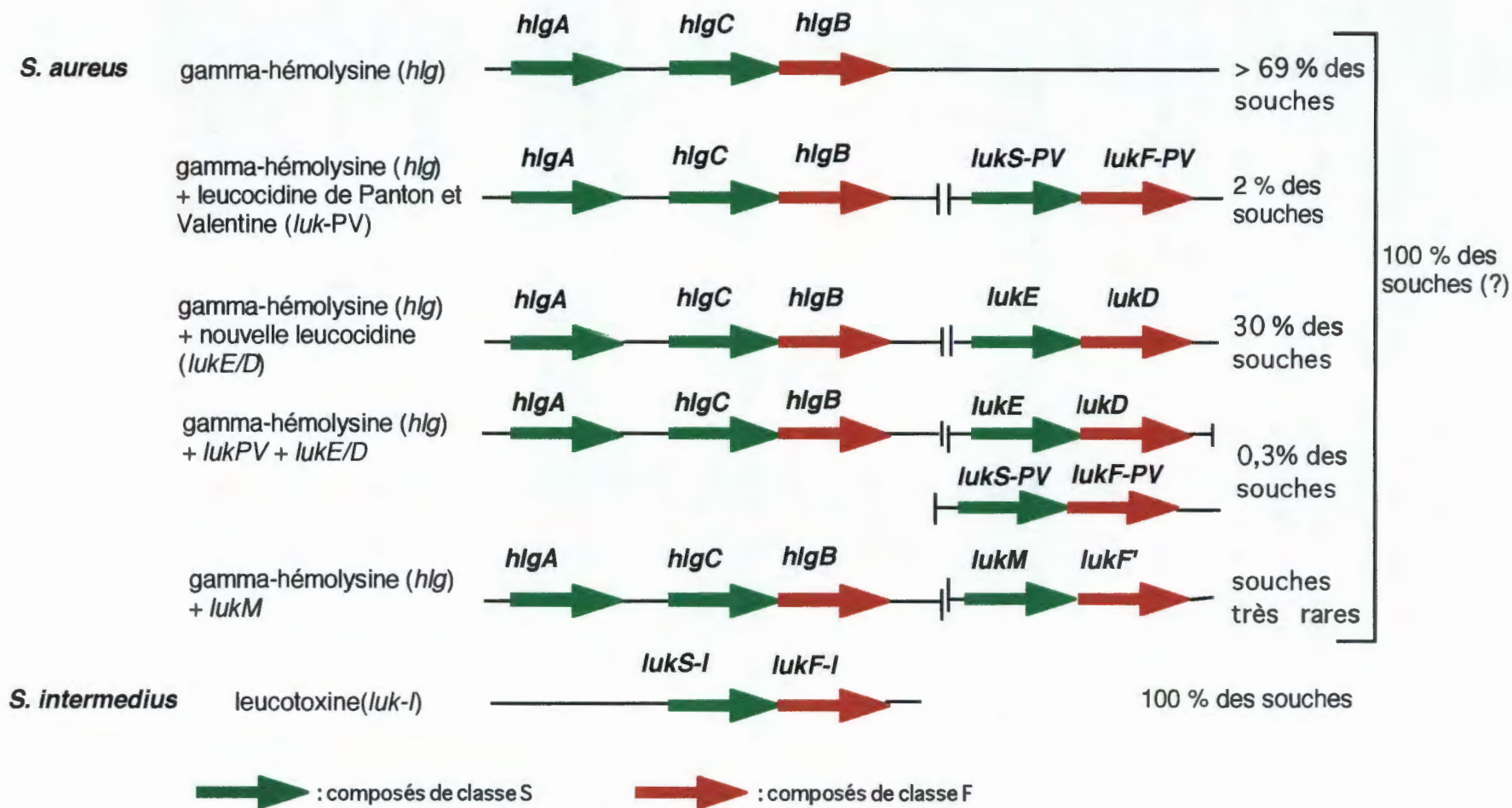


Figure 7 : LA FAMILLE DES LEUCOTOXINES de STAPHYLOCOQUES :
Schéma des différentes combinaisons des gènes chromosomiques codants et leur fréquence.

l'isoleucine, l'arginine, la sérine et la thréonine conduit à des protéines inactives (Walker and Bayley, 1995)

- L'utilisation de mutants cystéine marqués à l'acrylodan a mis en évidence un peptide de 15 acides aminés (126-140) essentiel pour la formation du pore transmembranaire (Valeva et al., 1995) où un certain nombre d'acides aminés passe d'un environnement hydrosoluble à un environnement hydrophobe.

III.3.2. Les Leucotoxines à deux composés

III.3.2.1. Principaux membres

Ce sont des toxines à deux composés, l'un dit de classe "S" (31-32 kDa) et l'autre dit de classe "F" (34-35 KDa) qui sont sécrétés de façon non associée dans le surnageant de culture (Prévost et al., 1995c; Supersac et al., 1993). Sur le plan structural les composés de la même classe possèdent 60 à 75% d'identité de séquence alors que les composés de classes différentes ont des identités de séquence de 15 à 25 % (**Figure 7**, **Figure 8**) (Prévost et al., 1995c). Elles agissent en synergie sur la membrane des cellule-cibles en activant le métabolisme du calcium et en créant des pores de taille ionique dans des cellules de défense de l'organisme (Colin et al., 1994) (Polynucléaires, monocytes, macrophages etc...). Ces protéines sont insolubles dans les solutions usuelles à une concentration supérieure à 7,5 mg/ml, thermolabiles et sensibles à un pH < 5,5. La spectroscopie à Infrarouge en Réflectance Atténuée par Transformée de Fourier (ATR-FTIR) révèle une prédominance de feuilletts β (70 à 75%) dans les structures secondaires de ces leucotoxines (Meunier et al., 1997) ce qui les différencie des colicines à hélices α (Lesieur et al., 1997). Les principaux membres de cette famille de toxines staphylococciques sont :

III.3.2.1.1. La Leucocidine de Panton et Valentine

Le terme leucotoxine a d'abord été évoqué en 1894 par Van de Velde (Van der Velde, 1894). Il avait constaté que l'injection de la bactérie *Staphylococcus aureus* dans la cavité pleurale de lapin produisait un effet leucotoxique.

Pendant très longtemps la LPV a été confondue avec les hémolysines. Ce n'est qu'en 1932 que Panton et Valentine (Panton et al., 1932) ont identifié l'activité leucocytolytique de la LPV à partir de l'étude de 22 souches de *Staphylococcus aureus* isolées de diverse infections staphylococciques. Les surnageants de culture obtenus à partir de ces souches avaient une activité hémolytique sur les globules rouges de lapin et pouvaient aussi détruire les leucocytes humains. Ils ont constaté que l'activité hémolytique et l'activité leucocytolytique ne sont pas forcément liées (Julianelle, 1922; Panton et al., 1932). Certaines souches isolées à partir de furoncles ou de complications de furoncles possédaient une forte activité leucocytolytique alors

que l'activité hémolytique était très faible. Panton et Valentine ont ainsi conclu à l'existence d'une leucotoxine différente des hémolysines qui sera dénommée en 1936 par Wright : Leucocidine de Panton et Valentine (Wright, 1936).

Cette leucotoxine a été purifiée pour la première fois en 1960 par Woodin (Woodin, 1960) à partir de la souche V8 (ATCC49775) de *S. aureus*. Il a démontré qu'elle était constituée de deux composés séparables en chromatographie : l'un de 32 kDa dit de classe F (fast-eluted) parce qu'il est élué plus rapidement sur une colonne de carboxyméthyl-cellulose, alors que l'autre de 38 kDa dit de classe "S" (Slow-eluted) est retardé. Les gènes codant ces deux composés ont été clonés et séquencés et un nouveau protocole de purification a été proposé (Prévost et al., 1995c). Ces deux composés appelés respectivement LukF-PV et LukS-PV sont sécrétés séparément dans les surnageants de culture et n'ont aucune activité biologique lorsqu'ils sont analysés individuellement. Ils agissent en synergie sur la membrane des cellule-cibles provoquant la formation de pores de taille ionique, ce qui augmente la perméabilité membranaire aux ions. Notre laboratoire, grâce à des tests d'immunoprécipitation radiale en gel (Finck-Barbançon et al., 1991), a pu montrer que la LPV est produite par 2% des souches de *S. aureus* isolées en clinique humaine (Couppié et al., 1994). Ces souches sensibles aux antibiotiques sont étroitement liées à des infections cutanées primaires et nécrosantes comme les furoncles (Cribier et al., 1992a; Cribier et al., 1992b; Cribier et al., 1992c; Prévost et al., 1995b). Les souches productrices de la LPV isolées de furoncles sont responsables dans certains cas de septicémies et d'abcès pulmonaires (Couppié et al., 1997).

Les effets de cette leucotoxine sont variés et ont fait l'objet de plusieurs études. Gladstone et Van Heyningen ont montré que la LPV avait une spécificité cellulaire. Elle est active *in vitro* sur les granulocytes d'homme et de lapin alors que ceux de mouton, de cobaye et de souris sont insensibles. Ils confirmèrent l'absence d'activité hémolytique de la LPV (Gladstone and Van Heyningen, 1957).

Woodin fut le premier à étudier l'effet de la LPV sur les cellule-cibles. Il montrait que cette toxine modifiait les échanges ioniques et le métabolisme cellulaire (Woodin, 1972b). En fonction de la dose de toxine, il observait une activation des pompes Na^+/K^+ (Woodin and Wieneke, 1968) et une excrétion de protéines (Woodin, 1962), puis une accumulation de Ca^{2+} intracellulaire (Woodin and Wieneke, 1963a). Il observait également une stimulation de l'activité adénylate cyclase (Woodin, 1972a) et une augmentation du métabolisme cellulaire (Woodin and Wieneke, 1963b; Woodin and Wieneke, 1964). Enfin, il observait que la LPV provoquait une accélération du renouvellement des phospholipides membranaires et plus précisément des phosphoinositides (Woodin and Wieneke, 1967).

Lorsqu'on injecte la LPV purifiée dans les veines d'un lapin, on observe d'abord une baisse transitoire des polynucléaires monocytes dans le sang périphérique et la moelle osseuse

Protéines - classe S
(32 kDa - pI 8.9 - 9.9)

Protéines - classe F
(35 kDa - pI 7.5 - 9.2)

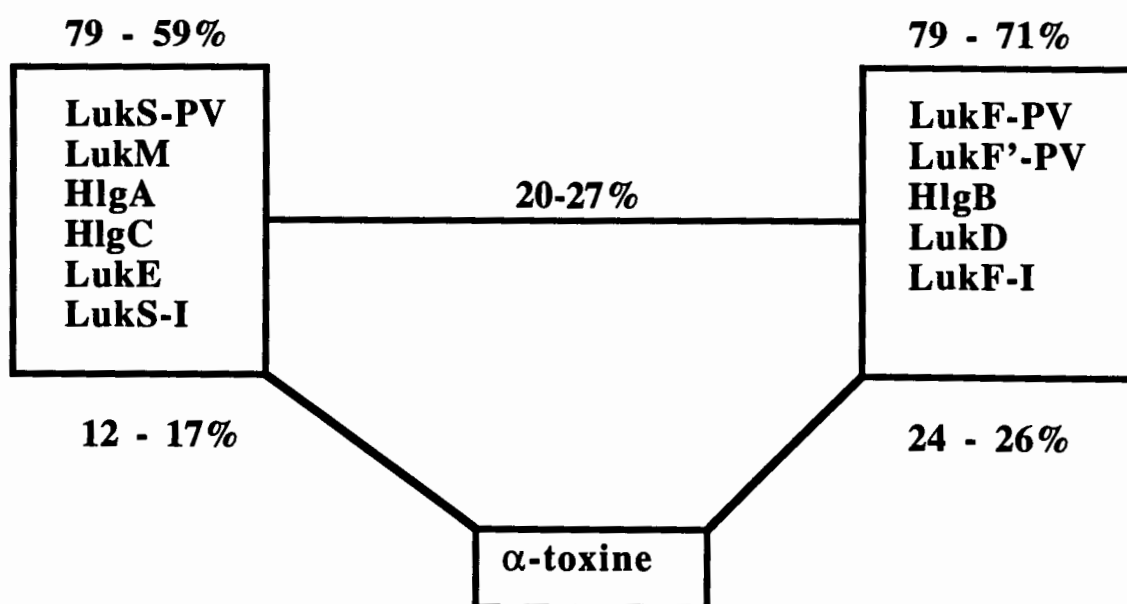


Figure 8 : Identités de séquence entre les protéines de classe S et les protéines de classe F des leucotoxines à deux composés de staphylocoques, et l'alpha-toxine.

ainsi que le nombre de lymphocytes circulants. Après quelques heures persiste une augmentation (Szmigielski et al., 1966; Szmigielski et al., 1968) comparable avec l'effet des d'agents cytostatiques (Szmigielski and Jeljaszewicz, 1976). L'activité leucotoxique se traduit par des modifications morphologiques des macrophages. On observe une baisse de la réfringence des cellules, le noyau multilobé des macrophages se rassemble et occupe une place importante dans la cellule.

L'effet de souches productrices de LPV sur la peau de lapin a également été étudié (Cribier et al., 1992b; Ward and Turner, 1980). Au début des années 90, Bernard Cribier (Cribier et al., 1992b) a montré que l'injection intradermique de la LPV provoquait chez le lapin des lésions nécrosantes et la lyse des leucocytes. La taille de ces lésions est dose et temps dépendants. L'injection de cette LPV dans l'humeur vitrée de lapin provoque des réactions inflammatoires (Coupié and Prévost, 1997) qui s'étendent à tout l'œil. La barrière hémato-rétinienne est rompue après 24 heures. La distribution de la LPV radiomarquée dans les organes de souris a été étudiée par Grojec (Grojec, 1979).

III.3.2.1.2. La Gamma-hémolysine

Il s'agit également d'une leucotoxine à deux composés isolée à partir de la souche de *Staphylococcus aureus* Smith 5R (Plommet, 1988; Taylor and Bernheimer, 1974). C'est la première leucotoxine à être clonée et séquencée à partir de souche de *S. aureus* méthicilline-résistante (Kamio et al., 1993; Rahman et al., 1991; Rahman et al., 1992). Elle est produite par la quasi totalité des souches de *Staphylococcus aureus* isolées en clinique humaine. En réalité, elle comprend deux protéines de classe S (HlgA : 31,5 kDa; HlgC : 32 kDa) et une protéine de classe F (HlgB : 34 kDa) (Prévost et al., 1995c; Taylor and Bernheimer, 1974). Elle représente donc deux couples possibles de leucotoxines HlgA + HlgB et HlgC + HlgB. Chacun des deux couples possède une activité cytolytique sur les leucocytes polynucléaires, les monocytes et les macrophages de plusieurs espèces animales. Le couple HlgA + HlgB possède en plus une activité hémolytique sur les érythrocytes et certains lymphocytes humains. Malgré une identité avoisinant 65%, les gènes codant la gamma-hémolysine sont génétiquement maintenus par les souches possédant également ceux codant la LPV (Cooney et al., 1993). Toutes les combinaisons entre un composé de classe S et un composé de classe F sont leucotoxiques avec des spectres spécifiques d'activité cellulaire.

III.3.2.1.3. La leucotoxine LukM-LukF-PV like (ou LukF')

Elle est isolée à partir de la souche P83 d'origine bovine (Choorit et al., 1995). Elle est constituée de deux composés de classe S et F qui possèdent des parentés antigéniques avec ceux de la leucocidine de Panton et Valentine. (Kaneko et al., 1997b). Cette toxine n'est produite par aucune des souches d'origine humaine testées jusqu'à maintenant. Seules deux

souches sur 20 isolées de mammites bovines la produisaient. C'est donc une leucotoxine apparemment très rare. Son activité biologique est faible sur les hématies et les polynucléaires humains. Elle est cependant dermonécrotique pour la peau du lapin (Gravet et al., 1998a).

III.3.2.1.4. La leucotoxine LukE-LukD

La leucotoxine LukE + LukD a récemment été caractérisée dans notre laboratoire (Gravet et al., 1998a; Gravet et al., 1998b). Elle fut mise en évidence à partir du surnageant de culture de la souche de Newman de *S. aureus* par la présence de matériel réagissant de manière croisée avec tous les anticorps déjà disponibles. Elle est produite par environ 30 % des souches de *Staphylococcus aureus* isolées en clinique humaine et concerne tous les types d'infection (Gravet et al., 1998a). Cependant, elle est produite par 90% (N = 46) des souches (méthi-R) isolées en culture dominante dans des diarrhées post-antibiotiques chez les patients âgés (Gravet et al., 1998a).

Cette leucotoxine est fortement dermonécrotique lorsqu'on l'injecte par voie intradermale chez le lapin. La plupart des souches produisant les épidermolysines A et B isolées dans les cas d'impétigo bulleux et de syndrome de la peau ébouillantée sont également productrices de la toxine LukE/LukD.

III.3.2.1.5. La leucotoxine LukS-I-LukF-I de *Staphylococcus intermedius*

C'est une leucotoxine isolée à partir des surnageants de culture fortement leucotoxiques de *Staphylococcus intermedius* (Prévost et al., 1995a). Cette bactérie n'appartient pas à la flore habituelle de l'homme, mais est elle responsable de dermites chez les petits carnassiers. Elle est constituée de deux protéines dont l'activité cytolitique est synergique sur les leucocytes humains. Lorsqu'elle est injectée par voie intradermique cette leucotoxine est responsable de nécrose cutanée chez le lapin.

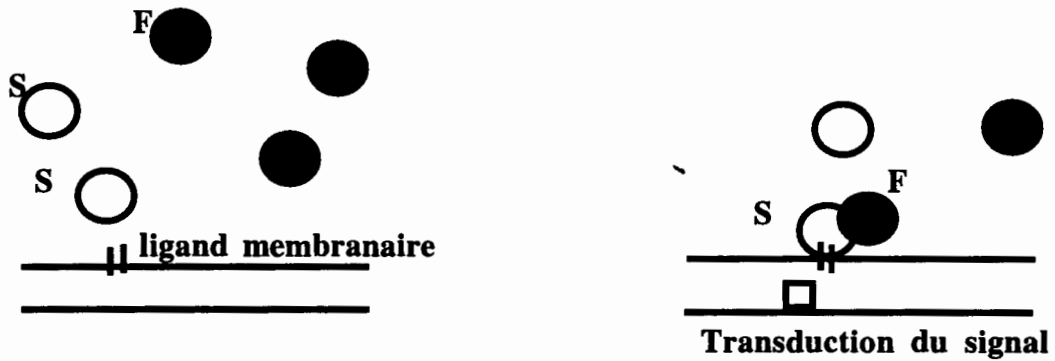
III.3.2.1.6. La Leucotoxine R

La leucotoxine R fut caractérisée à partir de la souche P83 de *S. aureus* isolée d'une mammite bovine (Soboll, 1971). Cette leucotoxine semble avoir une spécificité cellulaire différente de LPV. La remise en cause de cette caractérisation par le clonage de (Supersac et al., 1993) démontrera qu'il s'agissait certainement de la gamma-hémolysine. Elle est active sur les leucocytes bovins et humains et sur les globules rouges de lapin.

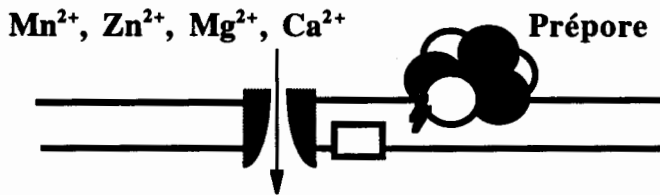
III.3.2.2. Mode d'action des leucotoxines

Le mode d'action des leucotoxine est encore mal connu. Dans les années 80, Noda *et al* (Noda et al., 1980) proposaient que les récepteurs des leucotoxines seraient le ganglioside GM1 sur lequel se fixerait le composé LukS-PV permettant ensuite la fixation de LukF-PV (Noda et al., 1981), entraînant ainsi une entrée de Ca²⁺ suivie d'une ADP-ribosylation de

A. Fixation séquentielle des composés de classe S puis de classe F



B. Oligomérisation, formation du pré-pore, activation des canaux calciques



C. Multiplicité des perturbations cellulaires

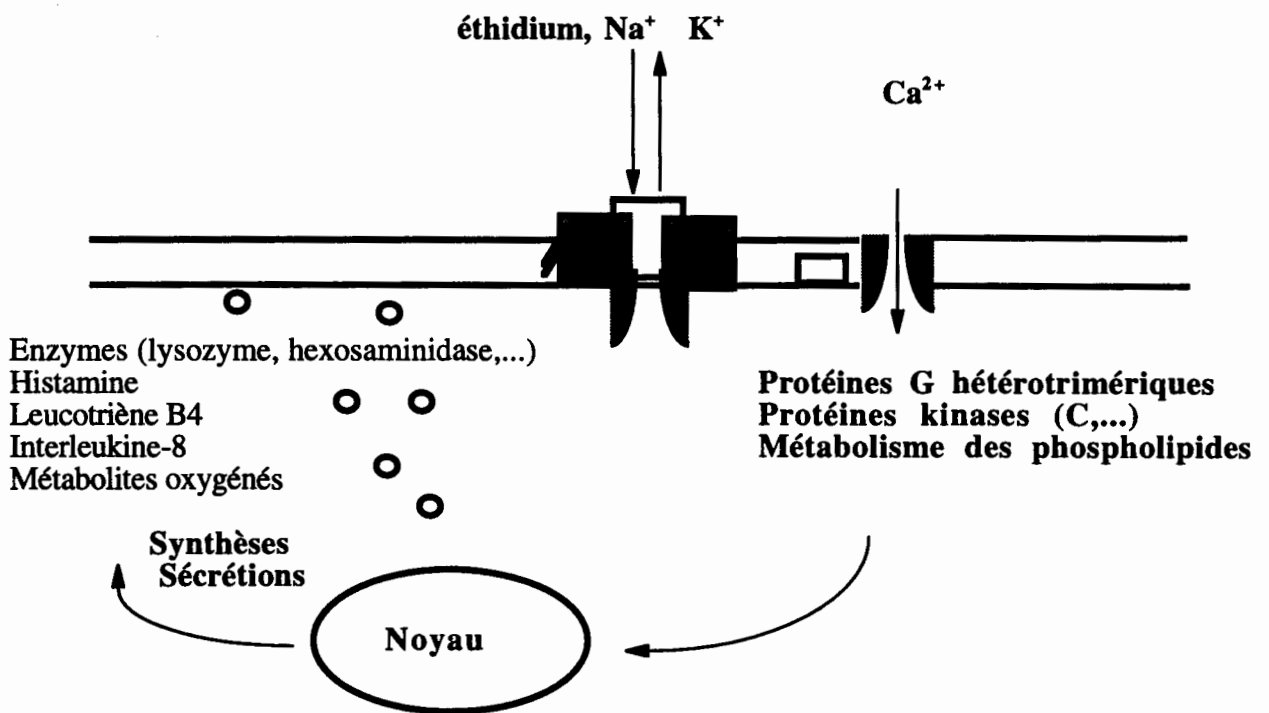


Figure 9 : Mode d'action des leucotoxines à deux composés de staphylocoques.

plusieurs protéines cellulaires (Kato and Noda, 1989; Noda et al., 1980). Notre laboratoire n'a pu reproduire ces résultats. Contrairement à ce qu'on observe pour la toxine cholérique le traitement des cellule-cibles par les neuraminidases n'atténue pas leur sensibilité à la toxine et il n'existe pas de précipitation en gel entre LukS-PV ou LukF-PV et le GM1. D'autre part, la fixation des composés de classe S sur les PN humains n'est pas sensible à un traitement par les O- et N-glycosidases.

Notre laboratoire a entrepris dès les années 90, l'étude de l'action cellulaire des leucotoxines sur des polynucléaires. Des travaux effectués grâce à l'utilisation des techniques telles que la cytométrie en flux, la spectrofluorimétrie et l'utilisation de sondes fluorescentes, comme le Fura2, Mag-Fura2 et le bromure d'éthidium (Bet), ont permis de mieux comprendre le mécanisme d'action de ces toxines (**Figure 9**). Les premiers résultats montraient que le composé S se fixe en premier sur un ligand membranaire avant que le composé F ne se fixe secondairement (Colin et al., 1994) pour former des pores de taille ionique [Finck-Barbançon, 1993 #23]. Les ions Ca^{2+} joue un rôle important dans la formation de ces pores. Dans les conditions physiologiques (1 mM Ca^{2+}), la fixation du couple de protéines provoque d'une part l'ouverture de canaux calciques perméables aux ions divalents (Mn^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+}) et d'autre part la formation de pores qui perméabilisent les cellules à l'éthidium (Finck-Barbançon et al., 1993; Meunier et al., 1995). Mais en absence de Ca^{2+} extracellulaire on observe une entrée plus importante de Bet et de cations monovalents comme Na^+ , K^+ (Staali et al., 1998). Ces pores semblent spécifiques aux ions monovalents sont probablement formées par la fixation du couple de protéines. Cependant, les flux de cations divalents débutent dans les cellules activées avant l'entrée de Bet. L'utilisation de différents inhibiteurs a permis de démontrer que ces deux phénomènes sont indépendants (Staali et al., 1998). Ces canaux calciques sont préexistants et sont ouverts par un phénomène d'activation qui résulte de l'interaction du couple de protéines S et F avec un ligand membranaire qui n'est pas encore défini. La réponse cellulaire se traduit aussi par l'activation de protéines G hétérotrimériques (Hensler et al., 1994a), d'au moins une protéine kinase C, de la libération d'agents du chimiotactisme comme les leucotriènes B4 (Hensler et al., 1994b) et l'interleukine 8 et de vasodilatateurs comme l'histamine (König et al., 1994).

Toutefois, les leucotoxines possèdent une spécificité d'action. Les différents couples de protéines sont actifs à des degrés variables en fonction du type cellulaire. Le couple HlgA + HlgB est fortement leucotoxique sur les polynucléaires humains, de bœuf et de lapin et fortement hémolytique pour les hématies de nombreuses espèces (Plommet, 1988; Supersac et al., 1993). La LPV n'est active sur les neutrophiles qu'à partir du stade métamyélocyte (Meunier et al., 1995), mais aussi sur les monocytes macrophages d'homme et de lapin. Le couple HlgC + HlgB est leucotoxique et hémolytique sur les hématies de lapin (Nariya et al., 1997; Prévost et al., 1995c; Tomita and Kamio, 1997), mais pas d'homme. Les couples Luke

+ LukD et LukM + LukF'-PV ont des activités relativement faibles par rapport aux autres couples. La leucotoxine de *S. intermedius* a une activité comparable à la LPV.

Malgré un tropisme cellulaire différent et spécifique, il existe une forte parenté entre ces toxines et leur mode d'action semble voisin, mais les ligands membranaires sont encore inconnus.

III.4. Conclusion sur les toxines formant des pores

Les toxines formant des pores jouent donc un rôle important dans la pathogénie des bactéries. Leurs modes d'action sont différents selon qu'elles sont amenées à s'insérer dans la membrane ou à traverser celle-ci pour atteindre des cibles intracellulaires. Ce mode d'action est prédéfini dans la composition de leurs séquences primaires. La disposition des résidus qui vont interagir pour permettre l'oligomérisation des monomères assure une symétrie dans le pore final. Les connaissances sont nombreuses en ce qui concerne l' α -toxine. Les leucotoxines et l' α -toxine appartiennent à la famille des toxines formant des pores à feuillets β prépondérants, mais elles se distinguent par plusieurs caractéristiques.

Les spectres cellulaires et l'activité des leucotoxines diffèrent de ceux de l' α -toxine. Par exemple, les polynucléaires constituent la cible majeure de la plupart des leucotoxines alors que l' α -toxine ne possède qu'une faible activité sur ces cellules.

Contrairement à l' α -toxine qui forme des pores par homo-heptamérisation les leucotoxines forment leurs pores par l'action synergique de deux composés individualisés, l'un de classe S et l'autre de classe F. Chacune des deux protéines possèdent des fonctions particulières dans l'interaction avec des ligands membranaires et certainement dans les événements qui conduisent à la formation des pores. La résolution de la structure de la protéine de classe F de la PVL (LukF-PV) (Pédelacq et al., 1999) a permis de modéliser un hexamère dans lequel 3 molécules de LukF-PV et 3 molécules de LukS-PV sont disposés en alternance. Ce qui donne un pore hétérogène formé par deux types de protéines contrairement à l' α -toxine qui forme des pores homogènes. Le calcium joue un rôle important dans la formation des pores et dans l'activité des leucotoxines alors qu'il semble ne pas intervenir pour l' α -toxine (Abrami et al., 1998). De plus, les pores formés par les leucotoxines sont perméables au Bet contrairement à l' α -toxine.

Les comparaisons de séquences indiquent que l' α -toxine possède de 15 à 25 % d'identité de séquence avec les leucotoxines. Certains acides aminés stratégiques sont néanmoins particulièrement conservés dans les diverses protéines. La résolution de la structure tridimensionnelle de l' α -toxine (Song et al., 1996) indiquait que des domaines conservés participaient par exemple au plan d'interaction entre monomères. Un feuillet β de 13 résidus conservés à l'extrémité N-terminale des composés de classe S des leucotoxines joue un rôle important dans l'activité des leucotoxines.

IV. Nos travaux

Par rapport à l' α -toxine, le modèle des leucotoxines à deux composés permet un découplage d'un plus grand nombre d'événements moléculaires qui conditionnent leur activité biologique apparemment complexe. Nous avons décidé d'étudier les relations structure-fonctions des leucotoxines, notamment l'oligomérisation des protéines de classe S et de classe F et le découplage de l'activité formant des pores perméables aux ions éthidium, Na^+ , K^+ , de la fonction activatrice induisant une perméabilisation au Ca^{2+} . L'alignement des séquences protéiques entre α -toxine et les leucotoxines montrait que l'histidine 35 est un acide aminé important dans l'oligomérisation de l' α -toxine pouvait se superposer avec la thréonine 28 située dans le feuillet β conservé à l'extrémité N-terminale des composés de classe S. Nous avons étudié l'importance de cette thréonine 28 et son rôle dans l'oligomérisation des leucotoxines.

Une particularité des toxines étudiées, démontrée par **Staali *et al.*, 1998** (Staali et al., 1998), est la fonction d'activation qui devance une fonction de perméabilisation des leucotoxines à deux composés. Cet aspect n'a en fait pas été très discuté pour les molécules parentes. La résolution de la structure tridimensionnelle de LukF-PV fut un facteur déterminant nous permettant de mieux concevoir un programme de recherche visant à découpler les deux fonctions des leucotoxines, afin d'approcher leurs impacts cellulaires respectifs.

Nous avons entrepris parallèlement une approche épidémiologique de l'antibiorésistance et de l'expression des leucotoxines par les souches de *S. aureus* isolées en Afrique de l'Ouest (Bénin, Côte d'Ivoire Togo) où le contexte climatique, sanitaire et social est différent par rapport aux pays industrialisés.

MATERIELS et METHODES

MATERIELS

I. Les souches bactériennes

Escherichia coli : Epicurian *coli* XL1-Blue supercompetent-Stratagene, Montigny le Bretonneux-France

Génotype : *recA1, endA1, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lacZ*, [F' *proAB, lacI^qZΔM15, Tn10(tet)*]. Ces cellules ont une grande aptitude à la transformation, ce qui permet d'obtenir des clones recombinants à partir de faibles quantités d'ADN.

***Escherichia coli* NM522**

Génotype : *supE, thi, hsdR, lac-proAB, (F', proAB lacI^q DM15)*. C'est une souche facilement transformable par les plasmides pCU1, pUC19.

***Escherichia coli* INV α F'**

Génotype : *endA1, recA1, hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺), supE44, λ ⁻, thi-1, gyrA, relA1, ϕ 80, lacZΔM15Δ(*lacZYA-argF*), *deoR*⁺, F'*. Cette souche est utilisée comme réceptrice des vecteurs pCRTMII recombinants (TA CloningTM kit, Invitrogen Corporation).

***Escherichia coli* BL21**

Génotype : F⁻, *ompT, hsd(r_B⁻, m_B⁻), gal (52, 53)*. Cette souche est utilisée pour l'expression des protéines de fusion à partir du plasmide pGEX (Pharmacia, Uppsala - Suède). Elle se conserve pendant plusieurs semaines dans du glycérol 10% (v/v) à -80°C.

***Staphylococcus aureus* souche RN 4220 :**

Cette souche, obtenue par traitement de la souche 8325-4 à la nitrosoguanidine, est dépourvue de système de restriction, mais reste capable de modifier l'ADN exogène. Elle sert de première réceptrice au plasmide navette pCU1 avant la transformation de la souche Newman *hlg*. Elle est en outre mutée dans le locus de régulation *agr* et ne peut être utilisée pour la production des leucotoxines.

***Staphylococcus aureus* souche Newman *hlg* :: tet**

La souche Newman de *Staphylococcus aureus* produit la gamma-hémolysine, l' α -toxine, la β -toxine mais ne produit pas l' α -toxine, ni la LPV.

La souche Newman *hlg*⁻ est obtenue à partir de la souche Newman. C'est une souche curée de ses plasmides. Les gènes chromosomiques codant la gamma-hémolysine ont été délétés grâce à une recombinaison homologue avec un locus modifié comprenant le gène de résistance à

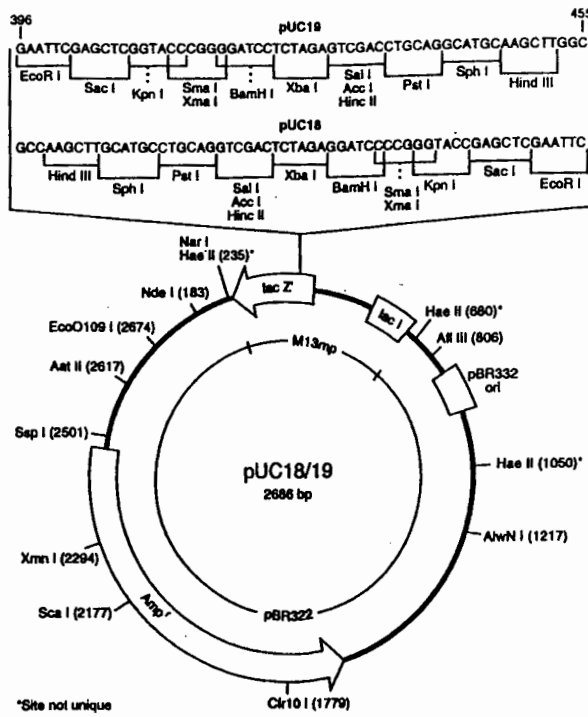


Figure 10a : Représentation schématique des vecteurs pUC18 et pUC19 qui se distinguent par leur cassette de clonage.

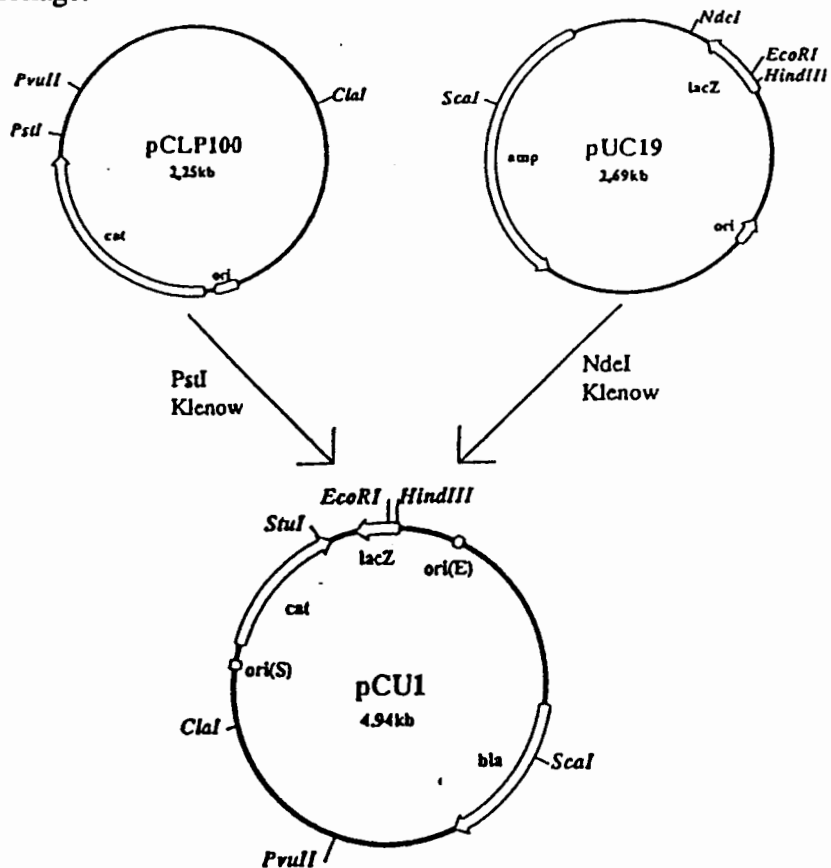


Figure 10b : Représentation schématique des vecteurs pCU1 (don du Dr F. Götz).

la tétracycline et a été utilisée pour produire des leucotoxines recombinantes mutées (Supersac et al., 1998), et décrites au Chapitre I.

***Staphylococcus aureus* souche V8 ATCC49775**

Cette souche provient d'un cas de furonculose chronique (Gladstone and Van Heyningen, 1957). Elle produit la leucocidine de Panton et Valentine et les gamma-hémolysines.

II. Les vecteurs

II.1. Les vecteurs pUC19 et pCU1 (Figures 10a et 10b)

Le vecteur **pUC19** (Yanisch-Perron et al., 1985) est un vecteur de 2686 pb qui contient le gène codant la résistance à l'ampicilline et le gène *lacZ* codant la β -galactosidase ainsi qu'une origine de répliation chez *E. coli*. Le gène *lacZ* porte une cassette de clonage contenant plusieurs sites de restriction à son extrémité 5'. En présence d'IPTG, la β -galactosidase est synthétisée, ce qui permet de sélectionner des clones recombinants sur le critère de leur coloration : l'addition de X-Gal dans le milieu colore les colonies en bleu si le plasmide est intact, alors que les colonies hébergeant un plasmide dont le gène *lacZ* est interrompu par un insert sont blanches.

Le vecteur **pCU1** est un plasmide navette de 5940 pb capable de se répliquer à la fois dans *E. coli* et dans *S. aureus*, car il possède les deux origines de répliation. Il comporte l'intégralité de pUC19 (Augustin et al., 1992), l'origine de répliation dans *S. aureus* du plasmide pUB110 et le gène codant la résistance au chloramphénicol du plasmide pC194.

Les gènes codant la LPV et la gamma-hémolysine ont d'abord été clonés dans le vecteur pUC19, puis dans le vecteur pCU1.

II.2. Le vecteur pCRTMII (cf .IV.3. Methodes d'étude de l'ADN)

II.3. Le vecteur d'expression pGEX6P-1 (Figure 11)

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

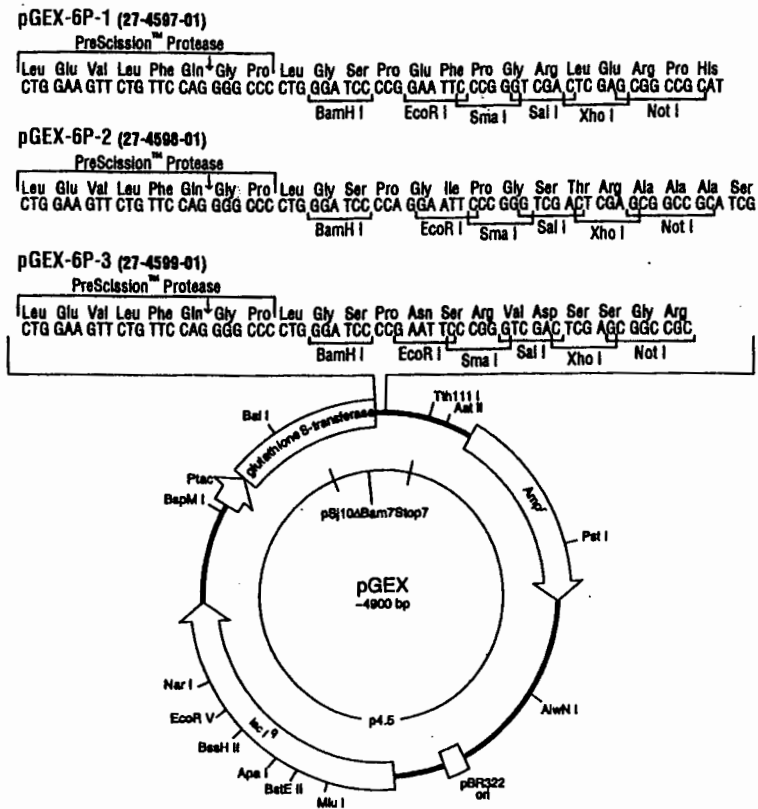


Figure 11 : Représentation schématique des vecteurs d'expression pGEX 6P qui se distinguent par la situation de la cassette de clonage par rapport à la phase de lecture.

III. Les milieux de culture

Milieu 2 x TY (Trypcase-Yeast extract) : 1,6% (p/v) bio-trypcase (BioMérieux), 1% (p/v) extrait de levure (Oxoid), 0,5% (p/v) NaCl pH 7,4. Le milieu gélosé contient 1,5% (p/v) d'agar.

Milieu 2 x TYA : milieu 2 x TY dans lequel on rajoute 100 µg/ml d'ampicilline.

Milieu 2 x TYC : milieu 2 x TY dans lequel on rajoute 20 µg/ml de chloramphénicol.

Milieu YCP (Yeast extract-Casaminoacides-Pyruvate) : 3 % (p/v) extrait de levure (Oxoid), 2 % (p/v) bactocasaminoacides (Difco), 2 % (p/v) pyruvate de sodium, 0,25 % (p/v) Na₂HPO₄, 0,042 % (p/v) KH₂PO₄. Ajuster à pH 7,0 avec NaOH.

Milieu M9: 15 g/l Na₂HPO₄-12H₂O, 3g/l KH₂PO₄, 1g/l NH₄Cl, 0,5 g/l NaCl, 15g/l agar. Après autoclavage rajouter : 1 ml CaCl₂ 0,1 M, 1 ml MgSO₄ 1 M, 1 ml Thiamine-HCl 1 M, 2 ml Glucose 20 %.

Milieu SOC : 20 g/l Tryptone (Oxoid), 5 g/l Extrait de levure, 0,5 g/l NaCl, 10 mM MgCl₂, 2,5 mM KCl, 55,6 mM Glucose.

Milieu de congélation des souches : 80% Brain Heart Infusion (BBL), 10 % (v/v) Sérum de cheval, 10% (v/v) glycérol (100 %).

Milieu SMM : 1 M Saccharose, 0,04 M Acide malique, 0,04 M MgCl₂

Milieu SMMP50 : 55% (v/v) SMM, 2,8 % (p/v) Penassay broth (Difco), 0,5 % (p/v) BSA

Solutions et tampons usuels

TEB 10 x : 0,89 M Tris-base, 0,89 M acide borique, 25 mM EDTANa₂ (Titriplex III), pH 8,3.

TE : 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTANa₂, pH 8,0.

MOPS : 0,2 M Morpholino propane phosphate, 50 mM formamide, 10 mM EDTA, ajusté à pH 7,0 avec de l'acide acétique.

BFP x 100: 2 % (p/v) BSA, 2 % (p/v) Ficoll 400, 2 % (p/v) PVP (Polyvinylpyrrolidone).

SSC 20 x : 3 M NaCl, 0,3 M citrate trisodique pH 7,0.

SSPE 20 x : 200 mM NaH₂PO₄, 20 mM EDTANa₂, 3,6 M NaCl pH 7,0.

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

EC Lysis Buffer : 6 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM EDTA (Titriplex II), 1 M NaCl, 0,5 % (p/v) Brij 58, 0,2 % déoxycholate de Na, 0,5 % (v/v) lauroyl sarcosine.

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

Tampon de migration SDS-PAGE : 0,20 M Tricine, 0,20 M Tris, 0,55 % SDS, pH 8,0.

Solution mère de coloration au bleu de Coomassie : 1 pastille de bleu de Coomassie G250 R (Pharmacia), 120 ml (v/v) Méthanol (100 %) QSP 200 ml avec H₂O.

Solution fille de coloration au bleu de Coomassie : 50 % (v/v) de solution mère filtrée, 10 % (v/v) Acide acétique (100 %), 30 % (v/v) Méthanol (100%).

Solutions pour la préparation d'ADN plasmidique (Plasmid-combi-kit, Qiagen) :

- **Tampon P1** : 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A
- **Tampon P2** : 200 mM NaOH, 1 % (p/v) SDS
- **Tampon P3** : 3,0 M Acétate de potassium, pH 5,5
- **Tampon QC** : 1 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,0, 15 % éthanol
- **Tampon QBT** : 750 mM NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,0, 15 % éthanol, 0,15 % (v/v) Triton X100
- **Tampon QF** : 1,25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8,5, 15 % éthanol.

METHODES RELATIVES A L'ETUDE DE L'ADN

I. Les méthodes de préparation de l'ADN

I.1. Préparation d'ADN génomique de *S. aureus* (Rifaï et al., 1989)

A partir d'une préculture de 5 ml de *S. aureus*, on ensemence 400 ml de milieu 2 x TY pendant une nuit à 37°C. Les bactéries sont ensuite centrifugées pendant 10 min à 5000 x g. Le culot est lavé une fois avec de l'eau, puis repris dans 20 ml de tampon de lyse (25% sucrose, 0,5 mg lysostaphine, 40 mg lysozyme) est incubé 40 min à 37°C. Le milieu est ensuite centrifugé pendant 10 min à 5000 x g. Le culot est resuspendu dans 10 ml de tampon acétate (0,15 M Acétate de Na, 1 mM EDTANa₂, 4% lauroyl sarcosine, 0,1 M NaCl, pH 6,5) puis subit une première extraction avec 10 ml de phénol saturé en eau et équilibré à pH 8,0. La phase supérieure aqueuse subit une seconde extraction avec 10 ml de phénol/chloroforme (v/v) et deux à l'éther. L'ADN contenu dans la phase aqueuse est alors précipité avec 3 volumes d'éthanol absolu, lavé à l'éthanol 80%, puis séché et repris dans 4 ml de tampon TE.

I.2. Les méthodes de préparation d'ADN plasmidique

I.2.1. Maxipréparation d'ADN par la méthode chromatographique (Plasmid Combi kit, Qiagen)

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

Une culture d'une nuit de bactéries transformées, cultivées dans 100 ml de milieu 2 x TYA, à 37 °C est centrifugé pendant 10 min à 5000 x g. Le culot bactérien est lavé une fois à l'eau puis repris dans 4 ml de tampon P1. Le mélange est transféré dans des tubes d'ultracentrifugation. Les bactéries sont ensuite lysées par addition de 4 ml de tampon P2. Après 5 min d'incubation le SDS est neutralisé par 4 ml de tampon P3 et la suspension devient visqueuse. Le milieu est laissé pendant 15 min dans la glace puis centrifugé une première fois à 25000 x g, à 4 °C, pendant 30 min dans un rotor vertical (vTi 60 - Beckman). Le surnageant est récupéré et centrifugé une deuxième fois pendant 15 min pour éliminer totalement les débris cellulaires. Ce surnageant est ensuite passé sur une colonne échangeuse d'anions (type DEAE-cellulose) préalablement équilibrée par 4 ml de tampon QBT. La colonne est ensuite lavée avec 2 x 10 ml de tampon QC. L'ADN est alors élué avec 5 ml de tampon QF, puis 3,5 ml d'isopropanol sont ajoutés et le milieu est centrifugé pendant 10 min, à 5000 x g, à 4°C. Après deux lavages à l'alcool 70 %, le culot est séché et repris dans 100 µl de TE. Les colonnes peuvent être recyclées en appliquant et en les conservant dans le tampon QF - 2,5 M NaCl.

I.2.2. Maxi-préparation d'ADN plasmidique sur gradient de Chlorure de césium

Une culture de 16H de bactéries transformées, cultivées dans 400 ml de milieu 2 x TYA, est centrifugée pendant 10 min à 10000 x g à 4°C. Le culot bactérien est remis en suspension dans 5,8 ml d'une solution 0,05 M Tris-HCl, 25 % (p/v) saccharose, pH 8,0, 5 mg/ml de lysozyme. Après 5 min d'incubation à 0°C sous agitation douce, 2,6 ml de 0,25 M EDTA pH 8,0 sont ajoutés. Ce traitement permet d'obtenir des protoplastes qui seront lysés pendant 20 min à 0°C par l'addition de 0,6 ml de tampon de lyse 2 % (v/v) Triton X-100, 0,05 M Tris-HCl, 0,06 M EDTANa₂, pH 8,0. Les lysats bactériens sont ensuite centrifugés à 50000 x g pendant 40 min à 6°C. Pour la purification définitive du plasmide, on ajoute au volume de surnageant 0,4 volume de 0,2 M K₂HPO₄ pH 8,0, 1 g/ml de CsCl, 0,01 volume d'une solution de Bet à 10 mg/ml. Une centrifugation de 10 min à 3000 x g, à 4°C permet d'éliminer la plupart des ARN et des lipides insolubles. Le surnageant est ensuite transvasé dans un tube scellable (Quick-Seal, Beckman), puis recentrifugé à 85000 x g, à 14°C pendant 18 H dans un rotor vertical (vTi 65 - Beckman). Après la centrifugation à l'équilibre de densité, deux bandes sont visibles. La bande plasmidique majeure, est inférieure (Maniatis et al., 1989). Le plasmide est aspiré à l'aide d'une seringue. Le Bet est éliminé par 3 extractions dans un volume égal d'isopropanol contenant 15% (v/v) de TE. Trois volumes de tampon TE sont ensuite ajoutés, puis l'ADN plasmidique est précipité par 3 volumes d'éthanol. Le précipité obtenu après une centrifugation de 5 min à 10000 x g à 4°C est lavé à l'alcool à 80%, séché et remis en solution dans 300 µl de tampon TE avant d'être soumis à une extraction au phénol, trois extractions à l'éther, puis reprécipité à l'éthanol. Après un dernier séchage, l'ADN plasmidique est resolubilisé à une concentration voisine de 1 µg/µl dans du TE.

I.2.3. Minipréparation d'ADN plasmidique à partir d'*E. coli*

Une culture de 16 h (500 µl) d'*E. coli* est homogénéisée vigoureusement (Chowdhury, 1991) trois fois pendant 15 s avec 500 µl d'une solution de phénol/ chloroforme/isoamylalcool (24/24/1). Après une centrifugation de 5 min à 12000 x g, la phase supérieure aqueuse est extraite à l'éther et les acides nucléiques sont précipités par 0,7 x v d'isopropanol. Après deux lavages à l'alcool 80 %, le précipité est séché et solubilisé dans 30 µl de TE contenant 20 µg/ml de RNase A.

I.3. Préparation d'ADN bactérien total intact en vue de l'électrophorèse en champs pulsés (Prévost et al., 1991)

37°C. Lorsque la culture atteint une DO_{600 nm} de 0,4, les cellules sont centrifugées 10 min à 5000 x g, à 4°C. Le culot bactérien est lavé deux fois avec 5 ml de tampon PIV (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA acide, 10 mM EGTA, 1 M NaCl, pH 7,5), puis resuspendu dans 600 ml du même tampon. Trois cents ml de la suspension sont chauffés à 55°C pendant 10 min puis mélangés à

600 ml d'agarose à bas point de fusion (Appligène, France) liquide 2% (p/v) dans une solution 50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH 8,0 puis chauffés encore pendant 10 min. Le mélange est ensuite coulé dans les fentes (25 x 3 x 3 mm³) d'un support en plastique puis refroidi. Les tranches d'agarose ainsi obtenues sont transférées dans des tubes contenant 1,5 ml de tampon de lyse composé du EC lysis buffer, 50 mg/ml de lysostaphine (Sigma) et 500 µg/ml de lysozyme (Sigma). La lyse des parois des bactéries emprisonnées dans l'agarose s'effectue pendant toute une nuit à 0°C. Le tampon de lyse est ensuite remplacé par 1,5 ml de tampon de protéolyse (0,25 M EDTANa₂, 20 mM EGTA, 1% lauroyl sarcosine (p/v), pH 9,0, et 250 mg/ml de protéinase K). La digestion dure 24 H à 55°C. La protéinase K est éliminée par 4 lavages dans du tampon TE-PMSF 0,1 mM (Phénylméthylsulfonyl fluorure) pH 8,0. Les tranches d'agarose sont ensuite lavées 4 fois avec du TE seul pour éliminer le PMSF. Elles peuvent être ainsi conservées pendant 12 mois à 4°C avec le changement du tampon tous les mois.

II. Modifications enzymatiques de l'ADN

II.1. Hydrolyses de restriction

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

II.2. Déphosphorylation des extrémités 5'-phosphate d'un plasmide

La réaction est catalysée par la phosphatase alcaline d'intestin de veau. Cet enzyme hydrolyse les groupements phosphates présents à l'extrémité 5' des ADN, ARN, ribo et désoxyribonucléotides (Maniatis et al., 1989). Cette réaction permet d'éviter la recircularisation des vecteurs sur eux-mêmes lors d'une ligation. Elle est effectuée dans 300 µl de tampon 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,9 et 1 U de phosphatase alcaline d'intestin de veau pour 10 pmol d'extrémités 5'-phosphate. Une incubation est effectuée pendant 45 min à 37°C, puis la même quantité d'enzyme est rajoutée et la réaction est prolongée pendant 45 min à 37°C. La réaction est stoppée en ajoutant 5 µl de 0,25 M EDTANa₂ pH 8,0. L'enzyme est dénaturé par un chauffage de 10 min à 70°C, puis éliminé par une extraction au phénol à 70°C, par deux extractions au phénol-chloroforme (50/50) et trois extractions à l'éther. Deux volumes d'éthanol - 0,3 M NaCl sont ensuite ajoutés afin de précipiter l'ADN. Ce dernier est lavé à l'alcool 80 %, séché et remis en solution dans du TE à une concentration avoisinant 0,03 pmole/µl.

II.3. Ligation de deux fragments d'ADN

La réaction est catalysée par la T4 ADN ligase, un enzyme capable de former une liaison phosphodiester entre les extrémités 5' phosphate et 3'-OH de deux fragments d'ADN. Le vecteur est préalablement linéarisé et déphosphorylé. Dans un volume final de 15 µl contenant du tampon ligase (20 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, pH 7,4), un

rapport molaire insert/vecteur compris entre 3 et 5, et on ajoute 0,2 unité de T4 ADN ligase. Le milieu est incubé 16 h à 14°C avant d'être utilisé pour la transformation.

III. Electrophorèse de fragments d'ADN

III.1. Séparation des fragments d'ADN sur gel d'agarose

Le gel d'agarose (Seakem GTG agarose, TEBU) est réalisé dans du tampon de migration 0,5 x TEB. Sa concentration varie de 0,8 à 1,5%, et est inversement proportionnelle à la taille des fragments à séparer (Maniatis et al., 1989). Avant le dépôt sur gel, 1/4 du volume de l'échantillon de la solution dénaturante est ajouté. Un marqueur de poids moléculaire est également déposé sur chaque gel. L'électrophorèse s'effectue dans le tampon de migration pendant 2H à 8V/cm. Le gel est ensuite immergé pendant 10 à 15 min dans du 0,5 x TEB contenant 0,1 µg/ml Bet. Après une exposition sous ultra-violets, une photographie des fragments d'ADN ayant incorporé le Bet est prise.

III.2. Electroélution d'un fragment d'ADN à partir d'un gel d'agarose

Après son identification, le fragment d'ADN intéressant est découpé à partir du gel d'agarose pour son électroélution (Maniatis et al., 1989). Cette dernière est effectuée grâce à deux microcupules (Sartorius) fermées à leur base par une membrane à dialyse. Ces cupules sont remplies de tampon 50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA pH 8,0 de façon à réaliser un pont salin, puis placées dans une cuve d'électrophorèse contenant du 0,25 x TEB. Le gel découpé est placé dans la cupule située du côté de la cathode. Après 1H d'électrophorèse à 100 V, 500 µl de solution sont récupérés au fond de la cupule située à l'anode. Les morceaux d'agarose sont éliminés par 5 min de centrifugation à 12000 x g, à 0°C. Après une extraction au phénol et trois à l'éther, les acides nucléiques présents sont précipités à l'éthanol, lavés à l'éthanol 80%, puis séchés avant d'être remis en solution dans du TE à une concentration avoisinant 0,2 pmole/µl.

III.3. Electrophorèse en champs pulsés

III.3.1. Préparation de l'ADN (cf I. 3)

III.3.2. Hydrolyse de l'ADN

L'enzyme de restriction *SmaI* (CCC/GGG) est utilisée dans les conditions décrites par le fournisseur (Sigma). Le morceau d'agarose (5 x 3 x 3 mm³) est équilibré pendant 30 min dans 300 µl de tampon *SmaI* à 4°C. L'hydrolyse s'effectue à température ambiante dans un volume final de 60 µl contenant 10 unités d'enzyme.

III.3.3. Electrophorèse en champ pulsés (Prévost et al., 1991)

Elle est réalisée sur un appareil Geneline™ (Beckman) dans du tampon TAFE x 0,5 (TAFE x 20 = 0,2M Tris, 10 mM EDTA acide, 0,087 mM acide acétique, pH 8,2), selon la programmation

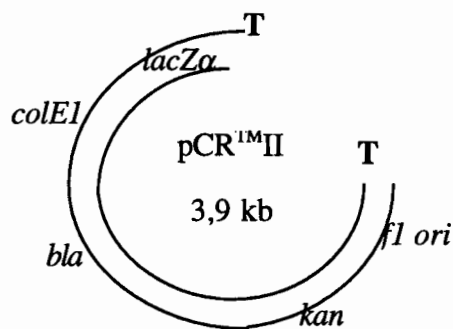
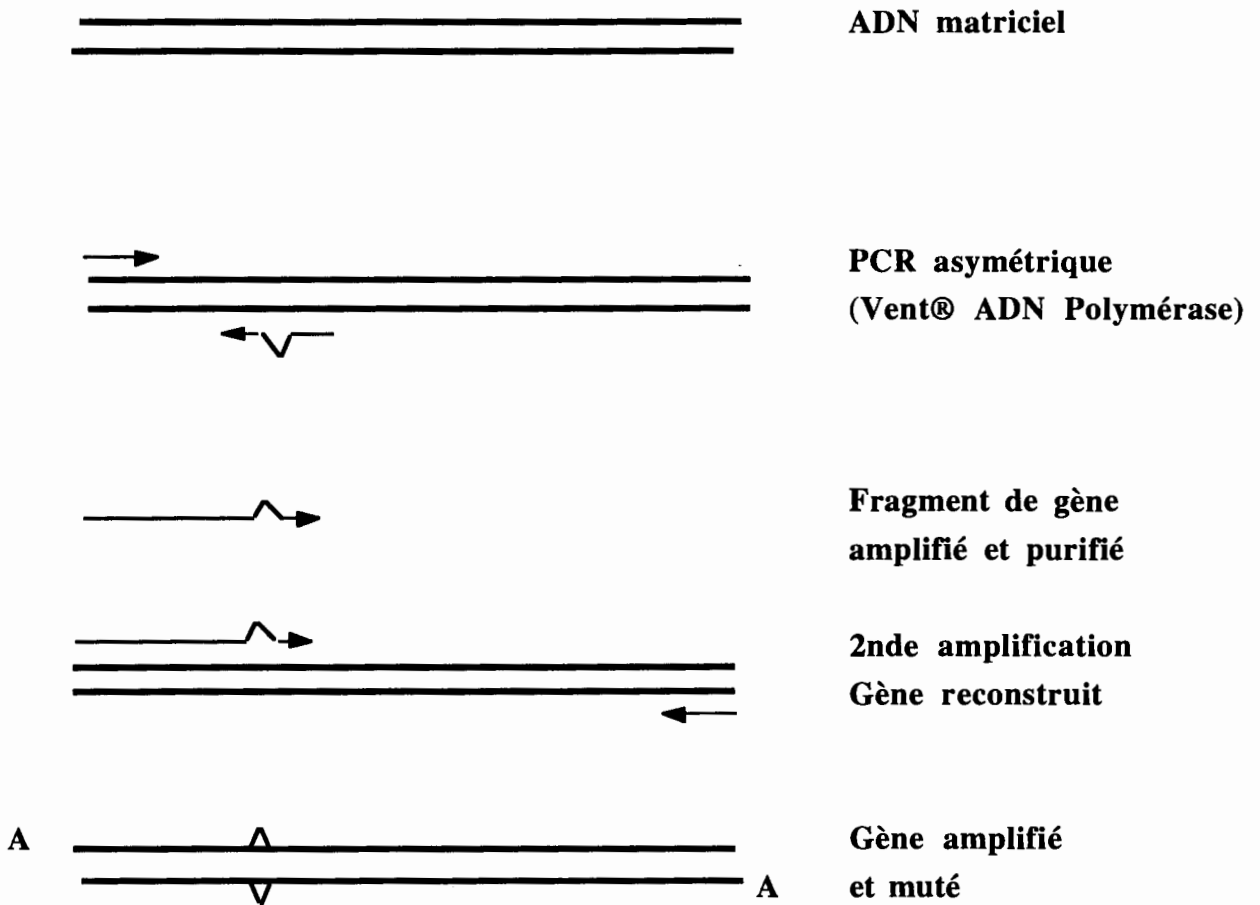


Figure 12 : Principe de la mutagenèse dirigée utilisant une réaction asymétrique de polymérisation en chaîne. Le vecteur pCRTMII possède les gènes de résistance à l'ampicilline (*bla*) et à la kanamycine (*kan*), ainsi que les origines de réplication de l'épisome f1 et du cosmide ColE1.

: 140 mA avec des champs alternés de 4 s pendant 1 H, 133 mA avec des champs alternés de 18 s pendant 2 H 30, 133 mA avec des champs alternés de 13 s pendant 2 H 15, 140 mA avec des champs alternés de 10 s pendant 2 H, 150 mA avec des champs alternés de 8 s pendant 8 H et 140 mA avec des champs alternés de 6 s pendant 6 H 30, l'intensité restant constante. Le gel d'agarose est ensuite coloré au bromure d'éthidium puis visualisé aux UV (300 nm).

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

IV.1. Principe de la méthode

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

IV.2. La réaction

La réaction s'effectue dans un milieu contenant 0,2 mM de dNTP, 10 ml de tampon PCR x 10 (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8,0), 6 ml de 50 mM MgCl₂, 100 pmoles d'amorce puis le tout est recouvert de 80 ml d'huile de paraffine. Les tubes sont ensuite placés dans un thermocycleur programmable.

IV.3. PCR asymétrique, megaprimer et application à la mutagenèse dirigée

Ce protocole qui comporte deux étapes de PCR permet d'introduire la mutation portée (**Figure 12**) par l'une des amorces oligonucléotidiques dans des fragments amplifiés de 200 pb à 2000 bases (Perrin and Gilliland, 1990). Une PCR asymétrique permet d'obtenir un excès de fragment 5'→3' contenant la mutation. L'enzyme utilisée est la Vent[®] ADN Polymérase (Biolabs), afin d'éviter l'adjonction finale d'une base, phénomène qui se produit avec la *Taq* ADN polymérase, qui, par ailleurs, ne possède pas une fidélité satisfaisante pour ce genre d'application. Une seconde étape faisant intervenir une nouvelle amorce et le fragment amplifié, puis purifié sur un gel d'agarose, permet d'obtenir un gène reconstitué grâce à la *Taq* ADN polymérase, prêt à être reclone dans le vecteur **pCRTMII**. Ce gène cloné est ensuite libéré par une digestion *EcoRI*, puis reclone dans le vecteur navette pCU1, afin que la protéine mutée soit exprimée dans *S. aureus*.

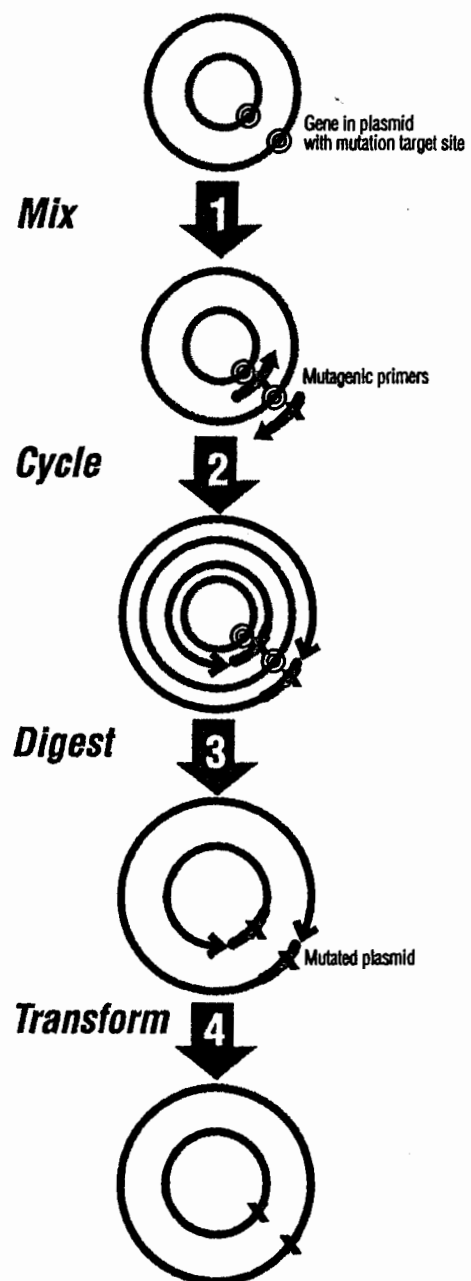


Figure 13 : Principe de la mutagénèse dirigée selon la méthode Quick Change™ Mutagenesis (Stratagene).

V. Mutagenèse dirigée par la méthode “Quick Change™ Site Directed Mutagenesis”

V.1. Principe de la Méthode (Figure 13)

C'est une technique qui permet l'étude des relations structure fonction des protéines, l'identification des régions intramoléculaire et des acides aminés importants pour ces fonctions, l'expression des gènes. Contrairement à d'autres méthodes, cette technique permet de faire la mutagenèse dirigée sur l'ADN double brin cloné de n'importe quel plasmide (jusqu'à 11 kb). Elle est rapide et permet d'obtenir des mutants en quatre étapes avec un rendement de 80%. Le protocole est simple et permet d'utiliser l'ADN plasmidique issu de minipréparations d'ADN ou d'une préparation sur gradient de chlorure de césium.

La technique du Quick Change™ Site directed Mutagenesis peut être utilisée pour faire des mutations ponctuelles, un changement d'acide aminé, une délétion courte ou longue ou une insertion de un ou plusieurs acides aminés. L'enzyme utilisée pour cette technique est la *Pfu* ADN polymérase qui a une fidélité d'édition douze fois supérieure à celle de la *Taq* ADN polymérase. Cette *Pfu* ADN polymérase réplique les deux brins de l'ADN plasmidique avec un taux minimal d'erreur et, à la température d'élongation de 68 °C, elle ne déplace pas l'amorce d'oligonucléotidique portant la mutation à insérer. Cette méthode nécessite une faible quantité de matrice d'ADN au départ et un faible nombre de cycles, ce qui augmente le rendement de la mutagenèse dirigée et diminue les risques de mutations additionnelles.

La réaction se déroule en quatre étapes résumées dans le schéma (Figure 13). Le plasmide contenant l'insert double brin est hybridé à deux oligonucléotides complémentaires à chacun de ses deux brins et portant la mutation désirée (étape 1). Ces oligonucléotides servent aussi d'amorce à la *Pfu* ADN polymérase qui synthétise les brins complémentaires (étape 2). Les brins néosynthétisés ne sont pas méthylés contrairement aux brins parentaux. L'endonucléase *DpnI* qui reconnaît la séquence 5'-Gm6ATC-3' et donc, est spécifique des ADN méthylés et hémiméthylés (étape 3) permet d'éliminer ainsi les ADN parentaux double-brin méthylés et les ADN hybrides hémiméthylés comportant un brin parental et un brin néosynthétisé. Il ne reste en principe dans le milieu que des molécules d'acides nucléiques double-brin néosynthétisés non méthylés. Ces molécules seront ensuite transformées dans des bactéries supercompétentes de la souche d'*E. coli* XL1 Blue (étape 4).

V.2. La réaction

La réaction s'effectue dans un milieu : 2,5 mM dNTP, 125 ng de chacune des deux amorces, 5 µl de tampon de mutagenèse x 10 (200 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄, pH 7,5, 1 % (v/v) Triton x 100, 1 mg/ml BSA, 5 à 50 ng de l'ADN matrice, 1 µl de *Pfu* ADN polymérase à (2,5 U/µl) et de l'eau QSP 50 µl. Puis le tout est

recouvert de 40 μ l d'huile de paraffine et les tubes sont placés dans un thermocycleur programmable. Après la réaction, 0,5 U de *DpnI* (10 U/ μ l) est ajoutée et l'ensemble est incubé 1 h à 37°C, en rajoutant 0,5 U de *DpnI* après 30 min. Le milieu est ensuite utilisé pour la transformation de cellules d' *E. coli* XL1 Blue supercompétentes (cf . VII. 2).

V.3. Le criblage des mutants

Après transformation les colonies ayant cultivé sont sélectionnées pour la préparation d'ADN plasmidique (cf I. 2.). Les plasmides sont ensuite séquencés au niveau de la mutation selon la méthode de Sanger (cf VI). Si la mutation est présente, le gène entier sera séquencé.

VI. Séquençage d'un ADN par la méthode de Sanger (T7 sequencing kit, Pharmacia Biotech)

VI. 1. Principe et application de la méthode (Sanger et al., 1977)

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

VI.2. Gel de séquence selon Sanger (Sanger et al., 1977)

Une solution à 6% (p/v) d'acrylamide-bisacrylamide (19/1), 8 M urée, 1 x TEB, est préparée et 100 ml de cette solution sont ajoutés à 10 μ l de TEMED et 600 μ l de 10 % (p/v) persulfate d'ammonium puis versés entre deux plaques de verre (40 cm x 50 cm), séparées par des entretoises de 0,4 mm d'épaisseur et un peigne à dents effilées permettant le dépôt. Après 40 min de polymérisation, les plaques de verre sont disposées dans une cuve d'électrophorèse dont les réservoirs sont remplis de 1 x TEB. Les échantillons sont chauffés 5 min à 75°C. La migration s'effectue pendant 2 ou 4 h sous une puissance électrique constante de 80 W.

VII. Transformation des bactéries

VII.1. Transformation d'*Escherichia coli* NM522

VII.1.1. Obtention des bactéries compétentes

Cinq cents μ l d'une préculture d'*E. coli* NM522 sontensemencés et cultivés dans 100 ml de milieu 2 x TY à 37°C jusqu'à une DO_{600 nm} de 0,4 à 0,6. Après 10 min de centrifugation à 5000 x g, à 4°C, les bactéries sont remises en suspension dans 20 ml de 50 mM CaCl₂ et

laissées dans de la glace pendant 30 min. Les cellules rendues compétentes sont à nouveau sédimentées et reprises par 2 ml de 50 mM CaCl₂. Ces cellules compétentes conservées à 0°C peuvent être utilisées pendant 3 à 4 jours.

VII.1.2. Transformation de la souche NM522 par le plasmide pCU1

A 200 µl de bactéries compétentes, on ajoute le milieu réactionnel de ligation. Après 45 min d'incubation à 0°C, les cellules sont soumises à un choc thermique durant 5 min à 37°C. Après ce traitement, 40 µl d'un mélange d'une solution de 2% (p/v) X-Gal dans du diméthylformamide et d'une solution 0,1 M IPTG sont ajoutés aux bactéries, puis celles-ci sont étalées sur une boîte de Pétri contenant du milieu TYA gélosé.

VII.2. Transformation de cellules Epicurian coli XL-1 Blue supercompétentes

A 80 µl de bactéries supercompétentes, on ajoute 0,75 µl de 2,5 M β-mercaptoéthanol et les cellules sont incubées 10 min dans la glace. Ensuite, 2 µl du milieu de ligation provenant de la réaction de PCR sont ajoutés et incubés 30 min dans la glace. Les cellules sont soumises à un choc thermique dans un bain-marie à 42°C pendant 45 s, puis remises dans la glace 2 min. On étale la suspension sur une boîte de Pétri contenant du milieu TYA gélosé et la boîte est incubée une nuit à 37°C.

VII.3. Transformation de *E. coli* BL21 par électroporation

VII.3.1. Obtention des bactéries compétentes

A partir d'une préculture de 3 ml d'*E. coli* BL21, on ensemence 100 ml de milieu 2 x TY qu'on incube à 37°C sous une agitation de 200 rpm. Lorsque la DO_{600nm} atteint 0,5 à 0,7. Les cellules sont laissées 15 à 30 min dans la glace, puis centrifugées à 5000 x g, pendant 10 min à 4°C. Le culot est lavé 1 fois dans 10 ml de tampon HEPES pH 7,0, puis une deuxième fois dans 5 ml du même tampon. Les cellules sont ensuite resuspendues dans 2 à 3 ml de 10% glycérol dans de l'eau distillée, désionisée et stérile puis répartie en aliquote. Elles peuvent être conservées à -80°C pendant plusieurs mois.

VII.3.2. Electroporation d'*E. coli* BL21 par le vecteur pGEX6P-1

L'électroporation s'effectue avec un appareil Bio-Rad Gene Pulser®. Cinquante ml de cellules compétentes sont mélangées dans une cuvette d'électroporation de 0,2 cm d'épaisseur avec 2 ml du milieu de ligation contenant le vecteur pGEX6P-1 recombinant. Les cellules sont soumises alors à un choc électrique de 2,5 kV, 200 Ohms, 25 µF pendant 4 à 5 ms. Un ml de milieu SOC est immédiatement ajouté au mélange et incubé dans un tube de 15 ml pendant 1 h, à 37°C sous une agitation de 250 rpm. Cent µl du milieu de culture sont ensuite étalés sur du milieu 2 x TYA gélosé contenant du 2% de glucose puis incubé toute une nuit à 37 °C.

VII.4. Transformation des souches de *S. aureus* par électroporation

Le protocole est identique pour les souches RN 4220 (1) et Newman *hlg⁻*. Une préculture dans 2 ml de milieu 2 x TY est lancée sur la nuit. Le lendemain, 200 µl de bactéries sont prélevés pour ensemer 100 ml de milieu 2 x TY, incubé 4 h sous agitation à 37°C (jusqu'à DO_{600nm} 0,4 - 1). Les cellules sont ensuite centrifugées 10 min à 5000 x g et lavées trois fois avec 20 ml d'une solution de glycérol 10 % (v/v) stérile, à 0°C et les cellules sont mises en suspension dans 2 ml de 10 % (v/v) glycérol. L'ADN est déposé (1,5 µl) sur la paroi d'une cuvette d'électroporation stérile à usage unique, et 80 µl de bactéries sont rajoutés dans la cuve pour subir une décharge de 1400 V (capacitance = 25 µF, résistance = 200 Ω). Les bactéries électroporées sont récupérées et placées dans 950 µl de milieu de régénération SMMP 50 [SMM : 1 M saccharose, 0,04 M acide malique, 0,04 M MgCl₂ pH 6,5. SMMP 50 : 55 % (v/v) SMM, 2,8 % (p/v) Penassay broth (Difco), 0,5 % (p/v) BSA], puis incubées 1 h à 37°C sous agitation et enfin mélangées à 3 ml de milieu 2 x TY agar en surfusion et étalées sur boîte 2 x TYC. La production de toxine par les clones transformés est vérifiée par immunodiffusion radiale.

METHODES RELATIVES A L'ETUDE DES PROTEINES

I. Purification des leucotoxines

I.1. Purification de leucotoxines à partir de souches de *S. aureus*

Les souches recombinantes Newman *hlg⁻* possédant les gènes codant la LPV sous-clonés aux sites de restriction *HincII-HindIII* dans le plasmide navette pCU1, sont cultivées à 37°C dans 6 Erlens de 2 L contenant 200 ml de YCP (100 µg/ml de chloramphénicol) durant 18 h sous une agitation de 200 rpm. Les protéines sécrétées, dont les leucotoxines, contenues dans les surnageants de culture, sont concentrées par une précipitation au sulfate d'ammonium à 80 % de saturation. Le précipité solubilisé est dialysé contre un tampon 50 mM NaH₂PO₄ pH 7,0, utilisé au cours des chromatographies suivantes, (2 mM DTT si présence de cystéine dans la protéine). Les leucotoxines sont ensuite capturées à l'aide de Sépharose Fast Flow S® puis éluées, puis sur une colonne échangeuse de cations MonoS® FPLC® (Pharmacia) dans un gradient continu de 0-700 mM NaCl. Le polissage s'effectue par une chromatographie hydrophobe en AlkylSuperose® FPLC® dans un gradient décroissant de sulfate d'ammonium (Finck-Barbançon et al., 1991). Les protéines purifiées sont stockées à -80°C ou +4°C à DO_{280nm} = 1,0, dans un tampon 50 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, (2 mM DTT si présence de cystéine dans la protéine), pH 7,0.

I.2. Purification des leucotoxines sous forme de protéines fusion à partir d'*E. coli* BL21

I.2.1. Principe de la méthode

Le système utilisé ici est la Glutathion-S-Transférase (GST) fusion protein System™

(Pharmacia). C'est un système qui permet la surexpression, la purification et la détection de la protéine de fusion produite dans *E. coli*. Ce système consiste en 3 composés majeurs que sont le vecteur d'expression pGEX6P-1, le module de purification de la GST et le module de détection de la GST. La protéine de fusion est facilement purifiée à partir de lysat bactérien par une chromatographie d'affinité à l'aide d'une colonne de Glutathion Sépharose 4B. Le clivage de la protéine d'intérêt est effectué en utilisant la PreScission Protease qui reconnaît une séquence spécifique située immédiatement devant la cassette de clonage du plasmide pGEX. La protéine de fusion est détectée par un dosage colorimétrique de la GST.

I.2.2. Obtention du lysat bactérien

Deux erlenmeyer de 2 L contenant 400 ml de milieu 2 x TYA sontensemencés par 5 ml d'une préculture d'*E. coli* BL21 transformée par le plasmide recombinant pGEX 6P-1, et incubés à 37°C sous une agitation de 200 rpm. Lorsque la DO_{600nm} atteint 0,4, à 0,6 les bactéries sont induites avec 800 µl d'une solution 0,1 M IPTG puis réincubées durant 15 h. Le lendemain, les bactéries sont centrifugées à 7000 x g pendant 10 min, à 4°C. Le culot est remis en suspension dans 35 ml de tampon PBS - EDTA. Les bactéries sont ensuite broyées à la French Press (Pressure Cell Press) sous une pression de 600 bars. Le lysat bactérien est centrifugé pendant 30 min à 35000 x g, à 4°C dans un rotor Ti60 (Beckman). Le surnageant est récupéré et utilisé pour le dosage de l'activité enzymatique de la GST.

I.2.3. Dosage de l'activité enzymatique de la GST

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

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

La cuvette est ensuite placée dans le spectrophotomètre et l'absorbance est lue à 340 nm toutes les minutes pendant 5 min contre un témoin contenant tous les éléments sauf les 10 µl d'échantillon remplacé par 10 µl d'eau distillée (car même en absence de GST on assiste à une dégradation du substrat). Cette réaction est linéaire jusqu'à une $DO_{340nm} = 0,8$. La concentration de GST contenue dans l'échantillon doit donc être ajustée en conséquence pour que la réaction

reste linéaire au bout de 5 min. Cette concentration de GST est proportionnelle dans ces conditions à la vitesse de réaction ($\Delta DO/\text{min}$) selon la relation suivante :

$$\Delta DO_{340\text{nm}}/\text{min/ml} = \frac{DO_{340\text{nm}}(t_2) - DO_{340\text{nm}}(t_1)}{(t_2 - t_1) \times v}$$

où : $DO_{340}(t_2)$ = absorbance à 340 nm au temps t_2 en min

$DO_{340}(t_1)$ = absorbance à 340 nm au temps t_1 en min

v = volume d'échantillon utilisé

I.2.4. Purification de la protéine de fusion sur colonne de Sépharose 4B

La résine de Glutathion Sépharose 4B est préalablement équilibrée avec 5 volumes de tampon PBS-EDTA. Le gel est ensuite mélangé avec le surnageant de culture (4 mg d'équivalent GST/2 ml de gel), puis agité doucement pendant 30 min à 4°C. Le mélange est ensuite centrifugé pendant 5 min à 2000 x g puis décanté à 2 volumes de gel. Le gel est ensuite coulé dans une colonne PD10 et lavé avec 10 volumes de tampon PBS-EDTA. La protéine de fusion est éluée avec 4 volumes de tampon d'éluion (60 mM Tris-HCl, 30 mM GSH, pH 8,0). Les différentes fractions sont récoltées et la $DO_{280\text{nm}}$ est mesurée. La présence de la protéine d'intérêt peut être vérifiée par immunoprécipitation.

I.2.5. Clivage de la protéine de fusion par la PreScission® Protease

La PreScission Protease (Pharmacia) est une protéine de fusion constituée par la protéase 3C du rhinovirus humain de type 14 (Walker et al., 1994) et la GST de *Shistosoma japonicum*. (Smith and Jonhson, 1988). Cette protéase a un PM de 46 kDa. La séquence reconnue par la PreScission Protease est composée de : Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln/Gly-Pro (Cordingley et al., 1990). Son maximum d'activité se situe entre pH 7,0 et 8,0 et à basse température (5 à 15 °C). La réaction s'effectue dans du tampon 1 x PBS ou dans un tampon : 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7,0 à 25 °C. La Préscission® Protéase est utilisée à raison de 10 à 100 U par mg de protéine de fusion. La protéolyse dure 15 min lorsqu'on utilise 100 U /mg de protéine de fusion à 5°C ou 4 à 16 heures lorsqu'on utilise 10 U/mg à 5°C. Cette étape de digestion a été optimisée et elle s'effectue sur une nuit à + 2°C avec 5 U d'enzyme par mg de protéine de fusion.

II. Techniques d'analyse des protéines

II. 1. Immunoréplique (Western Blot) sur membrane de nitrocellulose

II.1.1. Préparation du lysat bactérien

Cent ml d'une culture de 6 H ($DO_{600\text{nm}} = 0,6$) d'*E. coli* NM522 sont centrifugés pendant 10 min à 5000 x g , à 4°C. Les culots bactériens sont remis en suspension dans 1 ml de tampon TE. Deux cents μl d'une solution de lysozyme à 20 mg/ml de TE sont ajoutés. Après 30 min

d'incubation à 37°C, les bactéries sont soumises à un choc thermique par un passage de 45 s dans du méthanol contenant de la neige carbonique, puis remises 45 s à 55°C. Cette alternance de congélation et de décongélation provoque la lyse des bactéries et le milieu devient très visqueux. Les débris cellulaires sont ensuite séparés des protéines contenues dans le surnageant par 30 min d'ultracentrifugation à 45000 x g, à 4°C dans un rotor Ti 60 (Beckman).

II.1.2. Séparation et transfert sur membrane de nitrocellulose

A 50 µl d'une dilution au 1/10e des lysats, on ajoute 6,25 µl de 20% (p/v) SDS. Le mélange est chauffé pendant 5 min puis 5 µl d'une solution 0,1% (p/v) de BBP sont ajoutés. Un volume de 1 µl est ensuite déposé sur gel dénaturant (Phast System-Pharmacia) pour une électrophorèse. Après 20 min de migration, le gel contenant les protéines est déposé sur une membrane de nitrocellulose imbibée de tampon de transfert (25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, pH 8,4, 20% (v/v) méthanol). Le tout est placé entre deux feuilles de papier Whatman 3 MM imbibées par le même tampon, puis inséré entre deux grilles d'un appareil de transfert vertical (TE series Transphor, HSI) rempli jusqu'au 1/3 par 2,5 l de tampon, la membrane est située du côté de l'anode. Grâce à leur charge globalement négative, les protéines migrent vers la membrane sous l'effet du champ électrique (6 V/cm pendant 1H) et sont adsorbées sur la membrane (Towbin et al., 1979).

II.1.3. Détection des protéines

Après le transfert, la membrane est saturée par 1H d'incubation à 37°C dans 20 ml de tampon TBS (20 mM Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,5) contenant 5% (p/v) de BSA. Le filtre est ensuite lavé 3 fois dans du tampon TBS, puis incubé pendant 2 H à 37 °C, en présence d'anticorps anti-S (ou anti-F) dilué dans du TBS-1% (p/v) BSA, 0,05% (v/v) Tween 20. Après lavage, le filtre est incubé en présence d'anticorps de chèvre anti-lapin couplé à la peroxydase, dilué au 1/400e dans le tampon PBS (Dulbecco). Après 2 H à 37°C, la membrane est lavée 3 fois dans du PBS, puis l'activité de la peroxydase est révélée par 20 min d'incubation à température ambiante dans 12,5 ml de PBS en présence de 5 µl de 30% (v/v) H₂O₂ et 2,5 ml d'une solution de 0,3% (p/v) 4-chloro 1-naphtol dissous dans du méthanol absolu.

II.2. Electrophorèse dénaturante des protéines : méthode PhastSystem™

Cette méthode est basée sur le principe de Laemmli (Laemmli, 1970). Le PhastSystem™ est un système automatisé de séparation en gel de polyacrilamide (PAA), très rapide (30 min) et reproductible. Les protéines sont d'abord dissociées en sous unités polypeptidiques par le SDS et le β-mercaptoéthanol. Le SDS est un détergent anionique qui se lie aux protéines (1,4 g de SDS par gramme de protéine) et leur confère une charge nette négative. Toutes les protéines possèdent ainsi la même densité de charge et ne migrent plus qu'en fonction de leurs poids moléculaire. Le bleu de bromophénol est habituellement ajouté aux échantillons pour suivre la migration. Les gels (PhastGel, Pharmacia) sont constitués de "Stacking gel" de 13 mm (0,112

M tampon acétate, 0,112 M Tris, pH 6,4, 4 % Polyacrylamide) et d'un Phastgel gradient de 32 mm (0,112 M tampon acétate, 0,112 M Tris, 6,4) avec un gradient de 10 - 15 % de polyacrylamide (il existe d'autres types de gradients en fonction de la taille des protéines à séparer). Les échantillons sont préparés dans un volume final de 50 µl contenant 5 à 50 µg de protéine en présence de 2,5 % (p/v) SDS, 5 % (v/v) β mercaptoéthanol, 10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8,0 en concentration finale. L'échantillon contenu dans le mélange est porté à 100°C pendant 5 min. On ajoute ensuite 0,01 % (v/v) d'une solution à 4% (p/v) de bleu de bromophénol qui permet de suivre la migration des protéines. Les échantillons ainsi préparés sont déposés avec un mélange de marqueurs de poids moléculaire sur le gel dénaturant. Ce dernier est ensuite placé dans un appareil (Phast system™, Pharmacia) programmable pour la migration, la fixation et la coloration. Après 30 min, les protéines peuvent être visualisées.

II.3. Immunoprécipitation des leucotoxines par une diffusion radiale en gel des protéines

La présence de leucotoxines est recherchée à partir de lysats bactériens dans le cas de souches d'*E. coli* ou à partir de surnageant de culture dans le cas de souches de *S. aureus*. Les anticorps utilisés pour ce test spécifique de chaque leucotoxine sont des anticorps polyclonaux de lapin, purifiés par affinité (Gravet et al., 1998b). La réaction s'effectue dans un gel d'agarose 0,6 % (p/v) dans le tampon PBS, contenant des puits d'un volume de 50 µl, espacés de 7 à 8 mm entre eux, dans lesquels on dépose des anticorps de lapin anti-leucotoxines purifiés par affinité à $DO_{280\text{ nm}} = 3$ qui vont réagir avec les surnageants de culture ou les lysats bactériens à $DO_{280\text{ nm}} = 0,2$. Après une diffusion de 16 H, les arcs de précipitation peuvent être visionnés directement à l'œil nu ou après une coloration au bleu de Coomassie.

II.4. Dosage de protéines par la méthode de Bradford

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

A 50 µl de soude 1 M sont ajoutés 20 µl d'échantillon protéique (0,2 à 2 µg), 1ml de réactif au bleu de Coomassie concentré [pour 1L : 100 mg bleu de Coomassie G-250 (Pharmacia), 50 ml d'éthanol 95%, 100 ml H₃PO₄ 85% (p/v)] puis le tout est incubé 5 min à température ambiante. La lecture de l'absorbance est ensuite effectuée à 595 nm au spectrophotomètre. Une courbe d'étalonnage est réalisée avec des dilutions différentes d'une solution de sérum albumine bovine contenant de 1 à 25 µg/ml de protéine.

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

III.1. Principe de la réaction

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

III.2. Mode opératoire

Tous les groupements SH n'étant pas accessibles à cause de leur position stérique, il convient de dénaturer la protéine afin d'avoir la même réactivité pour tous les résidus vis à vis du DTNB. La réaction a lieu comme décrit par Habeeb et *coll* (Habeeb, 1972). On réalise une solution de 6 ml contenant environ 0,01 à 0,04 g de protéine, 2% (p/v) SDS, 0,05 M tampon Bicine pH 8,0, et 0,5 mg/ml d'EDTA. A 3 ml de cette solution est ajouté 0,1 ml d'une solution de DTNB (40 mg DTNB, 10 ml de 0,05 M tampon Bicine, pH 8,0). La couleur est développée pendant 15 min et on lit l'absorbance à 412 nm contre un témoin constitué par la protéine dans du SDS. La concentration des groupements cystéine est déterminée par la formule : $DO_{412 \text{ nm}} = \epsilon \cdot l \cdot C$ avec $l = 1 \text{ cm}$ et $\epsilon = 13600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

III.3. Réaction d'oxydation : formation de ponts disulfure

Cette réaction consiste en l'oxydation de groupements R-SH en vue de créer des ponts disulfure internes à une protéine ou à réaliser la dimérisation d'une protéine. Elle se déroule comme décrit par TRAUT R. R. (Traut et al., 1989). Dix μg de protéine (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) sont placés dans deux tubes de centrifugation. Le premier tube sert de témoin négatif. Le second tube est additionné de 1,5 μl d'une solution 10 mM CuSO_4 , 5 H_2O et 30 mM 1,10-phénanthroline. Trois μl de chaque tube sont alors prélevés respectivement à 15, 30 et 60 min puis additionnés immédiatement d'un volume égal de tampon pour gel de polyacrylamide dénaturant contenant 40 mM d'iodoacétate. Les tubes sont ensuite incubés à 65°C pendant 15 min. L'analyse des protéines se fera en SDS-PAGE.

IV. Marquages de protéines

IV. 1. Marquage aléatoire d'une protéine à la fluorescéine

Les protéines ont été marquées, en tentant d'approcher un rapport équimolaire, à la fluorescéine par la 5-([4,6-dichlorotriazine-2-yl](amino)-fluorescéine (DTAF) selon la technique de

Blakeslee (Blakeslee, 1977). La protéine concentrée à environ 50 μM (entre 10 et 100 μM) dans du tampon 0,2 M NaHCO_3 pH 9,0 est mis en contact avec une solution DTAF 10 x concentrée préparée dans du tampon 1 M NaHCO_3 pH 9,0, dans un rapport molaire initial : $R_i = [\text{DTAF}]/[\text{Protéine}] = 2$. Le mélange est laissé 20 min à température ambiante sous agitation. On ajoute ensuite 50 mM final d'une solution 2 M NH_4Cl pH 8,0 puis le mélange est laissé 2 H à 4 °C. Le milieu réactionnel est alors désalé sur une colonne PD10 contre un tampon 30 mM HEPES, 0,15 M NaCl pH 7,5. La concentration finale en DTAF ($\epsilon_M = 61000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) est estimée en mesurant la $\text{DO}_{491\text{nm}}$ et la concentration finale de protéine est estimée par la méthode de Bradford. Le rapport molaire final $R_i = [\text{DTAF}]_f/[\text{Protéine}]_f$ détermine le degré de couplage de la fluorescéine à la protéine.

IV.2. Marquage d'une protéine contenant une cystéine à la fluorescéine

Les leucotoxines étant naturellement dépourvues de cystéine, la substitution d'un autre acide aminé par ce résidu permet d'obtenir des molécules comportant une seule cystéine dans les leucotoxines. Cette opportunité nous permet d'effectuer des marquages sélectifs avec des traceurs moléculaires soit de la fixation des protéines de classe S et de classe F, soit de l'accessibilité de surface des résidus, soit de son environnement hydrophile ou hydrophobe. Ce marquage spécifique des résidus thiols à pH 7,0 s'effectue grâce à un excès molaire de fluorescéine-5-maléimide (F5M ; $M = 427$; $\epsilon_{490\text{nm}} = 81900 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) de 5 fois dans un tampon 50 mM NaPhosphate, 0,15 M NaCl, 1 mM EDTANa_2 pH 7,0 et 10 μM de protéine cible. Après 30 min à température ambiante, la réaction est stoppée par l'addition de 10 mM β -mercaptoéthanol final. La F5M est ensuite séparée de la protéine marquée en passant la solution sur une colonne de désalage PD10 (Pharmacia). Le degré de couplage de la F5M est estimé en rapportant la concentration de fluorescéine ($\text{DO}_{490\text{nm}}$) de la solution à la concentration protéique déterminée par une coloration de Bradford.

IV.3. Marquage d'une protéine contenant une cystéine à l'AMSD

La solution protéique est désalée sur une colonne PD10 (Pharmacia) contre le tampon 0,2 M PhosphateNa, 1 mM β -mercaptoéthanol pH 8,0, puis concentrée à environ 40 μM (1,2 mg/ml) sur filtre Centricon® 10 (Amicon).

L'**AMSD** [4 acetamido-4' maléimidylstilbene 2,2' disulfonic acide, disodium salt, $\epsilon_{320 \text{ nm}} = 29000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Molecular Probes, Leiden-Pays-Bas)], dissout dans l' H_2O à 0,1 M, est ajouté à la concentration finale de 15 mM et le mélange est incubé à l'obscurité durant 30 min à température ambiante. Afin de neutraliser les groupements maléimide libres, 30 mM final de β -mercaptoéthanol sont ajoutés et incubés pendant 30 min dans les mêmes conditions. La solution est ensuite centrifugée durant 10 min à $8000 \times g$ à 4°C et la protéine est purifiée par chromatographie FPLC MonoS® dans les conditions décrites au C.1.1. La protéine est stockée sous forme d'aliquotes à -20°C dans l'obscurité à $\text{DO}_{280 \text{ nm}} = 1,0$.

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

V.1. Activité leucocytotoxique sur les polynucléaires humains

V.1.1. Principe de la méthode

Le procédé employé est dérivé de celui décrit par Gladstone *et al.* (Gladstone and Van Heyningen, 1957). Il consiste à observer au microscope à contraste de phase (x 400), les changements morphologiques des leucocytes polynucléaires et monocytes adsorbés sur une lame de verre. Ces changements consistent en un arrondissement des cellules, une perte de réfringence, un arrondissement des noyaux et l'éventuelle formation de pseudopodes. Pour observer une activité leucotoxique, la présence d'un composé de classe S et d'un composé de classe F est nécessaire. La détermination de l'activité spécifique des composés S ou F sur des PN purifiés, utilise des dilutions successives de l'un des composés tandis que l'autre est en excès. Les dilutions de protéines sont effectuées dans du PBS - 0,5 % (p/v) gélatine.

V.1.2. Préparation des polynucléaires humains

Les PN ont été préparés à partir de concentrés cellulaires sanguins ("buffy coat") ; appauvris en plasma, plaquettes et globules rouges. Ils sont âgés de moins de 24 H et sont aimablement fournis par le Centre Régional de Transfusion Sanguine de Strasbourg.

La purification a été réalisée sous une hotte à flux laminaire vertical. Trente ml de "buffy coat" dilués au 1/3 dans du sérum physiologique stérile sont déposés à la surface de 12 ml d'un milieu de séparation des lymphocytes (Milieu MSL[®] - TechGen, FRANCE) dans un tube stérile de 50 ml (FALCON[®] FRANCE). Après 20 min de centrifugation sans frein à 800 x g, les plaquettes et le plasma se retrouvent dans le surnageant (**Figure 14**), puis les monocytes et les lymphocytes sont éliminés. Le sédiment qui contient les globules rouges et les PN est repris dans 30 ml de sérum physiologique auxquels on ajoute 10 ml d'une solution à 6 % (p/v) de Dextran. Après 30 min de sédimentation à température ambiante, les globules rouges situés au fond du tube sont séparés des PN qui se retrouvent dans le surnageant. Ce dernier est alors récupéré et centrifugé sans frein pendant 5 min à 800 x g. Le culot est remis en suspension dans 500 µl de sérum physiologique. Les globules rouges résiduels sont éliminés par l'addition de 18 ml d'H₂O qui provoque leur lyse osmotique en 45 s. L'osmolarité est rétablie par l'addition de 2 ml d'une solution 9 % (p/v) NaCl. Les PN sont sédimentés par une centrifugation sans frein de 5 min à 800 x g et remis en suspension dans une solution de 0,1 mM EGTA pH 7,0 à raison de 6 x 10⁶ cellules/ml.

V.1.3. Activité leucocytolytique des leucotoxines

A 80 µl de PN purifiés (5 x 10⁵ cellules/ml), on ajoute 10 µl de la dilution du composé de classe S à tester et 10 µl d'une dilution au 1/1000 du composé de classe F (1 nM). Le mélange

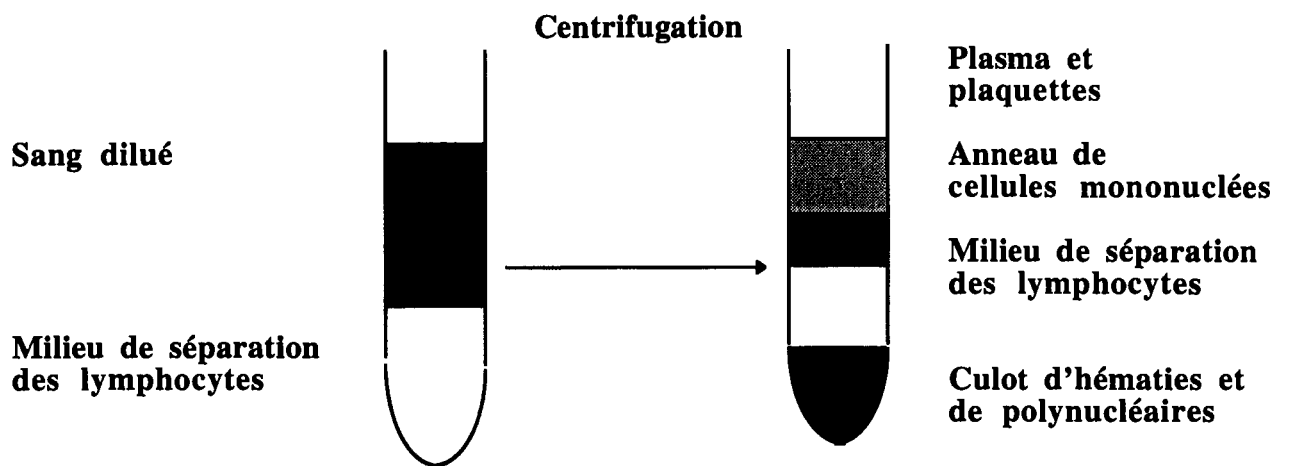


Figure 14 : Séparation des cellules sanguines humaines.

est incubé pendant 30 min à 37°C. Vingt µl sont ensuite déposés sur une lame de verre et les polynucléaires observés au microscope à contraste de phase. L'action des leucotoxines de staphylocoque se caractérise par une perte de réfringence des cellules qui s'étalent. Leur noyau se rassemble en une masse compacte et des pseudopodes cellulaires sont parfois visible. A forte concentration de leucotoxines, les cellules sont lysées. L'activité est déterminée par la quantité minimale de leucotoxine induisant 100 % de modifications morphologiques pour la quantité de cellules énoncée ci-dessus.

V.2. Activité hémolytique sur les hématies d'homme et de lapin

Les globules rouges humains ou de lapin sont prélevés stérilement par ponction intracardiaque en présence d'héparine (4U/ml de sang total). Après une centrifugation à 1000 x g pendant 5 min, les hématies sont lavées trois fois dans un tampon PBS - 0,5 % (p/v) gélatine, puis remises en suspension dans ce même tampon à une concentration de 1 % (v/v). Les échantillons supposés contenir la toxine sont ensuite successivement dilués d'un facteur 2 dans 100 µl de tampon PBS - 0,5 % gélatine contenant 25 ng de HlgB et déposés dans les puits d'une plaque de microtitration. Cent µl de la préparation de globules rouges sont ensuite rajoutés. Après 1 H d'incubation à 37°C, les plaques sont centrifugées 5 min à 1000 x g : les globules rouges non lysés sédimentent.

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

VI. Analyse par cytométrie en flux

VI.1. Principe du cytomètre

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

V1.2. Description du cytomètre en flux

Le cytomètre en flux FACSort (Becton-Dickinson, Le Pont de Claix, France), est équipé d'une source laser à argon de 15 mW émettant à 488 nm. Les cellules en suspension sont aspirées par un flux continu d'une solution isoosmotique appelée liquide de gaine qui permet le passage cellule à cellule dans le faisceau incident (**Figure 15**). Les mesures réalisées sont de plusieurs types:

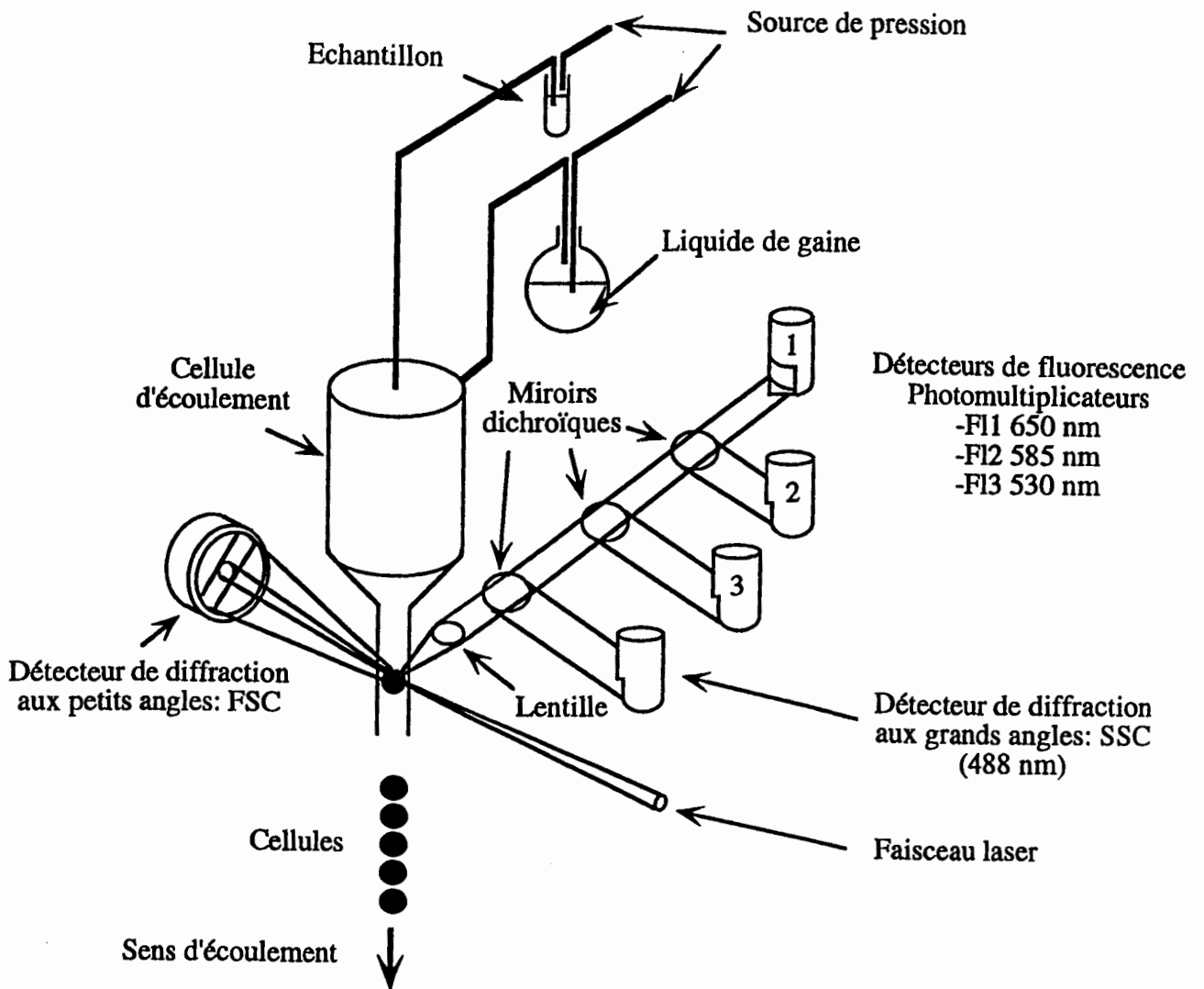


Figure 15 : Représentation schématique du cytomètre en flux FacSort® (Beckton-Dickinson).

- La lumière diffractée selon un angle de 3 à 10° par rapport au rayon incident (diffraction à petit angle ou FSC) permet d'avoir une approche de la taille cellulaire.
- La lumière réfractée à 90° par rapport au rayon incident (réfraction et réflexion à grand angle ou SSC) témoigne de la complexité du contenu cellulaire.
- Chaque population de cellules sanguines peut être représentée sur un diagramme dont les coordonnées sont la taille (FSC) et la complexité du contenu cellulaire (SSC).
- Les mesures de fluorescence émise peuvent être filtrées à trois longueurs d'ondes différentes, 530, 585 et 650 nm et enregistrées simultanément par l'intermédiaire de trois photomultiplicateurs indépendants (FL1, FL2 et FL3). Les essais sont réalisés sur plusieurs donneurs de sang différents (4) et sont analysés puis intégrés par le programme Lysis II (Becton-Dickinson).

VI.3. Chargement des cellules par le Fluo-3/Fluo-4

La mise en évidence des variations de concentration de calcium intracellulaire traduisant l'activation du canal calcique par les leucotoxines est réalisée par la mesure des variations d'intensité de fluorescence de fluo-3 préalablement chargé dans les cellules. Le fluo-3 (Molecular Probes, Eugene, Oregon) est une sonde moléculaire dont la fluorescence augmente quand elle fixe du calcium ($\lambda_{\text{excitation}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 530 \text{ nm}$). Le fluo-3 étant peu soluble, il est utilisé en présence d'un détergent non ionique le Pluronic F127 (Molecular Probes) qui facilite son incorporation dans les cellules. La sonde est ajoutée dans la suspension cellulaire à la concentration finale de 2 μM et les PN sont incubés 1 h à 37°C puis les cellules sont lavées dans du tampon EGTA avant d'être utilisées pour les analyses de cytométrie en flux.

VI.4. Détermination de la formation de pores aspécifiques en présence d'éthidium.

La membrane cellulaire est naturellement imperméable à l'éthidium, un cation monovalent. Lorsque des pores membranaires sont formés, il pénètre dans la cellule, s'intercale entre les plateaux de bases des acides nucléiques et peut émettre une fluorescence rouge ($\lambda_{\text{excitation}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 650 \text{ nm}$). L'augmentation de la fluorescence de l'éthidium est utilisée comme indicateur de la formation des pores aspécifiques par les leucotoxines. L'éthidium est ajouté au milieu cellulaire à la concentration finale de 25 nM.

VI.5. Observations des modifications subies par les cellules

En présence de 1 mM Ca^{2+} dans le milieu extracellulaire l'observation microscopique montre une augmentation du volume du noyau qui s'arrondit. Dans le même temps, le contenu des granules disparaît et après 10 min d'incubation seulement quelques granules gardent leur

intégrité. En absence de Ca^{2+} dans le milieu extracellulaire, l'activité des toxines se traduit au microscope par une augmentation du volume cellulaire, une dispersion des granules et les cellules deviennent claires. Après 15 min d'action, tous ces phénomènes s'amplifient et les noyaux s'arrondissent. Les membranes cellulaires gardent grossièrement toute leur intégrité structurale (Meunier et al., 1995).

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

VI.6. Détermination de la taille des pores formés par les leucotoxines

Le diamètre des pores créés par les leucotoxines est déterminé grâce à l'évaluation de la variation du FSC des cellules traitées ($5 \cdot 10^5$ cellules/ml) avec de 1 nM de LukS-PV et de 40 nM du composé de classe F et présence de 30 mM de billes de Polyéthylène glycol (PEG) de rayon différent (0.94, 1.2, 1.22, 1.44 nm). Les valeurs de FSC sont collectées à 10, 20, 30 min après l'addition de toxine.

VI.7. Etude de la capacité de Fixation des leucotoxines mutantes

Grâce à l'utilisation de la protéine mutante LukF-PV_{Ser27Cys} marquée à la fluorescéine on peut déterminer la capacité des protéines mutées à fixer les cellules - cible par des expériences de compétition en absence de Ca^{2+} extracellulaire. La protéine LukF-PV_{Ser27Cys} marquée à la fluorescéine est utilisée à une concentration fixe de 20 nM en présence de concentrations variables de 1, 5, 10, 20, 50, 100, 200 nM de protéine mutante. Les cellules sont préalablement mis en présence de 3 nM de LukS-PV. La fluorescence résiduelle en surface des cellules est mesurée durant 50 min après l'application du mélange de toxine. La courbe représentant la variation de la fluorescence de LukF-PV_{Ser27Cys} marquée en fonction de la concentration permet de déterminer la constante d'inhibition apparente (K_{Iapp}) pour chaque mutant. Cette constante est calculée par la formule suivante.

$$K_{Iapp} = \frac{IC50}{1 + \frac{[F]}{K_{dF}}}$$

IC50 correspond à la concentration de protéine donnant 50 % d'inhibition. Elle est déterminée par la projection sur l'axe des abscisses du niveau d'inhibition 50 %

$K_{dF} = 3$ nM (Colin A. D., communication personnelle) = constante de dissociation apparente de LukF-PV

[F] concentration de LukF-PvSer27Cys

VII. Dosage de l'Interleukine 8 (IL-8) humaine

Le dosage de l'interleukine 8 (IL-8) humaine est effectué par une méthode ELISA à l'aide d'un kit (Endogen-Interchim, Montluçon-France). Les solutions du kit sont employées à température ambiante, mais certaines ne sont pas sorties plus de 15 min avant l'utilisation. Les cupules séccables sensibilisées aux anticorps anti IL-8 sont chargées par 50 µl de surnageant ou de lysat de polynucléaires durant 1 H à 20-25°C. Dans le même temps, des dilutions de 1000 à 25,6 ng/ml d'IL-8 sont réalisées simultanément et serviront de gamme étalon. Après trois lavages avec le tampon commercial dilué, 50 µl d'anticorps anti IL-8 conjugué à la biotine sont appliqués pendant 1 H et les puits sont ensuite lavés trois fois par le tampon de lavage. Cent microlitres d'une dilution au 1/400 de Streptavidine HRP® sont ajoutés pendant 30 min avant d'être lavés trois fois. Une dilution de tétraméthyl benzidine, substrat de la peroxydase de raifort, est alors incubée pendant 30 min à l'obscurité à raison de 100 µl par puits. La réaction est stoppée par l'addition de 100 µl de solution d'arrêt (contient 0,01 % de thimérosal). Une double mesure de l'absorbance est réalisée à 450 et 550 nm dans les 30 min suivant l'arrêt de la réaction.

VIII. Modèles expérimentaux

VIII.1. Dermonécrose chez le lapin

Des injections intradermales de 50 µl de PBS de 100, 300, 1000, 3000, 10000 ng de chacun des composés de classe S et F sont pratiquées dans le dos rasé de lapins New-Zealand de 3 à 5 kg. Les conséquences macroscopiques sont observées 24 H et 48 H après l'injection, et 5 niveaux réactionnels peuvent être distingués :

- Niveau 0 : peau lisse, normale, sans rougeur.
- Niveau 1 : plaque rouge sans véritable relief de 10 à 15 mm de diamètre
- Niveau 2 : papule rouge, chaude avec un relief de 5 mm et un diamètre de 15 à 20 mm
- Niveau 3 : abcès plus intense de 10 mm de relief et 20 à 30 mm de diamètre
- Niveau 4 : les dimensions se stabilisent mais du pus commence à se collecter et la lésion œdémateuse devient marginée de bleu
- Niveau 5 : une dépression au centre de la lésion se forme et du pus commence à suinter

VIII.2. Injections de toxines dans l'humeur vitrée du lapin

Les injections sont réalisées dans un oeil en accord avec les résolutions de l'Association for Research on Vision and Ophthalmology (ARVO) et avec la permission n° 04683 d'expérimentation animale accordée par le Ministère de l'Agriculture et des forêts.

Les lapins New-Zealand de 3,0 à 3,5 kg sont endormis par l'injection intramusculaire de Zoletil-100® (Laboratoires Reading, Londres) et l'oeil est insensibilisé avec l'instillation de 2 gouttes de chlorhydrate d'oxybuprocaine (CIBA Vision). Les injections de toxines contenues dans 5 µl dans l'humeur vitrée sont réalisées avec un point d'entrée à 4 mm en regard de l'iris en évitant de toucher le cristallin et la rétine avec l'aiguille 3.0 -Gauge (0,3 x 13 mm).

L'évolution de la réaction inflammatoire est suivie toutes les 12 H sur un intervalle de 48 H. Les manifestations cliniques de la chambre postérieure sont évaluées à l'aide d'un ophtalmoscope manuel (Heine), selon les critères de Nussenblatt et *al* (Nussenblatt et al., 1985), qui distingue 5 niveaux de sévérité :

- Niveau 0 : vitrée normal, sans trouble laissant distinguer le nerf optique et les petits vaisseaux sanguins.
- Niveau 1 : un léger trouble s'installe, ne laissant apercevoir que les vaisseaux majeurs et le nerf optique.
- Niveau 2 : la transparence de l'humeur vitrée est réduite à l'observation du nerf optique et des départs de vaisseaux.
- Niveau 3 : seul le nerf optique reste visible, mais ses contours sont flous.
- Niveau 4 : le nerf optique n'est plus visible, des dépôts de fibrine (hypopyon) peuvent éventuellement apparaître.

Les modifications de la chambre antérieure et des annexes ont également été notées : perte des détails de l'iris, pupille constamment rétractée (chemosis), trouble de la chambre antérieure (espace entre le cristallin et la cornée), conjonctivite, blépharite (paupière inflamée), oedème oculaire.

RESULTATS

CHAPITRE I

IMPORTANCE D'UN FEUILLET β PREDIT DANS LES COMPOSES DE CLASSE S DES LEUCOTOXINES DE *S. AUREUS*

I. Introduction

II. Article N°1

III. Discussion

IV. Approfondissement de l'étude du β -feuillet prédit à l'extrémité N-terminale des composés de classe S

VI.1. Objectifs

IV.2. Choix des nouvelles mutations

IV.3. Activités biologiques des protéines mutées LukS-PV Gly10Cys et Ser22Cys

IV.4. Dimérisation des mutants LukS-PV Gly10Cys et Ser22Cys

IV.5. Activités biologiques de certains mutants de LukS-PV

V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Protéines de classe S / Alpha-toxine / Protéines de classe F

LukE	1	NTNIENIGDGA--EVI----KRTEDVSSKKW-GVTQNVQDFVKDKKYNKDALIVKMQGFINSRTSFSVDVKGRGYELTKRLI	
LukS-PV	1	DN*****---*V-----*****T*D*-----*I*****L***S***K*TYNY*NTDH--I*AMR	
HlgA	1	ENK**D**Q**--*I*-----*Q*IT**RL-AI**I*****V*****S***TY**L*KYPY--I**M*	
HlgC	1	ANDT*D**K*SDI*I*-----*****KT*N*-----*I*****L*****S***TYNY*KTNH--I*SMR	
LukM	1	A---*D**D*-----*****R*-----*I*****T*N***QN--RAN**MV	
LukS-I	1	ANT**E**E**--*QI*-----*****R*-----*I*****P*****I*****L*****T***K***S***IL	
Hla	1	ADSDI**KT*TTDIGSNITV*TGDL*TYD*EN*MHKK*FYS*ID*NH**KL*VIRTK*T*AG--QYRVYSEE*AN-KSG*A	
LukD	1	AQNITPKREKKVD-DKITLYKTTATSDNDKLN-IFQLITFNFIKDKSYDKDITLVKAAGNINSYKFNPNPKDYNYSQFYWGG	
LukF-PV	1	**H***VS*****S***K*-*S*****I*****Y***TKP***TIS*****S	
HlgB	1	EGK***VSV***-*V*****A*S**FK-*S*****T*****FVKP**N**DF*KL***A	
LukF'-PV	1	**H***VS*****S***K*-*S*****I*****Y***TQPTSDSSIN*****A	
LukF-I	1	*NQ***VS*****A*S*N*--*S*L*****SP**N*I**S***A	
LukE	76	WPFQYNIGLTKDPNVSLINSITLTKTKIETT*DVQQLTGYNIGGNFQAPS--IGNGSFNYSKT--ISY*QKSYVSEVDKQ	
LUKS-PV	74	*****K*N***D***Y--***N**DSVN*S*****N*G*--*T*****--***N*QN*I**EH*	
HlgA	74	*****S*K***S**D***Y--***N**DSA**S*K*****S*****--***N**N**T**ES*	
HlgC	76	*****K*N*KY*****Y--***N**S*N*S*****L*****S_____*QN*****EQ*	
LukM	71	*****S**Q**T***Y--***N**V*****K***V*--*S*****S--*K*S*****EQ*	
LukS-I	76	*****A*K*N***P***Y--***N**SI**S*****V*****L--L**K**E***K--*****N*I**AQ*	
HLA	80	**SAFKVQ*QLP*NE*AQISDY-Y*RNS*D*KEYMS**T*GFN**VTGDDTGK***LIGA*V*IGHILK*V*PDFKTILESP	
LukD	81	KYNVSVSSESNDVAVNVVDYAPKNHNEEFVQQT*LGYSYGGDINISN-GLSGGLNGSK-SFSETIN*YKQESYRITIDRKTNHK	
LukF-PV	81	***I*IN*D***S*****Q*****V*****_*****G****_*****SL*KR**F*	
HlgB	81	****I**Q***S*****Q*****N***TF***S***_*****NT-A*****LS*N**Y*	
LukF'-PV	81	****F***K*S*****Q*****I*_*T*****_*****I*****	
LukF-I	81	****I*A**KG*****Q*****N***F***S**K-*****E-*****KH*DN*	
LukE	155	NSKSVK*GWV*KAN*FV*TPD-----GKKFAADRYL*FVQ*SPNGPTGSAREYFAPDNQLPPLVQSGFNPSFITLTSHEK*GSKLI	
LukS-PV	151	****Q**I***S*I*SL-----*MSGH*PN**GYKP-YSQNP*D**V***E*****H*****ASV*****-GD	
HlgA	151	***G*****S***N-----*QSV*Y*Q**A*-DP-TGPA*D**V*****I*****R*K-GD	
HlgC	153	****L*****S*A*ES-----*Q*S*F*SD**GYKP-HSKDP*D**V**SE*****A*V*****-SD	
LukM	148	S**TI*****S**IAG-----HRWS*Y*EL**IRNIT-RGPN**D**VD**E***IT*****A*V****D*-GD	
LukS-I	153	***NIR*E***S*N*EN-----*QVS*Y**H***R**I*--*N**DF*V*NDE***IG*****A*V****D*-GD	
Hla	161	TD*K*G*K*IF*NMVNQNWGPYDRDSWNPVYGNQ**MKTRN*-SMK*ADN*LDP*KASS*LS***S*D*A*VITMDR*KASKQ	
LukD	161	SIGWGEA*HKIMNNGWGPYGRDSYDPTYGNELFLGDKSSNAGQNF*LP*THQI*PLLARGN*FNF*E*F*SVL*SHK*LF*DT*TK*SK-I	
LukF-PV	161	K**D*****HS*****M***SRQ*NL*****EY*KM*V*S*****G***R*QNA*****-	
HlgB	161	NV*****FH*****A*RQ**AY*****IAQ**M**S*S*****L*****RQDGA***-*	
LukF'-PV	161	*****S*S*****RQ*****N*****M*****L*****QK*V****-*	
LukF-I	161	T*****A*****FHDL*****RQ**L*****R*M*****L*****PNGA*T**-*	
LukE	231	RVNLKFSYGRNLDITYAT-----LFPRTGIYAERKHNAFVNRNFVVRKVNWKTHEIKVKGHN	286
LukS-PV	226	TSEFEIT***M*V*H**RRTTHYGNSY-LEGS*I*K*****YT*K*E*****	284
HlgA	226	KSEFEIT***M*A***-----YVT*HRLAVD***D**K***VT*K*E*****V*I*SITPK	280
HlgC	228	TSEFEIT***M*V*H**IKRSTHYGNSY-LDGH*V*****YT*K*E*****Q*	286
LukM	223	TSEFEIT***M*V***-----YL*KL*L*P*****E*****L*K*E*****S*L**R***	277
LukS-I	226	TSEFEIA*****-----F*****F***R***LM**L*TK*E*****	281
Hla	241	QT*IDVI*E*VR*DYQLHWTSTNWKGTN-----TKDKWTRDSSER*KID*EKE*MTN	293
LukD	242	KVTYQREMDRYTNQWNRHLHWGNNYKNQNTVTFSTYEV*DWQ*ILLK*LG*TD*SK*ET*NP-GV	301
LukF-PV	242	T***S*****F**Q**I*****DE*RA*H**I*****E*HTV***D*Q**K**MS	301
HlgB	242	T*****L*QIR**GFY*A*A**FK*R**K***I**E*HKV**LD*KET*N*K	299
LukF'-PV	242	*****E*F*****I*Y*I**KRA*H*****I**EKHTV**VASQS*S*	296
LukF-I	242	*****E***Y**GF**M*T*****NA***F**I**DQHTV**K*H*D*K**S	300

Figure 16 : Alignement des séquences peptidiques des composés de classe S (LukE, LukS-PV, HlgA, HlgC, LukM, LukS-I) et de classe F (LukD, LukF-PV, HlgB, LukF'-PV, LukF-I) des leucotoxines avec l'α-toxine (Hla) (méthode Clustal - logiciel d'analyse DNASTar®). Les astérisques indiquent les identités entre acides aminés, les tirets signifient l'absence de résidus.

I. INTRODUCTION

Les leucotoxines de *S. aureus* constituent une famille de toxines formant des pores à deux composés individualisés, l'un dit de classe S et l'autre dit de classe F. Parmi les principaux membres de cette famille, on distingue d'une part la gamma-hémolysine constituée de deux composés de classe S (HlgA, HlgC) et d'un composé de classe F (HlgB), et d'autre part la LPV constituée d'un composé de classe S (LukS-PV) et d'un composé de classe F (LukF-PV). Les comparaisons de séquences primaires effectuées grâce au logiciel Protean™ du programme DNASTar Ltd (Londres) montrent une homologie de 60 à 75 % entre les composés de la même classe (**Figure 16**). Mais les composés de classe F ne présentent que 15 à 25 % d'identité avec ceux de classe S. Le mode d'action de cette famille de toxines mérite d'être mieux connu. L'utilisation de techniques comme la cytométrie en flux a permis de démontrer que l'activité biologique ne s'exprimait que lors de la fixation préalable du composé de classe S aux membranes des PMNs avant que le composé de classe F ne se fixe secondairement (Meunier et al., 1995). Les mêmes résultats ont été observés sur les érythrocytes de lapin et d'homme (Meunier et al., 1997) bien que d'autres auteurs aient annoncé une fixation inversée pour le couple HlgA + HlgB sur les hématies humaines (Ozawa et al., 1995). Cette fixation séquentielle confère un rôle particulier à la protéine de classe S. D'autre part, la séquence de l'alpha-toxine, l'une des toxines formant des pores la plus étudiée ne présentait que 2 % d'identité avec les composés de classe S. Nous nous sommes donc intéressés aux domaines structuraux des composés de classe S pouvant être impliqués dans le mode d'action des leucotoxines. Les alignements de séquence et les prédictions de structure secondaire par la méthode de **Chou et Fasman** montraient l'existence d'un β -feuillet de 13 acides aminés conservés à l'extrémité N-terminale des composés de classe S. La présence de cette structure conservée nous a amené à nous interroger sur son importance dans les composés de classe S vis à vis d'une fonction commune à toutes ces protéines. Le logiciel Protean™ du programme DNASTar prédit que la mutation de la thréonine 28 en acide aspartique dans le composé HlgA (HlgA Thr28Asp) et la mutation de la thréonine 30 en acide aspartique dans le composé HlgC (HlgC Thr30Asp) provoquent une rupture du β -feuillet. Dans le cadre de l'étude des relations structure-fonction de ces leucotoxines et en absence de leur structure tridimensionnelle, nous avons donc réalisé par mutagenèse dirigée le remplacement de cette thréonine 28 par d'autres acides aminés dans les protéines de classe S HlgA et HlgC de la gamma-hémolysine et de la LPV. Ces substitutions sont prédites pour rompre le β -feuillet. Les protéines mutées sont purifiées et analysées pour plusieurs de leurs propriétés sur les PMNs humains, les érythrocytes de lapin et des vésicules synthétiques unilamellaires. La vérification de la modification du contenu en β -feuillets par une méthode biophysique a pu être envisagée grâce à la collaboration avec l'équipe de G. Menestrina (CNR Povo, Italie). Notre choix s'est d'abord porté sur la gamma-hémolysine, car des analyses biophysiques sur les hématies et les membranes synthétiques étaient alors possible. Les applications se sont ensuite étendues à LukS-PV.

II. ARTICLE N°1

“A predicted β -sheet from class S components of staphylococcal γ -hemolysin is essential for the secondary interaction of the class F component“

**O. Meunier, M. Ferreras, G. Supersac, F. Hoeper, L. Baba-Moussa,
H. Monteil, D.A. Colin, G. Menestrina, G. Prévost**

***Biochimica et Biophysica Acta*, 1326 (1997) 275-286**



A predicted β -sheet from class S components of staphylococcal γ -hemolysin is essential for the secondary interaction of the class F component

O. Meunier ^a, M. Ferreras ^b, G. Supersac ^a, F. Hoepfer ^b, L. Baba-Moussa ^a, H. Monteil ^a,
 D.A. Colin ^a, G. Menestrina ^b, G. Prévost ^{a,*}

^a Institut de Bactériologie de la Faculté de Médecine de Strasbourg, 3, rue Koeberlé, F-67000 Strasbourg, France

^b CNR-Cefsa, 14, via Sommarive, I 38050 Povo, Italy

Received 17 December 1996; revised 6 February 1997; accepted 7 February 1997

Abstract

Site-directed mutagenesis was performed on genes encoding HlgA and HlgC, two of the three proteins expressed from the staphylococcal γ -hemolysin locus, which originate two pore-forming toxins (HlgA + HlgB, HlgC + HlgB). As related proteins, HlgA and HlgC were found to bind first to cell membranes. Amino acid substitutions concerned residues that would predictably disrupt a 13 amino acid conserved β -sheet of the Chou and Fasman secondary structure prediction. The mutation of a threonine into an aspartic acid residue from HlgA (T28D) and from HlgC (T30D) that would break this predicted N-terminal structure lowered dramatically the biological activities on purely lipidic vesicles, erythrocytes and polymorphonuclear cells. The change in secondary structure was confirmed by Fourier Transformed Infrared spectroscopy. The binding of mutated and native proteins at the same kind of sites onto polymorphonuclear cells was evidenced with flow cytometry and fluorescein-labelled anti-class S antibodies or wild type HlgA or HlgC. However, the subsequent binding of fluorescein-labelled HlgB to membrane-bound mutated HlgA or HlgC complexes was inhibited. In conclusion, the first binding of class S components is essential for the subsequent binding of class F components, and a predicted β -sheet seems to be at least one of the functional domains involved. © 1997 Elsevier Science B.V.

Keywords: γ -Hemolysin; Synergy; Sequential binding; Predicted β -sheet; FTIR spectroscopy; Mutagenesis

1. Introduction

The locus encoding the γ -hemolysin from *Staphylococcus aureus* Smith 5R, a methicillin-resistant strain RIMD 310925, P83 and ATCC 49775 strains was described as composed of three genes [1–4]. Two of the corresponding proteins, HlgA and HlgC have primary structures related to the recently described LukS-PV (62–65% identity) and are consid-

Abbreviations: PMN, polymorphonuclear cells; SUV, small unilamellar vesicles; RRBC, rabbit red blood cells; ATR-FTIR, attenuated total reflectance-Fourier-transformed infrared spectroscopy

* Corresponding author. Fax: +33 3 88 251113.

ered as class S proteins [4]. The third protein, HlgB is related to LukF-PV (72% identity) and considered as a class F protein. Similarly to the pair LukS-PV + LukF-PV which forms the Pantone-Valentine leucocidin [5], the γ -hemolysins actually comprise two pairs, e.g., HlgA + HlgB, HlgC + HlgB. The locus encoding γ -hemolysin is largely distributed among *S. aureus* strains, whereas that encoding the Pantone-Valentine leucocidin is encountered in only 2% of strains mainly associated with furuncles [6,7]. A 25–30% identity score was found between components of class S and class F [1,4] which may account for a similar folding when integrated into membranes.

In this work we demonstrate that the two γ -hemolysins are pore-forming toxins as the Pantone-Valentine leucocidin [8]. Logically, one can expect similar biological features for these compounds, e.g., binding, components interaction, oligomerisation, and formation of the pore. It was reported that LukS-PV and HlgA (class S components) bind first to PMN [9,10] and to rabbit red blood cells [11], respectively. However, HlgB (class F component) was reported to bind primarily onto human RBC [11]. Pairs constituting γ -hemolysin are leucotoxic for various mammalian PMN, monocytes and macrophages [3,4], inducing inflammatory response of host defence cells [9,12–14]. However, HlgC + HlgB exhibits a hemolytic activity very much lower than that of HlgA + HlgB on both rabbit and human erythrocytes.

The different membrane ligands of class S components remain unknown, as well as the interaction between class F components and membrane-bound class S components complexes. Furthermore, the stoichiometric arrangement of the two synergistic proteins participating in pore-formation has still to be defined clearly [9]. The synergistic action of two different proteins and the various cell specificities pertaining to the different pairs of proteins make these toxins rather peculiar. Although the toxic process of such molecules may be the result of pore-formation, other interactions with cell signaling proteins cannot be excluded.

In an attempt to study structure–function relationships within these molecules, a single amino acid substitution was designed to disrupt a part of a predicted secondary structure appearing in both HlgA and HlgC and also in LukS-PV [15]. The biological activity of the purified engineered proteins was anal-

ysed on human circulating PMN, rabbit erythrocytes, and small unilamellar vesicles.

2. Materials and methods

2.1. Plasmids and mutagenesis

DNA-modifying enzymes were used as recommended by the manufacturers (Gibco-Bethesda Research Laboratories and New England Biolabs, Beverly, MA). The *hlg* locus of *S. aureus* ATCC 49775 (sequence EMBL Library Databank no. X81586) was previously cloned into the pUC 19 plasmid [16].

Briefly, pairs of oligonucleotides: (1) 3 5'-AATAAATCTTTTAAACATAATGCTA-3' 27, coupled to 353 5'-TCAAATTGAATGTTTTGATCTA-TAGCTAATCGT-3' 326 from *hlgA* sequence determining a HlgA T28D mutated protein and (2) 1475 5'-GCTTTTAGCATTCCAAACAAAAA-3' 1497 coupled to 1841 5'-GAATTGGATATTTTGA7C-CACGCCCATTTATTA C-3' 1807 or 2132 5'-GT-TAAATGATCC7TTACCACCAAG-3' 2109 from *hlgC* sequence determining mutated HlgC T30D, and HlgC N129K, respectively, were used for short DNA fragments amplification [17]. Amplifications were performed in 100 μ l containing 10 ng of recombinant plasmid and 2 U of *Taq* DNA polymerase (Gibco-BRL). Operating conditions were as follows: one denaturing step of 4 min at 94°C; 20 cycles of 3 steps of 1 min 30 s at 92°C, 1 min 30 s at 48°C, 1 min 30 s at 72°C; an ending step of 3 min at 72°C. The amplified DNA fragments were electrophoresed on 1.5% (w/v) agarose gel and electroeluted in order to be used in a second amplification with the oligonucleotides 1396 5'-AATGCTCTTGCTTTTATTTT-3' 1377 and 2845 5'-CTGCAGCTTTAAG-CACTAAAG-3' 2825, thus amplifying whole *hlgA* and *hlgC* genes, respectively. Secondary amplifications were performed as followed: one denaturing step of 4 min at 94°C; 20 cycles of 3 steps of 1 min 30 s at 92°C, 1 min 30 s at 54°C, 4 min 30 s at 72°C, and 5 min at 72°C. The electroeluted amplified DNA fragments were then ligated to the T/A ended plasmid pCRTMII (RD Systems Ltd - London), used to transform *Escherichia coli* (*E. coli*) Inv α F' strain [*endA1*, *recA1*, *hsdR17* (r⁻k, m⁺k), *supE44*, λ -

thiI, *gyrA*, *relA1*, ϕ 80, *lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*), *deoR*⁺, F', and sequenced [18] in both strands with T7 DNA polymerase (Pharmacia, Uppsala, Sweden). DNA analyses and structure predictions were made by using DNASTar Software (DNASTar Ltd-London).

2.2. Purification of mutated proteins

For each of the mutated genes as well as for the wild-type gene, recombinant Inv α F' *E. coli* strains were grown at 37°C during 18 h in 2-liter Erlenmeyer flasks filled with 1 liter of 2 \times TY medium – 100 μ g/ml ampicillin. Bacteria were harvested by a 10-min centrifugation at 7000 \times *g* and resuspended as 30% (w/vol) in 50 mM NaH₂PO₄, 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT (pH 7.0). Bacteria were then ground under a 130 megaPascal pressure in a FrenchPress (SLM Instruments, Urbana, USA) at 4°C. Bacterial debris were removed by a 35-min ultracentrifugation at 55000 \times *g* in a Ti60 rotor (Beckman) at 4°C. Supernatants were dialysed against 50 mM NaH₂PO₄, 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT (pH 7.0). The mutated proteins were purified by the same procedure as previously reported for the wild-type HlgA or HlgC [4,19]. They were stored at –80°C at a 1 mg/ml concentration after being analysed by SDS-PAGE [20] on PHAST⁺-System (Pharmacia).

2.3. Labelling of antibodies and purified HlgB with 5-(14, 6-dichlorotriazin-2-yl) amino-fluorescein (DTAF)

Affinity-purified rabbit polyclonal anti-S component antibodies and purified HlgB were adjusted to 1 mg/ml in 0.2 M NaHCO₃ (pH 9.0) and mixed for 20 min at room temperature with 0.1 volume of 2 M DTAF solubilised in 1 M NaHCO₃ (pH 9.0). The coupling reaction [21] was stopped by equilibrating the solution to 50 mM NH₄Cl (pH 8.0) for 2 h at 4°C. Free DTAF was discarded by desalting in a PD10 column (Pharmacia), and proteins were equilibrated in 30 mM Hepes, 0.15 M NaCl (pH 7.5). DTAF coupling was measured by the determination of the concentration of protein as assayed by Bradford coloration compared to the bound fluorescein concentration measured at OD_{491 nm} ($\epsilon_M = 61\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). HlgB was labelled with DTAF in a 1:1 mol ratio and conserved more than 95% of the bio-

logical activity of the wild HlgB when combined with HlgA or HlgC.

2.4. Secondary structure determinations by attenuated total reflectance – Fourier transformed infrared (ATR-FTIR) spectroscopy

ATR-FTIR spectra were recorded on a Bio-Rad FTS 185 FTIR spectrometer equipped with a DTGS detector with CsI window, a KBr beamsplitter and an ATR attachment by Specac. Typically, 32 interferograms were collected, Fourier transformed to a nominal resolution of 0.5 cm⁻¹ and averaged. The instrument was constantly purged with dry air. Spectra were corrected by subtracting a background obtained with the ATR crystal and no sample. The absorbance of residual H₂O was subtracted to give an almost flat baseline between 1880 and 1720 cm⁻¹. Before analysis the leukotoxins were extensively dialysed against three changes of 10 mM Hepes (pH 7.0). For the experiment, 28 to 40 μ g of HlgA, HlgA T28D, HlgC, and HlgC T30D contained in 40 μ l of the given leukotoxin solution were deposited and dried in a thin layer on one side of a 10-reflections Ge crystal (45° cut): the crystal was housed in a liquid cell and flushed with D₂O-saturated nitrogen for 45 min before collecting the reported spectra.

The ATR-FTIR spectra were processed using the Bio-Rad Win-IR software. Spectra were deresolved to 2 cm⁻¹ and then the amide I' band, between 1600 and 1700 cm⁻¹, was curve-fitted with a sum of Lorentzians, using the nonlinear least squares fitting of Levenberg-Marquardt method [22]. No parameter was constrained. The relative contents of secondary structure elements were estimated by dividing the areas of the individual peaks, assigned to particular secondary structures according to Byler and Susi [23], by the area of the whole amide I' band; the components around 1610 cm⁻¹, resulting from the side chains, were excluded.

2.5. Permeabilisation of lipid vesicles

Small unilamellar vesicles (SUV) were prepared as follows: an equimolar mixture of phosphatidylcholine (PC, Avanti Polar Lipids) and cholesterol (Cho, Fluka) 1:1 at a total lipid concentration of 2 mg/ml was sonicated for 1 h in a solution containing calcein 80 mM (Sigma), whose pH was adjusted at 7.0 with

NaOH. Titanium particles released by the sonotrode during sonication were removed by centrifugation. SUV were washed in a Sephadex-G25 column to remove free calcein, using a buffer containing 30 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 7.0).

The permeabilising activity of SUV by the toxins was assayed by measuring the extent of calcein release [24]. In a 1-cm plastic cuvette a total volume of 1.2 ml of the above buffer containing a final lipid concentration around 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and the indicated concentrations of the assayed toxins were incubated under continuous stirring. After the addition of the toxin, the fluorescence (F) emitted at 520 nm (excitation at 494 nm), increased as a consequence of the dequenching of the internal dye when diluted in the external medium. Maximum release was determined by addition of 1 ml Triton X-100. The extent of permeabilisation was calculated as:

$$P(\%) = 100 \times (F_{\text{final}} - F_{\text{initial}}) / (F_{\text{maximal}} - F_{\text{initial}})$$

where F_{initial} is the value of fluorescence before the addition of the toxin, F_{final} the value reached at equilibrium, and F_{maximal} the value obtained with Triton X-100.

2.6. Determination of the hemolytic activity

Fresh venous blood was collected from rabbit in EDTA 6 mM. Rabbit red blood cells (RRBC) were prepared by washing thrice (10 min centrifugation at $700 \times g$, room temperature) in a buffer containing 30 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 7.0). The time course of the RRBC lysis in the presence of the different toxins was followed by measuring the turbidity at 650 nm in the washing buffer at 25°C, using a kinetic 96-well microplate reader (Molecular Devices UVmax), as already described [25]. Each well contained the specified concentrations of the indicated toxins and RRBC at a concentration of 0.13% (v/v), which corresponds to an initial $A_{650\text{nm}}$ of 0.1, in a final volume of 200 μl of the same buffer. When a couple of toxins was assayed, both components were added at the same concentration, and serially two-fold diluted along a line of the microplate. In competition studies of a native with a mutant toxin, the concentration of the wild-type toxins (HlgA + HlgB or HlgC + HlgB) was constant all along the line, while the mutant was serially diluted. The 96 wells were stirred and read

every 8 s for 45 min of reaction. The percentage of hemolysis was calculated as:

$$\text{Hemolysis}(\%) = 100 \times (A_{\text{initial}} - A_{\text{final}}) / (A_{\text{initial}} - A_{\text{water-lysed}})$$

where A_{initial} is the absorbance before adding the toxin, A_{final} that after the addition of the toxin, and $A_{\text{water-lysed}}$ the absorbance obtained when the RRBC were completely lysed in water. The maximal rate of hemolysis, V_{max} , was the largest slope calculated in the absorbance vs. time curve normalised by dividing by $(A_{\text{initial}} - A_{\text{water-lysed}})$.

For the end-point measurements, the assay was performed differently. In a total volume of 500 μl , RRBC (at the same final concentration as above) were incubated with the toxins for 30 min at 37°C. Intact cells were pelleted ($15\,800 \times g$, 3 min) and the released hemoglobin in the supernatant was read at 415 nm. The hemolytic activity was calculated as:

$$\text{Hemolysis}(\%) = 100 \times (A_{+\text{toxin}} - A_{-\text{toxin}}) / (A_{\text{water-lysed}} - A_{-\text{toxin}})$$

where $A_{+\text{toxin}}$ and $A_{-\text{toxin}}$ are the reading with and without toxin, respectively.

2.7. Preparation of leucocytes

Five ml of Plasmion* (Lab. Roger Bellon, France) were added to 14 ml of buffy-coats from healthy donors diluted with 6 ml of 9‰ (w/v) NaCl and left to sediment for 30 min. Supernatant leucocytes suspension were harvested and the residual erythrocytes contaminating were lysed for 10 min by completing to 50 ml with 0.16 M NH_4Cl . After washing, cells were resuspended (5×10^6 cells/ml) in 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM glucose, 0.1 mM ethylene glycol-bis(beta-aminoethyl ether) N, N, N',N'-tetraacetic acid, 10 mM Hepes and 3 mM Tris-base (pH 7.3). The latter buffer was also used to wash cells treated with toxins and antibodies as well as for competition assays before flow cytometry analysis.

2.8. Flow cytometry measurements

Before further experiments, rapid leucocytolytic and hemolytic assays were achieved as previously reported [4]. Flow cytometry measurements were

made using a FACSort[®] cytometer (Becton-Dickinson, Le Pont de Claix, France) equipped with a 15 mW argon laser tuned at 488 nm. Forward (FSC) and side (SSC) light scatter dot plots acquired from 5000 purified white cells (10^6 cells/ml) were usually gated for PMN [10]. The fluorescence light 1 (FL1: $\lambda_{EM} = 530$ nm) was used to record the DTAF fluorescence and the fluorescence light 3 (FL3: $\lambda_{EM} = 585$ nm) was used to record the fluorescence of ethidium. The fluorescence of ethidium which increases when it is bound to nucleic acids was used as an indicator of the formation of pores through the cell membrane as previously described in the absence of calcium [10]. Data were calculated from quadruplicate assays by Lysis 2 TM software (Becton-Dickinson, France).

2.9. Binding capabilities determination

Two methods were used to determine the binding of both components: (1) the binding of the class S components was measured by the fixation of fluorescent anti-class S components antibodies. The PMN were incubated with increasing amounts of HlgA or

HlgC, and after washing, a 15 min subsequent incubation with fluorescent anti-S antibodies ($2.5 \mu\text{g/ml}$) was performed at room temperature; (2) the class S components capabilities to bind the class F component were estimated by the binding of fluorescent DTAF-HlgB (0.75 nM). The results were calculated as percent of the mean fluorescence obtained from 5000 cells for 3 nM HlgA or HlgC. A concentration of 3 nM in HlgA and HlgC was used in the rest of this study for mutants comparison and competition since this value is close to the concentration where the specific binding is saturated.

3. Results

3.1. Secondary structure predictions

However, class S proteins, on one hand, and class F proteins, on the other hand, harbour from 60 to 98% sequence identity. Moreover, secondary structure predictions [15] revealed significant homologies. As an attempt to verify the significance of these observations and determine which of the predicted

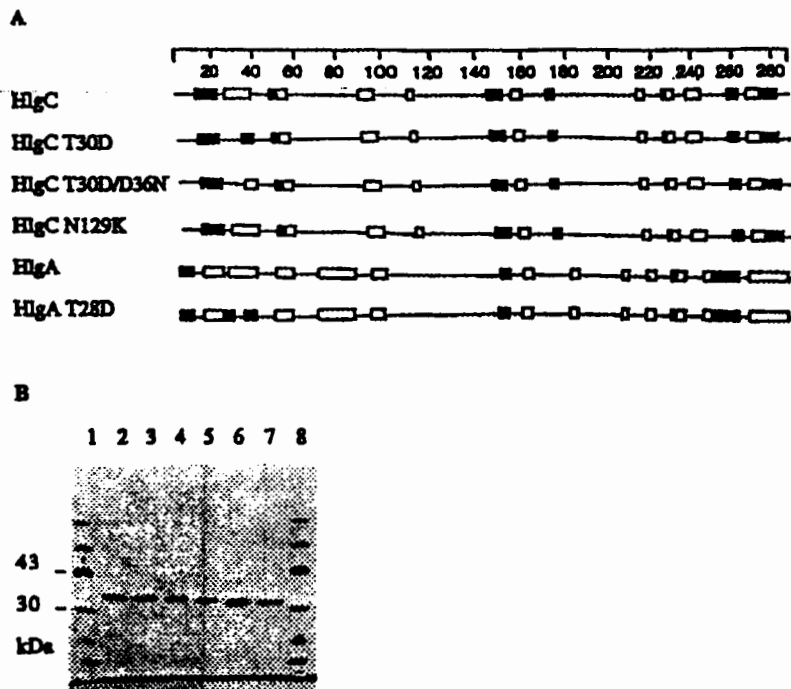


Fig. 1. A: Secondary structures predictions of HlgC, HlgC T30D, HlgC T30D/D36N, HlgC N129K, HlgA, and HlgA T28D. Alpha-helices (□) and beta-sheet (■) predictions were obtained by computed Chou and Fasman [3] algorithms (DNASStar Ltd). B: SDS-PAGE of the purified mutated proteins (50 ng loaded). Lanes 1 and 8: apparent molecular mass ladder (Pharmacia). Lane 2: HlgC. Lane 3: HlgC T30D. Lane 4: HlgC T30D/D36N. Lane 5: HlgC N129K. Lane 6: HlgA. Lane 7: HlgA T28D.

secondary structures may have an important role in the cascade of events determining pore-formation, we introduced amino acid substitutions that would, predictably, disrupt some conserved secondary structures of the class S proteins. These latter components were considered as the most critical to study, since they are binding to target cell membranes in first place.

Two mutations concerned a predicted and conserved 13 amino acid-long β -sheet (Fig. 1A) in the N-terminal extremity of HlgA and HlgC (HlgA T28D and HlgC T30D). A third one HlgC T30D/D36N was obtained simultaneously to HlgC T30D and was analysed because of a predicted partial restoration of the β -sheet along 6 amino acids. The HlgC N129K was induced in order to modify a region (GYNIGG-GNFQS) having homology with some human integrins [26]. The considered secondary structures were predicted by the methods of Chou and Fasman [27] and Garnier et al. [28]. The purified proteins showed comparable molecular mass with the staphylococcal native proteins (Fig. 1B). The biological specific activities of the native staphylococcal proteins were previously observed to be comparable to the *E. coli* recombinant proteins, thus allowing the use of the former proteins in the following experiments.

ATR-FTIR spectra of HlgA and HlgC are shown in Fig. 2. In all cases the amide I' band is peaked in the region at 1634–1641 cm^{-1} , indicating a prevalence of β structure, at least in part composed of antiparallel β -sheet [23]. Upon introduction of Thr for Asp at position 28 in HlgA and 30 in HlgC there is a reduction in the absorption at 1635 cm^{-1} indicative of a decrease in β -sheet (Table 1). In the case of HlgA T28D such a decrease is compensated mainly by an increase in β -turn structure, whereas in the case of HlgC T30D there is an increase in the unordered structure.

Fig. 2. Infrared-ATR spectra in the amide I' region of deuterated films of class S components of gamma-lysins. A: HlgA; B: HlgC. The spectrum (solid line), seven Lorentzian component bands obtained by curve-fitting (thin solid lines) and their sum (dotted line), are shown in each case. A linear baseline was subtracted. In the insets, the spectra of the point mutants described in this paper (dashed lines) are compared to the respective wild-type (solid lines). In both cases, the spectrum of mutant was normalised to have the same total area as the wild-type.

3.2. Permeabilising activity on model membranes

The pairs constituting γ -hemolysins HlgA + HlgB and HlgC + HlgB were both found to have a permeabilising activity on small unilamellar vesicles (SUV).

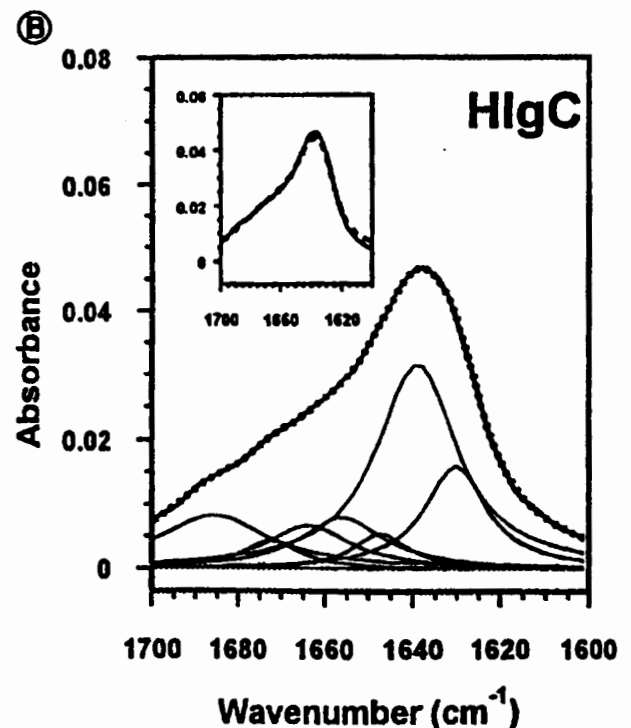
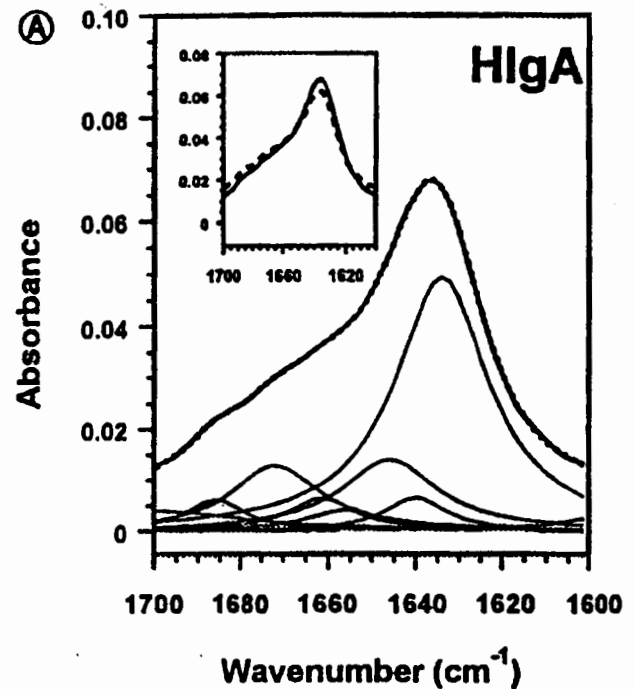


Table 1
Secondary structure determination of gamma-lysins and mutants by ATR-FTIR

Protein	β_1	t	α	r	β_2	β_{total}
HlgA	6.7	14.6	5.9	15.8	57.0	63.7
HlgAT28D	9.6	25.4	4.5	17.0	43.4	53.0
HlgC	4.3	21.4	11.0	5.1	58.1	62.5
HlgC T30D	4.7	24.4	11.7	14.0	45.2	49.9

Best fitted Lorentzians (see Fig. 2) were assigned to a particular secondary structure according to Byler and Susi [22]: β_1 pertains to antiparallel β -sheet, β_2 to both parallel and antiparallel β -sheet, α is for α -helix, t for β -turn and r for random coil or, more in general, unordered structure. β_{total} is β_1 plus β_2 . The errors, as derived from independent fittings, are within $\pm 5\%$.

Hence, the effect of the mutations HlgA T28D and HlgC T30D on this activity was studied. Fig. 3A shows the extent of calcein release measured when 95 nM of HlgA, HlgC, HlgA T28D or HlgC T30D were incubated with PC:Cho 1:1 SUV in the presence of the same amount of HlgB. HlgA had the highest permeabilising activity, while the mutants were completely inactive, even at concentrations up to five times higher than the wild-type protein (data not shown).

The competition between HlgA T28D and HlgC T30D and the respective wild-type proteins in the permeabilisation of lipid vesicles was then studied. Constant concentrations of HlgA + HlgB or HlgC + HlgB were incubated with SUV (PC:Cho 1:1) in the presence of increasing amounts of HlgA T28D and HlgC T30D, respectively. As shown in Fig. 3B, there was a competition between the mutants and natural proteins, which was stronger in the case of HlgA. At the same concentration of HlgA and its mutant, calcein release decreased to around 40% of control, disappearing almost completely when HlgA T28D: HlgA was in a 4:1 ratio. In the case of HlgC, as the concentration of HlgC T30D increased, the release of calcein decreased, being 15% lower when HlgC and the mutant were equimolar, to reach 50% of the original activity when the mutant was four times more concentrated than the wild-type toxin. Due to the high amount of toxins required in these experiments, a complete decrease of the permeabilising activity of HlgC could not be reached.

3.3. Hemolytic activity

The hemolytic activity of HlgA T28D and HlgC T30D, in the presence of HlgB, was assayed on rabbit red blood cells (RRBC) and compared with that of the wild-type toxins. In these assays, the class S components HlgA or HlgC and HlgB were always added in the same concentration, both the extent of the hemolytic activity and the maximal rate of hemolysis, V_{max} were determined (Fig. 4A,B). HlgA + HlgB provoked 80% of hemolysis at a concentration 4

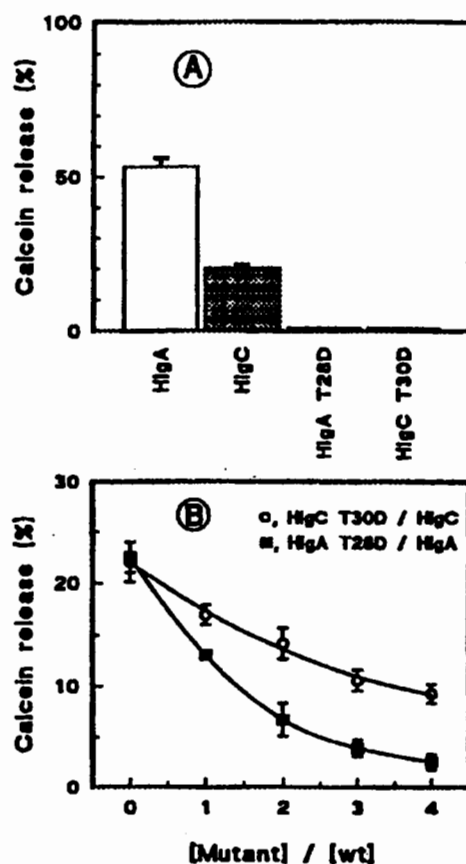


Fig. 3. Permeabilising activity of HlgA, HlgA T28D, HlgC and HlgC T30D, in the presence of equimolar HlgB, on small unilamellar vesicles of PC:Cho 1:1. A: Permeabilising activity, obtained in the presence of 95 nM of each toxin and expressed as the % of calcein released ($n = 2$). Maximal release was the value obtained when vesicles were incubated with Triton X-100. B: direct competitions of the mutants HlgA T28D and HlgC T30D with native HlgA and HlgC, respectively, for SUV permeabilisation. In both cases, a fixed concentration of the native toxins (31.25 nM each for HlgA + HlgB and 95 nM each for HlgC + HlgB) was incubated with increasing concentrations of the mutant ($n = 2$). In this figure, the % of calcein release is represented as a function of the ratio [mutant]/[wild type toxin].

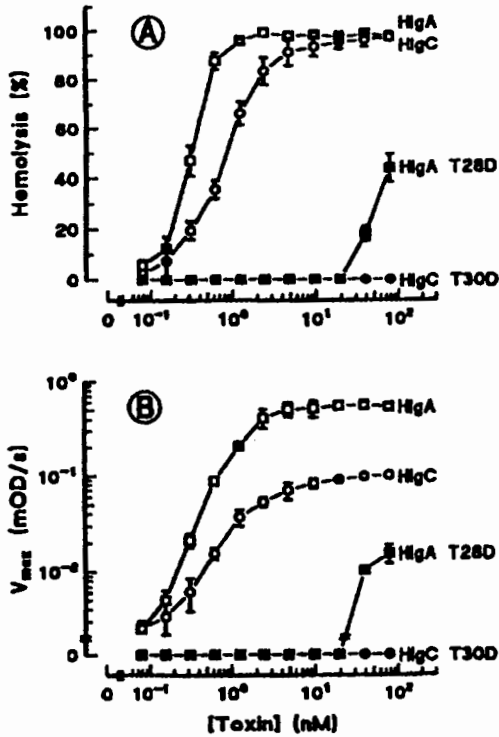


Fig. 4. Titration of the hemolytic activity of HlgA, HlgA T28D, HlgC and HlgC T30D in the presence of HlgB on rabbit red blood cells ($n = 3$). A: extent of hemolysis expressed as a percentage of the maximal hemolysis obtained by incubating the red blood cells with distilled water. B: maximal rate of hemolysis (V_{max}) calculated from the kinetic curves of hemolysis. HlgB was always present at the same concentration than the S component of the couple. The time course of the hemolysis was followed turbidimetrically, and the final % of hemolysis and V_{max} were calculated as described in Section 2.

times lower than HlgC + HlgB (around 0.5 nM and 2 nM, respectively). Titration of V_{max} indicated that, as the concentration of toxins increased over 0.09 nM, V_{max} increased as well, to finally reach a saturating value which was almost ten times higher with HlgA + HlgB than with HlgC + HlgB.

When HlgA T28D was assayed in the presence of HlgB, and compared with HlgA, the mutant presented only a slight hemolytic activity, 250 times lower than that obtained with the wild-type toxin. On the contrary, HlgC T30D was not hemolytic at any of the assayed concentrations, indicating that this mutant is at least 1000 times less active than the native HlgC.

In order to determine whether the mutants HlgA T28D and HlgC T30D were able to bind to the cell

membrane, a test of competition was performed between these mutants and the respective native toxins. The assay was performed keeping constant the concentration of the native toxin, while the concentration of the mutant was varied in a range of 5×10^3 times. When RRBC were incubated with HlgC + HlgB and increasing concentrations of HlgC T30D, the hemolytic activity decreased (Fig. 5A), becoming around 70% of the control (native proteins) when HlgC and HlgC T30D were present in equimolar amounts. This indicated the capability of the mutant to bind to the membrane. Similarly, the hemolytic activity of HlgA + HlgB decreased in the presence of increasing amounts of HlgA T28D, being around 70% when HlgA and HlgA T28D were equimolar

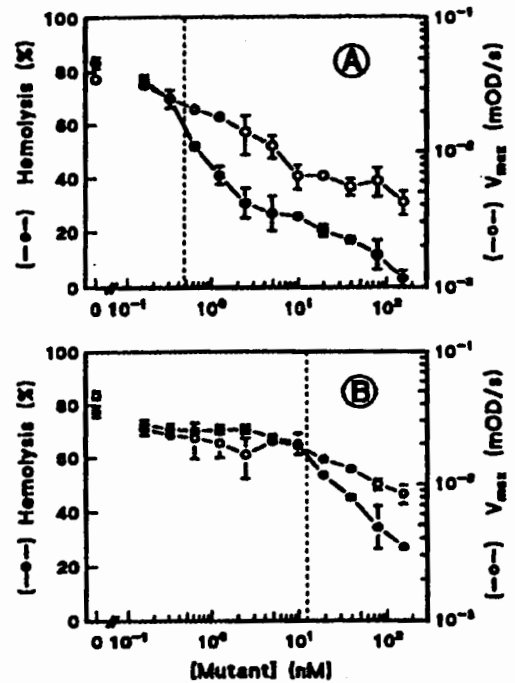


Fig. 5. Hemolytic assays of direct competitions between the native toxins HlgA (A) and HlgC (B) and various concentrations of the mutants HlgA T28D and HlgC T30D (bottom ordinate scale). The mutants were incubated at different concentrations with a fixed concentration of HlgA + HlgB (0.47 nM each) or HlgC + HlgB (12.5 nM each). After the addition of RRBC, the hemolytic activity was measured ($n = 2$) as in Fig. 4. In each panel of this figure, the % of hemolysis (left ordinate scale) and V_{max} (right ordinate scale) are reported as a function of the concentration of the mutant. The dashed line represents the conditions in which native toxin and mutant are present in equimolar amounts.

(Fig. 5B). HlgA T28D at a concentration 300 times higher than HlgA completely removed the hemolytic activity of HlgA.

3.4. Leucotoxic activity

Fig. 6 shows that the pairs HlgA + HlgB and HlgC + HlgB are both able to provoke an influx of ethidium in target cells, indicating the formation of pores through the membrane. HlgA T28D in associa-

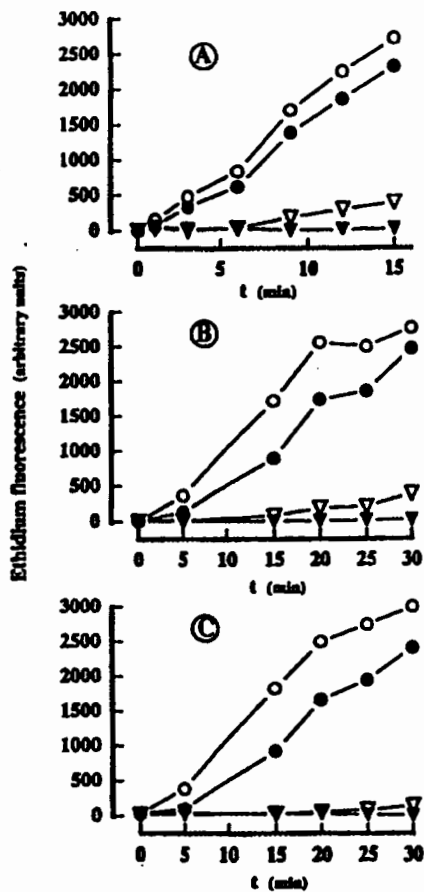


Fig. 6. Determination by flow cytometry of the ethidium fluorescence of PMNs incubated in the presence of A: 0.75 nM HlgB and either 3 nM HlgA (open circles), or 3 nM HlgA + 3 nM HlgA T28D (closed circles), or 3 nM HlgA + 30 nM HlgA T28D (open triangles), or 3 nM HlgA T28D (closed triangles); B: 0.75 nM HlgB and either 3 nM HlgC (open circles), or 3 nM HlgC + 3 nM HlgC T30D (closed circles), or 3 nM HlgC + 30 nM HlgC T30D (open triangles), or 3 nM HlgC T30D (closed triangles); C: 0.75 nM HlgB and either 3 nM HlgC (open circles), or 3 nM HlgC + 3 nM HlgC T30D (closed circles), or 3 nM HlgC + HlgC T30D/D36N (open triangles), or 3 nM HlgC T30D/D36N (closed triangles).

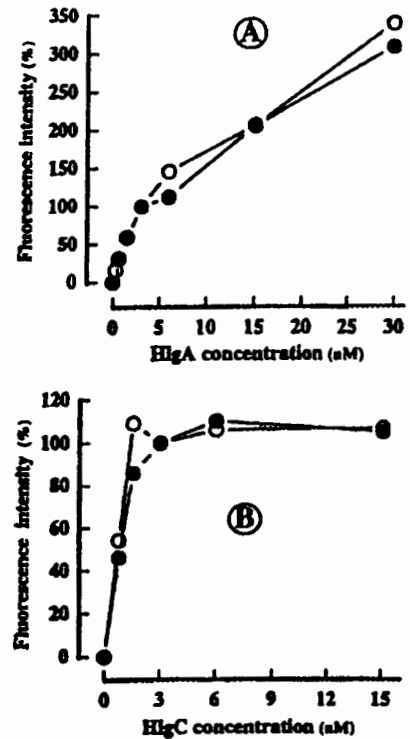


Fig. 7. Flow cytometry analysis of the binding of different HlgA (A) and HlgC (B) concentrations to PMNs revealed by fluorescent antibodies (open circles) and fluorescent HlgB (closed circles). The fluorescence intensity was expressed in % of the value obtained for 3 nM HlgA or HlgC.

tion with HlgB did not show any ability to form pores through the membrane of PMNs as revealed by ethidium fluorescence (Fig. 6A). Moreover, HlgA T28D was able to inhibit the biological activity of HlgA when it was ten times more concentrated than HlgA. Three HlgC mutants (HlgC T30D, HlgC T30D/D36N, HlgC N129K) were analysed in association with HlgB for their biological activity on PMNs and compared with wild HlgC. HlgC T30D had lost its toxicity towards PMNs (Fig. 6B) as HlgA T28D did. Although HlgC T30D was not toxic, it inhibited the activity of HlgC on human PMNs when it was ten-fold more concentrated (Fig. 6B). The parent mutant HlgC T30D/D36N showed the same lack of biological activity (Fig. 6C), and the same inhibiting properties. Conversely, the mutation in N129 had no significant consequence on the protein activity (data not shown). Thus, HlgC N129K did not receive more attention. At the opposite HlgC T30D, and HlgC T30D/D36N were shown to have lost their toxicity (Fig. 4) as had HlgA T28D.

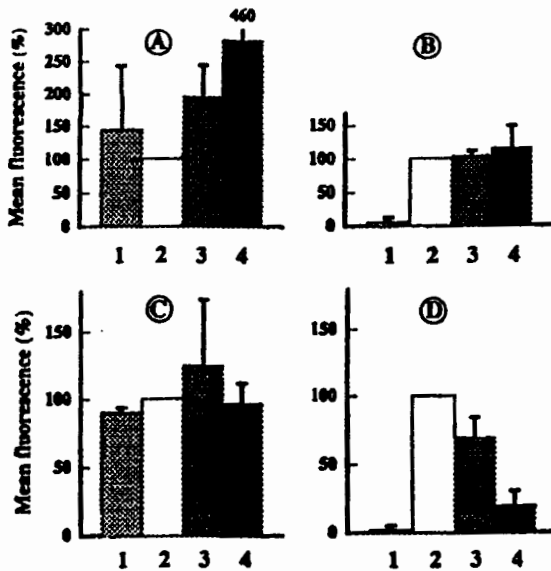


Fig. 8. Determination by flow cytometry of the fluorescence intensity of PMNs measured in the presence of A,C: fluorescent anti S-component antibodies, and B,D: fluorescent DTAF-HlgB. A,B: Mean fluorescence intensities obtained for 3 nM HlgA T28D (1), 3 nM HlgA and 3 nM HlgA T28D (3), 3 nM HlgA and 30 nM HlgA T28D (4) were expressed in % of the value obtained for 3 nM HlgA (2) ($n = 4$). C,D: Mean fluorescence intensities obtained for 3 nM HlgC T30D (1), 3 nM HlgC and 3 nM HlgC T30D (3), 3 nM HlgC and 30 nM HlgC T30D (4) were expressed in % of the value obtained for 3 nM HlgC (2) ($n = 4$).

The use of fluorescent antibodies indicated that the binding of HlgA was composed by a specific and a non-specific part (Fig. 7A), whereas the binding of HlgC seemed strictly specific (Fig. 7B). The properties of these different bindings of HlgA and HlgC will be extensively studied elsewhere. The mutated HlgA retained its ability to bind to PMN membranes, as revealed by the fixation of fluorescent S component antibodies (Fig. 8A). In fact, the amount of fluorescent antibodies bound when HlgA was mixed with HlgA T28D was very similar to that with HlgA alone (Fig. 7A) but at a concentration corresponding to the sum of the concentrations of the two proteins. Interestingly, HlgA T28D lost the capacity to bind HlgB as shown in Fig. 8B using DTAF-HlgB, and this would explain why it had no pore-forming ability. On the contrary, the mutant did not inhibit the binding of HlgB to HlgA since competition experiments did not reveal a decrease in binding. Furthermore, since the results obtained for the binding of DTAF-HlgB were comparable to those for the bind-

ing of fluorescent anti S component antibodies, one can conclude that the non-specifically bound HlgA is still functional, at least for the secondary binding of HlgB.

HlgC T30D, like HlgA T28D, retained its ability to bind to human PMN membranes (Fig. 8C) but also competed efficiently with HlgC on its binding site. Finally, membrane-bound HlgC T30D, like HlgA T28D, lost its ability to bind HlgB secondarily (Fig. 8D), and thus, no pores could be formed through the cell membranes. HlgC T30D/D36N behaved exactly as HlgC T30D did (data not shown).

4. Discussion

Staphylococcal leucotoxins appear to be of interest because they operate by the sequential and synergistic action of class S and class F proteins, and they are directed mainly against the host defence cells. Moreover, despite forming a defined toxin family comprising at least 8 characterised and related class S and class F proteins [1–4,29,30], they do not share high sequence identity with other known toxins. For example, staphylococcal α -hemolysin and exfoliative toxins harboured only 29% and 23% identity with class S components, respectively. Exfoliative toxins are rather known as serine-proteases [31]. Homologies between α -hemolysin and leucotoxins may reflect a similar folding of the pores formed by the toxins [32]. However, the sequential binding of proteins constituting leucotoxins remains a fundamental mechanistic process, and oligomerisation might be more easy to study than for α -hemolysin because of the presence of two different proteins.

It has to be emphasized that flow cytometry revealed that pairs constituting the γ -hemolysin are pore-forming toxins as it was demonstrated for the Pantone-Valentine leucocidin [10] and that biological activity of these pairs can be studied either with PMN, RRBC and SUV. More details will appear elsewhere concerning the biological properties of γ -hemolysin. Site-directed mutagenesis strategy initially involved a conserved predicted secondary structure within class S proteins bearing membrane affinity. Mutated proteins were purified to homogeneity and it should be noticed that hydrophobic chromatography [4] was necessary to avoid cross-contamination

with HlgB. Here, the biological effect of mutations HlgC T30D, HlgC T30D/D36N and HlgA T28D, that would, predictably, disrupt a conserved 13 amino acid-long β -sheet in the N-terminal part of the class S proteins of gamma-hemolysins (from L25 to K37 for HlgA and from W27 to K39 for HlgC), was reported. Secondary structure evaluations from ATR-FTIR spectra of the mutants and the wild-type toxins were performed, indicating a decrease in β -sheet of around 10% for the mutants, suggesting it involves a total of about 27 residues, therefore, more than the single predicted β -strand containing the mutation. This suggests that the mutated strand may belong to a region of pleated sheets. These mutations were chosen because they represented amino acid substitutions by residues bearing different charge but similar steric space. Another mutation was designed to integrate a positive charge (HlgC N129K) in a short sequence common with human integrins [26] which was not critical for biological activity.

The biological activities of pairs comprising HlgB were dramatically affected for HlgC T30D, HlgC T30D/D36N, and HlgA T28D. The extent of the loss of activity could not always be determined because of the limits in the amounts of proteins available. HlgC T30D did not show any biological activity, neither against natural membranes (PMN and RRBC) nor against model membranes (SUV), so that they are at least 1000 times less active than HlgC. HlgA T28D instead retained some hemolytic activity, albeit 250 times lower than that of the native toxin, but was equally inactive on PMN and on the model of membrane permeabilisation. These observations prompted the analysis of the effective binding of these non-active mutated proteins to the PMN membrane by a three-step procedure. The first step implied native versus mutated proteins competition and the determination of the biological activity by ethidium entry into permeabilised PMN. The results were similar for HlgC and HlgA, and clearly indicated that when equal amounts of wild-type toxins and their respective mutants were applied in addition to HlgB; around 70 to 80% of the activity without the mutants was retained. When mutated proteins were 10-fold more concentrated, the biological activity was almost insignificant as compared to that of natural toxins. The second step was the determination of the binding of mutated proteins by fluorescent antibodies which

showed that both the mutated HlgA and HlgC kept their binding properties (specific and non-specific for HlgA, specific for HlgC) and could compete with wild-type proteins on the same binding sites. Therefore, the primary binding of class S components to membranes was once more confirmed. The third one was the determination of the binding of fluorescent HlgB on the bound mutated proteins. They were both shown to be unable to bind HlgB, but, when associated with their respective native protein, they gave different results. HlgA T28D, even ten times more concentrated than HlgA, did not modify the binding of HlgB, suggesting the presence of non-specific binding sites for HlgA for which no significant competition occurred. Nevertheless, there was no opening of pores. An explanation for this could be that the pores, as for α -toxin [33], are constituted by oligomers including several S components where the native toxin and its mutant could be mixed. In these oligomers, HlgB could bind to HlgA but not to the mutated protein, thus rendering the oligomers probably containing both HlgA and the mutated HlgA unable to create a pore. Conversely, in the case of HlgC at the concentration of 3 nM (Fig. 7B), the binding sites are nearly saturated and HlgC T30D can compete with its parent protein, thus decreasing the binding sites of the HlgB class F component. A higher propensity of HlgA to make unspecific binding, presumably to the lipid matrix itself could explain its higher activity on purely lipidic vesicles. Furthermore, the formation of inactive complex aggregates containing native and mutated class S components and class F components is the only reasonable explanation for the competition effect observed with SUV, where specific binding is excluded.

In conclusion, the mutated proteins seemed to bind to the same membrane target sites as the respective native proteins. This indicated that the mutations, although predictably disrupting a 13 amino acid-long β -sheet (from W27 to K39), did not affect profoundly the structural conformation of the whole protein. The loss of pore-forming activity of the mutated toxins was shown to be due to the loss of the ability to make an oligomer with HlgB. At this point of studies, it is not known whether disruption of the β -sheet or the only introduction of a negative charge are responsible for the loss of binding of HlgB. The predicted 13 amino acid long β -sheet appears at least to have an

essential role in the class S component-mediated binding of HlgB (class F component). However, the mutation D36N (HlgC T30D/D36N) did not restore any functional activity although, according to the secondary structure predictions, it retained a putative 6 amino acid-long β -sheet. The latter result would indicate either the secondary structure prediction is fictitious, or that the restored structure is not sufficient to allow the binding of HlgB, or that threonin 30 exerts a critical role in the secondary binding. Contrary to the α -toxin where oligomers can be observed in solution [34], major structural modifications appear to be necessary in order to favour the secondary binding of class F component of leucotoxins. More detailed studies are now in progress together with topology analysis of pore-formation and crystallographic studies.

Acknowledgements

The skillful technical assistance of D. Keller was greatly appreciated. This work was supported in part by grant from the Direction de la Recherche et des Etudes Doctorales (DRED EA 1318). M.F. was supported by a post-doctoral fellowship from the European Community (European Project CHRX-CT93-055).

References

- [1] J. Cooney, Z. Kienle, T.J. Foster, P.W. O'Toole, *Infect. Immunol.* 61 (1993) 768–771.
- [2] Y. Kamio, A. Rahman, H. Nariya, T. Ozawa, K. Izaki, *FEBS Lett.* 321 (1993) 15–18.
- [3] G. Supersac, G. Prévost, Y. Piémont, *Infect. Immunol.* 61 (1993) 580–587.
- [4] G. Prévost, B. Cribier, P. Couppié, P. Petiau, G. Supersac, V. Finck-Barbançon, H. Monteil, Y. Piémont, *Infect. Immunol.* 63 (1995) 4121–4129.
- [5] A.M. Woodin, The staphylococcal leukocidin, in: J.O. Cohen (Ed.), *The staphylococci*, Wiley, New York, 1972, pp. 281–289.
- [6] B. Cribier, G. Prévost, P. Couppié, V. Finck-Barbançon, E. Grosshans, Y. Piémont, *Dermatology* 185 (1992) 175–180.
- [7] G. Prévost, P. Couppié, P. Prévost, S. Gayet, P. Petiau, B. Cribier, H. Monteil, Y. Piémont, *J. Med. Microbiol.* 42 (1995) 237–245.
- [8] V. Finck-Barbançon, G. Duportail, O. Meunier, D.A. Colin, *Biochim. Biophys. Acta* 1182 (1993) 275–282.
- [9] D.A. Colin, I. Mazurier, S. Sire, V. Finck-Barbançon, *Infect. Immunol.* 62 (1994) 3184–3188.
- [10] O. Meunier, A. Falkenrodt, H. Monteil, D.A. Colin, *Cytometry* 21 (1995) 241–247.
- [11] T. Ozawa, J. Kaneko, Y. Kamio, *Biosci. Biotech. Biochem.* 59 (1995) 1181–1183.
- [12] B. König, G. Prévost, Y. Piémont, W. König, *J. Infect. Dis.* 171 (1995) 607–613.
- [13] B. König, G. Prévost, W. König, *J. Med. Microbiol.* (1997) in press.
- [14] A.J. Siqueira, C. Speeg-Schatz, F.I.S. Freitas, J. Sahel, H. Monteil, G. Prévost, *J. Med. Microbiol.* (1997) in press.
- [15] G. Prévost, G. Supersac, D.A. Colin, P. Couppié, S. Sire, T. Hensler, P. Petiau, O. Meunier, B. Cribier, W. König, Y. Piémont, The new family of leucotoxins from *S. aureus*: structural and biological properties, in: J. Freer et al. (Eds.), *Bacterial Protein Toxins*, Suppl. 24, Zentralblatt für Bakteriologie, Gustav Fischer, Stuttgart, 1994, pp. 284–293.
- [16] C. Yanisch-Perron, J. Viera, J. Messing, *Gene* 33 (1985) 103–119.
- [17] R.K. Saiki, D.H. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, H.A. Erlich, *Science* 239 (1988) 487–491.
- [18] S. Tabor, C.C. Richardson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 4761–4771.
- [19] V. Finck-Barbançon, G. Prévost, Y. Piémont, *Res. Microbiol.* 142 (1991) 75–85.
- [20] U.K. Laemmli, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [21] D. Blakeslee, *J. Immunol. Methods* 17 (1977) 361–364.
- [22] D.W. Marquardt, *J. Soc. Ind. Appl. Math.* 11 (1963) 431–441.
- [23] H. Byler, H. Susi, *Biopolymers* 25 (1986) 469–487.
- [24] G. Menestrina, *FEBS Lett.* 232 (1988) 217–220.
- [25] S. Cauci, R. Monte, M. Ropele, C. Missero, T. Not, F. Quadrifoglio, G. Menestrina, *Mol. Microbiol.* 9 (1993) 1143–1155.
- [26] R.S. Larson, A.L. Corbi, L. Berman, T.A. Springer, *J. Cell. Biol.* 108 (1989) 703–712.
- [27] P.Y. Chou, G.D. Fasman, *Biochemistry* 13 (1974) 222–245.
- [28] J. Garnier, D.J. Osguthorpe, B. Robson, *J. Mol. Biol.* 120 (1978) 97–120.
- [29] W. Choorit, J. Kaneko, K. Muramoto, Y. Kamio, *FEBS Lett.* 357 (1995) 260–264.
- [30] G. Prévost, T. Bouakham, Y. Piémont, H. Monteil, *FEBS Lett.* 376 (1995) 135–140.
- [31] C.J. Bailey, M.B. Redpath, *Biochem. J.* 284 (1992) 177–180.
- [32] L. Song, M.R. Hobough, C. Shustak, S. Cheley, H. Bayley, J.E. Gouaux, *Science* 274 (1996) 1859–1866.
- [33] A. Valeva, M. Palmer, K. Hilgert, M. Kehoe, S. Bhakdi, *Biochim. Biophys. Acta* 1326 (1995) 213–218.
- [34] A. Valeva, A. Weisser, B. Walker, M. Kehoe, H. Bayley, S. Bhakdi, M. Palmer, *EMBO J.* 15 (1995) 1857–1864.

III. DISCUSSION

Tous ces résultats montrent à l'évidence que la zone du β -feuillet, prédit et conservé à l'extrémité N-terminale des protéines de classe S, joue un rôle important dans l'activité des leucotoxines. Les tests de perméabilisation de vésicules synthétiques unilamellaires montraient que les leucotoxines natives HlgA + HlgB sont capables d'induire le reflux de la calcéine intravésiculaire alors que les mutants HlgA Thr28Asp et HlgC Thr30Asp couplés à HlgB ne le pouvaient pas (Article n°1 : **Fig. 3A**). La cytométrie en flux montre qu'aussi les couples HlgA + HlgB et HlgC + HlgB pouvaient provoquer un influx de Bet dans les PMNs alors que le mutant HlgA Thr28Asp en association avec HlgB n'avait aucune activité (Article n°1 : **Fig. 6**). Ces deux expériences de relarguage de calcéine à travers les vésicules unilamellaires synthétiques et de pénétration de Bet dans les PMNs montrent que les leucotoxines sont capables de former des pores, ce qui permet de les classer définitivement dans le groupe des "pores forming toxins". Les mutants HlgC Thr30Asp et HlgC Thr30Asp/Asn129Lys sont aussi incapables de former des pores lorsqu'ils sont combinés à HlgB. Lorsque ce dernier est à une concentration 10 fois supérieure à la normale, le mutant HlgC Thr30Asp est capable d'inhiber la toxicité de HlgC utilisée à la concentration initiale (Article n°1 : **Fig. 6B**) et donc de se fixer sur les mêmes sites membranaires que ceux de la protéine native. Toutefois, en ce qui concerne HlgA Thr28Asp, la compétition avec la protéine native n'est pas totale, car même en quantité 10 fois supérieure à la normale le mutant n'arrive pas à empêcher entièrement la fixation secondaire de HlgB en présence de HlgA. Ceci peut s'expliquer par l'existence de sites d'interaction non spécifiques et probablement non fonctionnels pour lesquels il n'existe pas de compétition. Le mutant HlgA Thr 28Asp est capable de se fixer sur les PMNs mais il n'est pas toxique lorsqu'il est combiné avec HlgB marquée à la fluorescéine. La fixation secondaire de HlgB ne se fait pas avec le mutant préalablement fixé sur les PMNs. Ce mutant est donc incapable d'interagir avec le composé de classe F pour former des pores contrairement à la protéine native. Cette expérience montre que la formation du pore implique une interaction entre le composé de classe S et le composé de classe F. La seule substitution de la thréonine en acide aspartique a suffi à faire chuter l'interaction de HlgB avec le composé de classe S préalablement fixé. La raison vient-elle de la rupture du β -feuillet ou simplement de la substitution de la thréonine 28 ? Cette dernière est située dans le β -feuillet et conservée dans toutes les protéines de classe S connues à ce jour, et peut être alignée sur l'His35 de l' α -toxine qui joue un rôle important dans l'oligomérisation (Jursch et al., 1994) et la formation des pores en particulier au niveau de l'interaction entre monomères (Menziés and Kernodle, 1994). On peut se demander si cette thréonine 28 joue le même rôle que l'His35 pour la formation des pores chez les leucotoxines. Lorsqu'on mélange HlgA avec HlgA Thr28Asp en quantité 10 fois supérieure, la fixation secondaire de HlgB n'est pas modifiée, mais il n'y a pas formation de pores. Une explication possible est qu'à l'image de ce qui se passe chez l' α -toxine (Valeva et al., 1995), les pores des leucotoxines sont constitués par des oligomères contenant un mélange de composés de classe S natif HlgA et muté HlgA Thr28Asp. Dans cet oligomère le composé de classe F, HlgB, peut se fixer sur HlgA, mais pas sur HlgA Thr28Asp, de tels oligomères mixtes ne peuvent former des

pores. Il serait important de connaître la stoechiométrie de ces pores et la disposition des différents composés à l'intérieur de ceux-ci. Cette séquentialité confère une fonction supplémentaire au composé de classe S par rapport à d'autres toxines comme l' α -toxine et l'aérolysine qui agissent après la formation d'homoheptamères n'ont pas la même structure primaire ni le même spectre de spécificité cellulaire. Cependant, les données actuelles rapprochent finalement les leucotoxines de l' α -toxine par leur degré d'homologie (Gouaux et al., 1998), ce qui reflète certainement une transition entre l'état hydrosoluble et l'état oligomérique, ainsi qu'une partie des modalités d'insertion dans les membranes relativement univoques.

Sur le plan structural, la spectrométrie infrarouge à réflectance atténuée montre que les mutations HlgA Thr28Asp et HlgC Thr30Asp provoquent une perte de 10 % en structures β en corrélation avec une rupture du β -feuillet considéré. Cette technique révèle une prédominance de β -feuillet (70 à 75%) dans les leucotoxines, ce qui permet de les classer dans la sous-famille des toxines formant des pores à β -feuillet prépondérants par opposition à la colicine A et bon nombre de bactériocines (Lesieur et al., 1997). Les composés de classe S présentent seulement 12 à 18 % d'identité de séquence d'acide aminé avec l' α -toxine (Gray and Kehoe, 1984) et 23 % avec l'exfoliatine A ou B, qui pour les dernières n'ont pas du tout le même mode d'action (Prévost et al., 1998).

IV. Approfondissements de l'étude du β -feuillet prédit à l'extrémité N-terminale des composés de classe S

IV.1. Objectifs

Ce β -feuillet, apparemment conservé, semble au moins en partie, impliqué dans l'interaction entre monomères S/F au cours de la constitution du pore, et sachant qu'il existe forcément une interaction F/S dans le système. Plusieurs questions peuvent se poser :

- qu'elle est la nature de l'interaction entre monomères ? S'agit-il d'un élément structural entrant dans une gorge du monomère complémentaire, ou bien d'interactions où chaque monomère participe d'égale manière à cette construction ?

- l'environnement de ce feuillet β est-il accessible ? Existe-t-il une interaction avec un ligand membranaire ?

- la Thr28 est-elle directement, ou seule responsable de cette interaction ?

- les prédictions de structure secondaire ont-elles leurs limites surtout concernant l'intégrité du feuillet β ?

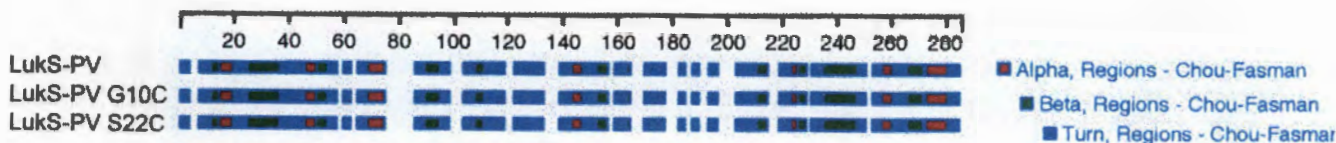


Figure 17: Prédictions de structure secondaire selon la méthode Chou et Fasman pour les mutants LukS-PV Gly10Cys et Ser22Cys.

Table 1 : Séquences oligonucléotidiques utilisées pour les mutagénèses dirigées par PCR asymétrique

Gènes	Modifications	Séquences oligonucléotidiques
<i>LukS-PV</i> (5')	-	837 5'-TGTTATGGTCAACTATATCGTGG-3' 859
<i>LukS-PV</i> (3')	-	2159 5'-TTATCGGAATCTGATGTTGCAGT-3' 2137
<i>LukS-PV</i>	Gly10Cys	1184 5'-TACCTCAGCGCA A ATCACCAATATT-3' 1162
<i>LukS-PV</i>	Ser22Cys	1225 5'-ACCCCCACTTATCGCA A ACTTGTATCTT-3' 1198

Conditions PCR N°1 : 94°C - 3 min 30s, 48°C - 2 min, 72°C - 2 min

Conditions PCR N°2 : 94°C - 3 min 30s, 58°C - 1 min 30s, 72°C - 4 min 30s.

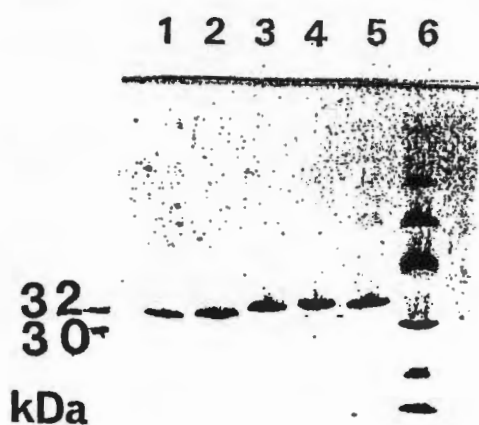


Figure 18 : Profils électrophorétiques des protéines LukS-PV Gly10Cys et Ser22Cys purifiées, en conditions dénaturantes : SDS-PAGE.

IV.2. Choix de nouvelles mutations

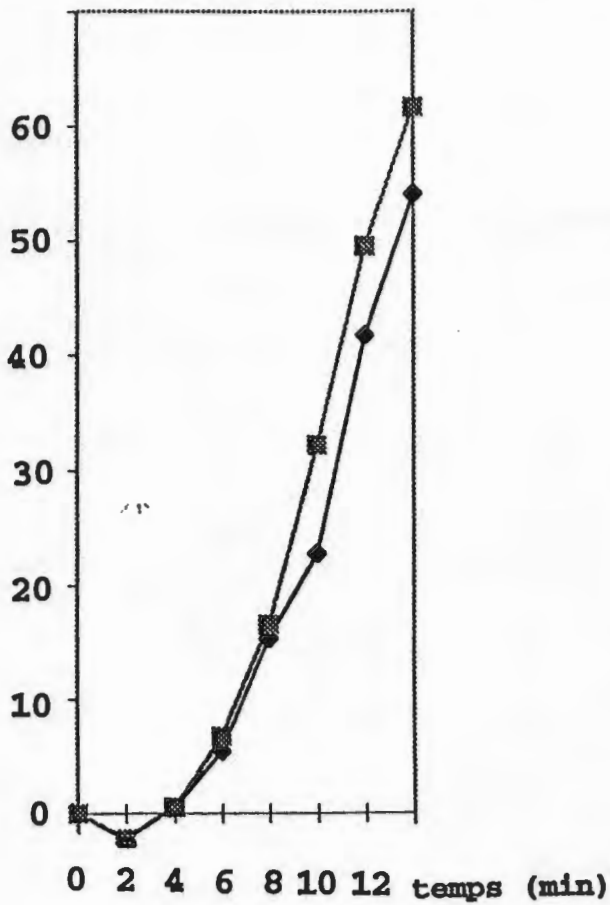
Les composés des leucotoxines sont exempts de résidus cystéine à l'état natif, ce qui permet d'envisager des substitutions par ce résidu, suivies de marquages spécifiques avec de forts rendements. Deux mutants cystéine ont été construits : LukS-PV Gly10Cys et LukS-PV Ser22Cys. LukS-PV a été choisie, car cette protéine présente peu de fixation aspécifique sur les membranes des cellule cibles. D'autres substitutions de la Thr28 et de plusieurs acides aminés compris dans le β -feuillet s'étendant de Trp25 à Lys35. Les substitutions décrites plus haut ont été obtenues par la méthode d'amplication asymétrique décrite au B.4.3. Elles ne perturbent pas de façon significative la structure secondaire prédite de LukS-PV (**Figure 17**). Les protéines correspondantes ont été purifiées après leur leur expression dans *S. aureus*. Leurs comportements chromatographiques au cours de cette purification furent tout à fait semblables à ceux de la protéine sauvage, leurs caractéristiques physicochimiques sont également proches (**Figure 18**).

IV.3. Activités biologiques des protéines mutées LukS-PV Gly10Cys et Ser22Cys

Les extraits cellulaires des souches recombinantes exprimant les protéines mutées et la protéine native présentait une activité biologique comparable sur les polynucléaires neutrophiles humains. De même, les protéines mutées Gly10Cys et Ser22Cys ont une activité spécifique analogue à celle la protéine native. En effet, en fonction des concentrations protéiques, les doses limites de protéines mutées pour obtenir 100 % de lyse de 10^5 polynucléaires humains étaient comprises entre 0,089 et 0,029 ng respectivement, soit $5,3 \times 10^7$ et $3,4 \times 10^7$ U/mg. Ces valeurs sont très proches de celle de l'activité spécifique de LukS-PV natif (7×10^7 U/mg), en présence d'un excès de LukF-PV.

L'analyse par cytométrie en flux de LukS-PV Gly10Cys et Ser22Cys (**Figure 19**) montre que ces deux protéines ont gardé une fonctionnalité équivalente à celle de LukS-PV. Les temps de latence avant l'apparition de l'activité biologique sont comparables et les pentes reflètent les cumuls de lyse cellulaire sont également comparables. Ces deux protéines mutées sont considérées comme tout aussi fonctionnelles que la protéine native, et pourront servir de support à des marquages fluorescents. Après le contrôle de leur fonctions conservées et des niveaux de fluorescence obtenus en situation de fixation, de telles protéines permettront d'établir des constantes de fixation apparentes de LukS-PV et d'évaluer la communauté des sites de fixation des protéines de la même classe.

% de cellules lysées



% de cellules lysées

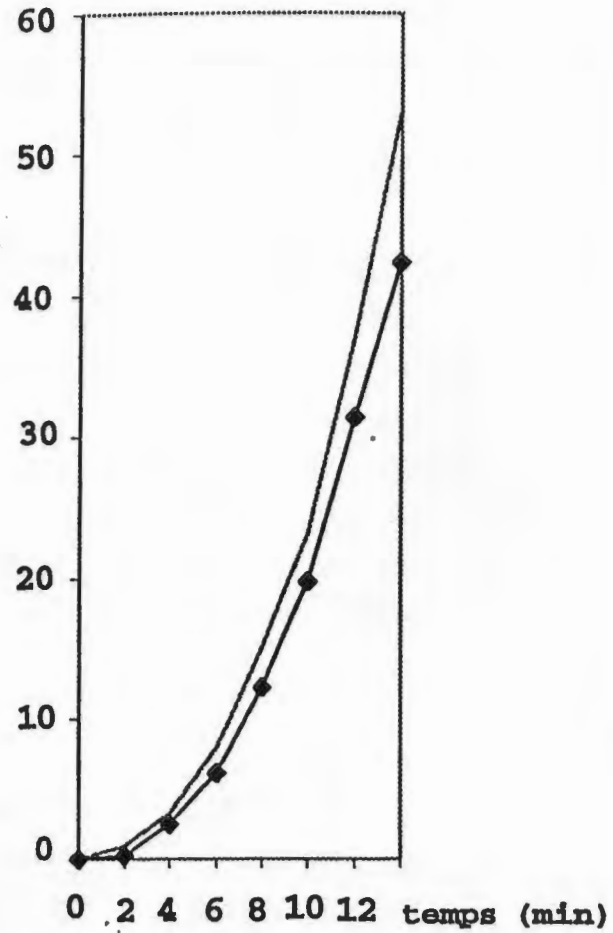


Figure 19: Analyse par cytométrie en flux de la lyse cellulaire provoquée par les protéines mutées LukS-PV Gly10Cys et Ser22Cys. Ces dernières ont été utilisées à une concentration de 20 nM en présence de 1 mM de calcium extracellulaire sur des densités cellulaires de 10^6 PMNs/ml.

Table 2 : Etude de l'accessibilité des résidus cystéines de LukS-PV Gly10Cys et de LukS-PV Ser22Cys au DTNB

	Témoin négatif	Témoin SDS 2%	LukS-PV	LukS-PV SDS 2%	LukS-PV Gly10Cys	LukSPV Gly10Cys SDS 2%	LukS-PV Ser22Cys	LukS-PV Ser22Cys SDS 2%
Concentration en DTNB (μM)	330	330	330	330	330	330	330	330
Concentration en Protéine (μM)	0	0	61	61	34	34	51,2	51,2
Absorbance (DO) 412 nm	0,050	0,038	0,057	0,015	0,451	0,479	0,355 ^b	0,382 ^b
Concentration en DTNB mesurée (μM)	<5 ^a	<5 ^a	<5 ^a	<5 ^a	32,8	34,9	51,6	30,6
$\epsilon=13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$								

a : Limite de sensibilité de l'expérience

b : facteur de dilution avant la prise de l'absorbance

$$\text{DTNB} = \frac{(\text{DO essai} - \text{DO t moin})}{13600} \times b \quad \text{avec } l = 1 \text{ cm}$$

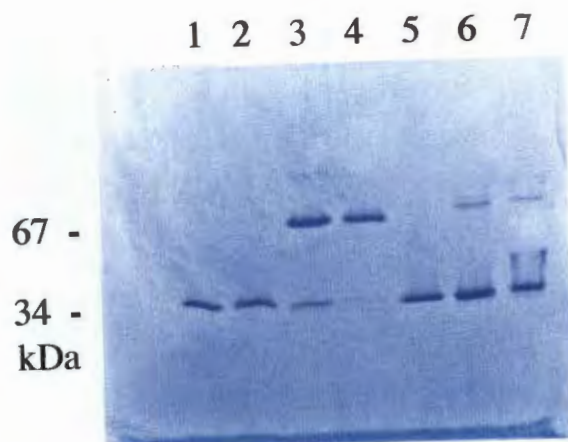


Figure 20 : Electrophorèse en conditions dénaturantes des protéines LukS-PV (ligne 1), LukS-PV Gly10Cys (ligne 2), LukS-PV Gly10Cys en conditions oxydantes (ligne 3), LukS-PV Gly10Cys dimérisé et purifié (ligne 4), LukS-PV Ser22Cys (ligne 5), LukS-PV Ser22Cys en conditions oxydantes (ligne 6), LukS-PV Ser22Cys dimérisé et incomplètement purifié (ligne 7).

IV.4. Etude de l'accessibilité des résidus cystéine au DTNB

La fixation covalente de DTNB sur le ou les résidus cystéine d'une protéine non dénaturée évoque leur accessibilité à de petites molécules en surface de la protéine. Les expériences de fixation du DTNB ont concerné LukS-PV, LukS-PV Gly10Cys et LukS-PV Ser22Cys. Au préalable, les protéines purifiées ont été débarrassées du DTT sur une colonne de dessalage PD10 (Pharmacia), puis reconcentrées sur FPLC MonoS® à $DO_{280nm} = 1,0$.

Dans cette expérience, nous avons testé les protéines mutées et native en présence d'un excès de DTNB. Ces protéines avaient été préalablement traitées ou non par du 2% SDS pour comparer les résultats obtenus sans et avec dénaturation.

Les données de la **Table 2** représentent les valeurs moyennes de 3 essais consécutifs. Alors que la fixation du DTNB n'est pas significative pour LukS-PV natif, une absorbance est détectée pour les protéines mutées. Nous avons pu remarquer que l'évolution de cette fixation était très rapide. Les mesures d'absorbance ne variaient plus après 2 min de réaction. De ces valeurs d'absorbance, il est possible de déduire une concentration de DTNB qui est très voisine de la concentration des protéines mutées engagées dans chaque essai, **que ces protéines aient été préalablement traitées au SDS ou non**. Les deux résidus cystéine en position 10 ou 22 sont donc tout à fait accessibles au DTNB.

IV.5. Dimérisation des mutants LukS-PV Gly10Cys et Ser22Cys

Les mutants cystéine ayant été purifiés en conditions réductrices (5 mM DTT), il est possible qu'en absence d'agent réducteur, ils puissent se dimériser grâce à la formation d'un pont disulfure.

Nous avons observé la dimérisation spontanée (66 kDa) très partielle (environ 10% de dimères) de LukS-PV Gly10Cys quatre heures après que celle-ci a été débarrassée du DTT. En fait, cette dimérisation reste partielle quel que soit le temps où la protéine est conservée sans DTT. Une dimérisation dans les mêmes conditions a également été constatée pour LukS-PV Ser22Cys. La dimérisation de ces résidus R-SH peut être augmentée en fonction du temps et de l'oxydation par un traitement au $CuSO_4 - 1,10$ phénanthroline (**Figure 20**, lignes 3 et 6). En effet, une oxydation de 1 H dans ces conditions permet d'obtenir une proportion de 50 % environ de dimères. Ce rendement intermédiaire de dimérisation peut s'expliquer par un état de protonation particulier des résidus cystéine ($pK_R = 8,3$). Néanmoins, l'obtention de dimères nous a incité à les purifier. Ceci a été réalisé, non pas par gel filtration car les leucotoxines ont un comportement de protéines globulaires dans ces systèmes, mais par chromatographie FPLC MonoS® (**Figure 20**). Comme le montre la **Figure 20**, lignes 4 et 7, les dimères de la protéine LukS-PV Ser22Cys n'ont pas pu être séparés par cette purification, alors que ceux de

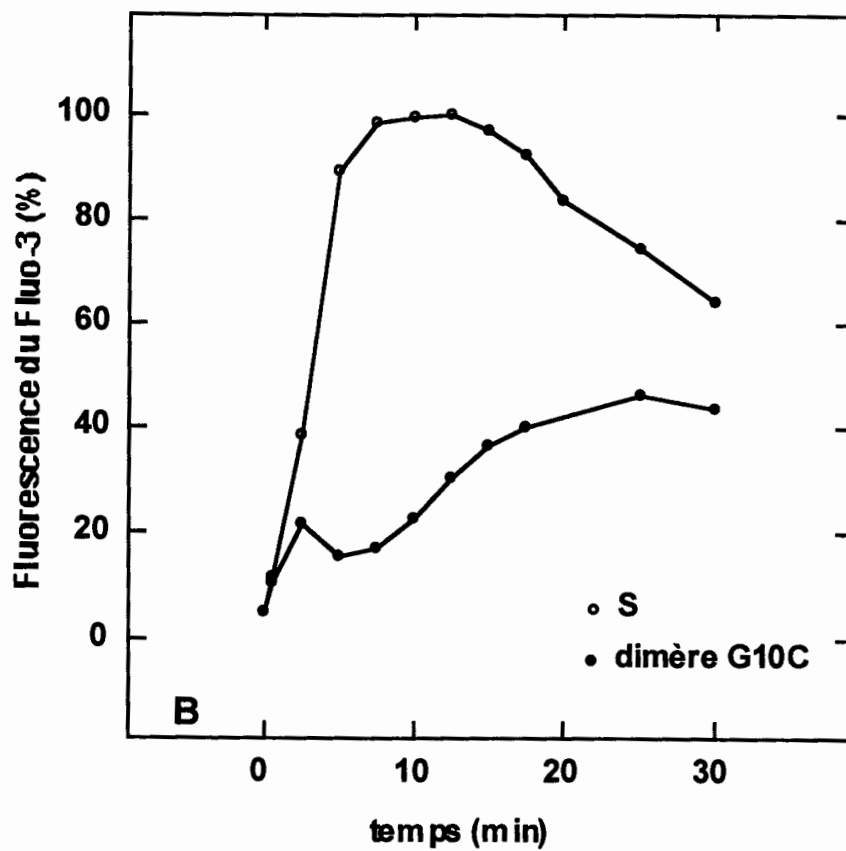
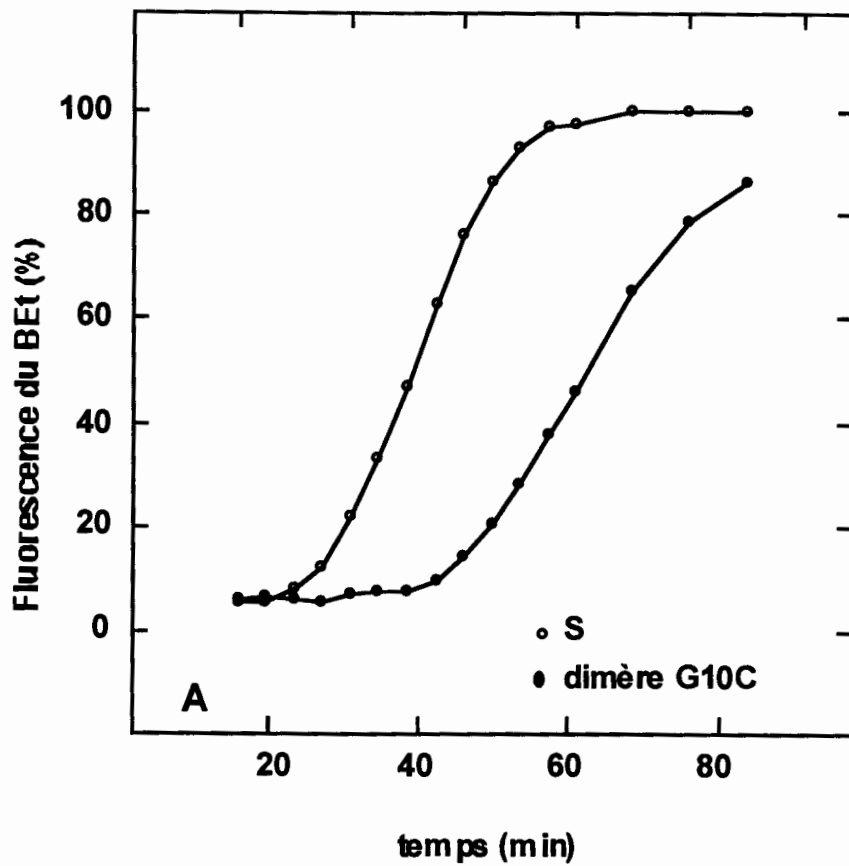


Figure 21 A et B : Activités biologiques du dimère LukS-PVG10C et de LukS-PV

LukS-PV Gly10Cys l'ont été bien que légèrement contaminés (< 10 %) et se sont avérés stables à 4°C. Leur activité biologique a été recherchée (**Figure 21A et B**). Ce dimère de LukS-PVgly10 Cys est en fait très faiblement actif, qu'il s'agisse de l'induction du métabolisme calcique (**Figure 21B**) ou de l'entrée d'éthidium (**Figure 21A**) assimilée à la lyse cellulaire, et les activités résiduelles constatées peuvent être rapportée à la contamination de monomère actif.

IV.6. Activités biologiques de certains mutants de LukS-PV

Le laboratoire a continué d'approfondir l'étude de l'interaction entre LukS-PV et LukF-PV. LukS-PV a d'abord été ciblé, car la fixation de cette protéine sur les membranes est spécifique par rapport à HlgA. Ce travail constituera une partie de la thèse de Sandra Werner.

Parmi les protéines mutées réalisées, nous présentons l'activité biologique de quatre mutant intéressants. : LukS-PV Thr28Asp, LukS-PV Thr28Ser, LukS-PV Thr28 His, LukS-PV Asp34Asn. Leur capacité à induire le métabolisme calcique et l'entée d'éthidium suivent les mêmes schémas différentiels (**Figure 22A et B**). Alors que la protéine LukS-PVThr28Ser ne présente qu'une activité faiblement diminuée, la protéine LukS-PVThr28Asp n'est pratiquement pas active et LukS-PV Thr28His et LukS-PV Asp34Asn possèdent des potentiels intermédiaires. Ces premiers résultats seront suivis de l'analyse de la fixation des composés de classe S, puis des composés de classe F sur les précédents. Ils suggèrent néanmoins que le résidu His qui peut correspondre à l'His 35 de l' α -toxine impliqué dans l'oligomérisation (Jursch et al., 1994; Krishnasastri et al., 1994; Menzies and Kernodle, 1994) n'est pas omnipotent. Si les leucotoxines suivent un même schéma biophysique pour l'insertion dans les membranes, leur évolution est telle que les interactions entre protéines sont différentes. D'autre part, il est probable que d'autres acides aminés comme Asp34 jouent un rôle important soit dans l'interaction directe entre monomères soit dans le positionnement des résidus essentiels à celle - ci.

V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les différentes expériences montrent que le β -feuillet est impliqué dans les interactions entre composés de classe S et composés de classe F. La structure entière de la protéine n'est pas radicalement modifiée par les mutations introduites. Les protéines mutées de la Thr28 sont encore capables de se fixer sur les mêmes sites membranaires que la protéine native, mais ne permettent plus la fixation secondaire du composé de classe F, et de ce fait n'induisent aucune activité biologique. La fixation primaire du composé de classe S est primordiale à l'activité des toxines. Le mode d'action séquentiel des leucotoxines constitue un avantage pour l'étude des toxines, car il permettra de dissocier les différents mécanismes impliqués dans l'action de ces toxines et les évènements qui conduisent à l'oligomérisation et à la formation des pores. Le rôle

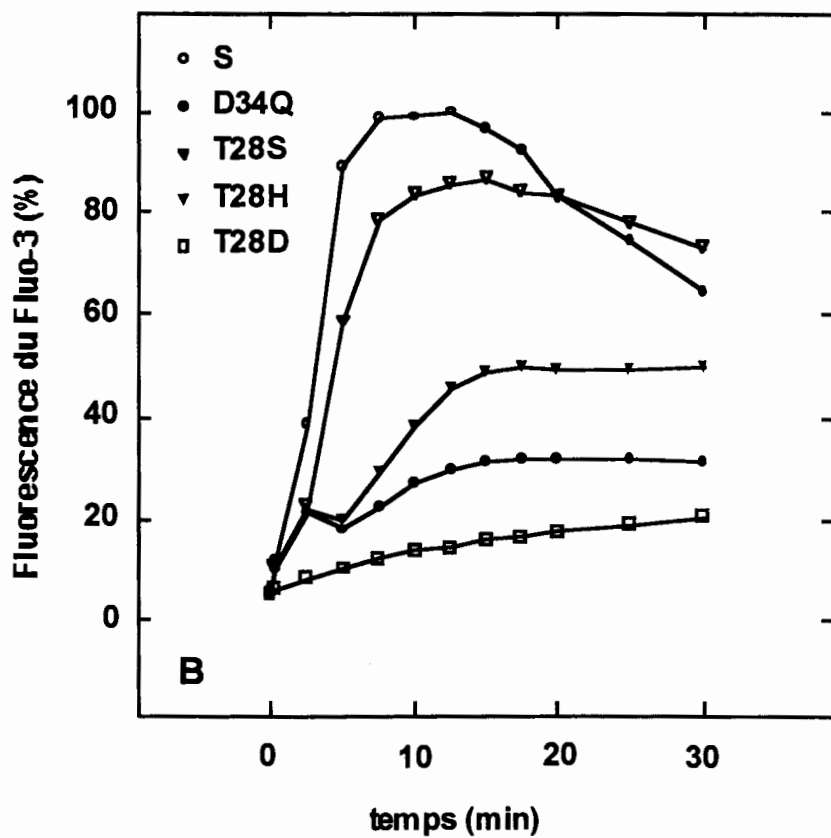
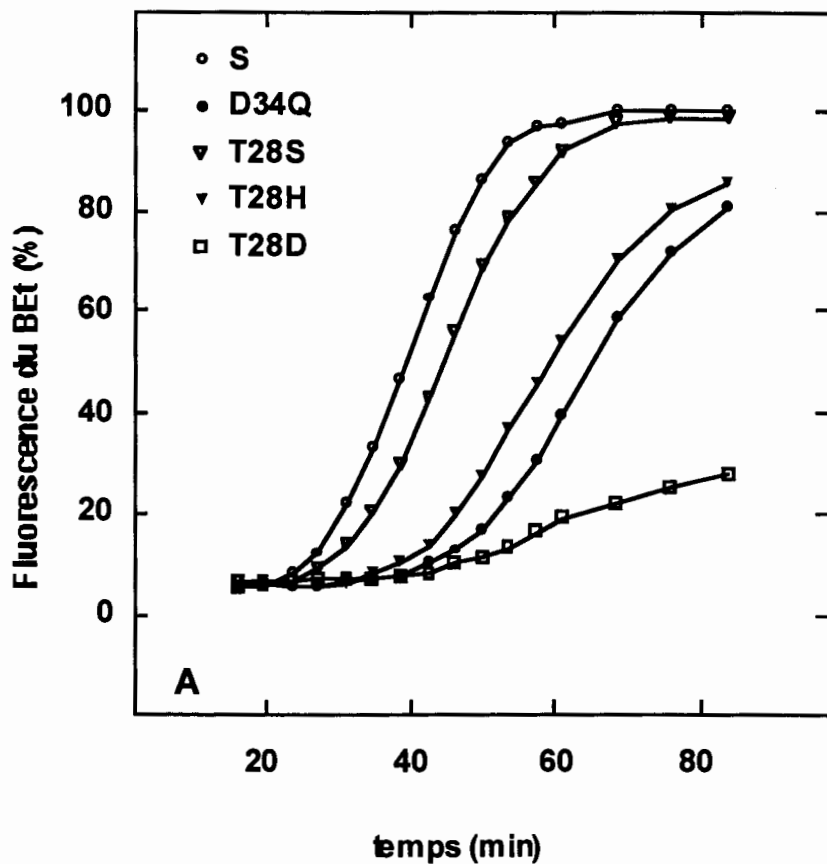


Figure 22 A et B : Activités biologiques des mutants de LukS-PV

de ce β -feuillet est approfondi par la substitution d'autres acides aminés qui le composent. Il s'avère que le résidu Thr28 est essentiel à l'activité biologique quelque soit la rupture ou non d'un β -feuillet, et particulièrement dans l'oligomérisation des protomères S/F. Le type d'interaction au cours de cet évènement est différent que dans le cas de l'alpha-toxine. En effet, la substitution par une histidine, résidu correspondant dans l'alpha-toxine, ne conduit pas à une leucotoxine fonctionnelle.

Par ailleurs, il a été noté que les prédictions de structure secondaire par la méthode de Chou et Fasman (également par la méthode de Garnier et Robson) rapportaient des taux en contenu de feuillets β bien en deçà des valeurs obtenues par la spectroscopie infrarouge. Ces derniers résultats, comme nous allons le constater correspondent certainement à la réalité, puisqu'ils coïncident avec les données de résolution de la structure tridimensionnelle.

Comme cela avait été prédit par le calcul, la substitution en cystéine de résidus situés à la proximité du β -feuillet de LukS-PV ne modifie pas de façon appréciable l'activité biologique des protéines. Nous avons montré par des expériences de marquage et de dimérisation que ces cystéines étaient exposées et accessibles au DTNB. Ces résidus et probablement ceux qu'ils remplacent, sont donc localisés soit en surface des protéines, soit dans une poche conformationnelle qui est accessible à de petits ligands, et sont proches du domaine d'interaction avec les composés de classe F. Ces mutants cystéine pourraient être utilisés en cristallographie (collaboration avec le Pr J.P. Samama, Toulouse) pour obtenir des dérivés de métaux lourds et fournir des bases de données de diffraction complémentaires à celles de la protéine native en vue d'une résolution de la structure tridimensionnelle de LukS-PV, ou de HlgA, ou de HlgC. Ils peuvent également servir de base pour des marquages spécifiques à la fluorescéine. En fait, des deux mutants cystéine cités, seul LukS-PV Gly10Cys marqué à la fluorescéine permet d'obtenir des niveaux de fluorescence satisfaisants en cytométrie en flux lorsque la protéine qui reste fonctionnelle, est fixée à la surface des membranes des polynucléaires. Cette protéine permet de déterminer le KI apparent et d'étudier la communauté des sites de fixation des composés de classe S (résultats exploités par D.A. Colin).

CHAPITRE II

RESOLUTION DE LA STRUCTURE DES PROTEINES COMPOSANT LES LEUCOTOXINES

I. Introduction

II. ARTICLE N°2

**III. Conclusion et perspectives offertes par la résolution de la structure 3D de
LukF-PV**

I. INTRODUCTION

Depuis longtemps, la structure tridimensionnelle des toxines formant des pores intrigue les chercheurs, car elles sont supposées subir un grand nombre de modifications conformationnelles leur permettant une transition de l'état hydrosoluble où elles sont sécrétées à un état partiellement lipostable où elles deviennent fonctionnelles.

Après la résolution de la structure sous la forme d'un heptamère de l' α -toxine (Song et al., 1996), l'architecture globale d'un bon nombre de toxines formant des pores à β -feuillettes prépondérants pouvait être considérée comme comprise au moins dans leur état lipostable.

Cependant, afin de pouvoir établir des hypothèses sur l'ampleur des modifications conformationnelles concertées qu'adoptent ces toxines, il était nécessaire de connaître également leur structure sous la forme hydrosoluble à l'état de monomère. De telles structures permettent également de mieux appréhender l'interaction de ces protéines avec d'éventuels ligands membranaires. C'est dans ce cadre qu'en collaboration avec l'équipe de J. P. Samama (CNRS-IPBS, Toulouse), nous avons pris pour projet la cristallisation des composés des leucotoxines dans leur forme monomérique. Bien que la cristallisation de LukS-PV et de LukF-PV aient été entreprises simultanément, des cristaux exploitables de LukS-PV n'ont jamais été obtenus. Sachant que cette dernière protéine représente le pivot de l'activité biologique des leucotoxines en s'associant probablement à un ligand membranaire spécifique et ensuite en subissant la transformation évoquée plus haut, nous pouvons nous interroger sur l'existence d'une zone flexible dans la structure de LukS-PV. Une telle zone pourrait nécessiter l'affinement de conditions de stabilisation particulières lors de la cristallisation. Les protéines soumises à la cristallisation ont été purifiées selon la méthode décrite dans la partie Matériels et Méthodes (C.1.1), puis concentrées à 3 mg/ml dans 50 mM NaH_2PO_4 pH 7,0. En présence d'une salinité réduite LukS-PV a montré une propension marquée à l'agrégation pour des concentrations dépassant 4 mg/ml. La structure de LukF-PV présentée ci-après a été obtenue grâce au trempage des cristaux de la protéine native à l'aide d'une solution d'iridium à haute densité. Parmi les métaux testés (Os, Au, Ir) seul ce dernier ion métallique a présenté la capacité à déplacer sept des huit atomes de cadmium préalablement fixés par molécule de LukF-PV lors de la cristallisation. Les méthodes et programmes utilisés pour la résolution furent parmi les plus actuels.

II. ARTICLE N°2

The structure of *Staphylococcus aureus* leucocidin component (LukF-PV) reveals the fold of the water-soluble species of a family of transmembrane pore-forming toxins

**Pédelacq. J D, Maveyraud. L, Prévost. G, Baba-Moussa. L, González. A, Courcelle. E, Shepard. W, Monteil. H, Samama. J P, Mourey. L.
Structure, 1999, 7, 277-287**

The structure of a *Staphylococcus aureus* leucocidin component (LukF-PV) reveals the fold of the water-soluble species of a family of transmembrane pore-forming toxins

Jean-Denis Pédelacq¹, Laurent Maveyraud¹, Gilles Prévost²,
Lamine Baba-Moussa², Ana González³, Emmanuel Courcelle¹,
William Shepard⁴, Henri Monteil², Jean-Pierre Samama^{1*} and Lionel Mourey¹

Background: Leucocidins and γ -hemolysins are bi-component toxins secreted by *Staphylococcus aureus*. These toxins activate responses of specific cells and form lethal transmembrane pores. Their leucotoxic and hemolytic activities involve the sequential binding and the synergistic association of a class S and a class F component, which form hetero-oligomeric complexes. The components of each protein class are produced as non-associated, water-soluble proteins that undergo conformational changes and oligomerization after recognition of their cell targets.

Results: The crystal structure of the monomeric water-soluble form of the F component of Pantone–Valentine leucocidin (LukF-PV) has been solved by the multiwavelength anomalous dispersion (MAD) method and refined at 2.0 Å resolution. The core of this three-domain protein is similar to that of α -hemolysin, but significant differences occur in regions that may be involved in the mechanism of pore formation. The glycine-rich stem, which undergoes a major rearrangement in this process, forms an additional domain in LukF-PV. The fold of this domain is similar to that of the neurotoxins and cardiotoxins from snake venom.

Conclusions: The structure analysis and a multiple sequence alignment of all toxic components suggest that LukF-PV represents the fold of any water-soluble secreted protein in this family of transmembrane pore-forming toxins. The comparison of the structures of LukF-PV and α -hemolysin provides some insights into the mechanism of transmembrane pore formation for the bi-component toxins, which may diverge from that of the α -hemolysin heptamer.

Introduction

Leucocidins (Luk) and γ -hemolysins (Hlg) are bi-component toxins secreted by *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus aureus*, one of the most frequently isolated pathogens found in hospitals [1–6]. These toxins target polymorphonuclear cells, monocytes, macrophages and erythrocytes and comprise the family of staphylococcal bi-component leucotoxins [3,7]. Their toxicity involves the synergistic combination of a class S and a class F component [1], two non-associated exoproteins. These proteins undergo conformational changes and form oligomeric complexes after recognition of their cell targets, a process leading to transmembrane-pore formation [5,8] and, ultimately, to cell death.

Several Luk and Hlg toxins have been isolated from various *S. aureus* strains. The genes for most of these isolated toxins have been cloned and sequenced [2–4,6,9–11], and the corresponding proteins have been partitioned into the class F and class S subtypes. Among these toxins, the

Addresses: ¹Groupe de Cristallographie Biologique, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale du CNRS, 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse Cedex, France, ²Laboratoire de Toxinologie et d'Antibiologie Bactériennes, Institut de Bactériologie de la Faculté de Médecine, Université Louis Pasteur, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 3 rue Kœberlé, 67000 Strasbourg, France, ³European Molecular Biology Laboratory, Hamburg Outstation, DESY, Notkestraße 85, Hamburg D-22603, Germany and ⁴LURE, Université Paris-Sud, 91405 ORSAY Cedex, France.

*Corresponding author.
E-mail: samama@ipbs.fr

Key words: bi-component leucotoxins, crystal structure, LukF-PV, MAD, transmembrane pore

Received: 5 November 1998
Revisions requested: 4 December 1998
Revisions received: 18 December 1998
Accepted: 5 January 1999

Published: 26 February 1999

Structure March 1999, 7:277–287
<http://biomednet.com/elecref/0969212600700277>

© Elsevier Science Ltd ISSN 0969-2126

Pantone–Valentine leucocidin (PVL) was the first to be reported [12], purified and characterized [1]. PVL-producing strains are associated with primary cutaneous lesions, particularly furuncles [13–15], and the PVL toxin was shown to be highly active on human and rabbit polymorphonuclear leucocytes [3,8]. This toxicity requires the interaction of the S component of PVL (LukS-PV) with a membrane-bound receptor on human polymorphonuclear neutrophils (PMNs), with a K_D of less than 1 nM [16], followed by the binding of the F component of PVL (LukF-PV) [17,18]. It has been shown by flow cytometry, spectrofluorimetry and immunological studies that these sequential interactions at the membrane surface induce several responses of the target cells, and that pores, which are specific for the traffic of monovalent cations, are formed [8,19–21]. Biochemical data argued for a heterohexameric assembly of the bi-component toxins. Ultracentrifugation of toxins solubilized from erythrocyte membranes indicated a molecular weight in the order of 200 kDa and electrophoretic separations showed similar amounts of the F (MW 34 kDa) and S (MW 32 kDa)

components [5]. Studies of the interaction of several bi-component toxins with purely lipidic vesicles, indicated that they form membrane-attached oligomers. The two components of each toxin were present in equal amounts, suggesting a molar ratio of 1:1 in the oligomer [22]. The best fit of the statistical analysis of the kinetics of vesicle permeabilization indicated that the pores formed by the bi-component toxins were hexameric species [22].

Here, we report the three-dimensional X-ray structure of the secreted, water-soluble form of LukF-PV at 2.0 Å resolution. The multiwavelength anomalous dispersion (MAD) method was used to solve the structure of this 301 amino acid protein. The LukF-PV structure was compared with that of α -hemolysin from *S. aureus* [23], another pore-forming toxin [24], which has been described in its homoheptameric pore-forming state [25]. Our study shows the conservation of the core domains between these two toxins [26] and illustrates the fold of the stem domain prior to membrane insertion. The study also yields insights into some of the significant conformational changes pertaining to the mechanism of assembly in this family of toxins.

Results and discussion

Overall structure

The three-dimensional structure of LukF-PV contains 22 β strands (64.4%) and three short segments of either 3_{10} or α helices (5.3%). These secondary structure elements are organized into three structural domains: the β sandwich, the rim and the folded stem (Figure 1a). The β -sandwich domain (residues 1–61, 80–102, 154–169, 219–249 and 268–301) is made of two six-stranded antiparallel β sheets facing each other with an average angle of 30°. The rim domain (residues 62–79, 170–218 and 250–267) forms an antiparallel four-stranded open-face sandwich [27], topped by a stretch of residues (182–218). The conformation of this stretch may be described as two consecutive Ω loops followed by all the helical segments found in LukF-PV. The core of the protein, made of the β sandwich and rim domains, is similar to that of the α -hemolysin protomer (Protein Data Bank [PDB] code 7AHL) [23]. Superimposition of the two protein structures can be achieved using either the β -sandwich or the rim domains: the root mean square (rms) differences are 0.82 Å (for 116 C α atoms) and 0.89 Å (for 74 C α atoms), respectively. However, the respective orientations of the β -sandwich and rim domains differ in the two toxins (Figure 1b), due to a rigid-body displacement which can be described as a 10.7° rotation followed by a 0.19 Å translation along the rotation axis. This movement may be related to the large conformational change in the stem region of the proteins that occurs during the process of membrane insertion [28,29].

Sequence alignment of LukF-PV and α -hemolysin was performed, based on the superimposition of their three-dimensional structures. The alignment was then extended to all

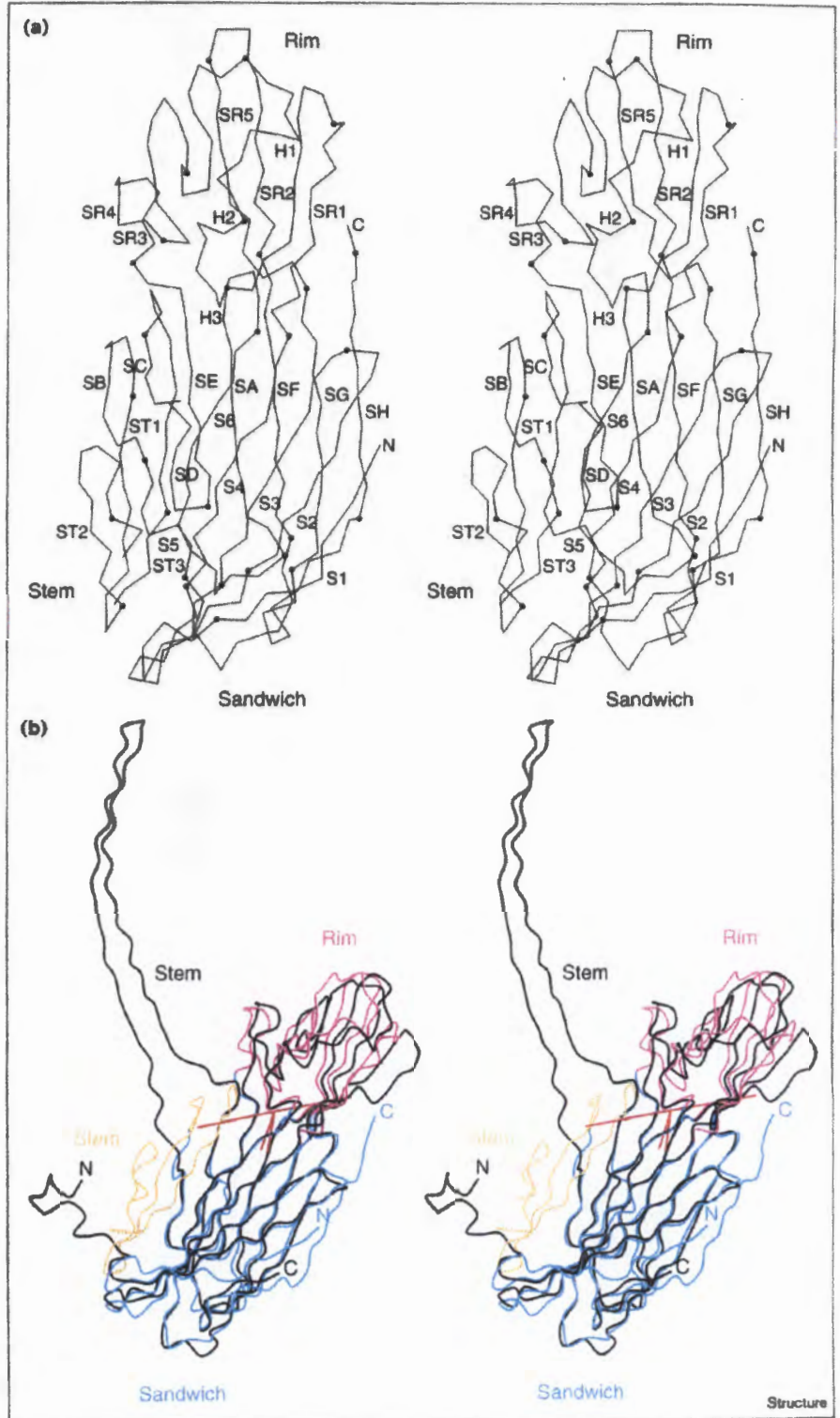
class F proteins, which share around 70% identity, and also to the class S proteins, which share 59–75% identity among one another. Between them, these two protein classes share 26–30% identity. The resulting multiple sequence alignment (Figure 2) revealed several conserved residues in α -hemolysin, class F and class S proteins. The positions of these residues, and their contribution to the protein fold, were analyzed using the LukF-PV three-dimensional structure. All of these residues have an important structural role and most could be associated into two groups. The first group comprises 12 residues: Ile59, Tyr82, Tyr99, Pro101, Tyr149, Leu153, Trp164, Leu216, Phe221, Pro223, Phe225 and Tyr245. The sidechains of these residues form a continuous hydrophobic patch involving all the strands in the β -sandwich domain (Figure 3a), except for the three N-terminal strands (S1, S2 and S3) and the two C-terminal strands (SG and SH), which are located on the same side of the β sandwich. The strands S2, S3 and S4 are, nevertheless, held together by hydrogen-bond interactions formed between the invariant Arg247, located in strand SF, and the mainchain oxygen atoms of residues 30 and 60 (which belong to the β turn between strands S2 and S3 and to S4, respectively). These features suggest conservation of the β -sandwich fold in all proteins. The second group of invariant residues is located at the bottom of the rim domain and comprises eight residues: Phe76, Trp78, Met192, Phe193, Phe207, Asp250, Tyr252 and Asn265. The sidechains of these residues provide a number of hydrophobic contacts, and polar interactions are exchanged between three buried residues (Figure 3b). The amide sidechain of Asn265 is at hydrogen-bonding distance from the nitrogen atom of the indole ring of Trp78 and from the carboxylic group of Asp250. The conservation of these residues and interactions might be regarded as a folding determinant of the rim domain. The formation of this core may be needed to accommodate the significant sequence variations between the class F and S proteins, which are prevalent in the two Ω -loop regions of the rim domain (Figure 2).

Conformational changes between the initial monomeric water-soluble and final pore-forming states

The X-ray structures of LukF-PV and the self-assembling α -hemolysin homoheptamer illustrate the molecular species at the first and last steps of pore formation, respectively. Pore formation is commonly described as a four-step process involving the water-soluble secreted form, the membrane-bound monomer [30], an oligomeric pre-pore [31,32], and finally, the transmembrane pore itself [25]. The stem region, comprising residues 106–148, is also known as the glycine-rich stem. In each protomer of the α -hemolysin heptamer, the stem forms two 65 Å long antiparallel β strands, which protrude from the protein core (Figure 1b) and constitute one building unit of the membrane-spanning 14-stranded β barrel [23]. In the water-soluble LukF-PV protein, the stem region is folded as a third domain made of three

Figure 1

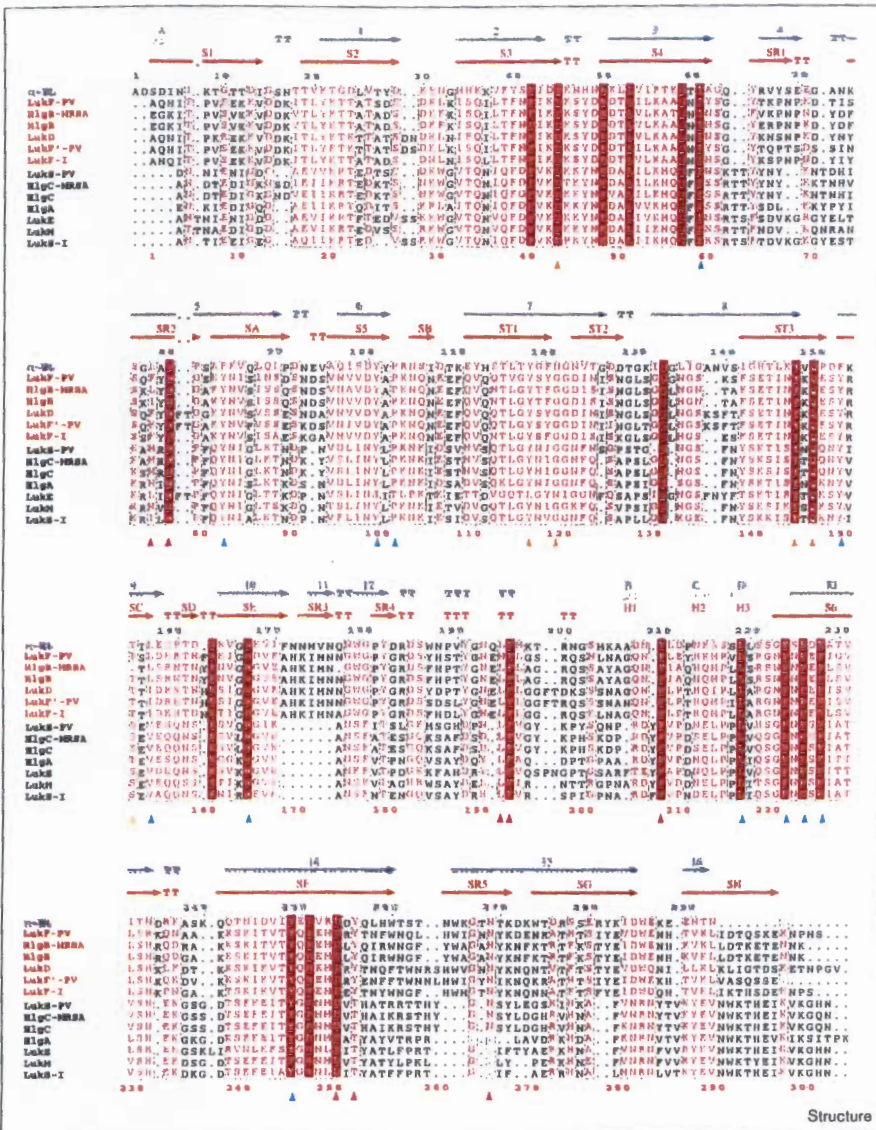
Structural domains in LukF-PV and α -hemolysin. (a) Stereoview C α trace of LukF-PV. Every tenth C α atom is indicated by a black dot. The N and C termini, the secondary structure elements and the three domains are labeled. (b) Stereoview of LukF-PV (the β -sandwich, rim and stem domains are shown in cyan, magenta and orange, respectively) superimposed onto one protomer of α -hemolysin in the heptameric oligomer (black). The rotation axis and the angular range describing the rigid-body motion (see text) are depicted in red. (The figure was produced using the program MOLSCRIPT [52].)



antiparallel β strands (ST1, ST2 and ST3) linked by one β turn and one right-handed cross-over connection (Figure 1). The junction to the β -sandwich domain is provided by

two short antiparallel strands: SB (residues 103–105) and SC (residues 149–153). The stem domain is packed onto the β -sandwich core, excluding an area of 2750 Å^2 from

Figure 2



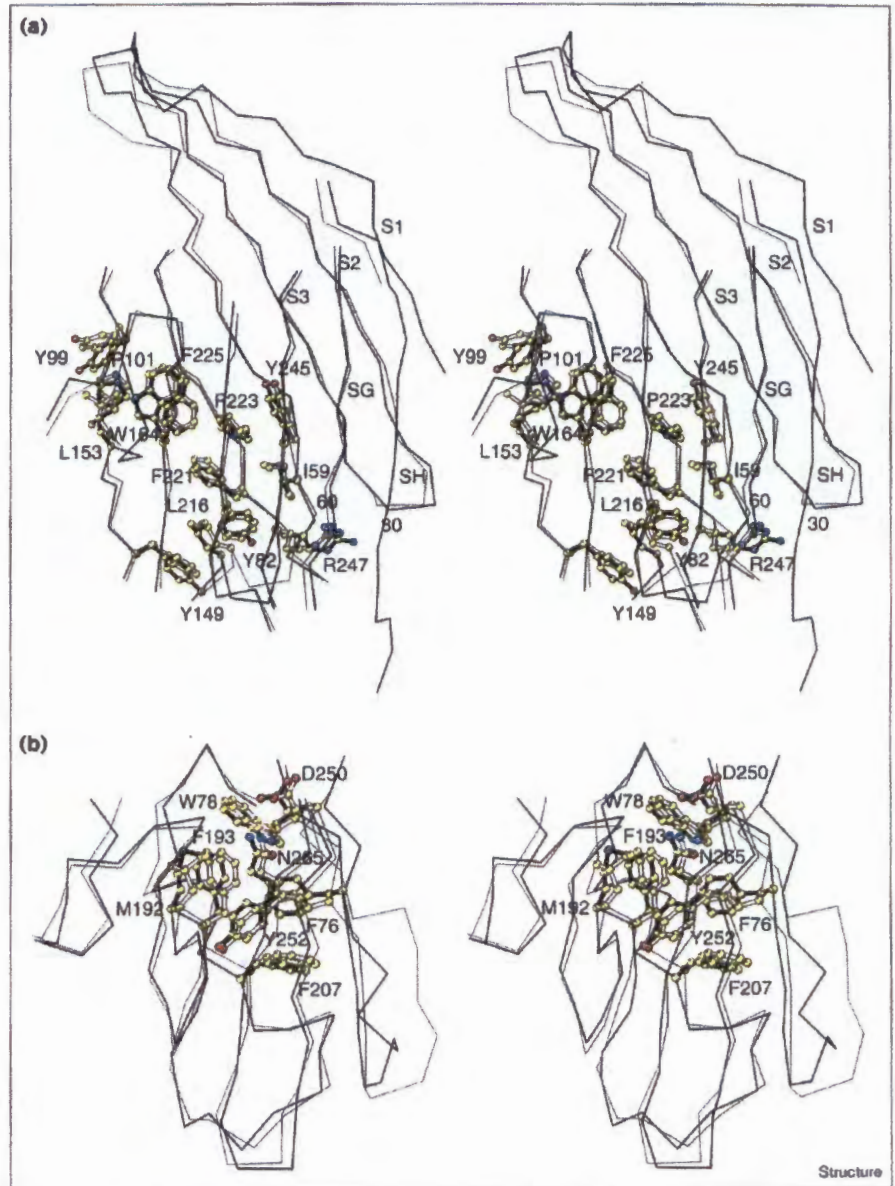
Sequence alignment for *Staphylococcus aureus* α -hemolysin (α -HL), *S. aureus* leucocidins (LukF-PV, LukD, LukF-PV, LukS-PV, LukE and LukM), *Staphylococcus intermedius* leucocidins (LukF-I and LukS-I), and *S. aureus* γ -hemolysins (HlgB-MRSA, HlgB, HlgC-MRSA, HlgC and HlgA). The names of the F and S components of the bi-component toxins are written in orange and black, respectively. The alignment was based on the structure superimposition of LukF-PV and α -HL. Secondary structure elements of α -HL (blue) and LukF-PV (red) were assigned using the program DSSP [53]; β strands are shown as arrows and α helices as coils; TT and TTT are used to mark a β turn and an α turn, respectively. Sequence homologies are highlighted in red; sequence identities are shown as white letters on a red background. Invariant residues in the β sandwich, the rim and the stem domains are indicated using triangles with the same color code as in Figure 1b. The sequence numbering in blue is for α -HL and the numbering in red is for LukF-PV. (The figure was created using ESPript [http://www.ipbs.fr/ESPript].)

the solvent. At each side of the stem- β -sandwich interface, two groups of invariant residues provide a set of interactions, which suggests that the fold of the stem domain should be similar in all monomeric water-soluble α -hemolysin, class F and class S proteins (Figure 4). The sidechain of Asp43, from strand S3 of the β -sandwich domain, is located at hydrogen-bonding distance from both the mainchain nitrogen atom of residue Gly119 and the phenolic group of Tyr116 of the stem. These interactions would be impaired by the C β atom of any amino acid at position 120, and probably explains the invariance of Gly120 (Figure 2). At the other edge of this interface, hydrogen bonds are exchanged between Thr151 O γ 1 and the side-chain atoms of residues Tyr144 and Gln146 from the folded stem (Figure 4).

Pore formation by PVL requires the unfolding of the stem domain. The differences in solvent accessibility of the residues of this domain, in its folded and α -hemolysin-like extended conformation, were evaluated. This calculation indicated that the sidechains that will be oriented towards the nonpolar part of the lipid bilayer are, in most cases, involved in the stem- β -sandwich domain interface. A search for structural homology with other protein structures using the programs DALI [33] and DEJAVU [34] revealed significant similarity, despite very weak sequence homology, between the stem domain and two toxins isolated from snake venom: erabutoxin A [35] (PDB code 5EBX) and toxin- γ [36] (PDB code 1TGX). The molecular architecture of these two toxins is known as the three-finger fold [37]. The three central β strands, and loops II and III of these

Figure 3

Stereoview superimposition of the three-dimensional structures of LukF-PV (thick lines and black bonds) and α -hemolysin (thin lines and open bonds). The sidechains of the invariant residues forming the core of the domains are shown with atoms in standard colours. The superimposition of (a) the β -sandwich domains and (b) the rim domains. (The figure was produced using the program MOLSCRIPT [52].)



toxins (the conformation of which is constrained by four disulfide bridges) encompass the fold of the stem in LukF-PV (Figure 5). The possible functional significance of this structural similarity with respect to protein-membrane interactions remains to be documented for the *S. aureus* toxins. However, this finding suggested that formation of a disulfide bridge between residues 128 and 144 in LukF-PV, which would be analogous to the link between Cys43 and Cys54 in the snake venom toxins (Figure 5), may be envisioned. Such an engineered *S. aureus* toxin, where the unfolding process of the stem domain would not go to completion, may help to clarify some of the early steps of membrane pore formation.

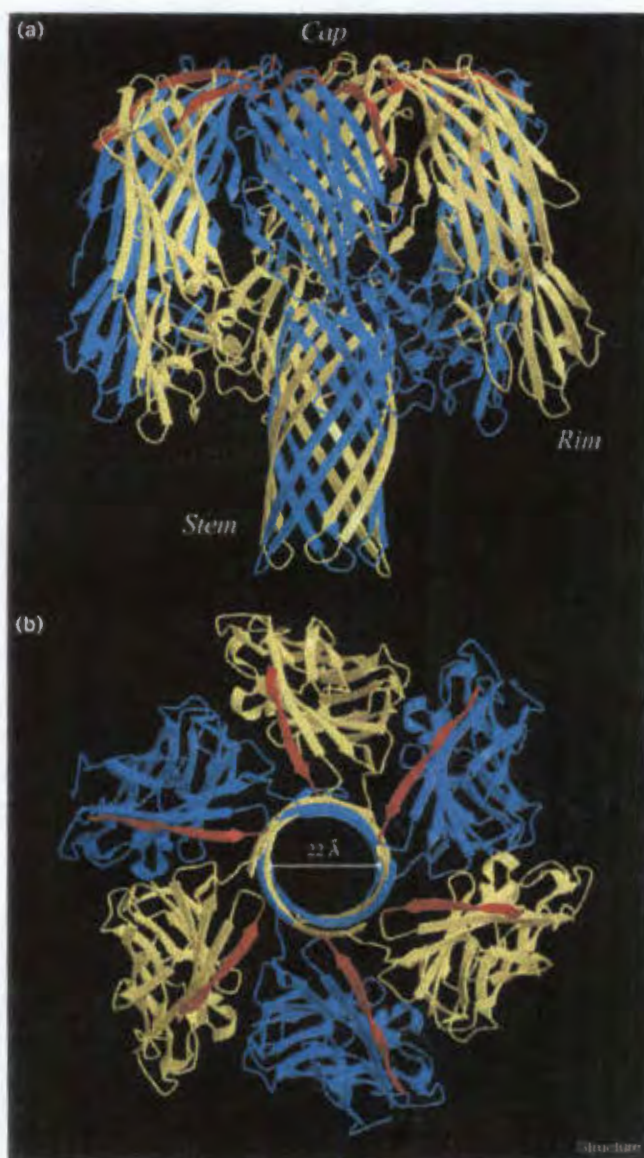
The sequence alignment (Figure 2), and the structure superimposition of LukF-PV and the α -hemolysin protomer indicate the invariance, in both residue type and position, of Pro101 and Tyr149 (LukF-PV numbering), the two residues between which the very large conformational change of the stem region occurs. These hinge points interact with residues from the β -sandwich core. The mainchain carbonyl oxygen atoms of residues Ala100 and Pro101 form hydrogen-bond interactions to the mainchain nitrogen atom of Ile226 from strand S6, and the nitrogen atom of the indole ring of the invariant Trp164, respectively. In addition to the van der Waals contacts established by the aromatic ring, the phenolic hydroxyl group of

region and the transition from the soluble monomeric form to the pore-forming heptameric structure was proposed [39]. The loose organization postulated for this region, and the inspection of the superimposed LukF-PV and α -hemolysin structures support this hypothesis. Accommodation of the 16 N-terminal residues, in the conformation they adopt in the pore-forming heptamer, seems sterically incompatible with a folded stem according to the LukF-PV structure (Figure 1b).

A similar oligomerization process for the bi-component toxins would imply that the N-terminal strand S1 dissociates from its antiparallel strand S2. Assuming that this transition occurs, the possibility that the F and S components may form homo- or heteroheptameric pores similar to that of α -hemolysin was examined. The α -hemolysin-like pore-forming protomers of the F and S proteins were generated with the reasonable assumption that the conformation of the unfolded stem regions should be very similar in all three proteins. The oligomers were modeled by superimposition of the unfolded stem regions of the F and S proteins onto each pair of strands of the 14-stranded β -barrel pore. Examination of the protomer-protomer contacts in these hypothetical heptamers showed that their formation was unlikely without additional conformational changes in the β -sandwich domain. A majority of seemingly incompatible sidechain substitutions, from α -hemolysin to the F and S proteins, occur for the residues involved in the 29 tight hydrogen-bond interactions contributing to the association of consecutive protomers in α -hemolysin. On the other hand, assuming unfolding of the stem domain but no dissociation of the N-terminal S1 strand from the β sandwich was also incompatible with the formation of heptameric oligomers of F and S proteins. Obvious steric clashes occur between adjacent protomers, which arise from the folded N-terminal strand. These modeling approaches suggested that the structure of the pore in PVL may diverge from the α -hemolysin heptamer, which would agree with the proposal that the oligomeric bi-component toxins contained equimolar proportions of class F and S monomers in a hexameric assembly [5,22].

The transmembrane pore resulting from a hexameric assembly would be a 12-stranded antiparallel β barrel, the geometrical and topological characteristics of which have been described [40,41]. In this barrel, the shear number (*S*) equals the number of strands in the β sheet, a feature that was also specific to the 14-stranded β barrel α -hemolysin pore. The inner diameter of the pore (21 Å) is in good agreement with the experimental data on γ -hemolysin [5] and PVL [42], which indicated a functional diameter of about 21–24 Å. The tilt of the strands to the β barrel axis is 37°, in line with the average angle formed by the β strands with the normal of the plane of the membrane, which was estimated to be 36–38° for the bi-component toxins in small unilamellar vesicles [22]. The

Figure 6



Molecular model of heterohexameric PVL assuming no unfolding of strand S1 from the β -sandwich domain. The conformation of the stem region was derived from that of the α -hemolysin protomer [23]. The architecture of the pore was based on the topology of a 12-stranded β barrel [41]. (a) View perpendicular to the sixfold axis. The LukF and LukS subunits are shown in blue and yellow, respectively; the N termini are shown in red. (b) View down the sixfold axis from the top of the cap. (The figure was produced using the program MOLSCRIPT [52].)

heterohexameric pore was constructed assuming unfolded stem regions for the F and S proteins and without altering the position of strand S1. Each antiparallel β strand of the stem was superimposed onto one pair of strands of the 12-stranded β barrel, and the resulting positions of the β -sandwich and rim domains in the mushroom-shaped complex showed no bad contacts (Figure 6). One of the

interprotomer interactions involved the folded N-terminal strand and the model suggested that additional residues at the N terminus should not impair oligomerization. We therefore engineered a LukF-PV protein containing eight additional residues (Gly-Pro-Leu-Gly-Ser-Pro-Glu-Phe) at the N terminus and found no change in the toxicity of this PVL on PMN cells compared to that of the native protein (GP, unpublished data).

Leucotoxins composed of a given S component and supplied with different class F proteins exhibit different levels of toxicity on selected cell types [11], suggesting either interaction of the F proteins with the membrane-bound receptor of LukS-PV or incomplete pore formation resulting from some mismatch between some F proteins, the S protein and/or the membrane components. The possible mismatch between the F and S proteins could only be addressed from the X-ray structure of LukF-PV. An analysis of the sequence variation within the class F proteins showed that they occur in regions located at the F-S interface, and at the solvent-exposed region of the toxin. The former location may be consistent with the different levels of cytotoxicity observed with the various combinations of S and F molecular species.

The protein monomer-membrane interactions are likely to contribute to the drastic conformational transitions leading to the disruption of the 2750 Å² interface between the folded stem and the β-sandwich domain, and to the formation of significant protomer-protomer interfaces in the oligomeric species [23]. These processes might be influenced by the chemical content of the membrane, which may provide some explanation for the recently proposed polymorphism of the α-hemolysin toxin formed in different membrane layers [43]. In the case of PVL, the binding of LukS-PV to its high-affinity membrane-bound receptor may also drive molecular events. The cooperative effect in the transition from a folded stem to other species, which in the case of the self-assembling α-hemolysin could involve the conformational change of the N-terminal region, may arise in PVL from protein-receptor binding interactions. The structure of the soluble form of LukF-PV should help in the design of engineered proteins for further investigations of the binding and oligomerization of these protein subunits in membranes.

Biological implications

Leucocidins, γ-hemolysins and α-hemolysin are exotoxins produced by *Staphylococcus aureus*, a common pathogen in hospitals. These toxins are secreted as water-soluble proteins of about 33 kDa but form oligomeric species upon binding to the cell membrane. This oligomerization leads to pore formation and is commonly described as a four-step process involving the water-soluble species, the membrane-bound monomer, an oligomeric pre-pore and finally the transmembrane pore.

Although α-hemolysin is a self-assembling toxin, leucocidins and γ-hemolysins are bi-component toxins that act through the sequential binding and synergistic association of a class S and a class F component to form hetero-oligomeric complexes. X-ray structure determination of the pore-forming oligomer of α-hemolysin, formed in deoxycholate micelles, revealed a heptameric organization. In this mushroom-shaped structure, the transmembrane pore appears as a 14-stranded antiparallel β barrel in which each protomer contributes two 65 Å long antiparallel strands. In this work, the X-ray structure of the water-soluble form of the F component of the Pantone-Valentine leucocidin (LukF-PV), solved by the multiwavelength anomalous dispersion (MAD) method, illustrates the molecular species that undergoes the conformational changes and oligomerization promoted by membrane association. The conservation of the folding determinants of the protein, established on the basis of a multiple sequence alignment of all toxic components, suggests that the structure of LukF-PV represents the fold of any water-soluble protein in this family of toxins. The membrane-spanning region of the toxin forms an additional domain in the monomeric protein, tightly packed onto the protein core. The topology of this domain is similar to that of erabutoxin A and toxin-γ from snake venom.

Biochemical and biophysical studies argued for hexameric assemblies of leucocidins and α-hemolysins, containing similar amounts of the F and S components. Modeling attempts of heptameric and hexameric oligomers of PVL, based on 14-stranded and 12-stranded antiparallel β-barrel pores, respectively, were in favor of the hetero-hexameric assembly of PVL.

Materials and methods

Purification of LukF-PV

The reference *S. aureus* ATCC49775 was grown in yeast extract casaminoacid sodium pyruvate (YCP) medium [11] for 16 h at 37°C with vigorous shaking. The proteins in the culture supernatant were precipitated with ammonium sulfate. The pellet was solubilized in 30 mM sodium phosphate (pH 6.5) and then dialyzed against the same buffer. Negatively charged proteins were discarded by two consecutive separations on SP fast flow and MonoS columns (Pharmacia, Uppsala, Sweden) using fast protein liquid chromatography (FPLC) at 4°C with an NaCl gradient ranging from 0 to 700 mM. Protein fractions (80–120 mM NaCl) were pooled and adjusted to 50 mM potassium phosphate, 1.5 M (NH₄)₂SO₄ (pH 7.0) for chromatography on an alkyl-superose FPLC column (Pharmacia). Pure LukF-PV was eluted from a linear (NH₄)₂SO₄ gradient (1.5–0 M). The protein was stored at 0.6 mg/ml (OD_{280nm} = 1.0) in 30 mM sodium phosphate, 200 mM NaCl (pH 6.5).

Crystallization

Crystals of LukF-PV were obtained at 4°C by seeding microcrystals in pre-equilibrated hanging drops containing the protein (20 mg/ml) in 200 mM Tris and MES buffer (pH 6.8–7.0), 21% PEG 4000 (W/V) and 7 mM cadmium chloride. The crystals belong to orthorhombic space group P₂₁, 2₁ with cell parameters a = 50.7 Å, b = 73.3 Å, c = 99.7 Å, with one molecule per asymmetric unit.

Table 1

Data collection statistics.

Wavelength (Å)	Resolution (Å) (outer shell)*	Reflections measured/unique	Completeness (%) (outer shell)*	R_{sym}^{\dagger} (outer shell)*	$R_{\text{iso}}^{\ddagger}$	R_{ano}^{\S}
Remote λ_1 1.1270	24.4–2.0 (2.12–2.0)	96,992/21,089	85.0 (88.0)	0.060 (0.101)	–	0.037
Edge λ_2 1.1053	24.4–2.0 (2.12–2.0)	92,737/21,121	85.1 (89.8)	0.071 (0.123)	0.042	0.048
Peak λ_3 1.1048	24.4–2.0 (2.12–2.0)	80,455/21,495	86.7 (89.7)	0.064 (0.111)	0.040	0.056
Remote λ_4 0.8269	24.4–2.0 (2.12–2.0)	74,044/20,710	83.3 (89.8)	0.063 (0.121)	0.051	0.050

*Values in parentheses are for the highest resolution shell. $^{\dagger}R_{\text{sym}} = \sum \Sigma |<I> - I_i| / \sum \Sigma I_i$; $^{\ddagger}R_{\text{iso}} = \Sigma |F_{\text{PH}} - F_{\text{P}}| / \Sigma |F_{\text{P}}|$.

$^{\S}R_{\text{ano}} = \Sigma |<I^*> - <I^*>| / \Sigma (<I^*> + <I^*>)$.

Data collection and phasing

A MAD experiment was performed on a single crystal soaked with $(\text{NH}_4)_2\text{IrCl}_6$. Soaking was performed in an X-ray capillary by adding the iridium salt solubilized in the reservoir solution to the crystal in mother liquor. The final concentration and soaking time were 2 mM and 16 h, respectively. An equal volume of a cryoprotectant solution (20% glycerol [w/v] in the solution used for heavy-atom soaking) was then added for 1 h. The content of the capillary was transferred on a glass plate and the crystal mounted in a cryo-loop and flash-cooled to 100K in a stream of nitrogen gas. Care was taken to properly orient the crystal in the cryo-loop in order to record the Bijvoet pairs on the same frame. MAD diffraction data were collected at four wavelengths on X31 beam line of the EMBL Hamburg Outstation at the Deutsches Elektronen-Synchrotron (DESY, Germany). A fluorescence spectrum, recorded with the frozen crystal prior to data collection, was used to select the wavelengths in the iridium L_{III} absorption edge ($\lambda_2 = 1.1053$ Å, maximum of f''), at the peak ($\lambda_3 = 1.1048$ Å, maximum of f') and at two remote wavelengths ($\lambda_1 = 1.1270$ Å and $\lambda_4 = 0.8269$ Å) (Figure 7). Data were collected on an 18 cm MAR research image plate with detector distance 180 mm, frame size 1° and approximately 4 min exposure time. Reflection intensities were processed using the program DENZO [44]. The CCP4 suite of programs [45] was then used to merge and scale these intensities and to compute the structure-factor amplitudes (Table 1). For scaling and all subsequent steps, the low-energy reference data set (λ_1) was chosen as 'native' data set. Three major heavy-atom sites were identified in dispersive difference Patterson maps at 4.0 Å resolution. Heavy-atom refinement and MAD phasing were conducted with SHARP [46] using all data between 24.4 and 2.0 Å (Table 2), which indicated four additional sites in the

anomalous residual map computed at λ_3 . The electron-density map was improved by solvent flattening in SOLOMON [47] assuming a solvent content of 48% in the unit cell.

Model building and crystallographic refinement

The modified 2.0 Å resolution electron-density map allowed tracing of 88% of the LukF-PV molecule, including 81% of sidechain atoms. The structure was refined by the maximum-likelihood method as implemented in REFMAC [48] including a bulk-solvent correction computed in X-PLOR [49], followed by manual fitting into SIGMAA-weighted electron-density maps with TURBO-FRODO [50]. Reflections between 24.4 and 2.0 Å were used in the refinement, excluding a random set of data (5%) for the calculation of the free R factor [51]. The final model comprises 2389 nonhydrogen atoms in LukF-PV, seven iridium species, one cadmium ion, 168 water and 2 MES buffer molecules. The rms deviations from ideal geometry were calculated: bond lengths, 0.012 Å; angles, 2.3°; dihedrals, 27.7°. The crystallographic R value and R_{free} were 0.20 (for 19,969 reflections) and 0.24 (for 1080 reflections), respectively. The average B factors are 15.3 Å² for protein atoms (14.2 Å² and 16.3 Å² for mainchains and sidechains, respectively), 50.9 Å² for the iridium species, 39.1 Å² for the cadmium ion and 31.5 Å² and 19.8 Å² for the MES buffer and water molecules, respectively. Ser129 and the three consecutive glycine residues (Gly130–Gly132) display the highest temperature factors in the structure and no clear electron density could be assigned to Asn133, Gly134 and Ser135. Flexibility of the polypeptide chain, rather than cleavage in this region, should be invoked as sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) of dissolved crystals only revealed a single protein band corresponding to the full-length protein.

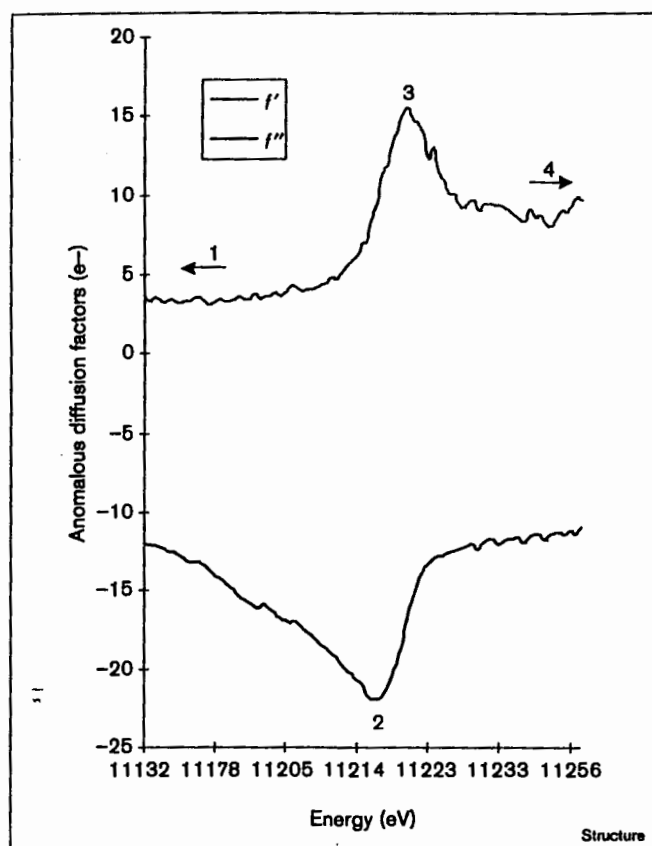
Table 2

MAD phasing statistics.

Wavelength (Å)	$f''/f''^*(e^-)$	P_{iso}^{\dagger} acentric/centric	P_{ano}^{\dagger}	$R_{\text{Cullis}}^{\ddagger}$ acentric/centric	$R_{\text{Cullis}}^{\ddagger}$	FOM [†] acentric/centric
Remote λ_1 1.1270	–10.7/4.0	–	1.39	–	0.86	0.56/0.41
Edge λ_2 1.1053	–22.0/8.5	1.84/1.18	2.06	0.57/0.59	0.72	
Peak λ_3 1.1060	–16.8/15.5	1.01/0.78	2.46	0.61/0.63	0.63	
Remote λ_4 0.8269	–3.8/10.2	1.29/0.97	1.81	0.71/0.75	0.76	

*Values of anomalous scattering factors, as refined by SHARP [46], used for phasing. † Phasing statistics provided by the program SHARP [46]; FOM, figure of merit.

Figure 7



The energy dependence of the anomalous scattering factors f' and f'' in the vicinity of the iridium L_{III} absorption edge, as derived from the fluorescence spectrum. The energies corresponding to the four working wavelengths are labeled: 2 (edge), 3 (peak), 1 and 4 (two remote points).

Accession numbers

The coordinates and structure factors are deposited in the Protein Data Bank with accession code 1pvl, to become available at the time of publication.

Acknowledgements

We are grateful to the skillful technical assistance of D Keller for the purification of LukF-PV. We thank É de La Fortelle and G Bricogne for providing the SHARP program and for precious advice, P Gouet for his helpful assistance in the use of the program ESPript, MS Sansom and ID Kerr for kindly providing the coordinates of canonical β barrels and M Welch for his critical reading of the manuscript. This work was supported in part by the Direction de la Recherche et des Etudes Doctorales (grant EA 1318) and by the Région Midi-Pyrénées.

References

- Woodin, A.M. (1960). Purification of the two components of leucocidin from *Staphylococcus aureus*. *Biochem. J.* **75**, 158-165.
- Cooney, J., Kienle, Z., Foster, T.J. & 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 leucocidin. *Infect. Immun.* **61**, 768-771.
- Prévost, G., et al., & Piémont, Y. (1995). Pantone-Valentine leucocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infect. Immun.* **63**, 4121-4129.
- Prévost, G., Bouakham, T., Piémont, Y. & Monteil, H. (1995). Characterisation of a synergohemotropic toxin produced by *Staphylococcus intermedius*. *FEBS Lett.* **376**, 135-140.
- Sugawara, N., Tomita, T. & Kamio, Y. (1997). Assembly of *Staphylococcus aureus* γ -hemolysin into a pore-forming ring-shaped complex on the surface of human erythrocytes. *FEBS Lett.* **410**, 333-337.
- Kaneko, J., Muramoto, K. & Kamio, Y. (1997). Gene of LukF-PV-like component of Pantone-Valentine leucocidin in *Staphylococcus aureus* P83 is linked with lukM. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**, 541-544.
- Tomita, T. & Kamio, Y. (1997). Molecular biology of the pore-forming cytolytins from *Staphylococcus aureus*, α - and γ -hemolysins and leucocidin. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**, 565-572.
- Finck-Barbançon, V., Duportail, G., Meunier, O. & Colin, D.A. (1993). Pore formation by a two-component leucocidin from *Staphylococcus aureus* within the membrane of human polymorphonuclear leukocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1182**, 275-282.
- Rahman, A., Izaki, K. & Kamio, Y. (1993). Gamma-hemolysin genes in the same family with lukF and lukS genes in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**, 1234-1236.
- Supersac, G., Prévost, G. & 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.
- Gravet, A., Colin, D.A., Keller, D., Girardot, R., Monteil, H. & Prévost, G. (1998). Characterization of a novel member, LukE-LukD, of the bi-component staphylococcal leucotoxins family. *FEBS Lett.* **436**, 202-208.
- Pantone, P.N. & Valentine, F.C.O. (1932). Staphylococcal toxin. *Lancet* **222**, 506-508.
- Finck-Barbançon, V., Prévost, G. & Piémont, Y. (1991). Improved purification of leucocidin from *Staphylococcus aureus* and toxin distribution among hospital strains. *Res. Microbiol.* **142**, 75-85.
- Cribier, B., Prévost, G., Couppié, P., Finck-Barbançon, V., Grosshans, E. & Piémont, Y. (1992). *Staphylococcus aureus* leucocidin: a new virulence factor in cutaneous infections? An epidemiological and experimental study. *Dermatology* **185**, 175-180.
- Couppié, P., Cribier, B. & Prévost, G. (1994). Leucocidin from *Staphylococcus aureus* and cutaneous infections: an epidemiologic study. *Arch. Dermatol.* **130**, 1208-1209.
- Colin, D.A., Mazurier, L., Sire, S. & Finck-Barbançon, V. (1994). Interaction of the two components of leucocidin from *Staphylococcus aureus* with human polymorphonuclear leukocyte membranes: sequential binding and subsequent activation. *Infect. Immun.* **62**, 3184-3188.
- Woodin, A.M. & Wieneke, A.A. (1968). The cation-sensitive phosphatases of the leukocyte cell membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **33**, 568-562.
- Noda, M., Kato, I., Matsuda, F. & Hirayama, T. (1981). Mode of action of staphylococcal leucocidin: relationship between binding of 125 I-labeled S and F components of leucocidin to rabbit polymorphonuclear leukocytes and leucocidin activity. *Infect. Immun.* **34**, 362-367.
- Meunier, O., Falkenrodt, A., Monteil, H. & 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.
- König, B., Prévost, G., Piémont, Y. & König, W. (1995). Effects of *Staphylococcus aureus* leucocidins on inflammatory mediator release from human granulocytes. *J. Infect. Dis.* **171**, 607-613.
- Staal, L., Monteil, H. & 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.
- Ferreras, M., Höper, F., Serra, M.D., Colin, D.A., Prévost, G. & Menestrina, G. (1998). The interaction of *Staphylococcus aureus* bi-component γ -hemolysins and leucocidins with cells and lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1414**, 108-126.
- Song, L., Hobaugh, M.R., Shustak, C., Cheley, S., Bayley, H. & Gouaux, J.E. (1996). Structure of staphylococcal α -hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* **274**, 1859-1866.
- Füssle, R., Bhakdi, S., Sziegoleit, A., Tranum-Jensen, J., Kranz, T. & Wellensiek, H.J. (1981). On the mechanism of membrane damage by *Staphylococcus aureus* α -toxin. *J. Cell Biol.* **91**, 83-94.
- Gouaux, J.E., et al., & Bayley, H. (1994). Subunit stoichiometry of staphylococcal α -hemolysin in crystals and on membranes: a heptameric transmembrane pore. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **91**, 12828-12831.
- Gouaux, E., Hobaugh, M. & Song, L. (1997). α -Hemolysin, γ -hemolysin, and leucocidin from *Staphylococcus aureus*: distant in sequence but similar in structure. *Protein Sci.* **12**, 2631-2635.

27. Richardson, J.S. (1981). The anatomy and taxonomy of protein structure. *Adv. Protein Chem.* 34, 167-339.
28. Ward, R.J., Palmer, M., Leonard, K. & Bhakdi, S. (1994). Identification of a putative membrane-inserted segment in the α -toxin of *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry* 33, 7477-7484.
29. Valeva, A., Palmer, M., Hilgert, K., Kehoe, M. & Bhakdi, S. (1995). Correct oligomerization is a prerequisite for insertion of the central molecular domain of staphylococcal α -toxin into the lipid bilayer. *Biochim. Biophys. Acta* 1236, 213-218.
30. Walker, B., Krishnaswamy, M., Zom, L. & Bayley, H. (1992). Assembly of the oligomeric membrane pore formed by Staphylococcal α -hemolysin examined by truncation mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 267, 21782-21786.
31. 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.
32. Vécsey-Semjén, B., Lesieur, C., Möllby, R. & van der Goot, F.G. (1997). Conformational changes due to membrane binding and channel formation by staphylococcal α -toxin. *J. Biol. Chem.* 272, 5709-5717.
33. Holm, L. & Sander, C. (1993). Protein structure comparison by alignment of distance matrices. *J. Mol. Biol.* 233, 123-138.
34. Kleywegt, G.J. & Jones, T.A. (1994). Halloween... Masks and Bones. In *Proceedings of the CCP4 Study Weekend: From First Map to Final Model* (Bailey, S., Hubbard, R. & Waller, D., eds), pp. 59-66, SERC, Daresbury Laboratory, Warrington, UK.
35. Corfield, P.W., Lee, T.J. & Low, B.W. (1989). The crystal structure of erabutoxin a at 2.0-Å resolution. *J. Biol. Chem.* 264, 9239-9242.
36. Bilwes, A., Rees, B., Moras, D., Ménez, R. & Ménez, A. (1994). X-ray structure at 1.65 Å of toxin γ , a cardiotoxin from *Naja nigricollis* venom. Crystal packing reveals a model for insertion into membranes. *J. Mol. Biol.* 239, 122-136.
37. Rees, B. & Bilwes, A. (1993). Three-dimensional structures of neurotoxins and cardiotoxins. *Chem. Res. Toxicol.* 6, 385-406.
38. Gouaux, E. (1998). α -Hemolysin from *Staphylococcus aureus*: an archetype of β -barrel, channel-forming toxins. *J. Struct. Biol.* 121, 110-122.
39. Cheley, S., *et al.*, & Bayley, H. (1997). Spontaneous oligomerization of a staphylococcal α -hemolysin conformationally constrained by removal of residues that form the transmembrane β -barrel. *Protein Eng.* 10, 1433-1443.
40. Murzin, A.G., Lesk, A.M. & Chothia, C. (1994). Principles determining the structure of β -sheet barrels in proteins. I. A theoretical analysis. *J. Mol. Biol.* 236, 1369-1381.
41. Sansom, M.S. & Kerr, I.D. (1995). Transbilayer pores formed by β -barrels: molecular modeling of pore structures and properties. *Biophys. J.* 69, 1334-1343.
42. Colin, D.A., Meunier, O., Staali, L., Prévost, G. & Monteil, H. (1997). Bi-component leukotoxins from *Staphylococcus aureus*. In *Cold Spring Harbor Laboratory on Microbial Pathogenesis and Host Response*. (Maloy, S., Taylor, R.K. & Magee, P.T., eds), pp. 150, Cold Spring Harbor, New York.
43. Czajkowsky, D.M., Sheng, S. & Shao, Z. (1998). Staphylococcal α -hemolysin can form hexamers in phospholipid bilayers. *J. Mol. Biol.* 276, 325-330.
44. Otwinowski, Z. (1993). Oscillation data reduction program. In *Proceedings of the CCP4 Study Weekend: Data Collection and Processing*. (Sawyer, L., Isaacs, N. & Bailey, S., eds), pp. 56-62, SERC, Daresbury Laboratory, Warrington, UK.
45. Collaborative Computational Project No. 4. (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D* 50, 160-763.
46. de La Fortelle, É. & Bricogne, G. (1997). Maximum-likelihood heavy-atom parameter refinement for multiple isomorphous replacement and multiwavelength anomalous diffraction methods. *Methods Enzymol.* 276, 472-494.
47. Abrahams, J.P. & Leslie, A.G.W. (1996). Methods used in the structure determination of bovine mitochondrial F₁ ATPase. *Acta Crystallogr. D* 52, 30-42.
48. Nurshudov, G.N., Vagin, A.A. & Dodson, E.J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D* 53, 240-255.
49. Brünger, A.T. (1992). *X-PLOR Version 3.1*. A system for X-ray crystallography and NMR. Yale University Press, New Haven, CT.
50. Foussel, A. & Cambillau, C. (1989). TURBO-FRODO. In *Silicon Graphics Geometry Partner Directory*, pp. 71-78, Silicon Graphics, Mountain View, CA.
51. Brünger, A.T. (1992). The free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* 355, 472-475.
52. Kraulis, P.J. (1991). MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* 24, 946-950.
53. Kabsch, W. & Sander, C. (1983). Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* 22, 2577-2637.

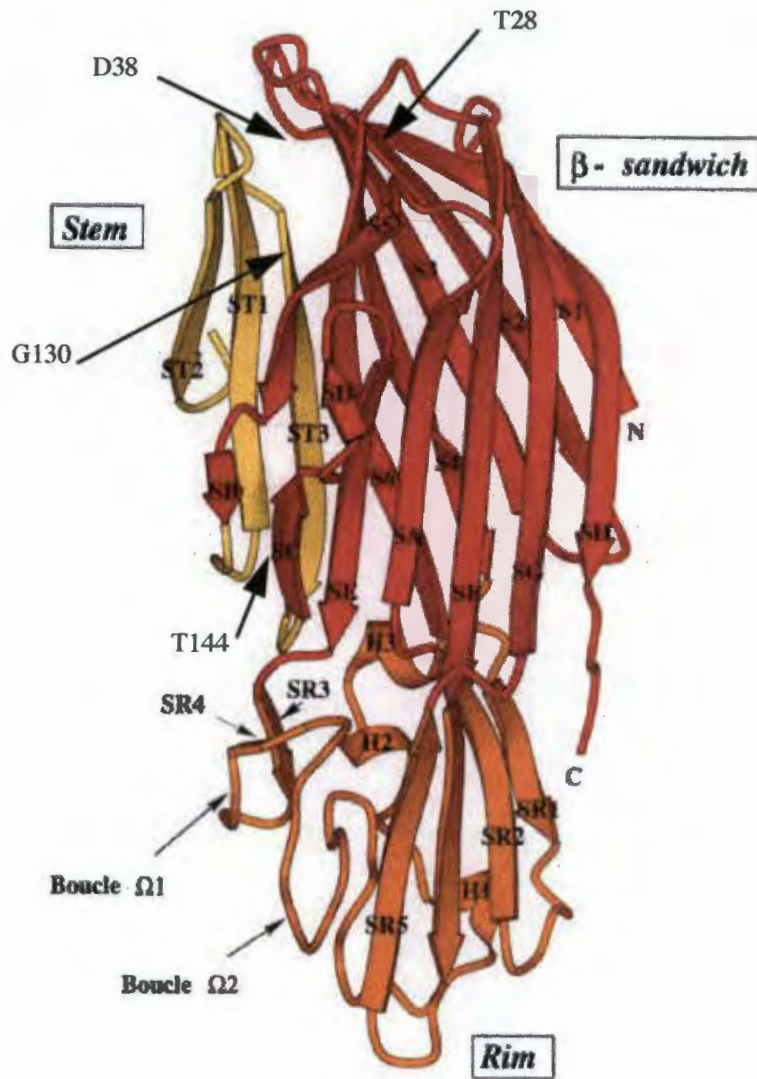


Figure 23 : Représentation schématique de la structure tridimensionnelle de LukF-PV à l'état hydrosoluble (d'après Pédelacq, 1998).

III. Conclusion et perspectives offertes par la résolution de la structure 3D de LukF-PV

Cette structure tridimensionnelle de LukF-PV met en évidence l'importance des modifications conformationnelles concertées qui vont avoir lieu avant l'adoption d'une structure lipostable. Tout d'abord, la région centrale de la structure primaire qui est présumée participer à la formation du pore, se trouve repliée sous la forme de trois β -feuillettes contre l'une des faces de la structure (**Figure 23**), tenue par les interactions avec Asp38 et Thr144. Ce domaine masque alors une surface de 2750 Å² où pointe un certain nombre de résidus apolaires. Ces résidus, au cours de l'insertion de la protéine dans la membrane, et par analogie à la structure de l' α -toxine, vont pouvoir engager une série de dépliements et d'interactions hydrophobes avec les lipides membranaires, et se présenter finalement sous la forme de deux β -feuillettes transmembranaires. Il doit être noté que les acides aminés réellement variants parmi les séquences des protéines de classe F sont positionnés dans la face opposée de la lumière du pore dans la structure. Cette particularité laisse présumer de la pression de conservation de l'architecture de ces molécules, ainsi que d'un mode de développement du pore relativement univoque, et commun à de nombreuses protéines présentant les mêmes fonctions.

Cependant, la structure tridimensionnelle de LukF-PV montre quelques différences vis à vis de celle de l' α -toxine. Outre la région du *Stem*, l'extrémité N-terminale se positionne le long de la surface externe du chapeau alors que dans le cas de l' α -toxine, cette dernière déborde complètement de la protéine pour venir s'encaster dans le monomère adjacent, créant une sorte d'arrimage répété au sommet de l'oligomère. Quelle répercussion peut avoir cette différence? En fait, ce premier β -feuillet ajoute quelque peu à l'encombrement stérique de la protéine et pourrait en partie expliquer la structure vraisemblablement hexamérique des leucotoxines actives. Il faut rappeler que **Kamio et coll** et **Ferreras et coll** ont d'abord suggéré un assemblage hexamérique de HlgA-HlgB dans les membranes d'hématies de lapins grâce à l'obtention d'images en microscopie électronique montrant la présence de complexes hexamériques, puis à la caractérisation d'un complexe protéique de 190 kDa extrait de petites vésicules unilamellaires solubilisées. D'autre part, si ces complexes sont bouillis, les deux formes monomériques réapparaissent avec une égale intensité suggérant qu'une équivalence pondérale entre les deux types de protéines. Cette observation est compatible avec l'obtention d'hexamères formés de trois molécules de classe S et trois molécules de classe F.

Dans ce contexte, une modélisation de LukS-PV a d'abord été réalisée en utilisant les homologies de séquence avec LukF-PV. Ces structures sont essentiellement composées de feuillettes β , comme l'indiquaient les analyses en spectroscopie infrarouge. Un assemblage des deux types de protéine a été réalisé et seule une formation hexamérique où LukS-PV est disposé en alternance avec LukF-PV paraît vraisemblable. Le double β -feuillet transmembranaire aurait donc un angle de 37° par rapport à la verticale, plus relevé que celui de l' α -toxine (42°) par rapport à l'axe de la membrane. L'une des conséquences est que le diamètre du pore est de 21 Å,

en accord avec l'estimation en microscopie électronique (Sugarawa et al., 1997) ou par la mesure du diamètre minimum des billes de polyéthylène glycol exclues par le pore (Colin et al., 1997). Ce diamètre est légèrement plus réduit que celui de l' α -toxine (24 Å). Dans cette structure oligomérique, Thr28 de LukS-PV se trouve en bordure de la structure modélisée de cette protéine, mais cependant à une distance supérieure à toute interaction possible avec un résidu de LukF-PV. Toutefois, une légère déformation de la molécule au cours de l'oligomérisation reste envisageable. Deux acides aminés de LukF-PV pourraient alors interagir avec la Thr28 : Lys 155 ou Asn 158. Cette hypothèse pourrait être testée grâce à la mutagenèse dirigée ou la Lys155 ou l'Asn158 seraient substituées par un acide aminé non polaire (Leu, Val) et dont le radical serait différemment orienté dans l'oligomère (Arg, Glu, Tyr). De même, pour conforter la modélisation disponible, il serait intéressant de vérifier les interactions suivantes : LukS-PV Asp9/LukF-PV Ser145, LukS-PV Lys45/LukF-PV Ser8. Des mutants cystéine de HlgA et HlgB ont été produits afin de favoriser la formation de ponts disulfures lors de l'oligomérisation. En fonction des combinaisons de mutants/protéines natives utilisées et des *ratio* molaires entre protéine mutée/ protéine native utilisée, l'énergie de transfert développée par les ponts disulfure devrait permettre une approche complémentaire de la détermination du nombre de protéines par pore et de leur alternance. Déjà, nous savons que le couple HlgA Ser155Cys/HlgB Ser219Cys est fonctionnel et entraîne la formation d'un pont disulfure (G. Menestrina, communication personnelle).

L'article récent de Ferreras et al (Ferreras et al., 1998) rapporte que la fixation de HlgA présente une coopérativité pour l'hémolyse, avec un nombre de Hill égal à 3, qui n'est pas en faveur de l'existence d'un ligand spécifique. Par contre, la surface membranaire des cellules sensibles est plus rapidement saturable par les leucotoxines composées de HlgC et LukS-PV avec des nombres de Hill égaux à 1 et 0,2, respectivement. Ces dernières valeurs confortent l'hypothèse de l'existence de ligands spécifiques pour certains composés de classe S.

Il paraît évident que s'il existe un site privilégié d'interaction avec un ligand membranaire dans la structure des composés de classe S et F, ce dernier se situe plus probablement dans la proximité du domaine du Stem qui va également opérer une modification conformationnelle importante. Chaque modification de cette région devra tenir compte de cette hypothèse en examinant la fixation résiduelle des mutants. Les acides aminés de cette région peuvent également être la cible de mutations pour la recherche de mutants d'affinité.

D'autres points intéressants sont notés à partir de cette structure tridimensionnelle :

- La séquence C-terminale des leucotoxines présente 10 à 12 acides aminés supplémentaires par rapport à l' α -toxine. Ces résidus sont organisés en un β -feuillet qui prend part au β -sandwich, puis de quelques acides aminés non structurés débordant sur le domaine *Rim* d'ancrage à la membrane. Le rôle de ces quelques acides aminés pourrait être facilement évalué en opérant une ou plusieurs délétions de cette séquence et en examinant la vitesse de formation des pores.

- Lors du trempage des cristaux de LukF-PV par le sel d'iridium, seul l'un des sites de fixation du cadmium à la position Glu107 n'a pas été déplacé. Il peut s'agir d'un problème de stéréochimie ou de fixation privilégiée. Nous savons d'autre part (Finck-Barbançon et al., 1993) qu'une concentration de 2 mM en zinc suffit à bloquer l'entrée de Bet par le pore. Ces observations pourraient suggérer que l'un ou l'autre des composés des leucotoxines soit naturellement capable de fixer un ion divalent. Un résidu de radical acide est conservé pour toutes les protéines de cette famille de toxines, sauf LukE. Malheureusement, LukE est très faiblement actif sur les polynucléaires humains et ne nous permet pas de connaître l'action du zinc sur les pores formés par LukE-LukD.

- Le dépliement de la région *Stem* peut être théoriquement bloqué par la substitution de deux acides aminés en cystéine : Leu128Cys et Tyr144Cys grâce à la formation théorique d'un pont disulfure. Il serait alors intéressant de savoir si une étape de formation des pores est inhibée : la fixation, l'oligomérisation, l'insertion membranaire ou la formation du pore. A laquelle de ces étapes débute la série de modifications conformationnelles concertées ?

- Cependant, il nous a paru plus intéressant encore de travailler sur la fonctionnalité du pore. En effet, **Staali et coll** (Staali et al., 1998) ont rapporté que les leucotoxines à deux composés opèrent par un mécanisme double. La première fonction dans le temps est une activation de canaux calciques cellulaires qui intervient dans les 150 s suivant l'application des leucotoxines, et qui peut être inhibée par l'usage d'adénosine, de thaspigargine, d'éconazole, La^{3+} ; et ceci indépendamment de la formation des pores qui ne sont fonctionnels qu'après 10-15 min et sont, eux, bloqués par 0,2 mM Zn^{2+} ou des concentrations de Ca^{2+} non physiologiques supérieures à 2 mM.

Nous avons donc projeté le découplage de ces deux fonctions des leucotoxines car :

- il permettrait de confirmer d'une autre manière les observations de Staali et al.

- il s'agirait d'une réalisation tout à fait originale dans le domaine des toxines formant des pores. L'obtention de telles leucotoxines modifiées permettrait de mieux connaître la réponse cellulaire consécutive à chacune des fonctions des leucotoxines.

- en bloquant la capacité de lyse cellulaire des leucotoxines, il faudra évaluer leur toxicité sur un modèle expérimental et si elles n'induisent effectivement plus de nécrose, ces dernières pourraient ensuite être testées comme immunomodulateurs.

CHAPITRE III

TENTATIVE DE DECOUPLAGE DE L'ACTIVITE CALCIUM-INDUCTRICE DE L'ACTIVITE FORMANT DES PORES DES LEUCOTOXINES A DEUX COMPOSES SUR LES POLYNUCLEAIRES HUMAINS

1. Introduction
2. Article N°3
3. Conclusion
4. Perspectives

I. INTRODUCTION

Le rôle perméabilisant des toxines formant des pores a d'abord constitué l'objet prioritaire des recherches (Bhakdi et al., 1996), bien que les conséquences inflammatoires de leur action étaient documentées (Jonas et al., 1994). Ces derniers phénomènes, mettant en jeu les réponses secondaires des cellules ont souvent été considérés comme annexes et non spécifiques. Le locus codant la leucocidine de Pantone et Valentine a récemment été confirmé (Kaneko et al., 1997a; Van der Vijver et al., 1972) comme inclus dans l'ADN d'un bactériophage inclus dans l'ADN chromosomique de *S. aureus*. Des particules phagiques ont été obtenues après traitement de la souche ATCC 49775 à la mitomycine C, mais celle-ci ne sont pas infectantes. Cette observation explique que les différentes souches *S. aureus* productrices de LPV restent stables pour ce caractère. Tenant compte de la biologie moléculaire des bactériophages, on peut s'interroger sur l'origine du locus codant la LPV.

S. aureus est l'une des bactéries les mieux adaptées à l'écosystème humain et aurait pu, par le biais d'une sélection de gènes exogènes, sélectionner des facteurs biochimiques lui permettant de dévier la réponse cellulaire anti-infectieuse, au profit de sa survie et de sa multiplication.

Après la mise en évidence de l'entrée de calcium (Finck-Barbançon et al., 1993), un ion divalent, et d'éthidium (Meunier et al., 1995), un ion plus volumineux, faisant suite à l'action de la LPV, les travaux de **Staali et coll** (Staali et al., 1998) ont montré l'indépendance des deux phénomènes en réalisant les conditions physiologiques permettant le blocage sélectif de chacun des flux.

En fonction de ces différents résultats, il devrait être théoriquement possible de modifier les leucotoxines de telle façon à ce que des pores non fonctionnels puissent s'édifier dans les membranes des cellule - cibles, tout en conservant une activation cellulaire intacte.

Nous avons alors tenté deux approches par le biais de la mutagenèse dirigée :

- l'une consistant à modifier la structure interne du pore

- l'autre en générant des délétions dans le " Stem" , afin que celui - ci soit moins ouvert sur l'espace cellulaire interne.

II. ARTICLE N°3

Discoupling the Ca²⁺-activation from the pore-forming function in human PMNs of the bi-component Panton-Valentine leucocidin

L. Baba Moussa^{1,2}, S. Werner¹, D.A. Colin¹, D. Keller¹, R. Girardot¹, A. Sanni², H. Monteil¹, G. Prévost¹

Running-title: Discoupling the functions of the Panton-Valentine leucocidin

1. UPRES EA-1318. Institut de Bactériologie de la Faculté de Médecine (Université Louis Pasteur-Hôpitaux Universitaires de Strasbourg), 3 rue Koeberlé
F- 67000 Strasbourg. Tel: (33) 3 88 21 19 70. FAX: (33) 3 88 25 11 13.

2. Département de Biochimie et de Biologie Cellulaire. Fa.S.T. Université Nationale du Bénin. 04 BP 0320 Cotonou. Bénin. Tel/Fax: 00 229 30 10 24

*corresponding author. e-mail: gilles.prevost@medecine.u-strasbg.fr

Soumis à FEBS Letters, 1999.

Abstract The consecutive cell-activation, including Ca^{2+} -channels opening, and pore-formation leading to human neutrophils lysis were the two functions of the Panton-Valentine leucocidin attempted to be decoupled by site-directed mutagenesis. Of the two approaches, the first one consisting in deletions of the cytoplasmic extremity of the transmembranous domain produced a LukF-PV $\Delta\text{Ser125-Leu128}$ with a slightly reduced Ca^{2+} -induction, but with a dramatically lowered lytic activity. The second one consisting in the modification of charges and/or steric clutter inside the lumen of the pore led to interesting mutated proteins: LukF-PV G131D, G131W, G130D. The latter had an intact Ca^{2+} -induction property while the lytic ability remained 20-fold diminished. Binding properties, intrinsic pore diameters remained comparable to the wild-type protein. Because the mutated proteins were still able to promote interleukine-8 secretion, but were rather inactive in experimental models, new insights are brought concerning the role of the two functions in the virulence of this bi-component leucotoxin.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Panton-Valentine leucocidin, decoupling, Ca^{2+} /ethidium penetration, stem domain, virulence.

1. Introduction

Staphylococcal bi-component leucotoxins constitute a family [16] of pore-forming toxins acting by the sequential interactions with target membranes of two distinct classes of proteins: S proteins (31-32,5 kDa) and F proteins (34 - 35.5 kDa). The first described of these toxins [15, 23], the Pantone-Valentine leucocidin (PVL) is known to be specific of rabbit and human polymorphonuclear cells (PMNs), generating *in vitro* [7] an inflammatory response involving chemotactic and vasodilating factors. The production of PVL by *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) strains was associated with necrotizing pyodermites such as furuncles [2]. Injections of PVL induced dermonecrosis or high inflammatory reactions in eyes of rabbit experimental models [3, 17]. LukS-PV, one of the two PVL-components binds first to membranes, then allowing the binding of the second component LukF-PV, and consecutive biological effects [1, 10]. Early effects were recently distinguished as an activation process triggering Ca^{2+} metabolism prior to the pore-forming activity and sensitising cells to some monovalent cations [19]. Indeed, Ca^{2+} entry (1 mM out the cells) was blocked by the use of drugs such as econazole, D600, adenosine that did not affect ethidium entry and Na^+/K^+ exchanges. Conversely, monovalent cations fluxes were inhibited in the presence of 0.1 mM Ca^{2+} + 0.2 mM Zn^{2+} though divalent cations penetration remained detected.

In fact, bi-component leucotoxins belong to pore-forming toxins with β -sheet rich structures, where binding, oligomerization, prepore formation and insertion into the membranes are generally admitted as essential steps before the pores become functional [4, 9]. The three-dimensional structures of the water-soluble LukF-PV [14] and HlgB [13], the two class F components composing PVL and the gamma-hemolysin appeared recently at high resolution. While LukF-PV and HlgB are 70% identical in sequence, the 3-D structures of these monomers were very similar and comprised three distinct domains: i) a β -sandwich of two six antiparallel β -sheets which is mostly representative of the cap structure described for the structure of the alpha-toxin [18], ii) a central domain of three small β -sheets, iii) a third domain of four β -sheets, two α -helixes and several turns mimicking the rim domain of the alpha-toxin heptamer. From the comparison with the 3-D structures of the lipostable heptameric form of the alpha-toxin, the extended stem which finally constitutes the transmembrane β -barrel after oligomerization appeared to be condensed as 3 central strands β -sheets in the water-soluble form

and covered a hydrophobic interface endowed with the rest of the molecule. As the stem is constituting the major part of the pore, it may represent a target of choice for the decoupling of cell activation from pore-formation of bi-component leucotoxins, in order to prove that they are two distinct functions of the staphylococcal bi-component leucotoxins and to begin the assessment of their respective roles in the associated virulence.

2. Materials and Methods

2.1. Bacterial strains and vectors.

E. coli XL1 Blue cells [*recA1 endA1 gyrA96 thi1 hsdR17 supE44 relA1 lac* (F' *proAB lacI^f ZΔM15 Tn10 (tet^r)*)] were used as recipient cells after site-directed mutagenesis of recombinant plasmids (Stratagene, Montigny le Bretonneux-France). *E. coli* BL21 [F-, *ompT, hsdS* (*rB*⁻, *mB*⁻), *gal* (52, 53)] was used for the overexpression of Glutathione-S-transferase (GST)-fused leucotoxins after being electroporated as recommended (Pharmacia, Uppsala-Sweden). pGEX 6P-1[®] (Pharmacia) was the expression vector for leucotoxins and their mutants.

2.2. Cloning and expression of LukF-PV in *E. coli*.

Proteins were expressed in *E. coli* through the GST Gene Fusion System[®] (Pharmacia). Briefly, DNA fragments corresponding to secreted proteins and containing the putative 3' inverted repeats were amplified via dedicated oligonucleotides containing *EcoR1* restriction sequences at their 5'-end. After a further *EcoR1* restriction, the amplified DNA fragments were ligated with the *EcoR1*-dephosphorylated pGEX-6P-1. The right oriented recombinant plasmids were used as templates of any of the mutations discussed in this work. Site-directed mutagenesis was achieved by using the Quick Change[®] Mutagenesis kit (Stratagene). Briefly, reactions were performed in the presence of 5 ng of template (5.8 kb), 0.25 mM dNTP, 0.4 nM of each oligonucleotide and 5 U of *Pfu* Turbo[®] DNA polymerase in 50 μl. Temperatures of hybridization, elongation, denaturation were 50°C, 68°C, 95°C during 30 s, 3 min 30 s, 1 min, respectively. Initial templates were eliminated with a 80 min *DpnI*-restriction, and 80 μl of XL1 Blue Supercompetent[®] cells (Stratagene) were then transformed as recommended with 2.5 μl of the mixture. Mutated genes were sequenced [20] from Qiagen (Paris, France) plasmid preparations and positive plasmids were electroporated at 1.8 kV, 200 Ohms, 25 μF in 80 μl of *E. coli* BL 21 previously stored at 5.0 A_{600nm} units in 0.1 mM Hepes, pH 7.0. Electroporated cells were regenerated in SOC medium (1% (wt/vol) Tryptone, 0.5% (wt/vol) Yeast Extract, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucose, pH 7.0) for 1 h at 37°C. Transformed bacteria were treated and plated as recommended (GST Gene Fusion System[®], Pharmacia).

2.3. Purification of *E. coli* recombinant leucotoxin components.

Recombinant *E. coli* BL 21 mutated clones were inoculated from a starter into 2 x 400 ml of 2 x TY filled in two-liter Erlenmeyer flasks, and cultivated for 6 hours before overnight induction of the GST fused protein with 0.2 mM IPTG. Bacteria were harvested by centrifugation and were concentrated as a 30% (wt/vol) suspension into 30 mM NaPhosphate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.0. Then, bacteria were cheared at 9000 pSi with a French Press (SLM Instruments-Bioritech, Joinville ³/Juine-France). Cell debris were discarded by a 30 min centrifugation at 30,000 x g at 6°C and GST activity was measured at 340 nm as recommended. A volume of lysate equivalent to 4 mg of titrated-GST was applied on a Glutathione Sepharose 4B[®] (Pharmacia) column equilibrated with 60 mM Tris-HCl, pH 8.0. The fusion protein was eluted in the same buffer containing 30 mM glutathion, and further digested overnight by 5 U of PreScission[®] protease (Pharmacia) per mg of mutated proteins. The leucotoxin components were purified through a 1.35 M to 0.45 M (NH₄)₂SO₄ gradient applied on an AlkylSuperose[®] Fast Performance Liquid Chromatography (Pharmacia), which eluted at 0.75 M (NH₄)₂SO₄. The pre-purified F components were dialysed against 30 mM MES, pH 6.3 and purified to homogeneity by a MonoS[®] FPLC through a 0 to 150 mM NaCl gradient, with elution around 90 mM NaCl. Purified proteins were controlled by SDS-PAGE and radial gel immunoprecipitation and stored at OD_{280 nm} = 1.0 at -80°C.

2.4. Labelled proteins

LukF-PV Ser27Cys, a functional cystein mutated protein was labelled with fluorescein 5-maleimide (Molecular Probes, Lerden - The Netherlands) at a 5-fold excess for a 10 µM protein solution for 30 min at room temperature in 50 mM NaPhosphate, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA Na₂, pH 7.0. The coupling reaction was stopped by the addition of 10 mM β-mercaptoethanol. The mixture was then desalted and the coupling yield was determined by the ratio of the determined concentration of fluorescein ($\epsilon_{490\text{nm}} = 81,900 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$) and that of the protein determined by the Bradford titration (Biorad, Ivry ³/Seine-France).

LukF-PV Gly130Cys and LukF-PV Gly131Cys, at 40 µM in 0.2 M NaPhosphate, 1 mM β-mercaptoethanol pH 8.0 were labelled with 15 mM AMSD [4 acetamido-4' maleimidyl stilbene 2,2' disulfonic acid, disodium salt dissolved at 0.1 M in H₂O, $\epsilon_{320\text{nm}} = 29,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Molecular Probes)] in dark at room temperature for 30 min. Reaction was stopped by adding 30 mM β-mercaptoethanol for 30 min in dark. Proteins solutions (Gly130Cys*, and Gly131Cys*) were then centrifuged for 10 min at 8,000 x g at 4°C, and peptides purified onto a FPLC MonoS[®] chromatography using a NaCl gradient ranging from 0 to 700 mM NaCl in 50 mM NaH₂PO₄ pH 7.0, stored in dark at 4°C at OD_{280nm} = 1.0.

2.5. Preparation of human polymorphonuclear cells (PMNs)

Twelve ml of J-Prep solution (TechGen) were added to 30 ml of buffy coats from healthy donors diluted with 10 ml of 0.9% (wt/vol) NaCl, and centrifuged for 20 min at 800 x g at

room temperature. The cell pellet was suspended within 40 ml of 0.9% (wt/vol) NaCl, 1.5% (wt/vol) Dextran and left to sedimentation for 30 min. The supernatant was gently removed and then, centrifuged at room temperature at 800 x g for 10 min. The new supernatant was discarded and the erythrocytes contaminating the PMNs contained in the pellet were resuspended and lysed into 18 ml of apyrogenic water for 45 s, before the suspension being complemented with 2 ml of 9% (wt/vol) NaCl. After two washing steps in 50 ml of 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM glucose, 0.1 mM ethylene glycol-bis (beta-aminoethyl ether) N, N, N', N'-tetraacetic acid, 10 mM Hepes, 3 mM Tris-base (pH 7.3), the cells were suspended and adjusted to 2×10^6 cells/ml in the same buffer. The latter buffer was used to wash the cells treated with the Ca^{2+} -specific fluorescent probe Fluo-4 (Molecular Probes, Eugene, Oregon).

2.6. Flow cytometry measurements

Experiments were made with 5×10^5 cells/ml loaded in 5 μM Fluo-4 solution during 1h at 37°C, then washed and resuspended in the presence of 1.1 mM Ca^{2+} for the evaluation of the Ca^{2+} entry. Each component constituting the leucotoxins was generally added at 1 nM. Flow cytometry measurements were performed by using a FacSort[®] cytometer (Becton-Dickinson, Le Pont de Claix, France) equipped with a 15 mW argon laser tuned at 488 nm. Forward (FSC) and Side (SSC) light scatter dot plots acquired from 3,000 purified leucocytes were classically gated [10, 11]. Fluo-4 fluorescence due to the calcium penetration was recorded from the fluorescence light 1 (FL1: $\lambda_{\text{Em}} = 530$ nm), every 30 s during 45 min. After basic fluorescence subtraction, results were compared to the maximum fluorescence obtained with controls which indicated the potentiality of the different pairs of leucotoxins for the opening of Ca^{2+} channels. The fluorescence light 3 (FL3: $\lambda_{\text{Em}} = 650$ nm) was used to record the fluorescence of ethidium applied at 25 nM together with the leucotoxins. This fluorescence increased when the molecule entered the cells by the pores formed through the plasma membrane and combined with nucleic acids. Means from four series of data, at least, obtained from PMNs of four different donors were calculated by Lysis 2TM software (Becton - Dickinson, France) and results were expressed as mean percentages of maximum fluorescences of controls. Standard deviations were not shown for clarity of the Figures, but did not vary more than $\pm 6\%$.

By using a full functional fluorescein-labelled LukF-PV Ser27Cys, the binding abilities of LukF-PV and inactive mutants combined with 3 nM LukS-PV were determined by competition experiments in the absence of extracellular calcium using a fixed concentration of 20 nM of the labelled LukF-PV Ser27Cys, and variable concentrations of 1, 5, 10, 20, 50, 100, 200 nM of the mutated proteins. The residual fluorescences at the cell surface were gated during 50 min after the application of the protein couples LukS-PV + X, in order to minimize the influence of lysed cells in the data. Apparent inhibition constants ($K_{\text{I,app}}$) were deduced by projection to abscisses of the 50% means fluorescence values (IC50), with the following equation:

$$K_{\text{I,app}} = \text{IC50} / (1 + [\text{F}]/K_{\text{d,F}})$$

where [F] is the concentration of the fluorescent LukF-PV Ser27Cys and $Kd_F = 3 \text{ nM}$ (D.A. Colin, personal communication).

The pore diameters created by leucotoxins were assessed by an evaluation of the FSC of treated cells (5×10^5 cells/ml) with 1 nM of LukS-PV and 40 nM of F component and 30 mM of Polyethylene glycol (PEG) beads of different radius (0.94, 1.2, 1.22 and 1.44 nm). FSC values were collected at 0, 10, 20, and 30 min after toxin application.

2.7. IL-8 titration

Equimolar amounts (1 nM or 5 nM) of PVL or LukS-PV/LukF-PV G130D, or LukS-PV/LukF-PV Δ Ser125-Leu128 were applied for 20 min at room temperature to 0.5 ml of the buffer cited in § 2.5, 1.1 mM CaCl_2 containing 5×10^5 cells/ml. After treatment, washed cells corresponding to half-volume of the assays was treated for lysis by 0.2% (v/v) Triton X-100 (Boehringer). Cells or cell debris were immediately pelleted at 4°C and 50 μl of the supernatant were submitted to IL-8 titration. IL-8 from secretion fluids or cell lysates was titrated with an ELISA kit used as recommended by the Manufacturer (Endogen-Interchim, Montluçon France).

2.8. Activity of modified LukF-PV in rabbit skin and eye models

Shaved rabbits of at least 2.5 kg were injected intradermally with 50 μl of sterile 9.55% (wt/vol) PBS Dulbecco solution with equal amounts (300, 1,000, 3,000, 10,000 ng) of LukS-PV and native or mutated LukF-PV. Macroscopic clinical observations were recorded at 24, and 48h after injection of toxins. Five reaction levels [6] which reflected the intensity of the inflammatory reaction with clear-cut differences were attributed according to the inflammatory response: level 0 was the normal skin, level 1 showed a red inflammatory reaction ($\varnothing = 10\text{-}15$ mm) without abscess formation, level 2 showed a hot, red papule with relief ($\varnothing = 15\text{-}20$ mm, 5 mm high), level 3 showed a more intense abscess ($\varnothing = 20\text{-}30$ mm, 10 mm high) becoming blue and oedematous, level 4 still progressed in intensity ($\varnothing \geq 30$ mm, 10-15 mm high) with white pus collection surrounded by blue oedema, level 5 showed a lesion in progress with a central depression and pus sweating.

The injection procedure into the rabbit vitreous humor was in accordance with the ARVO Resolution on the use of animals in research were followed. The permission (n° 04683) to experiment on animals was given by French Ministry of Forests and Agriculture. Rabbits weighing 2.0 to 2.5 kg were all injected in the right eye after anesthesia by intramuscular injection of 300 μl of Zoletil®-100 (Reading Laboratories, London). Rabbit eyes were then instilled with 0.3% (wt/vol) atropine sulphate (Alcon Laboratories, Courbevoie, France), and 2

min later with oxybuprocain hydrochloride (Chauvin Laboratories, Montpellier, France). Injections of 50 μl of products were made through the *pars plana* into the vitreous with a 25-gauge needle without touching the crystallin lens and the retina.

Eyes were submitted to clinical observations 24 h and 48 h after injection. Clinical modifications of the posterior chamber were assessed by using a direct ophthalmoscope (Heine)

according to the criteria of Nussenblatt *et al.* [12] identifying five increasing levels of severity: 0) normal situation without vitreous haze, 1) vitreous haze allowing observation of the optic nerve as well as retinal vessels, 2) vitreous haze still allowing observation of vessels and optic nerve, but with difficulty, 3) vitreous haze allowing the observation of the optic nerve only, its boundaries being blurred, 4) vitreous haze not allowing the observation of the optic nerve. If any, conjunctival hyperhemia, haze of the anterior chamber, chemosis, loss of iris details, blepharitis and oedema were noticed.

3. Results

3.1. Ca^{2+} and ethidium entries induced by the mutated proteins

In order to decouple the two functions of the bi-component leucotoxins, two approaches were explored. The first one consists in the steric or chemical modification of the lumen of the pore by introduction of charges or molecular labels that may avoid the ethidium permeation, but not early cell activation and Ca^{2+} channels opening. A series of substitutions by different residues were generated at two glycine positions: Gly130Asp, Gly130Cys, Gly130Lys, Gly130Trp, Gly131Asp, Gly131Cys, Gly131Trp. The two cysteine mutants were further labelled with AMSD, a 19 Å compound with quite a rigid structure. The second approach was to reduce the length of the stem by the deletion of the polar residues between the 2 β -sheets of the stem, rendering its structure partially transmembranous. In such a configuration, the hydrophobic interactions of one component, at least, might favour the partial obturation of the cytoplasmic extremity of the pore by phospholipids. Three deletions were engineered in LukF-PV which spanned the extremity of the stem: Δ Leu128-Ser135, Δ Ile124-Ser129, Δ Ser125-Leu128.

Fig. 1 shows the biological activities on human PMNs of all the mutated proteins combined with the native LukS-PV used at 1 nM. Results concerning the entry of Ca^{2+} and ethidium have been distributed on two-three panels for clarity. No aberrant variation of the biological activity of a given mutated protein compared to the control was observed in the assays. Amongst the

modified proteins tested, several of them beared a reduced ability to promote Ca^{2+} -channels opening. Figure 1A shows that LukF-PV Δ Leu128-Ser135, Δ Ile124-Ser129 did not beared any activity, as well as when they were 10-fold concentrated (data not shown). LukF-PV Δ Ser125-

Leu128 at 1 nM (Fig. 1A) had a reduced Ca^{2+} -activation comprised between data obtained with LukF-PV 1 nM and 0.1 nM. When concentrated up to 10 nM, the induced Ca^{2+} -entry into the PMNs was comprised between data obtained for LukF-PV 1 and 10 nM. Therefore, LukF-PV ΔSer125 -Leu128 was assumed to be from than 5 to 10-fold less active than the native LukF-PV. LukF-PV Gly130Cys* and Gly131Cys* (Fig. 1C) induced a dramatically lowered Ca^{2+} induction. When the two latter were 10-fold concentrated, this activation was restored to a level a bit lower than for LukF-PV 1 nM. These mutated proteins were assumed to be less than ten-fold less active than the native PVL. Figure 1B shows that Ca^{2+} -activation potentials of LukF-PV Gly130Cys, Gly130Asp, Gly130Lys, Gly130Trp, Gly131Cys, Gly131Asp, and Gly131Trp were similar to the native LukF-PV.

At the opposite, when LukF-PV Gly130Asp, Gly131Trp, Gly131Asp were examined for their ability to form pores and to facilitate the ethidium permeation (Fig. 1E), they showed interesting because with a dramatic loss of this pore-forming activity. Indeed, Gly131Asp and Gly131Trp used at 1 nM induced the entry of ethidium at a level corresponding to that of LukF-PV at 0.1 nM, and less for Gly130Asp. When these proteins were used at 10 nM, a slight additive entry of ethidium was noticed (not shown) as it was observed for LukF-PV ΔSer125 -Leu128 1 nM or 10 nM too (Fig. 1D). The latter protein when used at 1 nM induced no more active pores than the native protein at 0.1 nM. When used at 10 nM, the ethidium entry did not increase of 10-fold and remained comparable to LukF-PV 0.1 nM. Therefore, in these cases concentration of the proteins did not influence the residual pore-forming activity of the modified LukF-PV/PVL. The other deletions studied generated non lytic leucotoxins. The pore-forming abilities of Gly130Cys* and Gly131Cys* were significantly decreased to less than that of the native LukF-PV at 0.05 nM (Fig. 1F). Concentration at 10 nM of these proteins increased the permeation of the cell membranes to ethidium, to values similar to the native LukF-PV 0,1 nM. Considering the other mutated proteins, LukF-PV Gly130Cys had a strictly comparable efficacy to form pores whereas Gly131Cys, Gly130Lys and Gly130Trp mutants beared graduated efficacies comprised between that of the native LukF-PV 1 nM and 0.1 nM.

Therefore, of the different mutated LukF-PV, some have both Ca^{2+} -activation and pore-formation diminished or abolished and four others, Gly130Asp, Gly131Asp, Gly131Trp, and ΔSer125 -Leu128 showed decreased pore-forming abilities, whereas Ca^{2+} -penetration remained

unchanged or diminished a little. These tendencies were also verified with the lag-times observed before the beginning of the entry of the tested molecules. These times extended from 12 min for the entry of ethidium with the native PVL to 38 min, 33, and 52 min for Δ Ser125-Leu128, Gly131Asp, and Gly130Asp mutants, respectively. Refinement of mean curves for Ca^{2+} -activation defined lag-times of approximately 90 s for LukF-PV and Gly130Asp, Gly131Asp, Gly131Trp mutants, whereas it was around 130 s for Δ Ser125-Leu128, combined with LukS-PV.

3.2. Binding of the mutated Luk-PV proteins

As shown in Fig. 2A for competition experiments, the different $K_{i,app}$ varied according to the proteins compared to the values obtained for both LukF-PV, LukF-PV Ser27Cys (3.2 nM and 2 nM, respectively). Values of 1.17, 13, 14.3, 6.2 and > 70 nM were obtained for LukF-PV Δ Ser125-Leu128, Gly131Cys*, Gly130Cys*, Δ Ile124-Ser129, Δ Leu128-Ser135, whereas the $K_{i,app}$ of the Gly130Asp mutant (3.9 nM) was similar to LukF-PV, as were those of Gly131Asp and Gly131Trp mutants (2.8, 3.4 nM, respectively).

3.3. Pore diameters created by modified leucotoxins

The intrinsic diameter of pores formed by LukS-PV combined with LukF-PV Δ Ser125-Leu128, Δ Leu128-Ser135, Δ Ile124-Ser129, LukF-PV Gly130Cys*, LukF-PV Gly131Cys*, LukF-PV Gly130Asp, Gly131Asp, and Gly131Trp, respectively was assessed by revealing in flow cytometry the modification of cell granularity consecutive to the application of calibrated polyethylene glycol beads. In fact, every one of the couples tested formed pores excluded PEG beads of a radius greater than 1.22 nm as it is shown for PVL, LukS-PV + LukF-PV Δ Ser125-Leu128 (Fig. 2B) or for LukS-PV + LukF-PV Gly130Cys* or + Gly131Asp (Fig. 2C), or LukF-PV Gly131Cys* (data not shown). However, it appeared that cell disorders (FSC) were not obtained as rapidly as for the PVL for the couple composed of LukF-PV Gly130Asp (Fig. 2C) or were insignificant, especially for LukF-PV Δ Leu128-Ser135, Δ Ile124-Ser129 (Fig. 2B), at any of the three times considered following toxin applications.

3.4. IL-8 secretion induced by modified leucotoxins

Titration from human PMNs treated by leucotoxins evidenced secretion of IL-8 (Fig. 3). While PVL 1 nM did not induce a significant secretion (32 pg/ml) of IL-8, whereas at a dose of 5 nM, a significant secretion was provoked (150 pg/ml). When lysed, the treated cells released greater amounts of IL-8 (300-350 pg/ml), but the sum of secreted and cellular IL-8 corresponded to that titrated in the lysed control cells. Finally, both the two modified leucotoxins tested LukS-PV + LukF-PV Gly130Asp or + LukF-PV Δ Ser125-Leu128 induced significant IL-8 secretion (up to 140 pg/ml) even when used at 1 nM. In the two latter cases, sums of secreted and cellular IL-8 were near that of lysed control cells.

3.5. Inflammatory reaction promoted by modified leucotoxins

In order to determine whether host inflammatory reaction can be attributed to the activation function, the potencies of LukS-PV + LukF-PV Δ Ser125-Leu128 or Gly130Asp, or Gly131Asp or Gly131Trp were compared to that of PVL in two sensitive experimental models. When injected in the rabbit skin, dermonecrosis with pus collection (level 4) was clearly induced with 2000 ng of PVL (1000 ng of each component) within 48 h, whereas comparable lesions were almost obtained with 20,000 ng of LukS-PV + LukF-PV Δ Ser125-Leu128 and Gly130Asp (Fig. 4C). Therefore, it appeared that the mutated protein was 10-fold at least, less active than the native toxin. Similar levels of dermonecrosis were obtained with 6,000 ng of LukS-PV + G131D or G131W, which placed them in an intermediate value.

In the rabbit eye, differences between the respective activities were more acute. As previously reported [17], the injection of 600 ng of PVL into the vitreous humor generated a strong inflammatory reaction characterized by a haze in the posterior chamber that did not allowed the observation of the optical nerve, the loss of iris details, haze in the anterior chamber, conjunctival hyperhemia, blepharitis and ocular secretion (Fig. 4B). At the opposite, the injection of 20,000 ng of LukS-PV + LukF-PV Δ Ser125-Leu128, or LukF-PV Gly130Asp did not induce a significant haze in the anterior chamber, and only a slight conjunctival hyperhemia was observed that might be provoked in part by the injection itself (Fig. 4A). In this model, the two mutated toxins were 30-fold, at least, less potent than the native PVL, whereas

LukF-PV Gly131Asp and Gly131Trp were able to induce a significant inflammatory reaction in the rabbit eye at a dose of 6,000 ng of the combined proteins with posterior chamber criteria of 3 associated to a pronounced conjunctiva (3/4 of the eyeball) both at 24 and 48 h after the injection of toxins (data not shown).

4. Discussion

In this study, evidences were given that both the approaches attempted for the decoupling of the Ca^{2+} -induction and the pore-formation by the staphylococcal bi-component leucotoxins is feasible. As the goal was to reduce or to get down the pore-formation, mutagenesis concerned the stem domain [13] of LukF-PV, one of the two proteins constituting the PVL. Residues Gly130 and Gly131 were substituted by several different amino acids: Cys, Trp, Asp, Lys. These glycine residues can be aligned [5, 18] with Gly134 and Leu135 of the α -toxin, which are located in the outer and the inner leaflet of the heptameric pore, respectively [21, 22]. Three deletions of the bottom of the stem were also tested, one of them LukF-PV Δ Ser125-Leu128, consisting essentially in a reduction the length of the stem. Amongst these mutated proteins, Cys-, Lys- and Gly130Trp substitutions led to proteins similarly active as the PVL. The two deleted proteins Δ Leu127-Ser134, Δ Ile124-Ile131, being completely inactive were not equivalent, since the latter remained able to bind though with a lesser affinity, to the same sites as the wild type protein, but unable to form a pore. When the Cys-mutants were conjugated to AMSD, their biological activity was reduced and their binding properties were reduced too (Fig. 3A). However, despite the steric cluttering probably due to the label, PEG beads of 1.2 nm, as for the PVL, still penetrate through the pores formed by modified leucotoxins. These highly solvated, but neutral molecules may only reflect the intrinsic diameter of pores without influence of charged residues present inside the lumen of the pore. In the case of AMSD-labelled proteins, polar extremities of the label may be oriented inside the cells, therefore, reducing the true clutter.

The cases of LukF-PV G130D, G131D, G131W, and Δ Ser125-Leu128 were very interesting, since their potentiality to promote Ca^{2+} -entry in human PMNs was similar to the wild type protein, whereas their ability to form pores was considerably reduced, especially for G130D and Δ Ser125-Leu128 with a lag-time for the ethidium-entry of 52 and 38 min compared to

12 min for LukF-PV (Fig. 1). The latter proteins bound LukS-PV-membrane complexes as efficiently as LukF-PV (Fig. 3A). Pore-formation remained permeable to PEG beads in a comparable manner as for PVL (Fig. 2B, 2C). IL-8 secretion induced by LukS-PV + LukF-PV Gly130Asp was similar to that induced by the PVL, except at the concentration of 1 nM where PVL seemed inefficient to promote IL-8 secretion. With a KI_{app} LukF-PV = 3 nM, it is possible that this discrepancy may be explained by a conjugated phenomenon of the absence of a complete saturation of the specific sites of LukF-PV and the simultaneous development of pores that may destroy cell metabolism, blocking IL-8 fluxes before achieving cell lysis. The latter event would not undergo so rapidly with LukF-PV Gly130Asp or Δ Ser125-Leu128 which bore a reduced lysing activity. At 5 nM concentrations the leucotoxins were more saturating their specific sites, but mutants did not enhance their lytic activity. However, after a 20-min period of treatment, PVL and modified leucotoxins were not promoting the neosynthesis of IL-8 by human PMNs, since sums of secreted and cellular IL-8 were comparable to the controls. These results were in accordance with those previously described [8]. However, when challenged on two previously documented [3, 6, 17] experimental models, the interesting mutated proteins, especially LukF-PV Gly130Asp and Δ Ser125-Leu128 mutants combined with LukS-PV became poor inflammation effectors. This suggests that pore-formation is an essential function for the virulence of PVL. One may hypothesize that as the two functions are delayed, the first one, *e.g.* cell-activation favors cell recruitment and non specific immunity, but cell lysis would amplify the latter, provide nutrients available for the bacterial multiplication and spreading, whereas cell debris may complicate the general immune response.

In conclusion, the feasibility of the decoupling of the two distinct functions of the PVL was demonstrated. The data obtained allow to make deeper the structural basis of the observations and to assess more precisely the respective roles in virulence of PVL of cell activation and pore-formation.

Acknowledgements

We thank A. Gravet for helpful discussion. This work was supported by grant EA-1318 from the “Direction de la Recherche et des Etudes Doctorales (DRED)“.

References

- [1] Colin, D.A., Mazurier, I., Sire, S. and Finck-Barbançon, V. (1994) *Infect. Immun.* 62, 3184-3188.
- [2] Couppié, P., Cribier, B., Prévost, G., Grosshans, E. and Piémont, Y. (1994) *Arch. Dermatol.* 130, 1208-1209.
- [3] Cribier, B., Prévost, G., Couppié, P., Finck, B., V., Grosshans, E. and Piémont, Y. (1992) *Dermatology* 185, 175-180.
- [4] Gouaux, J.E. (1997) *Curr. Opin Struct. Biol.* 7, 566-573.
- [5] Gouaux, J.E., Hobaugh, M. and Song, L. (1998) *Protein Science* 6, 2631-2635.
- [6] Gravet, A., Colin, D.A., Keller D., Girardot, R., Monteil, H., and Prévost, G. (1998) *FEBS Letters* 436, 202-208.
- [7] König, B., Köller, M., Prévost, G., Piémont, Y., Alouf, J.E., Schreiner, A. and König, W. (1994) *Infect. Immun.* 62, 4831-4837.
- [8] König, B., Prévost, G., Piémont, Y. and König, W. (1995) *J. Infect. Dis.* 171, 607-613.
- [9] Lesieur, C., Vecsey-Semjen, B., Abrami, L., Fivaz, M. and van der Goot, F.G. (1997) *Mol. Membrane Biol.* 14, 45-64.
- [10] Meunier, O., Falkenrodt, A., Monteil, H. and Colin, D.A. (1995) *Cytometry* 21, 241-247.
- [11] Meunier, O. et al. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* 1326, 275-286.
- [12] Nussenblatt, R.B., Palestine, A.G., Chan, C.C., Roberge, F. (1985) *Ophthalmology* 92, 467-471.
- [13] Olson, R., Nariya, H., Yokota, K., Kamio, Y., and Gouaux, E. (1999) *Nature. Struct. Biol.* 6, 134-140.
- [14] Pédelacq, J.D., Maveyraud, L., Prévost, G., et al. (1999) *Struct.* 7, 277-287.
- [15] Prévost, G., Cribier, B., Couppié, P., Petiau, P., Supersac, G., Finck-Barbançon, V., Monteil, H. and Piémont, Y. (1995) *Infect. Immun.* 63, 4121-4129.
- [16] G. Prévost (1999) The bi-component staphylococcal leucocidins and gamma-hemolysins (toxins). In "The Comprehensive Sourcebook of Bacterials Toxins, 2nd edition" Chapter 21. J.E. Alouf and J.H. Freer (eds), pp402-418. London: Academic Press.
- [17] Siqueira, J.A., Speeg-Schatz, C., Freitas, F.I.S., Sahel, J., Monteil, H. and Prévost, G. (1997) *J. Med. Microbiol.* 46, 486-494.
- [18] Song, L., Hobaugh, M.R., Shustak, C., Cheley, S., Bayley, H. and Gouaux, J.E. (1996) *Science* 274, 1859-1866.
- [19] Staali, L., Monteil, H. and Colin, D.A. (1998) *J. Memb. Biol.* 162, 209-216.

- [20] Tabor, S., and Richardson, C.C. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 4767-4771.
- [21] Valeva, A., Weisser, A., Walker, B. *et al.* (1996) *EMBO J.* 15, 1857-1864.
- [22] Ward, R.J., Palmer, S., Leonard, K. and Bhakdi, S. (1994) *Biochem.* 33, 7477-7484.
- [23] Woodin, A.M. (1960) *Biochem. J.* 75, 158-165.

LEGENDS OF FIGURES

Fig. 1: Evaluation by flow cytometry of the Ca^{2+} -penetration (Panels A, B, C) and the pore-forming abilities (Panels D, E, F) according to the time, on human PMNs of LukS-PV + LukF-PV or modified proteins indicated horizontally. Curves were calculated as means of 4 different experiments on different donors and expressed as percentages of maximums of fluorescence. Standard deviations (not shown for clarity) did not exceed $\pm 6\%$. Ca^{2+} entry (left) was recorded in the presence of extracellular 1.1 mM CaCl_2 from Fluo-4-charged cells. Pore-formation indicated after ethidium combination with nucleic acids was achieved in the absence of extracellular calcium. The decrease of Fluo-4 fluorescence was assumed as a natural loss of the probe and/or a loss due to cell lysis.

Fig.2. Binding competition experiments to LukS-PV-PmNs membranes complexes between the fluorescein-labelled LukF-PV Ser27Cys and LukF-PV (F), LukF-PV Ser27Cys (F S27C), LukF-PV Gly130Asp), LukF-PV Gly130Cys* (F G130C*), LukF-PV Δ Ser125-Leu128 (F Δ Ser125-Leu128), LukF-PV Δ Ile124-Ser129 (F Δ Ile124-Ser129), LukF-PV Δ Leu128-Ser135 (F Δ Leu128-Ser135), according to percentages of fluorescence intensities and concentration of F components. B and C. Probing the diameter of pores formed by modified leucotoxins with calibrated PEG molecules. Forward Side Scatter variations (FSC) were recorded at 10, 20 30 min following toxin application.

Fig. 3. IL-8 titration \pm SD from supernatants (S) or lysates (L) of human PMNs (5×10^5 cells/ml) from 4 different donors treated by 1 or 5 nM of both LukS-PV + LukF-PV or LukF-PV Gly130Asp, or LukF-PV Δ Ser125-Leu128 for 20 min at room temperature.

Fig. 4. Experimental challenge of PVL and LukS-PV + LukF-PV Gly130Asp in the rabbit vitreous humor and in the rabbit skin. A: 48 h after the injection of 20,000 ng of LukS-PV + LukF-PV Gly130Asp in the vitreous humor, only a slight inflammation of the conjunctiva is observed. B : 48 h after the injection of 600 ng of PVL in the vitreous humor, secretions, full conjunctivitis, inflammation of the iris and haze into the posterior chamber are noticed. C: Up: 48 h after the intradermally injection of 600, 2000, 6000, 20000 ng of the PVL (both the components); down: injections in the same conditions of LukS-PV + LukF-PV Gly130Asp.

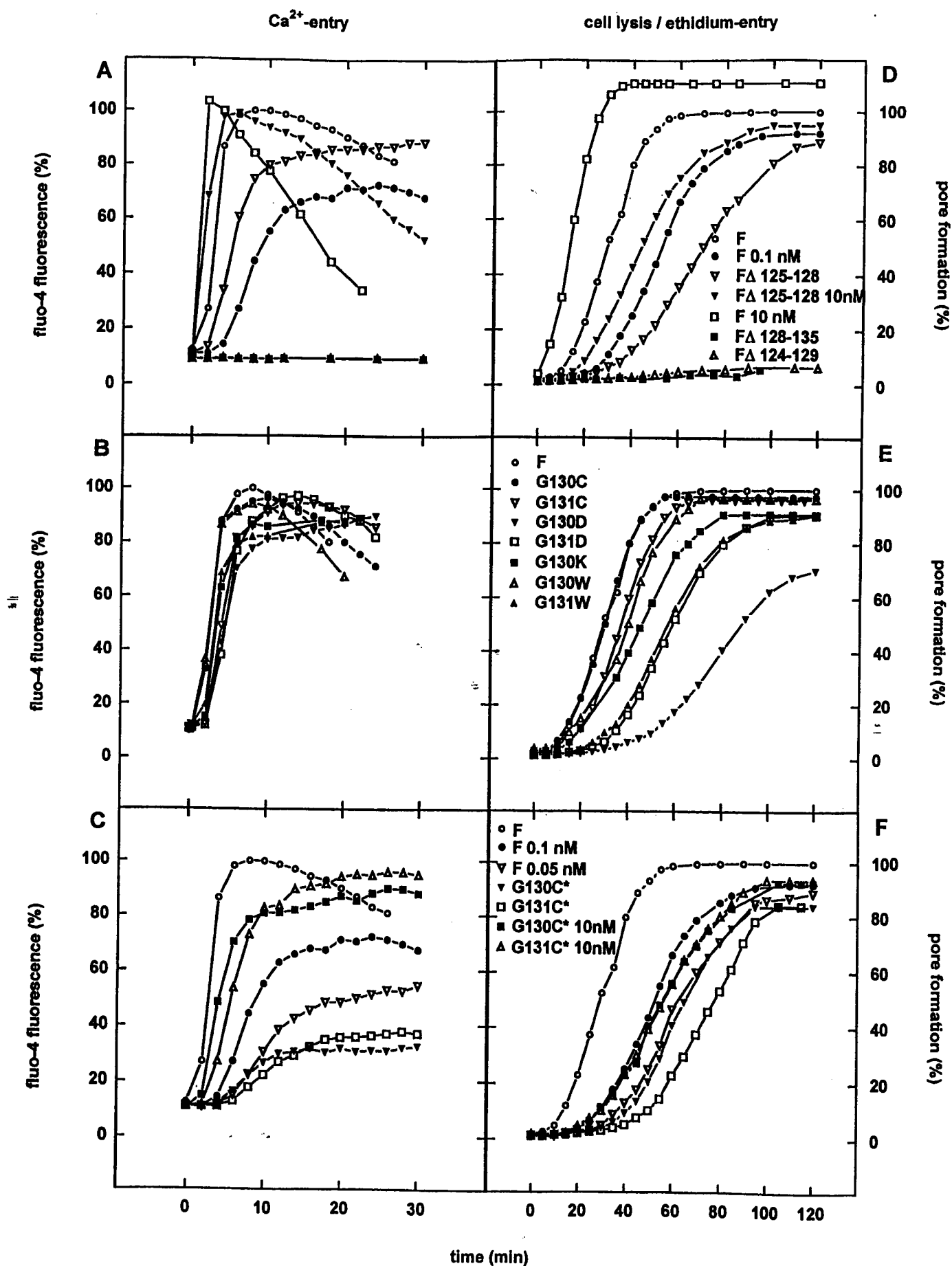


FIG 1

FIG 2

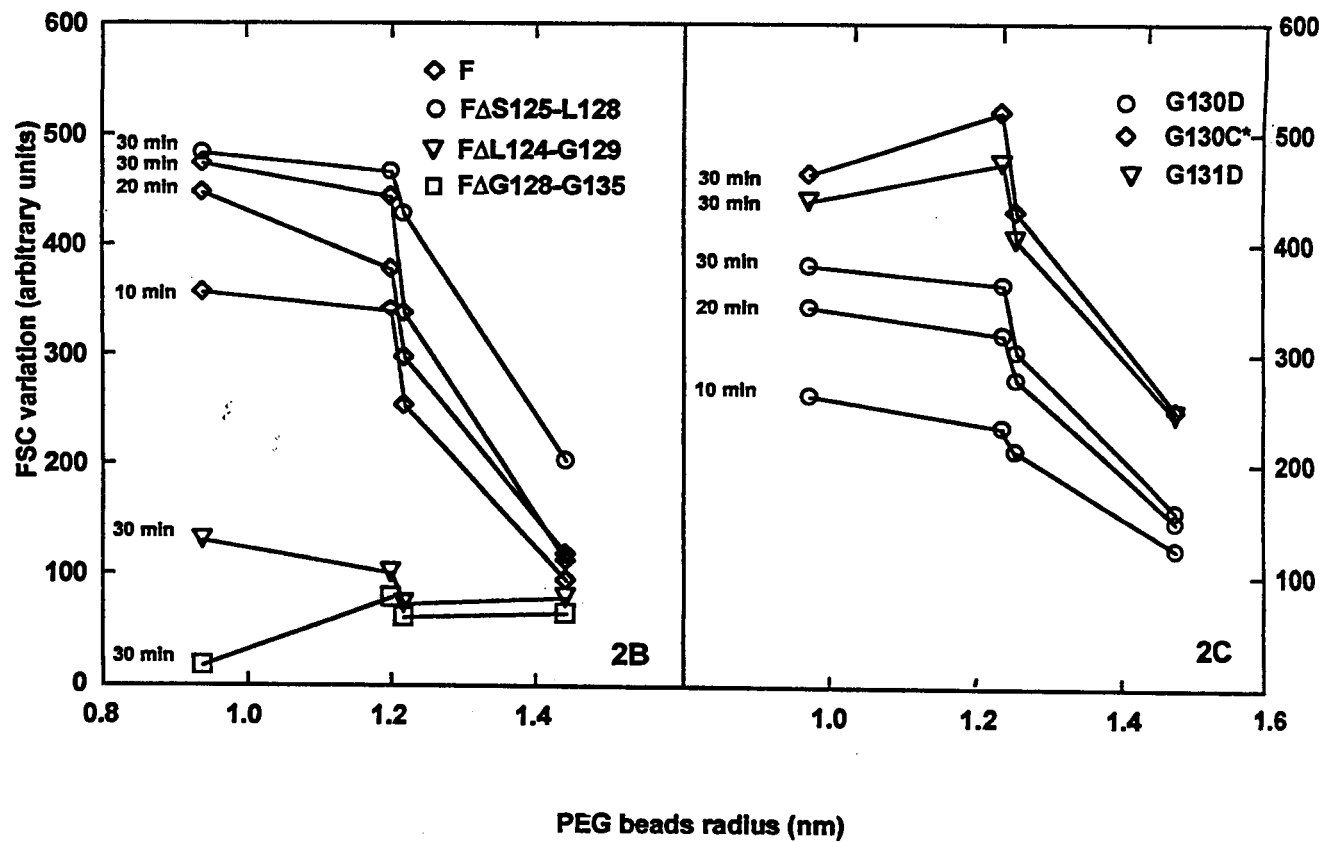
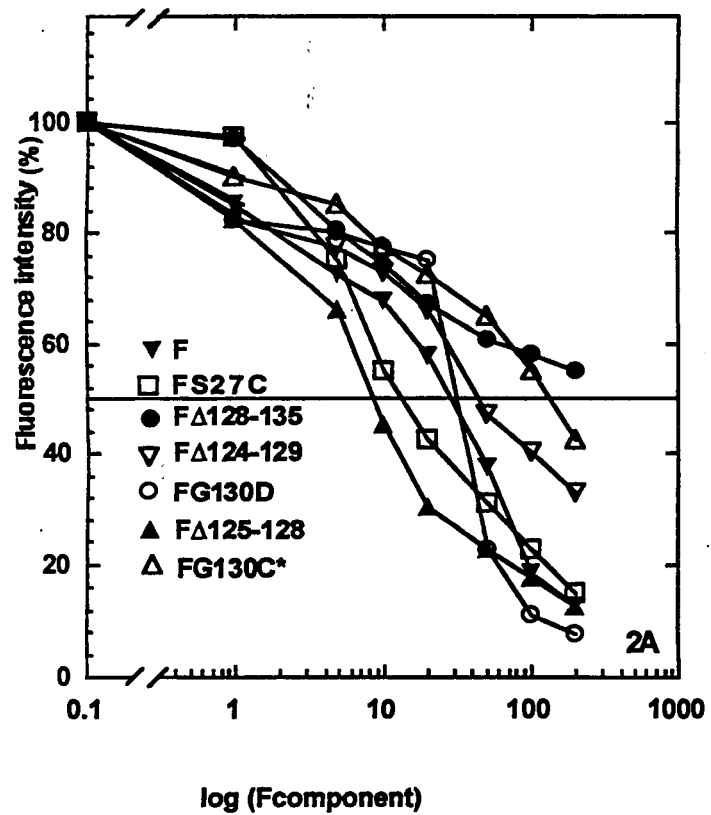


FIG 3

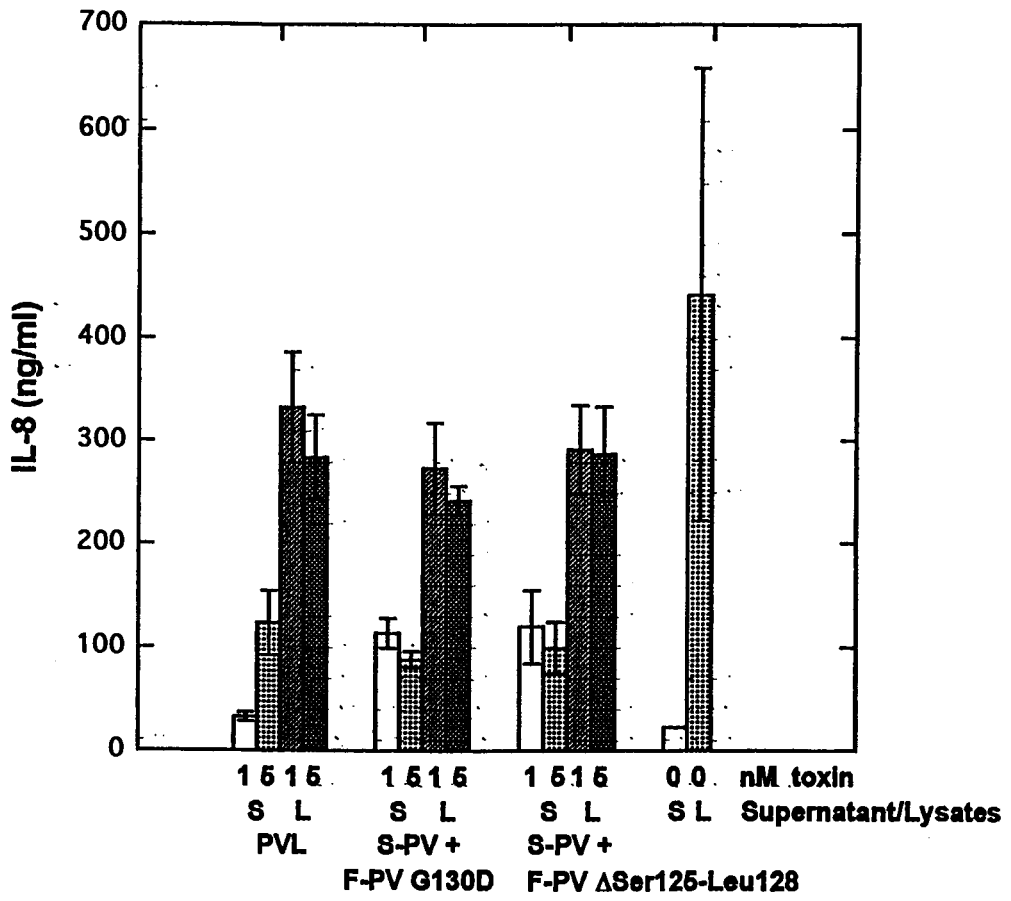


FIG 4

A



B



C



III. DISCUSSION

L'obtention de protéine LukF-PV mutées défectueuses dans leurs propriétés perméabilisantes montre :

- L'induction calcique dans les cellules et la formation des pores sont bien des évènements indépendants. Si le mutant Δ Ser125-Leu128 n'a plus la même potentialité que la protéine sauvage pour faire pénétrer le calcium, l'activité lytique est décalée par rapport à l'activité activatrice. De plus, lorsque la protéine est utilisée à une concentration 10 fois supérieure, l'induction calcique est restaurée, mais pas l'entrée de l'éthidium, ce qui renforce l'idée des pores formés mais incomplètement fonctionnels. Le phénomène observé est encore plus important pour LukF-PV Gly130Asp, alors que les mutants Gly1311Asp et Gly131Trp possèdent une activité perméabilisante seulement 10 fois diminuée. Cependant les pores formés par ces protéines mutées combinées à LukS-PV sont perméables aux "billes" de PEG d'un diamètre inférieur à 1,22 nm. Ceci peut refléter les limites de l'information fournie pour cette expérience : ces molécules sont très solvatées, mais neutres; cet état de solvation peut faciliter leur passage et peut être le forcer en ne reflétant finalement que le diamètre intrinsèque des pores indépendamment d'une chimie de coordination pouvant être induite par la présence de charges dans la lumière des pores. En outre, les constantes de fixation des protéines pré-citées ne semblent pas affectées. Ces modifications ne semblent donc pas influencer sur la reconnaissance du composé F avec le complexe composé S-membrane.

Les répercussions des mutations sur la structure tridimensionnelle des pores ne peuvent être énoncées avec certitude. En effet, la modélisation de l'hexamère (Pédelacq et al., 1999) formé par la LPV ne permet pas de modéliser les interactions monomère-monomère, et en sus les mutations générées. Cependant des hypothèses peuvent être avancées.

- Les mutants LukF-PV Δ Ileu124-Gly129 et LukF-PV Δ Gly128-Gly135 ont des propriétés de fixation amoindries. En fait, le détail des niveaux d'interaction entre monomères S/F n'est pas encore complètement précisé. Il est possible que les délétions influencent la structure générale de la protéine, mais la participation du domaine "Stem", en particulier la zone "triangle" au maintien de l'interaction entre monomère est une hypothèse qui n'a pas encore été validée.

- Pour les quatre mutants à l'activité perméabilisante réduite, deux approches ont été suivies; l'une consistant à modifier la structure de la paroi interne du pore, l'autre tentant d'enfermer l'extrémité du "Stem" dans la structure lipidique de la membrane (Δ Ser125-Leu128). L'introduction d'une charge négative supplémentaire ou d'un résidu Trp dans la lumière du pore ne suffit pas à perturber complètement l'entrée d'éthidium, et l'effet maximal est obtenu avec Gly130Asp où la glycine est normalement orientée vers la membrane.

L'introduction d'une charge négative (Asp) peut provoquer une modification structurale locale telle que le pore perd sa fonction vis à vis de l'éthidium.

Les leucotoxines dont l'activité formant des pores est diminuée de 10 à 50 fois présentent une activité pro-inflammatoire fortement amoindrie puisqu'elles sont très faiblement dermonécrotiques et faiblement inflammatoires lorsqu'elles sont injectées dans l'humeur vitrée du lapin. Cependant, elles induisent la sécrétion d'IL-8 à un niveau comparable à la LPV, alors que celle-ci ne représente qu'un tiers des stocks cellulaires immédiatement disponibles. Il semblerait donc que cette sécrétion d'interleukine-8 ne soit pas suffisante pour initier une inflammation notable. Si l'on admet que la LPV native est capable de lyser les cellules-cibles, les niveaux d'interleukine-8 libérés dans le milieu extérieur devraient donc être supérieurs. Alors que la formation des pores et surtout la lyse cellulaire interviennent tardivement par rapport à l'activation cellulaire, on peut imaginer que celle-ci soit responsable d'un large afflux dans le milieu de médiateurs de l'inflammation (König et al., 1995), alors que certains d'entre eux comme le leucotriène B₄ et l'IL-8 ont pu être néosynthétisés (Hensler et al., 1994b; König et al., 1994). Cependant, les cadavres cellulaires peuvent jouer le double rôle de fournir des éléments nutritifs essentiels (Fer) et assimilables (molécules simples) et de compliquer la réponse immunitaire spécifique. Ces deux éléments, s'ils sont réels ne peuvent que dévier la réponse immune et profiter à la multiplication et à la dissémination de *S. aureus* à partir d'un point d'infection. Il y a quarante ans, avant l'accessibilité actuelle à l'hygiène et aux moyens de traitement, le furoncle était classiquement considéré comme une origine fréquente de septicémies au pronostic grave (Harrison and Lacey, 1974; Sosin et al., 1989), mais ce genre d'évolution peut encore être observé (Couppié et al., 1997).

IV. Perspectives

L'acide aminé Gly130 identifié au cours de ce travail correspond à Gly134 de l' α -toxine. Ce dernier résidu de l' α -toxine a été désigné comme orienté vers l'environnement hydrophobe par plusieurs auteurs (Palmer et al., 1993; Valeva et al., 1996; Ward et al., 1994). L'apport d'une charge négative peut déstructurer localement le "Stem" sans pour autant influencer l'édification du pore et l'activation cellulaire.

Dans le prolongement de cette étude de faisabilité du découplage de l'activité formant des pores, de futurs travaux pourront tenter de réduire encore cette dernière :

- répercutant les mêmes modifications sur les composés de classe S
- en étudiant, par le biais d'autres substitutions de Gly130, Gly131 et éventuellement, la possibilité d'obtenir des mutants incapables de perméabiliser les cellules. Dans le cas des délétions, d'autres modifications plus réduites et se déplaçant sur la séquence pourraient être intéressantes.

D'autre part, le fait d'obtenir des leucotoxines ne possédant qu'une de leurs deux fonctions devrait permettre d'assigner leur rôle inflammatoire exact. De telles toxines, seulement activatrices, pourraient être testées dans un modèle expérimental en tant qu'immunomodulateurs, afin de déterminer si elles apporteraient un bénéfice à l'immunité dans le contrôle des infections.

CHAPITRE IV

APPROCHE EPIDEMIOLOGIQUE DES INFECTIONS A *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EN AFRIQUE DE L'OUEST

- 1. Présentation**
- 2. Article N°4**
- 3. Conclusion et perspectives**

I. PRESENTATION

La santé des populations de l'Afrique équatoriale et sub-équatoriale est généralement désignée comme mise en péril par divers fléaux : malnutrition, paludisme, VIH, onchocercose, ... Le niveau sanitaire lié à la pauvreté et à la rareté de l'eau salubre et le climat chaud et humide sont des facteurs d'impact cruciaux. Cependant, peu de travaux font véritablement un état des lieux des infections communautaires rencontrées dans ces pays. L'antibiorésistance des souches bactériennes et les infections nosocomiales sont des sujets très rarement discutés en Afrique. Il paraît important de détailler ces problèmes, afin d'établir une information utile à la pratique médicale et à la prévention des maladies infectieuses.

S. aureus est l'un des germes les mieux adaptés à l'écologie humaine et le plus fréquemment rencontré parmi les infections hospitalières. Les souches qui composent cette espèce peuvent présenter de multiples mécanismes de résistance aux antibiotiques. Nous nous sommes intéressés aux infections à *S. aureus* rencontrées dans plusieurs Centres Hospitaliers du Bénin, de Côte d'Ivoire et du Togo.

II. ARTICLE N°4

APPROCHE EPIDEMIOLOGIQUE DE L'ANTIBIORESISTANCE ET DE LA PRODUCTION DE LEUCOTOXINES PAR LES SOUCHES DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLEES EN AFRIQUE DE L'OUEST.

EPIDEMIOLOGICAL APPROACH OF ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY AND LEUCOTOXINS PRODUCTION BY *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLATES IN WEST AFRICA

L. BABA MOUSSA^{1,2}, A. SANNI¹, A.Y. DAGNRA³, S. ANAGONOU⁴, M. PRINCE-DAVID³, V. EDOH⁵, J.J. BEFORT⁶, G. PREVOST¹, H. MONTEIL^{1*}

1. Laboratoire de Toxinologie et d'Antibiologie Bactériennes (LTAB-UPRES-EA 1318).

Institut de Bactériologie de la Faculté de Médecine. Université Louis Pasteur - Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 3, rue Koeberlé, F-67000 Strasbourg.

Tel: 03 88 21 19 70. Fax : 03 88 25 11 13. e-mail : Henri.Monteil@adm-ulp.u-strabg.fr

2. Université Nationale du Bénin, Faculté des Sciences et Techniques, Département de Biochimie et de Biologie Cellulaire. 04 BP 0320 Cotonou. (Bénin)

3. Université du Togo. Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie. BP 1515 Lomé (Togo).

4. Centre National Hospitalo-Universitaire. Laboratoire de Bactériologie. BP 386 Cotonou (Bénin).

5. Centre Hospitalo-Universitaire de Treichville. Laboratoire de Bactériologie. Abidjan (Côte d'Ivoire)

6. Faculté de Pharmacie. 01BP V34. Abidjan (Côte d'Ivoire)

**Accepté pour publication dans Médecine et Maladies Infectieuses,
1999**

RESUME : L'analyse de l'antibio-résistance et de la production de leucotoxines de 414 souches consécutives et indépendantes de *Staphylococcus aureus* isolées au Bénin, en Côte d'Ivoire et au Togo montre que leur diversité est importante, mais que le taux de résistance aux antibiotiques est pratiquement comparable à ceux des pays industrialisés. Parmi les infections à *Staphylococcus aureus*, souvent diagnostiquées à un stade avancé, la part des infections génito-urinaires est très importante (43 %). Si les souches productrices de la leucotoxine Luke/LukD sont aussi fréquentes qu'en Europe (29 %), la fréquence des souches productrices de leucocidine de Panton et Valentine (LPV) est significativement plus élevée en Afrique (30 % versus 2 %)($p < 0,001$). Cette observation pose le problème de la manifestaion clinique de certaines infections à *S. aureus* en Afrique. Les profils de macrorestriction *Sma*I de l'ADN total obtenus après une électrophorèse en champ pulsé sont multiples et montrent que ces souches ne sont pas épidémiques. Ces observations centrées sur *S. aureus* pourraient servir de support à la prévention et l'hygiène hospitalière dans ces pays.

Mots-clés : *Staphylococcus aureus*, infections, antibiorésistance, leucotoxines, bio-diversité.

SUMMARY : Antibiotic susceptibility and leucotoxin production analyzed for 414 consecutive and independent *Staphylococcus aureus* strains collected in Benin, Ivory Coast and Togo showed an important polymorphism, despite the resistance to antibiotics was similar as that of developed countries. From the different infections due to *Staphylococcus aureus*, generally diagnosed at an advanced stage, genitourinary infections appeared frequently (43%). Although strains producing the Luke/LukD leucotoxin were as frequent (29%) as in Europe, those producing the Panton-Valentine leucocidin were significantly more frequent in Africa (30% versus 2% in Strasbourg-France)($p < 0.001$). This observation is questioning about the clinical expression of some *Staphylococcus aureus* infections in Africa. Pulsed-field gel electrophoresis after the *Sma*I-macrorestriction of total DNAs demonstrated polymorphism of Panton-Valentine leucocidin-producing strains and their non epidemic spreading. This work centered on *Staphylococcus aureus* might be a support for hygiene and hospital care in these countries.

Key-words: *Staphylococcus aureus*, infections, antibiotic susceptibility, leucotoxins, bio-diversity

INTRODUCTION

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) est la bactérie la plus fréquemment isolée dans les prélèvements de malades hospitalisés. De nombreuses données ont été recueillies dans les pays industrialisés, qui ne sont pas connues pour les pays en voie de développement? *S. aureus* est responsable de nombreux types d'infections où facteurs d'adhésion, facteurs opsonisants et facteurs d'invasion se complètent pour exprimer la virulence de la bactérie. Parmi les toxines sécrétées par *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), les leucotoxines à deux composés constituent une famille dont plusieurs des membres ont été récemment caractérisés [1]. Leur action résulte de l'association à la surface des cellules cibles de deux exoprotéines non associées en solution : l'une de classe S (31-34 kDa), l'autre de classe F (34-35 kDa). Cette classification est validée d'une part par les identités de séquence à l'intérieur d'une même classe de protéines (de 55 à 70 % pour les protéines de classe S, de 70 à 80 % pour les protéines de classe F). D'autre part, la constitution d'une leucotoxine résulte toujours de l'interaction préalable d'une protéine de classe S avec un ligand membranaire qui dépend de la différenciation des cellules cibles, puis de celle d'un composé de classe F. Il s'ensuit une activation cellulaire doublée de la formation de pores perméables aux cations monovalents [2].

La plus anciennement connue de ces leucotoxines est la leucocidine de Pantone et Valentine (LukS-PV/LukF-PV)[3, 4]. Les souches productrices (soit 2 % des souches cliniques au CHU de Strasbourg) ont été associées aux furoncles, et inversement [5, 6]. Des complications de ces affections sous la forme de bactériémies et de métastases pulmonaires ont été décrites [7]. Le terme historique de gamma-hémolysine regroupe en fait deux leucotoxines : HlgA/HlgB et HlgC/HlgB ; la première est la seule toxine staphylococcique ayant véritablement une action hémolytique sur les cellules humaines [4]. Les gamma-hémolysines sont produites par l'ensemble des souches isolées en clinique.

En ce qui concerne LukM/LukF'-PV, les souches productrices semblent être rares dans le recrutement d'un centre hospitalier européen [8, 9]. En revanche, pour LukE/LukD, la dernière leucotoxine caractérisée [9], 30 % des souches cliniques de *S. aureus* la produisent. Les associations cliniques concernant cette leucotoxine sont apparemment subtiles [10], et sont en cours d'évaluation. Les différentes cibles cellulaires actuellement reconnues par les leucotoxines à deux composés sont des polynucléaires neutrophiles, les monocytes et les macrophages pour

la LPV, avec en outre les hématies et certains lymphocytes T pour HlgA/HlgB. Cependant, les activités biologiques de LukM/LukF'-PV et de LukE/LukD laisse supposer sur l'existence d'autres cibles cellulaires [9].

La multiplicité des leucotoxines est un facteur de discrimination des souches de *S. aureus* et peut compléter des enquêtes épidémiologiques, voire mettre en évidence des associations cliniques intéressantes. Le but de ce travail a été d'évaluer l'antibiorésistance et la production de leucotoxines par les souches de *S. aureus* isolées dans plusieurs centres hospitaliers du Bénin, du Togo, de la Côte d'Ivoire.

MATERIELS ET METHODES

Souches de *S. aureus*

Les souches de *S. aureus* ont été récoltées durant l'année 1997 de malades différents dans les centres hospitaliers du Bénin (soit 29 souches au Laboratoire du Dispensaire National, 22 souches isolées à la clinique Saint Luc, 57 souches au Centre Antituberculeux du Lazaret et 82 centre National Hospitalo-Universitaire de Cotonou), du Togo (109 souches au centre Hospitalo-Universitaire de Lomé), et durant un an jusqu'en juillet 1998 en Côte d'Ivoire (115 souches au Centre Hospitalo-Universitaire d'Abidjan). Elles ont d'abord été identifiées en Afrique comme des cocci groupés en amas à Gram (+), catalase (+), mannitol (+), DNase (+), coagulase (+). Ces souches ont été recontrôlées par les techniques conventionnelles après leur acheminement au Laboratoire de Toxinologie et d'Antibiologie Bactériennes (LTAB). L'identification de *S. aureus* dans les prélèvements urinaires a été entreprise après la mise en évidence de la présence de plus de 100 000 germes/ml.

Données cliniques

Le recueil des données cliniques correspondant aux souches isolées est difficile pour plusieurs raisons :

a) le niveau de pauvreté de la population et l'absence de protection sociale étatisée incitent les malades à consulter tardivement, à éviter ou raccourcir la durée d'hospitalisation, à réduire l'investigation biologique, elle-même tributaire d'une pénurie chronique, ce qui rend

inhomogènes les informations cliniques nécessaires à l'analyse épidémiologique fine des résultats

b) le suivi et le devenir du malade ne peuvent être appréhendés.

Cependant, les souches présentées dans cette série sont toutes obtenues de patients différents pour lesquels nous disposons d'un diagnostic rapide de l'infection, de la nature du prélèvement, et de la sensibilité aux antibiotiques. La comparaison des différents groupes de valeurs a été effectuée par la détermination du test de χ^2 .

Antibiogrammes

Les antibiogrammes présentés ont été effectués par la méthode de diffusion en gélose à partir de disques chargés en antibiotiques [ampicilline (Amp), oxacilline (Oxa), kanamycine (Kan), gentamicine (Gm), péfloxacin, pristinamycine, érythromycine, rifampicine, fosfomycine, acide fusidique, triméthoprime-sulfaméthoxazole]. La résistance à l'oxacilline a été déterminée par le diamètre d'inhibition de croissance sur une gélose hypersalée à 6,5 % (p/v) ClNa ou après 48 h d'incubation à 30°C. La détermination des résistances a été effectuée selon les recommandations du Comité Français de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie [11].

Recherche des leucotoxines

Des plaques en polystyrène à 24 puits contenant 500 μ l de YCP (Yeast Extract-Casaminoacids-Pyruvate de Na)[9] sontensemencées à partir d'une culture jeune et incubée 16 heures à 37°C sous une atmosphère de 10 % en CO₂ avec une agitation vigoureuse. La présence de leucotoxine à deux composés (LPV, gamma-hémolysine, LukE/LukD, LukM/LukF'-PV) est révélée par un test d'immunoprécipitation après une diffusion radiale en gel d'agarose 0,6 % (p/v) en présence d'anticorps spécifiques de lapin purifiés par affinité [9]. Après 16 h de diffusion, les gels sont déshydratés et les arcs de précipitation sont révélés par une coloration au bleu de Coomassie.

Détermination des pulsotypes

Les pulsotypes des souches LPV (+) ont été déterminés à partir des préparations d'ADN total hydrolysées par l'enzyme de restriction *Sma*I selon la méthode déjà décrite [12]. L'électrophorèse est réalisée sur un appareil Geneline™ (Beckman) dans un tampon TAFE x 0,5 (TAFE x 20 = Tris 0,2 M, EDTA 10 mM, acide acétique 0,087 mM, pH = 8,2) selon la programmation : 150 mA constants avec des champs pulsés de 2 s pendant 2 h, 14 s pendant

1 h, 12 s pendant 1 h 30 min, 10 s pendant 2 h 30 min, 8 s pendant 6 h 30 min, 6 s pendant 6 h 30 min. Les pulsotypes figurant sur les photographies de gels d'agarose à 1 % (p/v) colorés au bromure d'éthidium ont été comparés et classés sous forme de dendrogrammes en déterminant les coefficients de Dice et en utilisant le programme UGPMA fourni par les logiciels Molecular Analyst™ 1.5 et Fingerprint™ 1.12 (Biorad).

RESULTATS

Origine des souches.

Comme l'indique le Tableau I, 414 souches de *S. aureus* ont été considérées dans l'enquête. Ces souches proviennent de trois grands types de prélèvements : les prélèvements génito-urinaires (43 %) sont particulièrement fréquents, bien que ceux où *S. aureus* était associé à *Staphylococcus saprophyticus* ou *Escherichia coli* aient été éliminés. Cette première observation suscite déjà une interrogation sur le rôle pathogène précis et l'expression de ces infections à *S. aureus* dans cette zone géographique. Le caractère surinfectant de *S. aureus* ne peut être écarté dans tous les cas (immunosuppression faisant suite à une crise paludique, par exemple). Les affections cutanées tropicales sont nombreuses et peuvent se compliquer d'abcès de surinfection. Il n'est donc pas étonnant que les souches de *S. aureus* isolées de suppurations soient également fréquentes (31 %). Le Centre du Lazaret de Cotonou (Bénin) est un centre de lutte contre la tuberculose ; il fut la source essentielle de souches isolées à partir d'expectorations (57/83). Ces dernières constituent le seul type de prélèvement respiratoire rencontré.

Sensibilité aux antibiotiques

De rares données existent sur les profils de sensibilité aux antibiotiques des souches de *S. aureus* en Afrique équatoriale [13]. Le Tableau II indique ceux des souches des trois pays considérés. En effet, la moitié des souches sont résistantes à l'ampicilline. Les taux de résistance ne varient pas significativement en fonction de la clinique ou du pays considérés et sont de 14,5 % pour toutes les souches résistantes à l'oxacilline et de 13 % pour les souches OxaR-GmR-KanR, 20 % sont résistantes à la kanamycine et à la gentamicine, alors que 27 % sont uniquement résistantes au moins à la kanamycine. Les six souches OxaR-GmS-KanS ont été isolées dans chacun des trois pays et les trois souches ivoiriennes n'ont pas été obtenues sur

une période de 8 mois. Avec 11 % et 17 % de souches résistantes à l'acide fusidique et au triméthoprime-sulfaméthoxazole, les observations sont proches de moyennes européennes [14] ou françaises [15]. La fréquence des souches résistantes à la rifampicine, la pristinamycine, la péfloxacinine n'est pas non plus différente. La résistance à l'oxacilline parmi les grands groupes de prélèvements varie de 2,4 % pour les souches d'origine respiratoire, à 22 % pour celles d'origine génito-urinaire.

Production de leucotoxines à deux composés

Leucotoxine de Pantan et Valentine (LPV)

Alors que plusieurs études réalisées aux Hôpitaux Universitaires de Strasbourg [16, 17] rapportaient une incidence des souches productrices de LPV comprise entre 1,5 et 5 %, la fréquence globale de ce type de souches en Afrique de l'Ouest est beaucoup plus élevée (30 %). Elle est significativement différente ($p < 0,001$) de celles citées dans une des précédentes études [17]. Lorsque les données sont analysées par pays, les fréquences sont également significativement différentes ($p < 0,001$) même si celle des souches isolées au Bénin apparaît plus faible (14 %), et celle des souches de Côte d'Ivoire particulièrement élevée (53 %). En ce qui concerne les différents types de prélèvements, il est nécessaire de distinguer deux catégories : ceux dont le nombre des souches est important comme les prélèvements génito-urinaires, les suppurations et les expectorations de ceux où les recrutements sont plus réduits (prélèvements sanguins, LCR, coprocultures). Pour les prélèvements les plus nombreux, les souches productrices de LPV sont fréquentes puisqu'elles représentent 18 et 16 % des souches isolées des infections génito-urinaires et des expectorations à *S. aureus*, respectivement, et 50 % des souches isolées des suppurations.

En ce qui concerne les infections uro-génitales (Tableau III), les principaux signes cliniques évoqués sont des douleurs à la miction, de la fièvre, des leucorrhées. Les souches LPV (+) représentent 15,6 % des prélèvements urinaires alors qu'aucune souche parmi 40 de la même origine et isolées aux Hôpitaux Universitaires de Strasbourg n'était positive [17]. Nous avons distingué les prélèvements urinaires des prélèvements urétraux et vaginaux. Les prélèvements urinaires positifs sont au nombre de 96, mais les souches LPV (+) représentent 15 % des 60 souches isolées chez des femmes, et 30,5 % des 36 souches isolées chez des hommes ; la différence est appréciable ($p < 0,06$).

En ce qui concerne les prélèvements génitaux, ils sont peu nombreux chez les hommes, et une souche sur cinq est LPV (+). Ces souches ne représentent que 12 % des souches isolées chez les individus de sexe féminin. Néanmoins, les souches LPV (+) semblent plus fréquentes ($p < 0,03$) pour les prélèvements génito-urinaires d'individus masculins que féminins.

Les suppurations positives à *S. aureus*, qu'elles soient superficielles ($n = 117$) ou profondes ($n = 12$) sont souvent concernées par les souches LPV (+), soit 50 et 55 % des souches respectivement. Malheureusement, nous ne possédons de diagnostic précis que dans de rares cas. Cependant, parmi les infections évoquées figurent des staphylococcies cutanées primaires : 16 furoncles et panaris. Une majorité (75 %) des souches correspondantes sont productrices de LPV. Des souches LPV (+) ont été isolées d'infections graves comme des ostéomyélites, des ostéites et une myosite. Là encore, la proportion des souches toxigènes est plus importante pour les suppurations superficielles que pour une série comprenant des souches isolées de staphylococcies primaires et secondaires [7].

Les souches de *S. aureus* isolées d'expectorations sont aussi plus souvent positives (15,6 %) pour la LPV que dans l'enquête strasbourgeoise [17]. Elles semblent moins fréquentes dans le Centre Anti-tuberculeux du Lazaret.

Les 5 liquides céphalo-rachidiens inclus dans l'étude sont LPV (+), mais le point de départ de ces infections n'a pu être précisé. De même, les deux tiers des souches d'hémocultures (11/18) sont LPV (+), alors que lors d'une précédente étude réalisée à Strasbourg, une seule souche positive avait été observée parmi 69 hémocultures positives à *S. aureus* pour des patients différents [6].

L'association Luke/LukD

La fréquence des souches productrices de Luke/LukD est de 29 % pour l'ensemble de la série, soit un score très comparable à celui observé pour les souches strasbourgeoises. Au niveau des différents types de prélèvements, la fréquence de ces souches avec 21 % des souches d'origine uro-génitales, 30 % des suppurations ne présente pas de variation significative avec les observations publiées [9]. Le chiffre de 50,6 % de positivité pour les expectorations doit être replacé dans un contexte où 24 souches sont productrices de Luke/LukD parmi les 57 souches (42 %) isolées de malades atteints de tuberculose et hospitalisés dans un seul et même service.

La recherche de la production des trois constituants de la gamma-hémolysine et de

LukM/LukF'-PV pour les 120 premières souches obtenues a montré que toutes produisaient la gamma-hémolysine et qu'aucune ne produisait LukM/LukF'-PV, confirmant les données déjà publiées pour des souches isolées en clinique humaine [9, 17].

Antibiorésistance des souches productrices de leucotoxines

L'antibiorésistance des souches de *S. aureus* LPV (+) n'est pas significativement différente de celle de l'ensemble des souches collectées. En effet, parmi ces souches LPV (+), 35,4 % sont résistantes à l'amoxicilline, 10,4 % sont résistantes à l'oxacilline, 12 % sont résistantes aux aminoglycosides et finalement 6,4 % sont multirésistantes (β -lactamines, aminoglycosides, fluoroquinolones). Les souches LPV (+) de Côte d'Ivoire semblent plus fréquemment résistantes, puisque 46 % sont AmR, 16,4 % sont OxaR et 11,5 % sont OxaR-KanR-GmR. C'est également dans ce pays que les souches LPV (+) sont les plus fréquentes [48 % des souches LPV (+) et 53 % des souches ivoiriennes]. Pour ce type de souches, celles qui sont AmR représentent 11 % des 414 souches collectées, celles qui sont OxaR comptent pour 3 % de l'ensemble, et les souches multirésistantes 2 %.

L'antibiorésistance des souches productrices de Luke/LukD n'est pas caractéristique, car 41 % sont AmR, 13,6 % sont OxaR et 13,4 % sont OxaR-KanR-GmR.

Les souches africaines LPV (+) sont-elles épidémiques?

L'analyse des 125 souches LPV (+) par électrophorèse en champ pulsé après leur macrorestriction par l'enzyme *SmaI* met en évidence 20 pulsotypes différents (Figure 1). La plupart de ces profils diffèrent largement entre eux, indiquant la variété des souches pouvant être porteuses du caractère LPV (+). Seuls les pulsotypes 5 et 6 sont proches l'un de l'autre. Les pulsotypes 8, 13 et 16 regroupent néanmoins 24, 11 et 13 souches, respectivement, mais ces groupes comprennent des souches isolées dans des cliniques et des pays différents. Elles ne peuvent être considérées comme épidémiques, mais sont plutôt endémiques.

De même, les pulsotypes obtenus à partir des 24 souches productrices de Luke/LukD isolées au Centre Antituberculeux du Lazaret (Cotonou - Bénin) se répartissent en 9 profils différents (Figure 2).

Leur distribution ne permet pas de mettre en évidence une souche épidémique pouvant être responsable d'infections nosocomiales.

DISCUSSION

Les observations qui ont pu être faites grâce à cette enquête montrent un certain nombre de données différentes de celles obtenues en Europe.

Parmi les données concordantes figure les taux de résistance aux antibiotiques. En effet, les souches de *S. aureus* isolées en Afrique de l'Ouest ne présentent pas de variations importantes avec des séries de souches européennes [14], strasbourgeoises [15] en particulier pour les proportions de souches résistantes à l'amoxicilline, aux aminoglycosides, à l'oxacilline. Le résultat nouveau est que les souches de *S. aureus* produisant la LPV ne sont pas particulièrement sensibles aux antibiotiques. Parmi celles-ci, 43% sont résistantes à l'amoxicilline et 10% à l'oxacilline.

S. aureus est toujours fréquemment isolé (31 %) de suppurations superficielles ou profondes [14], mais la part des prélèvements génito-urinaires positifs est très significativement plus importante ($p < 0,001$). En effet, alors que les données strasbourgeoises variaient de 8 à 13 % [15, 17], les souches africaines isolées de prélèvements urogénitaux représentent une grande part (42,5 %) parmi les autres prélèvements. L'incidence de *S. aureus* dans ce type d'infection devrait maintenant être précisée. Notons que les malades affectés dans ce type d'infection sont jeunes (< 55 ans, moyenne d'âge = 31 ans). Ils ne sont pas, dans leur grande majorité, hospitalisés pour un problème nécessitant l'implantation d'une sonde urinaire au moment de la consultation. Pour ces malades, l'infection concomitante à *Plasmodium falciparum* ou au VIH n'a pu être documentée. Outre des conditions sanitaires souvent insuffisantes et un climat chaud et humide, un autre facteur qui pourrait influencer la survenue d'infections urinaires peut être du à un apport hydrique limité par l'accès à l'eau potable, impliquant une concentration urinaire favorisant la colonisation bactérienne.

La proportion constante de souches de *S. aureus* productrices de Luke/LukD sur les deux continents met en valeur la fréquence très augmentée des souches productrices de LPV en

Afrique de l'Ouest. En effet, ces souches sont six à dix fois plus répandues, et concerne la plupart des types de prélèvements. Leur association reste plus nette avec les staphylococcies cutanées primaires, mais 50 % des souches isolées de suppurations sont positives. Ces souches ne correspondent pas à un clone épidémique puisque leur ADN analysé en électrophorèse en champ pulsé montre l'existence de nombreux pulsotypes dont les exemplaires redondants ne présentent pas de communauté de lieux géographiques, de sites d'infection. Il semble donc que ces souches soient largement disséminées dans ces pays, correspondant probablement à une écologie propre. De récents travaux confirment l'origine bactériophagique du gène codant la LPV [18], mais aucune preuve n'est encore apportée sur la fluidité de ce caractère génétique. Ce travail permet d'évaluer l'importance des infections à *S. aureus* en Afrique de l'Ouest, et, sachant le coût du système de santé pour les usagers, laisse imaginer l'existence de nombreuses infections communautaires à cette bactérie. La dérégulation de l'achat d'antibiotiques, parfois de mauvaise qualité, peut être à l'origine de la sélection dans la population de souches résistantes. Il y a donc un intérêt à approfondir l'observation épidémiologique de ces infections afin de pouvoir mettre en œuvre une politique cohérente de prévention [19] en dominant la pression de sélection d'antibiotiques inadaptés par des mesures économiques et sanitaires.

Remerciements. Nous remercions l'assistance technique des personnels du Dispensaire National et de la Clinique Saint Luc de Cotonou, ainsi que MM. D. Keller et N.W. Chabi. L'aide fournie par M. J.M. Rousée pour la construction du dendrogramme à l'Institut d'Hygiène de la Faculté de médecine de Strasbourg est remerciée. L. Baba Moussa est boursier de la Mission de Coopération et d'Action Culturelle de l'Ambassade de France au Bénin. Ce travail a été réalisé grâce à la dotation EA-1318 de la Direction de la Recherche et des Etudes Doctorales.

REFERENCES

- 1 Prévost G. The bi-component staphylococcal leucocidins and gamma-hemolysins (toxins). In : Alouf JE, Freer JH., éd. The Comprehensive Sourcebook of Bacterials Toxins, 2nd edition. London : Academic Press ; 1999. Ch 21, p. 402-418.
- 2 Staali L, Monteil H, Colin DA. The pore-forming leukotoxins from *Staphylococcus aureus* open Ca^{2+} channels in human polymorphonuclear neutrophils. J Memb Biol 1998 ; 162 : 209-216.
- 3 Panton PN, Valentine FCO. Staphylococcal toxin. Lancet 1932 ; 222 : 506-508.

- 4 Prévost G, Cribier B, Couppié P, Petiau P, Supersac G, Finck-Barbançon V, Monteil H, Piémont Y. Panton-Valentine leucocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infect Immun* 1995 ; 63 : 4121-4129.
- 5 Cribier B, Prévost G, Couppié P, Finck-Barbançon V, Grosshans E, Piémont Y. *Staphylococcus aureus* leukocidin: a new virulence factor in cutaneous infections. *Dermatology* 1992 ; 185 : 175-180.
- 6 Couppié P, Cribier B, Prévost G, Grosshans E, Piémont Y. Leucocidin from *Staphylococcus aureus* and cutaneous infections: an epidemiological study. *Arch Dermatol* 1994 ; 130 : 1208-1209.
- 7 Couppié P, Hommel D, Prévost G, Godart MC, Moreau B, Sainte-Marie D, Peneau C, Hulin A, Monteil H, Pradinaud R. Septicémie à *Staphylococcus aureus*, furoncle et leucocidine de Panton et Valentine : 3 observations. *Ann Dermatol Vénérolog* 1997 ; 124 : 684-686.
- 8 Kaneko J, Muramoto K, Kamio Y. Gene of LukF-PV-like component of Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* P83 is linked with *lukM*. *Biosc Biotech Biochem* 1997 ; 61 : 541-544.
- 9 Gravet A., Colin D.A., Keller D., Girardot R., Monteil H., Prévost G. Characterization of a novel structural member, LukE-LukD, of the bi-component staphylococcal leucotoxins family. *FEBS Lett* 1998 ; 436 : 202-208.
- 10 Gravet A, Baba Moussa L, Werner S, Staali L, Meunier O, Keller D, Colin DA, Sanni A, Monteil H, Prévost G. Characterization of a novel 30%-distributed staphylococcal leucotoxin and structure comparison with the other members of the toxin family. In : Hacker J. *et al.* éd. In "Bacterial Protein Toxins". Stuttgart, Iena, New-York : A Gustav Fischer Verlag ; ZBl Mikrobiol 1998 ; Suppl. 29 : p. 401-402..
- 11 Acar J, Carret G, Cavallo JD, Chardon H, Choutet P, Courvalin P, Dabernat H, Drugeon H, Dubreuil L, Goldstein F, Jarlier V, Morel C, Philippon A, Rouveix B, Sirot J, Soussy CJ, Thabaut A. Communiqué 1997 du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. *Pathol Biol* 1997 ; 45 : n°8 : I-XII.
- 12 Prévost G, Jaulhac B, Piémont Y. DNA fingerprinting by pulsed field gel electrophoresis efficiently distinguishes methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol* 1992 ; 30 : 967-973.
- 13 Voss A, Doebbeling BN. The worldwide prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* 1995 ; 5 : 101-106.
- 14 Voss A, Milatovic D, Wallrauch-Schwarz C, Rosdahl VT, Braveny I. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994 ; 13 : 50-55.
- 15 Mahoudeau I, Elkhaili H, Delabranche X, Freitas FIS, Meunier O, Prévost G, Monteil H. Epidémiologie de *Staphylococcus aureus* dans les Hôpitaux Universitaires de Strasbourg. *J Med Strasbourg* 1997 ; 28 : 153-159.

- 16 Finck-Barbançon V, Prévost G, Piémont Y. Improved purification of leukocidin from *Staphylococcus aureus* and toxin distribution among hospital strains. Res Microbiol 1991 ; 142 : 75-85.
- 17 Prévost G, Couppié P, Prévost P, Gayet S, Petiau P, Cribier B, Monteil H, Piémont Y. Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins. J Med Microbiol 1995 ; 42 : 237-245.
- 18 Kaneko J, Kimura T, Kawakami Y, Tomita T, Kamio Y. Panton-Valentine leucocidin genes in a phage-like particle isolated from mitomycin C-treated *Staphylococcus aureus* V8 (ATCC 49775). Biosc Biotech Biochem 1997 ; 61 : 1960-1962.
- 19 Dossou-Gbete L, Amoussou J. Les habitudes du traitement présomptif des formes non graves de paludisme à Porto-Novo, Bénin. Med Mal Infect 1998 ; 28 : 1000-1004.

LEGENDES DE FIGURES

Figure 1 : Dendrogramme et schéma des pulsotypes obtenus après une macrorestriction *Sma*I de l'ADN intact des 125 souches LPV (+) et la séparation des fragments d'ADN par électrophorèse en champ pulsé.

Figure 2 : Neuf pulsotypes différents, obtenus après la macrorestriction *Sma*I de l'ADN intact et la séparation des fragments d'ADN par électrophorèse en champ pulsé, sont observés pour les souches de *S. aureus* productrices de Luke/LukD isolées d'expectorations au Centre Anti tuberculeux du Lazaret. Les pulsotypes des lignes 6 et 8 sont comparables. Le marqueur de taille des fragments d'ADN est un oligomère de l'ADN du bactériophage λ (New England Biolabs, Ozyme Paris).

Tableau I : Distribution des souches de *S.aureus*, LPV (+) ou Luke/lukD (+) isolées en Afrique de l'Ouest.

Types de prélèvements par pays	Souches de <i>S. aureus</i>				<i>S. aureus</i> LPV (+)				<i>S. aureus</i> Luke/LukD (+)			
	Bénin	Côte d'Ivoire	Togo	Total	Bénin	Côte d'Ivoire	Togo	Total (%)	Bénin	Côte d'Ivoire	Togo	Total (%)
Prélèvements urogénitaux	76	62	38	176	5	26	0	31 (17,6%)	21	7	9	37 (21%)
Prélèvements superficiels	25	30	62	117	7	20	30	57 (49%)	11	3	23	37 (31,6%)
Prélèvements profonds	2	4	6	12	1	2	3	6 (50%)	1	0	1	2 (16,6%)
Prélèvements respiratoires	82	1	0	83	12	1	0	13 (15,6%)	41	1	0	42 (50,6%)
Prélèvements sanguins	3	14	1	18	2	9	1	12 (67%)	0	0	1	1 (8,3%)
LCR	1	2	2	5	1	2	2	5 (100%)	0	0	0	0
Coprocultures	1	2	0	3	0	1	0	1 (33%)	0	0	0	0
Total	190	115	109	414	28	61	36	125 (30,2%)	74	11	34	119 (28,7%)

Note : LCR = liquide céphalo-rachidien.

Tableau II : Pourcentages d'antibiorésistance des souches de *S. aureus* isolées en Afrique de l'Ouest.

	Bénin (n= 190)	Côte d'Ivoire (n=115)	Togo (n=109)	Total (n= 414)
Ampicilline	68	43,5	24,7	49,7
Oxacilline	11,6	19	14,6	14,5
Kanamycine	21,6	37,4	27,5	27,5
Gentamicine	16,8	29,6	16,5	20,3
GmR-KanR	16,8	29,6	16,5	20
OxaR-GmR-KanR	11	16,5	12,8	13
Pefloxacine	13,7	25,2	12,8	16,6
Pristinamycine	11,5	13,9	11,0	12
Erythromycine	12,6	27,8	11,9	16,6
Rifampicine	13,7	4,3	2,8	8,2
Fosfomycine	16,3	22,6	13,7	17,4
Acide Fusidique	11,6	13,0	9,2	11,3
Triméthoprime-sulfaméthoxazole	24,7	13,9	7,3	17,1

Note : KanR : résistant à la kanamycine, GmR : résistant à la gentamicine, OxaR : résistant à l'oxacilline.

Tableau III : Détail des prélèvements génito-urinaires et pourcentages de souches LPV[+].

Type de prélèvement	Femmes (%LPV[+])	Hommes (%LPV[+])	Total (%LPV[+])
urinaire	60 (15%)	36 (30,5%)	96 (15,6%)
génital	67 (11,9%)	10 (20%)	77 (11,7%)
Spermoculture	--	3 (33%)	3 (33%)
Total	127 (13,4%)	49 (28,6%)	176 (18,7%)

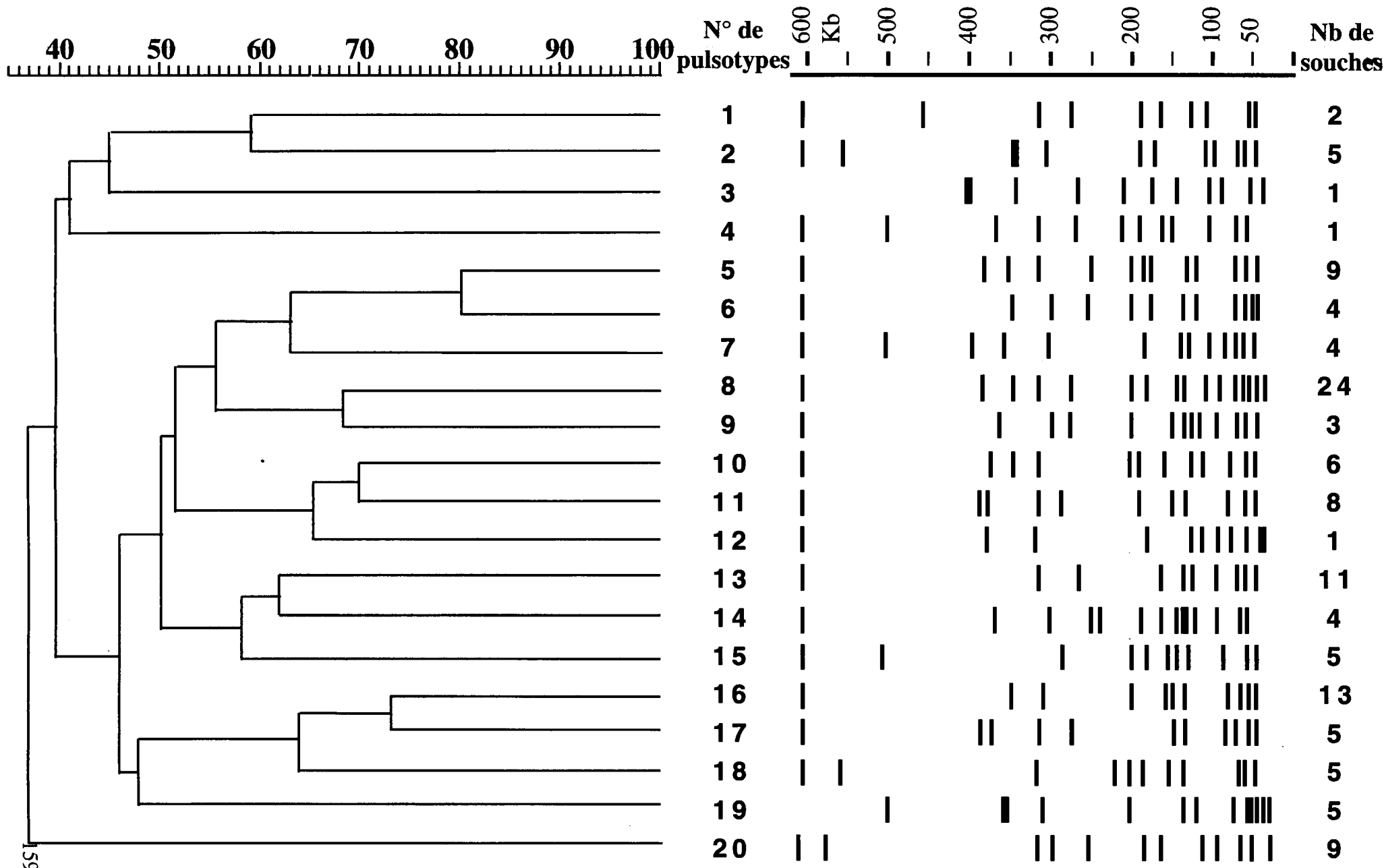
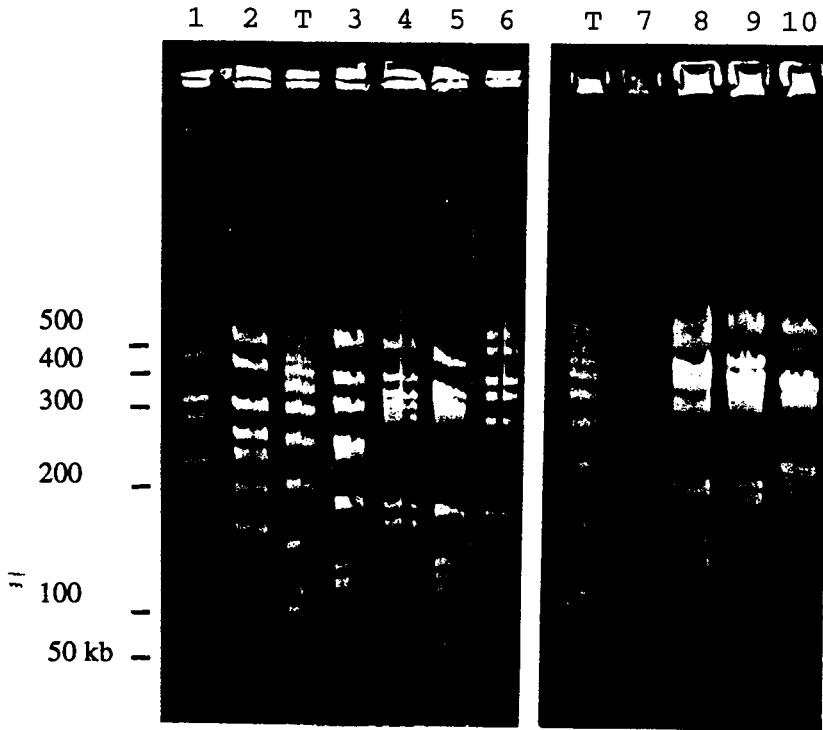


FIG 2



III. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Un certain nombre de résultats obtenus dans ce travail sont nouveaux :

- La fréquence des souches de *S. aureus* productrices de LPV est notablement plus importante qu'en France.
- Les souches productrices de LPV peuvent être résistantes aux antibiotiques .
- Les souches africaines de *S. aureus* peuvent être multirésistantes aux antibiotiques
- Les infections à *S. aureus* sont multiples à l'instar de l'épidémiologie générale, mais la proportion de prélèvements urogénitaux positifs est considérable.

Cependant de nombreuses données sont encore manquantes mais pourraient être complétées par des études plus ciblées :

- Etablir l'incidence des infections à *S. aureus* dans un centre hospitalier, en considérant séparément les consultations ambulantes et les malades hospitalisés.
- Evaluer la prévalence des infections génitales et urinaires dues à *S. aureus* parmi les autres bactéries et déterminer l'expression clinique de ces infections ainsi que l'éventuelle production de toxines associées.
- Le problème des infections respiratoires à *S. aureus* est également intéressant. Ces infections sont-elles primaires ou consécutives à d'autres infections ? Quels types de souches sont impliqués ? Une donnée clinique ancienne est que les pneumopathies bulleuses des jeunes enfants étaient souvent rapprochées de l'existence de furoncles chez le malade ou les membres de son entourage. Il semble que ces affections existent dans la population africaine, de manière saisonnière à l'époque des vents de sable. Une telle étude permettrait d'établir l'implication de la LPV dans cette maladie et de conforter l'hypothèse du développement d'un modèle expérimental.
- Enfin, ces études pourraient dépasser le seul rôle de *S. aureus* et s'intéresser aux autres bactéries couramment responsables d'infections communautaires et nosocomiales.

Il ne faut cependant pas oublier que le niveau social moyen de la population ne lui permet pas toujours de bénéficier rapidement et entièrement d'un système performant de santé. Ce type d'étude, pour être précis et complètement descriptif doit passer par un financement rigoureusement évalué.

Ces enquêtes épidémiologiques sont généralement importantes, car elles permettent le plus souvent de proposer et de valider les nouvelles mesures d'hygiène et de prévention dans les services hospitaliers. Elles participent également à la sensibilisation des populations aux divers périls infectieux et s'intègrent pleinement dans la prophylaxie des maladies. Elle représentent un outil essentiel à de nombreux programmes d'amélioration de la santé.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Le but de notre travail de thèse était de mieux connaître les bases physiopathologiques moléculaires et cellulaires des infections à *S. aureus*. Parmi les facteurs de virulence produits par cette bactérie, les leucotoxines constituent un modèle original intéressant car elles ont la particularité d'être constituées de deux composés l'un de classe S et l'autre de classe F qui se fixent aux cellule-cibles de façon séquentielle. L'activité biologique ne s'exprime que lors de la fixation préalable du composé S puis du composé F. Bien que les leucotoxines agissent suivant le même mode d'action, elles possèdent des tropismes cellulaires différents. La leucocidine de Panton et Valentine est active sur les polynucléaires monocytes et macrophages humains et de lapin, mais elle ne possède aucune activité hémolytique sur leurs hématies. Le couple HlgA + HlgB de la gamma-hémolysine est fortement leucotoxique sur les PN humains, de boeuf et de lapin et fortement hémolytique sur les hématies de nombreuses espèces. Il perméabilise également certain lymphocytes T comme les cellules de Jurkat.

Les leucotoxines présentent deux fonctions essentielles : la fixation séquentielle des deux composés se traduit par l'ouverture de canaux calciques, puis par la formation de pores perméables aux cations monovalents. Il s'ensuit une activation cellulaire qui induit l'activation une réponse inflammatoire qui implique la synthèse et la sécrétion de plusieurs molécules telle que l'interleukine-8. Nous avons étudié l'interaction des composés S avec les composés F en identifiant un domaine structural des composés S pouvant être impliqués dans le mode d'action des leucotoxines. Sur la base des alignements de séquence et des prédictions de structure secondaire données par la méthode de Chou et Fasman, nous avons pu démontrer que l'acide aminé Thr28 situé dans un feuillet β de 13 acides aminés conservé à l'extrémité N-terminale des composés de classe S, jouait un rôle important dans le mode d'action des leucotoxine. Cette Thr28 est essentielle à l'interaction des composés S avec les composés F. Elle est critique pour le processus d'oligomérisation des toxines. Cette Thr28 peut être alignée sur l'His35 de l'alpha-toxine qui joue également un rôle important dans l'interaction entre monomères. La substitution de la Thr28 en His ne conduit pas à une leucotoxine fonctionnelle car la nature des interactions mis en jeu n'est pas la même. Ces deux acides aminés bien que non équivalents jouent le même rôle dans deux protéines différentes. Bien qu'ayant peu d'homologie sur le plan de leurs séquences primaires, les leucotoxines et l'alpha-toxine gardent une architecture globalement semblable. Cependant, les points d'interaction entre monomère restent à validés malgré la modélisation de l'hexamère dont l'édification sous cette forme a été prouvée. On pourrait imaginer de substituer des acides aminés en cystéine de telle façon que des ponts disulfures soient formés au moment de l'oligomérisation et savoir s'il s'agit d'interactions transitoires ou définitives dans le temps.

La résolution de la structure tridimensionnelle de LukF-PV a permis d'obtenir la structure

d'un composé hydrosoluble d'une toxine formant des pores et d'évaluer l'ampleur des modifications conformationnelles qui ont lieu au cours de la formation d'un oligomère transmembranaire.

Cette structure représente l'un des supports indispensables pour la compréhension du mode d'action des leucotoxines, et leur modification éclairée.

D'autre part, nous apportons la preuve que les deux fonctions activatrice et perméabilisante des leucotoxines sont distinctes et qu'elles peuvent être découplées. En effet, nous avons obtenu quatre protéines mutées de LukF-PV à l'activité perméabilisante réduite. Pour ce faire nous avons utilisé deux approches : l'une qui consiste à modifier la structure de la paroi interne du pore (Gly130Asp, Gly131Asp, Gly131Trp) et l'autre tentant d'enfermer l'extrémité du " Stem" dans la structure lipidique de la membrane (Δ Ser125-Leu128). Le mutant Δ Ser125-Leu128 n'a plus la même potentialité que la protéine sauvage à provoquer l'induction calcique mais l'activité lytique est décalée par rapport à l'activité activatrice. Cette dernière est entièrement restaurée lorsque la protéine est utilisée à une concentration 10 fois supérieure, mais pas l'entrée d'éthidium, ce qui renforce l'idée que les pores formés sont incomplètement fonctionnels. Le phénomène observé est plus important pour le mutant Gly130Asp alors que les deux autres mutants Gly131Asp et Gly131Trp possèdent une activité perméabilisante seulement dix fois diminuée. D'autre part, nous avons pu vérifier que les pores formés par ces mutants combinés à la protéine LukS-PV sont perméables aux molécules de PEG d'un rayon inférieur à 1,22 nm. Les leucotoxines à activité perméabilisante fortement diminuée sont très peu dermonécrotiques et faiblement inflammatoires lorsqu'elles sont injectées dans l'humeur vitrée du lapin. Le fait d'obtenir des telles leucotoxines ne possédant qu'une de leurs deux fonctions devrait permettre d'assigner leur rôle pro-inflammatoire précis. Ce type de toxine pourrait être utilisés dans un modèle expérimental en tant qu'immunomodulateur, afin de déterminer si elles apporteraient un bénéfice à l'immunité dans le contrôle des infections.

Enfin, en s'intéressant aux souches de *S. aureus* isolées dans plusieurs hôpitaux d'Afrique de l'Ouest, nous avons découvert que l'incidence des souches productrices de LPV est bien plus élevée (30 %) que pour les souches européennes (2 %). La résistance aux antibiotiques n'est pas notablement différente des souches françaises. En outre, les infections à *S. aureus* semblent fréquentes et particulièrement les infections urinaires. Ce type d'enquête permet de commencer à faire le point sur l'inféctiologie en Afrique, données souvent partielles, et de mettre l'accent sur la nécessité de permettre un accès encore meilleur à la santé pour les populations.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abrami L., Fivaz M., Glauser P. E., Parton R. G., van der Goot F. G.** (1998). A pore-forming toxin interacts with a GPI-anchored protein and causes vacuolation of the endoplasmic reticulum. *J. Cell. Biol.* **140**:525-540.
- Augustin J., Rosentein, Schneider V., Schnell N., Engelke G., Entian K. D., Götz F.** (1992). Genetic analysis of epidermin biosynthetic genes and epidermin-negative mutants of *S. epidermidis*. *Eur. J. Biochem.* **204**:1149-1154.
- Avril J. L., Dabernat H., Denis F., Monteil H.** (1992). Chapitre I : Les staphylocoques, Bactériologie clinique, Paris, p. 9-30.

B

- Baddour L. M.** (1994). Virulence factor among Gram-positive bacteria in experimental endocarditis. *Infect. Immun.* **62**:2143-2148.
- Bergdoll M. S.** (1983). Enterotoxins, In "Staphylococci and staphylococcal infections". Easmon, C. S. F., Adlam, C. (eds). London Academic Press Inc, pp. 559-598.
- Bergdoll M. S., Reiser R. F., Crass B. A., Robbins R. M., Davis J. P.** (1981). A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F associated with toxic choc syndrome from *Staphylococcus aureus* isolates. *Lancet.* **i** : p1017-1020.
- Bhakdi S., Bayley H., Valeva A., Walev L., Walker B., Weller U., Kehoe M., Palmer M.** (1996). Staphylococcal alpha-toxin, streptolysin-O, and *Escherichia coli* hemolysin: prototypes of pore-forming bacterial cytolysins. *Arch. Microbiol.* **165**:73-79.
- Bhakdi S., Trantum-Jensen J.** (1991). Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Rev.* **55**:733-751.
- Blakeslee D.** (1977). Immunofluorescence using dichlorotriazinylamino-fluorescein (DTAF). Preparation, purification and stability of the compound. *J. Immunol. Methods.* **17**:361-364.

Boden M. K., Flock J. I. (1992). Evidenced for three different fibrinogen-binding proteins with unique properties from *Staphylococcus aureus* strain Newman. *Microb. Pathog.* **57**:2358-2289-2982363.

Boden M. K., Flock J. I. (1994). Cloning and characterization of a gene for a 19 kDa fibrinogen-binding protein from *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **12**:599-606.

Brian P., Bailey L., Bailey C. J. (1993). ELISA estimation of the binding of epidermolytic toxin neonatal mouse skin. *Toxicon*, **31**:569-576.

Bychkova V., Ptitsyn O. B. (1993). The molten globulate intermediate *in vitro* and *in vivo*. *Biochem. Mol. Biol.* **4**:133-163.

C

Cavarelli J., Prévost G., Bourget W., Moulinier L., Chevrier B., Delagoutte B., Bilwes A., Mourey L., Rifai S., Piémont Y., Moras D. (1997). The structure of *Staphylococcus aureus* epidermolytic toxin A, an atypic serine protéase, at 1.7 Å resolution. *Structure*, **5**:813-824.

Chakraborty T., Schmid A., Notermans S., Benz R. (1990). Aerolysin of *Aeromonas sobria* : avidence for formation of ion-permeable channels and comparison with alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **58**:2127-2132.

Choi Y., Kotzin B., Herron L., Callahan J., Marrack P. (1989). Interaction of *Staphylococcus aureus* toxin "superantigen" with human T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**:8941-8945.

Choorit W., Kaneko J., Muramoto K., Kamio Y. (1995). Existence of a new protein component with the same function as the LukF component of leukocidin or γ -hemolysin and its gene in *Staphylococcus aureus* P83. *FEBS Lett.* **357**:260-264.

Chowdhury K. (1991). One step mini-prep method for the isolation of plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **19**:2792.

Colin D. A., Meunier O., Staali L., Prévost G., Monteil H. (1997). Bi-component leukotoxins from *Staphylococcus aureus*, Proceedings of Cold Spring Habor Laboratory on

Microbial Pathogenesis and Host Response, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 150.

Colin D. A., Prévost G., Meunier O., Sire S., Mazurier I., Supersac G. (1994). The leucocidin from *S. aureus* : physiopathology and sequence, In "Bacterial Protein Toxins", J. Freer et al (eds). Zentralblatt für Bakteriologie, Supp 24. A Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New-York, pp. 347-348.

Collier R. J. (1990). Diphtheria toxin : structure and function of a cytotoxic protein.: ADP ribosylating Toxins and G Proteins : Insights into signal transduction: Washington, American Society of Microbiology, pp3-19.

Cooney J., Kienle Z., Foster T. J., 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 F and S components of leucocidin. *Infect. Immun.* **61**:768-771.

Cordingley M. G., Callaban P. L., Sardana V. V., Garsky V. M., Colonno R. J. (1990). Substrate requirements of human rhinovirus 3C protease for peptide cleavage *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **265**:9062-9065.

Couppié P., Cribier B., Prévost G., Grosshans E., Piémont Y. (1994). Leucocidin from *Staphylococcus aureus* and cutaneous infections: an epidemiological study. *Arch. Dermatol.* **1130**:1208-1209.

Couppié P., Hommel D., Prévost G., Godart M. C., Moreau B., Sainte-Marie D., Peneau C., Hulin A., Monteil H., Pradinaud R. (1997). Septicémie à *Staphylococcus aureus*, furoncle et leucocidine de Panton et Valentine : 3 observations. *Ann. Dermatol. Vénérolog.* **124**:684-686.

Couppié P., Prévost G. (1997). Les leucotoxines staphylococciques. *Ann. Dermatol. Vénérolog.* **124**:740-748.

Cramer W. A., Heymann J. B., Schendel S. L., Deriy B. N., Cohen F. S., Elkins P. A., Stauffacher C. V. (1995). Structure-fonction of channel-forming colicins. *Biophys. Biomol. Structure*, **24**:611-641.

Cribier B., Couppié P., Finck-Barbançon V., Prévost G., Piémont Y., Grosshans E. (1992a). La leucocidine : un nouveau facteur de virulence dans les infections cutanées. *Ann. Dermatol. Vénérolog.* **119**:449.

Cribier B., Finck-Barbançon V., Prévost G., Jaulhac B., Piémont Y. (1992b). *Staphylococcus aureus* cutaneous infections: role of leucocidin in an experimental animal model. *J. Invest. Dermatol.* **98**:835.

Cribier B., Prévost G., Couppié P., Finck-Barbançon V., Grosshans E., Piémont Y. (1992c). *Staphylococcus aureus* leukocidin: a new virulence factor in cutaneous infections. *Dermatology*, **185**:175-180.

E

Emori T. G., Gaynes R. P. (1993). An overview of nosocomial infections, including the role of microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Rev.* **6**:428-442.

F

Ferreras M., Höper F., Dalla Serra M., Colin D. A., Prévost G., Menestrina G. (1998). The interaction of *Staphylococcus aureus* bi-component γ -hemolysins and leucocidins with cells and lipids membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* **1414**:108-126.

Finck-Barbançon V., Duportail G., Meunier O., 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.

Finck-Barbançon V., Prévost G., Mazurier I., Piémont Y. (1992). A structurally novel staphylococcal Protein A from V8 strain. *FEMS Microbiol. Lett.* **91**:1-8.

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.

Flandrois J. P., Courcol R., Lemeland J. F., Ramuz M., Sirot J., Soussy C. J. (1997). *Bactériologie Médicale*, Presses Universitaires de Lyon.

Fleurette J. (1989). Staphylocoques et Microcoques. *Bact. Med.* **2**:775-789.

Foster J. T., Höök M. (1998). Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiol.* **6**:484-488.

G

Gemmell C. G., Tree R., Patel A., O'Reilly M., Foster T. J. (1990). Susceptibility to opsonophagocytosis of protein A, α -haemolysin and β -toxin deficient mutants of *S. aureus* isolated by allele-replacement., In " Bacterial Protein Toxins", Rappuoli et al., eds. Zentrablatt für Bakteriologie, suppl. **21**, AGustav Fischer Verlag, Stuttgart, Iena, New-York., pp232-236.

Gladstone G. P., Van Heyningen W. E. (1957). Staphylococcal leucocidin. *Br. J. Exptl. Pathol.* **38**:125-137.

Gouaux J. E., Hobaugh M., Song L. (1998). α -hemolysin, γ -hemolysin and leukocidin from *Staphylococcal aureus*: distant in sequence but similar in structure. *Protein Sci.* **6**:2631-2635.

Gravet A., Baba Moussa L., Werner S., Staali L., Meunier O., Keller D., Colin D. A., Sanni A., Monteil H., Prévost G. (1998a). Characterization of a novel 30%-distributed staphylococcal leucotoxin and structure comparison with the other members of the toxin family. In " Bacterial Protein Toxins", J. Hacker et al. (eds). Zentrablatt für Bakteriologie, Supp. **29**, A Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Iena, New-York pp401-402 .

Gravet A., Colin D., Keller D., Girardot R., Monteil H., Prévost G. (1998b). Characterization of a novel structural member, LukE-LukD, of the bi-component staphylococcal leucotoxins family. *FEBS Lett.* **436**:202-208.

Gray G. S., Kehoe M. (1984). Primary sequence of the α -toxin gene from *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **46**:615-618.

Grojec P. (1979). Distribution of ^{131}I -labelled staphylococcal leukocidin in mouse organs. *Med. Dosw. Mikrobiol.* **31**:209-216.

H

- Habeeb A. F. S. A.** (1972). Reaction of protein sulfhydryl group with Ellman's reagent. *Method in Enzymol.* **25**:457.
- Habig W. H.** (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**:7130-7139.
- Harrisson J., Lacey R. W.** (1974). Unusual skin sepsis due to strain of multiresistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Path.* **27**:888-890.
- Hensler T., Köller M., Prévost G., Piémont Y., König W.** (1994a). GTP-binding proteins are involved in the modulated activity of human neutrophils treated by the Panton-Valentine leucocidin from *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **62**:5281-5289.
- Hensler T., Prévost G., König B., Piémont Y., Köller M., König W.** (1994b). LTB₄ and DNA fragmentation induced by leukocidin from *Staphylococcus aureus*. The protective role of GM-CSF and G-CSF on human neutrophils. *Infect. Immun.* **62**:2529-2535.
- Hildebrand A., Pohl M., Bhakdi S.** (1991). *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. Dual mechanism of binding to target cells. *J. Biol. Chem.* **266**:17195-17200.
- Holderbaum D., Hall G. S., Ehrhart L. A.** (1986). Collagen binding to *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **54**:359-364.

J

- Jaulhac B., Bes M., Bornstein N., Piémont Y., Brun Y., Fleurette J.** (1992). Synthetic DNA probes for detection of genes for enterotoxins A, B, C, D, E and for TSST-1 in staphylococcal strains. *J. Appl. Microbiol.* **72** (5):386-392.
- Jaulhac B., De Buyser M. L., Dilasser F., Prévost G., Piémont Y.** (1991). Screening of staphylococci for toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) gene. *Lett. Appl. Microbiol.* **13** (2):90-92.

Jonas D., Walev I., Berger T., Liebetrau M., Palmer M., 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.

Jonsson K., Signas C., Muller H. P., Lindberg M. (1991). Two different genes encoding fibronectin binding proteins in *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Biochem.* **202**:1041-1048.

Julianelle L. A. (1922). Studies of hemolytic staphylococci. Hemolytic activity - biochemical reactions - serologic reactions. *J. Infect. Dis.* **31**:256-284.

Jursch R., Hildebrand A., Hobom G., Trantum-Jensen J., Ward R., Kehoe M., S B. (1994). Histidine residues near the N-terminus of *Staphylococcus* alpha-toxin as reporters of regions that are critical for oligomerization of pore-formation. *Infect. Immun.* **62**:2249-2256.

K

Kamio Y., Rahman A., Nariya H., Ozawa T., and Izaki K. (1993). The two staphylococcal bi-component toxins, leukocidin and gamma-hemolysin, share one component in common. *FEBS Lett.* **321**:15-18.

Kaneko J., Kimura T., Kawakami Y., Tomita T., Kamio Y. (1997a). Pantone-Valentine genes in a phage-like particle isolated from mytomycin C-treated *Staphylococcus aureus* V8 (ATCC 49775). *Biosc. Biotech. Biochem.* **61**:1960-1962.

Kaneko J., Muramoto K., Kamio Y. (1997b). Gene of LukF-PV-like component of Pantone-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* P83 is linked with *lukM*. *Biosc. Biotech. Biochem.* **61**:541-544.

Kato I., Noda M. (1989). ADP-ribosylation of cell membrane proteins by staphylococcal α -toxin and leukocidin in rabbits erythrocytes and polymorphonuclear leucocytes. *FEBS Lett.* **255**:59-62.

König B., Köller M., Prévost G., Piémont Y., Alouf J. E., Schreiner A., König W. (1994). Activation of human effector cells by different bacterial toxins (leukocidin, alveolysin, erythrotoxicin A): generation of interleukin-8. *Infect. Immun.* **62**:4831-4837.

König B., Prévost G., Piémont Y., König W. (1995). Effects of *Staphylococcus aureus* leucocidins inflammatory mediator release from human granulocytes. *J. Infect. Dis.* **171**:607-613.

Krishnasastry M., Walker B., Braha O., Bayley H. (1994). Surface labeling of key residues during assembly of transmembrane pore formed by staphylococcal alpha-hemolysin. *FEBS Lett.* **356**:66-71.

Kuusuela P. (1978). Fibronectin binds to *Staphylococcus aureus*. *Nature*, **276**:718-720.

Kuypers J. M., Proctor R. A. (1989). Reduced adherence to traumatized rat heart valves by low fibronectin-binding mutant of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **57**:2306-2312.

L

Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, **227**:680-685.

Lakey J., Duché D., Gonzalez-Manas J. M., Baty D., Pattus F. (1993). Fluorescence energy transfer distance measurements. The hydrophobic helical hairpin of colicin A in the membrane bound state. *J. Mol. Biol.* **230**:1055-1067.

Lakey J. H., Parker M. W., Gonzales-Manas J. M., Duché D., Vriend G., Baty D., Pattus F. (1994). The role of electrostatic charge in the membrane insertion of colicin A. Calculation and mutation. *Eur. J. Biochem.* **220**:155-163.

Lesieur C., Vécsey-Semjen B., Abrami L., Fivaz M., van der Goot F. G. (1997). Membrane insertion : the strategies of toxins. *Mol. Memb. Biol.* **14**:45-64.

Li J. (1992). Bacterial toxins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**:545-556.

Li J., Koni P., Ellar D. J. (1996). Structure of moquistocidal δ -endotoxin CytB from *Bacillus thurengiensis* sp. *Kyushuensis* and implications for membrane pore formation. *J. Mol. Biol.* **257**:129-152.

Li J. D., Carroll J., Ellar D. J. (1991). Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 25 Å resolution. *Nature*, **353**:815-821.

Linder R., Bernheimer A. W. (1991). Comparative toxinology of bacterial and invertebrate cytolytins, *In* "Source Book of Bacterial protein Toxins", Alouf, J. E., Freer, J. H., eds., San Diego, Academic Press Inc., pp. 107.

Lofdahl S., Guss B., Uhlen M., Philipson L., Lindberg M. (1983). Gene for staphylococcal protein A (cloning/DNA sequence determination/signal peptide/expression. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* **80**:697-701.

London E. (1992). How bacteria protein toxins enter cell; the role of partial unfolding in membrane translocation. *Mol. Microbiol.* **6**:3277-3282.

Lopes J. D., Reis M. D., Brentani R. R. (1985). Presence of laminin receptors in *Staphylococcus aureus*. *Science.* **229**:275-277.

M

Maleville J., Tael A., Massicot P. (1990). Affections bactériennes communes., *in* Saurat, J. H., Grosshans, E., Laugier, P., Lachapelle, J. M., eds., Dermatologie et Vénérologie, Fribourg, p. 106-119.

Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. (1989). Molecular cloning / A laboratory Manual. *Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, New York.* **2nd Ed.**

McDevitt D., Vaudaux P., Forster T. J. (1992). Genetic evidence that bound coagulase of *Staphylococcus aureus* is not clumping factor. *Infect. Immun.* **60**:1514-1523.

Menzies B. E., Kernodle D. S. (1994). Site-directed mutagenesis of the alpha-toxin gene of *Staphylococcus aureus*: role of histidines in toxin activity in vitro and in a murine model. *Infect. Immun.* **62**:1843-1847.

Meunier O., Falkenrodt A., Monteil H., Colin D. A. (1995). Application of flow cytometry in toxinology: pathophysiology of human polymorphonuclear leucocytes damaged by a pore-forming toxin from *Staphylococcus aureus*. *Cytometry*, **21**:241-247.

Meunier O., Ferreras M., F. H., Baba Moussa L., Monteil H., Colin D. A., Menestrina G., Prévost G., Supersac G. (1997). A predicted β -sheet from class S components of staphylococcal γ -hemolysin is essential for the secondary interaction of the class F component. *Biochim. Biophys. Acta.* **1326**:275-289.

Möllby R. (1989). Isolation and properties of membrane damaging toxins., In "Staphylococci and staphylococcal infections". Easmon, C. S. F., Adlam, C., (eds). London, Academic Press. Inc., pp 617-669.

Montecucco C., Papini E., Schiavo G. (1994). In "Bacterial Protein Toxins" penetrate cell via four-step. *FEBS Lett.* **346**:92-98.

Morgan P. J., Varley P. G., Rowe A. J., Andrew P. W., Mitchell T. J. (1993). Characterization the solution properties and conformation pneumolysin, the membrane damaging toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Bioch. J.* **296**:671-674.

N

Nariya H., Nishiyama A., Kamio Y. (1997). Identification of the minimal segment in which the threonine 246 residue is a potential phosphorylated site by protein kinase A for the LukS-specific function of staphylococcal leukocidin. *FEBS Lett.* **415**:96-100.

Noda M., Kato I., Matsuda F., Hyrayama T. (1980). Fixation and inactivation of staphylococcal leukocidin by phosphatidylcholine and ganglioside GM1 in rabbit polymorphonuclear leucocytes. *Infect. Immun.* **29**:678-684.

Noda M., Kato I., Matsuda F., Hyrayama T. (1981). Mode of action of staphylococcal leukocidin: relationship between binding of ¹²⁵I-labeled S and F components of leukocidin to rabbit polymorphonuclear leucocytes and leukocidin activity. *Infect. Immun.* **34**:362-367.

Nussenblatt R. B., Palestine A. G., Chan C. C., Roberge F. (1985). Standardization of vitreal inflammatory activity in intermediate and posterior uveitis. *Ophthalmology*, **92**:467-471.

O

Ozawa T., Kaneko J., Kamio Y. (1995). Essential binding of LukF of staphylococcal γ -hemolysin followed by the binding of HgII for the hemolysis of human erythrocytes. *Biosc. Biotech. Biochem.* **59**:1181-1183.

P

Palmer M., Jursch R., Weller U., Valeva A., Hilgert K., Kehoe M., Bhakdi S. (1993). *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. *J. Biol. Chem.* **268**:11959-11962.

Panton P. N., Valentine F., C.O (1932). Staphylococcal toxin. *Lancet*, **222**:506-508.

Parker M. W., Buckley J. T., Postma J. P. M., Tucker A. D., Leonard K., Pattus F., Tsernoglou D. (1994). Structure of the *Aeromonas* toxin proaerolysin in its water-soluble and membrane channel states. *Nature*, **367**:292-295.

Parker M. W., Pattus F. (1993). Rendering a membrane protein soluble in water ; a common packing motif in bacterial protein toxin. *Trends. Biochem. Sci.* **18**:391-395.

Parker M. W., Pattus F., Tucker A. D., Tsermoglou D. (1989). Structure of the membrane pore-forming fragment of colicin A. *Nature*, **337**:93-96.

Parker M. W., Tucker A. D., Tsernoglou D., Pattus F. (1990). Insights into membrane insertion based on studies of colicins. *Trends. Biochem. Science*, **15**:126-129.

Patel A. H., Nowlan P., Weavers E. D., Foster T. J. (1987). Virulence of protein A-deficient mutants of *Staphylococcus aureus* isolated by allele-replacement. *Infect. Immun.* **55**:3103-3110.

Patti J. M., Bremell T., Krajewska-Pietrasik D., Abdelnour A., Tarkowski A., Ryden C., Höök M. (1994). The *Staphylococcus aureus* collagen Adhesin is a virulent determinant in experimental septic arthritis. *Infect. Immun.* **62**:152-161.

- Patti J. M., House-pompeo K., Boles J. O., Garza N., Gurusiddappa S., Höök** (1995). Critical residues in the ligand-binding site of the *Staphylococcus aureus* collagen-binding adhesin (MSCRAMM). *J. Biol. Chem.* **270**:152-161.
- Pédelacq J. D., Maveyraud L., Prévost G., Baba-Moussa L., González A., Courcelle E., Shepard W., Monteil H., Samama J. P., Mourey L.** (1999). The structure of *Staphylococcus aureus* leucocidin component (LukF-PV) reveals the fold of the water-soluble species of a family of transmembrane pore-forming toxins. *Structure*, **7**:277-287.
- Perrin S., Gilliland G.** (1990). Site specific mutagenesis using asymmetric polymerase chain reaction and a single mutant primer. *Nucleic Acids Res.* **18**:7433-7438.
- Peterson P. K., Verhoef J., Sabath L. D., Quie P. G.** (1977). Effect of protein A on staphylococcal opsonisation. *Infect. Immun.* **15** : 760-764.
- Petosa C., Collier R. J., Klimpel K. R., Leppla S. H., Liddington R. C.** (1994). Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen. *Nature*, **385**:833-838.
- Piémont Y., Rasoamananjara D., Fouace J. M., Bruce T.** (1984). Epidemiological investigation of exfoliative toxin producing *Staphylococcus aureus* strains in hospitalized patients. *J. Clin. Microbiol.* **19**:417-420.
- Piémont Y., Rifai S., Monteil H.** (1988). Les exfoliatines de *Staphylococcus aureus*. *Bull. Inst. Pasteur*, **86**:263-296.
- Plommet M.** (1988). Purification of staphylococcal gamma-hemmolysin. *Methods in Enzymol.* **165**:8-16.
- Prévost G., Bouakham T., Piémont Y., Monteil H.** (1995a). Characterization of a synergohymenotropic toxin from *Staphylococcus intermedius*. *FEBS Lett.* **376**:135-140.
- Prévost G., Colin D. A., Staali L., Baba Moussa L., Gravet A., Werner S., Sanni A., Meunier O., Monteil H.** (1998). Les leucotoxines formant des pores de *Staphylococcus aureus* : variabilité des cellules-cible et deux processus pharmacologiques. *Pathol. Biol.* **46**:435-441.

Prévost G., Couppié P., Prévost P., Gayet S., Petiau P., Cribier B., Monteil H., 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., Piémont Y. (1995c). Panton-Valentine leucocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infect. Immun.* **63**:4121-4129.

Prévost G., Pottecher B., Dahlet M., Bientz M., Mantz J. M., Piémont Y. (1991). Pulsed field gel electrophoresis as a new epidemiological tool for monitoring methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care unit. *J. Hosp. Infect.* **17**:255-269.

R

Rahman A., Isaki K., Kato I., Kamio Y. (1991). Nucleotide sequence of leucocidin S-component gene (*lukS*) from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**:138-144.

Rahman A., Nariya H., Isaki K., Kato I., Kamio Y. (1992). Molecular cloning and nucleotide sequence of leucocidin F-component gene (*lukF*) from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**:640-646.

Rifaï S., Barbançon V., Prévost G., Piémont Y. (1989). Synthetic exfoliative toxin A and B DNA probes for detection of toxigenic *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.* **27**:504-506.

Ritter von Rittershain G. (1878). Die exfoliative Dermatitis jüngerer Säuglinge. *Cent. Z. Kinderheilkd.* **2**:3-23.

Ryden C., Yacoub A. L., Maxe L, D H., Oldberg A., Franzen A., A L., Rubin K. (1989). Specific binding of bone sialoprotein to *Staphylococcus aureus* isolated from patients with osteomyelitis. *Eur. J. Biochem.* **184**:331-336.

S

- Saiki R. K., Gelfaud D. H., Stoeffel S., Scharf S., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Ehrlich H. A.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**:487-491.
- Sanger F., Niklen S., Coulson A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **74**: 5463-5467.
- Sato H., Matsumori Y., Tanabe T., Saito H., Shimizu A., Kawano J.** (1994). A new type of staphylococcal exfoliative toxin from a *Staphylococcus aureus* isolated from a horse with phlegmon. *Infect. Immun.* **62**:3780-3785.
- Schulz G. E.** (1996). Porins : general to specific, native to engineered passive pores. *Struct. Biol.* **6**:485-490.
- Signas C., Raucci G., Jonsson K., Lindgren P. E., Anantharamaiah G. M., Höök M., Lindberg, M .** (1989). Nucleotide sequence of the gene for a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus* : use of this peptide sequence in synthesis of biological active peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **86**:699-703.
- Smith D. B., Johnson K. S.** (1988). Single step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusion protein with glutathion S-transferase. *Gene*, **67**:31-40.
- Soboll H.** (1971). Pantone-Valentine-Leukozidin bei Staphylokokken vom Rind: Ph d thesis.
- Song L., Hobaugh M. R., Shustak C., Cheley S., Bayley H., Gouaux J. E.** (1996). Structure of staphylococcal α -hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science*. **274**:1859-1866.
- Sosin D. M., Gunn R. A., Ford W. L., Skaggs J. W.** (1989). An outbreak of furunculosis among high school athletes. *Am. J. Sports Med.* **17**:828-832.
- Speziale P., Raucci G., Visai L., Swiltalski L. M., Timpl R., Höök M.** (1986). Binding of collagen to *Staphylococcus aureus* Cowan 1. *J. Bacteriol.* **167**:77-81.

- Staali L., Monteil H., Colin D. A.** (1998). The pore-forming leukotoxins from *Staphylococcus aureus* open Ca²⁺ channels in human polymorphonuclear neutrophils. *J. Memb. Biol.* **162**:209-216.
- Sugarawa N., Tomita T., Kamio Y.** (1997). Assembly of *Staphylococcus aureus* γ -hemolysin into a pore-forming ring-shaped complex on the surface of human erythrocytes. *FEBS Lett.* **410**:333-337.
- Supersac G., Piémont Y., Kubina M., Prévost G., Foster T. J.** (1998). Assessment of the role of gamma-toxin in experimental endophthalmitis using a Δhlg deficient mutant of *Staphylococcus aureus*. *Microb. Pathog.* **24**:241-225.
- Supersac G., Prévost G., 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.
- Surgalla M. J., Dack G. M.** (1955). Enterotoxin produced by micrococci from cases of enteritis after antibiotic therapy. *J.A.M.A.* **158**:649-650.
- Switalski L. M., Patti J. M., Butcher W., Gristina A. G., Speziale P., Höök M.** (1993). A collagen receptor of *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with septic arthritis mediates adhesion to cartilage. *Mol. Microbiol.* **7**:99-107.
- Szmigielski S., Jeljaszewicz J.** (1976). Stimulatory effect of staphylococcal leukocidin on granulopoiesis disturbed by cytostatic agents. *Cancer Lett.* **1**:299-303.
- Szmigielski S., Jeljaszewicz J., Wiszinski J., Korbecki M.** (1966). Reaction of rabbit leucocytes to staphylococcal (Panton-Valentine) leukocidin *in vivo*. *J. Path. Bacteriol.* **84**:599-604.
- Szmigielski S., Jeljaszewicz J., Zak C.** (1968). Leucocyte system of rabbits receiving repeated doses of staphylococcal leukocidin. *Path. Microbiol.* **31**:328-336.

T

Taylor A. G., Bernheimer A. W. (1974). Further characterization of staphylococcal gamma-hemolysin. *Infect. Immun.* **10**:54-59.

Todd J. K. (1988). Toxic Shock Syndrome. *Clin. Microbiol. Rev.* **1**:432-446.

Tomita T., Kamio Y. (1997). Molecular biology of pore-forming cytolysins from *Staphylococcus aureus* α - and γ -hemolysins and leukocidin. *Biosc. Biotech. Biochem.* **61**:565-572.

Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from acrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **76**: 4350-4354.

Traut R. R., Casino C., N Z. (1989). Cross-linking of protein subunits and ligands by the introduction of disulphide bonds. In "Protein function", TE Creighton ed. IRL Press, pp. 127.

V

Valeva A., M P., Hilgert K., Kehoe M., Dhakdi S. (1995). Correct oligomerisation of is prerequisite for insertion of the central molecular domain of staphylococcal alpha toxin into the lipid bilayer. *Biochim. Biophys. Acta.* **1236**:213-218.

Valeva A., Weisser A., Walker B., Kehoe M., Bayley H., Bhakdi S., Palmer M. (1996). Molecular architecture of a toxin pore : a 15-residue sequence lines the transmembrane channel of staphylococcal alpha toxin. *EMBO J.* **15**:1857-1864.

van der Goot F. G., Lakey J. H., Pattus F. (1992). The molten globule intermediate for protein insertion or translocation through membranes. *Trends. Cell. Biol.* **2**:343-348.

Van der Velde H. (1894). Etude sur le mécanisme de la virulence du staphylocoque pyogène. *La Cellule*, **10**:401-460.

Van der Vijver J. C. M., van Es-Boon M., Michel M. F. (1972). Lysogenic conversion in *Staphylococcus aureus* to leucocidin production. *J. Virol.* **10**:318-319.

W

Walker B., Bayley H. (1995). Restoration of pore-forming activity in staphylococcal alpha-hemplysin by targeted covalent modification. *Protein Eng.* **8**:491-495.

Walker P. A., Leong L. E., Ng P. W., Tan S. H., Waller, S, Murphy D., Porter A. G. (1994). Efficient and rapid affinity purification of proteins using recombinant fusion proteases. *Biotechnology*, **12**:601-605.

Ward J. R., Palmer M., Leonard K., Bhakdi S. (1994). Identification of putative membrane-inserted segment in the alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry*, **33**:7477-7484.

Ward P. D., Turner W. H. (1980). Identification of Panton-Valentine leukocidin as a potent dermonecrotic toxin. *Infect. Immun.* **28**:393-397.

Wiener M., Freymann D., Ghosh P., Stroud R. M. (1997). Crystal structure of colicin Ia. *Nature*, **385**:391-395.

Woodin A. M. (1960). Purification of the two components of leukocidin from *Staphylococcus aureus*. *Biochem. J.* **75**:158-165.

Woodin A. M. (1962). The extrusion of protein from the rabbit polymorphonuclear leukocyte treated with staphylococcal leukocidin. *Biochem. J.* **82**:9-15.

Woodin A. M. (1972a). Adenylate cyclase and the function of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate in the leukocidin-treated leucocyte. *Biochem. Biophys. Acta.* **286**:406-415.

Woodin A. M. (1972b). The staphylococcal leukocidin, *The staphylococci*, p. 281-289.

Woodin A. M., Wieneke A. A. (1963a). The accumulation of calcium by the polymorphonuclear leukocyte treated with staphylococcal leukocidin and its significance in the extrusion of protein. *Biochem. J.* **87**:487-495.

Woodin A. M., Wieneke A. A. (1963b). The incorporation of radioactive phosphorus in the leucocyte during the extrusion of proteins induced by staphylococcal leucocidin. *Biochem. J.* **87**:480-487.

Woodin A. M., Wieneke A. A. (1964). The participation of calcium, adenosine triphosphate and adenosine triphosphatase in the extrusion of granule proteins from polymorphonuclear leucocyte. *Biochem. J.* **90**:498-509.

Woodin A. M., Wieneke A. A. (1967). The participation of phospholipids in the interaction of leukocidin and the cell membrane of the polymorphonuclear leucocyte. *Biochem. J.* **105**:1029-1038.

Woodin A. M., Wieneke A. A. (1968). The cation-sensitive phosphatases of the leucocyte cell membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **33**:558-562.

Wright J. (1936). Staphylococcal leukocidin (Neisser - Weschberg type) and antileucocidin. *Lancet*, **230**:1002-1004.

Wuepper K. D., Dimond R. L., Knutson D. (1975). Study of the mechanism of epidermal injury by a staphylococcal epidermolytic toxin. *J. Invest. Dermatol.* **65**:191-200.

Y

Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J. K. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strain : nucleotide sequence of M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, **33**:103-119.

LISTE DES FIGURES ET DES TABLES

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 :** *Staphylococcus aureus* et ses composants externes p 10
- Figure 2 :** Modèle de l'interaction des superantigènes (sAg) et des antigènes (Ag) avec les récepteurs des cellules T et les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (Hla DR) de classe II (MHC) portées par les cellules présentatrices de l'antigène (APC) P 14
- Figure 3 :** Schéma de formation des pores par les colicines. La structure exacte du canal ouvert n'est pas encore déterminée, de même que le nombre d'hélices qui pénètrent la membrane sous l'influence du potentiel de membrane d'après Lesieur p 19
- Figure 4 :** Structure tridimensionnelle de la proaérollysine obtenue à 2,8 Å de résolution d'après Parker (Parker et al., 1994). Cette protéine de 52 kDa sera activée et perdra son domaine I par une protéolyse de type furine. La structure du pore formé par cette toxine n'est pas encore élucidée. p 21
- Figure 5 :** Structure tridimensionnelle, obtenue à une résolution de 2,6 Å, du pore formé par le facteur PA ("Protective Antigen") de la toxine du charbon ou anthrax; d'après Petosa p 22
- Figure 6 :** Structure tridimensionnelle du pore formé par l'alpha-toxine de *Staphylococcus aureus* obtenue avec une résolution de 2, Å. A p 24
- Figure 7 :** La famille des leucotoxines de Staphylocoques : Schéma des différentes combinaisons des gènes chromosomiques codants et leur fréquence p 27
- Figure 8 :** Identités de séquence entre les protéines de classe S et les protéines de classe F des leucotoxines à deux composés de staphylocoques, et l'α-toxine p 30
- Figure 9 :** Mode d'action des leucotoxines à deux composés de staphylocoques. p 33
- Figure 10a :** Représentation schématique des vecteurs pUC18 et pUC19 qui se distinguent par leur cassette de clonage. p 39
- Figure 10b :** Représentation schématique des vecteurs pCU1 p 39
- Figure 11 :** Représentation schématique des vecteurs d'expression pGEX 6P qui se distinguent par la situation de la cassette de clonage par rapport à la phase de lecture. p 41

Figure 12 : Principe de la mutagenèse dirigée utilisant une réaction asymétrique de polymérisation en chaîne. Le vecteur pCRTMII possède les gènes de résistance à l'ampicilline (<i>bla</i>) et à la kanamycine (<i>kan</i>), ainsi que les origines de réplique de l'épisome f1 et du cosmide ColE1	p 48
Figure 13 : Principe de la mutagenèse dirigée selon la méthode Quick Change™ Mutagenesis (Stratagene).	p 50
Figure 14 : Séparation des cellules sanguines humaines	p 62
Figure 15 : Représentation schématique du cytomètre en flux FacSort®	p 64
Figure 16 : Alignement des séquences peptidiques des composés de classe S	p 71
Figure 17 : Prédiction de structure secondaire selon la méthode Chou et Fasman pour les mutants LukS-PV Gly10Cys et Ser22Cys.	p 88
Figure 18 : Profils électrophorétiques des protéines LukS-PV Gly10Cys et Ser22Cys purifiées, en conditions dénaturantes : SDS-PAGE.	p 88
Figure 19 : Analyse par cytométrie en flux de la lyse cellulaire provoquée par les protéines mutées LukS-PV Gly10Cys et Ser22Cys.	p 90
Figure 20 : Electrophorèse en conditions dénaturantes des protéines LukS-PV	p 91
Figure 21A et B : Activités biologiques du dimère de LukS-PV Gly10C et LukS-PV	p 93
Figure 22A et B : Activités biologiques des mutants de LukS-PV	p 95
Figure 23 : Représentation schématique de la structure tridimensionnelle de LukF-PV (d'après Pedelacq, 1998)	p 111

LISTE DES TABLES

Table 1 : Séquences oligonucléotidiques utilisées pour les mutagenèses dirigées par PCR asymétrique	P 88
Table 2 : Etude de l'accessibilité des résidus cystéines de LukS-PV Gly10Cys et LukS-PV Ser22Cys au DTNB	P 91

RESUME

Mécanisme d'action des leucotoxines à deux composés de *Staphylococcus aureus* : oligomérisation et découplage de l'activité formant des pores. Approche épidémiologique des infections à *Staphylococcus aureus* en Afrique de l'Ouest.

S.aureus est une bactérie pathogène importante de l'homme. Parmi les facteurs de virulence produits par cette bactérie, les leucotoxines sont des toxines à deux composés, l'un dit de classe S et l'autre dit de classe F, qui agissent en synergie de façon séquentielle. Notre travail de thèse a porté sur l'étude du mode d'action de ces toxines. Les alignements de séquence et les prédictions de structure secondaire par la méthode de Chou et Fasman, ont permis de montrer, grâce à des techniques telles que la mutagenèse dirigée, la cytométrie en flux, la spectrofluorométrie, qu'un acide aminé Thr28 situé dans un feuillet β de 13 acides aminés conservé à l'extrémité N-terminale des composés S est essentiel pour l'interaction entre les monomères et donc pour l'activité biologique des leucotoxines. D'autre part, la structure du composé LukF-PV a été obtenue avec une résolution de 2 Å en collaboration avec le Laboratoire de Cristallographie Biologique du Dr J.P. Samama (IPBS Toulouse). Celle-ci apporte la vision d'une toxine formant des pores à l'état hydrosoluble. Ces toxines possèdent deux fonctions principales, l'une activatrice et l'autre perméabilisante que nous avons réussi à découpler grâce à l'obtention de mutants déficients dans la seconde de ces deux fonctions. Ces protéines mutées dont l'activité formant des pores est très diminuée sont très faiblement dermonécrotiques et faiblement inflammatoires lorsqu'elles sont injectées dans l'humeur vitrée de lapin. Cependant, elles induisent la sécrétion d'interleukine-8 à un niveau comparable à celui de la LPV. De telles toxines mutantes pourraient permettre d'envisager leurs applications dans des biotechnologies comme stimulateurs de l'immunité.

Enfin notre enquête épidémiologique sur les infections à *S. aureus* en Afrique de l'Ouest révèle d'une part une écologie différente des souches de *S. aureus* productrices de leucotoxines et d'autre part une expression différente des infections s'expliquant probablement par un système de santé et un état sanitaire spécifique aux pays en voie de développement.

Mots-clés : *Staphylococcus aureus*, leucocidine de Panton et Valentine, polynucléaire neutrophile, oligomérisation, structure-fonction, activation, formation des pores.