

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

EA-7290 Virulence bactérienne précoce

THÈSE présentée par :

Viola MAZZOLENI

soutenue le : **30 juin 2020**

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

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

**La Leucocidine de Panton-Valentine initie une
forme alternative de NETose qui passe par la
voie mitochondriale**

THÈSE dirigée par :

Dr. PRÉVOST Gilles

MCU-PH, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Pr. DECKER Patrice

PR PU, Université Sorbonne Paris Nord, Bobigny

Pr. DE CHAISEMARTIN Luc

MCF-MCUPH, Hopital Bichat-Claude Bernard, Paris

Pr POTTECHER Julien

PR PUPH, Hôpital universitaire Hautpierre, Strasbourg

MAZZOLENI Viola

viola.mazzoleni@etu.unistra.fr

Université de Strasbourg- EA7290 Virulence bactérienne précoce
Institut de Bactériologie de la Faculté de Médecine- 3, rue Koeberlé
67000 Strasbourg, FRANCE

A mia nonna Lora, che sapeva vedere la matematica e i numeri presenti in
ogni cosa.

E agli esami, *che non finiscono mai*: salute!

À Lora, ma grand-mère, qui savait voir les mathématiques et les nombres
présents en toutes choses.

Et aux examens, qui ne se terminent jamais dans la vie : santé !

Remerciements

Je m'adresse au jury de thèse, Pr. Decker Patrice, Pr. De Chaisemartin Luc, Pr Pottecher Julien. Je tiens à vous remercier pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse et pour faire partie du jury. J'espère que ce manuscrit et mon exposé seront à la hauteur de vos attentes. J'ai essayé de faire de mon mieux, avec toute la passion qui me caractérise et que j'espère vous retrouverez en lisant mon travail.

Cette thèse a été soutenue par une bourse du ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche, par l'Université de Strasbourg et par la Faculté de médecine, qui m'a accordé un contrat supplémentaire de 5 mois.

Ce travail doctoral a vu la lumière grâce à différentes personnes que je tiens ici à remercier de tout mon cœur.

Tout d'abord je souhaite remercier la personne qui a cru en moi et en mes capacités dès le début, alors que j'étais fraîchement arrivée d'Italie avec mon petit diplôme en Physiopathologie dans une main, et une grande peur pour mon avenir dans l'autre. Je remercie donc le Docteur Gilles Prévost pour m'avoir accueillie au sein de son équipe, pour m'avoir permis de m'occuper de ce sujet de recherche, la NETose, qui m'a tout de suite énormément plu et passionnée. Je le remercie pour le temps qu'il m'a accordé, pour les corrections, les discussions, pour avoir écouté mes idées et mes hypothèses, pour tous les congrès auxquels il m'a permis de participer et pour m'avoir donné l'espoir qu'un jour je pourrai devenir la chercheuse que je rêve d'être.

Je remercie énormément toute mon équipe de laboratoire :

Daniel Keller, pour son soutien, son expérience et professionnalité, sa patience et son immense gentillesse. Notamment, je le remercie pour m'avoir appris tout ce qui est l'expression et la purification des leucotoxines et ses conseils concernant les Western blot. Je n'oublierai jamais cette belle personne qui va sûrement me manquer.

Kevin Prola, pour sa disponibilité, courtoisie, son aide et ses mots gentils qui ont souvent soulagé mon inquiétude. J'espère le meilleur pour toi et je sais que tu vas réussir sans aucun problème. Dernière ligne droite !

Je remercie également Elodie Olivares pour les échanges scientifiques, pour son soutien et ses conseils précieux. J'ai vraiment apprécié ton support et nos discussions m'ont apporté beaucoup !

À tous les membres de l'EA7290 (ou UR7290, désormais !) : le Professeur Benoît Jaulhac, Nathalie Boulanger, Frédéric Schramm, Philippe Riegel, François Jehl, Emilie Talagrand-Reboul, Antoine Grillon, Pierre Boyer, avec qui j'ai eu l'occasion de travailler, notamment lors des Travaux pratiques pour les étudiants en médecine, un grand merci ! Non seulement l'expérience d'enseignement m'a enrichie d'un point de vue professionnel, mais je rappellerai toujours avec plaisir votre disponibilité et gentillesse.

Je remercie tous mes collègues, présents et passés, notamment Gaëlle Zimmermann qui m'a encadrée et aidée au début de ma formation au laboratoire et qui ne me nie jamais un conseil ou tout simplement son écoute. Merci à Ivan Tarassov et Anna Smirnova de l'Institut de Physiologie et de Chimie Biologique (IPCB) pour notre belle et efficace collaboration. Je suis heureuse d'avoir pu apprendre autant de vous, notamment concernant la microscopie confocale. Merci de m'avoir rendue autonome si rapidement et pour votre disponibilité.

Je remercie les « nouveaux arrivés » aussi et je dis un grand merci à mes nombreux stagiaires et aux étudiants auxquels j'ai pu apprendre quelque chose pendant les cours de Bio-

informatique et les TP de Bactériologie. Vous m’avez probablement appris plus que j’ai pu vous enseigner.

Merci à Angéla Gonzales et Christine Keyser, pour m’avoir accueillie dans l’Institut de médecine légale de Strasbourg pour effectuer un stage de découverte très passionnant et enrichissant. Grâce à vous, j’ai appris beaucoup plus sur cet aspect de la biologie qui m’a toujours autant attirée, et qui ne cesse pas de me motiver.

Merci au personnel de l’Établissement Français du sang de Strasbourg : des personnes souriantes et agréables qui ont dû pas mal rigoler pour les innombrables matins où j’appelais pour demander un « buffy coat », prononcé à l’américaine. Non, je ne le prononcerai jamais à la française, désolée ☺

Mais sortons du labo, maintenant ! À mon merveilleux compagnon Corrado Lotta vont les remerciements les plus profonds et sincères et probablement un million de « pardon » ne suffirait jamais pour toute l’anxiété, les peurs, le stress, les discussions, les larmes. Tu as toujours été là. Tu m’as tenue contre toi, comme je t’avais demandé au début, malgré tout ce qui nous est arrivé. Cette thèse ne serait pas là sans toi. E se vuoi te lo dico anche in italiano : grazie, amore mio ! In sardo però non lo so ancora dire... ! ☺

À mes parents : ils m’ont laissée partir, ils ne se sont jamais opposés à mes décisions de vie et ils ont été toujours disponibles en cas de besoin. Mais surtout, ils m’ont laissée libre. « Aucun parent ne doit vouloir le mieux pour son fils. Et vous savez pourquoi ? Parce qu’il ne sait pas quel est le mieux pour lui ». Vous me l’avez appris concrètement et ça vaut plus que l’or.

Merci à mes amis les plus chers, dont Vincent Denimal *at the top of the list*. Vous avez préservé ma santé mentale et mon sourire. C’est tout ce dont on a besoin pour bien travailler et, à plus grande échelle, pour bien vivre sa vie. Vincent, je te dois au moins 1000 *carbonaras* et 2000 parmesans !

In fine, je remercie ma grand-mère Loredana, dont je serai toujours très fière. Professeur de mathématiques, j’ai retrouvé son manuscrit de thèse Noël dernier, par hasard. Elle nous a quitté à la fin de mon Master 2 pendant que j’étais à Strasbourg, en train de me préparer pour le concours de l’École Doctorale. Je n’ai pas pu être présente à son enterrement, mais je veux croire qu’elle m’a pardonnée.

Cette thèse est pour elle.

Table des matières

Remerciements	ii
Table des matières	iv
1 INTRODUCTION	1
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>.....	2
1.1.1 « Carte d'identité » de la bactérie.....	2
1.1.2 Pourquoi s'intéresser de <i>S. aureus</i> ? Les pathologies associées	4
1.1.3 Traitements existants	10
1.1.4 Avoir un problème pour chaque solution : les facteurs de virulence de <i>S. aureus</i> ciblent chaque niveau de l'immunité humaine	15
1.1.5 Les leucotoxines bicomposées et les pathologies associées.....	39
1.1.6 Les γ -hémolysines AB et CB (HlgAB et HlgCB) et la Leucocidine de Panton et Valentine (LPV) : les « chevaliers noirs » - la famine- et le « chevalier pâle » - la mort-.....	48
1.2 LA NETOSE	56
1.2.1 Le neutrophile humain : le fantassin de notre immunité	56
1.2.2 La NETose et ses « déclinaisons »	70
1.2.3 NETose et la LPV de <i>S. aureus</i> : « the butler did it ! »	89
1.3 OBJECTIFS DE LA THÈSE	92
2 MATERIELS ET METHODES	94
2.1 Préambule	94
2.2 SOLUTIONS ET TAMPONS PRÉPARÉS AU LABORATOIRE ..	94
2.2.1 PURIFICATION ET CULTURE DE NEUTROPHILES HUMAINS	94
2.2.2 PURIFICATION DES TOXINES BACTERIENNES.....	95
2.2.3 WESTERN BLOT	95
2.2.4 IMAGERIE.....	96
2.3 ANTICORPS PRIMAIRES UTILISÉS	97
2.4 ANTICORPS SECONDAIRES UTILISÉS.....	98
2.5 SONDAS FLUORESCENTES	98
2.6 INDUCTEURS ET INHIBITEURS PHARMACHOLOGIQUES...	99
2.7 TECHNIQUES EMPLOYÉES	100
2.7.1 Purification des neutrophiles humains	100
2.7.2 Expression et purification des leucotoxines	102
2.7.3 Microscopie en épifluorescence.....	105
2.7.4 Western Blot	110
2.7.5 Cytométrie en flux	115

2.7.6	Microscopie confocale	118
2.7.7	Vidéo-microscopie	120
2.7.8	Quantification	121
2.7.9	Statistiques	128
3	RESULTATS	129
3.1	NETose : de l'image à la quantification	129
3.1.1	Introduction	129
3.1.2	Résultats qualitatifs	132
3.1.3	Résultats quantitatifs et statistiques	137
3.1.4	Discussion	138
3.1.5	Perspectives	139
3.2	Dérivés réactifs de l'oxygène : <i>it's not only a NADPH oxidase issue</i> 141	
3.2.1	Introduction	141
3.2.2	Résultats quantitatifs et statistiques	149
3.2.3	Discussion	150
3.3	Quand les résidus arginines sont déiminés : la voie de signalisation intracellulaire, la citrulline, et le destin mitochondrial de la LPV	153
3.3.1	Introduction	153
3.3.2	Kinases, autophagie et canal SK3	153
3.3.3	L'histone H3 citrullinée par la PAD4	162
3.3.4	Voyage de la LPV dans le neutrophile humain : un passage à la mitochondrie ?	168
4	PUBLICATIONS	173
4.1	Abstract publié dans le journal « Toxicon »	174
4.2	Article en phase de révision, soumis au journal « The FASEB Journal »	175
5	CONCLUSION GÉNÉRALE	220
5.1	La NETose et <i>S. aureus</i> : une offensive stratégique via la LPV ?... ..	220
5.2	Questions ouvertes et perspectives	223
5.3	Vue générale sur la NETose : la « femme fatale » de l'immunité... ..	225
6	BIBLIOGRAPHIE	228
6.1	ARTICLES ET REVUES	275
6.2	LISTE DES COMMUNICATIONS ORALES ET PAR AFFICHES 276	
	Résumé	1
	Abstract	1

Liste des figures

Figure 1 - Staphylococcus aureus observé après coloration de Gram.	2
Figure 2- Ligne du temps représentant l'apparition des thérapies antibiotiques et l'émergence des résistances aux antibiotiques chez S. aureus. Adapté de (McGuinness et al., 2017)	12
Figure 3- Transfert vertical et horizontal des gènes de virulence. Adapté de (Malachowa et al., 2010).	18
Figure 4- Acquisition des éléments génétiques mobiles de S. aureus.	19
Figure 5- Disposition classique en trois lignes de l'infanterie romane.	24
Figure 6- Représentation schématisée des trois voies de la cascade du complément.	25
Figure 7- Évasion bactérienne de la reconnaissance de la cascade du complément (a) et de l'opsonisation (b).	27
Figure 8- Modèle proposé illustrant l'invasion bactérienne et la formation de bulles cutanées provoquées par les ET de S. aureus. Adapté de (Oliveira et al., 2018).	31
Figure 9- Mode d'action des superantigènes (SAg).	34
Figure 10- Les différentes leucotoxines produites par S. aureus et leurs caractéristiques.	36
Figure 11- L'α-hémolysine de S. aureus.	37
Figure 12- Mécanisme d'action de l'α-hémolysine (Hla).	38
Figure 13- Organisation génétique de la LPV (et de la LukED), de la γ-hémolysine (HlgABC) et de LukAB.	40
Figure 14- Les leucotoxines à deux composés sont produites sous forme de monomères hydrosolubles qui vont interagir en s'oligomérisant aux cellules cibles. Chaque sous-unité comporte 3 domaines : le domaine "core" ou « cap », le domaine d'ancrage, ou « rim » et le domaine « stem » qui se déploie pour former un pore à la membrane. (Spaan et al., 2017).	41
Figure 15- Mode d'action des leucotoxines bicomposée.	42
Figure 16- Arbre phylogénétique des PFT de S. aureus.	43
Figure 17- Le système immunitaire vu par Nik Spencer- Senior Graphic designer du journal Nature.	56
Figure 18- Production de la lignée des neutrophiles dans la moelle osseuse.	57
Figure 19- Les fonctions-clé des neutrophiles humains ou hPMNs.	65
Figure 20- Schéma représentatif des étapes principale du processus de NETose.	69
Figure 21- Activation du complexe enzymatique NADPH oxydase.	75
Figure 22 - Contribution de la Gasdermine-D d'après le modèle de Sollberger et collaborateurs.	77
Figure 23- Différents stimuli ont été testés pour analyser le niveau de citrullination général des protéines, dite hypercitrullination.	88
Figure 24- Séparation sur gradient de Ficoll.	101
Figure 25- Isolement des hPMNs à partir d'un buffy coat.	102
Figure 26- Carte génétique du plasmide pGEX-6P-1.	103
Figure 27- Principe de la technique d'immunomarquage pour l'observation des échantillons par épifluorescence.	106
Figure 28- Schéma de la lumière qui passe à travers un microscope à fluorescence.	109
Figure 29- Spectre d'émission.	110
Figure 30- Phase de migration de la technique de Western blot.	114
Figure 31- Construction du « sandwich » utilisé pour la phase de transfert des protéines du gel à la membrane de nitrocellulose.	115
Figure 32- Principe du fonctionnement d'un cytomètre en flux et du « sorting » successif.	117
Figure 33- Spectre d'émission des deux fluorochromes utilisés pour le marquage de la LPV (Alexa594) et de la mitochondrie (Alexa488).	120
Figure 34- Exemple de quantification de l'intensité des bandes d'un western blot effectuée avec le logiciel Image J.	124
Figure 35- Exemples illustrant les graphiques de dispersion avec différentes valeurs de CCP.	125
Figure 36- Les hPMNs isolés à partir de buffy coats issus de donneurs de toutes âges montraient une variabilité de réponse aux stimuli trop importante.	130

<i>Figure 37- Des hPMNs exposés à 1nM de LPV pendant 6h.</i>	133
<i>Figure 38- hPMNs exposés pendant 6 h à 1 nM de LPV et marquées au SYTO 9 Green.</i>	133
<i>Figure 39- Résultats des expériences d'immunofluorescence avec les hPMNs exposés aux différents stimuli à 6h.</i>	135
<i>Figure 40- hPMNs exposé 6 h à 1 nM de LPV.</i>	136
<i>Figure 41- Effet du prétraitement au DPI sur la NETose induite par le PMA.</i>	141
<i>Figure 42- Le DPI n'inhibe pas la NETose provoquée par la LPV.</i>	142
<i>Figure 43- La Dihydrorhodamine-1,2,3 (DHR123) devient fluorescente uniquement en présence de DROs produits par la NADPH oxydase.</i>	143
<i>Figure 44- Le PMA, mais pas la LPV provoque le burst oxydatif par l'activité de la NADPH oxydase.</i>	144
<i>Figure 45- Les mtDROs marqués par la sonde MitoSOX avec le PMA ou la LPV.</i>	146
<i>Figure 46- Fluorescence du MitoSOX due à 1 nM de LPV à 1 h avec ou sans DNP (méthode directe).</i>	147
<i>Figure 47- NETose provoquée par 1 nM de LPV à 6 h avec ou sans DNP (méthode indirecte).</i>	147
<i>Figure 48- NETose provoquée par 1 nM de LPV à 6 h avec ou sans inhibiteurs de la XO et de la MPO.</i>	148
<i>Figure 49- Le DPI inhibe significativement la fluorescence du DHR123 due au PMA.</i>	149
<i>Figure 50- Révélation d'un Western blot pour l'analyse de l'autophagie cellulaire.</i>	154
<i>Figure 51- Révélation d'un Western blot pour l'analyse de l'autophagie cellulaire.</i>	155
<i>Figure 52- Révélation d'un Western blot pour l'analyse de l'autophagie cellulaire.</i>	155
<i>Figure 53- Révélation d'un Western blot avec marquage de LC3B, GAPDH et ERK1/2 phosphorylé.</i>	156
<i>Figure 54- Révélation d'un western blot avec marquage GAPDH et ERK1/2 phosphorylé et Akt phosphorylé.</i>	157
<i>Figure 55- Voie de signalisation en aval de l'activation du récepteur CD45.</i>	158
<i>Figure 56- Les Src kinases ne sont pas impliquées dans le processus initié par la LPV.</i>	159
<i>Figure 57- L'inhibition du canal SK3 des hPMNs par le traitement avec l'inhibiteur NS8593 à 100 µM bloque la NETose causée par la LPV.</i>	161
<i>Figure 58- La NETose initiée par la calcimycine A23187.</i>	161
<i>Figure 59- Schéma illustrant la réaction de citrullination, ou dé(s)imination induite par la PAD4.</i>	163
<i>Figure 60- La citrullination de l'histone H3 étudiée par immunofluorescence.</i>	164
<i>Figure 61- L'inhibition des PADs sur la citrullination de l'histone H3 et l'EN par immunofluorescence.</i>	165
<i>Figure 62- L'inhibition des mtDROs sur la citrullination de l'histone H3 par immunofluorescence.</i>	166
<i>Figure 63- Colocalisation entre la LukS-PV (en rouge) et le cytochrome C de la mitochondrie (en vert).</i>	170
<i>Figure 64- Analyse statistique de la moyenne de fluorescence du MitoSOX.</i>	171
<i>Figure 65- Résultats de l'étude des sources de calcium intracellulaire mobilisées par la LPV.</i>	221
<i>Figure 66- Schéma illustrant le processus de NETose provoqué par la LPV</i>	226
<i>Figure 67- La LPV provoque la NETose.</i>	227

Liste des tables

<i>Tableau 1- Anticorps primaires utilisés</i>	97
<i>Tableau 2- Anticorps secondaires utilisés</i>	98
<i>Tableau 3- Sondes fluorescentes</i>	98
<i>Tableau 4- Inducteurs et inhibiteurs pharmacologiques</i>	99

Abréviations

A23187 : calcimycine

ACPA : anticorps anti- protéines citrullinées

Akt : Protéine kinase B

ANOVA : analyse de la variance

BEt : Bromure d'éthidium

BSA : Albumine de sérum bovin

C5aR : récepteur de la cascade du complément dont le ligand est l'anaphylotoxine C5a

CCP : coefficient de corrélation de Pearson

CDNB : Chloro-1,2,2 Dinitrobenzène

CGD : maladie granulomateuse chronique

CHIPS : chemiotaxis inhibitory protein of *S. aureus*

citH3: histone H3 citrullinée

ClfA: le Clumping Factor A

CMH II : complexe majeur d'histocompatibilité de classe II

CytC : Cytochrome C

ddH₂O : eau ultrapure (MilliQ)

DHR123 : dihydrorhodamine 123

DNP : Dinitrophénol

DPI : Diphénylène ionodium

DROs : dérivés réactifs de l'oxygène

Ecb : Extracellular complement-binding protein

Efb : Extracellular fibrinogen-binding protein

EN : élastase du neutrophile

ERK : extracellular signal-regulated kinase

ETose : extracellular traps

Fab: antigen-binding fragment

FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting

fl: facteur I

fMLP: formylated peptide receptor

FSC: Forward Scatter

GAPDH: D-glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GPCR: G-protein couple receptor

GSDMD: Gasdermine-D

GST: glutathion-S-transférase

HBSS: Hanks' Balanced Salt Solution

HIgCB : γ -hémolysine CB
hPMNs : polynucléaires neutrophils humains
IP : iodure de propidium
IPTG : Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranoside
K_d : constantes de dissociation
LAD : déficience d'adhésion leucocytaire
LPS : lipopolysaccharide
LPV ou PVL : Leucocidine de Pantou et Valentine
LTH : Leukotoxic Hypercitrullination
LukF-PV : composant F de la LPV
LukS-PV : composant S de la LPV
MAPK: mitogen-activated protein kinase
MET: Monocytes/Macrophages extracellular Traps
MitoSOX: Mitochondrial Superoxide Indicator
MLS_B: Macrolide-lincosamide-streptogramine B
MPO : myéloperoxydase
MSCRAMM : microbial surface components recognition adhesive matrix molecules
MSL : Milieu de séparation des lymphocytes
mtDROs : dérivés réactifs de l'oxygène d'origine mitochondriale
NETose : Neutrophil Extracellular Traps
NETs : filets de chromatine relargués lors de la NETose
NOX, NOX2 ou NADPH oxydase : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH) Oxidase
ORF: open-readign frame
PAD4: peptidyl-arginine désaminase 4
PAM : peptide antimicrobien
PAMP : pathogen-associated molecular pattern
PFA : Paraformaldéhyde
PFT ou TFP : toxine formant des pores
PIA: polysaccharide intercellular adhesin
PKC: protéine kinase C
PMA : phorbol myristate acétate
PMT : photomultiplicateurs
PR : Polyarthrite rhumatoïde
PRR : pattern recognition receptors
PSM : phenol-soluble modulins
PVL⁺ ou LPV⁺ : souches sécrétant la LPV
RIPA : Radioimmunoprecipitation assay buffer

RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium

***S. aureus* ou SA :** *Staphylococcus aureus*

SAK : staphylokinase

SARM ou MRSA : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline

SARV ou VRSA : *Staphylococcus aureus* résistant à la vancomycine

Sbi : Staphylococcal immunoglobulin-binding protein

SCCs : cassette chromosomique staphylococcique ou Staphylococcal cassette chromosomes

SCIN : Staphylococcal component inhibitor

SI : séquences d'insertion

SK3: small conductance calcium-activated potassium channel 3

SLE : Lupus érythémateux

SOD : superoxyde dismutase

SpA: staphylococcal protein A

SSC: Side Scatter

SSL: staphylococcal superantigen-like

SSSS: staphylococcal scalded skin syndrome

SVF : sérum de vœu fœtal

TA : température ambiante

TRIS : tris(hydroxyméthyl)aminométhane

TSST-1 : toxic shock syndrome toxin-1

XO : Xanthine Oxydase

1 INTRODUCTION

« Où finit le télescope, le microscope commence. Lequel des deux a la vue la plus grande ? Choisissez. Une moisissure est une pléiade de fleurs ; une nébuleuse est une fourmilière d'étoiles. »

(Victor Hugo, « Les Misérables »)

1.1 *Staphylococcus aureus*

1.1.1 « Carte d'identité » de la bactérie

“the masses looked like bunches of grapes.”

(Alexander Ogston. 1880)

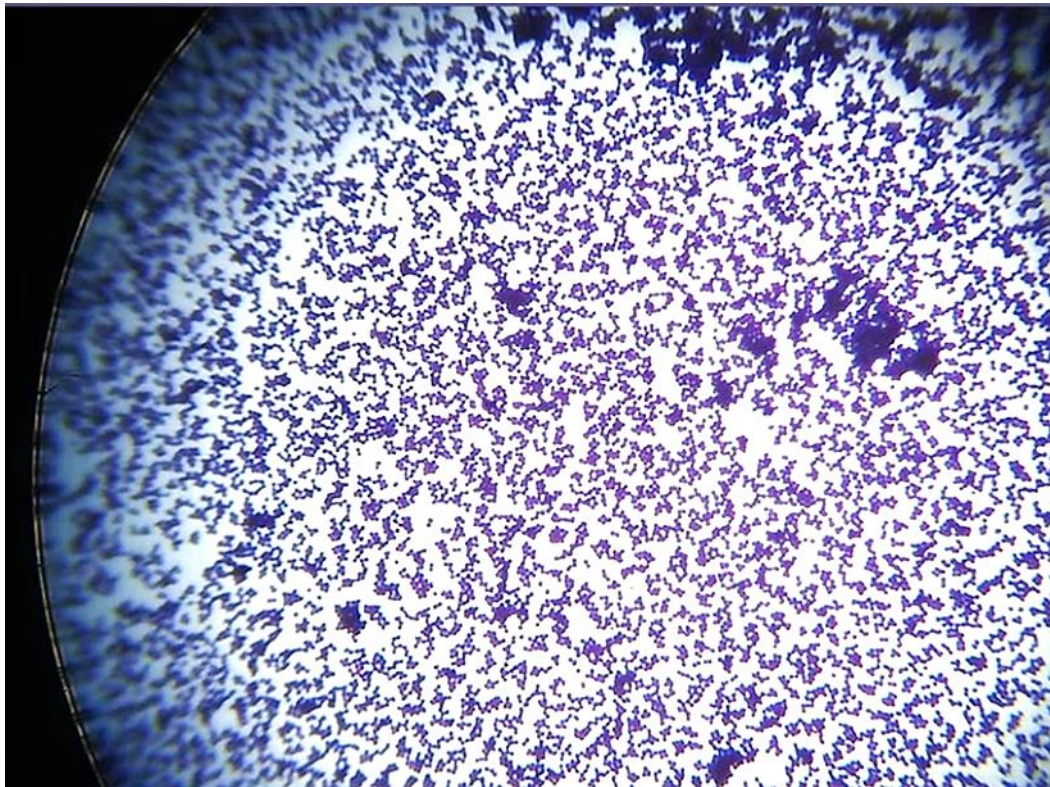


Figure 1 - *Staphylococcus aureus* observé après coloration de Gram.

Objectif x100 (grossissement final x1000). Institut de Bactériologie de Strasbourg, avril 2019.

Staphylococcus aureus, l'un des micro-organismes pathogènes parmi les plus connus, même par les non-spécialistes, est une bactérie faisant partie de la famille des *Micrococcaceae*.

Historiquement, trois personnalités orbitent autour du nom « *Staphylococcus aureus* » : Louis Pasteur, Alexander Ogston et Anton Julius Friedrich Rosenbach. En effet, *Staphylococcus aureus*, également appelé Staphylocoque doré, a été décrit pour la première fois à la fin du XIX^e siècle, presque au même moment par le français Louis Pasteur et par le chirurgien écossais Alexander Ogston. Plus précisément, Pasteur, considéré comme le père de la microbiologie, isola *Staphylococcus aureus* à partir d'un pus de furoncle en la présence d'Émile Roux et Chamberland, alors que Ogston décrivit cette bactérie organisée en amas de forme de grappe de raisin, suite à des observations sur les abcès humains aussi aigus et chroniques (Newsom 2008).

Ogston nomma pour la première fois la bactérie « *Staphylococcus aureus* » en raison de sa forme particulière et de sa pigmentation. Ensuite, l'allemand Rosenbach démontra que les staphylococci sont différenciés sur la base de leur pigmentation, en distinguant ainsi *Staphylococcus aureus*, qui présentait une coloration jaune dorée (du latin « aureus », doré) de *Staphylococcus albus* (du latin « albus », blanc, aujourd'hui renommé *Staphylococcus epidermidis*) qui montrait plutôt une coloration blanche en culture. Ce fut ce même microbiologiste qui cultiva les cocci dans de très différentes conditions de culture dans le but d'en définir les conditions pathologiques chez les humains. Ses recherches confirmèrent d'ailleurs les hypothèses de Pasteur concernant l'implication de *S. aureus* dans l'ostéomyélite aiguë.

Au fil du temps, les chercheurs ont pu tracer un véritable « portrait-robot » de *Staphylococcus aureus* qui s'appuie sur certaines de ses caractéristiques biologiques et morphologiques. En effet, à une analyse microscopique cette bactérie, positive à la coloration de Gram, se présente sous forme de coques à diamètre variable entre 0,5 et 1,5µm, organisés en amas ou isolés (Figure 1). Le fameux pigment caroténoïde doré qui a valu à la bactérie son nom d'espèce « aureus » est visible quand elle est retrouvée en forme de colonies poussant dans un milieu solide contenant du mannitol. D'autre part, elle produit une coagulase et une DNase, deux enzymes qui sont à la base des principaux tests cliniques qui en confirment l'identification (Kent et al., 2009), outre qu'elle peut utiliser le mannitol en fermentation comme seule source de carbone (Lowy 1998). N'ayant pas besoin d'un milieu de culture particulièrement riche pour être cultivé, *Staphylococcus aureus* montre des caractéristiques de bactérie mésophile, neutrophile et halophile, poussant de préférence à 37°C, à pH neutre (pH=7) et en présence d'une concentration en NaCl qui peut dépasser le 5% (Lowy 1998). De plus, en étant anaérobie facultative, la bactérie bénéficie de cette caractéristique notamment une fois l'infection installée dans les tissus plus profonds de l'hôte.

D'un point de vue génétique, la bactérie présente un chromosome unique et circulaire (2.7-2.8 mbp), mais elle dispose également d'un assortiment d'éléments génétiques accessoires, tels que des plasmides (aussi bien conjugatifs que non conjugatifs), des transposons, des prophages et d'autres éléments génétiques variables (Młynarczyk et al. 1998). Cet aspect génétique est à la base de sa pathogénicité élevée, puisque les gènes des nombreux facteurs de virulence et ceux qui sont responsables des résistances aux antibiotiques que *Staphylococcus aureus* a développé, se localisent aussi bien sur le chromosome que dans les éléments génétiques mobiles. Par conséquent, ceci peut entraîner un passage de virulence non seulement d'une souche à l'autre, mais aussi interspécifique (Jensen and Lyon 2009). Environ 20% de ce génome est variable d'une souche à l'autre.

Ce « passage », ou transfert d'éléments génétiques pathogènes, rend la bactérie encore plus dangereuse et l'étude de ses facteurs de virulence est vraisemblablement un sujet capital dans la lutte contre les infections bactériennes.

1.1.2 Pourquoi s'intéresser de *S. aureus* ? Les pathologies associées

« Bertrand avec Raton, l'un singe, l'autre chat, Commensaux d'un logis, avaient un commun maître. » (La Fontaine, *ib.* IX, 17.)

La peau humaine est siège de colonisations bactériennes à partir de la naissance. En effet, les souches qui résident sur notre épiderme en absence de pathologies font partie de ce qu'on appelle le « microbiote cutané », c'est-à-dire la flore commensale constituée de différents microorganismes, dont des bactéries généralement inoffensives qui appartiennent au groupe des saprophytes (et même symbiotes) ou opportunistes. Le microbiote pourrait être décrit comme une espèce d'« empreinte digitale à micro-organismes », du fait de sa permanence et de son unicité. Cependant, cette flore commensale peut être également constituée de souches pathogènes. Il n'est donc pas surprenant que les staphylocoques soient présents en tant que commensaux naturels chez les humains. En effet, la majorité des bactéries faisant partie de la flore commensale de la peau sont à Gram (+). Ainsi, les staphylocoques retrouvés le plus souvent appartiennent principalement aux espèces *S. epidermidis* et *S. hominis* (Otto et al., 2008), mais également *S. aureus* (Iwatsuki et al. 2006). En effet, le portage asymptomatique permanent ou transitoire de *S. aureus* chez l'homme sain s'élève à 30%, privilégiant les zones humides du corps telles que les aisselles, le périnée, les narines, l'intérieur des poignets et les mains, ainsi que la base du cou.

Cependant, cette bactérie peut devenir très pathogène et entraîner tous types d'infections chez les humains. Le « pacte de commensalité » est rompu généralement dans deux situations principales. La première peut se produire suite à un affaiblissement de l'immunité de l'hôte, ce qui comprend non seulement l'immunodépression due à des maladies chroniques, mais aussi à tout état lié à une condition d'immunité réduite ; en particulier, la bactérie peut profiter d'un état physique et immunologique débilisé en raison d'une opération chirurgicale ou d'une maladie préexistante ou encore en lien avec le facteur d'âge de l'hôte, en faisant des personnes âgées et des enfants une cible de prédilection. La deuxième situation concerne généralement le franchissement de la barrière épithéliale. Cette dernière peut se produire à cause de brûlures, de coupures, de perforations, de plaies et d'éraflures ou par le biais d'un matériel d'implantation chirurgicale, notamment les cathéters qui constituent également un support d'adhésion optimale

pour la formation de biofilm. Il est donc évident qu'un acte chirurgical peut favoriser la colonisation bactérienne des tissus internes, qui, combiné à l'immunodépression typiquement dérivée d'une opération, fait de l'hôpital, l'un des milieux où les infections à *Staphylococcus aureus* se manifestent le plus souvent et avec une virulence accrue. Par conséquent, l'identification de *Staphylococcus aureus* est très souvent une source d'inquiétude, notamment en milieu hospitalier. En effet, *Staphylococcus aureus* est une des espèces principalement isolées comme cause d'infections nosocomiales, c'est-à-dire contractées dans les 48 heures suivant l'hospitalisation. Elle est redoutée plus particulièrement à cause de l'existence de nombreuses souches résistantes, ou multi-résistantes, aux antibiotiques, comme dans le cas des souches résistantes à la méticilline (SARM), combiné à la production de nombreux facteurs pro-inflammatoires. Il est donc évident que cette bactérie représente un problème de santé publique à ne pas négliger.

Concernant les pathologies associées à la présence de la bactérie, on pourrait les décrire en suivant une logique de localisation et en partant des tissus les plus superficiels de l'homme, jusqu'à arriver aux tissus profonds.

1.1.2.1 PEAU ET TISSUS MOUS

Des lésions au niveau de la toute première barrière naturelle qui nous protège de l'environnement, la peau, sont à la base des affections, le plus souvent bénignes, provoquées par *Staphylococcus aureus*. En effet, à ce niveau, il y a une manifestation de type nécrotique associée à la présence d'un exsudat composé en particulier de neutrophiles et de cellules mortes qui contribuent à la formation du pus, ce que l'on appelle **infections suppuratives** et qui peuvent intéresser toutes les couches de la peau : l'épiderme, le derme, mais aussi les follicules pileux et les glandes sudoripares, ainsi que les vaisseaux sanguins en proximité. Dépendamment de la zone épithéliale intéressée par l'infection, on peut distinguer différentes pathologies. En effet, parmi les infections plus communes au niveau superficiel se localisant principalement aux membres et au niveau du visage, on retrouve **l'impétigo**, affectant plus fréquemment l'enfant (Bangert et al. 2012). Cette infection est caractérisée par la présence de vésicules ou de cloques fragiles d'un diamètre d'environ un centimètre, qui, cependant peuvent évoluer en lésions plus étendues ou même ulcéraires. Dans ce dernier cas de figure, on parlera alors d'**ecthyma**, une forme plus importante d'impétigo, caractérisée par la présence de plaies ouvertes. D'autres infections cutanées, normalement aux pronostiques bénins, telles que des **folliculites** et des **furuncles**, intéressent la zone du follicule pilo-sébacé avec des manifestations cliniques présentant des abcès avec une

inflammation du follicule et la production de pus, ou encore caractérisés par une nécrose des tissus environnants. Le regroupement de plusieurs furoncles est dit **anthrax staphylococcique**, à ne pas confondre avec la pathologie homonyme « Anthrax », en langue anglaise, traduite par « maladie du charbon » en français et due à un autre type de pathogène, *Bacillus anthracis*. D'autre part, localisé à la proximité de l'ongle du doigt ou de l'orteil, *Staphylococcus aureus* est souvent responsable de **panaris**, un type d'infection superficielle non grave qui peut soit régresser spontanément, soit nécessiter un traitement antibiotique, afin d'éviter la dissémination de la bactérie au niveau de la gaine nerveuse des nerfs voisins ou des tissus plus profonds, comme les muscles et les os avoisinants.

Concernant les infections profondes non localisées, on retrouve des **cellulites infectieuses**, causées par la bactérie, se développant à la couche la plus profonde de la peau. Cette infection comporte la présence d'un érythème souvent associé à une augmentation locale de la température, dite hyperthermie, et caractérisée par une douleur aiguë et un gonflement des tissus locaux. Il s'agit d'une maladie contagieuse qui, en absence de traitement, peut permettre à *S. aureus* de se disséminer et de rejoindre notamment la circulation sanguine, provoquant ainsi une septicémie.

Au niveau des muqueuses, *S. aureus* peut être responsable de **sinusites** ou **d'otites**.

Plus rarement, la bactérie est impliquée dans des pathologies de la peau extrêmement graves comme la **fasciite nécrosante** (Cheng et al. 2011), intéressant les tissus mous de la peau et caractérisée par une nécrose étendue des tissus sous-cutanés et des membranes fibro-élastiques, dites *fascia*. D'autre part, les muscles, notamment du tronc et des membres, peuvent être également touchés par des infections à *S. aureus*, comme dans le cas des **pyomyosites**, des infections aiguës des muscles squelettiques, souvent associées à des furoncles non traités ou des abcès à l'intérieur des tissus intéressés (Chiedozi 1979).

De façon générale, on retrouve des caractéristiques communes à toutes ces infections : la présence des signes d'inflammation et de nécrose et des traitements destinés majoritairement aux cas plus graves, par la prescription d'antibiotiques ou par des interventions chirurgicales. Malgré le pronostic généralement peu engagé, ces manifestations cutanées sont souvent associées à des formes d'immunodépression et restent dans tous les cas à ne pas sous-estimer, afin d'éviter que *Staphylococcus aureus* diffuse aux niveaux plus profonds de l'organisme.

1.1.2.2 SYSTÈME CARDIO-VASCULAIRE

Étant une bactérie qui peut, en principe, atteindre tous les organes, une fois franchie la barrière épithéliale, ce pathogène peut se retrouver dans la circulation sanguine et causer une infection à ce niveau, alias une **septicémie**. Notamment, une fois ayant eu accès au système circulatoire, la seule présence bactérienne à ce niveau est désignée « **bactériémie** », une condition pouvant déclencher une inflammation généralisée, le **sepsis**. Ce qui différencie la présence, souvent transitoire, des bactéries dans le sang (bactériémie), d'une infection se développant à ce niveau (septicémie), réside d'une part en la capacité du système immunitaire de répondre en éliminant le pathogène, sans de ce fait provoquer des symptômes majeurs, et d'autre part en la présence de matériel étranger, comme par exemple une prothèse ou un implant dans l'organisme, qui pourrait servir d'ancrage pour une colonisation bactérienne.

Curiosité : une victime célèbre de *Staphylococcus aureus* a probablement été le peintre Michelangelo Merisi da Caravaggio, ou « le Caravage », dont les analyses sur les restes au niveau des dents ont indiqué un sepsis causé par *Staphylococcus aureus* comme cause principale de la mort (Drancourt et al. 2018).

Une complication des bactériémies à *S. aureus* est l'atteinte d'organes profonds : cœur, endocarde, parmi d'autres. Cette infection, connue sous le nom **d'endocardite**, est souvent localisée aux valves cardiaques et majoritairement présente chez des patients ayant subi la pose d'une prothèse valvulaire ou d'un cathéter ou encore chez les consommateurs de drogues illicites injectables. *S. aureus* a été identifié en tant que principal responsable d'une telle infection au niveau cardiaque, qui peut avoir, à son tour, des complications encore plus graves, allant d'embolies pulmonaires, à la dégradation des valves cardiaques elle mêmes (Nadji et al. 2005). Les souches SARM sont responsables d'environ 40% des cas d'endocardites aussi bien aux Etats-Unis qu'au Brésil (Fowler et al. 2005). En plus, une endocardite produite par les souches SARM ont plus de probabilité de présenter une comorbidité et une bactériémie plus persistante chez les patients atteints, qui souvent développent l'infection à l'hôpital (Levine et al. 1991). L'endocardite à *S. aureus* est l'une des infections à plus haute mortalité provoquée par ce pathogène (Wallace et al. 2002), s'élevant de 30% à 60% (Fowler et al. 2005).

1.1.2.3 AUTRES ORGANES

Une fois l'infection installée au niveau d'un tissu profond, une dissémination de type métastatique peut s'accomplir, intéressant ainsi, par voie systémique, quasiment tous les organes du corps humain.

En particulier, en tant que site secondaire d'infection, les atteintes au niveau des poumons sont fréquemment causées par *S. aureus* notamment en milieu hospitalier, mais également développées dans le milieu communautaire, quoique plus rarement (Johnson 1944). Pourtant, les **pneumopathies** communautaires sont de plus en plus redoutées à cause d'une diffusion de la résistance aux antibiotiques présente chez SA, comme dans le cas des souches résistantes à la méticilline, en particulier aux Etats-Unis (Defres et al. 2009). En général, la bactérie peut provoquer des pneumopathies chez des individus fragilisés par une maladie chronique préexistante, comme la mucoviscidose, ou une atteinte transitoire du système immunitaire, comme il peut aussi se développer durant une simple grippe. La présence de la bactérie à ce niveau de l'organisme humain peut rester asymptomatique ou bien être la source d'infections invasives fulminantes, dépendamment de l'état immunitaire de l'hôte. L'inflammation se manifeste au niveau des bronches où une bronchopneumonie aiguë est souvent révélée, pouvant évoluer en une pneumonie nécrosante qui, comme la pneumonie communautaire à SA, touche de préférence les patients plus jeunes (Gillet et al. 2002). La **pneumonie nécrosante** présente un tableau clinique particulier, puisque la fièvre élevée est accompagnée par une toux avec expectorations sanglantes purulentes dite hémoptysie, et caractérisée par la présence d'une leucopénie, d'infiltrats au niveau des alvéoles multi-lobaires, des frissons, et une dyspnée à progression très rapide. La forme nécrosante de la pneumonie à SA est souvent associée à la présence d'un facteur de virulence bien précis, une toxine appelée Leucocidine de Pantone-Valentine ou LPV (Diep et al. 2013), qui fera l'objet d'un chapitre à part de cette thèse. Ainsi, le pronostic lié à cette pathologie est très mauvais, avec une mortalité de l'ordre de 75% et ayant une médiane de survie de 4,3 jours (Descloux et al. 2007).

Au niveau de l'os, cette bactérie peut développer une infection appelée **ostéomyélite**. En effet, 75% des ostéomyélites sont causées par des staphylocoques à Gram (+) (Walter et al. 2012). L'ostéomyélite est une infection de l'os ou bien de la moelle osseuse ou articulaire de type progressif. Souvent retrouvé chez les patients atteints de cette pathologie, SA est l'un des microorganismes le plus souvent responsable d'infections de l'os (Hatzenbuehler and Pulling 2011). L'origine de l'infection peut être de type hématogène, dérivant donc de la présence de la bactérie dans le sang, ou bien, elle est causée par un acte chirurgical (Oryan et al. 2014). En

général, ce type d'infection peut être donc primaire ou dérivé d'une infection au niveau d'un des tissus mous environnant l'os.

Une fois que la bactérie se retrouve en contact avec l'os, elle peut s'avantager de ses protéines de surface pour s'ancrer à la paroi de l'os et proliférer en formant un biofilm. La protéine de surface appelée Protéine A est un facteur clé de l'ancrage de *Staphylococcus aureus* au tissu osseux (Claro et al. 2011). En effet, cette protéine peut également être sécrétée pour se lier directement aux ostéoblastes, les cellules participant à la formation du tissu osseux. Cela va entraîner la mort des cellules de l'hôte avec une progression conséquente vers l'ostéoclastogenèse et une inhibition simultanée de l'ostéogénèse, ainsi que la libération de cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF- α (Mendoza Bertelli et al. 2016).

Avec un traitement efficace qui prévoit une antibiothérapie par voie intraveineuse instaurée dans les phases plus précoces de l'infection et en sélectionnant des molécules à bonne pénétration dans l'os, l'évolution est souvent favorable. Cependant, avec l'augmentation des résistances aux antibiotiques, cette pathologie est devenue de plus en plus difficile à résoudre. En absence d'une thérapie efficace, l'infection peut rapidement évoluer vers une forme chronique.

Staphylococcus aureus est également capable de passer la barrière hématoencéphalique et causer des manifestations neurologiques, telles que des **méningites**, des infections très graves et souvent mortelles, mais également assez rares (environ 9% des cas de méningites sont dues à SA (Jensen et al. 1993)). Il s'agit en effet d'une inflammation du liquide céphalorachidien (LCR), de l'arachnoïde ou de la pie-mère, qui peut se présenter aussi bien au niveau cérébral qu'au niveau spinal. Cette condition pathologique est souvent la conséquence d'une infection contractée à l'hôpital, suite à une opération, chez des individus ayant un système immunitaire compromis, ou encore suite au développement d'une endocardite à SA (Røoder et al. 1997). La plupart des méningites à *S. aureus* sont associées à des souches SARM et elles sont souvent d'origine nosocomiale, en conséquence d'un acte neurochirurgical, ayant un taux de mortalité très élevé (10–45%) (Pintado et al. 2019).

L'une des conséquences pathologiques parmi les plus redoutables dues à *S. aureus* est liée à la production de ses facteurs de virulence, notamment de toxines. En effet, le **syndrome du choc toxique** est l'une des conséquences de l'action d'une toxine staphylococcique appelée TSST-1. Ce syndrome a intéressé le grand public étant lié, entre autres, à une contamination, et parfois à une mauvaise utilisation, des tampons vaginaux. En effet, cette toxine produite par *S. aureus* a été identifiée par les chercheurs déjà dans les années 80, étant la cause du syndrome notamment chez des femmes qui utilisaient des tampons hyperabsorbants, contaminés, pendant leur cycle menstruel (Notes 1997). Également, d'autres portes d'entrée peuvent être à la base d'une telle

infection, comme par exemple des plaies chirurgicales ou à la suite de brûlures. Le syndrome se manifeste avec des symptômes plutôt communs et pseudo-grippaux : des fièvres élevées ($>39^{\circ}\text{C}$) accompagnées d'une chute de tension, d'éruption cutanées, de malaises et un état confusionnel. Ensuite d'autres symptômes se manifestent, ce qui peut conduire au coma et à une atteinte de plusieurs organes (défaillance multiviscérale). Un rash cutané est également présent en certains cas au niveau des yeux, de la bouche, des paumes des mains ou des pieds (Gottlieb et al. 2018). D'autres pathologies courantes liées à *S. aureus* sont les **toxi-infections alimentaires**, elles aussi causées par la production d'une toxine dite entérotoxines qui ont pour cibles principales les entérocytes, provoquant par conséquent des atteintes au niveau intestinal.

1.1.3 Traitements existants

« The greatest possibility of evil in self-medication [with penicillin] is the use of too-small doses, so that, instead of clearing up the infection, the microbes are educated to resist penicillin and a host of penicillin-fast organisms is bred out which can be passed on to other individuals and perhaps from there to others until they reach someone who gets a septicemia or a pneumonia which penicillin cannot save.

In such a case the thoughtless person playing with penicillin treatment is morally responsible for the death of the man who finally succumbs to infection with the penicillin-resistant organism. I hope this evil can be averted. »

Sir Alexander Fleming.

In 'Penicillin's Finder Assays Its Future: Sir Alexander Fleming Says Improved Dosage Method is Needed to Extend Use', New York Times (26 June 1945).

Un défi majeur dans la lutte contre les infections à *Staphylococcus aureus* est représenté par la capacité de la bactérie de s'adapter rapidement aux traitements antibiotiques courants.

Historiquement, à partir des années 40, le traitement de prédilection pour un grand nombre d'infections bactériennes était constitué par l'antibiothérapie à base de **pénicilline**, une molécule notamment efficace contre les bactéries à Gram (+). En revanche, l'utilisation répétée et incontrôlée des pénicillines a sélectionné le développement des souches résistantes. L'emploi d'une nouvelle β -lactamine d'origine semi synthétique avec un plus large spectre d'action, la **méticilline**, est alors devenue une thérapie plus efficace. Introduite pour la première fois en 1951 au Royaume-Uni, cette molécule a représenté et représente encore aujourd'hui l'antibiotique de

premier choix pour contrecarrer la résistance aux antibiotiques constituée par la production de l'enzyme β -lactamase, *blaZ*, exprimée chez *S. aureus* (Knox 1960).

Cependant, à peine deux ans après le développement de cet antibiotique, des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline, dites SARM ou MRSA, pour « Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* », étaient identifiées notamment en milieu hospitalier (Moran et al. 2006). Initialement présente dans un très faible pourcentage de souches, la résistance à la méticilline est devenue de plus en plus fréquente, spécialement aux Etats-Unis, représentant une grave cause d'infections nosocomiales (David et al. 2012).

La nécessité de développer un énième composé antibiotique efficace contre la bactérie a alors conduit à l'introduction de la **vancomycine**, un antibiotique de la famille des glycopeptides qui représente encore aujourd'hui le traitement de recours/second choix.

Encore une fois une telle pression en antibiothérapie a sélectionné de nouvelles formes de résistance aux antibiotiques, en particulier envers la vancomycine, où l'on parle alors de souches SARV (ou VRSA) isolées la première fois au Japon en 1996 (Hiramatsu et al. 1997) (Figure 2). Il est de moins en moins rare désormais que le traitement d'une infection sévère à *S. aureus* nécessite une combinaison de molécules. Aussi efficaces qu'ils soient, ces traitements n'excluent pas l'émergence des souches **multirésistantes**. Depuis 1999, plusieurs nouveaux antibiotiques ont été approuvés et commercialisés pour contourner le problème des SARM : le linezolide, le tedizolide, la daptomycine, la tigecycline, le ceftobiprole, le ceftaroline, la telavancine, la dalbavancine et l'oritavancine (Kallberg et al. 2018). Néanmoins, des souches de *S. aureus* résistantes à chacune de ces molécules ont été isolées dès les années suivantes (Lehman et al. 2019).

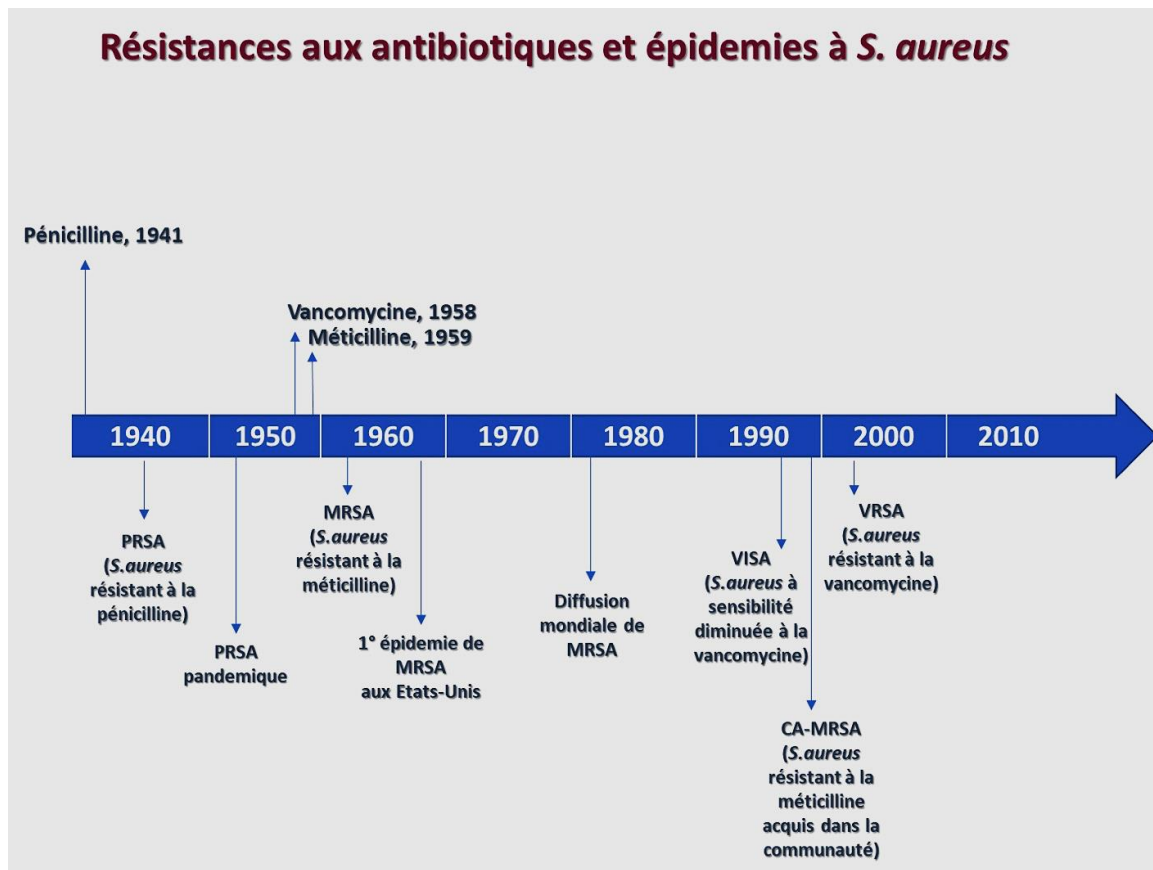


Figure 2- Ligne du temps représentant l'apparition des thérapies antibiotiques et l'émergence des résistances aux antibiotiques chez *S. aureus*. Adapté de (McGuinness et al. 2017)

À côté des difficultés liées aux résistances, la nature des molécules à pouvoir bactéricide est également un facteur défavorisant l'efficacité thérapeutique. En effet, les antibiotiques peuvent présenter une action limitée à cause de leurs caractéristiques en termes de solubilité, biodisponibilité ou toxicité. Un exemple est la toxicité rénale qui caractérise les aminoglycosides, ou l'association entre glycopeptides et lipoglycopeptides (Kallberg et al. 2018). D'ailleurs, l'efficacité antibiotique est souvent réduite si la bactérie est organisée en biofilm (Molina-Manso et al. 2013).

Toutefois, alors que les traitements conventionnels se basent sur les combinaisons de molécules, sur la durée et la dose d'antibiotique, et donc toujours par moyen d'une approche d'antibiothérapie, des nouveaux outils biologiques sont en cours de développement.

Une des nouvelles stratégies thérapeutiques vise à améliorer l'efficacité des molécules existantes, en renforçant la « drug delivery », en rendant la délivrance du médicament plus efficace, par exemple à travers un couplage des molécules antibiotiques à un système dit « carrier », ou transporteur. On parle alors de « **nanoantibiotics** ». En règle générale, ce « carrier » est constitué d'une nanoparticule qui peut être soit décorée extérieurement par les molécules antibiotiques,

soit les enrober en les encapsulant à l'intérieur. La nature de ces nanoparticules peut être très différente en fonction de l'utilisation. Les composés principaux peuvent aller de matériaux synthétiques comme des silicates ou des réseaux de carbone, à des bicouches lipidiques autoassemblantes dites liposomes, ou encore en se basant sur des motifs dendritiques ou polymériques, jusqu'à la synthèse de nanoparticules constituées uniquement par des métaux, tels que l'or ou l'argent (Labrière et al. 2019). Cette technologie a le principal avantage de concentrer l'efficacité des antibiotiques au sein du site infectieux, ou encore de rallonger les temps d'administration du médicament à travers une décharge progressive des nanoparticules, ce qui permettrait d'ajuster les posologies actuelles et de délivrer des doses inférieures de molécules. Cela non seulement réduirait le développement des résistances aux antibiotiques, mais permettrait également l'utilisation de composés normalement peu efficaces ou présentant des effets indésirables à posologie normale.

La recherche biomédicale actuelle est focalisée non seulement sur la synthèse des nouvelles molécules antibiotiques efficaces, mais également sur l'un des « ennemis naturels » des bactéries, y compris de *Staphylococcus aureus* : **les bactériophages**. Il s'agit de virus qui ciblent uniquement les bactéries avec une spécificité très intéressante, et actuellement à l'étude pour développer des futures stratégies antibactériennes, prenant le nom de « phagothérapie ». Cet outil biologique, qui avait déjà retenu l'attention des chercheurs au début du XXème siècle et avant la découverte des antibiotiques, est maintenant en phase clinique 1, ayant réussi avec succès les phases pré-cliniques (Lehman et al. 2019). Ce qui est intrigant, mais tout aussi limitant, concernant cette technologie est notamment sa spécificité d'action.

Un bactériophage étant un virus techniquement incapable d'infecter les cellules humaines des mammifères, peut devenir une arme très puissante dans la lutte contre les résistances aux antibiotiques. Ayant normalement des cibles bactériennes précises, la phagothérapie est en train de se développer autour de certains « gold standards », en sélectionnant les phages les plus spécifiques à *Staphylococcus aureus* tout en restant les plus inertes envers les hôtes humains. Cependant, il est encore difficile de trouver une thérapie phagique qui puisse cibler toutes les souches de l'espèce *S. aureus*.

Un autre « ennemi naturel » des bactéries est représenté par notre système immunitaire. En effet, les efforts déployés afin de développer un **vaccin** efficace, ont été d'importance majeure pendant les dernières décennies et ils ont représenté une solution efficace contre la mortalité due à d'autres bactéries, telles que *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* et *Neisseria meningitidis* (Payne et al. 2013; Snaebjarnardóttir et al. 2013). Malheureusement, la même efficacité n'a pas pu être obtenue lors d'une infection à *S. aureus* en phase d'essai clinique en

raison de deux facteurs principaux : premièrement *S. aureus* est une bactérie qui fait partie de la flore commensale chez l'humain, par conséquent le système immunitaire peut facilement être détourné par une bactérie capable d'évoluer parallèlement à son hôte et à son immunité. En plus, un vaccin est conçu en se basant sur la spécificité et la reconnaissance entre anticorps et antigène. Or, *Staphylococcus aureus* présente une variabilité accrue concernant ses protéines de surface, qui ont été la cible des vaccins en développement pendant les années passées, en plus d'un arsenal de facteurs de virulence très riche et avec une activité redondante (Dreisbach et al. 2011; Golubchik et al. 2013). Plus récemment, les approches pour le développement d'un vaccin efficace ont changé, ne ciblant plus un composé isolé présent à la surface cellulaire de *S. aureus*, telles que la capsule polysaccharidique ou encore une protéine associée à la paroi de la cellule bactérienne, mais plutôt une combinaison de plusieurs antigènes, adoptant une démarche polyvalente. En effet, une approche « multi-antigen » ciblant aussi bien des composés présents à la surface de la cellule bactérienne que certains facteurs de virulence de *S. aureus*, a été envisagée. Les cibles idéales de ces vaccins polyvalents devraient empêcher l'adhérence bactérienne et neutraliser les facteurs de virulence, telles que les exoprotéines toxiques, tout en facilitant l'activité de phagocytose de l'immunité innée.

Des exemples de cette nouvelle stratégie sont actuellement en phase pré-clinique ou clinique ayant une spécificité envers les polysaccharides de la capsule bactérienne et des antigènes comme l'alpha-toxine et la LPV (Hua et al. 2015). Notamment, l'alpha-toxine est exprimée par la quasi-totalité des souches de *Staphylococcus aureus*, se révélant donc une cible intéressante, étant également un des facteurs de virulence majeurs dans des modèles d'infection chez l'animal (Dinges et al. 2000). Concernant la LPV, le sujet de cette thèse, et produite principalement par des souches SARM (Boyle-Vavra and Daum 2007), son rôle dans la pathogénèse reste à clarifier. Une approche polyvalente et « multi-antigen » pour le développement d'un vaccin qui neutralise également l'activité des toxines bactériennes, représente néanmoins une stratégie prometteuse (Ohlsen and Lorenz 2010). Toutefois, comme il s'agit d'une bactérie commensale, on peut s'interroger sur les champs d'application de tels vaccins.

De toute façon, ce dernier point accentue également l'importance de certains facteurs de virulence dans les infections à *S. aureus*. Ainsi, un effort majeur doit être fait dans le but de comprendre le mode d'action des leucotoxines et d'intégrer ainsi les connaissances concernant un facteur de virulence qui bouleverse et empêche une réponse immunitaire normale et qui, lysant les leucocytes, retarderait ou préviendrait l'action d'un vaccin anti-staphylococcique.

1.1.4 Avoir un problème pour chaque solution : les facteurs de virulence de *S. aureus* ciblent chaque niveau de l'immunité humaine

“Messieurs, ce sont les microbes qui auront le dernier mot.” (Gentlemen, it is the microbes who will have the last word.) — Louis Pasteur

Une des caractéristiques principales de *Staphylococcus aureus* est sans aucun doute le nombre impressionnant et la variété de ses facteurs de virulence. En effet, cette bactérie a pu s'avantager de sa nature de bactérie commensale humaine et évoluer parallèlement au système immunitaire de son hôte pour en contourner les réponses bactéricides.

L'expression des facteurs de virulence chez cette bactérie est régulée de manière très fine. En effet, en dehors de son génome constitué d'un seul chromosome circulaire d'environ 2800 kb (Lowy 1998), *S. aureus* possède des éléments génétiques mobiles qui lui assurent la survie en conditions défavorables, comme par exemple en présence d'antibiotiques tels que la méthicilline ou la vancomycine. Ainsi, on peut distinguer plusieurs éléments génétiques mobiles qui participent à la résistance, mais aussi à la virulence de la bactérie.

1.1.4.1 Les éléments génétiques mobiles de *S. aureus*

En particulier, les **plasmides**, des molécules d'ADN autorépliquatives, peuvent être présents en une seule copie ou plusieurs copies à l'intérieur d'une même cellule bactérienne. Ces plasmides peuvent coder une variété de gènes différents. On peut en distinguer trois typologies : les petits plasmides multicopies, qui peuvent être cryptiques ou coder un seul déterminant de la résistance ; les grands plasmides d'environ 15 à 30 kb, présent en nombre limité de copies (de 4 à 6 par cellule) et qui codent plusieurs déterminants de la résistance ; les plasmides conjuguatifs codant pour les multirésistances (Berg et al. 1998).

En effet, *S. aureus* est une bactérie avec une faible compétence naturelle, par conséquent sa capacité d'absorption d'ADN exogène est très limitée, alors qu'elle se sert principalement de la transduction ou de la conjugaison pour le transfert intercellulaire des plasmides (Morikawa et al. 2003) (Figure 3). Une fois introduit dans la bactérie, le plasmide reste dans son état libre et circulaire ou il s'intègre au chromosome bactérien. Ces plasmides sont principalement responsables de la résistance acquise suite à l'introduction des antibiotiques. En effet, après l'introduction de la pénicilline, la résistance bactérienne chez *S. aureus* s'est manifestée via un

plasmide présentant le gène *blaZ*, ainsi que les gènes régulateurs *blaI* et *blaR* (Hackbarth and Chambers 1993). La résistance est donc due à la synthèse de l'enzyme β -lactamase, capable d'hydrolyser l'anneau β -lactame de la pénicilline.

Également, un plasmide est à la base de la résistance à la vancomycine, qui se manifeste par la présence du gène *vanA* et qui a été probablement transféré aux souches SARM depuis des souches d'*enterococci* résistants à la vancomycine (ERV) (Weigel et al. 2003; Ballard et al. 2005; Zhu et al. 2008). D'autre part, la bactérie est capable de survivre dans des environnements très toxiques pour les cellules vivantes et contenant des éléments tels que le cadmium, le mercure et l'arséniate, grâce à des plasmides contenant les gènes codant pour la résistance à ces composés (Jensen and Lyon 2009).

À côté des résistances, ces éléments génétiques peuvent présenter les gènes codant certaines toxines, comme dans le cas de pRW001, un grand plasmide de 37.5 kb qui code la toxine exfoliante B ou ETB (Jackson and Iandolo 1986).

En plus des plasmides, on retrouve d'autres éléments génétiques mobiles acquis à partir d'un **bactériophage (Figure 4)**. En effet, ces virus bactériens représentent l'apport majeur en termes d'évolution et de diversité de *S. aureus*. En fonction du type de phage, l'ADN viral peut s'intégrer au génome bactérien ou à un plasmide. L'introduction d'ADN peut avoir deux conséquences distinctes concernant les facteurs de virulence : une conversion lysogénique positive cause directement l'introduction et la production consécutive de facteurs de virulence d'origine virale, alors qu'une conversion de type négatif, qui cause une insertion de matériel génétique au chromosome bactérien, provoque l'inactivation des gènes, comme dans le cas de la β -hémolysine de *S. aureus* (Coleman et al. 1989; Goerke et al. 2009). Néanmoins, les phages chez *S. aureus* sont responsables de l'expression des gènes codant des protéines modulatrices inhibant le système du complément, dont la staphylokinase (Sak), l'Extracellular fibrinogen-binding protein (Efb) (Coleman et al. 1989), le staphylococcal inhibitor of complement (SCIN), et la chemotaxis inhibitory protein (CHIPS), parmi d'autres (Van Wamel et al. 2006). En plus, un bactériophage est également à l'origine de la diffusion d'une série de toxines dites entérotoxines, dont on parlera dans le chapitre suivant, et de la Leucocidine de Panton-Valentine, la toxine sujet de ce travail de thèse.

Les phages peuvent d'ailleurs participer au transfert inter-bactérien (transduction) des résistances aux antibiotiques, en interagissant avec les plasmides, ou encore avec un autre élément génétique mobile de *S. aureus*, les **îlots de pathogénicité**.

Ces derniers éléments génétiques sont constitués de grandes régions d'ADN d'environ 14 à 17 kb formant des clusters de gènes normalement intégrés au chromosome bactérien, ou bien

retrouvés à l'intérieur d'un plasmide ou du génome d'un bactériophage (Hacker and Kaper 2000). Dans le cas de *S. aureus*, tous ces éléments regroupent des gènes très conservés (Úbeda et al. 2003), qui codent des entérotoxines, l' α -hémolysine, la Leucocidine ED (LukED) et pour la toxine du choc toxique, ou Toxic Shock Syndrome Toxin (TSST-1) (Yarwood et al. 2002).

Un autre type d'élément génétique important pour la virulence de *S. aureus* est la **cassette chromosomique staphylococcique** ou **Staphylococcal cassette chromosomes (SCCs)**. En général, il s'agit de fragments d'ADN relativement grands qui s'insèrent toujours au niveau du gène *orfX* du chromosome de *S. aureus*. Cette insertion est d'intérêt médical puisqu'elle est responsable de la résistance à la méticilline, par l'introduction du gène *mecA*. Par conséquent, les souches SARM présentent toutes la cassette chromosomique staphylococcique *mecA* ou *SSCmecA* qui confère une résistance à la méticilline et à tous les antibiotiques à noyau β -lactame (la pénicilline, entre autres) (Chambers and DeLeo 2009).

En plus des éléments génétiques mobiles décrits précédemment, d'autres encore ont été décrits étant impliqués dans la pathogénicité de la bactérie. En particulier les **séquences d'insertion (SI) (Figure 4)**, des courtes séquences d'ADN d'environ 500 à 1500 pb qui représentent un autre élément transposable, principalement impliqué dans la résistance à d'autres antibiotiques, à savoir aux aminoglycosides et au triméthoprim (Rouch et al. 1987, 1989). Certaines SI peuvent faire partie de séquences plus complexes appelées **transposons (Figure 4)** (Byrne et al. 1989) qui peuvent être soit de petite taille et présents en plusieurs copies, ou bien constitués de séquences plus longues, mais présents en copie unique chez *S. aureus*. Ces éléments confèrent également la résistance à différents antibiotiques : les transposons de petite taille peuvent coder la résistance à la spectinomycine, ou aux antibiotiques MLS_B (Macrolide-lincosamide-streptogramine B), alors que des transposons de plus de 18 kb sont responsables des résistances à la vancomycine, aux aminoglycosides, au triméthoprim et à la tétracycline (Malachowa and Deleo 2010).

En général, *Staphylococcus aureus* a pu obtenir ses nombreux facteurs de virulence grâce à son rapport très étroit avec les hôtes mammifères et la plupart de ces facteurs est exprimée sous le contrôle de systèmes de régulation génétiques présents dans le chromosome de la bactérie (Malachowa and Deleo 2010). Ils seront abordés dans le prochain chapitre.

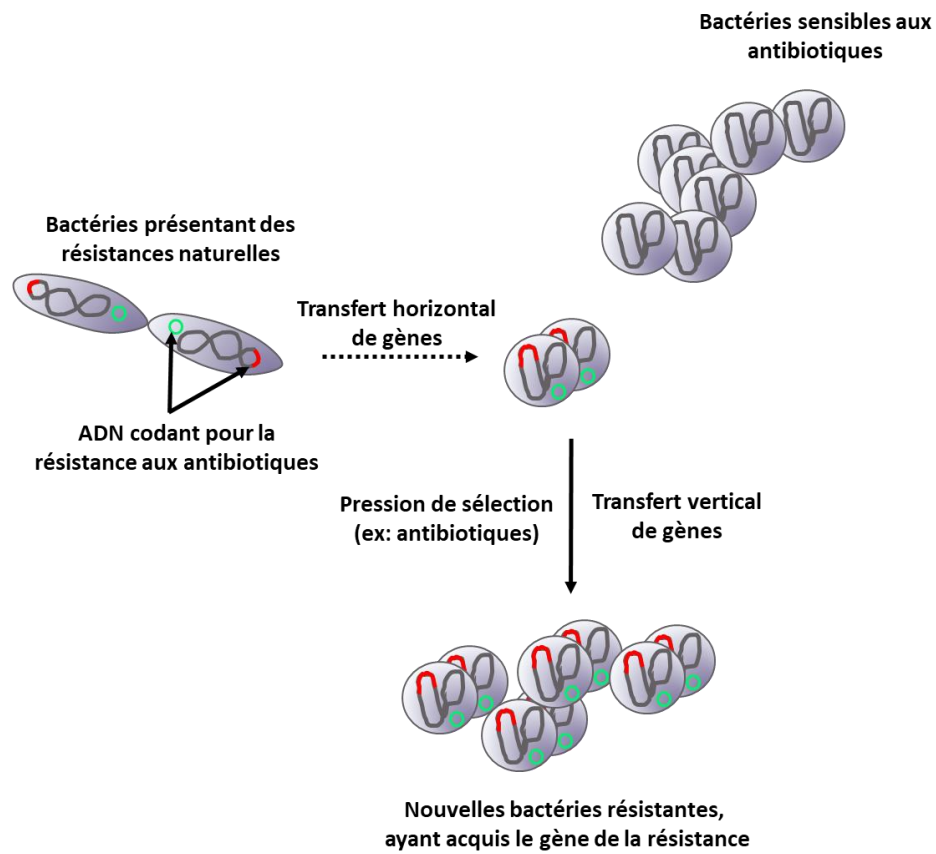


Figure 3- Transfert vertical et horizontal des gènes de virulence. Adapté de (Malachowa and Deleo 2010).

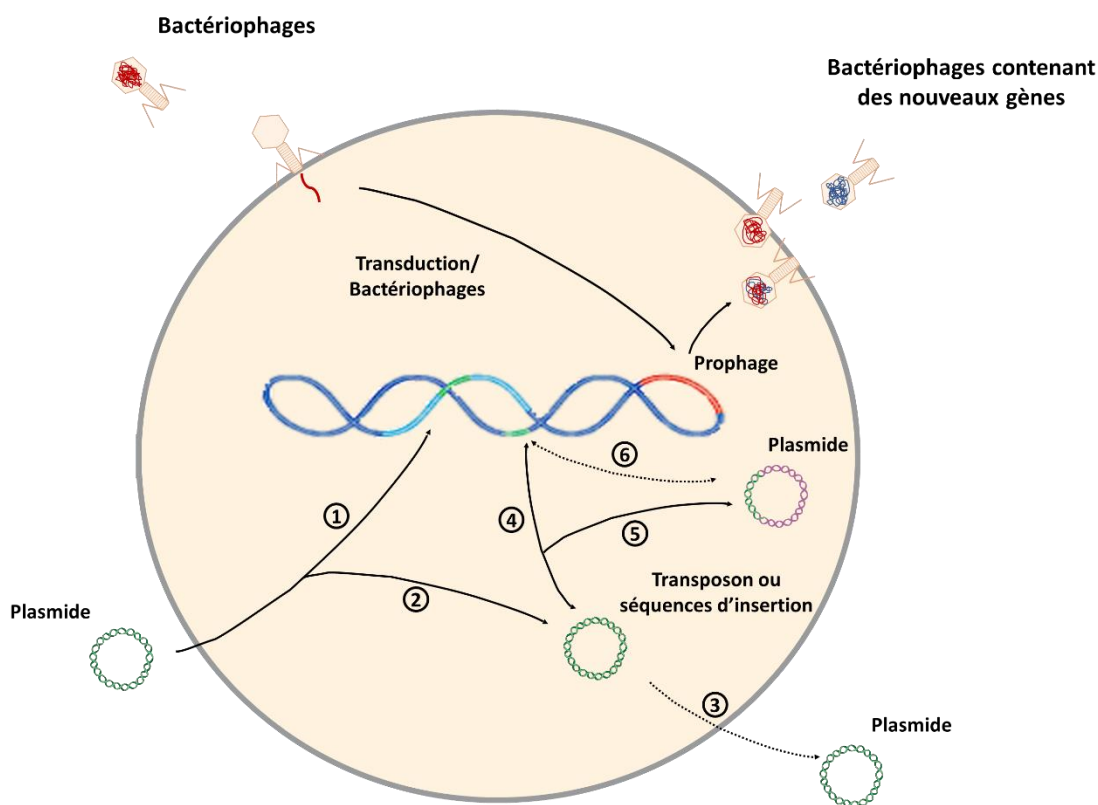


Figure 4- Acquisition des éléments génétiques mobiles de *S. aureus*.

- 1 Incorporation des plasmides ou d'une partie du matériel génétique du plasmide à l'ADN génomique de *S. aureus*.
- 2 Les plasmides peuvent rester à l'intérieur de la bactérie sous forme circulaire et indépendante.
- 3 Plasmide suicidaire.
- 4 Transfert d'un transposon ou d'une séquence d'insertion entre le plasmide et l'ADN génomique bactérien.
- 5 Transfert d'un transposon ou d'une séquence d'insertion entre le plasmide à l'intérieur de la cellule.
- 6 Transfert d'un transposon ou d'une séquence d'insertion de l'ADN génomique à un autre plasmide.

Adapté de (Malachowa and Deleo 2010)

1.1.4.2 Les systèmes de régulation : la « tour de contrôle » de la virulence de *S. aureus*

Nous avons décrit jusqu'ici les caractéristiques génétiques qui sont à la base de la virulence de *Staphylococcus aureus*. Il s'agit donc d'une bactérie potentiellement « bien armée » et ayant plusieurs cordes à son arc. Cette bactérie peut donc être dotée d'un arsenal bactérien qui définit les différences entre les souches et qui en détermine le caractère nocif à l'égard de l'hôte humain. Néanmoins, un slogan d'une publicité de pneus italiens énonçait « la puissance n'est rien sans le contrôle ». Évidemment, *S. aureus* suit le même bon principe. Effectivement, cette bactérie règle l'expression de ses gènes de virulence à travers deux systèmes de régulation génique qui lui assurent une production des facteurs de virulence dans les conditions optimales : les principaux

sont le locus *agr* (Coulter et al. 1998) et le locus *sarA* (Chien et al. 1999), qui peuvent représenter simultanément « le frein et l'accélérateur » de la bactérie.

En effet, à la fin des années 70, les chercheurs avaient déjà remarqué que les protéines solubles de *S. aureus* étaient produites et libérées dans milieu extracellulaire principalement une fois terminée la phase exponentielle de croissance de la bactérie, suggérant de ce fait un système de régulation unique et commun (Abbas Ali and Coleman 1977). Il s'agissait surtout d'un phénomène observable en situation de carence, donc présent également à de faibles concentrations bactériennes, en fonction de l'environnement. Cette information a été confirmée par la présence de mutants ayant plusieurs fonctions différentes (pléiotropique) et à la découverte d'un système de régulation des facteurs de virulence appelé **Système de régulation globale Agr**. Peu de temps après, d'autres loci différents ont été identifiés participant à la régulation des facteurs de virulences de *S. aureus*, dont le locus *sarA* et ses homologues.

Concernant le système **Agr**, ou Accessory gene regulator, sa régulation est déterminée par deux composés. Brièvement, ce système est composé par un domaine localisé à la membrane plasmique de la cellule bactérienne, AgrB et AgrC, dont AgrB, en complexe avec AgrD, est responsable de la modification et de l'export extracellulaire du peptide AIP (*agr*-inducing peptide). L'accumulation de AIP va activer et provoquer la phosphorylation de AgrC, qui, à son tour, phosphoryle AgrA, une protéine localisée au niveau cytoplasmique. La phosphorylation de cette dernière provoque l'induction de la transcription des promoteurs P2 et P3, lesquels permettent la transcription de la molécule RNA III. RNA III est le véritable effecteur qui contrôle positivement ou négativement la transcription des facteurs de virulence (Janzon and Arvidson 1990; Novick et al. 1993, 1995). En particulier, RNA III permet l'inhibition de l'expression des protéines de surface (protéine A) et d'autres protéines d'adhésion, autres que de la coagulase, en faveur d'une induction de transcription de facteurs de virulence tels que des toxines et des enzymes. Parmi les toxines induites par le système Agr, on retrouve les entérotoxines B, C, D, TSST-1, les exfoliatines A et B et les β - et δ - hémolysines. D'ailleurs, c'est grâce à ce système de régulation que certaines **leucotoxines** sont exprimées par *S. aureus*, notamment l' α -hémolysine, mais aussi les deux toxines étudiées au cours de ce travail de thèse, la γ -hémolysine et la LPV (Bronner et al. 2004; Cheung et al. 2004). Ce système est également appelé **quorum sensing**, puisque la régulation qui en résulte est déterminée par la densité de cellules bactériennes présentes dans l'environnement. En général, quand l'infection s'installe et la population bactérienne présente est abondante, l'accumulation de la protéine AIP produite par *S. aureus* dépasse une valeur seuil, ainsi permettant l'activation du système Agr et l'expression consécutive et concertée des facteurs de virulence par toutes les bactéries de la population locale. Cela va

généralement réprimer l'expression des protéines d'adhérence, qui étaient inversement nécessaires pendant la phase de croissance bactérienne, c'est-à-dire quand les bactéries présentes n'étaient pas encore très nombreuses.

À côté de ce premier système de régulation, il y a le système « accessoire », une famille de protéines appelée **Sar** ou « Staphylococcus accessory regulator ». SarA est une petite protéine basique de 14,7 kDa codée par le locus *sarA*, ayant une activité de régulation pléiotropique liée à la formation de biofilm via l'induction de la synthèse d'une adhésine appelée PIA (polysaccharide intercellular adhesin) (Arya and Princy 2016). SarA se lie directement à l'ADN bactérien sur des régions riches en AT des promoteurs des gènes cibles et provoquant l'altération de l'expression de différents gènes de virulence de façon positive, induisant des facteurs d'adhésion et certaines toxines, ou négative, comme par exemple son action d'inhibition de la protéine A et de l'expression de protéases (Cheung et al. 2004). D'ailleurs, *sarA* montre une interaction avec le système Agr, en activant les promoteurs P2 et P3 et induisant ce système de régulation génique (Arya and Princy 2013). Le système de régulation *sarA* est régulé par plusieurs autres facteurs, comme le facteur végétatif sigma A (σA), notamment pendant les étapes précoces de la phase de croissance exponentielle de la population bactérienne (Arvidson and Tegmark 2001).

D'autres systèmes ont été décrits et sont impliqués dans la régulation fine des facteurs de virulence de la bactérie ; à savoir le système *sae*, contrôlant l'expression de nucléases et coagulases staphylococciques dépendamment des conditions environnementales comme la salinité, le pH, le glucose et la présence d'antibiotiques (Novick et al., 2003), et le système *rot* (repressor of proteins), ayant une activité inhibitrice sur l'expression des toxines de *S. aureus*, tel que l' α -toxine, la γ -hémolysine et des protéases, en opérant une inhibition sur l'opéron *agr* ou en empêchant la transcription des gènes cibles (Arya and Princy 2016).

En général, l'expression des gènes de virulence se base sur plusieurs systèmes de régulation complexes et interconnectés qui représentent une forme de communication intra- ou interspécifique, dans le but de s'adapter à la fluctuation des facteurs environnementaux. Cela est l'une des stratégies habilement développées par la bactérie pour optimiser la production de ses toxines, la constitution du biofilm et, globalement, sa pathogénicité.

1.1.4.3 Les facteurs de virulence versus la réponse immunitaire humaine : une analogie historique

Staphylococcus aureus vit et prolifère sur notre peau, au niveau de nos muqueuses. Cette bactérie est une menace silencieuse qui nous colonise, soit de façon permanente, soit transitoirement. Il

est difficile d'éradiquer en surface ce pathogène comme n'importe quel autre : il nous connaît intimement et joue probablement un rôle de barrière. En effet, dans le paragraphe qui suit, nous verrons jusqu'à quel point *S. aureus* a réussi à contrecarrer nos défenses immunitaires, démontrant une stratégie qui pourrait rappeler, à bien des égards, les tactiques de l'infanterie romaine depuis les débuts de la République. Non seulement en référence à l'organisation très fine du quorum sensing où l'on voit les bactéries agir de façon coordonnée face aux changements environnementaux du site d'infection, mais également concernant la nature des facteurs de virulence produits. Cet arsenal de facteurs travaille en concert non seulement pour inhiber efficacement l'élimination de *S. aureus* effectuée par l'immunité de l'hôte, mais également pour empêcher le développement d'une « mémoire » immune contre le pathogène. Ainsi, comme nous l'avons vu dans le chapitre concernant les pathologies associées à *S. aureus*, la phase primordiale et primaire de l'infection est souvent opérée par la rupture de la barrière épithéliale : une plaie due à un traumatisme, à l'insertion d'un cathéter ou plus généralement à un acte chirurgical, ou encore au niveau des entrées « naturelles », tels que les follicules pileux ou les glandes sébacées ou sudoripares. D'emblée, il y a certainement un challenge entre la bactérie et l'immunité innée.

1.1.4.3.1 La « marche d'approche » : les facteurs favorisant la dissémination de *S. aureus* dans l'organisme

Cette phase, suivie par la dissémination de la bactérie dans l'organisme correspondrait à la « marche d'approche » qui précède la bataille, dans l'analogie avec l'infanterie romaine. Ainsi, des facteurs appelés **adhésines** entrent en jeu, ensemble avec certains **exoenzymes**. En effet, de nombreuses adhésines sont impliquées dans la phase de colonisation effectuée par la bactérie, en facilitant son adhésion aux surfaces de l'hôte. En plus, un nombre considérable d'exoenzymes et quelques cofacteurs ont également un rôle dans l'étape de dissémination bactérienne. La **coagulase** est un cofacteur impliqué dans la formation du biofilm, mais aussi dans la protection de la bactérie dans le cas d'un abcès, en fournissant la fibrine utilisée pour la formation de la pseudo-capsule de *S. aureus*. Concernant les exoenzymes capables de dégrader les tissus de l'hôte, on distingue des **protéases**, des **lipases** et des **hyaluronidases** : un arsenal d'enzymes produits, afin d'hydrolyser tous types de composés tissulaires de l'hôte pour consentir la colonisation dans l'organisme. D'ailleurs, la bactérie exprime toujours une nucléase (DNase), permettant à *S. aureus* de fournir des nutriments essentiels, voire de se libérer des filets/trappes à chromatine produites par les neutrophiles, ou Neutrophil Extracellular Traps (NETose), entre autres.

Ces facteurs sont sujets aux systèmes de régulation génétiques décrits auparavant et permettent l'installation de l'infection et la prolifération bactérienne.

1.1.4.3.2 La « construction du camp fortifié » : l'installation de *S. aureus* chez l'hôte

Concernant la phase suivante, la « construction du camp fortifié », on pourrait bien y reconnaître le mécanisme de formation du **biofilm**.

Brièvement, le biofilm peut se former en quelques heures et le mécanisme se déroule en trois étapes : une première phase, dite d'attachement qui, sur des matériaux abiotiques comme les cathéters, se fait principalement à travers des interactions non spécifiques de type électrostatique, avec la participation des éléments bactériens tels que des autolysines ou l'acide téichoïque (Foster 1995; Legeay et al. 2006). À l'inverse, si un biofilm est formé sur un matériel d'origine humaine, les interactions seront bien plus spécifiques, grâce à l'action des protéines de surface de *S. aureus* appelées Microbial Surface Components Recognition Adhesive Matrix Molecules, ou MSCRAMM, telles que le fibrinogène, qui stimule l'angiogenèse et la coagulation, ou la fibronectine, qui permet l'adhérence des cellules (Patti et al., 1994). Ces dernières favorisent l'adhésion intercellulaire. Suite à cette première phase, il y a une étape de maturation, où il y a un dépôt d'un polysaccharide appelé Polysaccharide Intercellular Adhesin ou PIA. Celui-ci a une fonction semblable au béton utilisé pour la construction d'un mur. En effet, le PIA forme une matrice de support qui permet au biofilm de se développer de façon tridimensionnelle et, grâce à des interactions électrostatiques, d'assurer une organisation en couches des cellules bactériennes. Cette organisation a une fonction de protection du système immunitaire de l'hôte, vis-à-vis de la déshydratation ou des antibiotiques (Costerton et al. 1999; Hall-Stoodley and Stoodley 2009) et il dépend du système Agr décrit précédemment. La dernière phase est celle du détachement, où les bactéries ayant atteint le niveau maximal de la taille du biofilm, sont libérées sous leur forme planctonique dans le but de coloniser d'autres surfaces de l'hôte, et ainsi propager l'infection (Goetz et al. 2016). L'analogie susmentionnée est particulièrement frappante puisque le biofilm agirait comme le campement construit dans le but de former une base et de se protéger des attaques extérieures. La phase de détachement correspondrait à la « levée du camp » et la reprise de la marche.

1.1.4.3.3 Le « déploiement avant le combat » : l'organisation des facteurs de virulence de *S. aureus* pour inhiber l'immunité humaine et faciliter la dissémination

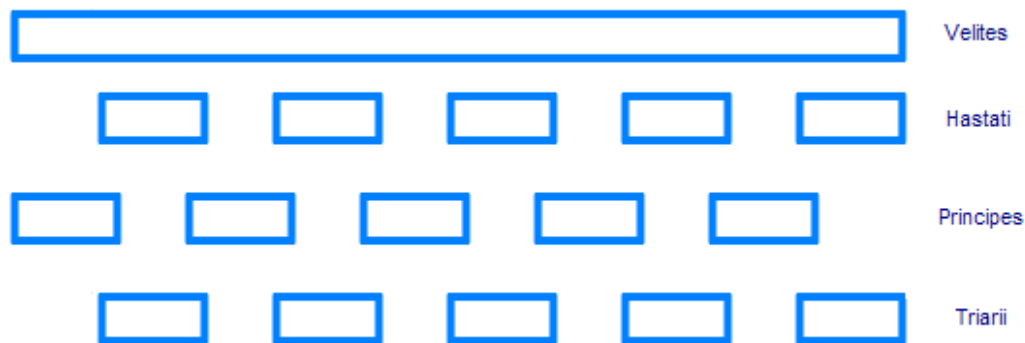


Figure 5- Disposition classique en trois lignes de l'infanterie romaine

(depuis le site internet Wikipédia: https://fr.wikipedia.org/wiki/Tactiques_de_l%27infanterie_romaine#Pr%C3%A9parations_initiales_et_mouvements_vers_la_bataille)

Nous allons faire un préambule ayant pour but d'introduire les facteurs de virulence de *S. aureus*, principalement exprimés et sécrétés afin de se débarrasser de l'immunité humaine, et spécialement conçus pour éviter tout dommage à la cellule bactérienne en elle-même. En effet, revenant à notre analogie historique, la phase suivant l'installation de l'infanterie romaine dans le champ est donc le déploiement de son armée pour se préparer au combat. Dans la Figure 5, on retrouve un schéma classique de l'organisation militaire pendant l'attaque. On peut observer la disposition typique en lignes, dont la toute première, formée par les fantassins légers des armées romaines antiques (les « vélites »), est la plus proche de l'ennemi. A l'inverse, *S. aureus* dans son organisation sessile en biofilm, représenterait donc la toute dernière ligne d'attaque, où les « triarii », c'est-à-dire les vétérans, n'étaient pas censés combattre réellement, étant si bien protégés par les trois lignes de défense qui les séparaient de l'ennemi, et donc du combat.

En effet, une fois la bactérie entrée dans l'organisme, notre système immunitaire répond rapidement par différentes stratégies : l'activation du **système du complément**, l'action des **enzymes et peptides antimicrobiens** et la **phagocytose** opérée par une catégorie spécifique de cellules immunitaires, les phagocytes, dont les neutrophiles humains, parmi d'autres (Medzhitov and Janeway C. 2000).

Effectivement, la surface bactérienne présente des éléments qui sont reconnus par le système immunitaire, étant des motifs moléculaires associés aux pathogènes, ou tout simplement **PAMPs**. Ces motifs ou « patterns » déclenchent une cascade de réactions immunitaires qui visent à détruire le pathogène en employant des moyens de plus en plus puissants et spécifiques.

Ainsi, une fois que la bactérie a été identifiée comme élément étranger par notre système immunitaire, des peptides et des enzymes sont employés, afin de détruire le pathogène.

Il s'agit en effet de l'activité exercée notamment par une cascade de réactions où une trentaine de protéines sériques sont clivées en succession, afin de tuer la bactérie. On parlera alors du **système du complément**. Ce système peut intervenir très précocement dans la réponse aux pathogènes, mais il fait également partie d'une réaction qui « soutient » l'immunité adaptative. Cette dernière fonction lui a valu le nom de « complément ». En effet, le complément a été initialement décrit comme facilitant l'opsonisation des bactéries, opérée à travers la liaison des anticorps aux pathogènes. Brièvement, le complément peut être activé à travers trois voies différentes : la voie classique, qui implique la reconnaissance des complexes antigène-anticorps par le C1q, la voie de la lectine, déclenchée par la liaison avec des polysaccharides présents sur la surface bactérienne, et la voie alterne, qui se distingue par le clivage spontané du facteur de la cascade du complément C3 en C3a et C3b, ce dernier se liant ensuite à la paroi bactérienne et clivant le facteur B en Bb et Ba. Les trois voies convergent toutes vers la formation d'un complexe de protéases actives sur la surface des pathogènes, la C3 convertase. Une fois activé, le système peut donc protéger l'hôte par trois moyens : en facilitant la phagocytose par l'opsonisation des bactéries, en attirant les cellules immunitaires aux sites infectieux par l'action des fragments clivés et libérés après chaque étape de la cascade, et en créant un pore transmembranaire à la membrane bactérienne à travers l'action directe du composé terminal produit par la cascade, le complexe **MAC** ou **Membrane Attack Complex** (Medzhitov and Janeway C. 2000) (Figure 6).

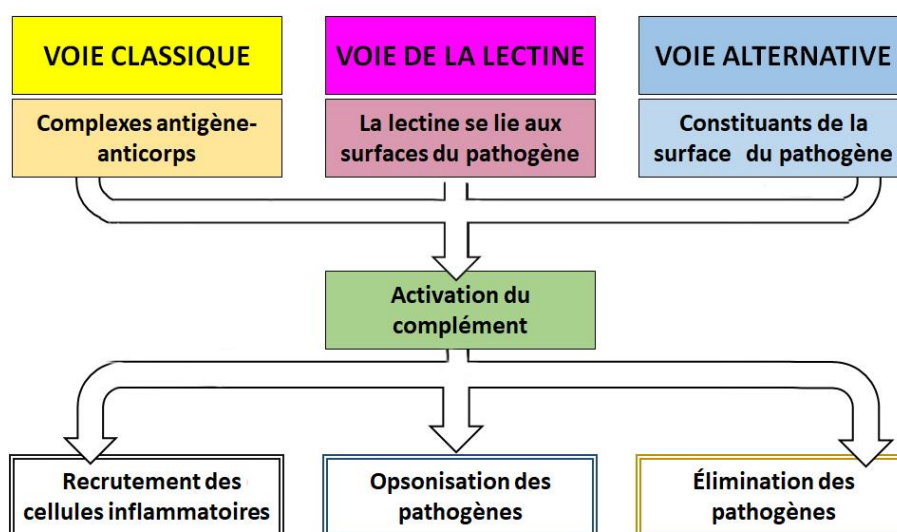


Figure 6- Représentation schématique des trois voies de la cascade du complément.

La voie classique (en jaune), initiée par la reconnaissance du fragment Fc de l'immunoglobuline, ou par le lien direct du composant C1q avec la surface du pathogène ; la voie de la lectine (en rose), initiée par une lectine appelée MBL

(mannan-binding lectin) normalement présente dans le sérum humain, qui se lie à la capsule bactérienne ; la voie alterne (en bleu) initiée spontanément par la présence des constituants présents sur la surface de la bactérie. Les trois voies mènent toutes à la formation d'une enzyme (en vert) qui va provoquer la génération des molécules effectrices du complément. Les trois conséquences principales de la cascade du complément sont l'opsonisation des pathogènes, le recrutement des cellules de l'inflammation et une activité directe par formation d'un pore à la bactérie qui entraîne la mort. Adapté de (Otagiri et al. 2017)

Staphylococcus aureus est néanmoins capable d'inhiber différentes étapes du système du complément par la production de ses facteurs de virulence (Figure 7).

Dans l'étape de reconnaissance de *S. aureus*, en particulier pour ce qui concerne la voie classique et celle de la lectine, la bactérie a développé une stratégie impliquant la production de protéines inhibitrices qui visent à bloquer l'interaction entre les phagocytes et les bactéries opsonisées par les immunoglobulines IgG ou par les opsonines C3b. Deux protéines sont retrouvées ancrées à la surface bactérienne : la staphylococcal protein A (**SpA**) et la staphylococcal immunoglobulin-binding protein (**Sbi**), alors que la staphylokinase (**SAK**) est sécrétée dans le milieu extracellulaire. Concernant le mode d'action, SpA et Sbi ont une fonction similaire : se liant au fragment Fc des immunoglobulines, elles empêchent l'interaction entre les neutrophiles et les complexes antigène-anticorps (Forsgren and Sjöquist 1966; Atkins et al. 2008). Différemment, la SAK cible le plasminogène de l'hôte pour produire la plasmine qui se dépose sur la surface bactérienne et cause le clivage des IgG et de la C3b de façon indirecte (Rooijakkers et al. 2005). La phase d'amplification consiste en la formation des C3 convertases. *S. aureus* dispose de 4 autres protéines inhibitrices, qui agissent à différents niveaux : le Clumping Factor A (**ClfA**), avec une action de cofacteur sur le facteur I (fI), le responsable direct du clivage du C3 en sa forme inactive, iC3b (Hair et al. 2008), le staphylococcal complement inhibitor (**SCIN**), une protéine de 85 résidus qui bloque la C3 convertase et son action sur le C3, inhibant ainsi la phagocytose qui suit l'opsonisation (Rooijakkers et al. 2007), l'Extracellular fibrinogen-binding protein (**Efb**) et l'Extracellular complement-binding protein (**Ecb**) qui agissent en se liant directement à C3b, et bloquant la voie alternative de la cascade du complément (Jongerijs et al. 2007). En plus, Sbi a également une fonction d'inhibition à cette étape de la cascade, en se liant au facteur H régulant le complément, ou complement regulator factor H (FH), et formant un complexe avec C3 qui inhibe son activité (Haupt et al. 2008).

En dernier, *S. aureus* cible la phase d'activation du C5 et de la migration des neutrophiles. En effet, la production d'une protéine appelée **CHIPS**, ou « chemiotaxis inhibitory protein of *S. aureus* », inhibe la chimio-attraction des phagocytes, promue par le système du complément, en bloquant le récepteur de l'anaphylotoxine C5a, le C5aR, et celui des peptides formylés comme

le fMLP, le formylated peptide receptor (FPR) (Postma et al. 2004). D'autres protéines produites par *S. aureus* ont le même rôle, comme c'est le cas du Staphylococcal superantigen-like 7 (SSL7) qui cible directement le C5 et inhibe son clivage en C5a et C5b (Laarman et al. 2010).

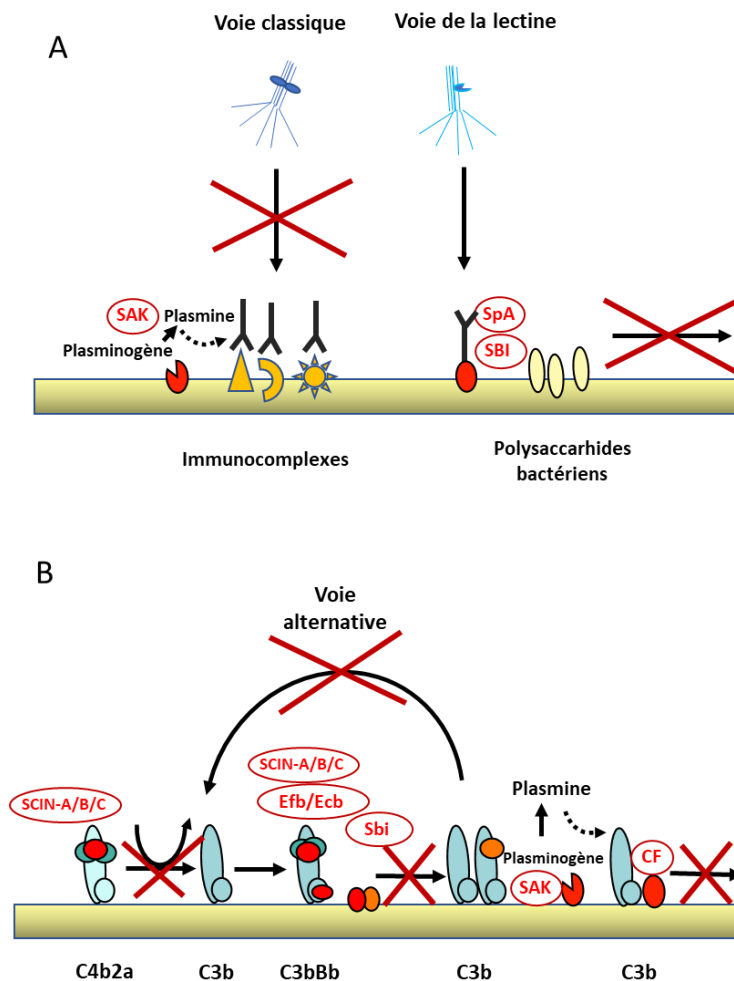


Figure 7- Évasion bactérienne de la reconnaissance de la cascade du complément (a) et de l'opsonisation (b).

Les protéines de *S. aureus* sont illustrées en rouge dans le schéma. *S. aureus* est capable de moduler l'action d'opsonisation et de reconnaissance de la cascade du complément.

- (A) Pour empêcher la reconnaissance des facteurs pathogéniques par la voie classique du complément, *S. aureus* exprime les protéines de surface Protéine A (SpA) et le staphylococcal immunoglobulin-binding protein (Sbi). Ces deux protéines se lient au fragment Fc des IgG, en bloquant l'interaction avec les FcR des neutrophiles. Un autre mécanisme pour éviter la reconnaissance passe par l'inactivation des IgG de façon indirecte à travers la plasmine activée par la Staphylokinase (SAK).
- (B) Il y a trois stratégies de *S. aureus* pour moduler l'opsonisation : (1) le clivage du C3, effectué de façon indirecte par la plasmine activée par la SAK qui va à son tour activer le clumping factor A (CF). Le CF peut ainsi se lier au facteur I de la protéase C3b humaine, ce qui permet le clivage du C3b. (2) À travers la modulation de la convertase : *S. aureus* peut inactiver les convertases C3 par la sécrétion de SCIN, SCIN-B, SCIN-C, Efb, et Ecb. (3) Par la modulation des régulateurs de l'hôte : Sbi se lie aux régulateurs négatifs de la convertase (FH, FHL1 et CD46 chez l'humain).
Adapté de (Laarman et al. 2010)

À côté de cette réponse précoce, l'immunité innée réagit à la présence des pathogènes par les **peptides antimicrobiens (PAM)** et la **phagocytose**, déclenchée en aval de la cascade du complément.

Les PAM sont des peptides d'environ 50 acides aminés présents chez l'animal et les plantes, des facteurs de défense parmi les plus anciens et les mieux conservés (Hoffmann et al. 1999). Ils sont présents notamment au niveau de la couche cornée de la peau où ils représentent la barrière cutanée chimique (Schröder and Harder 2006). Ils peuvent également être stockés au niveau des phagocytes, en particulier dans les granules des polynucléaires neutrophiles, et avoir un rôle pendant la phagocytose (Schröder and Harder 2006). L'activité bactéricide des peptides antimicrobiens dérive de leur charge nette positive qui permet l'interaction avec la membrane bactérienne, généralement chargée négativement. Un bon exemple est représenté par le **lysozyme** ou 1,4-8-N acetylmuraminidase, une enzyme particulièrement abondante dans les fluides corporels, mais également produite par les phagocytes après stimulation pro-inflammatoire (Keshav et al. 1991). Le lysozyme est une protéine antimicrobienne exprimée par les kératinocytes et les glandes lacrymales (Ogawa et al. 1971) qui dégrade les parois du pathogène en hydrolysant le peptidoglycane et en activant les autolysines bactériennes, qui, à leur tour, participent à la dégradation de la paroi (Masschalck and Michiels 2003). Cependant, l'action de cette enzyme est rapidement inhibée par l'ajout d'une D-alanine effectué par l'opéron *Dlt* sur les **acides téichoïques et lipotéichoïques** et une perte de la charge négative de la membrane phospholipidique de *S. aureus*, qui empêche l'action des PAM, à charge positive. Ce changement de charge a le double rôle, non seulement de réduire l'affinité des PAM pour la membrane bactérienne, mais aussi de les éloigner par leur répulsion électrostatique. La même stratégie est employée aussi bien une fois *S. aureus* phagocyté par les neutrophiles, que dans le sérum, où la **phospholipase A** et la **lactoferrine** ne peuvent pas agir sur *S. aureus* (Foster 2005). En général, *S. aureus* se protège de l'action des PAM en camouflant la charge de la surface cellulaire qui les attire à la membrane, mais aussi par la sécrétion de protéines qui neutralisent directement les peptides cationiques. C'est le cas de la **SAK**, déjà décrite dans ce paragraphe, qui a une action inhibitrice vis-à-vis du complément. En effet, SAK montre une activité de « défensine-peptide-binding », c'est-à-dire qu'elle empêche l'activité des PAM en créant une liaison semblable à celle créée au niveau des IgG et de la protéine du complément C3. La même action est produite par l'**auréolysine**, une métalloprotéase extracellulaire de *S. aureus* qui cible et clive les PAMs de la famille des cathélicidines, le **LL-37** (Sieprawaska-Lupa et al. 2004). D'ailleurs, le LL-37 cible la

SAK et facilite ainsi son activité de fibrinolyse et d'activation du plasminogène, ce qui favorise la dissémination de *S. aureus* (Braff et al. 2007).

Concernant la **phagocytose**, son action est contrôlée par *S. aureus* essentiellement grâce aux protéines impliquées dans l'inhibition de la cascade du complément (voir paragraphe précédent), mais également d'autres facteurs sont en jeu : la **capsule**, la « polysaccharide intercellular adhesin » (**PIA**) et les **inhibiteurs des dérivés réactifs de l'oxygène**.

La **capsule**, une fine couche de polysaccharides de sérotype 5, 8 et 336 (Thakker et al. 1998) est organisée autour de *S. aureus* ayant le rôle de prévenir la reconnaissance des opsonines et des facteurs du complément assemblés sur la membrane bactérienne par les récepteurs des cellules effectrices (Nilsson et al. 1997). Le **PIA**, déjà mentionné dans le paragraphe illustrant la formation du biofilm, a également une fonction inhibitrice de la phagocytose par son action protectrice, notamment par rapport à la population formant le biofilm (Foster 2005). En dernier, trois facteurs principaux contribuent à l'action antioxydante vis-à-vis des dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) produits pendant la phagocytose : le **pigment caroténoïde** qui confère la coloration typique de *S. aureus* (Liu et al. 2005), la **superoxyde dismutase** (SOD) (Karavolos et al. 2003) et la **catalase** (Das and Bishayi 2010). Les gènes codant ces enzymes sont en effet surexprimés suite à l'ingestion par le processus de phagocytose (Foster 2005). En plus de ces trois facteurs, l'homéostasie du **manganèse** (Horsburgh et al. 2002) et de trois **méthionine superoxyde réductases** exprimées par *S. aureus* interfèrent avec les DRO des phagocytes (Singh and Moskovitz 2003). *In fine*, d'autres stratégies complémentaires sont employées, afin de rendre inefficace la phagocytose : nous pouvons citer la régulation génétique dépendante du régulateur global **SarA**, déjà traitée précédemment, qui contribue à l'expression des gènes impliqués dans l'interférence avec la phase de fusion entre phagosomes et lysosomes, et avec la libération des peptides antimicrobiens contenus dans les granules (Gresham et al. 2000).

1.1.4.3.4 Le « combat » : les toxines de *S. aureus* ciblent les cellules immunitaires

« Lorsque l'armée a créé ce déploiement, les *hastati* commençaient en premier le combat. S'ils étaient incapables de battre l'ennemi, ils reculaient à pas lents et les *principes* les accueillait dans les espaces entre eux. [...] les *triarii* se mettaient sous les bannières, la jambe gauche tendue, les boucliers reposant sur leur épaule et les perches enfoncées au sol, avec leurs pointes vers le haut, comme s'il s'agissait d'une barrière. Si les *principes* s'étaient également battus avec peu de succès, ils reculaient

jusqu'à la ligne des *triarii*. D'où l'expression latine "*Res a Triarios rediit*" qui signifie "aller aux *triarii*" ou "en arriver à recourir aux *triarii*", c'est-à-dire entrer dans le vif du sujet, devoir recourir aux grands moyens ».

(Livio, *Ab Urbe condita libri*, VIII, 8, 9-12.)

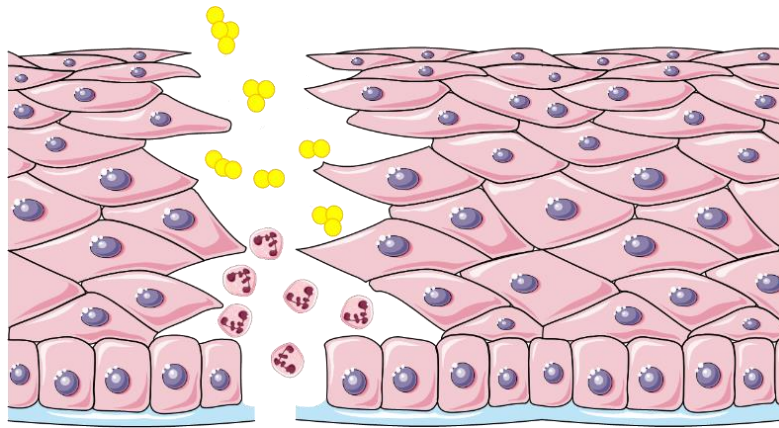
Nous avons analysé jusqu'ici la multitude de facteurs de virulence « primaires » dont *S. aureus* peut disposer. Néanmoins, ces facteurs ont une action plutôt défensive par rapport à l'immunité humaine, et, dépendamment de l'état de l'hôte, peuvent ne pas suffire pour « gagner le combat » contre l'immunité. Or, *S. aureus* a développé également une stratégie d'attaque à côté de sa défense : ses **toxines**.

En général on peut distinguer 3 différents types de toxines : les **enzymes cytotoxiques**, les **superantigènes** et les **toxines formant des pores** ou « **pore forming toxins** » (PFT).

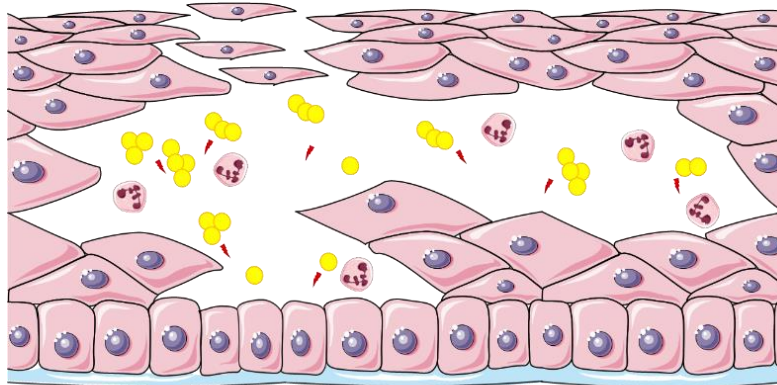
1.1.4.3.4.1 Les enzymes cytolytiques/cytotoxiques

L'attaque staphylococcique vise avant tout la première barrière qui s'interpose entre la bactérie et le torrent circulatoire de son hôte : la peau. Cette attaque est opérée par les nombreuses protéases de *S. aureus*, déjà citées dans le paragraphe illustrant les facteurs favorisant la dissémination bactérienne. À côté de ces facteurs, on trouve une famille de toxines appelées Toxines Exfoliantes (ET), également connues sous le nom **d'épidermolysines** et faisant partie de la catégorie des **enzymes cytotoxiques et cytolytiques**.

Il s'agit de sérines protéases qui ciblent spécifiquement les cadhérines des desmosomes de la couche la plus superficielle de la peau, pour créer une porte d'entrée et ainsi faciliter la dissémination bactérienne (Bukowski et al. 2010) (Figure 8).



Staphylococcus aureus adhère à l'épiderme et pénètre à travers les brèches intercellulaires créées par les neutrophiles parmi les kératinocytes superficiels.



Expansion des cavités opérées par les toxines ET de *S. aureus*.

Figure 8- Modèle proposé illustrant l'invasion bactérienne et la formation de bulles cutanées provoquées par les ET de *S. aureus*. Adapté de (Oliveira et al. 2018)

Les cellules-cibles de ces toxines sont en particulier les kératinocytes, qui sont hydrolysés au niveau de la desmoglérine-1 des jonctions cellule-cellule en provoquant macroscopiquement le décollement de la peau et la formation de bulles (Nishifuji et al. 2008). Les ET principales décrites au jour d'aujourd'hui sont ETA, ETB, ETC et ETD, dont ETA et ETB sont les plus couramment responsables de lésions cutanées, tandis que ETC semble être plutôt liée à des infections développées chez le cheval, sans association avec les infections humaines (Mariutti et al. 2017). Concernant l'ETD, elle a été retrouvée dans un seul cas d'infection à *S. aureus* (Nishifuji et al. 2008). D'un point de vue génétique, ETA est codée par le gène *eta* présent dans le chromosome bactérien et introduit par un bactériophage tempéré, alors que le gène de *etb*, exprimant la toxine ETB, se trouve dans un plasmide (O'Toole and Foster 1986; Lee et al. 1987). ETD est exprimé par un gène localisé au chromosome sur un îlot de pathogénicité (Nishifuji et

al. 2008). Par contre, rien n'est décrit concernant le locus de la toxine ETC (Sato et al. 1994). Ces toxines sont exprimées par environ 5% des souches de *S. aureus* (Ladhani 2001). Leur production est liée à des infections touchant uniquement la peau, comme l'impétigo bulleuse et la pathologie généralisée connue sous le nom de « staphylococcal scalded skin syndrome » (SSSS), ou épidermolyse toxinique staphylococcique. Cette dernière est une maladie touchant en particulier les nouveau-nés, les enfants et les adultes immunocompromis, des individus ayant généralement une immunité plus immature ou affaiblie, ou encore une fonction d'élimination rénale réduite (Hardwick et al. 1995; Bukowski et al. 2010; Mariutti et al. 2017). Les manifestations cliniques finales de la SSSS sont l'exfoliation de la peau et la formation de bulles, alors que des manifestations précoces sont caractérisées plutôt par une augmentation de la température corporelle, une hypersensibilité de la peau, des érythèmes suivis par la formation de bulles superficielles contenant du liquide séreux et le détachement de la couche superficielle de la peau (Cribier et al. 1994). Le taux de mortalité chez l'enfant adéquatement traité est d'environ 5%, alors que chez l'adulte immunocompromis s'élève à 59% (Popov et al. 2014).

Dans les années 2000, les chercheurs ont identifié la cible des ET : la desmoglérine-1 (Dsg1), une protéine présente uniquement dans la couche plus superficielle de l'épiderme humain. Le mode d'action des ET prévoit une phase de reconnaissance de la Dsg1, ce qui peut se produire uniquement en présence d'ions calcium (Ca^{2+}) dans le milieu (Hanakawa et al. 2003).

Une fois arrivée dans la circulation sanguine, *S. aureus* doit éviter, ou alors combattre, les cellules composant l'immunité. En effet, un deuxième type d'enzyme cytotoxique est la β -toxine ou **β -hémolysine**. Il s'agit d'une sphingomyélinase C dépendant du magnésium Mg^{2+} , une toxine ayant une action hydrolytique au niveau de la membrane plasmique, en agissant sur la sphingomyéline, un lipide présent à la membrane des cellules pour produire le céramide et la phosphocholine (Doery et al. 1963). Cette toxine a été décrite comme possédant également un pouvoir hémolytique sur les globules rouges en condition de températures inférieures à 37°C (Low et al. 1974).

1.1.4.3.4.2 Les superantigènes

S. aureus peut cibler les lymphocytes T CD4 par la production d'une catégorie de toxines appelées **superantigènes**. Initialement dénommées génériquement entérotoxines à cause de leur pouvoir émétique et diarrhéique, semblable aux symptômes de l'intoxication alimentaire staphylococcique (Grumann et al. 2014), cette famille est composée par 23 toxines différentes, appartenant à 3 sous-groupes : les entérotoxines staphylococciques, les superantigènes

Staphylococcal enterotoxin-like (SE-I) et la TSST-1, la toxine responsable du syndrome du choc toxique, déjà mentionnée dans les chapitres précédents. Ces toxines ont été décrites pour la première fois en 1988 par Bernhard Fleischer et Hubert Schrezenmeier (Fleischer and Schrezenmeier 1988) comme les mitogènes le plus puissants existants. Leur pouvoir mitogène dérive de leur capacité de créer un lien croisé entre la région V β du récepteur des lymphocytes T CD4⁺ et le complexe majeur d'histocompatibilité de classe 2 (CMH II) présent chez les cellules présentatrices d'antigènes (Figure 9). Cela induit la prolifération polyclonale des lymphocytes T avec une production massive de cytokines inflammatoires, comme le TNF α , l'IL-2 et l'INF γ (McCormick et al. 2001). Ces cytokines en concentration élevée provoquent une intoxication de l'hôte, appelée choc toxique, une condition au pronostic souvent sombre. Après le relargage des cytokines, les lymphocytes T deviennent non réactifs et ils sont donc éliminés par apoptose (Rellahan et al. 1990; Alderson et al. 1995). Cela suggère une fonction bien spécifique des superantigènes, qui viseraient donc à se débarrasser de la conséquence réponse humorale de l'hôte (Holtfreter et al. 2006; Grumann et al. 2011).

En particulier, les **entérotoxines** staphylococciques ont été regroupées sur la base de leur pouvoir d'induction de vomissements et diarrhées suite à leur ingestion. Étant des protéines souvent thermorésistantes, à la protéolyse et à la dessiccation, elles sont difficiles à éliminer par la cuisson des aliments. Cependant, la pathologie qui dérive de cette famille de superantigènes est généralement à résolution spontanée. L'effet émétique est dû à la présence d'un pont disulfure qui crée une boucle de 9 à 19 acides aminés dans la protéine (Tam and Torres 2019).

Concernant les superantigènes **Staphylococcal enterotoxin-like (SE-I)**, les informations sur ce groupe de toxines restent limitées. En général, on classe dans cette catégorie les superantigènes qui ont un pouvoir mitogène sur les lymphocytes T, mais une activité émétique incertaine ou absente (Spaulding et al. 2013).

La **TSST-1** est un superantigène dont le locus *tst* se retrouve sur plusieurs îlots de pathogénicité (Novick 2003). Il était initialement connu comme « SEF », et renommé ensuite « toxic shock syndrome toxin-1 » en 1984 pour indiquer à la fois son manque d'activité émétique et son lien direct avec le syndrome du choc toxique ou TSS. Concernant le TSS, il s'agit d'une pathologie caractérisée par une hypotension, de la fièvre et un rash cutané, qui desquame à distance en 1 à 2 semaines après le contact avec la toxine (Silversides et al. 2010). Le TSS peut être également classé en « menstruel » et « non menstruel », sur la base de son association avec la colonisation au niveau du vagin /du col utérin et l'utilisation de tampons vaginaux contaminés (Shands et al. 1980).

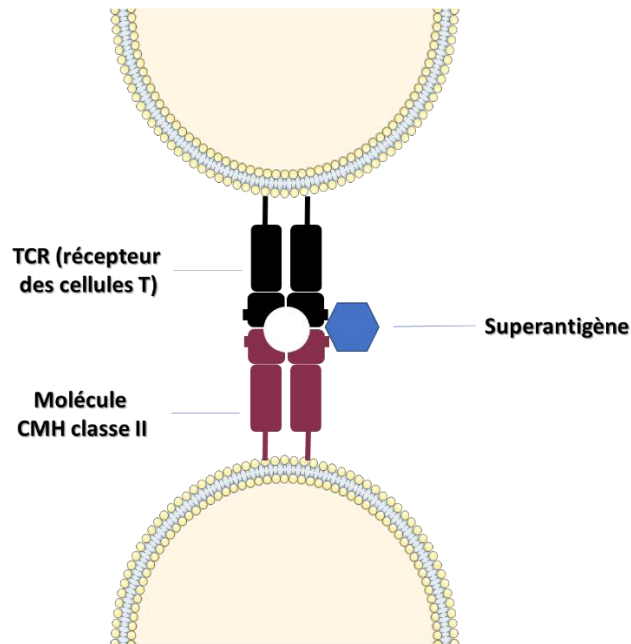


Figure 9- Mode d'action des superantigènes (SAG).

Le superantigène se lie à la partie variable $V\beta$ du récepteur des lymphocytes T et également au complexe majeur d'histocompatibilité de classe 2 (CMH II) des cellules présentatrices d'antigènes. Cela provoque une activation exacerbée des lymphocytes T. (Oliveira et al. 2018)

1.1.4.3.4.3 Les toxines formant des pores

En dernier, on parlera d'un groupe des toxines auquel appartient la **Leucocidine de Pantone-Valentine** ou LPV, le sujet principal de cette thèse. Il s'agit d'un groupe de toxines ayant une fonction principale : la formation de pores au niveau des cellules de l'immunité innée. Elles sont appelées de ce fait **toxines formant des pores** ou « pore-forming toxins » (**PFT**) (Figure 10). On distingue deux types de PFT : une forme monomérique et une forme bicomposée.

Toxine	Autres noms	Récepteurs ciblés	Cibles cellulaires chez l'humain	Cibles cellulaires chez le lapin	Cibles cellulaires chez la souris	Infos supplémentaires
Hla	α -toxine, α -hémolysine	ADAM10	Cellules épithéliales /kératinocytes, cellules endothéliales, monocytes, neutrophiles, lymphocytes T, plaquettes.	Érythrocytes	Cellules épithéliales /kératinocytes, cellules endothéliales, monocytes, neutrophiles, érythrocytes, plaquettes.	Monomérique
LPV	PVL, LukSF	C5aR1, C5aR2	Monocytes, macrophages, neutrophiles, neurones ganglionnaires	Monocytes, macrophages, neutrophiles, neurones ganglionnaires	Non, le récepteur murin mC5aR1 ne permet pas la liaison avec la LPV.	Bicomposée
HlgAB	γ -hémolysine, γ -toxine	CXCR1/2, CXCR4 (peu), CCR2, DARC	Monocytes, macrophages, neutrophiles, neurones ganglionnaires, érythrocytes.	Neutrophiles, neurones ganglionnaires	Monocytes, érythrocytes, neutrophils (peu) Le récepteur murin mCXCR2 ne permet pas la liaison avec la HlgAB, à la différence du mCXCR1.	Bicomposée
HlgCB	Leucocidine CB, γ -hémolysine, γ -toxine	C5aR1, C5aR2, C3R (peu)	Monocytes, macrophages, neutrophiles, neurones ganglionnaires, érythrocytes.	Neutrophiles, neurones ganglionnaires	Non, le récepteur murin mC5aR1 ne permet pas la liaison avec HlgCB.	Bicomposée
LukED	/	CCR5, CXCR1, CXCR2, DARC	Lymphocytes T, Neutrophiles, monocytes, cellules dendritiques, érythrocytes.	Neutrophiles	Lymphocytes T, Neutrophiles, monocytes, cellules dendritiques, érythrocytes.	Bicomposée
LukAB	LukGH	CD11b	Monocytes, neutrophiles.	Neutrophiles (rCD11b low affinity)	No (mCD11b doesn't bind)	Bicomposée, sécrétée comme hétérodimères
LukM'F	/	CCR1	Monocytes	/	Lymphocytes T, Neutrophiles, monocytes	Bicomposée, Exprimée seulement chez les souches de <i>S. aureus</i> des ruminants, Récepteurs bovin ciblés : CCR1, CCR2, CCR5, Cellules cibles du bovin : monocytes, neutrophiles.

LukPQ	/	CXCRA et CXCR2 des neutrophiles des équidés et, à un moindre niveau, des bovins. À plus forte concentration, également le récepteur CCR5 équin.	/	/	/	Bicomposée, La sous-unité F détermine le tropisme cellulaire.
-------	---	---	---	---	---	---

Figure 10- Les différentes leucotoxines produites par *S. aureus* et leurs caractéristiques.

Tableau adapté de (Seilie and Bubeck Wardenburg 2017)

Le prototype de toxine formant des pores à la membrane plasmique des cellules cibles est l’ α -Toxine, également appelée **l’ α -hémolysine** ou HlgA. Il s’agit d’une toxine formée par un seul composé hydrosoluble qui oligomérise pour former un tonneau beta à la membrane des cellules eucaryotes, et qui assume une conformation en « champignon » (Figure 11). Son *locus* se trouve en une seule copie dans le chromosome bactérien, près de l’opéron biotine, de la quasi-totalité des souches de *S. aureus* et sa localisation dans le chromosome ne varie pratiquement pas d’une souche à l’autre (Grumann et al. 2014; Monecke et al. 2014). Les cibles cellulaires de la toxine sont les plaquettes, les lymphocytes, les cellules endothéliales, partiellement les érythrocytes humains, et les cellules épithéliales. De plus, elle provoque la mort de cellules telles que certains leucocytes, dont les monocytes et les macrophages, alors qu’aucune cytotoxicité n’est provoquée chez les neutrophiles humains (Grumann et al. 2014).

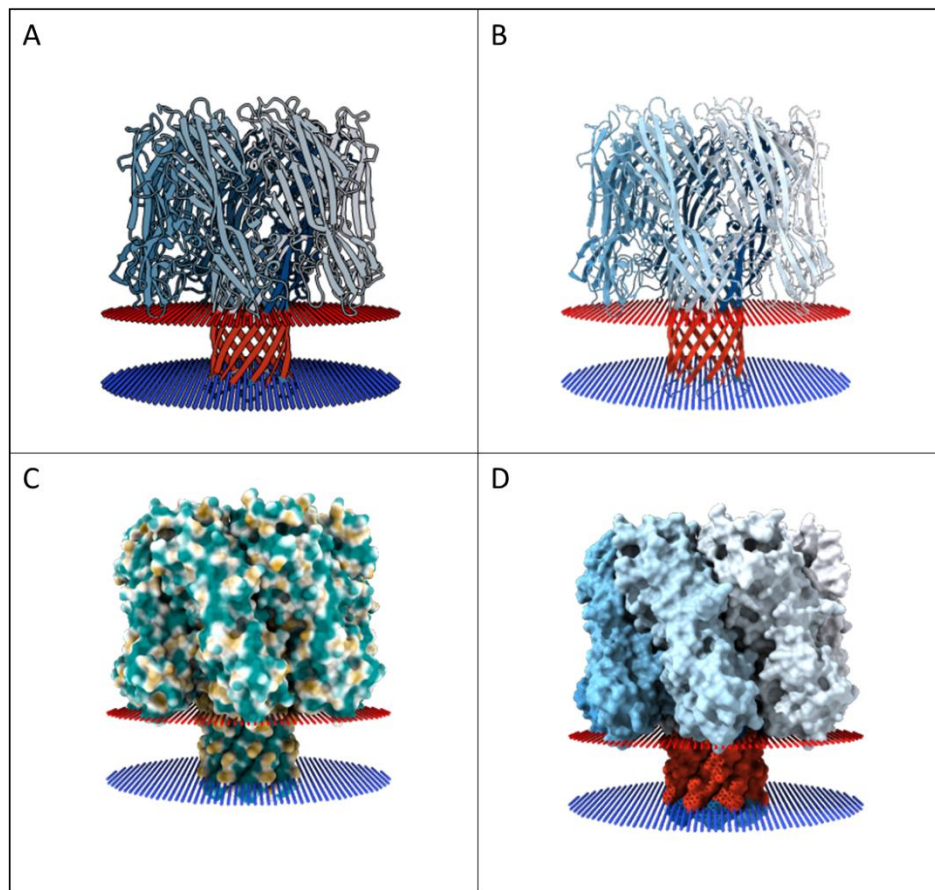


Figure 11- L'α-hémolysine de *S. aureus*.

(A) Affichage transmembranaire « planaire ». (B) Visualisation des régions transmembranaires. (C) Surface transmembranaire qui montre son caractère lipophile. (D) Affichage de la surface transmembranaire. Depuis le site internet : <https://www.rcsb.org/structure/7ahl>.

Cette toxine a été longuement étudiée et son mode d'action a été décrit comme il suit : son organisation en monomère hydrosoluble change en contact avec la membrane pour former le pore en tonneau beta heptamérique susmentionné. L'α-hémolysine se lie de manière spécifique à la désintégrine (contortrostatine) et à la métalloprotéase 10 appelée ADAM 10, un récepteur à la membrane des cellules cibles (Wilke and Wardenburg 2010). Plus récemment, un autre facteur cellulaire a été décrit comme impliqué dans la cytotoxicité de l'α-hémolysine : la protéine des jonctions adhérentes chez les mammifères « plekstrin-homology domain-containing A7 » ou PLEKHA7 (Popov et al. 2015). La formation de pores entraîne le passage de Cl^- (Comai et al. 2002), Ca^{2+} , K^+ , ATP et de molécules de taille réduite entre 1 et 4 kDa (Bhakdi and Tranum-Jensen 1991) (Figure 12).

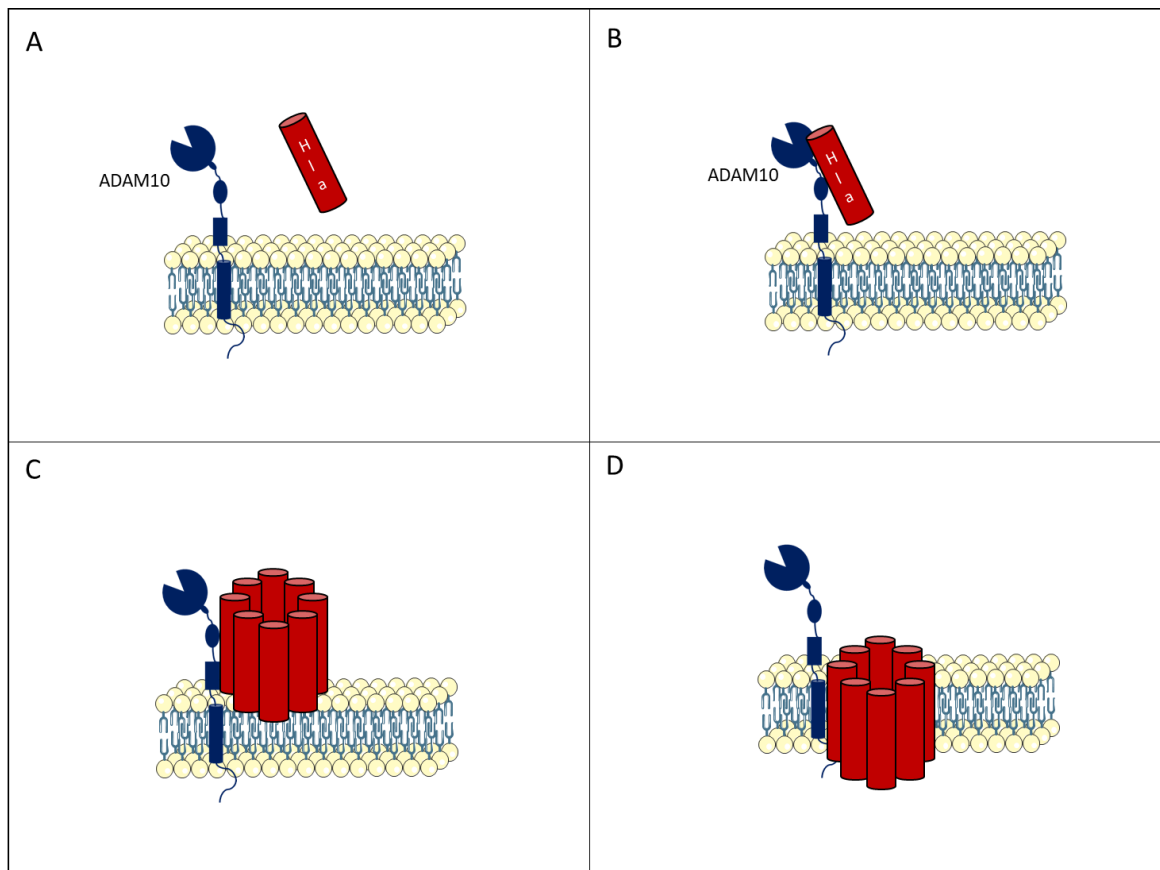


Figure 12- Mécanisme d'action de l' α -hémolysine (Hla).

L'Hla est sécrétée comme monomère hydrosoluble (A). Ensuite, elle se lie à la protéine transmembranaire ADAM10, le récepteur spécifique de Hla (B). La toxine oligomérisse en heptamère à la membrane plasmique et un pré-pore est formé (C). Dans l'étape finale un canal transmembranaire est formé et les ions passent, entraînant la mort cellulaire (D). Adapté de (Oliveira et al. 2018).

La conséquence d'une dose létale de la toxine est la mort cellulaire par lyse osmotique, alors qu'une dose sub-lytique peut moduler les réponses cellulaires, comme la production d'oxyde nitrique à partir des cellules endothéliales et épithéliales, l'entrée de Ca^{2+} dans les cellules, la production de cytokines inflammatoires comme l'IL-10 et la pyroptose des monocytes, entre autres (Suttorp et al. 1985; Grimminger et al. 1997; Rose et al. 2002; Berube and Wardenburg 2013). L'action de cette toxine sur les E-cadhérines des jonctions adhérentes épithéliales permet à la bactérie qui l'a produite de se disséminer plus facilement à l'intérieur de l'organisme, en ayant créé des brèches dans l'épithélium (Inoshima et al. 2011).

À côté de cette PFT monocomposée, nous citons également la **δ -hémolysine**, une toxine de 26 acides aminés faisant partie depuis 2007 d'une famille de cytotoxines appelée **Phenol soluble modulins** ou **PSM** (Cheung et al. 2015). Il s'agit de peptides trouvés uniquement chez *S. aureus* ayant une nature amphipatique, c'est-à-dire possédant à la fois un groupe hydrophile et un groupe hydrophobe. Ils sont classés sur la base du nombre d'acides aminés en type α ou type β (Peschel

and Otto 2013). Les PSM de type α , dont fait partie la δ -toxine, font normalement entre 20 et 25 acides aminés et ils possèdent une charge nette positive, alors que les PSMs de type β sont plus longs, entre 43 et 45 acides aminés, et présentent une charge nette négative (Tappin et al. 1988; Towle et al. 2016). Les *loci* de cette famille de toxines sont normalement présents au chromosome bactérien et le locus *hld* code la δ -hémolysine (Wang et al. 2007). Les PSM contribuent à la pathogénèse de *S. aureus* en provoquant la lyse des cellules cibles, participant à la formation du biofilm, et en contrôlant l'immunité de l'hôte sans pourtant avoir un récepteur cible à la membrane (Cheung et al. 2012). Les PSMs contribuent en particulier à la lyse des neutrophiles ou des ostéoblastes, suite à la phagocytose de la bactérie, alors que leur rôle est moins clair *in vivo*, une fois produites dans le torrent sanguin (Rasigade et al. 2013; Surewaard et al. 2013).

Concernant les PFT **bicomposées**, nous allons rapidement les décrire dans le prochain chapitre, en nous focalisant par la suite sur deux membres de cette famille : la Leucocidine de Panton et Valentine et la γ -Hémolysine CB.

1.1.5 Les leucotoxines bicomposées et les pathologies associées

Les PFT à deux composés sont la véritable « arme secrète » (*ou même, arme sécrétée*) de *S. aureus*. Elles constituent la réserve de cette « armée protéique » qui fait de la bactérie un pathogène extrêmement agressif.

De manière générale, cette famille regroupe des toxines avec une forte homologie génétique et structurelle avec l' α -hémolysine et ayant comme cibles cellulaires de prédilection les leucocytes, d'où leur nom « leucotoxines ». Il s'agit de toxines bipartites, c'est-à-dire que *S. aureus* produit deux composés séparés constituant une toxine, qui vont ensuite interagir l'un avec l'autre au niveau des cellules cibles, plus précisément à la membrane. Ainsi, les chercheurs ont nommé « sous-unité S », ou « slow-eluted », le composé élué plus lentement en chromatographie liquide pendant la purification, et « sous unité F », ou « fast-eluted », le composé élué plus rapidement (Woodin 1959, 1960). Les deux sous-unités sont co-transcrites et codées par des gènes en tandem, organisés en opérons, avec le gène codant la sous-unité S (environ 1kb) en amont par rapport à celui codant la sous-unité F (environ 1kb) (Figure 13). Généralement, le gène codant la sous-unité S est séparé par une seule base du gène de la sous-unité F, exception faite pour LukAB, dont les deux gènes sont espacés de 21 bases l'un de l'autre. Une autre particularité est

représentée par les γ -hémolysines, possédant deux sous-unités S, HlgA et HlgC, dont les gènes respectifs sont séparés par environ 400 pb. La sous-unité F commune, HlgB, se trouve immédiatement en aval de HlgC, et distante de HlgA, qui se trouve en amont de la construction génétique (Figure 13).

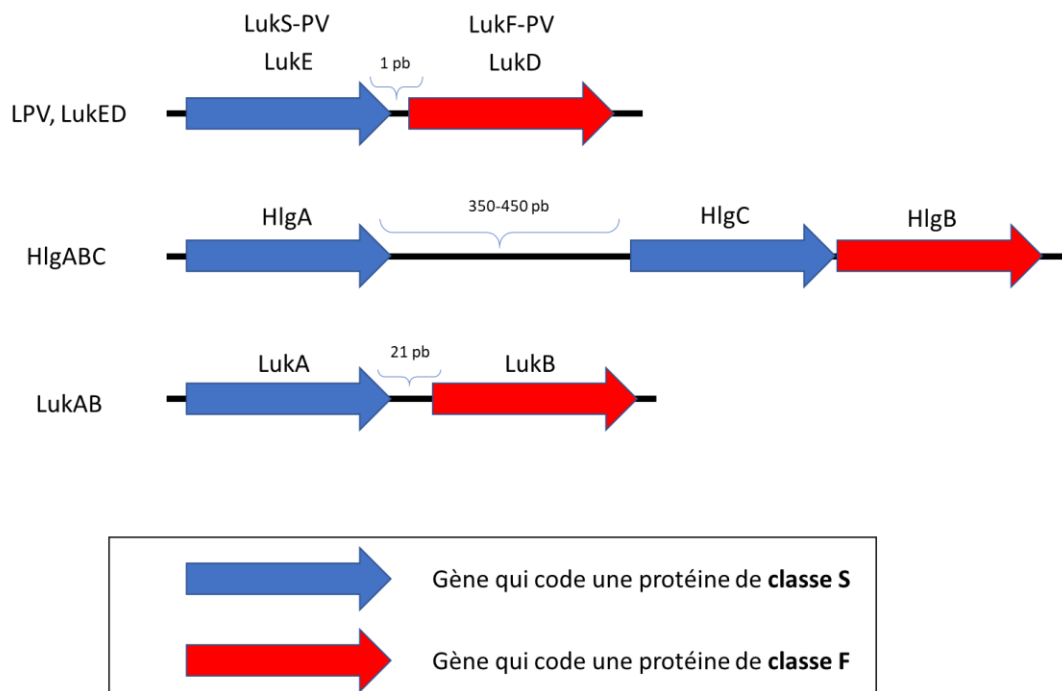


Figure 13- Organisation génétique de la LPV (et de LukED), de la γ -hémolysine (HlgABC) et de LukAB.

LukS et LukF sont séparés uniquement par une thymine, ainsi que LukED. Différemment, concernant la γ -hémolysine, HlgA se trouve à environ 500 bases de la construction génétique de HlgCB. LukA est séparé de LukB par 21 paires de bases. (Prévost et al., 1995)

Concernant la structure primaire, il s'agit généralement, pour leur forme sécrétée, de protéines d'environ 300 acides aminés, qui sont composées par environ 300 à 350 acides aminés quand elles présentent encore le peptide signal N-terminal. Ce dernier est ensuite clivé pour obtenir la forme active des toxines (Finck-Barbançon et al. 1991). Concernant l'identité de séquence entre le groupe des différentes sous-unités S, ou entre les différentes sous-unités F, chaque composé de la même classe partage environ entre 60 et 80% d'homologie, mais cela n'est pas valable pour LukAB, qui partage à peine 30 à 40 % d'identité de séquence avec les autres leucotoxines de *S. aureus*. D'ailleurs, *Staphylococcus intermedius*, une bactérie différente et appartenant à une autre espèce de staphylocoques, peut également produire des leucotoxines bicomposées. Ses leucotoxines, LukS-I et LukF-I, partagent une forte identité de séquence avec les leucotoxines de

S. aureus, allant d'environ 60 à 80% d'homologie (Prévost et al. 1995a). En revanche, entre la classe S et la classe F l'homologie de séquence est à peine 20 à 30%.

La sous-unité S présente une masse moléculaire d'environ 31 kDa, alors que la sous-unité F fait autour de 34-35 kDa (Woodin 1960). Une structure secondaire commune des leucotoxines bicomposées a pu être proposée grâce à la cristallographie à rayons x. Il y a un domaine central nommé « cap », structuré en sandwich β et formé par des brins antiparallèles, un domaine « rim », toujours constitué par des brins β antiparallèles, qui ont la fonction d'entrer en contact avec la cellule cible, et un domaine « stem », hydrophobique et initialement « caché » à l'intérieur du domaine cap, qui est ensuite déployé pour la formation du pore à la membrane (Figure 14).

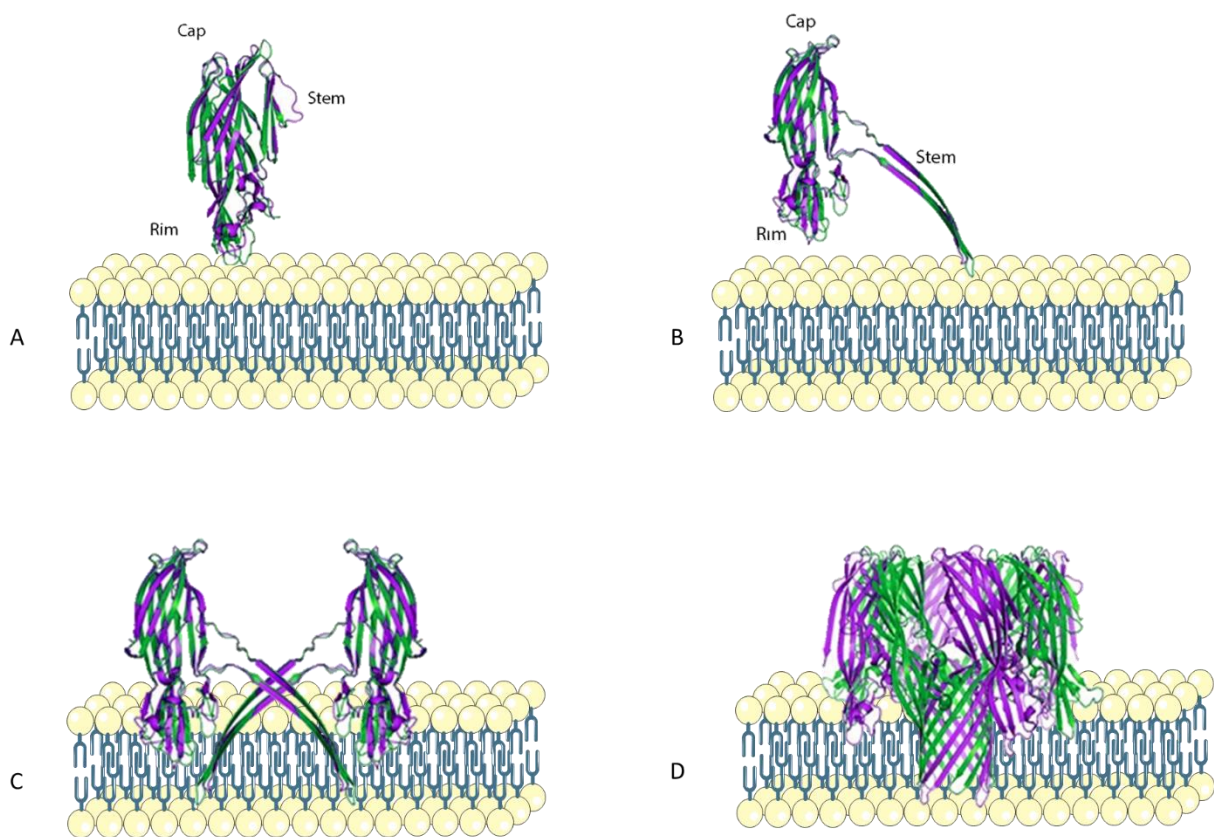


Figure 14- Les leucotoxines à deux composés sont produites sous forme de monomères hydrosolubles qui vont interagir en s'oligomérisant aux cellules cibles. Chaque sous-unité comporte 3 domaines : le domaine "core" ou « cap », le domaine d'ancrage, ou « rim » et le domaine « stem » qui se déploie pour former un pore à la membrane. (Spaan et al. 2017)

Le mode d'action est généralement décrit se débutant par la liaison du composé S à un récepteur de la surface cellulaire, qui en définit donc la spécificité. Suite à cette première liaison, le composé F est à son tour recruté à la membrane pour former un oligomère composé par l'alternance des sous-unités S et F : le pore est donc formé (Figure 15).

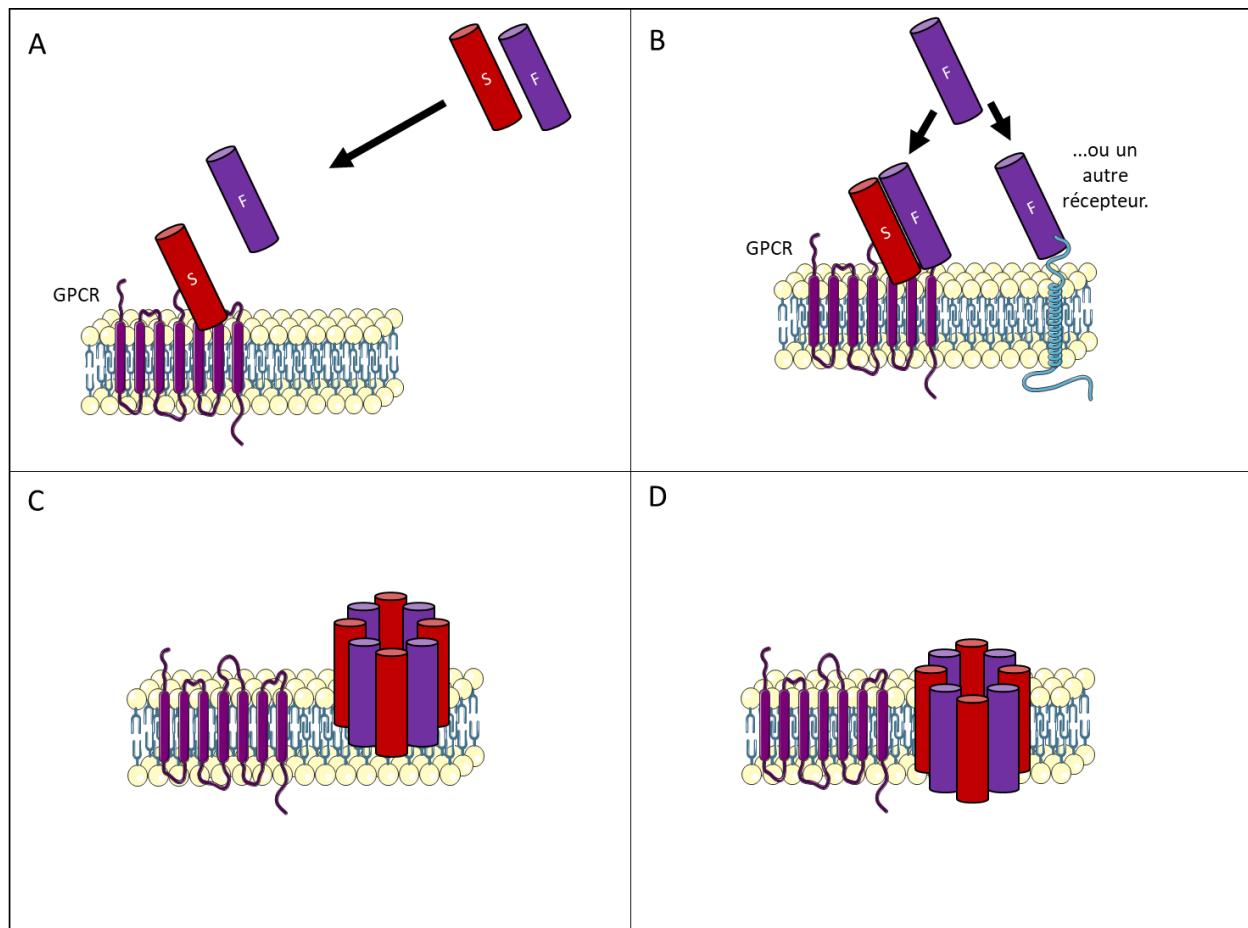


Figure 15- Mode d'action des leucotoxines bicomposée.

S. aureus sécrète les leucotoxines bipartites comme deux monomères hydrosoluble séparés : une sous-unité S et une sous-unité F. La sous-unité S prend contact en premier avec la membrane des cellules cibles, souvent par une liaison spécifique avec un récepteur membranaire du type GPCR (A). Cela entraîne le recrutement de la sous-unité F à la membrane plasmique (B). L'alternance de plusieurs sous-unités S et F va créer un oligomère (souvent un octamère) qui représente le pré-pore (C). En dernier, un pore s'ouvre à la membrane plasmique des cellules cibles en entraînant la mort cellulaire par lyse osmotique (D). Adapté de (Oliveira et al. 2018).

Tous les membres de cette famille de toxines montrent une activité toxique sur des leucocytes, mais seulement certains d'entre eux ont également une fonction hémolytique.

En outre, la structure des PFT à deux composés organisés en octamères ressemble à celle de l' α -hémolysine, montrant donc une conformation en champignon.

Mais, quel est l'avantage obtenu par la bactérie dans la production de deux éléments séparés pour provoquer une lyse des membranes plasmiques des leucocytes ? Pour répondre à cette question il faut introduire encore deux aspects concernant cette classe de toxines. En premier lieu, entre les sous-unités S de chaque toxine il y a une homologie très élevée, s'élevant à 80% d'identité de séquence. Le même est valable pour les sous-unités F des différentes PFT bicomposées. Cela est un point commun à tous les membres de cette famille de leucotoxines, sauf LukAB qui présente seulement 30% d'identité avec ses « consœurs » (DuMont et al. 2013a) (Figure 16).

Cela nous mène au deuxième aspect caractérisant ces leucotoxines : chaque sous-unité S peut virtuellement s'associer avec n'importe quelle autre sous-unité F. Cette caractéristique maximise l'effet cytotoxique induit par les leucotoxines de *S. aureus*, lequel dispose ainsi de plusieurs combinaisons de sous-unités capables de cibler et éliminer efficacement la lignée myéloïde de cellules de l'hôte, à savoir ses monocytes, ses macrophages et, surtout, ses neutrophiles.

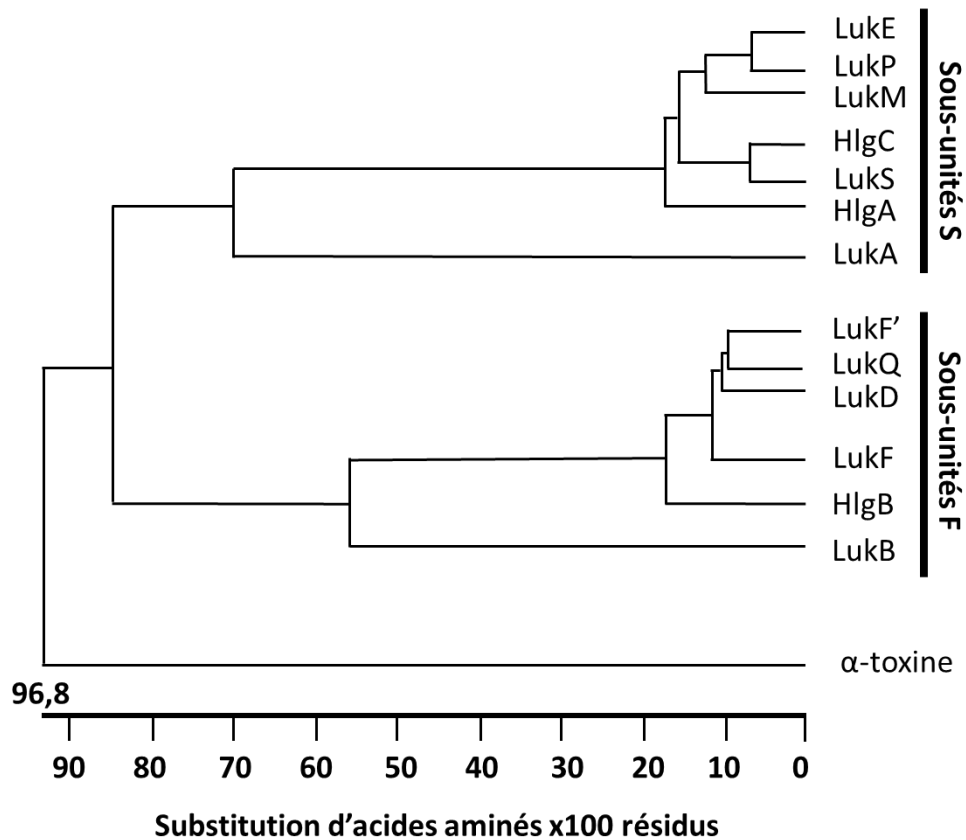


Figure 16- Arbre phylogénétique des PFT de *S. aureus*.

Adapté de (Tam and Torres 2019)

Le revers de la médaille est qu'un composé S ou F isolé n'a pas d'effet cytotoxique *per se*. En effet, les deux types de sous-unité sont nécessaires afin d'obtenir un effet toxique (Grumann et al. 2014).

Le nombre des membres de cette famille de leucotoxines semble être en train d'augmenter, compte tenu que l'identification de la Leucocidine de Panton et Valentine a eu lieu en 1936 par les bactériologistes anglais **Sir Philip Noel Panton** et **Francis Valentine** (Wright J. 1936) et la dernière leucocidine, la LukPQ, a été décrite seulement en 2017 (Koop et al. 2017).

A l'heure actuelle nous disposons d'informations relatives à six leucotoxines bicomposées produites par *S. aureus* : la **Leucotoxine ED**, la **Leucotoxine AB** (également nommée GH), les plus récemment décrites **Leucotoxine MF'** et **Leucotoxine PQ**, les **γ-Hémolysines** (dans la

combinaison AB ou CB) et la **Leucocidine de Panton et Valentine**, dont les deux dernières feront l'objet du chapitre suivant. À l'exclusion de la Leucotoxine MF' et de la Leucotoxine PQ, les quatre autres PFT à deux composés ont été décrites comme impliquées dans des pathologies humaines. Nous avons donc affaire aux « Quatre Cavaliers de l'Apocalypse » ayant aussi bien des missions spécifiques qu'une mission commune : empêcher l'efficacité de l'immunité innée humaine.

1.1.5.1 LukED : le « chevalier blanc » - la conquête

Les gènes de cette leucotoxine sont présents chez 70 à 80% des souches, mais ils sont exprimés seulement par environ 35% des souches de *S. aureus*. Les gènes *lukE* et *lukD* sont organisés en tandem et co-transcrits à la fin de la phase exponentielle de croissance. Le locus se trouve sur un îlot de pathogénicité du chromosome bactérien (Grumann et al. 2014). Cette toxine a été initialement décrite provoquant une dermonécrose chez le lapin (Gravet et al. 1998). Les premières études sur cette leucotoxine ont d'abord montré son activité lytique sur les érythrocytes humains et de lapin et sur les neutrophiles (Morinaga et al. 2003). Ensuite, le nombre de cibles cellulaires décrites pour LukED a augmenté, puisque la toxine peut en effet lyser plusieurs cellules dérivées de la moelle osseuse, aussi bien humaines que de souris : c'est la seule toxine de *S. aureus* capable de tuer des phagocytes murins (Alonzo et al. 2012, 2013). En effet, son mode d'action prévoit la liaison à un récepteur à sept domaines transmembranaires de la famille des GPCRs ou « G-protein-coupled receptors », le CCR5 présent à la membrane des neutrophiles, des monocytes, des macrophages, des cellules dendritiques, des cellules Natural Killer, des cellules T et des globules rouges (Alonzo et al. 2013; Reyes-Robles et al. 2013; Spaan et al. 2015a).

D'un point de vue pathologique, LukED est produit pour faciliter la réplication et la dissémination bactériennes, par son action leucotoxique, agissant à la membrane des cellules (Alonzo et al. 2012; Vandenesch et al. 2012) et soutenant ainsi la « conquête » opérée par la bactérie. En outre, cette toxine est également capable d'interférer avec l'immunité adaptative de son hôte (Reyes-Robles et al. 2013). Les pathologies associées à la présence de LukED sont la bactériémie (Alonzo et al. 2012; Vandenesch et al. 2012; Reyes-Robles et al. 2013), la mastite bovine (Fueyo et al. 2005; Haveri et al. 2007, 2008; Chu et al. 2013), l'intoxication alimentaire (Argudín et al. 2012; Li et al. 2015), l'impétigo, où on retrouve LukED associée à des épidermolysines ou exfoliatines, et la diarrhée post-antibiothérapie, souvent due à l'expression de LukED et d'entérotoxine(s) (Gravet et al. 1999, 2001).

1.1.5.2 LukAB ou GH : le « chevalier rouge » - la guerre

La leucotoxine LukAB, également connue sous le nom de LukGH, a été identifiée en 2011 par Dumont et collaborateurs et présente une puissante action toxique sur les neutrophiles humains, les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques, alors qu'aucune activité hémolytique n'a été signalée (DuMont et al. 2011). Les gènes *luka* et *lukb* se trouvent au niveau du chromosome bactérien et ils sont présents chez 99% des souches de *S. aureus* (Badarau et al. 2015). LukAB est retrouvée en abondance dans le protéome sécrété de *S. aureus*, ce qui en a permis l'identification (Ventura et al. 2010; DuMont et al. 2011). Son action particulière a un rôle « extracellulaire » et un rôle « intracellulaire ». En effet, si *S. aureus* produit LukAB dans le milieu extracellulaire, cette toxine forme des pores à la membrane plasmique des phagocytes, permettant, ainsi à la bactérie d'éviter la phagocytose. De la même manière, si *S. aureus* a été phagocyté, il peut produire LukAB, afin de s'échapper du processus de phagocytose, bénéficiant de l'action lytique de la toxine, qui lui assure l'affranchissement du phagosome des cellules immunitaires (DuMont et al. 2013a, 2013b). Il s'agirait de la seule toxine qui assure à la bactérie la survie une fois phagocytée : une véritable « arme de guerre » dans l'arsenal de *S. aureus* (DuMont et al. 2011, 2013b).

La double fonction de LukAB s'exprime également vis-à-vis des monocytes. En effet, ce type de cellule est largement ciblée par LukAB, qui en active la voie de l'inflammation liée à NLRP3 et ASC, uniquement si elle est produite dans le milieu extracellulaire. En effet, la mort cellulaire provoquée par LukAB ne passe pas par la voie de l'inflammasome si la toxine est produite par la bactérie phagocytée (Melehani et al. 2015).

D'autre part, étant donné que la LukAB et la LPV ciblent principalement le même type de cellule, les neutrophiles (hPMNs), elles peuvent coopérer si produites simultanément (Shukla et al. 2010; DuMont et al. 2011; Melehani et al. 2015). En outre, LukAB est aussi puissant que la LPV *in vitro* en termes d'inflammation, de production d'IL-8 par les hPMNs et de cytotoxicité. En plus, LukAB présente une forte spécificité d'espèce, ciblant en particulier le domaine I du récepteur CD11b présent sur les leucocytes humains ou des primates, et en ayant une faible activité sur les leucocytes murins (environ 1000 fois moins active chez la souris) (DuMont et al. 2013a, 2014).

Néanmoins, certaines différences ont été remarquées concernant cette leucotoxine. Tout d'abord au niveau de la séquence, dont l'homologie entre le composé LukA et les autres composés S des leucotoxines staphylococciques ne dépasse pas 30%, alors que l'homologie entre LukB et les autres composés F produites par *S. aureus* touchent au maximum 40% (DuMont et al. 2011;

Badarau et al. 2015). Cette différence se traduit également par une structure légèrement différente, notamment concernant le domaine « rim » de LukAB, avec une orientation de la boucle différente des autres PFT de *S. aureus* (Badarau et al. 2015). En plus, la réponse pro-inflammatoire, comme la transcription et la libération d'IL-8 dépendante du NF- κ B, est induite chez les cellules cibles même en présence d'une seule des deux sous-unités, LukA ou LukB, contrairement à la LPV, qui nécessite la présence des deux sous-unités S et F pour provoquer une réponse cellulaire. D'ailleurs, LukAB induit une augmentation en calcium intracellulaire dont la cinétique est plus lente et plus faible par rapport à celle liée à la LPV, et, contrairement aux autres leucotoxines bicomposées, toute autre combinaison entre les différentes sous-unités S et F des PFT de *S. aureus* et les composés LukA et LukB ne parviennent pas à induire une augmentation intracellulaire en calcium, ni une lyse des hPMNs humains (Yanai et al. 2014). En dernier, différemment des autres leucotoxines bicomposées de *S. aureus*, produites sous forme de monomères qui ensuite oligomérisent à la membrane des cellules cibles, LukAB est retrouvée sous forme d'hétérodimère avant la prise de contact avec la membrane des cellules de l'hôte. Cela suggère que les deux sous-unités de LukAB dimérisent même en amont de leur sécrétion, du fait que la cytotoxicité des deux composés séparés est inférieure à celle de la combinaison LukA/LukB (DuMont et al. 2014; Badarau et al. 2015).

In vitro, l'activité de cette leucotoxine particulière s'est avérée accrue par la coprésence de stimuli inflammatoires tels que l'IL-8, ou la contribution du surnageant de culture de *S. aureus*, qui augmente la sensibilité des hPMNs à LukAB, reflétant une situation plus physiologique (Janesch et al. 2017). Concernant les conséquences pathologiques, LukAB provoque des abcès chez la souris et des infections rénales (DuMont et al. 2011). En outre, cette leucotoxine est impliquée dans l'infection pulmonaire chez des patients atteints de mucoviscidose, car des anticorps anti-LukAB ont été trouvés dans le sérum des patients, démontrant que la toxine peut également cibler la réponse immunitaire adaptative (Chadha et al. 2016). De plus, l' α -hémolysine et LukAB produites par *S. aureus* quand la bactérie est organisée en biofilm, ont un rôle combiné concernant l'inhibition de la phagocytose opérée par les macrophages, et leur cytotoxicité (Scherr et al. 2015).

1.1.5.3 LukMF'

Bien que *S. aureus* ait été d'intérêt scientifique à cause de sa pathogénicité envers l'hôte humain, cette bactérie est également responsable d'infections retrouvées chez les animaux. En effet, la

particularité de la toxine staphylococcique LukMF' est sa spécificité d'espèce, puisqu'elle n'a jamais été isolée dans des infections humaines, mais seulement chez les ruminants et d'autres mammifères non humains, comme la souris et la chèvre (Rainard et al. 2003). L'identification des récepteurs des chémokines CCR1, CCR2 et CCR5 comme cibles de la LukMF' explique la spécificité d'espèce de cette toxine, puisque CCR1 est absent chez les neutrophiles humains et abondant chez les bovins (Vrieling et al. 2015).

Cette leucotoxine, dont le *locus* dérive du bactériophage tempéré ΦSa1 (Yamada et al. 2005), est retrouvée dans 27% à 86% des cas d'infections bovines et impliquée dans le développement d'infections de la mamelle des bovins laitiers, dite mastite (Yamada et al. 2005; Barrio et al. 2006; Haveri et al. 2007; Vrieling et al. 2015, 2016).

Formée par la combinaison entre une variante de la sous-unité F de la LPV, nommée LukF', et d'une sous-unité appelée LukM, elle montre une activité cytotoxique importante chez les neutrophiles bovins, en déclenchant une lyse cellulaire et une libération de Ca^{2+} supérieure à celle liée aux hémolysines de *S. aureus* (Barrio et al. 2006; Vrieling et al. 2015, 2016). Cependant, contrairement aux autres leucotoxines, la forme purifiée de LukMF' n'induit pas une forte réponse inflammatoire, une fois incubée avec les macrophages bovins (Fromageau et al. 2011).

1.1.5.4 LukPQ

La dernière leucotoxine de *S. aureus* décrite jusqu'à aujourd'hui est la Leucotoxine PQ. En effet, Koop et collaborateurs ont été les premiers à isoler la toxine seulement en 2017.

LukPQ est codé sur un prophage de 45 kpb (ΦSaeq1) retrouvé dans six lignages clonaux différents, presque uniquement chez des souches issues des équidés (Koop et al. 2017).

Cette toxine, tout comme LukMF', présente une spécificité d'espèce due à son récepteur cible, le CXCR4 et le CXCR2 présent uniquement chez les neutrophiles des équidés et, à un moindre niveau, des bovins. À plus forte concentration, la toxine peut cibler également le récepteur CCR5 équin. Cependant, c'est la sous-unité F, LukQ, qui en donne la spécificité cellulaire. Ceci représente une anomalie par rapport aux autres membres de la famille des PFT bicomposées, dont la spécificité est réglée par le composé S (Koop et al. 2017). En effet, le composé S de la toxine, LukP, est très proche du composé S de la LukED et en général LukPQ présente 91% et 80% d'identité de séquence d'acides aminés respectivement avec LukE et LukD. Néanmoins, la spécificité d'espèce de ces deux toxines est différente, ce qui souligne l'importance du composé

F dans le tropisme de LukPQ. De plus, les combinaisons non canoniques entre les composés des PFT de *S. aureus* montrent encore une fois que LukQ contribue au tropisme observé pour LukPQ (Koop et al. 2017).

1.1.6 Les γ -hémolysines AB et CB (HlgAB et HlgCB) et la Leucocidine de Panton et Valentine (LPV) : les « chevaliers noirs » - la famine- et le « chevalier pâle » - la mort-

Les deux dernières leucotoxines que nous décrivons dans ce chapitre ont été étudiées plus dans les détails au cours de ce travail de thèse. Notamment, la γ -hémolysine CB (HlgCB) a été initialement comparée à la toxine centrale de notre travail, la Leucocidine de Panton et Valentine, dont on parlera par la suite. En effet, HlgCB et la LPV ont été historiquement associées l'une à l'autre pour plusieurs raisons. Premièrement, elles ont un récepteur commun, le récepteur de la cascade du complément C5aR présent à la membrane des leucocytes humains, dont les neutrophiles, ce qui en explique la spécificité d'espèce (Spaan et al. 2013, 2014). Deuxièmement, les composants protéiques des deux leucotoxines sont étroitement apparentés et la séquence d'acides aminés de la sous-unité S de la LPV et de HlgCB, respectivement LukS-PV et HlgC, montre une homologie de 81% (Yoong and Torres 2013). Étant ce récepteur « partagé » par ces leucotoxines, cela suggère une « redondance » de l'activité de ces deux facteurs de virulence de *S. aureus*. Finalement, les deux leucotoxines ont été trouvées proches en termes de réponse cellulaire induite, notamment concernant la libération d'ions calcium Ca^{2+} , qui résulte importante et très rapide, et certaines cibles cellulaires communes, dont un type de cellule non leucocytaire, les neurones ganglionnaires (Jover et al. 2013). Néanmoins, plus récemment, Zimmermann-Meisse et collaborateurs ont étudié l'acheminement intracellulaire de ces deux toxines à l'intérieur des neutrophiles humains, démontrant que, bien que HlgCB et LPV soient internalisées avec un transport rétrograde similaire, elles suivent des cinétiques différentes suite à la liaison avec le C5aR. En effet, les deux toxines sont retrouvées à l'appareil de Golgi, mais HlgCB apparaît plus rapide de la LPV en termes de cinétique. En outre, la LPV serait retrouvée transitoirement au lysosome, contrairement à la HlgCB (Zimmermann-Meisse et al. 2017).

En général, les études plus récentes sur ces deux toxines longuement considérées similaires, ont permis de rédiger une longue liste de différences importantes qui les caractérisent, dont la cinétique d'internalisation n'est que l'une des toutes dernières découvertes. Ainsi, l'effet

hémolytique constaté en présence de HlgCB n'est pas décrit pour la LPV, qui d'ailleurs semble mobiliser le calcium intracellulaire des neutrophiles humains à partir du réticulum endoplasmique, à la différence de HlgCB qui produit la libération du calcium à partir plutôt des stocks acides intracellulaires. Cette différence a été justifiée par la nature différente des sous-unités F des deux leucotoxines, en identifiant donc dans ce composé l'élément qui détermine le compartiment d'origine du calcium mobilisé (Tawk et al. 2015). D'ailleurs, concernant le composé S, bien que le récepteur cible pour chacune des deux toxines soit le C5aR, HlgCB et la LPV se lient à deux domaines différents du C5aR pour initier la réponse cellulaire (Spaan et al. 2015b). En plus, les gènes des deux toxines sont présents en un pourcentage très différent des souches de *S. aureus*, puisque la HlgCB est exprimée par la quasi-totalité des souches, alors que la LPV n'est sécrétée que par un nombre limité de *S. aureus*, d'environ 5 à 10%. *In fine*, nous rappelons également les différentes morts cellulaires entraînées par ces deux toxines, même à faibles concentrations, dont l'apoptose a été signalée uniquement en présence de la LPV (Genestier et al. 2005) et pour un nombre assez limité de neutrophiles humains testés, suggérant un possible effet d'accélération d'un processus physiologique, plutôt qu'un véritable mode d'action toxique (Zimmermann-Meisse et al. 2017).

De nombreuses informations ont pu être collectées au long des dernières décennies, d'où la nécessité de décrire en détail et séparément ces deux toxines particulières.

1.1.6.1 Les γ -hémolysines AB et CB (HlgAB et HlgCB) : les « chevaliers noirs » - la famine

Exprimée par environ 99% des souches de *S. aureus*, les gènes de la gamme hémolysine sont organisés en tandem. Le locus présente trois gènes séparés : *hlgA*, *hlgB* et *hlgC*. En effet, deux sous-unités S, HlgA et HlgC, ont été décrites pouvant s'associer avec la sous-unité F commune, HlgB, pour constituer deux toxines différentes : HlgAB et HlgCB.

La combinaison HlgA et HlgB constitue la toxine HlgAB, qui a été mieux caractérisée. Il s'agit d'une leucotoxine décrite en 1938, dont la fonction biologique a été comprise par Guyonnet et Plommet en 1970 et par Mollby et Wadstrom en 1971 (Oliveira et al. 2018). HlgAB cible les récepteurs humains CXCR1, CXCR2, CCR2 et le récepteur DARC (« Duffy antigen receptor for chemokines »), présent sur les globules rouges. Son activité s'exprime par la lyse des érythrocytes humains, mais également des neutrophiles et des monocytes/macrophages (Spaan et al. 2014, 2015a). Chez la souris, cette leucotoxine montre une activité sur les monocytes et macrophages, mais pas sur les neutrophiles murins, qui présentent une variante du récepteur

CXCR2 (Spaan et al. 2014). HlgAB est exprimée par la quasi-totalité des souches de *S. aureus*, ce qui rend difficile de la lier à une pathologie précise (Prévost et al., 1995 a). Cette toxine est nécessaire à la survie et prolifération bactérienne, notamment elle participe au processus inflammatoire observé *in vivo* dans un modèle d'endophtalmie chez le lapin, en produisant des molécules pro-inflammatoires (Siqueira et al. 1997; Supersac et al. 1998). De plus, elle contribue partiellement à la virulence pendant le développement de l'arthrite septique et l'infection systémique chez la souris (Nilsson et al. 1999; Malachowa et al. 2011). La capacité de survivre et proliférer pendant le développement d'une bactériémie chez l'hôte semble être obtenue grâce à la capacité d'évasion vis-à-vis des macrophages, mais également à l'ion Fe^{2+} nécessaire au nutriment bactérien. Or, le Fe^{2+} n'est pas abondant à l'état libre dans le torrent circulatoire, ni suffisant pour assurer la survie de *S. aureus*. C'est donc à travers l'activité hémolytique que *S. aureus* arrive à priver son hôte de l'ion précieux et à s'échapper à la carence (ou « famine ») de cet élément (Prévost et al. 1995a; Ferreras et al. 1998). Tout comme HlgCB, elle entraîne une augmentation de calcium intracellulaire suivi par la lyse, mais moins efficace sur les neutrophiles humains, comparée à celle de LPV (Prévost et al. 1995a; Staali et al. 1998; Szmigielski et al. 1998). Au niveau des conséquences pathologiques, HlgAB induit d'ailleurs un relargage dose-dépendant de cytokines produites par les cellules épithéliales vaginales, telles que l'IL-8, l'IL-6, le TNF α et le MIP-3 α , qui sont impliquées dans la voie du facteur de croissance épidermique ou "epidermal growth factor" (EGFR) (Gillman et al. 2017).

Contrairement à HlgAB, HlgCB, l'autre combinaison de sous-unité S et F, cible le récepteur C5aR, tout comme la LPV (Spaan et al. 2014). HlgCB a été associée à une lyse partielle des érythrocytes et des lymphocytes de lapin, à une inflammation aiguë temps-dépendante et à la nécrose des tissus oculaires dans un modèle de lapin (Siqueira et al. 1997; Supersac et al. 1998; Bronner et al. 2003; Malachowa and DeLeo 2011; Perret et al. 2012). La lyse des leucocytes est produite dans le but d'échapper ou inhiber l'immunité, tandis que l'activité hémolytique permet à *S. aureus* un apport en Fe^{2+} suffisant à sa survie et dissémination (Nilsson et al. 1999; Cassat and Skaar 2012). Tout comme la LPV, HlgCB induit chez les cellules cibles un relargage d'IL-8, DRO, β -glucuronidase et histamine, mais dans une moindre mesure (König et al. 1997).

Plus récemment, cette toxine a été liée à une inflammation des cellules formant l'épithélium vaginal ou « human vaginal epithelial cells » (HVECs), induisant la génération de cytokines inflammatoires impliquées dans la voie du facteur de croissance EGFR, exactement comme HlgAB (Gillman et al. 2017). Les effets de ces deux formes de γ -hémolysine produisent un état

inflammatoire chez l'hôte et le développement de pathologies précises, tel que l'arthrite septique aiguë, notamment liée à la présence de HlgCB associée à la LPV (Shirtliff and Mader 2002).

Concernant le pore donnant le nom à cette classe de toxines, une anomalie a été remarquée dans les dernières années. En effet, l'activité de « pore-forming » de la HlgCB avait été initialement démontrée sur des membranes synthétiques et en absence d'un élément clé du processus : un niveau physiologique de calcium extracellulaire dans le milieu de culture expérimental (Ferrerias et al. 1998; Menestrina et al. 2003; Alonzo and Torres 2014). En revanche, les dernières études menées en présence d'ion Ca^{2+} en concentration physiologique montrent une tout autre conséquence cellulaire (Tawk et al. 2015). En effet, avec 1 mM de Ca^{2+} dans le milieu extracellulaire, non seulement la perméabilisation de la membrane plasmique des hPMNs testés est bien moindre, comme démontré par l'entrée du Bromure d'éthidium, mais on remarque que le calcium intracellulaire, dont la libération est stimulée très rapidement par la HlgCB, est mobilisé principalement à partir des stocks acides intracellulaires (Tawk et al. 2015). Cette caractéristique a interrogé les chercheurs, qui ont ensuite démontré qu'un autre processus est déclenché suite à l'action de HlgCB. À 1 mM Ca^{2+} , aucun pore à la membrane plasmique ne semble être spécialement induit par la toxine, qui, *a contrario*, se localise à l'intérieur des hPMNs, plus particulièrement au niveau de l'appareil de Golgi au bout d'environ 80 min après le contact avec les cellules humaines. Cette internalisation de la HlgCB suit le transport rétrograde cellulaire, sans pourtant provoquer la mort cellulaire durant au moins 6 h (Zimmermann-Meisse et al. 2017).

Puisque la totalité des souches de *S. aureus* expriment HlgCB, mais aussi de la LPV pour 5% des isolats cliniques (Couppié et al. 1994), nous avons effectué initialement un travail de comparaison entre les effets des deux toxines.

Voyons maintenant dans quels types d'infections on retrouve la LPV, le chevalier pâle qui correspond, à très juste titre, à la mort.

1.1.6.2 La Leucocidine de Panton et Valentine : le « chevalier pâle » - la mort

« The cells were rounded, the nucleus condensed, and the cytoplasm clarified, with no granules and no pseudopodes; then the cytoplasm disappeared. When the leukocytes were

examined in a Zeiss warm chamber, they were totally immobile and showed no diapedesis. They had all been shot down. »

Tiré de “A brief history of Staphylococcus aureus Panton Valentine leucocidin” (Lina et al., 2006)

Bien que la description de cette leucotoxine staphylococcique ou de son effet ait été laissée en dernier dans ce manuscrit, sa découverte remonte à l'an 1894, à peine 24 ans après les expériences de Sir Alexander Ogston et de Louis Pasteur décrivant que la bactérie *Staphylococcus aureus* était impliquée dans des infections humaines reproduites avec des modèle murins (Pasteur 1880; Ogston 1984). En effet, la LPV a été la première leucotoxine pour *S. aureus* décrite dans le détail (Woodin 1965).

Il fut en 1894 que le médecin Dr Honoré Van de Velde découvrit l'activité leucotoxique présente chez certaines souches de *S. aureus*. Cela a valu le nom « Leucocidine » à cette catégorie de toxines, qui apportaient une activité létale accrue aux bactéries. Il s'agissait bien de protéines sécrétées, comme démontré par ce même médecin, qui s'aperçut d'une cytotoxicité présente même en absence des bactéries, et uniquement due au surnageant de culture à T+48h.

C'est seulement en 1932 que Philip Panton et Francis Valentine exprimèrent l'hypothèse de l'existence d'une toxine particulière et décrivirent les surnageant de culture des souches de *S. aureus* isolées de furoncles : ils montraient l'absence d'une activité hémolytique, et une action cytotoxique et lytique uniquement vis-à-vis des leucocytes (Panton and Valentine 1932). En 1936 naquit le terme « Panton-Valentine Leukocidin » (PVL) ou Leucocidine de Panton et Valentine (LPV) en français.

Plus de 100 ans de recherches n'ont pas suffi pour mettre le mot « fin » aux découvertes scientifiques liées à cette puissante arme bactérienne.

Exactement comme pour les autres leucotoxines décrites jusqu'ici, la LPV présente deux sous-unités, S et F, dont la S est appelée LukS-PV (32 kDa), ou simplement LukS, et la F, LukF-PV ou LukF (34,5 kDa). Le locus *luk-PV* est codé dans le génome d'au moins 6 prophages différents exprimant la Sa2 intégrase (Kaneko et al. 1997, 1998; Boakes et al. 2011; McCarthy et al. 2012). Les gènes codant la LPV sont organisés en tandem et ils font partie d'un même opéron. Séparés par une seule thymine T, LukS se trouve en amont de LukF dans le locus, et elle est donc transcrite et sécrétée en premier (Figure 13) (Cooney et al., 1993; Prévost et al., 1995; Malachowa et al., 2010). La même organisation est retrouvée pour LukED et pour LukAB, dont l'intervalle

entre LukA et LukB est cependant constitué de 21 bases d'écart. D'ailleurs, en aval du gène codant les sous-unités S de chaque leucotoxine, il y a un site de fixation des ribosomes ou RBS (Ribosome Binding Site), qui faciliterait la traduction des composés de classe F.

Ce qui est distinctif concernant cette Leucocidine est sa fréquence chez les souches de *S. aureus*. En effet, d'un point de vue général, seulement environ 5 à 10% des souches de *S. aureus* codent cette toxine, mais sur l'ensemble des isolats cliniques des patients atteints de furoncles, de pneumonie nécrosante, ou d'infections communautaires sévères à *S. aureus*, les bactéries qui possèdent les gènes de la LPV représentent environ 90% (Brown et al. 2012; Tong et al. 2015).

Pour donner une idée plus concrète de ce que la LPV représente au niveau pathologique, nous allons décrire un cas clinique réel qui s'est produit à l'Hôpital de Strasbourg en 2019.

Rapport d'un cas d'infection à *S. aureus* LPV⁺

(G. Prévost, communication personnelle)

*« En Avril 2019, un adulte de 46 ans, sans antécédent médical, se présente aux urgences en se plaignant de maux abdominaux et de difficultés à respirer, la fièvre est à 39°C. Un traitement antibiotique (Céfotaxime) est prescrit et il rentre au domicile. Le lendemain, il doit être véhiculé aux urgences dans un état fébrile prononcé. L'IRM révèle de multiples foyers nécrotiques dans l'abdomen, et les différents prélèvements révéleront *S. aureus* LPV⁺ résistant aux Céfotaxime. Le patient décède 52 heures après son premier passage aux urgences ».*

L'inflammation a persisté malgré un traitement antibiotique pourtant dédié. Il est donc évident que la compréhension du mode d'action de cette leucotoxine pourrait représenter un enjeu scientifique et médical.

Plusieurs études ont été menées afin de décrire les conséquences de la LPV. En particulier, cette leucocidine présente une spécificité d'espèce due à son récepteur cible commun à la HlgCB, le C5aR. Elle a un effet cytotoxique uniquement chez les leucocytes polynucléaires, les monocytes et les macrophages humains et de lapin (Spaan et al. 2013, 2015b). Par conséquent, un modèle murin normal n'est pas approprié pour l'étude de cette toxine et des modèles de souris humanisées ont été récemment introduits (Tseng et al. 2015; Prince et al. 2017). À côté de ce modèle, les plus utilisés en recherche restent le lapin ou un modèle de neutrophiles humains *ex vivo*.

La LPV est liée à la sévérité accrue de pathologies invasives, telles que l'ostéomyélite et la pneumonie et elle peut causer des infections souvent mortelles chez l'individu sain, comme dans le cas clinique que nous avons mentionné (Lina et al. 1999; Naimi et al. 2003). L'autopsie des patients décédés par une pneumonie à *S. aureus* a montré que les poumons de ceux qui étaient colonisés par des souches sécrétant la LPV (PVL⁺) étaient ulcérés et hémorragiques, ce qui reflétait un état inflammatoire très sévère dû à la cytolysse de neutrophiles et de macrophages présents dans le tissu pulmonaire (Finck-Barbançon et al. 1993; Gillet et al. 2002). Les pathologies associées à la lyse cellulaire et à la nécrose tissulaire induites par la LPV sont les furoncles, les abcès et des infections nécrotiques sévères de la peau (Cribier et al., 1992; Couppié et al., 1994; Prévost et al., 1995 b).

Concernant le mode d'action, un certain nombre d'informations a pu être collecté au fil des années, sans portant donner une preuve définitive de la contribution de la LPV pendant une infection à *S. aureus*.

La liaison de LukS au récepteur C5aR a été démontrée être la première étape du mode d'action de la LPV. De ce fait, les cellules cibles de la LPV sont les neutrophiles humains et de lapin, chez qui l'activité est la plus documentée et la toxine résulte la plus active (Hensler et al. 1994; König et al. 1994; König et al. 1995). De la même façon la LPV cible également les monocytes et macrophages humains et de lapin (Woodin 1959; Gauduchon et al. 2001; Pichereau et al. 2012), mais également les cellules dendritiques et les neurones ganglionnaires, notamment les neurones granuleux cérébelleux et les neurones périphériques, tout comme dans le cas de HlgCB (Jover et al. 2013).

Suite à cette première étape de liaison, le composé F, ou LukF, est également recruté à la membrane plasmique, où il a été décrit récemment avoir sa cible en le récepteur CD45 (Tromp et al. 2018), à la différence de HlgCB, dont aucun récepteur du composé F n'a été identifié.

Le modèle d'action classique prévoit la formation d'un octamère constitué de l'alternance de sous-unités LukS et LukF, pour ensuite former un pore à la membrane plasmique des cellules cibles. Néanmoins, la présence d'un niveau physiologique de calcium extracellulaire a changé désormais cette représentation simpliste du mode d'action de la LPV, tout comme pour celui de HlgCB. En effet, en présence de calcium, une concentration de LPV établie sur la base de la constante de dissociation entre LukS et C5aR chez les neutrophiles humains, montre qu'aucun pore n'est formé, du moins à la membrane plasmique (Tawk et al. 2015). Les neutrophiles

humains exposés à une telle concentration de la LPV n'indiquent pas une lyse immédiate, mais plutôt l'augmentation importante et rapide en calcium intracellulaire, le relargage de DRO, d'IL-8 et d'IL-6, d'histamine et de leucotriène B4 (Hensler et al. 1994; König et al. 1994; König et al. 1995; Tawk et al. 2015). Le calcium intracellulaire est néanmoins mobilisé à partir du réticulum endoplasmique par la LPV, différemment de HlgCB, et, bien qu'une internalisation ait été mise en évidence, le transport rétrograde emprunté par la LPV montre une cinétique différente, comme annoncé dans l'introduction de ce chapitre, puisque LPV est retrouvée au lysosome durant les premières phases de l'internalisation, pour ensuite rejoindre plus tardivement l'appareil de Golgi (Tawk et al. 2015; Zimmermann-Meisse et al. 2017). Une énième différence a été constatée entre la mort cellulaire entraînée par la LPV et HlgCB : tandis que la LPV produit une accélération de l'apoptose chez les neutrophiles humains, HlgCB n'induit pas un tel processus de mort programmée (Genestier et al. 2005; Zimmermann-Meisse et al. 2017).

Toutes ces informations laissent sans réponse une question fondamentale : quel est le processus à travers lequel la LPV induit la mort cellulaire des hPMNs ?

Une seconde question qui se pose est : est-ce que la mort cellulaire principale entraînée par la LPV et HlgCB est la même, tenu compte de toutes les différences que nous venons de mentionner ?

Afin d'apporter une réponse à ces deux questions, ce travail de thèse a été destiné à l'étude d'une mort cellulaire programmée autre que l'apoptose, ce qui est cohérent avec un résultat préliminaire obtenu en 2016 par l'équipe de notre unité de recherche. En effet, la LPV à une concentration de 1 nM et inférieure, et non pas HlgCB, montre une perméabilisation membranaire touchant plus de 60% des hPMNs, mais ayant son pic à 6h d'incubation.

Un processus qui demande plusieurs heures pour provoquer la lyse cellulaire ne pouvait donc être que très sophistiqué et complexe. Ce processus que nous avons détaillé et confirmé être la mort cellulaire principale due à la LPV a un nom très évocateur : **la NETose** ou Neutrophil Extracellular Trap.

Notre « chevalier pâle », correspondant à la mort, a donc bien mérité son nom.

1.2 LA NETOSE

“PMA-treated neutrophils showed morphological changes quite different from those of typical apoptosis or necrosis.”

– Hiroshi Takei, 1996

1.2.1 Le neutrophile humain : le fantassin de notre immunité

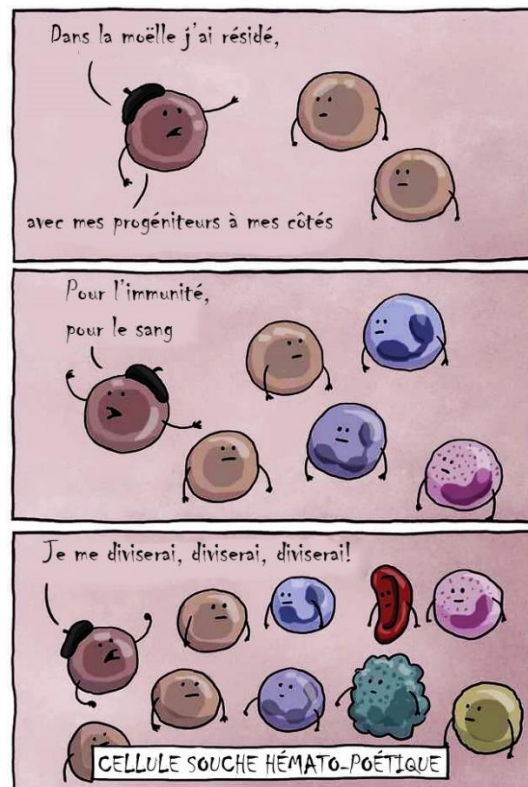


Figure 17- Le système immunitaire vu par Nik Spencer- Senior Graphic designer du journal Nature.

Adapté de : <https://twitter.com/NatureNews/status/1225434019136966657/photo/1>

Le neutrophile humain est un type de cellule faisant partie de l'immunité innée et abondamment présent dans la circulation sanguine. Ces cellules sont en fait produites à hauteur d'environ 10^{11} neutrophiles par jour (Dancey et al. 1976). Leur abondance est compensée par une durée de vie plutôt courte. En effet, dans des conditions d'homéostasie, ces cellules rentrent dans la circulation sanguine, pour migrer au niveau des tissus où elles exercent leurs fonctions. Finalement, elles sont éliminées, notamment par l'action des macrophages après environ 24 h. Malgré ce turnover rapide, le nombre de ces cellules dans la circulation sanguine reste constant, du fait d'une fine balance entre production et élimination (von Vietinghoff and Ley 2008). Leurs caractéristiques principales au niveau morphologique sont la forme typique du noyau, qui est polylobé, ayant de

trois à cinq lobes par cellule, et la présence de granules intracellulaires, des vésicules contenant une série de produits cytotoxiques. D'ailleurs, on distingue quatre groupes principaux de granules en fonction de leur contenu, les **primaires** ou azurophiles, **secondaires** ou spécifiques, **tertiaires** à gélatinases et les **vésicules de sécrétion**. De ce fait, ces cellules sont également appelées granulocytes « polymorphonuclear » (PMNs) ou polynucléaires, en français. D'origine hématopoïétique, les PMNs humains (hPMNs) quittent la moelle osseuse dans leur forme différenciée, afin de patrouiller l'organisme durant environ 24h, et réagir rapidement à des signaux d'infection ou des signaux génériquement produits en cas de perturbation de l'homéostasie (Brinkmann and Zychlinsky 2012) (Figure 18). En absence de stimulation, les neutrophiles « âgés » peuvent avoir deux destins : ils retournent à la moelle osseuse, où ils sont phagocytés par les macrophages résidents, ou bien ils meurent par un processus d'apoptose dans les tissus périphériques (Sollberger et al. 2018b).

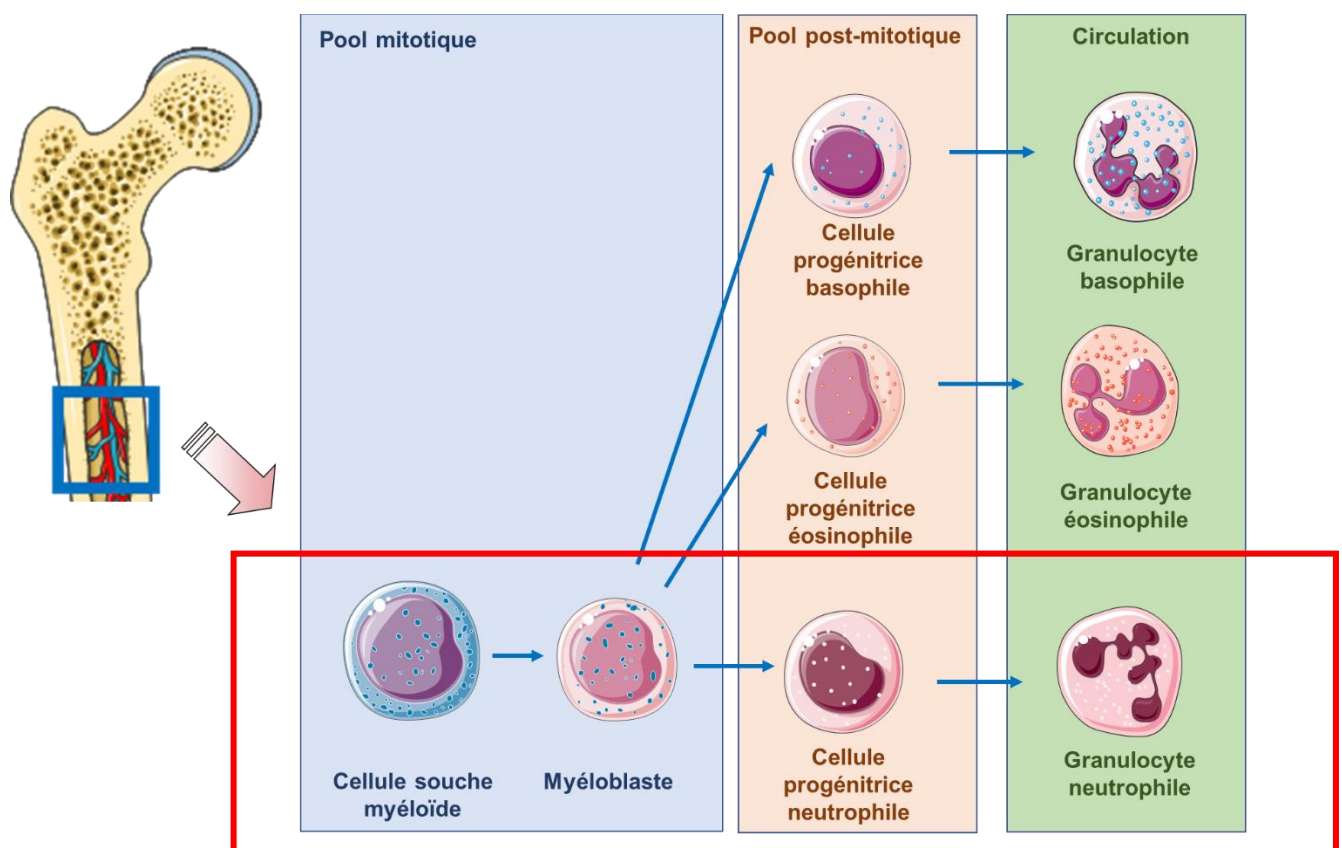


Figure 18- Production de la lignée des neutrophiles dans la moelle osseuse.

S'agissant de la « première ligne de défense », cette petite cellule immunitaire a une durée de vie allant de 5 à 135 heures après sa mise en circulation (Pillay et al. 2010; Tak et al. 2013). Sa fonction reste tout de même d'importance capitale, comme démontré par l'augmentation de

risque d'infection présent chez des patients ayant une neutropénie iatrogène ou d'origine congénital. En effet, les effets cytotoxiques des traitements chimiothérapeutiques, ainsi que des maladies monogéniques intéressant les neutrophiles, comme des défauts au niveau de la NADPH oxydase ou NOX, sont associés à des manifestations infectieuses importantes, notamment provoquées par des pathogènes opportunistes, tels que des champignons ou des bactéries (Malech et al. 2020). Il est intéressant de souligner que deux pathologies monogéniques distinctes affectant les fonctions du neutrophile, la maladie granulomateuse chronique ou CGD et la déficience d'adhésion leucocytaire ou LAD, montrent une augmentation d'infections causées par des pathogènes différents, ce qui suggère que chacune des fonctions du neutrophile humain a une spécificité d'action antimicrobienne bien déterminée. Ces différences dévoilent encore une fois que le système immunitaire a évolué, afin de contrecarrer les différents effets des pathogènes (Malech et al. 2020). En effet, le neutrophile répond à une panoplie de signaux différents, notamment par la production de nombreuses cytokines et d'autres facteurs inflammatoires, qui contrôlent et régulent l'inflammation et les fonctions des autres cellules de l'immunité (Nauseef and Borregaard 2014; Scapini and Cassatella 2014). Cette capacité semble être due à un état de transcription bien actif et très complexe, contrairement à ce que les scientifiques retenaient auparavant. Effectivement, leur versatilité de réponse se traduit en une activation transcriptomique qui se manifeste par des changements en ce qui concerne l'expression des molécules de surface et leur activité. Cependant, puisque ces modulations ont été retrouvés majoritairement chez une partie de la population des neutrophiles, cela pourrait indiquer l'existence de « *subsets* », ou sous-populations. En effet, plus récemment différents types de neutrophiles ont été décrits (Deniset and Kubes 2018). Notamment, ces cellules changent au niveau de leur phénotype du moment où elles quittent la moelle osseuse, jusqu'au moment où elles disparaissent de la circulation sanguine. Cet effet est connu sous le nom de « *aging* », puisque se déroule en un seul jour, donnant lieu à des neutrophiles présentant des propriétés différentes (Adrover et al. 2016). À côté de l'effet « d'âge », les neutrophiles peuvent présenter des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles dépendantes de leur environnement, comme dans le cas du cancer, où le nombre et la typologie de neutrophiles changent avec la progression de la tumeur (Sagiv et al. 2015). En général, différentes sous-populations de neutrophiles sont décrites aujourd'hui. Cependant, ces différents types cellulaires ne sont pas toujours considérés comme des « *subsets* » et le sujet reste controversé. Un état d'activation différent des cellules pourrait effectivement s'expliquer par une simple réponse à des facteurs locaux et transitoires, plutôt que justifier l'existence des vraies sous-population de polynucléaires.

1.2.1.1 Cycle de vie d'un neutrophile humain

Comme déjà anticipé, les polynucléaire neutrophiles sont produits au niveau de la moelle osseuse à partir des **cellules souches hématopoïétiques**. Ces cellules se différencient en **cellules multipotentes progénitrices (MPP)**, qui se transforment à leur tour en cellules **LMPP**, ou **progénitrices multipotentes biaisées lymphoïdes**. Encore une fois, ce dernier type de cellules progénitrices, résidentes dans la moelle osseuse, se différencie en **progénitrices de granulocytes-monocytes**, ou **GMP**. Les GMP, sous l'action du facteur **granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)**, deviennent **myéloblastes**, qui vont vers la maturation en neutrophile mature, passant par différents stades : **promyélocytes**, **myélocytes**, **métamyélocyte**, **polynucléaires juvéniles**, ou « *band cells* » et finalement **polynucléaire mature**. Pendant ces étapes intermédiaires, on remarque des modifications morphologiques, notamment au niveau du noyau, qui passe d'une forme ronde à une forme plus allongée en forme de « C », pour arriver à la morphologie finale, où le noyau prend la forme polylobée caractéristique des hPMNs. De plus, les récepteurs membranaires, ainsi que les récepteurs des cellules stromales de la moelle osseuse, changent pendant la maturation du neutrophile. Par exemple, il y a une sous-expression de l'intégrine $\alpha 4 \beta 1$ (VLA4) et du récepteur de la chémokine CXCR4 sur la membrane des neutrophiles matures. À *contrario*, il y a une surexpression du Toll-like receptor 4 TLR4 et de CXCR2. Concernant les cellules stromales, elles expriment des récepteurs d'adhésion, tels que VCAM1, VLA4, CXCL12 et CXCR4, afin de maintenir les cellules progénitrices au niveau de la moelle. Une fois matures, les neutrophiles sortent de la moelle osseuse de manière très régulée, grâce au G-CSF qui interfère avec l'interaction CXCR4-CXCL12 entre cellules stromales et neutrophiles (Summers et al. 2010). En effet, seulement 1 à 2 % des neutrophiles quittent la moelle en état **d'homéostasie**, pour se retrouver dans la circulation sanguine. Une fois dans la circulation sanguine, des cytokines, telles que les interleukines IL-23 et IL-17 produites par les phagocytes (Gordy et al. 2011; Jiao et al. 2014), guident les neutrophiles matures et contrôlent leur sortie de la moelle osseuse, grâce au lien entre IL-17 et G-CSF (von Vietinghoff and Ley 2008).

En cas **d'inflammation**, **l'IL-1** peut également participer à la production de neutrophiles, en agissant sur l'axe IL-17/G-CSF (Ueda et al. 2009). D'ailleurs, les neutrophiles déjà produits induisent un feedback positif sur le recrutement des nouveaux polynucléaires (Eskandari et al. 2012). Au niveau des sites infectieux, les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins commencent à exprimer des récepteurs tels que E- et P-sélectines, qui, se liant avec les glycoprotéines de

membrane des neutrophiles, induisent le « *rolling* » des cellules sur l'endothélium. Le neutrophile est donc activé par l'action des chémokines qui agissent sur les $\beta 2$ -intégrines. Une fois la liaison effectuée, par interaction entre les intégrines et les ICAM-1/ICAM-2, ou intercellular molecular adhesion molecule des cellules endothéliales, les neutrophiles migrent dans les tissus périphériques, suivant le gradient chimiotactique, comme le formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLF) et l'anaphylatoxine C5a, afin d'effectuer leurs fonctions de défense (Kolaczkowska and Kubes 2013).

Finalement, en absence d'inflammation les neutrophiles meurent par apoptose et sont éliminés par les macrophages résidants ou les cellules dendritiques. Autrement, les cellules sénescents commencent à exprimer le récepteur CXCR4 qui leur permet de retourner dans la moelle osseuse, où elles sont définitivement éliminées (Martin et al. 2003).

1.2.1.2 Sous-populations de neutrophiles humains

Comme déjà mentionné, les neutrophiles humains sont des cellules actives d'un point de vue transcriptionnel, et bien qu'elles soient principalement associées à leur action destructrice de pathogènes, elles ont des comportements bien plus complexes. En effet, elles peuvent avoir des fonctions différentes selon la situation et le tissu dans lequel elles se localisent, montrant ainsi un comportement qui les éloigne d'un pool homogène de cellules. Effectivement, différentes publications suggèrent que des véritables sous-populations existent, aussi bien dans une situation d'homéostasie, que dans une condition pathologique.

Dans le premier cas de figure, où **l'homéostasie est maintenue**, les neutrophiles peuvent présenter des changements morphologiques et phénotypiques plutôt liés à leur « âge ». En effet, l'un des changements typiquement remarqué est le nombre de lobes du noyau, qui peut aller de 2 jusqu'à 5 lobes. Notamment, de 10 à 30% de la population des polynucléaires présente normalement 2 lobes ; la « version » à 3 lobes contribue à hauteur de 40/50% ; 4 lobes sont retrouvés chez environ 10 à 20 % des cellules, et 5 lobes sont présents chez moins que 5% des neutrophiles humains. Au-delà de 5 lobes, on parle de « **hypersegmentation** », une condition qui représente normalement le vieillissement de la cellule dans la circulation sanguine (Huang et al. 2012). D'autres changements se présentent chez le neutrophile au fur et à mesure que la cellule patrouille l'organisme. On peut alors distinguer les neutrophiles « frais », qui sont fraîchement produits par la moelle osseuse et qui se retrouvent dans la circulation, et les neutrophiles « âgés »,

qui quittent le torrent circulatoire en absence d'inflammation. Le rapport entre ces deux « versions » de neutrophile varie suivant des oscillations de type circadien (Adrover et al. 2016). D'ailleurs, des changements au niveau des récepteurs de membrane ont été indiqués : les cellules plus âgées expriment davantage de CXCR4, qui, comme déjà mentionné, se lie au récepteur CXCL12 des cellules stromales de la moelle osseuse. En général donc, les cellules plus âgées expriment des signaux de sénescence qui le pousse à retourner dans la moelle osseuse, pour conclure leur cycle vital (Martin et al. 2003). D'autres molécules de surface semblent être différemment exprimées chez les polynucléaires plus âgés, comme le CXCR2 et le CD47, qui sont sous-exprimés respectivement afin de réduire la production de neutrophiles à partir de la moelle osseuse, et d'induire la phagocytose par les macrophages (Jaiswal et al. 2009; Eash et al. 2010). À côté de l'expression des récepteurs de membrane, les neutrophiles plus âgés présentent une taille cellulaire plus réduite, moins de granules et un noyau granulaire multilobé (Casanova-Acebes et al. 2013).

D'un point de vue transcriptomique, les cellules plus âgées montrent des voies de signalisation activées et altérées typiques des cellules se trouvant au foyer infectieux, comme par exemple des signaux liés à l'activation cellulaire, la détection de microbes, l'adhésion cellulaire, la migration et la mort cellulaire (Zhang et al. 2015). Cela suggère que les neutrophiles plus âgées seraient donc dans un état plus actif (Adrover et al. 2016).

Ces évidences montrent que des changements phénotypiques et morphologiques des neutrophiles ont lieu pendant leur cycle de vie, ce qui pourrait faciliter la migration des cellules dans les différents tissus.

En effet, au niveau des tissus du corps humain certains neutrophiles montrent également des fonctions et caractéristiques diverses. Par exemple, au niveau du poumon les neutrophiles résident grâce à la surexpression du récepteur CXCR4 (Devi et al. 2013), alors que dans la rate, ils se localisent au niveau de la zone marginale, où ils produisent des cytokines qui influencent la production d'anticorps par les lymphocytes B, montrant un phénotype différent en termes de récepteurs membranaires, et ayant une tendance accrue à former des NETs (Cerutti et al. 2013). Au niveau des ganglions lymphatiques les neutrophiles interagissent avec les lymphocytes T et modulent leur activation, alors qu'un autre sous-population de neutrophiles est impliqué dans l'angiogenèse (Rosales 2018).

In fine, toujours dans des conditions d'homéostasie, d'autres différences ont été décrites concernant les sous-populations ayant des comportements différents en ce qui concerne la migration, ou leur durée de vie liée au « *priming* » initié par le microbiote intestinal (Clarke et al. 2010; Hergott et al. 2016; Nourshargh et al. 2016).

Dans un **état pathologique**, différents *subsets* de neutrophiles ont été décrits, intervenant notamment dans des conditions inflammatoires et dans des cas de cancer (Silvestre-Roig et al. 2016; Yang et al. 2017).

Pendant l'inflammation, notamment due à une infection à *S. aureus* résistant aux antibiotiques, deux types de neutrophiles ont été identifiés : les **PMN-1** et les **PMN-2** (Tsuda et al. 2004). Ces deux typologies de neutrophiles diffèrent notamment en ce qui concerne les cytokines qu'ils produisent, l'activation des macrophages et les molécules de surface, dont le TLR. En particulier, le PMN-1 produit l'interleukine 12 (IL-12,) qui active les macrophages de façon classique, exprimant en surface les TLR2, 4, 5 et 8 avec une expression élevée de CD49 et une basse expression de CD11b. Contrairement, les PMN-2 produisent l'IL-10 qui active les macrophages par une voie alternative, exprimant les TLR2,4,7 et 9, et ayant une expression élevée de CD11b et une basse expression de CD49 (Tsuda et al. 2004).

D'un autre point de vue, tout dérèglement métabolique peut être associé à la présence de différentes sous-populations de neutrophiles, comme dans les cas **d'hyperglycémie** et **d'hyperlipidémie**, où les cellules sont sensibilisées, ou « **primed** » par des hautes concentrations en glucose ou en cholestérol, qui les rendent plus enclins à former des NETs ou à produire des dérivés réactifs de l'oxygène (Mazor et al. 2008; Wong et al. 2015).

En général, ces états métaboliques génèrent des cellules plus réactives et pro-inflammatoires.

Concernant la NETose, ou la production de NETs non associée à la mort cellulaire, nombreuses publications ont montré que les neutrophiles des patients atteints de diabète (Wong et al. 2015), ou de lupus érythémateux (Garcia-Romo et al. 2011; Villanueva et al. 2011) forment plus facilement les trappes à ADN dont on parlera plus dans les détails dans le prochain chapitre. Plus en général, l'habilité des neutrophiles à produire les NETs peut varier beaucoup dépendamment de l'état physiologique de l'individu. Cela suggère une diversité entre les neutrophiles, les rendant plus ou moins sujets à produire ce phénomène et participant à l'aggravation, ou alors à la résolution, d'une condition inflammatoire, comme dans le cas de la goutte (Schauer et al. 2014).

Le **microbiote** peut également « façonner » les neutrophiles dans un contexte de NETose. En effet, les neutrophiles « *primed* » par des microorganismes de la flore commensale peuvent avoir plus ou moins tendance à former des NETs (Zhang et al. 2015).

Globalement, il est clair que les états inflammatoires ou infectieux peuvent contrôler l'émergence de phénotypes particuliers de neutrophiles possédant ainsi des propriétés uniques.

Un dernier cas souvent décrit dans la littérature est celui du **cancer**, un état pathologique où les neutrophiles montrent des phénotypes très caractéristiques. Notamment, une augmentation du

nombre de neutrophiles dans le sang ou à l'intérieur de la tumeur est souvent associée à un mauvais pronostic et à une agressivité accrue du cancer (Schmidt et al. 2005; Sagiv et al. 2015). Cependant, cela n'est pas toujours vrai pour tout type de cancer. En effet, dans le cas du cancer gastrique la neutrophilie est associée à un pronostic plutôt positif (Caruso et al. 2002). Cela montre que globalement les neutrophiles peuvent posséder aussi bien des phénotypes pro- ou antitumoraux (Fridlender and Albelda 2012).

À ce propos, différents sous-populations de neutrophils ont été décrits.

Dans plusieurs types de cancers, non seulement le nombre de neutrophiles totaux est augmenté, mais notamment le nombre des neutrophiles dits « immatures », ayant un phénotype immunosuppresseur (Brandau et al. 2011). Ces cellules ont été nommées **myeloid-derived suppressor cells**, ou **MDSC** (Peranzoni et al. 2010) et elles ont une activité immunosuppressive vis-à-vis des lymphocytes T associée à une progression de la tumeur (Nagaraj et al. 2010; Raber et al. 2014; Keskinov and Shurin 2015). Une subdivision supplémentaire de ce groupe de cellules est représentée par l'identification de sous-groupes granulocytes (G-MDSC) et monocytes (Mo-MDSC) (Raber et al. 2014). Notamment, il est assez compliqué de distinguer les G-MDSC des neutrophiles normaux en raison de leur panel de marqueurs de surface qui semble être commun à celui des neutrophiles humains standard (Solito et al. 2017).

Un deuxième groupe de cellules liées au cancer est constitué de neutrophiles ayant une basse densité, ou **low-density neutrophils (LDNs)**, en anglais. Ce nom dérive de la phase où se trouvent ces cellules suite à une centrifugation en gradient de densité, ou gradient de Ficoll. Ainsi, les neutrophiles normaux, à haute densité, se retrouvent dans le culot, au niveau de la phase plus basse retrouvée dans le tube pour la centrifugation, alors que les LDNs se retrouvent dans la fraction de cellules à plus basse densité, mélangés aux cellules mononuclées (Sagiv et al. 2015, 2016). Ces cellules sont également retrouvées en grand nombre dans différents états pathologiques, tels que la polyarthrite rhumatoïde, le lupus, le rhumatisme articulaire (Hacbarth and Kajdacsy-Balla 1986), le sepsis (Morisaki et al. 1992), l'asthme (Fu et al. 2014), le psoriasis (Lin et al. 2011), le SIDA (Cloke et al. 2012), la vascularite associée aux ANCA (PC et al. 2015), le paludisme (Rocha et al. 2015), mais également pendant la grossesse (Ssemaganda et al. 2014). En effet, dans ce dernier cas, la suppression de l'activité des lymphocytes T est nécessaire pour la tolérance materno-fœtale. D'ailleurs, les LDNs issus de patients atteints de lupus érythémateux semblent avoir également plus tendance à former des NETs, ce qui va à auto-alimenter l'inflammation chronique due à la présence d'autoantigènes se retrouvant sur ces filets de chromatine extracellulaires (Villanueva et al. 2011). Concernant l'origine des LDNs, peu d'informations sont disponibles à ce jour. Néanmoins, il s'agit d'un groupe hétérogène de cellules

aux caractéristiques particulières, qui présentent des noyaux polylobés, mélangées à cellules à morphologie plus proche des myélocytes. Probablement, il s'agit de cellules immatures libérées dans la circulation sanguine à partir de la moelle osseuse à cause d'un état d'inflammation chronique (Denny et al. 2010; Kaplan 2015). Le sujet de leur origine reste tout de même controversé en raison d'un manque de marqueurs spécifiques pour cette sous-population de neutrophiles.

Un dernier sous-groupe de neutrophiles associés au cancer est le groupe de **Tumor-Associated Neutrophils** ou **TANs**. Ces cellules peuvent être différenciées en **N1** and **N2**, ce qui rappelle la classification des macrophages en M1 et M2 (Fridlender and Albelda 2012)(Fridlender et al. 2009; Galdiero et al. 2013). En effet, tout comme les deux catégories de macrophages, les N1 et N2 ont respectivement des fonctions antitumorales ou pro-tumorales. Les TANs N1 sont associés à une action pro-inflammatoire et antitumorale, différemment des TANs N2 qui montrent une activité pro-tumorigène (Fridlender et al. 2009). La population de TANs semble être sélectionnée sur la base du microenvironnement tumoral. En effet, la présence du transforming growth factor-beta (**TGF- β**) a une action qui pousse les TANs vers le phénotype N2, donc pro-tumeur, montrant ainsi que les TANs peuvent montrer un phénotype aussi bien pro que anti-tumeur, selon le microenvironnement (Fridlender et al. 2009; Sionov et al. 2014). De plus, il existe un lien entre les LDNs et les N2, puisque chez l'animal présentant une tumeur, le nombre de LDNs est augmenté. Ces derniers montrent toutefois un pouvoir cytotoxique moindre, ainsi qu'une expression de cytokines réduite. Sagiv et collaborateurs proposent que ces LDNs aux fonctions immunosuppressives soient la source des N2, étant considérés comme des neutrophiles encore immatures (Sagiv et al. 2015). Néanmoins, les informations concernant les deux typologies de TANs, N1 et N2, et leur rapport avec le microenvironnement restent valide uniquement au niveau d'expérimentation animale, alors que chez l'homme ce paradigme reste pour la plupart encore peu clair.

Globalement, trois populations de neutrophiles sont présentes chez les individus atteints de cancer : les neutrophiles normaux à haute densité, les LDNs immatures et les LDNs matures. De plus, les TANs N1 peuvent montrer le phénotype N2 immunosuppresseur et soutenir la tumorigénèse (Wu et al. 2014).

1.2.1.3 Fonctions du neutrophile humain

En termes généraux, les fonctions immunitaires du neutrophile sont nombreuses (Figure 19).

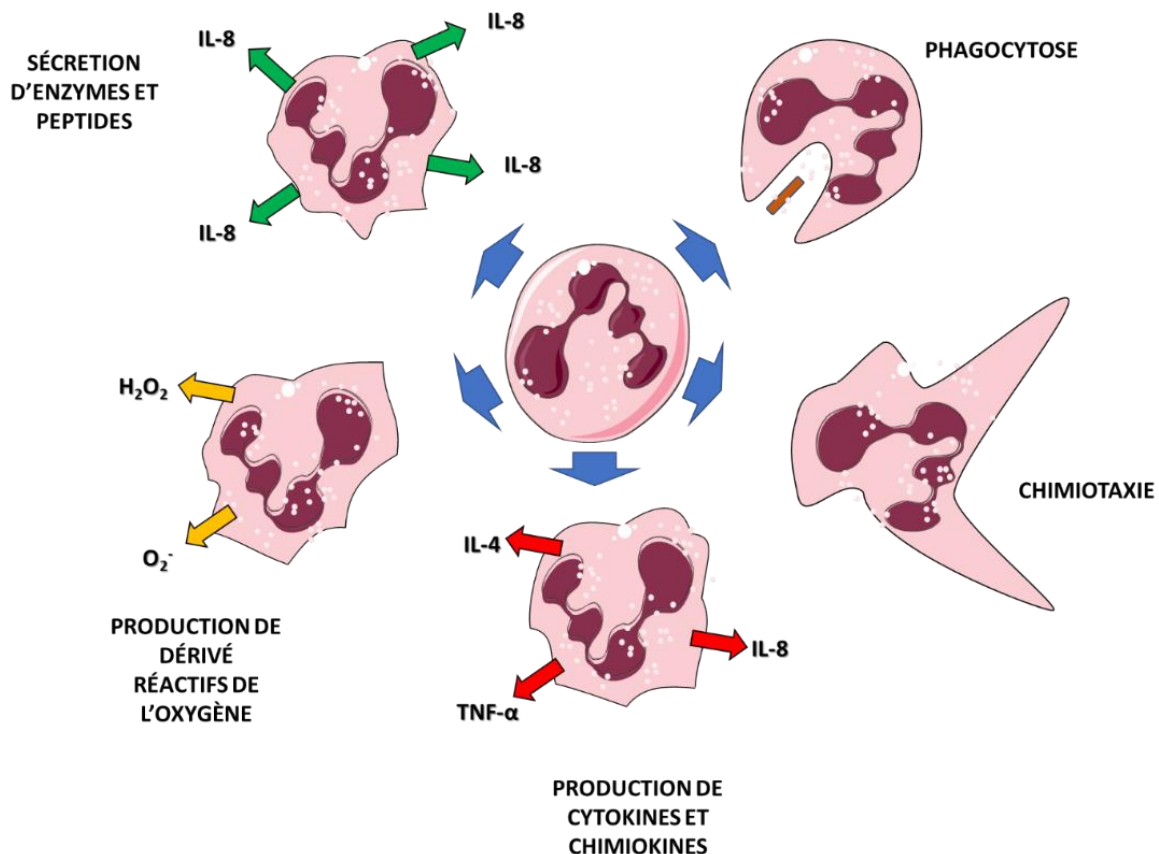


Figure 19- Les fonctions-clé des neutrophiles humains ou hPMNs.

Les hPMNs régissent aux pathogènes de façon multiple : par la production de dérivés réactifs de l'oxygène, par la dégranulation, ce qui permet la libération du contenu antimicrobien des granules intracellulaires, par la production de cytokines et chémokines inflammatoires qui induisent le recrutement des autres cellules immunitaires aux sites infectieux, en amplifiant la signalisation immunitaire. (Malech et al. 2020).

Tout d'abord, suite à l'installation d'une infection ou une inflammation, les macrophages situés localement au foyer infectieux commencent à produire des cytokines pro-inflammatoires, qui à leur tour vont provoquer la dilatation des vaisseaux sanguins et des modifications au niveau de leur endothélium. Ensuite, cela permet à d'autres monocytes et aux plus nombreux neutrophiles d'être recrutés. Ces cellules quittent le torrent circulatoire par un mécanisme appelé **diapédèse**, afin de se rendre au site infectieux. Cette première fonction est assurée par le gradient **chimiotactique** qui guide les hPMNs par des signaux d'origine microbienne ou endogène. Une fois arrivées au site d'infection, ces cellules commencent un processus d'activation. Ainsi, il y a une nouvelle vague de sécrétion de **cytokines et chémokines**, afin de recruter d'autres cellules immunitaires et « lancer l'alarme » au niveau de l'organisme. En plus, la **dégranulation**, un processus qui permet aux neutrophiles de libérer le contenu des granules dans le milieu extracellulaire, et la production de **dérivés réactifs de l'oxygène**, notamment d'ion superoxyde produit par la NADPH oxydase, facilite la mort des pathogènes. En effet, ces cellules sont des

phagocytes très efficaces, puisque leur activité de **phagocytose** permet l'ingestion et la neutralisation intracellulaire par digestion des pathogènes (Murphy and Weaver 2017). L'interaction entre pathogène et neutrophile peut se faire de deux manières : soit par la reconnaissance directe des **motifs moléculaires associés aux pathogènes ou PAMPs**, reconnus par des récepteurs spécifiques des neutrophiles appelés **PRRs** (pattern recognition récepteurs), soit les pathogènes, préalablement opsonisés, sont **reconnus de façon indirecte** par l'intermédiaire du récepteur du fragment Fc des immunoglobulines (Fc receptors) ou par les récepteurs du complément, interagissant avec des facteurs de la cascade. Une fois phagocytés, les pathogènes se retrouvent à l'intérieur d'une vésicule appelée **phagosome**, qui commence un processus de maturation se terminant par la fusion avec les granules du neutrophile. Cela va créer un environnement toxique du fait de la libération de protéases, phospholipases et peptides cationiques, ainsi que grâce à la production de DROs à l'intérieur du complexe phagosome (Otagiri et al. 2017).

Le processus **de NETose ou Neutrophil Extracellular Traps** va donc se rejoindre et à compléter les fonctions immunitaires du neutrophile. En effet, ce mécanisme permet de tuer de façon extracellulaire les pathogènes à travers l'activité antimicrobienne du contenu granulaire.

1.2.1.4 NETose : L'histoire d'une découverte

- **Japon, 1996, Département d'Immunologie et Parasitologie, Faculté de médecine de l'Université de Yamagata**

L'histoire scientifique de la NETose commence véritablement dans une ville d'environ 250 000 habitants, la même population municipale de la ville de Strasbourg. C'est ici que Hiroshi Takei, Professeur à l'Université de Yamagata et son équipe observèrent et décrivirent pour la première fois des changements morphologiques particuliers chez des neutrophiles humains exposés à un puissant activateur de polynucléaires, l'acétate de phorbol myristate ou « phorbol 12-myristate 13-acetate » (PMA), qui ne correspondaient ni à l'apoptose ni à la nécrose. Afin de clarifier la relation entre activation des neutrophiles et mort cellulaire conséquente, l'équipe de Takei mena des expériences *in vitro* en appliquant 25ng/mL de PMA (environ 40mM) aux polynucléaires neutrophiles humains purifiés. L'observation qui suivit fut : « *Curieusement, après 2h de stimulation, le noyau a commencé à assumer une structure sphérique. Après 3h de traitement avec le PMA, cette agglomération nucléaire est devenue plus évidente et certains neutrophiles ont montré une rupture nucléaire, suivie d'un relargage du nucléoplasme dans le cytoplasme.*

*Après 4h, la majorité des cellules étaient remplies d'une **fine matrice homogène**.* » (Takei et al. 1996). Takei et collaborateurs ne le savaient pas encore, mais cela fut la toute première description du phénomène de NETose.

En 1998, toujours au Japon, la génération de NETs fut également et inconsciemment décrite par une équipe du Département de Biologie de Tokyo. En effet, ces auteurs décrivirent les changements cellulaires des hPMNs exposés à 100ng/ml de PMA pendant 5h comme « *dégénérescences morphologiques avec une augmentation du volume cellulaire et **un certain nombre de structures formées** à partir des cellules traitées avec le PMA* » (Suzuki and Namiki 1998).

- **Allemagne, 2004, Institut de Biologie Infectieuse « Max Planck Institute » de Berlin.**

Cependant, il a fallu attendre le 5 mars 2004 et le travail innovateur de l'équipe du Professeur Arturo Zychlinsky, publié dans « *Science* », pour en arriver au vrai « baptême » de ce processus remarquable. Ce fut, en effet, Volker Brinkmann à dénommer « Neutrophil Extracellular Traps », ou NETosis, le phénomène engendré non seulement par des stimuli chimiques, tels que le PMA, mais également par des stimuli bactériens, dont *S. aureus*, en décrivant ainsi pour la première fois la fonction antibactérienne du processus.

Un nouveau mécanisme de défense immunitaire opéré par les neutrophiles humains venait d'être signalé, en dehors de l'activité de phagocytose et de dégranulation :

*« Étonnamment, nous voyons que les neutrophiles activés, contrairement aux cellules non stimulées, produisent des structures extracellulaires remarquables. **Ces fibres, ou NETs**, sont très fragiles, et les échantillons ont dû être lavés et fixés pour les préserver »* (Brinkmann et al. 2004).

En effet, les neutrophiles humains exposés à certains stimuli chimiques ou bactériens montraient, dans l'étape finale, l'extrusion de structures filamenteuses non entourées de membranes, ne s'agissant donc pas de pseudopodes, dans le milieu extracellulaire. Ces fibres sont composées principalement d'**ADN**, qui en constitue la structure de base. Les filets de chromatine sont également décorés de protéines dérivées des granules azurophiles (ou primaires), tel que **l'élastase du neutrophile** ou EN, la **myéloperoxydase** (MPO) et la cathepsine G, et du contenu des granules secondaires et tertiaires, tel que la lactoferrine et la gélatinase, respectivement, qui, ensemble avec les histones, exercent une activité antimicrobienne (Brinkmann et al. 2004). Les

NETs chargés en protéines et peptides antimicrobiens sont produits afin de piéger et tuer les pathogènes, à travers à la fois une action mécanique du réseau d'ADN, très collant, et une action microbicide assurée par les protéines et peptides d'origine granulaire et les histones. De plus, la concentration locale très élevée de ces agents antimicrobiens, facilite l'élimination des agents infectieux. Ce phénomène permet ainsi de tuer les bactéries bien avant leur phagocytose (Brinkmann et al. 2004).

Tout d'abord, nous pourrions avancer une première hypothèse, puisque on remarque une similitude intéressante entre *S. aureus* et le neutrophile : d'un côté la sécrétion des facteurs de virulence assure la dissémination bactérienne, et de l'autre le relargage de fibres de chromatine décorées par des peptides antimicrobiens piège et tue les pathogènes. La bactérie et l'immunité humaine sembleraient se battre « à armes égales », essayant d'éviter un véritable combat rapproché.

Depuis l'identification de cette nouvelle stratégie immunitaire, la littérature au sujet de la NETose n'a cessé de s'enrichir. Grâce à cela, nous avons pu collecter des données supplémentaires concernant ce processus, que nous expliquerons par la suite.

La NETose est un processus intéressant les leucocytes humains, tout comme ceux des animaux, dont le neutrophile est la cellule mieux caractérisée. D'autres cellules, telles que les monocytes (Granger et al. 2017) et les macrophages (Mohan et al. 2013; Wong and Jacobs 2013; Bonne-Année et al. 2014), ainsi que les éosinophiles (Simon et al. 2011; Yousefi et al. 2012) et les mastocytes (Von Köckritz-Blickwede et al. 2008; Lin et al. 2011), peuvent présenter ce même phénomène, mais les études disponibles sont moins nombreuses. Au fil des années, les informations issues des travaux japonais datant 1996 et 1998, et les découvertes décrites par Brinkmann et collègues en 2004, ont été finalement associées, ayant en effet décrit les différentes étapes d'un même processus NETotique.

1. « *Le noyau a commencé à présenter une **structure sphérique*** » (Takei et al. 1996). Cette étape est, à tous égards, la phase de décompactage de la chromatine nucléaire, qui produit des changements au niveau de la morphologie du noyau du neutrophile. Ainsi, la forme polylobée du noyau est perdue et le noyau devient effectivement sphérique (Sollberger et al. 2018b).
2. « *Cette agglomération nucléaire est devenue plus évidente et certains neutrophiles ont montré une **rupture nucléaire*** » (Takei et al. 1996). Suite à la première étape, où le noyau

est compromis, la membrane nucléaire est désintégrée, sans que la membrane plasmique en soit pourtant affectée (Sollberger et al. 2018b).

3. « On remarque une dégénération morphologique avec une **augmentation du volume cellulaire** » (Suzuki and Namiki 1998). L'augmentation du volume à l'intérieur d'une cellule encore non perméabilisée représente la phase de « mixing », où le contenu du noyau et le contenu des granules du neutrophile sont mélangés. Cela permet aux protéines et peptides antimicrobiens de s'associer à la structure de la chromatine (Sollberger et al. 2018b).
4. « Les neutrophiles activés produisent des **structures extracellulaires remarquables** » (Brinkmann et al. 2004). Cette phase décrit précisément l'étape du relargage des NETs dans l'environnement extracellulaire. Cela est immédiatement précédé par la rupture de la membrane cytoplasmique (Sollberger et al. 2018b). La NETose a lieu (Figure 20).

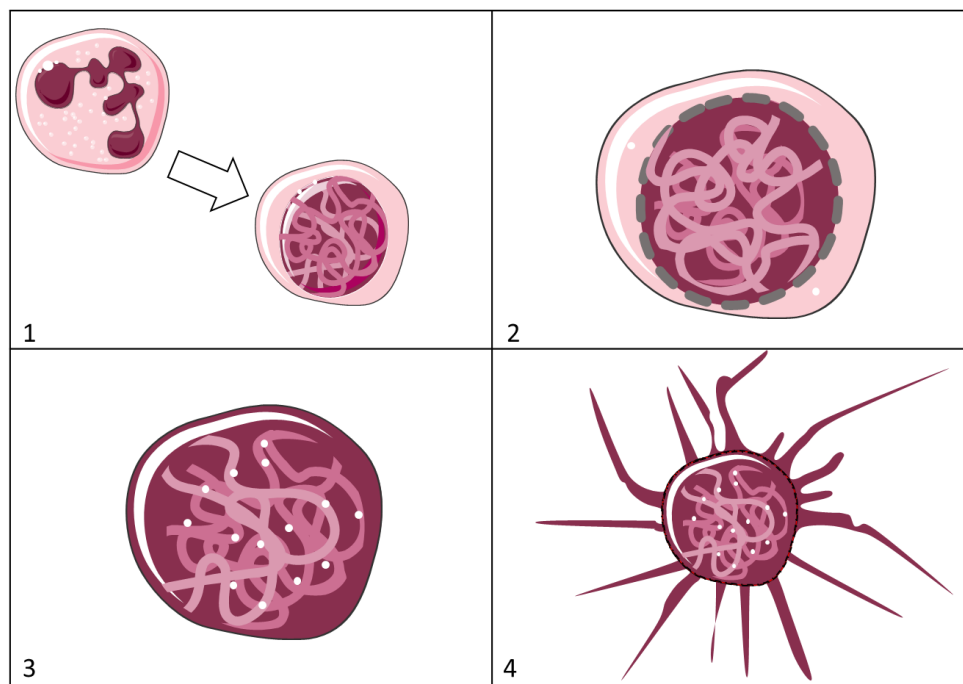


Figure 20- Schéma représentatif des étapes principale du processus de NETose.

(1) Les hPMNs stimulés montrent en premier lieu un changement morphologique du noyau, qui devient rond. Les granules sont désintégrés et leur contenu est libéré au cytoplasme. (2) la membrane nucléaire est perméabilisée, pendant que la membrane cytoplasmique est encore intègre. (3) Le contenu du noyau et des granules sont mélangés et il y a l'association des protéines et peptides antimicrobiens (points blancs, dans l'image) à la chromatine décompactée. (4) *in fine*, la membrane plasmique est perméabilisée et il y a la lyse du neutrophile et relargage des filaments de chromatine décorés par les agents antimicrobiens d'origine granulaire (NETs).

Ce phénomène a été défini comme un « processus de mort programmée », tout comme d'autres mécanismes propres au neutrophile, tels que l'**apoptose**, parmi d'autres. Néanmoins, concernant la biologie du neutrophile, cette fonction représente effectivement un autre mécanisme de défense antimicrobienne.

1.2.2 La NETose et ses « déclinaisons »

Il est encore assez compliqué de décrire de manière complète et univoque le processus de NETose, se basant sur les caractéristiques présentées par toutes les publications qui traitent ce sujet.

Toutefois, nous pouvons affirmer que, de manière générale, la NETose est un processus de durée variable, dépendamment du stimulus appliqué, qui implique la production de DROs, l'extrusion de fibres de chromatine dans le milieu extracellulaire et la présence, sur ces fibres, de marqueurs de NETose, tels que les protéines antimicrobiennes élastase du neutrophile et myéloperoxydase. Les NETs sont les filaments de chromatine expulsés dans l'étape finale du processus. Il s'agit de fibres à ultrastructure inusuelle, définies comme structures à apparence lisse et de diamètre d'environ 17nm, formées par des nucléosomes empilés et modifiés (Brinkmann and Zychlinsky 2012). Cette structure est constellée de domaines globulaires d'environ 50 nm de diamètre, constitués de protéines granulaires (Brinkmann et al. 2004). Cependant, à leur état non fixé et dans un milieu de culture qui en assure l'hydratation, ces structures apparaissent plutôt comme un nuage extracellulaire occupant un volume de 10 à 15 fois plus grand que celui de la cellule d'origine (Brinkmann and Zychlinsky 2012). Cette mort cellulaire programmée s'éloigne des caractéristiques typiquement retrouvées lors des processus d'apoptose, de nécroptose ou de nécrose (Kenny et al. 2017). Notamment, la NETose a été définie étant un mécanisme opposé à l'apoptose, en raison de l'inhibition de l'activation des caspases pendant ce processus (Remijnsen et al. 2011). Considérant ces notions, les chercheurs ont d'abord voulu trouver les détails sous-jacents à la mécanique d'un processus qui, au fur et à mesure, résultait être impliqué dans des états pathologiques humains tels que le sepsis et les maladies auto-immunes, allant donc au-delà d'un rôle purement antibactérien et immunitaire (Clark et al. 2007; Kessenbrock et al. 2009; Hakikim et al. 2010).

Ainsi, des éléments décrits comme nécessaires au déroulement du processus de NETose ont fait l'objet d'articles parus de manière précoce, qui pourtant montraient des contradictions (Wang et al. 2009; Remijnsen et al. 2011; Parker et al. 2012; Doua et al. 2015b).

Le fait que plusieurs inducteurs de nature très différente puissent aboutir à un même processus rend l'étude de cette mort cellulaire à la fois complexe et très fascinante.

En résumé, la NETose du neutrophile humain peut être induite non seulement par des inducteurs de type chimique, tel que le PMA, mais également par des virus, des levures, des parasites, des cytokines, des cristaux, des bactéries, ou encore des produits bactériens sécrétés, parmi d'autres (Kenny et al. 2017).

Ainsi, chaque stimulus montre des différences concernant la cinétique du processus de NETose et des caractéristiques moléculaires propres à chaque voie de signalisation activée. Néanmoins, les 4 étapes que nous avons décrites au début de ce chapitre, strictement liées à la morphologie, sont globalement communes à toutes les formes de NETose, indépendamment du stimulus inducteur (Sollberger et al. 2018b).

La littérature au sujet de la NETose a commencé à définir ce processus étant « stimulus-dépendant » précisément en raison d'une telle variété de différences (de Bont et al. 2018).

De ce fait, ils existent à ce jour différents mécanismes de formation de NETs présents dans la littérature, qui peuvent être associées ou non associées à la mort cellulaire.

En effet, le concept même d'expulsion de NETs, de manière dissociée de la mort cellulaire connue sous le nom de NETose a été nommé **NETose vitale** ou Vital NETosis (Pilschek et al. 2010). Les auteurs qui ont décrit en premier ce mécanisme alternatif ont indiqué que les neutrophiles exposés à la bactérie *Staphylococcus aureus* montraient un processus très rapide de relargage d'ADN en milieu extracellulaire, sans montrer une lyse de la membrane plasmique (Pilschek et al. 2010). Ce nouveau processus serait effectué entre 5 à 60 min après l'exposition des cellules à la bactérie, et impliquerait la génération de « *blebbing* », ou bourgeonnement, de vésicules provenant du noyau. En effet, ce dernier montre des changements rapides et passe d'une morphologie polylobée à une forme ronde, suite à la séparation des membranes nucléaires interne et externe. Ensuite, il y a la formation de vésicules contenant l'ADN nucléaire en « paquets », relâchées dans le milieu extracellulaire via un mécanisme semblable à l'exocytose cellulaire et indépendant de la génération de DROs. Une fois dans le milieu extracellulaire, les vésicules s'ouvrent afin de piéger la bactérie, tout en gardant le neutrophile qui les a produits en état vital. Le dudit mécanisme, au nom clairement oxymorique, serait soutenu par le concept que les neutrophiles, comme d'autres cellules sanguines, pourraient survivre à l'extrusion de leur ADN, et continuer à exercer leurs fonctions en version anucléé dans la circulation sanguine (Yipp and Kubes 2013). Des exemples qui sont souvent portés à soutien de cette thèse sont les globules rouges, qui présentent un noyau dans leurs stades plus immatures, pour ensuite le perdre à la fin de leur maturation, tout en gardant leurs fonctions, ou encore les plaquettes, tout aussi anucléées

(Yipp and Kubes 2013). D'ailleurs, les neutrophiles ayant expulsé leur ADN, pourraient maintenir leur capacité de phagocytose, prouvant ainsi que la cellule arrive à garder son activité antimicrobienne, même en l'absence du matériel génétique (Yipp and Kubes 2013).

D'autres auteurs, ont enrichi les études sur la NETose Vitale montrant que les NETs formés lors de ce phénomène pourraient avoir une origine mitochondriale et indépendante des DROs, si pré-stimulés (*primed*) avec le **GM-CSF** ou granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, et par une brève stimulation successive des récepteurs C5aR et TLR4 (Yousefi et al. 2009). Cela montrerait que le neutrophile se libère uniquement de l'ADN provenant de ces organelles, sans pourtant expulser l'ADN nucléaire, avec un mécanisme semblable à une « catapulte à ADN mitochondrial », qui d'ailleurs ne limite pas, et au contraire semble prolonger, la durée de vie de la cellule qui génère ce type de NETs (Yousefi et al. 2009). Plus récemment, d'autres auteurs ont décrit un mécanisme similaire, où les neutrophiles stimulés avec des complexes immuns de ribonucléoprotéines ou Ribonucleoprotein immune complexes (**RNP ICs**) montrent des mitochondries hypo-polarisées qui transloquent à la membrane plasmique (Lood et al. 2016). Le processus se termine par la production de NETs constitués totalement, ou en partie, d'**ADN mitochondrial**. Ce processus serait d'ailleurs soutenu par un *burst oxydatif* tout aussi dérivé de la mitochondrie (mtDROs), ce qui expliquerait l'état oxydé de l'ADN mitochondriale retrouvé dans le milieu extracellulaire (Lood et al. 2016). Un tel type d'ADN oxydé serait lié à certaines conditions inflammatoires et auto-immunitaires (Lood et al. 2016). Plus en général, ce mécanisme permettrait aux neutrophiles de maintenir les propriétés antibactériennes de base, sans contredire le paradigme classique qui prévoit que ces cellules immunitaires restent vivantes pour effectuer leurs fonctions (Yipp and Kubes 2013).

D'ailleurs, quand les NETs sont associés à la mort de la cellule, un phénomène semblable à la NETose, mais biologiquement différent, pourrait avoir lieu. C'est le cas de la **nécroptose**, une mort cellulaire également appelée « nécrose programmée », ou encore de la **Leukotoxic Hypercitrullination** (LTH), dont on parlera dans plus tard dans ce manuscrit. Il s'agit globalement de deux morts cellulaires se terminant par l'expulsion de fibres d'ADN décorées par les marqueurs classiques de NETose, comme l'EN ou la MPO, ou *NET-like structures*, et donc non assimilables à une mort par nécrose passive. Plus en particulier, concernant la **nécroptose**, il s'agit d'une mort cellulaire programmée et « lytique » récemment comparée à la NETose, qui pourtant passe par une voie de signalisation bien précise et univoque, impliquant le **receptor-interacting protein kinase 3 (RIPK3)** et le **mixed lineage kinase domain-like (MLKL)** (Desai

et al. 2016, 2017). D'ailleurs, des inhibiteurs spécifiques des kinases RIPK3 ou MLKL, un composé appelé **necrostatine-1** ou **Nec-1** ou le **nécrosulfonamide** respectivement, seraient suffisants pour inhiber complètement le processus de nécroptose induit par des stimuli tels que des particules d'origines différentes, les cristaux d'urate monosodique (MSU) ou encore le PMA (Desai et al. 2016, 2017). Cependant, une contradiction est remarquée si l'on compare ces résultats à ceux d'une publication parue en 2017 et publiée par Kenny et collaborateurs, puisque ces derniers auteurs montrent que le processus de NETose est indépendant de la voie de signalisation de la nécroptose, et surtout non inhibé par un pré-traitement avec la Nec-1, du moins pour des stimuli comme le PMA, parmi d'autres (Kenny et al. 2017). L'œuvre de ces derniers auteurs montre d'ailleurs la panoplie de voies de signalisation et de différents éléments en jeu qui existent entre des stimuli de diverse nature, se terminant par la génération de NETs (Kenny et al. 2017).

Concernant la nature des NETs produits dans les différentes conditions et par les différents stimuli, il faut remarquer également que leur action vis-à-vis de la **réponse inflammatoire** peut également varier, comme démontré par Ribon et collaborateurs (Ribon et al. 2019). Par une étude de comparaison entre patients atteints de PR et des patients en bonne santé, ces auteurs ont montré que les NETs pouvaient avoir des rôles **aussi bien anti- que pro- inflammatoires** dépendamment du microenvironnement. En particulier, pour les deux types de sujets à l'étude, les donneurs sains et les malades, les NETs stimulent l'activité pro-inflammatoire des autres neutrophiles et des macrophages, ayant une action encore plus importante dans le cas des NETs des malades de PR, avec une augmentation des cytokines pro-inflammatoires produites et une surexpression de HLA/CD86/CD11b. De plus, le facteur du complément C1q et la protéine antimicrobienne LL37 influencent positivement l'action inflammatoire que les NETs ont sur les macrophages. Toutefois, les mêmes auteurs montrent également une influence antinomique des NETs concernant l'état inflammatoire induit, puisqu'ils remarquent que ces derniers inhibent la production d'IL-6 uniquement chez les macrophages stimulés avec du LPS, toujours en concert avec le C1q et LL37, ce qui est accompagné d'une induction de la production d'IL-10. Cela indique globalement que les NETs **peuvent être à la fois pro- et anti-inflammatoires**, vraisemblablement en fonction de la cellule cible, de leur état d'activation et du contexte en terme de C1q et LL37, plus en particulier, ce qui *in vivo* pourrait s'avérer être un mécanisme très finement régulé et dépendant de **l'équilibre** entre les différents facteurs en jeu (Ribon et al. 2019).

En raison d'un tel nombre de variantes de NEToses et de « pseudo-NEToses », de natures et fonctions associées aux NETs et de discrepancies entre les différents résultats des publications, pour ce manuscrit nous préférons opter pour une distinction plus classique, ainsi identifiant plus généralement **deux** types principaux du phénomène, en se basant sur la **source de DROs mobilisées**.

Nous décrirons alors plus dans les détails les informations concernant la **NETose NADPH oxydase-dépendante** et celles liées à la **NETose NADPH oxydase-indépendante**.

1.2.2.1 La NETose NOX-dépendante

Il s'agit de la forme de NETose la mieux décrite dans la littérature scientifique. Compte tenu des études préliminaires qui ont permis d'identifier le processus, la NOX-dépendante est parfois appelée NETose *classique*. En effet, il est facile d'en comprendre la raison, si l'on pense que le stimulus typique provoquant la NETose NOX-dépendante est souvent représenté par le PMA. En général, des anticorps (Garcia-Romo et al. 2011; Behnen et al. 2014), des microbes (Fuchs et al. 2007), le cholestérol (Warnatsch et al. 2015), ou des mitogènes, tels que la concanavaline A (Amulic et al. 2017) et justement le PMA, poussent les neutrophiles humains à produire des DROs à partir de la **NADPH oxydase**. Ce complexe enzymatique est également appelé NOX2 ou simplement NOX, et il s'agit de la forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, une oxydoréductase très présente chez les phagocytes dont l'unique fonction est de catalyser la production de **DROs** (Figure 21).

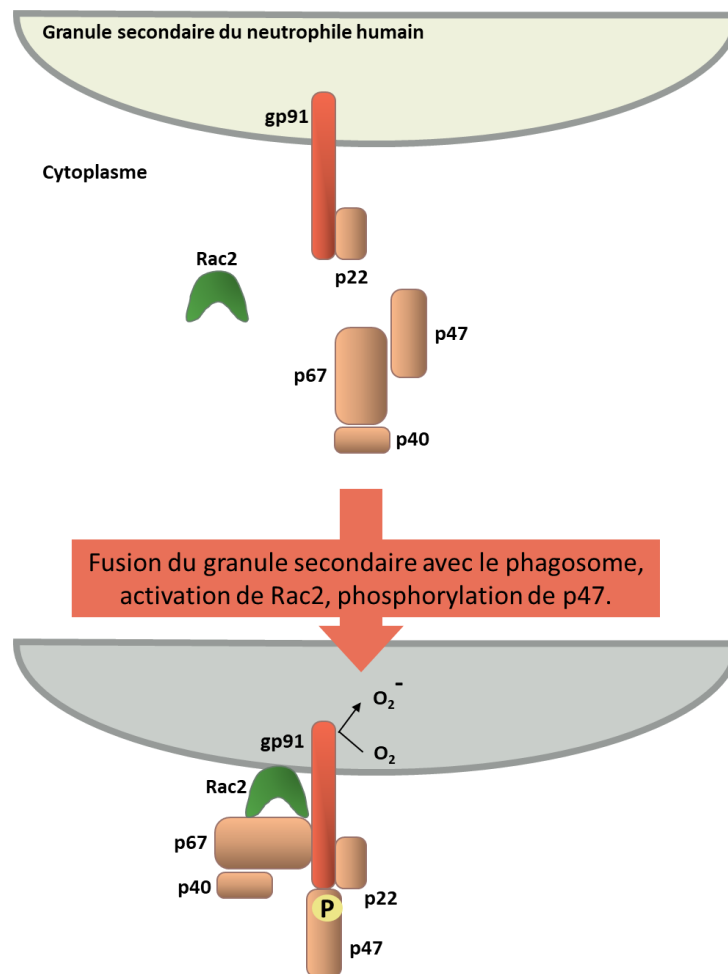


Figure 21- Activation du complexe enzymatique NADPH oxydase.

L'enzyme NADPH oxydase est présente chez les neutrophiles non stimulés sous forme de sous-unités ancrées à la membrane et de sous-unités présentes sous forme libre dans le cytoplasme, séparées les unes des autres. Une fois qu'un stimulus active le récepteur phagocytaire, il y a d'abord la phosphorylation des sérines du composé p47 du cytosol et l'activation de Rac2. La phosphorylation de p47 a une fonction de guide pour les composés cytosoliques qui vont s'assembler à la membrane avec les composés déjà ancrés à la membrane des granules secondaires. Ces derniers, en parallèle, vont fusionner avec le phagosome pour pouvoir expliciter la fonction de la NADPH oxydase dans le compartiment contenant les pathogènes. Le transfert d'électrons aux molécules d'oxygène génère l'ion superoxyde qui a la double fonction de détruire les microbes à l'intérieur du compartiment intracellulaire, et d'activer les protéases contenues dans les granules primaires, ayant ainsi une fonction antibactérienne.

Adapté de (DeFranco et al. 2007)

L'activation de la NOX est provoquée en amont par l'activation de la voie de signalisation des kinases « MAP », ou mitogen-activated proteins, en particulier **PKC, c-Raf, MEK, Akt et ERK** (Hakim et al. 2011). D'ailleurs, Remijnsen et collaborateurs indiquent qu'un processus **d'autophagie** se déroule parallèlement et est indispensable à la NETose NOX-dépendante, avec un lien probable avec le « burst » oxydatif (Remijnsen et al. 2011). Les DROs produits, de leur côté, vont induire la libération d'un complexe macromoléculaire appelé **azurosome** à partir des

granules. Ce complexe est constitué de l'enzyme **myéloperoxydase (MPO)** associée à 8 protéines, dont **l'élastase du neutrophile (EN)**, une sérine protéase stockée dans les granules primaires des phagocytes. L'azurosome est localisé au côté interne de la membrane des granules (Metzler et al. 2014). Les DROs, principalement sous forme de **radicaux superoxydes O_2^-** , subissent une dismutation spontanée ou par l'action des superoxydes dismutases (SOD) cellulaires, **en peroxyde d'hydrogène ou H_2O_2** . L' H_2O_2 est transformé en **HOCl** par l'action de la **MPO**, qui est activée par les DROs, induisant également la libération d'EN dans le cytoplasme (Metzler et al. 2014). L'EN clive la F-actine et transloque au noyau, probablement par diffusion passive à travers les pores de la membrane nucléaire (Metzler et al. 2014). Ici, l'EN va entraîner la **décompaction de la chromatine**, en agissant au niveau des histones. À cette étape participe en parallèle la MPO, qui amplifie les effets sur la décompaction de la chromatine (Metzler et al. 2014). L'expansion de la chromatine décompactée se produit en absence de rupture de la membrane plasmique. Des médiateurs aussi bien inflammatoires qu'anti-inflammatoires, participent à la NETose NOX-dépendante, dont la **prostaglandine E_2** et la **protéine C activée** (Shishikura et al. 2016; Healy et al. 2017). D'autres facteurs ont une influence sur la régulation de la NETose, comme le niveau **d' O_2 , CO_2 , bicarbonate** et de **pH** (Branitzki-Heinemann et al. 2016; Maueröder et al. 2016).

Étonnamment, la NETose NOX-dépendante implique la **réactivation du cycle cellulaire** et donc la sortie de la phase G0, phase dans laquelle les hPMNs se retrouvent une fois sortis de la moelle osseuse. Ainsi, il y a l'expression des kinases dépendantes de la cycline ou CDK, dont **CDK6**, qui est abondamment exprimée pendant la NETose, tout comme le marqueur de prolifération cellulaire **Ki-67** (Amulic et al. 2017). Cette réactivation du cycle cellulaire permet le déroulement de certains événements de la phase M du cycle cellulaire, comme la désorganisation de l'enveloppe nucléaire par la phosphorylation des lamines et la séparation du centrosome, des manifestations que l'on retrouve pendant le processus de NETose. Cependant, la transcription des gènes des histones et la synthèse d'ADN, correspondant à la phase S, sont absents pendant le processus NETotique.

Plus récemment, différents auteurs ont décrit dans les détails l'important mécanisme à travers lequel la lyse des membranes nucléaire et plasmique ont lieu dans deux phases spécifiques du processus de NETose (Chen et al. 2018; Sollberger et al. 2018a). Ces auteurs ont démontré le rôle d'une protéine formant des pores, **la Gasdermine-D ou GSDMD**, à la fois produisant un effet de feedback positif sur la libération de l'ADN et d'EN, et également responsable de l'étape

de lyse cellulaire par la formation de pores à la membrane plasmique. Cette dernière découverte explique ainsi l'étape terminale de libération des NETs dans l'espace extracellulaire (Figure 22).

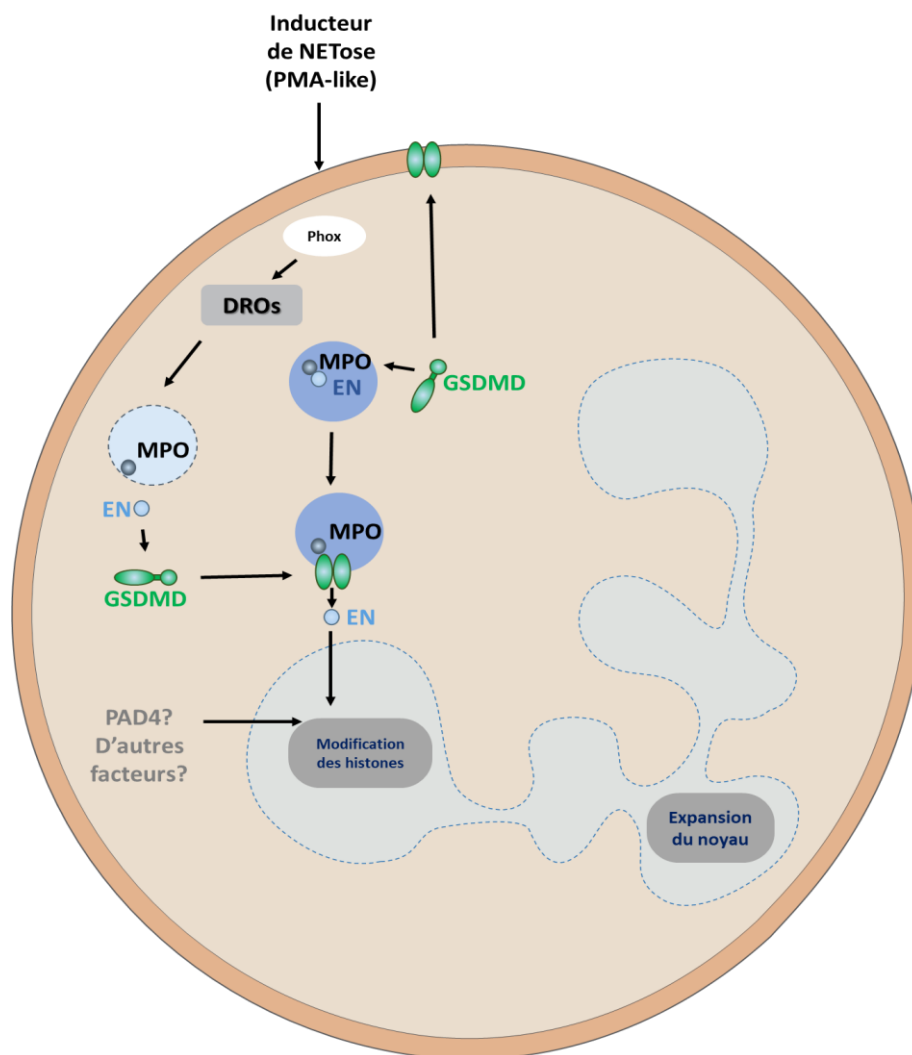


Figure 22 - Contribution de la Gasdermine-D d'après le modèle de Sollberger et collaborateurs.

(Sollberger et al., 2018)

Globalement, la GSDMD est une protéine au rôle bien défini et corrélé à une mort cellulaire typiquement induite chez les macrophages, la **pyroptose**, dont un inhibiteur spécifique, la **nécrosulfonamide**, a été décrit étant très efficace pour bloquer complètement son action pro-inflammatoire (Rathkey et al. 2018). Il est important de souligner que ce même inhibiteur est employé pour bloquer la nécroptose et ainsi la distinguer de la NETose (Kenny et al. 2017). En effet, cet inhibiteur bloque l'activité de la GSDMD via une liaison directe à la protéine, empêchant l'oligomérisation du fragment p30-GSDMD. Cette inhibition rend donc impossible la formation de pores par la protéine pendant cette mort cellulaire (Rathkey et al. 2018).

Toujours en 2018, les deux publications susmentionnées sont parues dans le journal « Science », montrant conjointement que la GSDMD est impliquée dans deux morts cellulaires à la fois, la pyroptose et la NETose, représentant ainsi le point commun entre les deux processus (Chen et al. 2018; Sollberger et al. 2018a). Concernant la NETose, elle est nécessaire, en concert avec la caspase 4/11, pour la perméabilisation de la membrane nucléaire et donc associée aux changements morphologiques typiquement retrouvés lors des stades précoces du phénomène. Ainsi, la GSDMD est essentielle pour une action plus spécifiquement vis-à-vis des pathogènes **extracellulaires**, quand elle est associée à la NETose et aux **neutrophiles**, et une action antibactérienne **intracellulaire** concernant les **macrophages**, constituant globalement le point clé d'une stratégie immunologique bien coordonnée (Chen et al. 2018; Sollberger et al. 2018a). Malheureusement, concernant la NETose, l'élégant mécanisme décrit par les auteurs n'est pas également observable avec d'autres inducteurs de NETose tels que la **nigéricine**, un antibiotique dérivé de la *Streptomyces hygroscopicus* et la **calcimycine**, ou A23187, produite pendant la fermentation de *Streptomyces chartreusensis*. En particulier, ce dernier stimulus semble dépendre de la GSDMD seulement dans une moindre mesure (Sollberger et al. 2018a), activant par ailleurs une voie de signalisation différente du PMA, notamment en ce qui concerne la mobilisation de DROs, qui est opérée à partir d'une source alternative de dérivés oxygénés (Douda et al. 2015b).

1.2.2.2 La NETose NOX-indépendante

Quand en 2009, Wang et collaborateurs décrivirent une nouvelle caractéristique propre au processus de NETose, l'idée que plusieurs formes de ce phénomène pourraient coexister n'avait été pas encore formulée de façon claire. Le PMA, largement employé dans les études *in vitro* du phénomène, a souvent été remplacé par d'autres stimuli provoquant la NETose. Ainsi, Wang et collaborateurs utilisèrent un **ionophore calcique** pour affirmer que pendant la NETose l'enzyme **peptidyl-arginine désaminase 4 (PAD4)**, très exprimée chez les neutrophiles humains, provoque une **hypercitrullination des histones**. Cette modification post-traductionnelle prévoit la conversion des résidus d'arginines (Arg) en citrullines (Cit), des acides aminés non conventionnels. Les acides aminés citrullines sont ainsi présents dans la structure de plusieurs protéines du neutrophile. D'après les auteurs de l'étude, la citrullination serait opérée afin de décondenser la chromatine du neutrophile, une étape fondamentale du processus de NETose (Wang et al. 2009). En effet, les ionophores calciques augmentent le niveau de calcium intracellulaire, un ion qui, à son tour, va se complexer à la PAD4 en l'activant (Luo et al. 2006; Neeli et al. 2008). La PAD4, une fois transloquée au noyau, catalyse la conversion des résidus

arginines chargés positivement, notamment présents sur les histones, en un résidu citrulline, à charge neutre (Wang et al. 2009; Li et al. 2010). Cela provoque une perturbation au niveau des interactions ioniques entre les histones, normalement chargés positivement, et l'ADN, à charge nette négative, pour *in fine* provoquer la décondensation de cette dernière (Hamam and Palaniyar 2019).

2010. L'histoire de la NETose revient au Japon.

Pilsczek et collaborateurs décrivent un nouveau mécanisme de production de NETs induit par *S. aureus*, pendant lequel les neutrophiles relarguent de l'ADN en deux phases : d'abord il y a formation de vésicules intactes ; ensuite ces dernières éclatent pour libérer les filets de chromatine dans le milieu extracellulaire. Ce mécanisme, déjà décrit précédemment, est très rapide (5 à 60 min) et indépendante des DROs produits par la NADPH oxydase. D'ailleurs, ces auteurs ont suggéré pour la première fois l'implication de la LPV dans le mécanisme de formation de NETs induit par *S. aureus*, ce qui explique également les contradictions entre leurs résultats et l'étude menée par Fuchs et al. (Fuchs et al. 2007; Pilsczek et al. 2010). En effet, ces derniers auteurs avaient montré que *S. aureus* produisait une NETose NADPH oxydase-dépendante. Cependant, la production des facteurs de virulence exprimés par les souches de *S. aureus* différaient entre ces deux travaux scientifiques, puisque les conditions de culture utilisées pour les études de Fuchs et al. ne permettaient pas l'expression des mêmes toxines bactériennes retrouvées dans les expériences de Pilsczek (Konig and Andrade 2016).

2012. Quelques années plus tard, en 2012, Parker et collègues (Parker et al. 2012) analysèrent le rôle de la production de DROs pendant la formation des NETs suite à l'action du PMA, mais également de trois espèces bactériennes et de la **ionomycine**, se basant sur les études de Wang et collègues du 2009. Leur résultat définit que, alors que le PMA et les stimuli bactériens testés nécessitent l'activité de la NADPH oxydase, la ionomycine provoquait une NETose indépendante de la NOX2. Ce fut la première publication qui déclarait de façon générale que, à côté de la NETose classique, il pouvait en exister une forme alternative, la **NETose NOX-indépendante**. D'ailleurs, l'**activité de la MPO** est également remise en discussion par ces auteurs, qui en indiquent la participation uniquement dans la NETose induite par le PMA, et pas dans la NETose induite par les bactéries *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*. D'autres caractéristiques ont été listées au fur et à mesure que la recherche au sujet de la NETose s'enrichissait. En particulier, comme le PMA pour la NETose NOX-dépendante, le ionophore

calcique A23187 et le ionophore potassique nigéricine, d'origine bactérienne, sont les stimuli le plus utilisés et les mieux décrits pour la NETose NOX-indépendante (Neeli and Radic 2013; Kenny et al. 2017). Cependant, d'autres inducteurs de NETose NOX-indépendante ont été découverts : des complexes immuns (Van Avondt et al. 2013; Behnen et al. 2014; Deleon-Pennell et al. 2016), des parasites (Gabriel et al. 2011; Villagra-Blanco et al. 2017), le LPS et les plaquettes (Clark et al. 2007; von Brühl et al. 2012; Etulain et al. 2015; Park et al. 2016), le pH alcalin (de Souza et al. 2018), les UV (Azzouz et al. 2018), des levures (Byrd et al. 2013; Wu et al. 2019), les cristaux d'urate monosodique (UMS) (Chatfield et al. 2018), et d'autres stimuli chimiques, physiologiques ou pharmacologiques (Neumann et al. 2014; Douda et al. 2015a; Haase et al. 2016; Tatsiy and McDonald 2018; Hule et al. 2019), qui font l'objet de publications récentes.

Ces stimuli conduisent à un même type de NETose, même si des différences ont été remarquées parmi les voies de signalisation induites par chaque stimulus. Malgré ces différences, des caractéristiques communes sont souvent retrouvées : il s'agit d'un phénomène avec une cinétique normalement plus rapide, caractérisé par l'augmentation du calcium intracellulaire et la conséquente activation de l'enzyme PAD4. Cette dernière induit la citrullination retrouvée à l'histone H3, impliquant la mitochondrie comme source des DROs nécessaires au déroulement du processus NETotique. Ce mécanisme est indépendant de la voie de signalisation d'ERK, dépendant du canal potassique activé par le calcium SK3, et justement indépendante de la NADPH oxydase (Douda et al. 2015b; Sollberger et al. 2018b). D'ailleurs, tout comme la NETose NOX-dépendante, la NETose NOX-indépendante a été confirmée être un processus bien distinct par rapport à l'apoptose, la nécrose ou la nécroptose (Remijsen et al. 2011; Kenny et al. 2017), ne montrant pas d'induction d'expression de gènes *de novo* (Sollberger et al. 2016; Kenny et al. 2017). Malgré les études disponibles, la NETose NOX-indépendante reste à détailler, notamment concernant sa voie de signalisation commune.

1.2.2.3 L'étrange cas de la NETose : le Dr « Je-kill » de la réponse immunitaire, et le « Mr Hyde » des maladies inflammatoires et auto-immunes

Bien que la NETose ait été définie une nouvelle forme de réponse immunitaire innée, son caractère « sombre » commençait déjà à émerger, comme annoncé dans la discussion de l'article de Brinkmann et collaborateurs du 2004. En effet, dans la dernière ligne de cette section de la publication on peut lire que « *les NETs pourraient avoir également des effets délétères sur l'hôte,*

puisque l'exposition aux complexes d'histones dans le milieu extracellulaire pourrait avoir un rôle dans le développement de maladies auto-immunes, comme le lupus érythémateux systémique. ».

Effectivement un nombre croissant d'états pathologiques humains ont été reliés à la NETose depuis sa découverte. Ainsi, le rôle immunitaire du processus a été de plus en plus éclipsé par l'idée que la NETose puisse avoir un effet néfaste sur l'hôte, notamment dans deux situations : quand le processus est activé **de façon exagérée** ou quand les mécanismes qui permettent la **clairance des NETs sont défectueux**. En effet, une NETose induite de manière inappropriée a été reliée au développement de maladies inflammatoires, auto-immunitaires ou d'occlusion vasculaire, comme la thrombose.

La présence des NETs dans des tissus ou fluides biologiques suite à une perturbation immunitaire, ainsi que la tendance accrue à développer des infections chez des sujets avec une dérégulation du processus de NETose (*i.e.* les patients atteints de CGD), ont été les épreuves principales de la fonction antibactérienne et donc immunitaire de ce processus. En effet, dans un contexte de **pathologies respiratoires** causées par des infections bactériennes, virales ou fongiques, les NETs ont un rôle bénéfique contribuant à la viscosité du mucus au niveau des sécrétions pulmonaires et dans les expectorations, facilitant ainsi l'élimination des pathogènes des poumons (Bianchi et al. 2009; Hamaguchi et al. 2012; Cortjens et al. 2016). Dans des cas de mucoviscidose et de maladies pulmonaires obstructives chroniques, les NETs amélioraient les fonctions pulmonaires (Dicker et al. 2018). Le revers de la médaille en cas de pathologies pulmonaires est la participation des NETs à l'aggravation des infections dues à *Rhinovirus* chez des patients asthmatiques. Ils contribuent tout aussi négativement dans des pathologies telles que des lésions pulmonaires aiguës et dans le syndrome respiratoire aigu sévère (Caudrillier et al. 2012; Toussaint et al. 2017). Au niveau des **pathologies dentaires**, des défauts congénitaux des neutrophiles, provoquant une diminution d'efficacité de la NETose, sont liés au développement de périodontites, alors que chez des patients atteints de périodontites, mais ayant des neutrophiles normaux, la dégradation des NETs est moins efficace (Chen et al. 2013; Roberts et al. 2016; White et al. 2016). **Concernant l'œil**, la NETose a été décrite ayant un rôle protecteur vis-à-vis des infections bactériennes et fongiques au niveau de la cornée, dites kératites, mais elle peut également exacerber la pathologie et être impliquée dans des inflammations stériles, tel que la kératoconjonctivite sèche (Sonawane et al. 2012; Shan et al. 2014). Les **bactériémies** staphylococciques ont un pronostic positif grâce à l'action des NETs, qui deviennent de moins en moins efficaces avec l'âge, ce qui explique l'augmentation de bactériémies chez les sujets

plus âgés (Tseng et al. 2012; Yipp et al. 2012). La NETose a été également liée aux **lésions cutanées** psoriasiques puisque ces lésions présentent une sévérité accrue due aux NETs chez ces patients (Lin et al. 2011; Hu et al. 2016).

D'ailleurs, à cause de l'action mécanique des NETs, qui occupent un volume considérable dans l'espace extracellulaire, le phénomène de NETose est souvent lié à des **maladies d'occlusion vasculaire**, telles que la thrombose. Les NETs favorisent la formation de corps d'occlusion dans les vaisseaux sanguins par une augmentation de l'activation des plaquettes, de la coagulation et de la formation des thrombi (Fuchs et al. 2010; Kambas et al. 2012). En effet, la fonction des NETs vise à maintenir l'homéostasie, mais représente également un facteur ayant des conséquences pathologiques du fait d'une formation exagérée ou inappropriée. En plus, les NETs sont retrouvés dans des cas d'accidents cérébraux vasculaires (Hirose et al. 2014), de microangiopathies thrombotiques (Arai et al. 2013; Ramos et al. 2016), c'est-à-dire des conditions rares entraînant la formation rapide de thrombi au niveau des artérioles, d'athérosclérose (Borissoff et al. 2013) et de syndrome des antiphospholipides (SAPL), qui est une condition pathologique auto-immune présentant des manifestations thromboemboliques due à la présence d'auto-anticorps dirigés contre plusieurs protéines associées aux phospholipides (Yalavarthi et al. 2015). Pourtant la NETose n'est pas clairement impliquée dans la pathogénèse de ces quatre conditions, s'agissant probablement d'un événement indépendant ou consécutif. D'autres pathologies ont été liées à la NETose, comme l'occlusion du conduit pancréatique, causée par l'accumulation d'agrégats de NETs due à la présence d'ions bicarbonates, cristaux et pH altéré (Leppkes et al. 2016). *À contrario*, dans le cas de la goutte, les NETs semblent participer à la résolution de l'inflammation et à la prévention de la chronicisation de la maladie (Schauer et al. 2014).

Concernant une autre classe de pathologies multifactorielles, le **cancer** et la NETose ont été parfois associés, dépendamment du type de cancer et de l'organe intéressé. Ainsi dans le cas du cancer du sein, la formation de métastase semblerait être facilitée par le processus de NETose (Park et al. 2016). Également, la coagulation accrue présente dans certaines tumeurs malignes semble être due aux NETs (Levi 2016). En revanche, la thérapie anti-cancéreuse par moyen d'infection virales des tumeurs semble être efficace grâce aux fonctions des neutrophiles, où probablement la NETose joue un rôle positif en termes d'effet tumoricide (Breitbach et al. 2011).

Pendant le **sepsis**, les NETs montrent une fonction protectrice de l'hôte, puisque les patients présentant plus d'activité NETotique montraient plus de chance de survivre à cette complication

infectieuse, probablement en raison de l'activité antibactérienne des NETs (Park et al. 2017). Cependant, avec la progression de l'infection, les NETs ont été liés à des lésions pulmonaires et hépatiques (Saffarzadeh et al. 2012; Weber 2015).

« Last, but not least », quand on fait référence à la NETose on pense en premier lieu au lien existant entre ce processus et certaines **maladies auto-immunes**. En particulier, trois pathologies auto-immunitaires sont associées au phénomène de NETose : le lupus érythémateux systémique ou SLE, la polyarthrite rhumatoïde ou PR, et les vascularites associées aux anticorps anti-cytoplasme des neutrophiles ou AAV, dont la Granulomatose de Wegener (Niles et al. 1989; Gupta and Kaplan 2016). Ces trois conditions sont en effet caractérisées par la présence d'auto-anticorps dirigés contre différents composants des NETs. Ainsi pour le SLE, les patients présentent des anticorps anti-nucléosome (Wu et al. 2006), dans la PR les auto-anticorps sont dirigés contre les protéines citrullinées (Sebbag et al. 2004; Vincent et al. 2005) et dans les AAV il y a la présence d'auto-anticorps dirigés contre les composants principaux stockés dans les granules azurophiles des neutrophiles (Falk and Jennette 1988; Niles et al. 1989). Le développement de pathologies auto-immunes liées à la NETose est normalement attribué aux deux causes principales précédemment mentionnées au début de ce paragraphe : une **exagération de la production des NETs**, qui devient un processus incontrôlable, ou bien un **défaut de dégradation** et clearance des produits NETotiques. En effet, des défauts congénitaux des DNases ont été associés au développement de SLE pédiatrique, en raison de la diminution d'efficacité dans la dégradation du réseau de chromatine constituant les NETs (Yasutomo et al. 2001; Al-Mayouf et al. 2011). D'ailleurs, le processus qui lie la NETose à la production d'auto-anticorps « s'autoalimente », puisque la présence d'auto-anticorps anti-NETs inhibe la dégradation des NETs libres, en aggravant la pathologie (Hakim et al. 2010) et les complexes immunes, à leur tour, peuvent provoquer des séquelles, telles que la glomérulonéphrite (O'Sullivan et al. 2015). L'ADN extracellulaire d'origine nucléaire ou mitochondriale peut être oxydé et ainsi provoquer une réponse immunitaire impliquant l'interféron de type 1 et la production de DROs, ce qui montre qu'il existe un rapport entre NETose et réaction inflammatoire (Gehrke et al. 2013; Lood et al. 2016).

Néanmoins, deux aspects intéressants émergent des études liant la NETose à l'auto-immunité. Tout d'abord, des **anomalies au niveau de la NOX** empêchent la production des DROs à partir de ce complexe enzymatique, mais n'ont aucune influence sur les DROs produits à partir de la mitochondrie. Dans ce cadre de figure, non seulement la PR et la SLE ne sont pas limitées par l'absence d'activité de la NOX, mais au contraire **ces anomalies sont associées à l'aggravation**

des pathologies auto-immunes (Maicas et al. 2011; Campbell et al. 2012; Jacob et al. 2017; Kienhöfer et al. 2017). Le deuxième aspect suggère qu'une **activation pharmacologique de la NOX pourrait améliorer le SLE**, cependant cela reste un résultat obtenu **uniquement dans des modèles murins** (Kienhöfer et al. 2017). Ainsi, l'activité de la NOX serait inversement proportionnelle à la gravité des pathologies auto-immunes liées à la NETose.

En résumé, comprendre les mécanismes à la base de chaque « version » du processus NETotique est d'importance capitale afin de distinguer entre effet bénéfique et effet délétère du même phénomène. D'ailleurs, le fait que les voies de signalisation et les éléments qui caractérisent la NETose dépendent strictement du stimulus qui l'a induite a interrogé les scientifiques, les poussant à se demander si on ne devrait plutôt parler de phénomènes complètement distincts. Cette hypothèse et ses implications sont traités dans le prochain paragraphe.

1.2.2.4 « A Critical Reappraisal »

Le titre de ce paragraphe est tiré de celui d'un article qui a particulièrement attiré mon attention pendant ces années de thèse. Il s'agit d'un travail publié dans le journal « Frontiers in Immunology » dans la catégorie « Hypothesis and Theory » dont les auteurs sont Maximilian F. König et Felipe Andrade (König and Andrade 2016).

Ainsi, tout ce que je décrirai dans cette section va simplement donner une interprétation concernant la forme alternative de NETose NOX-indépendante que j'ai détaillée dans le paragraphe ci-dessus, tout en rajoutant des éléments intéressants apportés par les auteurs. En effet, étant donné qu'encore beaucoup d'incertitude se cèle derrière ce processus et ses multiples déclinaisons, je trouve important de prendre en considération les différents points de vue et les commentaires de la communauté scientifique.

L'étude de König et Andrade est focalisée en particulier sur **la citrullination des protéines** qui a lieu pendant la NETose. Tout d'abord, les auteurs ont considéré et contesté ce qui avait été précédemment décrit en 2009 par Wang et collaborateurs. Ces derniers auteurs indiquaient un lien universellement valable entre PAD4, citrullination et NETose. En effet, tout d'abord le ionophore calcique utilisé par Wang en 2009 pour étudier le phénomène de NETose provoque en réalité la citrullination d'un nombre élevé de protéines différentes, ce que Romero et collaborateurs ont défini être un phénomène d'« **hypercitrullination** » (Romero et al. 2013). Cependant, dans l'article de Wang *et al.* les auteurs se sont concentrés spécifiquement sur la

citrullination **des histones**, et pas des autres protéines. Ce choix a été fait probablement dans le but de trouver une explication à cette modification post-traductionnelle dans le contexte de la NETose. En effet, à l'époque, le lien entre production de DROs et décompactage de la chromatine était encore ambigu. Wang et collaborateurs ont donc émis l'hypothèse que l'activité de la PAD4, et la citrullination consécutive des histones, pouvaient représenter le « missing link » entre les DROs et le relâchement de la chromatine. Ainsi, d'après leur théorie les DROs auraient le rôle d'activer la PAD4, laquelle à son tour produirait la citrullination des histones et leur perte de charge positive ultérieure. Cela aurait donc rendu plus faible le lien entre l'ADN et les histones, permettant la décompaction de la chromatine. Toutefois, non seulement le mécanisme d'activation de la PAD4 produite par les DROs n'était pas clairement démontré, mais la PAD4 nécessite d'un environnement réducteur pour que son site actif reste disponible (Takahara et al. 1983; Damgaard et al. 2016). Ainsi, l'action d'oxydation des DROs **inactiverait** directement la PAD4, ce qui est exactement le contraire de ce qu'a affirmé Wang et collègues.

À tout cela, il est nécessaire de rajouter que la citrullination des histones, et plus généralement l'hypercitrullination de plusieurs protéines lors de la NETose, n'est pas un élément commun à tous les types de processus NETotiques déclenchés par les différents inducteurs. En effet, tout comme la contribution de la NADPH oxydase, l'enzyme PAD4, responsable de la citrullination, également appelée déimination, ne participe pas au processus de NETose *per se*.

Il s'agit d'une notion encore difficilement acceptée par les scientifiques, qui, surtout pendant les années suivant la découverte de la NETose, avaient tendance à simplifier de façon excessive un phénomène qui se révèle de plus en plus complexe.

Au soutien de cette théorie, il faut rajouter que le PMA produit une inhibition de l'activation de la PAD4 à travers l'action de la forme α de la kinase PKC (Neeli and Radic 2013). La PAD4 serait, au contraire activée par une voie différente, impliquant une forme alternative de PKC, la PKC ζ (Neeli and Radic 2013).

De plus, indiquer la citrullination comme marqueur de la NETose est une notion peu précise pour les raisons suivantes :

1. La citrullination des histones se produit généralement lors d'une **réactivation cellulaire** (Sharma et al. 2012; Slade et al. 2014), ce qui pourrait simplement être le miroir de l'état actif des hPMNs exposés à des stimuli.

2. Les histones sont citrullinées dans d'autres processus de mort cellulaire programmée, tels que **l'apoptose** (Tanikawa et al. 2012), mais inhibés pendant une NETose antimicrobienne *stricto sensu* (Neeli and Radic 2013).
3. Une citrullination importante couplée à l'extrusion de fibres de chromatine dans le milieu extracellulaire est retrouvée suite à l'action d'agents qui induisent une **perturbation de l'intégrité des membranes cellulaires**. Dans ce dernier cas, Konig et Andrade parlent d'une mort cellulaire non-NETotique, qu'ils appellent **Leukotoxic Hypercitrullination ou LTH**.
4. Les stimuli physiologiques qui entraînent l'augmentation de calcium intracellulaire ne sont **pas en mesure de reproduire l'augmentation de calcium induit par les ionophores calciques**. Cela pourrait signifier que le stimulus nécessaire pour induire l'hypercitrullination des protéines n'appartiendrait pas à une condition physiologique, mais plutôt à une condition pathologique. Cela montrerait également que la citrullination exacerbée est contrôlée par plusieurs facteurs, et réprimée en condition d'état physiologique normal.

En général, au fur et à mesure que les études sur la NETose s'accumulaient, les détails concernant les mécanismes impliqués dans la forme alternative du phénomène ont pu donner l'image de la NETose NOX-indépendante décrite précédemment. Globalement, ce processus, comparé à la NETose NOX-dépendante, montre des différences en ce qui concerne la **cinétique**, la source de **DROs**, la voie de signalisation des **kinases**, et présente des éléments typiquement liés à la brusque augmentation du **calcium** intracellulaire, dont l'activité de la PAD4, la citrullination des protéines et l'activation du canal SK3. Finalement, on pourrait supposer qu'il s'agisse d'au moins deux types de mort cellulaire morphologiquement similaires, avec deux implications biologiques distinctes.

Ce concept alternatif interromprait le raisonnement qui tend à lier trois facteurs : La NETose, la citrullination et certaines maladies auto-immunes, parmi d'autres pathologies humaines. Une nette bifurcation semble se créer : d'un côté la notion de **NETose**, antibactérienne, NOX-dépendante et « arme » faisant partie de notre système immunitaire, et de l'autre ce que Konig et Andrade appellent « **NETosis-mimics** », aux caractères plus défavorables. Il ne s'agit pas d'un simple problème de définition : le fait de distinguer un processus immunitaire nécessaire à notre

système de défense d'un phénomène pathologique permettrait d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles, sans de ce fait perturber un processus immunitaire physiologique.

En général, il est important de rajouter que dans l'article de König et Andrade, ces auteurs apportent un exemple très intéressant pour soutenir leur théorie. En effet, ils raisonnent sur les contradictions concernant la NETose provoquée par *S. aureus*. Comme on l'a décrit précédemment, tandis que Fuchs et collaborateurs démontrent une NETose **NOX-dépendante** provoquée par cette bactérie, Pilszczek et collègues montrent que les NETs induits par *S. aureus* sont particuliers et le mécanisme est **indépendant de la NADPH oxydase** (Fuchs et al. 2007; Pilszczek et al. 2010). La différence entre ces deux études repose sur les conditions de culture et sur la production de toxines opérée par *S. aureus*. Notamment, la souche de *S. aureus* ne produisant pas la LPV induirait plutôt la phagocytose, suivie par l'activation de la NADPH oxydase, puis la NETose NOX-dépendante. À *contrario* une souche exprimant la LPV pourrait avoir des effets différents, qui pourraient conduire à une NETose NOX-indépendante, comme démontré par Pilszczek et collègues. On commence ainsi à se rendre compte que la **Leucocidine de Pantone et Valentine** a une influence sur le type de NETose provoquée par *S. aureus*. Pour corroborer cette idée, König et Andrade ont mené une nouvelle expérience : ils ont étudié le spectre des protéines citrullinées suite à l'action de stimuli tels que le PMA, l'LPS, la ionomycine, l'A23187 et la LPV. Le profil des protéines citrullinées pour chaque stimulus donne deux résultats : le premier est une confirmation concernant l'absence de citrullination pour les stimuli non ionophores, le PMA et le LPS, le deuxième montre que le spectre de citrullination des protéines induites par les ionophores calciques était très proche de celui obtenu par une stimulation avec la LPV (Figure 23). En résumé, la LPV induit une hypercitrullination des protéines du neutrophile de différents poids moléculaires, ce qui pourrait également concerner des protéines non histoniques, telles que l'EN, la MPO ou d'autres protéines antimicrobiennes libérées lors de la NETose classique. Ce processus empêcherait la normale fonction antimicrobienne des facteurs relargués pendant la NETose, reflétant une **stratégie bactérienne** qui mime la NETose pour, en fait, s'en débarrasser. En plus, une des conséquences de la citrullination massive des protéines causées par la LPV pourrait être la formation des néoantigènes. En effet, dans le cas de la **Polyarthrite Rhumatoïde (PR)** les protéines citrullinées sont la cible principale de la réponse auto-immunitaire. Une hypercitrullination chronique causée par des toxines bactériennes pourrait être la source primaire de néoantigènes causant la production d'**anticorps ACPA (anticorps anti-protéines citrullinées)** présent chez les patients atteints de PR. Les auteurs suggèrent que, alors que la NETose NOX-dépendante est une réponse

immunitaire antimicrobienne, il existe un ou plusieurs processus ressemblants à la NETose, mais qui seraient des phénomènes distincts et impliqués dans des états pathologiques humains, tels que l'auto-immunité.

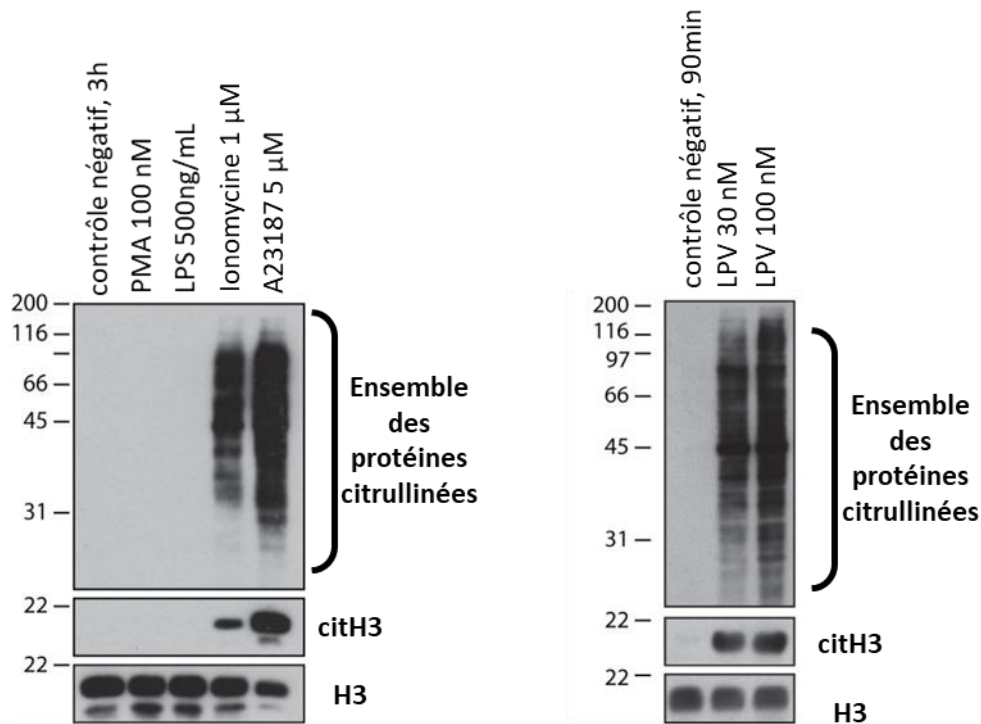


Figure 23- Des différents stimuli ont été testés pour analyser le niveau de citrullination général des protéines, dite hypercitrullination.

Analyse du niveau de citrullination des protéines de neutrophiles humains exposés à 100 nM de PMA, 500 ng/mL de LPS, 1 µM de ionomycine, 5 µM d'A23187 ou 30 et 100 nM de LPV. Les résultats montrent que le PMA et le LPS ne provoquent pas un niveau significatif de citrullination des protéines, alors que la ionomycine et la calcimycine (A23187), ainsi que la LPV, induisent la deimination d'une série de protéines de différents poids moléculaires. (Konig and Andrade 2016).

Dans tous les cas, que l'on adhère ou non à la théorie exposée par König et Andrade, cet article soutient l'existence d'une liaison entre la LPV produite par *S. aureus* et la NETose, qui cependant restait encore à démontrer de façon directe et univoque.

1.2.3 NETose et la LPV de *S. aureus* : « the butler did it ! »

« *Sola dosis facit venenum* » (C'est la dose seule qui fait le poison)

Paracelse (1493-1541)

Le lien de causalité entre la production de LPV et le déclenchement de la NETose des neutrophiles humains était, au fur et à mesure, de plus en plus flagrant. Comme dans un roman policier, le coupable a toujours été sous notre nez, ou mieux *dans* notre nez, en l'occurrence.

Pourtant, deux facteurs principaux ont créé des perplexités autour des différents éléments impliqués dans ce mécanisme, ce qui a retardé le raisonnement qui aurait directement relié la LPV à la NETose : d'un côté les contradictions par rapport à *S. aureus* et le type de NETose qui en résulte, conjointement à la confusion de base concernant la définition de NETose en elle-même. En effet, la tendance à indiquer en tant que processus de NETose toute conséquence cellulaire impliquant la libération de chromatine dans l'espace extracellulaire a rendu moins facile la distinction entre NETose et d'autres processus lytiques. De l'autre côté, la longue histoire scientifique de *S. aureus* et de ses facteurs de virulence, décrite dans les chapitres précédents, souligne comment les leucotoxines staphylococciques auraient une et une seule fonction principale : lyser rapidement les leucocytes. Pourtant, bien que la mécanistique à la base d'une telle activité membranolytique soit fascinante, les points faibles des études *in vitro* conduites par les différentes équipes de recherche, reposent sur des conditions expérimentales différentes. Notamment, concernant les conditions expérimentales, certains éléments n'étaient pas suffisamment considérés : la concentration de calcium dans le milieu extracellulaire, mais également la **dose des toxines** appliquées, voire leur **qualité**. Ainsi, alors qu'à fortes doses (200nM) la LPV induit une nécrose par lyse cellulaire directe des hPMNs, et à des doses plus faibles (5nM) elle provoquerait plutôt une apoptose précoce (Genestier et al. 2005), l'impact de concentrations inférieures et sublytiques de cette même leucocidine reste à définir. Cependant, il faut souligner que les résultats de nombreuses études précédemment publiées ont été obtenues par l'utilisation d'une forme de LPV recombinante via un système His-tag. Pourtant, cette forme de la LPV est 5 à 10 fois moins active que la leucotoxine obtenue à travers un système par fusion de la protéine à la GST. Cette dernière forme de LPV serait la seule comparable à une toxine native (Baba Moussa et al. 1999; Genestier et al. 2005).

D'ailleurs, plusieurs études ont suggéré que la concentration de LPV *in vivo* n'atteint que rarement des doses suffisamment élevées pour provoquer un effet cytotoxique, suggérant ainsi

un rôle additionnel pour cette leucotoxine, allant au-delà de la « simple » lyse des cellules cibles (Badiou et al. 2008; Graves et al. 2010).

Effectivement, une étude datant 2012 a montré que les conséquences cellulaires ne sont pas les mêmes en présence de **concentrations sublytiques de la leucocidine**, qui, à faible dose, induit plutôt une réponse immunitaire par la stimulation des hPMNs (Graves et al. 2012). Cependant, les auteurs de cette étude en déduisent qu'une dose sublytique de la LPV est un facteur qui améliorerait la réponse immunitaire innée de l'hôte, en raison d'une série de conséquences cellulaires, comme par exemple la redistribution subcellulaire des composés de la NADPH oxydase, entre autres. D'ailleurs, ces auteurs ont montré que pour des faibles concentrations de la LPV, de l'ordre du nM, la libération de LDH n'était pas significative, ce qui excluait une lyse cellulaire pour des temps inférieurs à 3h d'incubation avec une telle concentration de toxine. Néanmoins, la LPV à ces faibles doses provoque le relargage des différentes molécules impliquées dans l'inflammation, dont la MPO, et montre une augmentation de l'expression du récepteur CD11b, impliqué dans la fusion des granules intracellulaires avec la membrane plasmique.

En complément, Malachowa et collègues en 2013, ont montré qu'une autre leucotoxine de *S. aureus*, LukAB (ex LukGH), **en concentration sublytique** induit une NETose des hPMNs qui, étonnamment, piège, mais n'entraîne pas la mort de la bactérie (Malachowa et al. 2013).

Ces éléments, rajoutés aux découvertes publiées par Pilszczek et collaborateurs, qui indiquent une forme alternative de NETose (ou de formation de NETs) induite par des souches de *S. aureus* LPV⁺, ont jeté les bases du travail effectué pendant les années de ma thèse.

Toutefois, en juillet 2018, vers la fin de notre travail de recherche sur la LPV et la NETose, l'équipe de recherche de Bhattacharya et collaborateurs a publié un article affirmant que *S. aureus* organisé en biofilm pouvait produire des leucotoxines afin d'induire la NETose et vraisemblablement s'évader de la réponse immunitaire des hPMNs (Bhattacharya et al. 2018). Ces auteurs ont démontré que la LPV, uniquement par coopération avec la γ -hémolysine AB, était à la base du processus NETotique initié par *S. aureus* en forme sessile, ayant pour but d'empêcher la clearance du biofilm opérée par les hPMNs et permettant ainsi la persistance de la bactérie dans des infections chroniques. Cependant, ces auteurs parviennent à leurs conclusions sur la base de données expérimentales discutables. En effet, bien que les toxines stimulant les hPMNs *in vitro* sont exprimées dans le milieu de culture du clone de *S. aureus*

USA300 en biofilm, les résultats des analyses en *Western blot* et en spectrométrie de masse publiés par les auteurs montrent, étrangement, la seule présence de la sous-unité F, LukF-PV, de la LPV. Sans s'attarder non plus sur les masses moléculaires, et quoique les deux sous-unités soient normalement co-transcrites, cette donnée reste un point d'interrogation, notamment si l'on relie ces aspects aux résultats obtenus par les auteurs, qui affirment que la LPV seule n'est pas en mesure d'induire la NETose, nécessitant la co-présence de la HlgAB pour déclencher un niveau significatif du phénomène. D'ailleurs, les hPMNs sont stimulés par l'usage du milieu de culture épuisé des souches mutantes du clone USA300, délétées des gènes correspondant aux différentes leucotoxines. Les conséquences cellulaires des neutrophiles ainsi stimulés sont ensuite comparées à celles des cellules incubées dans le milieu des souches « Wild-type ». Ce procédé indirect, par contre, risque de ne pas tenir compte des différents éléments présents dans un milieu de culture dépourvu des leucotoxines de choix, ce qui risque de conduire à des interprétations erronées. Enfin, bien que les auteurs aient utilisé des anticorps primaires dirigés contre des « marqueurs » de NETose, tels que l'histone H3 citrullinée citH3, dont la spécificité en tant que marqueur de NETose a été discutée précédemment, mais également des anticorps anti-MPO et anti-EN, les images correspondantes au phénomène de NETose ne montrent pas les fibres de chromatine typiquement retrouvés dans la dernière étape de la NETose. En effet, les hPMNs marqués par les anticorps possèdent une morphologie plutôt ronde, n'indiquant une NETose que du fait de leur positivité à la fluorescence liée aux anticorps spécifiques. De plus, le marquage d'EN ne semblerait pas complètement confirmer les résultats correspondant aux marquages de la MPO et de la citH3, une « anomalie » qui n'est ni citée, ni discutée ultérieurement dans ledit article. La conclusion proposée par les auteurs est que l'activité cumulative de la LPV et de la HlgAB est nécessaire pour induire la NETose médiée par *S. aureus* organisé en biofilm.

Inversement, la « conclusion » que nous proposons est qu'une analyse directe des conséquences de la LPV purifiée en contact avec des hPMNs, dans un milieu très proche des conditions physiologiques, résulte encore plus urgente, afin d'éliminer toute confusion due à l'apport d'une série variable d'éléments biologiques propres à *S. aureus*.

1.3 OBJECTIFS DE LA THÈSE

Les informations d'intérêt majeur concernant la LPV et/ou la NETose au début de ce travail de thèse et les questions auxquelles ce travail a essayé d'apporter une réponse, pourraient se résumer en trois axes principaux :

1. **La LPV et la HlgCB, en concentration et condition de culture reflétant une situation infectieuse *in vivo*, ont des conséquences cellulaires différentes et ne forment pas de pore à la membrane plasmique des hPMNs.** Les Docteurs Mira Tawk et Gaëlle Zimmermann-Meisse ont abouti à ces résultats durant leurs doctorats. Tawk a travaillé sur la perméabilité membranaire des cellules en contact avec la LPV et la HlgCB purifiées et aux compartiments intracellulaires mobilisés spécifiquement par ces deux toxines, et ce en présence de 1 mM de Ca^{2+} extracellulaire ; Zimmermann-Meisse, dans les mêmes conditions expérimentales, s'est focalisée plutôt sur l'internalisation de la LPV et de HlgCB et sur l'apoptose précoce touchant, pourtant, un pourcentage limité des hPMNs exposés à la LPV. Ces deux auteurs ont pu enrichir la littérature scientifique en apportant leur contribution à propos des différences entre ces deux leucotoxines de *S. aureus*, tout en confirmant l'absence de formation d'un pore à la membrane plasmique. Ainsi, la famille des « pore-forming toxins » pourrait bientôt nécessiter une mise à jour en termes de définition.

La question à laquelle cette thèse a voulu répondre : Est-ce que la LPV et/ou la HlgCB à faibles concentrations provoquent une NETose chez la majorité des hPMNs testés, ou la LPV se comporte encore une fois de façon différente de HlgCB ?

2. **La LPV induit une perméabilisation membranaire significative uniquement après 6 heures d'incubation avec les hPMNs, contrairement à HlgCB.** En absence d'apoptose remarquable pour des concentrations de LPV égales ou inférieures au nM (environ 30% des hPMNs après 6h), la perméabilité membranaire décrite par Zimmermann-Meisse en 2016 suggérait effectivement une NETose, un processus que, comme on l'a décrit dans le chapitre précédent, peut se manifester sous des formes alternatives et dépendantes du stimulus. D'autre part, des éléments comme la libération massive du calcium intracellulaire à partir du réticulum endoplasmique, la production de DROs, la localisation lysosomale de la toxine après environ 20 min d'incubation et les changements

morphologiques des hPMNs qui se résolvent en la perméabilisation de la membrane plasmique à 6h, nous ont poussé à détailler le processus initié par la LPV.

Question à laquelle cette thèse a voulu répondre : Est-ce que la LPV provoque une NETose NOX-dépendante ou un processus dépendant d'une autre source de DROs ? Quels sont les particularités et les éléments en jeu dans ce processus ? Comment l'inhiber ?

3. **Un des travaux précédents sur la LPV affirmait que à 5nM cette toxine provoque une apoptose précoce passant par la voie mitochondriale** (Genestier et al. 2005). Les auteurs ont décrit des changements morphologiques typiques de l'apoptose, parmi lesquels l'on retrouve l'aspect arrondi du noyau et plus généralement de la cellule, et une perte de l'intégrité de la membrane nucléaire pour 80% des cellules, qui parallèlement, montrent une intégrité de la membrane plasmique. D'ailleurs, cette étude s'est focalisée sur la mitochondrie, dont le potentiel transmembranaire est altéré. Cette donnée a ensuite été confirmée par Zimmerman-Meisse et collègues par l'application de plus faible concentrations de la LPV (≤ 1 nM), se basant sur les constantes de dissociation (K_d) de la toxine sur les hPMNs.

La question à laquelle cette thèse a voulu répondre : Est-ce que la LPV pourrait effectivement se localiser à la mitochondrie ? Un pore pourrait-il donc se former au niveau de cet organe ? Quelle voie de signalisation pourrait être activée ? Quels sont les événements parallèles ?

Ainsi ce manuscrit sera organisé comme il suit :

1. Études des marqueurs de la NETose présents chez les hPMNs à différents temps d'incubation avec la LPV et HlgCB à des concentrations ≤ 1 nM. Développement d'une méthode de quantification et évaluation statistique.
2. Définition des sources de DROs impliqués dans le processus de NETose de la LPV et effet des inhibiteurs.
3. Comparaison des voies de signalisation et des kinases impliquées dans le processus et dans la NETose provoquée par le PMA, étude et analyse de la signification biologique de la citrullination provoquée par la LPV, et suivi de l'internalisation de la leucotoxine à la mitochondrie.

2 MATERIELS ET METHODES

2.1 Préambule

Les conditions expérimentales *in vitro* ont été sélectionnées sur la base des expériences précédemment menées par Mira Tawk et Gaëlle Zimmermann-Meisse, qui ont d'abord utilisé le tampon EGTA pour leurs expériences avec les polynucléaires neutrophiles. Cependant, ce tampon ne contient pas de calcium, un ion indispensable pour le processus **d'endocytose**. En effet, il a été remarqué que l'utilisation d'EGTA n'était pas adaptée pour étudier l'action des leucotoxines staphylococciques, qui en effet produisaient des conséquences cellulaires bien différentes. L'ajout d'1mM de calcium dans ce tampon montrait toutefois une mortalité cellulaire accrue, après environ 2h d'incubation. Ainsi, un tampon à composition plus proche des conditions physiologiques a été introduit, le Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) additionné de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) ou de 0,5% d'albumine de sérum bovin (BSA), les deux utilisés pour refléter les nutriments et les facteurs de croissance naturellement présents dans le sang humain (Moore et al. 1967). Le choix de la BSA pour remplacer le SVF dans les expériences d'épifluorescence est réalisée uniquement dans le but de faciliter l'adhésion cellulaire des hPMNs aux boîtes de Pétri dans lesquelles ils seront observés.

2.2 SOLUTIONS ET TAMPONS PRÉPARÉS AU LABORATOIRE

2.2.1 PURIFICATION ET CULTURE DE NEUTROPHILES HUMAINS

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

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

TAMPON HBSS-HEPES 20 mM : 1,3 mM CaCl_2 , 0,5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,4 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5,4 mM KCl, 0,4 mM KH_2PO_4 , 4,2 mM NaHCO_3 , 138 mM NaCl, 0,4 mM Na_2HPO_4 , 5,6 mM D-Glucose, 20 mM HEPES, pH 7,4

2.2.2 PURIFICATION DES TOXINES BACTERIENNES

Pour la purification des composés de la LPV nous utilisons deux types de tampons : des tampons pour la **chromatographie d'affinité** et des tampons pour la **chromatographie à échange d'ions**.

Chromatographie d'affinité : pour la sous-unité S et F les tampons sont les mêmes.

TAMPON A : HEPES 20mM, NaCl 150mM, EDTA- Na_2 1mM, pH 7,2 (NaOH)

TAMPON B : Tris Base 50 mM, GSH 30 mM, NaCl 500 mM, pH 8 (HCl)

TAMPON C : NaH_2PO_4 30 mM, NaCl 2 M, pH 6,5 (NaOH)

Chromatographie à échange d'ions : pour la sous-unité S et F les tampons ne sont pas les mêmes, en raison de leur comportements différents en chromatographie à échange de cations.

TAMPON D (LukS-PV) : HEPES 50mM, NaCl 50mM, pH 7,5 (NaOH)

TAMPON E (LukS-PV) : HEPES 50mM, NaCl 1 M, pH 7,5 (NaOH)

TAMPON D (LukF-PV) : MES 30 mM, pH 6,3 (NaOH)

TAMPON E (LukF-PV) : MES 30 mM, NaCl 1 M, pH 6,3 (NaOH)

2.2.3 WESTERN BLOT

TAMPON DE MIGRATION : TRIS-glycine-SDS solution tampon (tampon TGS) (#1610772, Bio-Rad, Hercules, Californie, États-Unis) dilué dans de l'eau ultrapure ddH₂O pour obtenir une concentration 1x.

TAMPON DE TRANSFERT : 25 mM tris(hydroxyméthyl)aminométhane (TRIS), 192 mM glycine, pH 8,3 et 20% méthanol (v/v).

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

TAMPON DE LYSE : Tampon RIPA avec 0,2% de Triton X-100 (v/v) additionné de Protease Inhibitor Cocktail cOmplete™ (11697498001, Roche, Bâle, Suisse), NaVO₃ (1 mM), leupeptine (25 µM), pepstatine (25 µM), aprotinine (25 µM), NaF (25 mM), levamisole (1 mM), PMSF (1 mM) et un inhibiteur de phosphatases (P5726, Sigma–Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France).

TAMPON DE CHARGE : 4× loading buffer avec 10% (v/v) de β-mercaptoethanol, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, leupeptine (10 µg/mL), pepstatine (10 µg/mL), aprotinine (10 µg/mL), NaF (10 mM), NaVO₃ (5 mM), and levamisole (1 mM).

TAMPON DE BLOCAGE : PBS x1 + 5% de lait écrémé en poudre (LEC).

TAMPON DE DILUTION : PBS Tween à 0.05%+ 1% BSA en poudre.

2.2.4 IMAGERIE

TAMPON DE BLOCAGE : HBSS avec 5% SVF(v/v), 4,6% BSA 100mg/mL.

TAMPON DE DILUTION : HBSS avec 4,6% SVF(v/v), 0,9% BSA 100mg/mL (p/v).

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

FIXATEUR : 16% paraformaldéhyde (PFA), 4% dans le milieu de culture des hPMNs.

2.3 ANTICORPS PRIMAIRES UTILISÉS

NOM COMMERCIAL	CIBLE	TYPE et ANIMAL HÔTE	CONCENTRATION FINALE	RÉFÉRENCES	EXPÉRIENCE ET BUT
Anti-neutrophil elastase	Élastase du neutrophile	Polyclonal de lapin	1 µg/mL	ab21595, Abcam, Cambridge, UK, RRID:AB_446409	Épifluorescence, Évaluation des NETs
anti-Myeloperoxidase	myéloperoxydase	Monoclonal de lapin	1 µg/mL	ab25989, Abcam, Cambridge, UK, RRID:AB_448948	Épifluorescence, Évaluation des NETs
anti-Histone H3 (citrulline R2 + R8 + R17) antibody - ChIP Grade	Histone H3 citrullinée (ou deiminée)	Polyclonal de lapin	1 µg/mL	ab5103, Abcam, Cambridge, UK, RRID:AB_304752	Épifluorescence, Évaluation des NETs
anti-GAPDH	GADPH	Polyclonal de lapin	1:10000	G9545, RRID:AB_796208, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France	Western blot, « loading control », afin de vérifier que des concentrations égales en protéines sont chargées dans le gel.
Anti-phospho-Erk1/2 (Thr202/Tyr204, Thr185/Tyr187) Antibody, recombinant clone AW39R	ERK kinases 1 et 2 phosphorylées	Monoclonal lapin	1:1000	05-797R, RRID:AB_1587016, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France	Western blot, évaluation de la phosphorylation de la kinase ERK
Anti-phospho Akt (ser 473)	Akt kinase phosphorylée	Monoclonal lapin	1:1000	#9271, RRID:AB_329825 Cell Signaling Technologies, Danvers, Massachusetts, USA	Western blot, évaluation de la phosphorylation de la kinase Akt
Anti- Phospho-Src Family (Tyr416)	La famille des kinases Src phosphorylées	Polyclonal lapin	1:1000	#2101, RRID:AB_331697, Cell Signaling Technologies, Danvers, Massachusetts, USA	Western blot, évaluation de la phosphorylation des kinases Src
anti- LC3B	LC3A et LC3B sont les deux ciblés par cet anticorps.	Polyclonal lapin	1:1000	L10382, Invitrogen™, Waltham, Massachusetts, USA	Western Blot, évaluation de l'autophagie cellulaire. La distinction des deux formes de la protéine LC3 est faite sur la base de leur poids moléculaires.
Anti-LukS-PV F(ab')²	Sous-unité S de la LPV	Polyclonal, lapin	1 µg/mL	Produit à l'Institut de Bactériologie de Strasbourg par Daniel Keller	Microscopie confocale, localisation de la LPV.
Purified Mouse Anti-Cytochrome c, Clone 6H2.B4	Cytochrome C (mitochondrie)	Monoclonal, souris	1:100	556432, BD Pharmingen™, San Diego, CA, USA	Microscopie confocale, localisation des mitochondries

Tableau 1- Anticorps primaires utilisés

2.4 ANTICORPS SECONDAIRES UTILISÉS

NOM COMMERCIAL	CIBLE ET FLUOROCHROME	TYPE et ANIMAL HÔTE	CONCENTRATION FINALE	REFERENCES	EXPERIENCE ET BUT
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody Alexa Fluor® 488 conjugate	Anticorps primaire de lapin, Alexa Fluor® <u>488</u>	Polyclonal de chèvre	2 µg/mL	A-11034, RRID:AB_2576217, Invitrogen™, Waltham, Massachusetts, USA	Épifluorescence, Évaluation des NETs
Goat anti-Mouse IgM (Heavy chain) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor® 555 conjugate	Anticorps primaire de souris, Alexa Fluor® <u>555</u>	Polyclonal de chèvre	2 µg/mL	A-21426, RRID:AB_2535847, Invitrogen™, Waltham, Massachusetts, USA	Épifluorescence, Évaluation des NETs
F(ab') ₂ Goat anti-Rabbit IgG-F(ab') ₂ Fragment cross-adsorbed Antibody DyLight® 594 Conjugated	Anticorps primaire de lapin, DyLight® <u>594</u>	Polyclonal de chèvre	2 µg/mL	A120-212D4, RRID:AB_10698092, Souffelweyersheim, France	Microscopie confocale, localisation de la LPV
Donkey F(ab') ₂ Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488) preabsorbed	Anticorps primaire de souris, Alexa Fluor® <u>488</u>	Polyclonal d'âne	2 µg/mL	ab181289, RRID:AB_2813900, Abcam, Cambridge, UK	Microscopie confocale, localisation de la mitochondrie

Tableau 2- Anticorps secondaires utilisés

2.5 SONDES FLUORESCENTES

NOM COMMERCIAL	LONGUEUR D'ONDE	CONCENTRATION FINALE	REFERENCES	EXPERIENCE ET BUT
Dihydrorhodamine 123 (DHR123)	Le DHR123 est analysé dans le canal Vert (525/30 nm)	10 µM	CAS No. 109244-58-8, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA	Cytométrie en flux, Évaluation DROs cytosoliques
MitoSOX™ Red mitochondrial superoxide indicator	Le MitoSOX est analysé dans le canal Jaune (583/26 nm)	2.5µM	M36008, Molecular Probes, Eugene, OR, USA	Cytométrie en flux, Évaluation DROs mitochondriaux (mtROS)
Hoechst dye 32258	Le Hoechst est analysé dans le canal bleu (UV) entre 460-490 nm.	10 µg/mL	94403, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Épifluorescence, Évaluation ADN et nuclei
DAPI	Le Hoechst est analysé dans le canal bleu (440/40 nm)	1 µg/mL	D9542, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Microscopie confocale, Évaluation ADN et nuclei

Tableau 3- Sondes fluorescentes

2.6 INDUCTEURS ET INHIBITEURS PHARMACHOLOGIQUES

NOM COMMERCIAL	PRE-INCUBATION AVEC LES hPMNs	CONCENTRATION FINALE	REFERENCES	EXPERIENCE ET BUT
Phorbol 12-myristate 13-acetate	Pas de pré-incubation.	50 nM	P8139, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Épifluorescence, cytométrie en flux, western blot. Utilisé en tant qu'inducteur de NETose NOX-dépendante.
Calcymicine ou A23187	Pas de pré-incubation.	25 µM	C7522, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Épifluorescence, western blot. Utilisé en tant qu'inducteur de NETose NOX-indépendante.
Diphenyleneiodonium chloride ou DPI	30 min avant l'application des stimuli	20µM	D2926, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Épifluorescence, inhibition de la NADPH oxydase
2,4-Dinitrophenol ou DNP	1h avant l'application des stimuli	750µM	D198501, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Épifluorescence, Cytométrie en flux, découplant de la mitochondrie. Inhibition de la production des DROS mitochondriaux (mtROS)
Allopurinol	30 min avant l'application des stimuli	2mM	A8003, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Épifluorescence, inhibition de la xanthine oxydase (XO)
Myeloperoxidase Inhibitor-I	30 min avant l'application des stimuli	100µM	sc204107, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA	Épifluorescence inhibition irréversible et spécifique de l'activité de la myéloperoxydase (MPO), également appelée ABAH
SK inhibitor NS8593 hydrochloride	30 min avant l'application des stimuli	100µM	CAS No. 875755-24-1, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA	Épifluorescence, évaluation du rôle du canal SK3. Il s'agit d'un inhibiteur réversible du canal au potassium active par le calcium SK3. Cet inhibiteur diminue la sensibilité du canal au calcium.
CI-Amidine (trifluoroacetate salt)	15 min avant l'application des stimuli	200µM	CAS No. 1043444-18-3, Cayman Chemicals, Ann Arbor, Michigan, USA	Épifluorescence, évaluation du rôle des enzymes Protein Arginine Deiminases (PADs). Il s'agit d'un inhibiteur de PADs.
4-amino-5-(4-methylphenyl)-7-(t-butyl) pyrazolo[3,4-d]- pyrimidine (PP1)	30 min avant l'application des stimuli	5µM	CAS No. 172889-26-8, Cayman Chemicals, Ann Arbor, Michigan, USA	Épifluorescence, évaluation de la voie de signalisation en aval du CD45. I s'agit d'un inhibiteur puissant, mais réversible de la famille des Src kinases.
4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine (PP2)	30 min avant l'application des stimuli	10µM	P0042, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Épifluorescence, évaluation de la voie de signalisation en aval du CD45. I s'agit d'un inhibiteur puissant et irréversible de la famille des Src kinases.

Tableau 4- Inducteurs et inhibiteurs pharmacologiques

2.7 TECHNIQUES EMPLOYÉES

2.7.1 Purification des neutrophiles humains

Afin de vérifier l'effet des leucotoxines staphylococciques, nous avons besoin d'obtenir un pourcentage le plus pur possible de neutrophiles humains. Ainsi, pour les expériences *in vitro* nous avons toujours utilisé des neutrophiles humains issus de concentrés sanguins dénommés « buffy coats ». En effet, grâce à une convention de cession avec l'Établissement Français du Sang de Strasbourg (EFS), nous avons eu accès à des prélèvements sanguins effectués moins de 24 heures avant le début de nos expériences. Ce détail est très important si l'on pense à la durée de vie limitée des neutrophiles humains, dont on a discuté dans l'introduction.

Une fois obtenu le buffy coat contenant environ 40/50 mL, nous avons procédé à l'isolement des hPMNs par séparation sur gradient de Ficoll. Le milieu de séparation des lymphocytes Ficoll® a une densité = $1,077 \pm 0,001$ et permet de séparer les lymphocytes et monocytes, qui forment un anneau opaque surnageant au-dessus du Ficoll. Au contraire, les hPMNs et les érythrocytes se retrouvent dans le culot après la centrifugation. Le principe de séparation se base sur les différentes densités des cellules et du Ficoll.

Pour obtenir cette séparation initiale, le buffy coat est dilué avec environ 80 mL d'eau physiologique (NaCl 0,9%). Après une phase de mélange à la pipette, environ 30 mL du buffy coat ainsi dilués sont déposés sur 12 mL de gradient de Ficoll, préalablement déposés au fond d'un tube de 50 mL. Quatre tubes de 50 mL sont prévus à cet effet afin d'utiliser tout le volume du buffy coat. Ensuite, une centrifugation à une vitesse de $800 \times g$ est effectuée pendant 20 min, ayant soin de ne pas provoquer de mouvements brusques, soit sans frein de centrifugeuse. La différence avant-après est illustrée dans les photos de la Figure 24.

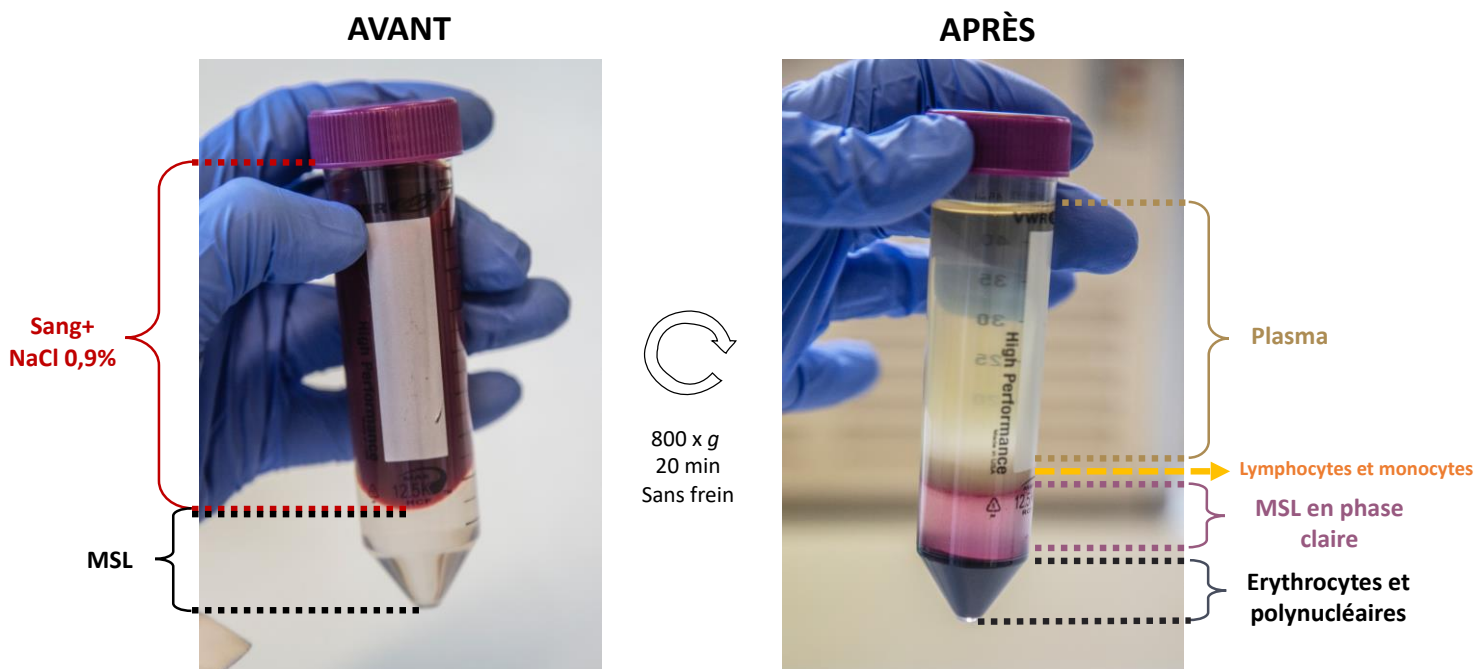


Figure 24- Séparation sur gradient de Ficoll.

Expérience menée au laboratoire, EA7290, suivant les indications du site Eurobio :

http://www.eurobio.fr/milieux-de-separation-des-lymphocytesmsl-xsl-269_664_356_367.html

On obtient donc une séparation partielle grâce à cette première centrifugation et au gradient de Ficoll. En effet, il est nécessaire de récupérer le culot, par aspiration du surnageant, effectuée avec une pompe à vide. Ensuite, 30 mL de Tampon NaCl 0,9% sont rajoutés à chacun des tubes, en veillant à utiliser des tampons et solutions maintenus à température ambiante (TA), pour éviter tout choc thermique. En dernier, 10 mL de Dextran 6% (p/v) sont rajoutés, avant de mélanger par inversion le contenu de chaque tube par des mouvements délicats afin de préserver les cellules en état optimal. Une fois que le mélange est homogène, les tubes sont laissés en position verticale et à TA pendant 30 min. Cette phase permet au Dextran de se lier aux érythrocytes et former un culot, alors que les hPMNs sont majoritairement retrouvés dans le surnageant, qui apparaît effectivement plus clair suite à la sédimentation des globules rouges. À l'aide d'une pipette, le surnageant est prélevé et déposé dans des nouveaux tubes et centrifugé à 1700 x g pendant 6 min. Le culot est à nouveau récupéré et remis en suspension par l'ajout de 500 µL de tampon NaCl 0,9%. L'étape suivante prévoit l'élimination des érythrocytes résiduels par choc osmotique : 18 mL d'eau MilliQ (ddH₂O) sont rajoutés à chaque tube pendant 45 sec pour provoquer la lyse des érythrocytes. Ensuite, 2 mL de tampon NaCl 9% sont rajoutés, afin de rééquilibrer l'osmolarité initiale et arrêter ainsi le choc. Les tubes sont à nouveau centrifugés à 1700 x g pendant 6 min et

le culot est remis en suspension par l'ajout de 500 μ L de tampon EGTA dans le but d'effectuer un dernier lavage des cellules isolées. Ce dernier tampon est tout de suite écarté grâce à une nouvelle centrifugation à 1700 x *g* pendant 6 min et le culot est remis en suspension dans le milieu de culture finale : le tampon RPMI supplémenté soit de 10% de SVF préalablement décomplémenté, soit de 0,5% de BSA (Figure 25). Pour les expériences de cytométrie, le tampon RPMI sans Phenol Red (Rouge de phénol) remplace le RPMI classique. Les cellules sont laissées en contact avec le milieu de culture à TA pendant une heure. Ensuite, les cellules sont observées au microscope avec le double but d'en faire une première évaluation qualitative sur la base de leur forme, et d'en effectuer le comptage. *In fine*, la concentration cellulaire est calculée et ajustée selon l'expérience à mener.

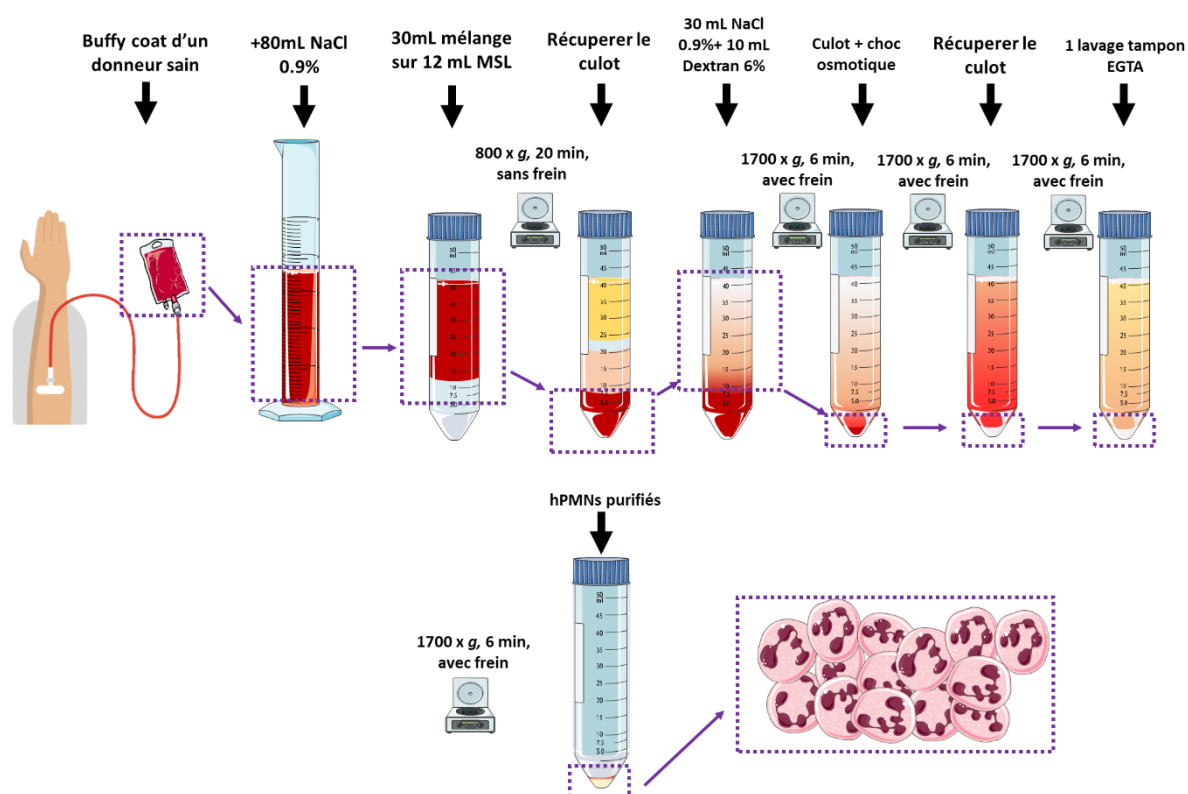


Figure 25- Protocole d'isolement des hPMNs à partir d'un buffy coat.

2.7.2 Expression et purification des leucotoxines

Principe : Les leucotoxines de *Staphylococcus aureus* ne sont plus produites à partir d'une souche sauvage, en raison de la difficulté à distinguer l'apport de chacun des composés S et F au niveau des conséquences cellulaires, et de la présence de contaminations. Par conséquent, au sein de l'EA7290 la méthode d'expression et purification prévoit l'utilisation de la souche *E. Coli*

BL21, très adaptée à la synthèse protéique, qui est transformée par l'utilisation d'un plasmide, le **pGEX-6P-1** (Figure 26). Ce plasmide présente une cassette de clonage qui présente en 5' la séquence exprimant la glutathion-S-transférase ou GST, suivie par la séquence de la sous-unité S ou F de chaque leucotoxine. Ainsi, la GST et l'insert sont co-transcrits et co-traduits en une protéine de fusion qui sera utilisée pour la première étape de purification de la protéine d'intérêt. D'ailleurs, cette construction plasmidique présente également le gène *Amp^R*, codant pour la résistance à l'antibiotique ampicilline. Cet outil est exploité pour sélectionner uniquement les souches d'*E. coli* présentant le plasmide.

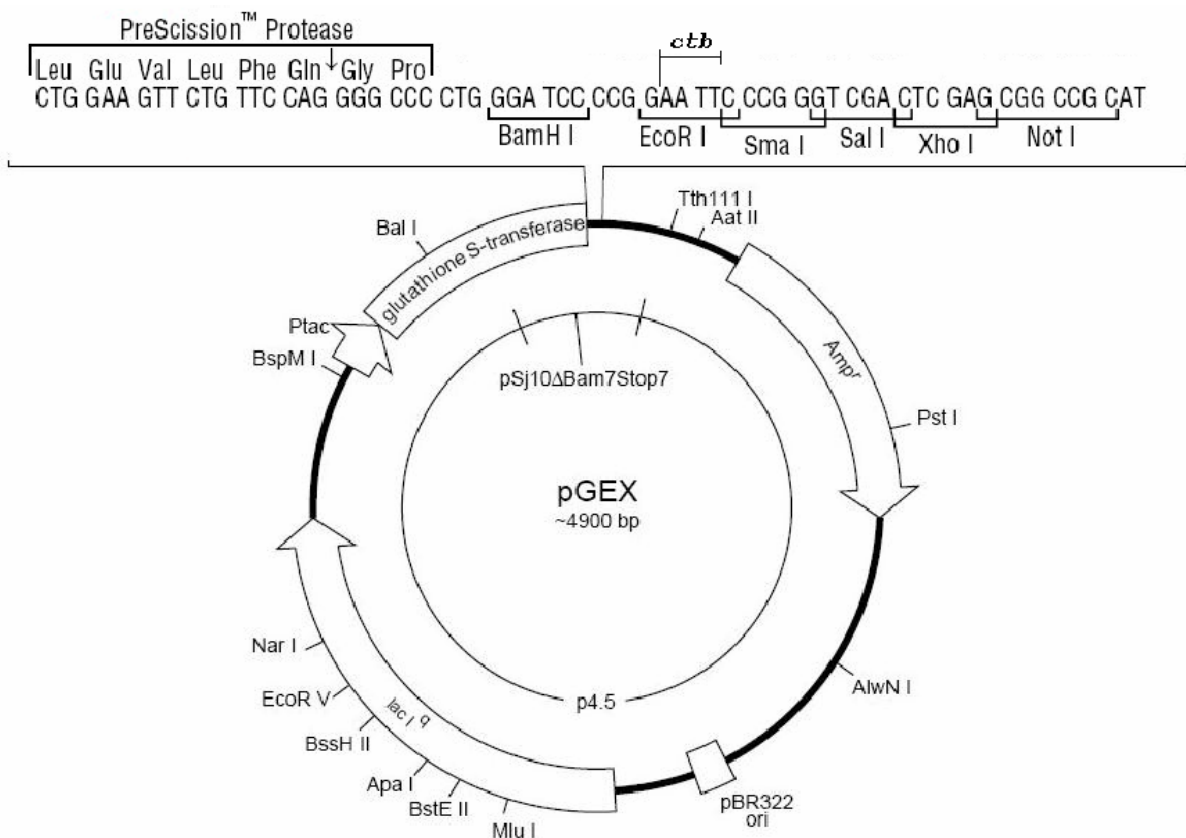


Figure 26- Carte génétique du plasmide pGEX-6P-1.

Protocole : Les souches BL21 sont cultivées dans un milieu de culture TYx2 contenant 17 g/L de bactotryptone, 10 g/L d'extrait de Bacto-levure et 5 g/L de NaCl. La culture bactérienne est faite à 37°C sous agitation pendant une nuit, jusqu'à obtention d'une densité optique égale à 0,5. Après centrifugation de 10 min à 2500x *g*, le culot est resuspendu dans 10 mL de CaCl₂ à 50 mM, centrifugé à nouveau et nouvellement repris dans 5 mL de CaCl₂ à 50 mM. Ces étapes permettent aux bactéries de devenir compétentes par l'action du chlorure de calcium. Ensuite, 1 µg du plasmide pGEX-6P-1 est rajouté à 150 µL de bactéries compétentes. Le passage d'une

température de 4°C à une température de 42°C permet de provoquer un choc thermique nécessaire pour que le plasmide soit incorporé. Rapidement refroidies à 4°C, les bactéries sont étalées sur un milieu gélosé de TY-A (contenant l'ampicilline) et incubées une nuit à 37°C. Suite à cette étape, il y a la phase de surexpression de la protéine de fusion GST-protéine d'intérêt. À cet effet, on rajoute un analogue structural du lactose, l'Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside ou IPTG. L'IPTG agit sur le gène *lacI^q*, répresseur de l'opéron lactose. Une fois enlevé l'inhibition, le promoteur de l'opéron lactose, le *ptac*, qui contrôle l'expression de la protéine de fusion, permet donc la surexpression de la protéine d'intérêt.

Accessoirement, une étape de contrôle et estimation du niveau de production peut être rajoutée pour doser l'activité de la GST par la mesure de l'absorbance à 340 nm au spectrophotomètre. En effet, ce test se base sur la réaction catalysée par la GST qui provoque le transfert du GSH sur le Chloro-1,2,2 Dinitrobenzène ou CDNB. L'absorbance du CDNB libre est de 270 nm, alors que le CDNB-GSH absorbe à 340 nm.

Concernant la surexpression de la protéine de fusion, elle est effectuée en présence de 0,2 mM de IPTG pendant une nuit à TA. Ensuite, la protéine de fusion est récupérée grâce à une étape de lyse bactérienne à la French Press (French PressureCell Press, SLM AMINCO®), en appliquant une pression de 600 bar. Le lysat bactérien est collecté et la GST est utilisée dans une première étape de purification par chromatographie d'affinité. Cette étape est effectuée grâce au Glutathion ou GSH couplé à une résine Sepharose 4B™ (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) constituant la phase stationnaire chargée dans la colonne. La résine est équilibrée avec le Tampon A et rajoutée au lysat (mélange en batch). Le mélange est agité 30 min à 4°C, centrifugé à 200 x *g* pendant 5 min et décanté avant d'être coulé dans la colonne PD10 (GE Healthcare). Ainsi, le lysat est passé sur colonne, afin de récupérer les protéines de fusion GST-protéine d'intérêt, grâce à l'affinité entre la GST et GSH. Le Tampon B est utilisé pour éluer la protéine de fusion. Des lavages de la colonne sont effectués avec le Tampon B, C et A et 20% d'éthanol dans l'eau avant de la stocker au frigo, ce qui permet d'éviter les contaminations. Le tag GST est successivement éliminé par la PreScission® Protease (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Après une étape de dialyse qui permet de réduire la concentration en NaCl contenue dans l'éluât, il y a l'étape de purification par échange de ions avec l'automate de purification ÄKTA™ purifier (GE Healthcare, Uppsala, Suède). La colonne ReSource™ est lavée d'abord avec NaOH 0,5M et ensuite avec le Tampon E et D. Cette technique se base sur la charge des molécules à isoler, et la résine utilisée pour la phase stationnaire est une échangeuse de cations se présentant sous forme de billes de polyvinyle-benzène auxquelles des groupements -SO₃⁻ ont été greffés. Le principe de la purification

se base sur l'attraction des composés S et F des leucotoxines aux groupements $-\text{SO}_3^-$. L'élution est provoquée par l'augmentation de la concentration d'ion Na^+ qui va compéter avec la protéine d'intérêt, qui est donc récupérée par l'augmentation progressive du tampon E, par rapport à la quantité de Tampon D. La pureté de chaque protéine est ensuite vérifiée par SDS-PAGE sur la base de la masse moléculaire apparente. La masse et l'intégrité des protéines peuvent être également testées par spectrométrie de masse et sa fonctionnalité peut être testée par des expériences d'activité leucotoxique. Un test supplémentaire peut être effectué par immunoprécipitation radiale double en gel d'agarose 0,6% (p/v) contre des antigènes natifs.

La concentration des composés purifiés des leucotoxines est calculée sur la base de la densité optique au spectrophotomètre à 280 nm et les sous-unités sont ensuite stockées à -80°C jusqu'à leur utilisation.

2.7.3 Microscopie en épifluorescence

Principe : Une fois que les composés des leucotoxines et les hPMNs sont préparés, nous pouvons procéder aux expériences souhaitées. Concernant l'étude de la NETose, l'une des techniques les plus fréquemment utilisées est la microscopie à fluorescence. Le principe de cette technique se base sur la possibilité d'observer par microscopie optique des objets, des molécules ou structures fluorescentes qui émettent de la lumière suite à l'absorption de photons à plus haute énergie. L'image peut ensuite être enregistrée en tant que cliché photographique, à l'aide d'une caméra qui peut être montée sur le corps du microscope. Dans le cas de nos expériences, les objets à observer ne produisent pas de lumière fluorescente en eux-mêmes. Par conséquent, une étape de **marquage** est prévue à cet effet. Le marquage le plus adéquat est l'**immunomarquage**, qui repose sur le principe de reconnaissance d'antigènes spécifiques opérée par les anticorps (Figure 27 A). Il s'agit donc d'une méthode de marquage indirect, puisque l'antigène, la cible de nos expériences, est marqué par un premier anticorps non couplé à un fluorochrome. Suite à cette première liaison, un deuxième anticorps couplé à un fluorochrome de choix est rajouté, afin de réagir avec le premier anticorps, tout en amplifiant le signal fluorescent par des multiples liens anticorps primaire-anticorps secondaires (Figure 27 B).

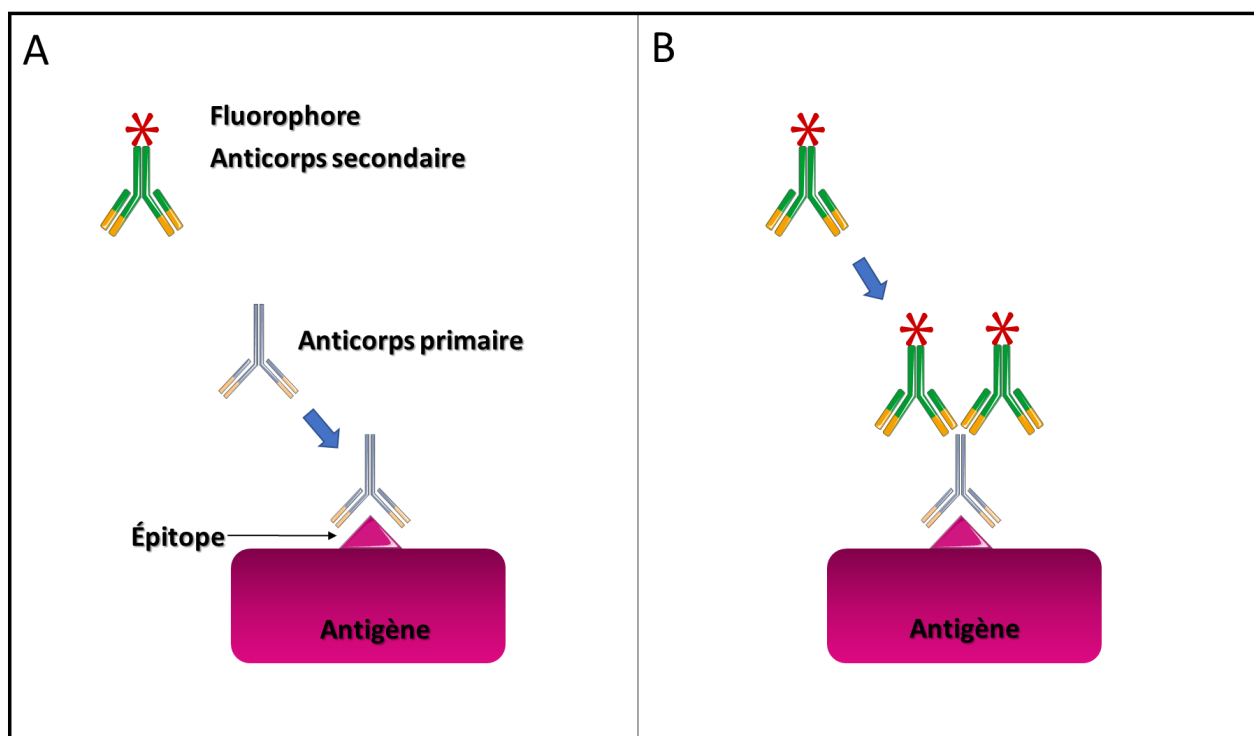


Figure 27- Principe de la technique d'immunomarquage pour l'observation des échantillons par épifluorescence.

Protocole : Pour évaluer qualitativement et quantitativement la NETose des hPMNs exposés aux deux leucotoxines à l'étude, nous avons précédemment effectué des tests pour optimiser la concentration de hPMNs afin d'obtenir un niveau homogène de cellules cultivées dans les boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre.

Petit excursus : Initialement, les boîtes en polystyrène étaient préalablement traitées avec de la gélatine à 1% ou de la poly-lysine x1, ou un mélange des deux, et chauffées (gélatine 0,1% et poly-lysine 1% dilués dans du PBSx1), mais l'adhérence n'était jamais suffisamment constante et les lavages successifs produisaient le décollement de la gélatine et des cellules. Ainsi, des boîtes de Pétri « treated » ont été introduites pour nos expériences. Il s'agit de boîtes en polystyrène, traitées afin d'en réduire le caractère hydrophobe naturel du matériel en augmentant la charge positive de la surface par des moyens chimiques. L'augmentation de la charge positive est importante pour l'adhérence cellulaire et ce type de matériel est donc maintenant utilisé pour la culture cellulaire de cellules comme les neutrophiles humains.

Fin de l'excursus.

Nos tests préliminaires avec des concentrations initiales variables de cellules (de 2×10^6 cellules par mL à $0,1 \times 10^6$ cellules par mL) nous ont permis de déterminer que $0,5 \times 10^6$ hPMNs par mL est la concentration optimale pour ce type d'expérience *in vitro*. Les hPMNs isolés comme précédemment décrit sont donc mis en culture à hauteur de $0,5 \times 10^6$ cellules par mL dans du RPMI/BSA 0,5%. Cinq-cents μ L de cellules en suspension sont déposés au milieu de la boîte Pétri à l'aide d'une pipette, ayant soin de ne pas faire couler la goutte aux bords de la boîte de Pétri. Cela a pour but d'éviter que les cellules se retrouvent aux limites de la surface de culture, où on avait précédemment remarqué une plus fréquente mort cellulaire. Les boîtes sont donc incubées dans un incubateur réglé à 37°C avec une atmosphère à 5% de CO₂ pendant 30 min, afin de permettre une adhérence cellulaire adéquate. Ensuite, les cellules sont observées au microscope optique pour vérifier l'état d'adhésion. Le milieu de culture est retiré et remplacé par 500 μ L de milieu contenant les stimuli, préparés dans du RPMI/BSA 0,5%, ou bien par 500 μ L de milieu de culture sans stimuli, afin d'obtenir un contrôle négatif pour chaque condition expérimentale. Les boîtes sont donc remises à l'incubateur et laissées pendant les différents temps d'incubation. Pour les expériences visant à évaluer la NETose induite par les deux leucotoxines et le PMA, utilisé en tant que contrôle positif, les temps d'incubation étaient 10 min, 1h, 3h et 6h, dont le dernier temps représente le pic maximale de NETose indiquée dans la littérature (Brinkmann et al. 2012). Après chacun des temps d'incubation, la boîte de Pétri contenant les hPMNs stimulés est sortie de l'incubateur et 125 μ L de PFA 16% sont directement rajoutés aux 500 μ L de milieu de culture pendant 5 min pour arrêter la réaction et créer des liens croisés covalents entre les molécules, en particulier entre les amines libres des protéines. Cela permet de fixer les cellules dans leur état tridimensionnel. Le milieu et le PFA sont ensuite retirés et les cellules qui ont adhéré au fond des boîtes de culture sont lavées avec de l'HBSS, avant de rajouter 1 mL de tampon de blocage. Cette étape se déroule pendant une nuit à 4°C et a pour but de saturer les sites aspécifiques pouvant gêner l'immunomarquage consécutif. Le blocage est effectué par le lien que la BSA et le SVF produisent aux potentiels sites de liaison non-spécifiques de la surface de culture, en réduisant ainsi le bruit de fond et en améliorant le ratio entre signal et background, sans pourtant altérer ou masquer les épitopes ciblés par les anticorps.

Une fois bloquées, les cellules sont lavées une fois avec du HBBS et l'anticorps primaire est préparé dans du tampon de dilution à une concentration de 1 μ g/mL. Cinq-cents μ L de cette dilution sont déposés sur les cellules pendant 1h à TA en appliquant une légère oscillation pour que l'anticorps atteigne toutes les cellules. Une fois le temps d'incubation écoulé, l'anticorps primaire est retiré et deux lavages avec l'HBBS vont précéder l'application de l'anticorps secondaire. Ce deuxième anticorps est également préparé dans le tampon de dilution à une

concentration de 2 μ g/mL. Les cellules sont à nouveau laissées en contact avec l'anticorps pendant une heure d'incubation à TA sous légère oscillation. Ensuite, l'anticorps est enlevé et les cellules sont lavées deux fois avec l'HBSS avant d'appliquer une dilution de la sonde fluorescente Hoechst à une concentration de 10 μ g/mL, préparée dans de l'HBSS. Nous laissons agir l'Hoechst pour le marquage des noyaux et de l'ADN pendant 30 min à TA et sous l'habituelle oscillation, avant de le retirer et de faire un dernier lavage à l'HBSS et appliquer à nouveau 1 mL du HBSS afin d'effectuer l'observation au microscope à épifluorescence avec un objectif x10.

Microscope à épifluorescence : Le microscope à épifluorescence utilisé pour nos expériences est un Olympus BX60 équipé d'une lampe à mercure HBO qui sert de source de lumière. L'objectif pour ce type d'expérience a un grossissement x10 (marque Olympus), ce qui permet d'avoir un grossissement total de x100 pour nos images (Figure 28). Les filtres utilisés pour les observations sont un filtre UV pour visualiser la fluorescence de la sonde Hoechst (DAPI dans la figure 29), un filtre pour la fluorescéine (FITC dans la figure 29) pour le fluorochrome Alexa 488 et un filtre pour la Rhodamine (TRITC dans la figure 29) pour l'Alexa555. Pour l'enregistrement des images, une caméra Orcaflash 4.0 (C11440, Hamamatsu, Massy, France) montée sur le microscope est utilisée et couplée au logiciel HC Image Live (Hamamatsu).

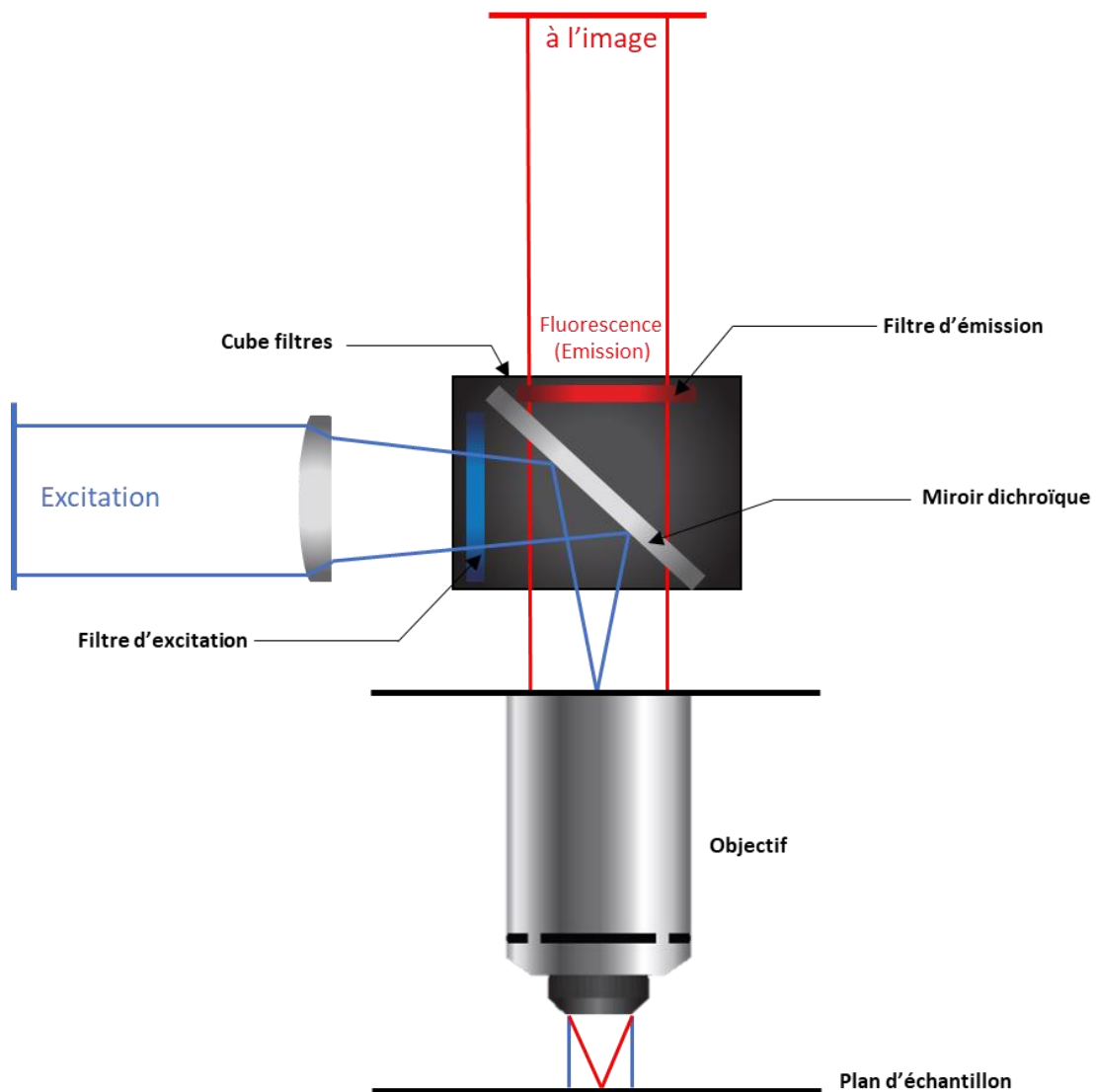


Figure 28- Schéma du chemin de la lumière dans un microscope à fluorescence.

Adapté du site : https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=10769

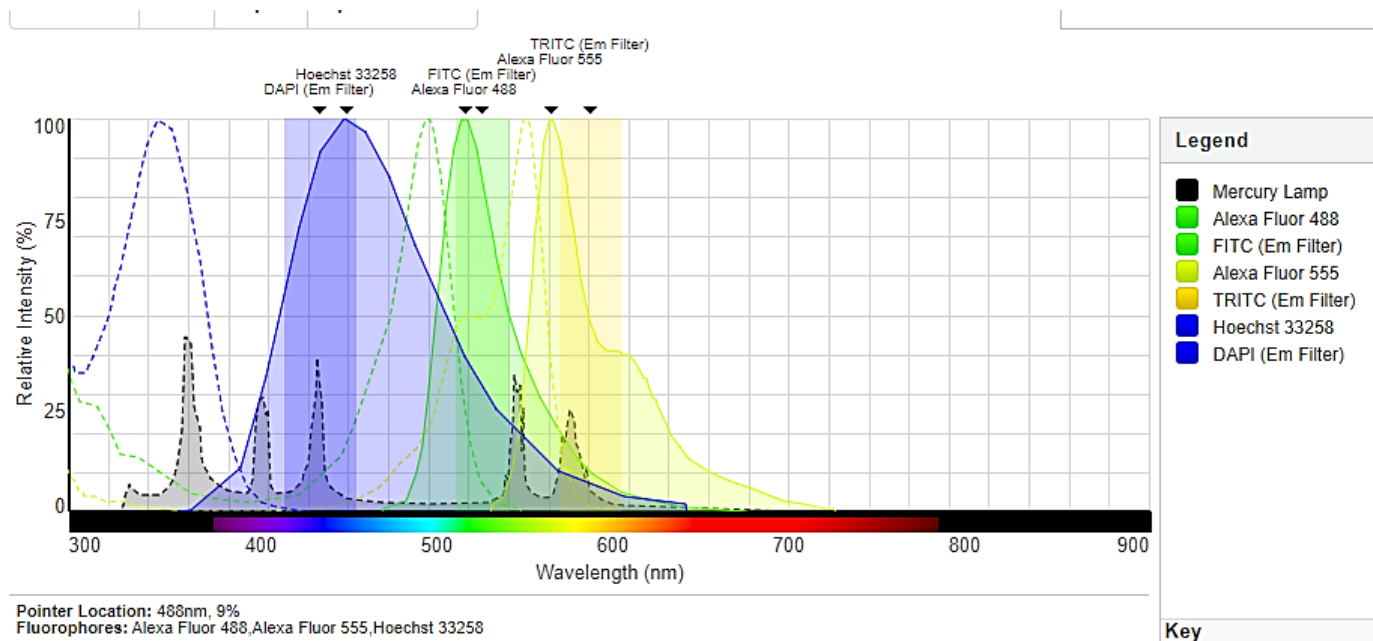


Figure 29- Spectre d'émission

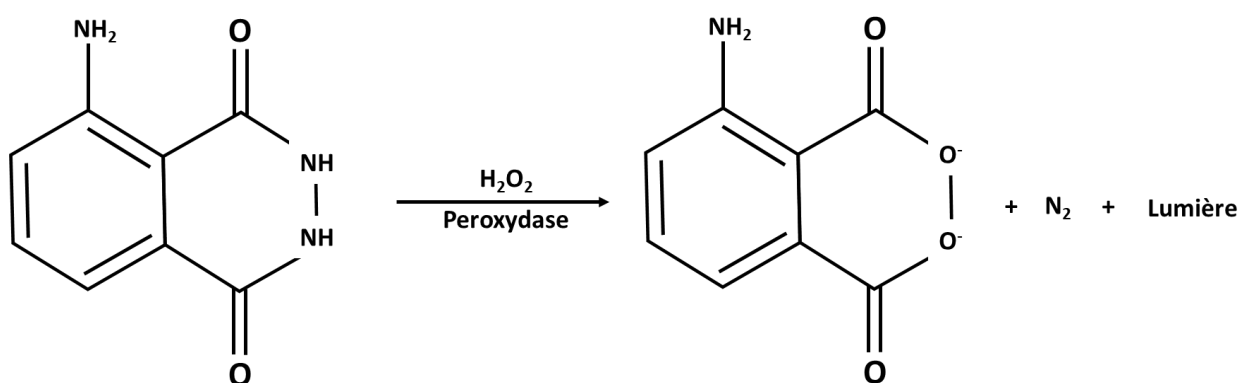
Lumière d'émission des deux anticorps secondaires utilisés (courbe verte et courbe jaune) et de la sonde Hoechst (courbe bleue), ainsi que le spectre d'excitation de la lampe au mercure (ligne pointillée noire). Les colonnes colorées en bleu, vert et jaune correspondent aux filtres d'émission utilisés pour observer les différents marquages cellulaires.

Source : Fluorescence Spectra Viewer by ThermoFisher Scientific (<https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>)

2.7.4 Western Blot

Principe : Pour l'étude de la voie de signalisation activée pendant la NETose, nous nous sommes basés sur la littérature disponible. Cependant les résultats publiés variaient selon le stimulus inducteur étudié, comme on l'a déjà expliqué dans l'introduction, ne permettant pas d'arriver à une conclusion univoque concernant la NETose. Néanmoins, différentes kinases ont été indiquées comme étant souvent phosphorylées, et donc activées, dans le cas de la NETose NOX-dépendante et NOX-indépendante. Ainsi, les kinases Akt et ERK1/2 ont été sélectionnées pour être étudiées par la technique de Western blot. Le principe de cette technique de biologie moléculaire se base sur l'extraction des protéines contenues dans les cellules opportunément lysées, et dont les protéines sont préservées des nombreuses protéases et phosphatases du neutrophile. Ensuite, une migration (verticale) sur gel de polyacrylamide est effectuée pour les

séparer sur la base de leur poids moléculaire apparent. Elles sont successivement transférées (par transfert horizontal) sur une membrane de nitrocellulose, afin de pouvoir effectuer un marquage à travers des anticorps spécifiques et révéler la présence ou l'absence d'une protéine dans l'extrait. Grâce à la spécificité des anticorps la technique permet également d'identifier des protéines ayant subi une modification post-traductionnelle, telle que la phosphorylation, mais également la deimination ou la lipidation, c'est-à-dire l'ajout d'une fraction lipidique à une protéine par un lien covalent, comme dans le cas de l'autophagie. Le résultat que l'on obtient est normalement issu de la révélation effectuée grâce à une réaction de chimiluminescence, qui permet une révélation très sensible. La réaction de chimiluminescence est similaire à celle induite pour observer les cellules en fluorescence, cependant il existe une différence principale. En effet, pour la microscopie à fluorescence le fluorochrome est porté dans un état excité par une source lumineuse (laser ou lampe à mercure) et il retrouve son état basal par l'émission d'une radiation dans le spectre électromagnétique, dépendamment de la molécule. Différemment, la réaction de chimiluminescence est due à un état déjà excité de la molécule, provoqué par une réaction chimique, ce qui résulte en l'émission de photons lumineux, du diazote gazeux (N₂) et d'un produit incolore.



Dans le cas des Western blots, la réaction se fait normalement entre la peroxydase couplée à l'anticorps secondaire et le mélange de deux produits, le peroxyde d'hydrogène et le luminol, additionné d'un activateur (*enhancer*) qui a le but de rendre la réaction d'émission lumineuse plus durable et la détection par la machine plus performante. La lumière est en effet détectée et une image est formée à l'ordinateur par accumulation de photons qui vont dessiner les différentes bandes correspondantes à la taille de la protéine ciblée par les anticorps.

Protocole : 1×10^7 hPMNs sont isolés d'un buffy coat et gardés dans du RPMI/SVF 10%. Un mL de préparation cellulaire est déposé dans un tube de 1,5 mL pour chaque condition expérimentale.

Les stimuli sont rajoutés directement dans le milieu de culture des cellules et les tubes sont mis dans un incubateur réglé à 37°C et 5% CO₂. Différents temps d'incubation sont prévus selon l'expérience. Généralement les temps d'incubation sont 10 min, 15 min, 30 min et 100 min. Deux lavages avec du PBS x 1 gardé dans la glace sont effectués et une centrifugation de 2 min à 2100 x *g* est réalisée avant de rajouter le tampon de lyse. Ce tampon est préparé avec une base de tampon RIPA, un milieu de lyse fort qui a pour but de solubiliser les protéines contenue dans le cytoplasme, les membranes et les noyaux, tout en évitant la dégradation des protéines et sans interférer avec leur activité biologique. Au RIPA on additionne 0,2% de Triton X-100. La dégradation des protéines est évitée grâce à l'ajout dans ce même tampon d'une série d'antiprotéases diverses (Tableau ci-dessous)

NOM DE L'INHIBITEUR	PROTEASES OU PHOSPHATASES INHIBÉES
Cocktail « cOmplete™ » de Roche	Ce cocktail contient des inhibiteurs des sérines, cystéines, et métalloprotéases.
NaVO ₃	Inhibiteur de tyrosine phosphatase.
NaF	Inhibiteur de sérine-thréonine phosphatases.
Pepstatine	Puissant inhibiteur de protéases aspartiques.
Levamisole	Inhibiteur de phosphatases alcalines.
Leupeptine	Inhibiteur de cystéines, sérines et thréonines peptidases.
Aprotinine	Inhibiteur de plusieurs sérines protéases, notamment la trypsine, la chymotrypsine, la plasmine et la kallicréine.
PMSF (Fluorure de phénylméthylsulfonyl)	Inhibiteur de protéases à sérines.
“Phosphatase Inhibitor Cocktail 2” de Sigma-Aldrich	Inhibiteur de protéines tyrosines phosphatases et de phosphatases acides et alcalines.

Une fois que les cellules sont solubilisées, le lysat est transféré dans des tubes plus épais pour effectuer une centrifugation à 20000 x *g*, à 4°C pendant 30 min. Cette étape est effectuée pour éliminer les agrégats insolubles. Le surnageant est ensuite récupéré et un dosage des protéines totales est effectué avec le kit Thermo Scientific™ Pierce™ 660nm Protein Assay (22660, Waltham, Massachusetts, USA). Une fois calculée les données concernant la concentration des

protéines totales pour chacun des échantillons, on prépare des nouveaux tubes dans lesquels on dépose une dilution adaptée du lysat afin d'obtenir une même concentration de protéines totales pour chaque condition. Le tampon de charge est donc rajouté pour permettre la dénaturation des protéines et pour pouvoir suivre le front de migration dans d'électrophorèse. En effet, le sodium dodecyl sulfate, ou SDS, contenu dans le tampon de charge, non seulement linéarise les protéines en structure primaire d'acides aminés, mais il leur apporte un nombre de charges négatives qui est dépendant de leur taille, ce qui permet leur séparation optimale sur la base de leur masse moléculaire apparente dans la phase de migration. L'ajout du β -mercaptoéthanol dans le tampon de charge est nécessaire pour réduire la formation de ponts disulfure et rendre ainsi possible la séparation des protéines dans le gel. De plus, la présence du Bromophénol bleu, une petite molécule anionique colorée, permet de marquer les protéines et ainsi monitorer la progression de la migration. Les échantillons si préparés sont chauffés 5 min à 95°C pour permettre aux protéines de perdre leur conformation 3D et donc consentir la successive reconnaissance des épitopes par les anticorps primaires. Un gel de polyacrylamide allant d'une concentration de 4% à 20% de densité est chargé avec les échantillons correspondant aux différentes conditions et un ou deux puits sont réservés pour charger l'échelle colorée Precision Plus Protein™ Dual Color Standards de Bio-Rad (Hercules, Californie, États-Unis), qui sert de repère pour déterminer le poids moléculaire des protéines. L'étape de migration se déroule en appliquant une courante électrique de 200 V et 66mA pendant environ 30 min à la cuve qui contient le tampon de migration et le gel chargé en protéines. Le front de migration bleu nous indique l'état de la migration (Figure 30).

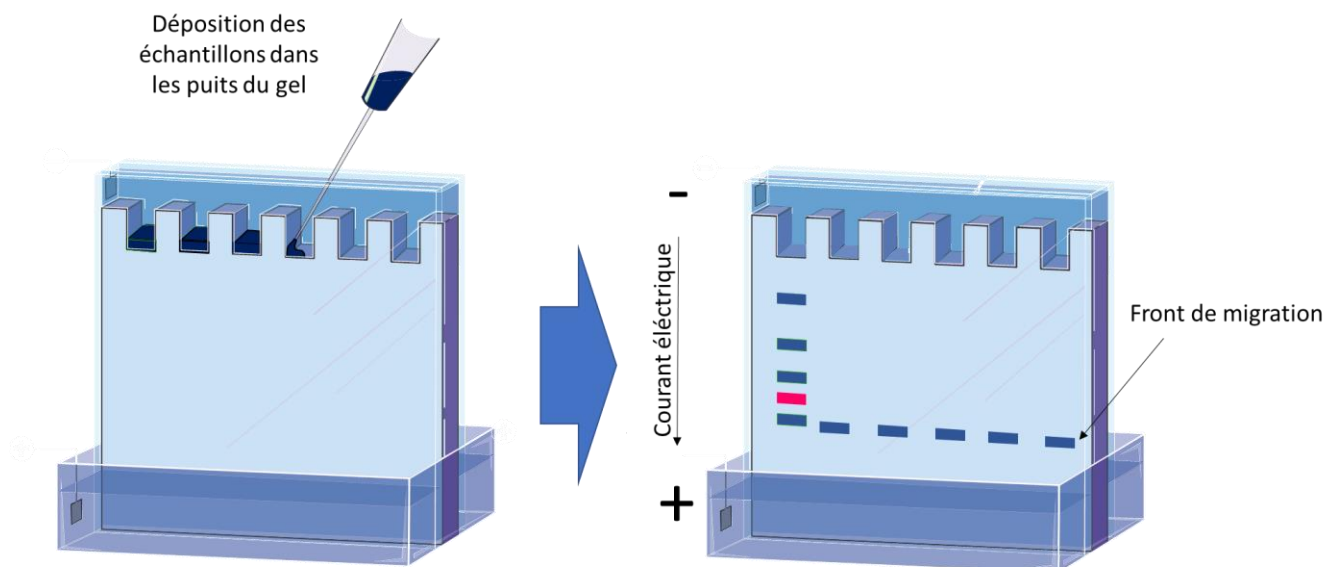


Figure 30- Phase de migration de la technique de Western blot.

SDS-PAGE : les échantillons sont déposés à la pipette à hauteur de 20 μ L par puit, pour des gels à 12 puits de Bio-Rad. Ensuite, un courant électrique est appliqué afin de séparer les protéines sur la base de leur masse moléculaire apparente, jusqu'à ce que le front de migration (en bleu) atteigne la limite du gel, marquée par une ligne noire. L'échelle colorée représente également un témoin du bon déroulement de la migration.

Une fois la migration arrêtée, le gel est récupéré pour la phase de transfert. Le transfert se fait après une étape d'assemblage de ce que l'on appelle « sandwich ». Des éponges sont imbibées avec du tampon de transfert. Sur ces éponges on dépose deux papiers absorbant de la même taille, précédemment imbibés avec le même tampon de transfert. Le gel est ensuite posé sur les papiers et la membrane de nitrocellulose de 0,2 μ m de porosité y est apposée, une fois imbibée de tampon. Le sandwich est complété par l'apposition de deux autres papiers absorbants et des éponges. Cet assemblage se fait du bas vers le haut et le courant successivement appliqué aura son pôle négatif dans la partie inférieure du sandwich et le pôle positif dans la partie supérieure, de manière à induire le transfert des protéines, chargées négativement, du gel à la membrane. Le sandwich est déposé dans une cuve et un courant de 30 V est appliqué pendant 2 h (Figure 31).

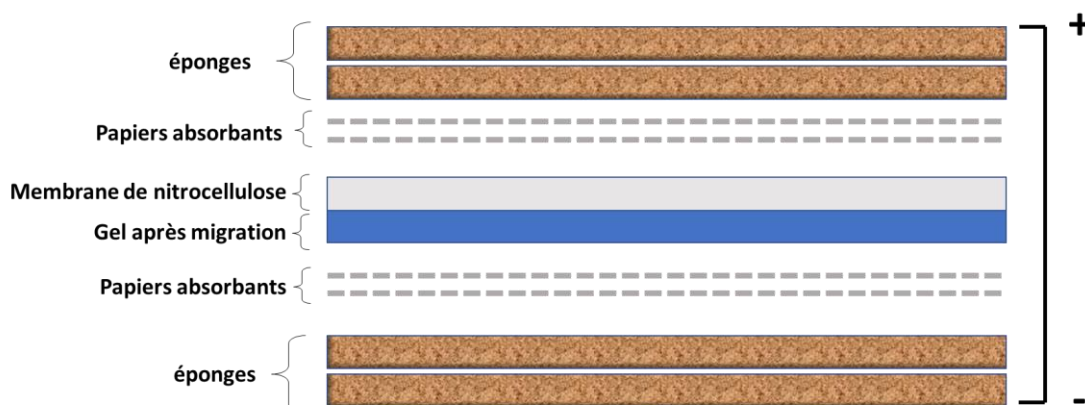


Figure 31- Construction du « sandwich » utilisé pour la phase de transfert des protéines du gel à la membrane de nitrocellulose.

Après le transfert, la membrane est récupérée et immergée dans le tampon de blocage où elle sera laissée sous légère agitation pendant minimum 3h, tandis que le gel est coloré avec du bleu de Coomassie pour évaluer la réussite du transfert.

Suite au blocage, la membrane est mise en contact avec l'anticorps primaire de choix, dilué à la concentration optimale dans du tampon de dilution. La membrane est laissée à 4°C sous légère agitation pendant une nuit. Le lendemain, 3 lavages sont effectués pendant 5 min chacun avec du PBS Tween à 0,05%, et l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase, opportunément dilué dans du tampon de dilution, est rajouté. La membrane est laissée 2 h sous agitation à TA pour permettre à l'anticorps secondaire de réagir avec l'anticorps primaire. Trois lavages avec du PBS Tween 0,05% sont effectués et la membrane est imbibée pendant 5 min d'un mélange de ratio 1 :1 de deux produits constituant le kit de révélation Clarity Max de Bio-Rad. L'observation et l'enregistrement des images sont effectués grâce au ChemiDoc™ Imaging System (Bio-Rad) et via le logiciel Image Lab Software de Bio-Rad pendant des temps d'exposition variables de 1 à 10 min.

2.7.5 Cytométrie en flux

Principe : La cytométrie en flux est une technique permettant l'analyse à haut débit des caractéristiques individuelles de chacune des cellules (particules/bactéries/parasites/billes, etc..) présentes dans une suspension. Les cellules sont prélevées par un capillaire et entraînées par un flux liquide, dit liquide de gaine, qui les aligne sans pourtant se mélanger avec la suspension

cellulaire. Ainsi, elles passent les unes après les autres devant un ou plusieurs faisceaux lumineux, souvent des lasers. Les cellules, passant devant le laser de façon ordonnée, provoquent la diffusion de la lumière du laser. Cette diffusion nous donne déjà deux informations très importantes : la lumière diffusée « vers l'avant », ou Forward Scatter (FSC) est analysée pour obtenir des informations concernant la taille de la cellule, tandis que la lumière qui est déviée de 90°, ou Side Scatter (SSC) permet d'avoir des informations concernant la forme, la structure interne et la granularité ou complexité de chaque cellule. Ainsi, deux détecteurs sont prévus, l'un aligné à la direction du laser (0°, FSC) et l'autre qui se trouve à 90° par rapport à la direction du laser (SSC). En plus de ces informations, on peut procéder avec des marquages fluorescents, soit en utilisant des anticorps couplés à des fluorochromes, comme dans le cas de la microscopie à fluorescence, soit avec des sondes fluorescentes. La fluorescence est ensuite passée par un jeu de miroirs dichroïques et des filtres optiques pour être ensuite adressée à des photomultiplicateurs qui en amplifient le signal et le convertent en signaux numériques pour procéder avec l'analyse statistique. Ainsi, on peut obtenir des nombreuses informations et données à une vitesse considérable, ce qui représente l'avantage de cette technologie. D'ailleurs, certains cytomètres peuvent être couplés à un système de triage, qui permet, non seulement l'analyse des cellules, mais également de les séparer sur la base de leurs caractéristiques. Cette application prend le nom de FACS ou Fluorescence Activated Cell **Sorting**, qui en souligne la capacité de **trier** (Figure 32).

Il faut rajouter pourtant que au sein de l'EA7290 nous avons pu disposer de deux typologies de cytomètres. Initialement, un FACSort® Beckton-Dickinson (Le Pont de Claix, France) a été utilisé. Ce dernier présentait une partie fluidique, constituée du liquide de gaine nécessaire à la focalisation des cellules. Néanmoins, plus récemment notre Institut a pu s'équiper d'un nouvel instrument, le cytomètre Guava® easyCyte™ 8TH de Luminex (ex-Merck) (Austin, Texas, États-Unis), dont il est important de détailler une particularité : il ne possède pas un système fluidique traditionnel, puisqu'il n'emploie pas le liquide de gaine. À la place de ce dernier, il présente un micro-capillaire capable d'aspirer directement l'échantillon en suspension et permettant un auto-alignement des cellules dans le flux.

Principe de fonctionnement d'un analyseur-trieur

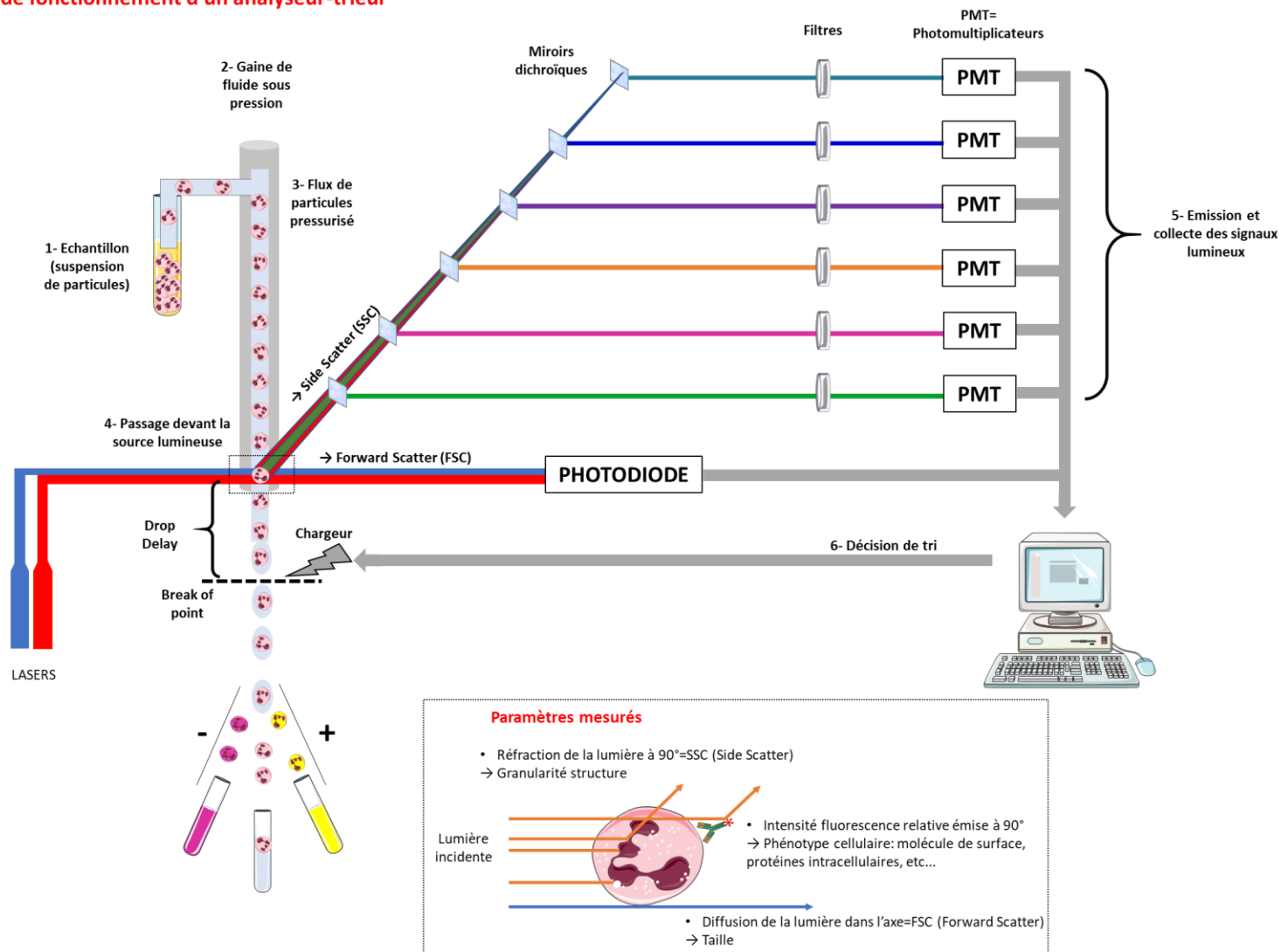


Figure 32- Principe du fonctionnement d'un cytomètre en flux et du « sorting » successif.

Adapté du site internet : <http://bfa.univ-paris-diderot.fr/cytometrie-en-flux-et-tri-cellulaire/>

Protocole : Pour l'étude des réactifs de l'oxygène produits par les hPMNs lors du contact avec les stimuli, nous avons isolé 1×10^6 polynucléaires neutrophiles dans du RPMI sans Phenol Red/SVF 10%. Les stimuli sont préparés à part, en rajoutant $2,5 \mu\text{M}$ de DHR123 au même moment de l'ajout des toxines et du PMA. Concernant les mtDROs, une préincubation des cellules avec $2,5 \mu\text{M}$ de MitoSOX est effectuée pendant 30 min à 37°C et 5% CO_2 , avant la stimulation. La fluorescence du DHR123 est analysée au cytomètre en flux dans le canal vert, dont la longueur d'onde d'émission correspond à 525/30 nm. Séparément, une lecture de la fluorescence du MitoSOX est effectuée par l'étude du signal dans le canal jaune, correspondant à une longueur d'onde d'émission de 583/26 nm. Initialement, les deux expériences ont été effectuées en employant le cytomètre FACSsort® Beckton-Dickinson et les résultats ont été

confirmés également par une analyse au cytomètre easyCyte™ 8TH de Luminex. Les temps d'incubation étudiés vont de 0 min à 60 min avec une lecture de la fluorescence toutes les 10 minutes. Une fois terminée la phase d'acquisition, la phase d'analyse est effectuée par sélection de la population cellulaire sur la base des caractéristiques communes des cellules, indiquées par les données de FSC et SSC. Une fois que la population des hPMNs a été sélectionnée ou « gated », la fluorescence correspondante uniquement à ces cellules est prise en compte, ce qui permet d'écarter les données relatives aux débris cellulaires, laissés en dehors de l'analyse. Ensuite, la moyenne de fluorescence correspondante à chacune des conditions d'incubation est employée pour obtenir les données statistiques.

2.7.6 Microscopie confocale

Principe : L'étude précédemment menée par Zimmermann-Meisse et al. (2016), nous a poussé à nous intéresser à l'internalisation de la LPV dans les hPMNs en ciblant la mitochondrie. Ainsi, la technique de microscopie confocale a été employée afin d'évaluer la colocalisation entre la LPV et la mitochondrie. La colocalisation en microscopie confocale est la capacité de visualiser et analyser la superposition de deux ou plusieurs types de molécules fluorescences différentes ayant la même localisation spatiale à l'intérieur de la cellule. Quand deux fluorochromes différents se superposent, la signification biologique que l'on peut en déduire est que les molécules ciblées par les anticorps couplés aux deux fluorochromes se trouvent en interaction physique l'une avec l'autre, ou bien, que d'un point de vu de l'image digitale, elles partagent les mêmes pixels. L'avantage d'utiliser une technique différente de la microscopie à fluorescence précédemment décrite est que la microscopie confocale permet d'obtenir des images à haute résolution et à très faible profondeur de champ dites « section optiques », grâce à la présence de deux « *pinholes* » ou sténopés. Le premier, se trouvant sur la trajectoire de la source lumineuse, sert pour focaliser le faisceau lumineux sur une partie spécifique de l'objet observé. Le deuxième se trouve dans la direction de la lumière émise et sert pour laisser passer uniquement la lumière dérivant de l'aire de l'objet sélectionné vers le détecteur, en excluant donc la lumière émise par tous les autres plans focaux qui rendrait l'image floue. La source lumineuse est souvent un laser, tandis que la lumière réémise suite à l'excitation de l'aire de l'objet observé est souvent due à un immunomarquage fluorescent à l'aide d'anticorps couplés à des fluorochromes. Cette technique permet ainsi de suivre la localisation, même au niveau subcellulaire, de molécules marquées par immunomarquage. D'ailleurs, il est également possible de produire des sections optiques

successives d'épaisseur inférieur à 0,5µm sur l'axe des Z, obtenant ce que l'on appelle un « Z-stack » : la série de ces images peut être ensuite utilisée pour faire une reconstruction 3D de l'objet observé.

Protocole : Les hPMNs sont isolés en raison de 8×10^6 cellules/mL dans du RPMI/SVF 10%. Un mL par condition est déposé dans des tubes de 1,5 mL et les stimuli sont rajoutés directement aux cellules en suspension. Un marquage supplémentaire est effectué en incubant les cellules avec 100nM de la sonde fluorescente MitoTracker® Deep Red FM (Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, États-Unis) pendant 20min avant la stimulation, afin d'avoir un contrôle supplémentaire pour le marquage de la mitochondrie. Ensuite, les hPMNs sont laissés à l'incubateur à 37°C et 5% CO₂ pendant 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 30 min, 40 min et 50 min, étant 50 min le dernier « time-point » exploitable avant les modifications morphologiques majeures liées à la NETose provoquées par la LPV. La fixation est faite à chaque temps d'incubation par l'ajout de 250 µL de PFA 16% aux cellules pendant 10 min à TA. Une centrifugation à 2100 x g pendant 2 min est effectuée et le surnageant est remplacé par l'HBSS afin d'effectuer un lavage. Ensuite, les cellules sont perméabilisées à l'aide d'une solution à 0,05% de TritonX-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) laissée agir pendant 5 min à TA. Suite à une nouvelle centrifugation le surnageant est remplacé par l'HBSS afin de laver les cellules des résidus de Triton. L'étape suivante est le blocage que, tout comme pour la microscopie à fluorescence classique, s'effectue par l'ajout du même tampon de blocage laissé agir pendant 30 min à TA. Après un énième lavage, les anticorps primaires sont rajoutés : l'un à une concentration de 1µg/mL pour marquer la sous-unité S de la LPV, et l'autre, un anticorps anti-cytochrome C, est utilisé à une dilution 1 :100 afin de marquer la mitochondrie. Les anticorps sont laissés en contact avec les cellules pendant une nuit à 4°C. Deux lavages avec l'HBSS sont effectués avant de rajouter 2µg/mL des deux anticorps secondaires spécifiques pendant 1h à TA. Les deux anticorps secondaires ont été choisis pour leur tailles réduites, s'agissant d'anticorps F(ab')₂, qui correspondent au résultat de la digestion effectuée par la pepsine afin d'éliminer le fragment Fc. Ainsi, uniquement la région Fab (ou antigen-binding fragment) est gardée, c'est-à-dire la région nécessaire pour reconnaître et lier les antigènes d'intérêt. Les anticorps secondaires sont couplés à deux fluorochromes dont les spectres d'émission sont écartés de manière à réduire au maximum les chevauchements entre les deux : l'anticorps marquant la LukS-PV porte un fluorochrome Alexa 594, alors que l'anticorps marquant le Cytochrome C est couplé à l'Alexa 488 (Figure 33).

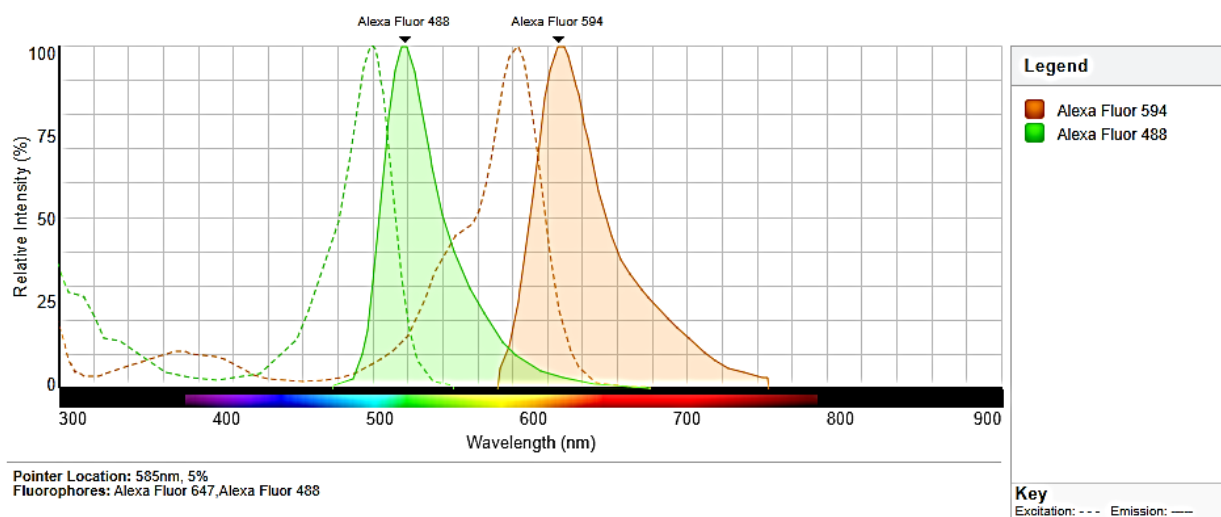


Figure 33- Spectre d'émission des deux fluorochromes utilisés pour le marquage de la LPV (Alexa594) et de la mitochondrie (Alexa488).

Le chevauchement entre les deux courbes est assez réduit, ce qui améliore l'interprétation et l'analyse des deux signaux. Depuis le site: <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>

Les anticorps secondaires sont retirés après une centrifugation à $2100 \times g$ et 2 lavages à l'HBSS sont à nouveau effectués avant de rajouter aux cellules $1\mu\text{g/mL}$ de DAPI pendant 5 min à TA. Un dernier lavage à l'HBSS est réalisé, après avoir retiré la sonde fluorescente. Les cellules sont ensuite montées sur lame en verre avec $10\mu\text{L}$ de milieu de montage Mowiol (Mowiol 4.88; cat# 475904; Calbiochem, La Jolla, CA, USA) et laissées durcir pendant 1 nuit à l'obscurité et à TA. L'observation est faite au microscope confocal Zeiss LSM 780 (Oberkochen, Allemagne) équipé d'un objectif x63 à immersion dans l'huile, et le logiciel ZEN 2010 permet la récolte des données et l'analyse. Dix champs de 1024×1024 pixels sont acquis en utilisant une diode à 305 nm (ultraviolet), un laser à argon à 488 nm et un laser à 562 nm pour exciter les 3 fluorochromes.

2.7.7 Vidéo-microscopie

Principe : La technique de vidéo-microscopie, ou « time-lapse microscopy » est effectuée avec un microscope à fluorescence équipé d'une lampe HBO à mercure et d'une caméra, dans le but d'évaluer de façon continue l'état des hPMNs exposés à 1 nM de la LPV. Par l'application de sondes fluorescentes, telles que le Hoechst, le SYTO™ 9 Green et le Bromure d'éthidium (BET), trois intercalants de l'ADN, nous avons marqué toutes les cellules adhérant au fond d'une boîte

de Pétri (le Hoechst et le SYTO™ 9 Green Fluorescent Nucleic Acid Stain) ou seulement les hPMNs ayant perdu l'intégrité de la membrane plasmique (le BEt). L'emploi du SYTO 9 nous permet de marquer de façon plus stable les acides nucléiques, puisque la sonde Hoechst a une demi-vie très courte, notamment si exposée plusieurs fois à une source lumineuse, ce qui va entraîner rapidement un phénomène de photoblanchiment (ou photobleaching). Le microscope à fluorescence est utilisé pour acquérir un nombre très élevé de photos prise toutes les minutes, et pouvant afficher jusqu'à 3 fluorescences sur la même image (RGB 3-band). L'ensemble des photos successives permet de réaliser une vidéo et d'observer ainsi l'évolution et les changements morphologiques des hPMNs exposés à 1 nM de la LPV. Cela permet de distinguer entre les cellules intactes, dont le noyau change de forme et structure (Hoechst/SYTO 9⁺), et les hPMNs perméabilisés (BEt⁺).

Protocole : Les hPMNs sont isolés à une densité de 5×10^5 cellules/mL dans du RPMI/BSA 0,5%, et 10 µg/mL de Hoechst sont rajoutés. Cinq-cents µL de cellules sont déposés dans une boîte de Pétri de 35 mm de diamètre et laissées adhérer pendant 30 min à 37°C et 5% CO₂. Une fois vérifié que les cellules ont bien adhéré au fond de la boîte par observation au microscope en lumière normale, le surnageant est remplacé par 3 mL de RPMI/BSA 0,5% contenant 1 nM de la LPV et 3 µg/mL de BEt ou 40 nM de SYTO9 Green. La mise au point au microscope à fluorescence Olympus BX60 est faite sur les cellules marquées à l'Hoechst avec un objectif à immersion dans l'eau x40. Les temps d'exposition des deux canaux, bleu et vert pour le Hoechst et le SYTO 9, ou bleu et rouge pour le Hoechst et le BEt, sont réglés grâce à la caméra Orcaflash 4.0 (C11440, Hamamatsu, Massy, France), couplée au logiciel HC Image Live (Hamamatsu). L'acquisition des photos se déroule avec un décalage de 60 sec entre une photo et l'autre pour une durée totale de 6h. Ensuite, les clichés sont visibles sous forme de vidéo pour observer les changements de fluorescence et morphologie cellulaire des hPMNs en contact avec la LPV.

2.7.8 Quantification

Les différentes techniques utilisées pendant ce travail de thèse nous ont permis non seulement d'obtenir des données quantitatives, comme dans le cas de la cytométrie, dont les moyennes de fluorescence de la population de hPMNs ont été exploitées pour les tests statistiques, mais également des images en fluorescence, issues des expériences de microscopie à fluorescence et confocale, ou encore des bandes sur membrane de nitrocellulose, dans le cas du Western Blot.

Ainsi, les résultats des trois techniques normalement produisant des données qualitatives par images ont été exploités avec trois logiciels différents, afin d'obtenir des données quantitatives et y appliquer nos tests statistiques, par la suite.

2.7.8.1 CellProfiler pour la microscopie à fluorescence

Les images en microscopie à fluorescence ont été acquises en prenant aléatoirement en photo 8 champs différents pour chaque condition (chaque boîte de Pétri). Le canal bleu (UV) est d'abord utilisé pour effectuer la mise au point de l'image et une photo par canal est prise en monochrome, afin d'effectuer la quantification avec le logiciel CellProfiler™ (Broad Institute, Cambridge, USA). Les données sont extraites grâce au principe du logiciel, qui permet la création d'une série de modules constituant une « pipeline ». Ces modules contiennent chacun des instructions précises pour pouvoir prendre en examen et quantifier le nombre de cellules totales par photo, correspondant au nombre de cellules marquées à l'Hoechst. Également, le logiciel quantifie le nombre de cellules en NETose, c'est-à-dire les cellules présentant un signal de fluorescence dans les canaux correspondant aux fluorochromes des anticorps anti-EN, anti-MPO ou anti-citH3. Cette méthode permet d'analyser les photos en éliminant le plus possible le biais qui peut affecter un comptage manuel des cellules.

Une fois obtenu le fichier des résultats du comptage, on applique aux chiffres une simple formule mathématique, adaptée de Brinkmann et al. (Brinkmann et al. 2012), à l'aide du logiciel Excel :

$$\% \text{ de NETose} = \frac{\text{Nombre de cellules positives à l'immunomarquage (i.e. : anti-EN)}}{\text{Nombre de cellules positives à l'Hoechst (la totalité des cellules)}} \times 100$$

Le pipeline est ainsi conçu :

1. **Sélection des noyaux :** les photos correspondantes au marquage à l'Hoechst sont prises en appliquant un filtre UV. Ainsi, les noyaux sont visibles dans le canal bleu avec un grossissement final x100. Le logiciel est réglé de façon à appliquer un seuil « Global » sur la base de la méthode dite « Robust Background » avec un facteur de correction égal à 2 et des limites inférieures et supérieures de luminosité de pixels prise en compte entre 0,3 et 1. Chaque cellule, ou objet, est identifié sur la base de son intensité lumineuse et le diamètre des cellules a été réglé entre 5 et 80 pixels.
2. **Sélection des cellules en NETose :** Les cellules en NETose sont observées dans le canal vert ou jaune, selon le fluorochrome employé. Le logiciel est réglé de façon à appliquer

un seuil « Global » sur la base de la méthode dite « Robust Background » avec un facteur de correction égal à 1 et des limites inférieures et supérieures de luminosité de pixels prise en compte entre 0,2 et 1. Chaque cellule, ou objet, est identifié sur la base de son intensité lumineuse et le diamètre des cellules a été réglé entre 6 et 200 pixels.

What is a « Robust Background » ? Il s'agit de la méthode de choix du seuil.

Le seuil d'intensité a une influence sur la décision de considérer ou pas un pixel comme appartenant à l'arrière-plan ou background, ou bien le considérer comme faisant partie d'un pixel composant l'objet ou cellule à l'étude. Plus la valeur de ce seuil est élevée, plus les pixels considérés comme faisant partie de l'objet doivent présenter une luminosité intense. Inversement, plus cette valeur est basse, plus les pixels à faible intensité sont considérés comme partie de l'objet à l'étude et non pas faisant partie du background.

Notamment, la méthode du « Robust Background » permet de considérer que la distribution du background suit une courbe Gaussienne et un égal pourcentage de pixels à intensité trop élevée ou trop faible sont exclus de l'analyse. Ensuite, le logiciel procède au calcul de la moyenne et des écarts types des intensités des pixels restants et applique un seuil issu du calcul : $\text{moyenne} + N \times \text{l'écart type}$. Le nombre de fois où l'écart type est rajouté à la moyenne est choisi par l'utilisateur sur la base des paramètres prenant en compte plus efficacement les objets à l'étude.

Cette méthode est conseillée si la majorité des pixels composant l'image font partie du background, ou bien quand l'image change concernant sa luminosité globale, mais les objets gardent une même différence d'intensité lumineuse par rapport au background.

Les valeurs ainsi obtenues sont analysées et moyennées grâce au logiciel Excel. Ensuite, elles sont transférées au logiciel GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA 92108) pour l'analyse statistique.

2.7.8.2 ImageJ pour les Western blot

Les images issues de la révélation au ChemiDoc™ de Bio-Rad sont enregistrées au format .scn et l'image à exposition adéquate est créée par une accumulation de photons. Ce procédé rend les bandes visibles, mais il faut veiller à ce que le signal ne soit pas saturé. L'image est ensuite ouverte avec le logiciel Image Lab™ de Bio-Rad, afin d'enregistrer une copie sous format .tiff. Cette dernière image est ensuite ouverte avec le logiciel Image J (NIH) (Schneider et al. 2012), afin de quantifier et comparer les profils de migration de bandes protéiques, par une technique de densitométrie, autrement dit, en se basant sur la mesure de la densité et de la quantité de signal. Une fois sélectionnée la bande ou les bandes d'intérêt, leurs profils de migration sont analysés par le logiciel, nous permettant d'en obtenir l'aire, correspondant à la mesure de leur intensité (Figure 34).

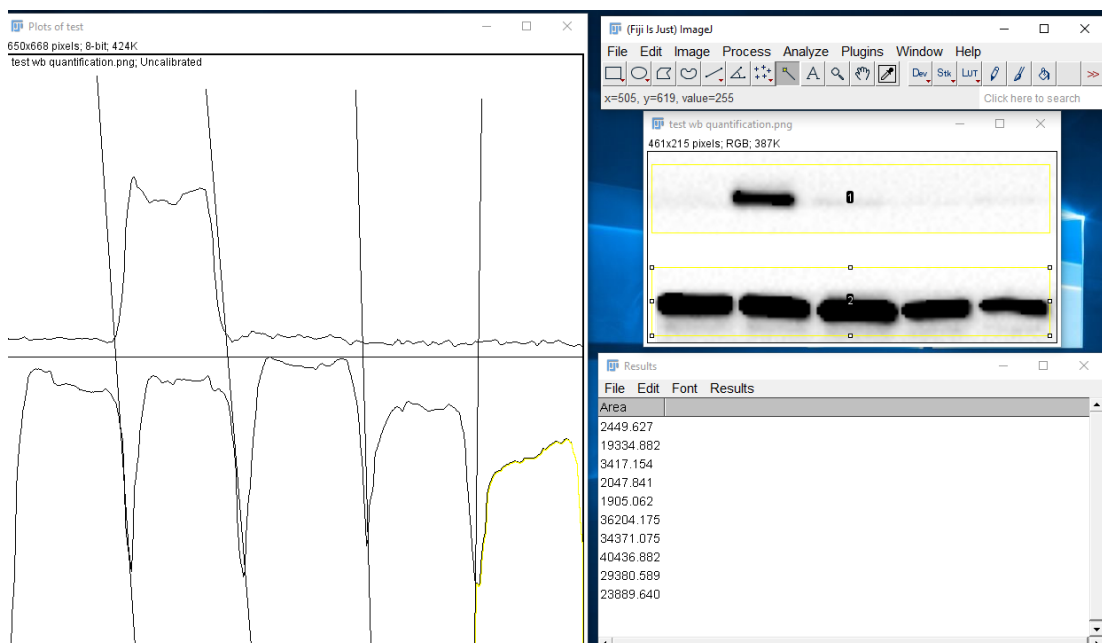


Figure 34- Exemple de quantification de l'intensité des bandes d'un western blot effectuée avec le logiciel Image J.

Le résultat quantitatif obtenu pour chaque condition est ensuite normalisé en le divisant par l'aire de la bande correspondante à la protéine GAPDH, utilisée comme « loading control ». Cela est fait afin de vérifier qu'une égale quantité de protéines totales par condition ont été chargées dans le gel. Suite à cette première opération le résultat est nouvellement divisé par le contrôle négatif (cellules sans stimuli), afin d'exprimer le résultat final en « fold-change », c'est-à-dire le facteur d'augmentation d'intensité pour chaque condition par rapport au contrôle négatif.

Niveau d'expression de la protéine y = $\frac{\text{aire de la condition x}}{\text{aire de la condition « contrôle négatif »}}$
 (aire de la GAPDH correspondante à la condition x / aire de la GAPDH correspondante au contrôle négatif)

Le contrôle négatif est donc introduit afin de normaliser les bandes, alors que la GAPDH est analysée pour comparer les conditions l'une à l'autre. Les données ainsi obtenues sont ensuite transférées au logiciel pour l'analyse statistique GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA 92108).

2.7.8.3 Squash pour la microscopie confocale

Pour l'évaluation du niveau de colocalisation entre la LPV et la mitochondrie, la superposition des deux fluorescences, correspondantes à chacun de ces deux facteurs, a été étudiée grâce au logiciel Fiji, en utilisant le plug-in Squash. Ce programme nous permet d'effectuer la

segmentation et la quantification des particules intracellulaires marquées, et d'en calculer le **coefficient de corrélation de Pearson (CCP)** et la **superposition entre l'aire des objets du canal rouge (toxine) et celle des objets du canal vert (mitochondrie)**. Plus particulièrement, nous avons déterminé l'aire de la fluorescence de la LPV, ou mieux de sa sous-unité LukS-PV, sur l'aire de la fluorescence du Cytochrome C des mitochondries. Le coefficient de Pearson nous donne la mesure de la corrélation linéaire entre deux variables. Dans le cas de nos expériences il s'agissait donc d'obtenir la corrélation entre les pixels des deux canaux dans l'ensemble de l'image.

Le coefficient de corrélation de Pearson : il s'agit d'une mesure de covariance, c'est-à-dire qu'elle détermine si et comment deux variables X et Y changent ensemble, autrement dit, c'est une mesure de leur dépendance. Cette valeur peut aller de -1 à 1. Si la valeur est entre -1 et 0 la corrélation linéaire est négative, c'est-à-dire que, quand la variable X augmente, la variable Y diminue et vice-versa. Si la valeur est à 0, cela indique qu'entre les deux variables il n'existe aucun type de corrélation linéaire et elles sont donc indépendantes l'une de l'autre. En dernier, si la valeur s'approche ou est égale à 1, les deux variables présentent une corrélation linéaire positive, et cela signifie que quand la variable X augmente, la variable Y augmente également, et vice-versa. (Figure 35).

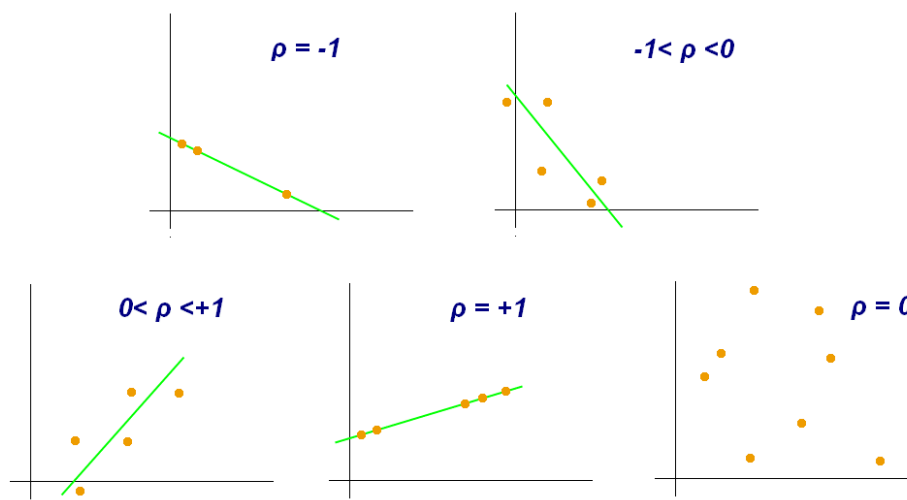


Figure 35- Exemples illustrant les graphiques de dispersion avec différentes valeurs de CCP.

Source : Wikipédia au site

https://it.wikipedia.org/wiki/Indice_di_correlazione_di_Pearson#/media/File:Correlation_coefficient.png

Concernant l'aire de superposition entre les deux canaux, nous avons évalué l'aire de la fluorescence correspondant à la LPV se superposant à celle correspondant à la mitochondrie. Nous avons exploité ces résultats afin d'avoir une mesure de la quantité de toxine se localisant à la mitochondrie.

Squassh est un outil informatique qui permet d'effectuer une segmentation des images en 2D ou 3D et la successive quantification du signal lumineux. Effectuer une segmentation signifie distinguer les différents objets dans une image de microscopie à fluorescence, ayant une distribution d'intensité constante et permettant ainsi une analyse basée sur chacun des « objets » de l'image, et non pas seulement sur l'analyse des pixels. Cette méthode permet ainsi de détecter, délimiter et quantifier les molécules fluorescentes dans les compartiments intracellulaires, tout en réduisant le bruit de fond dû à la fluorescence du background (Rizk et al. 2014).

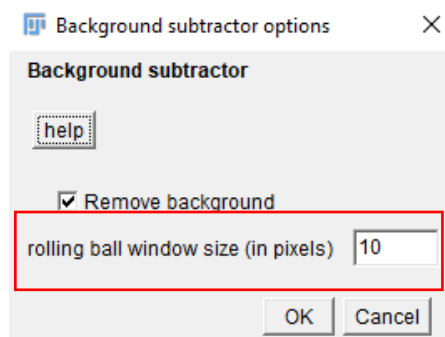
Pour chaque condition testée, nous obtenons un fichier qui présente une série de données concernant la colocalisation :

1. « **Coloc Objects Number** » : il s'agit du nombre d'objets trouvés après la segmentation du canal 1, qui se superposent à ceux du canal 2 et vice-versa.
2. « **Coloc Size Based** » : mathématiquement, c'est le ratio entre la taille totale des régions de colocalisation entre les deux canaux et le nombre total de pixels appartenant à tous les objets de l'image. Il permet de quantifier la fraction du volume occupé par les objets qui se superposent avec les objets de l'autre canal, par rapport à leur volume total.
3. « **Coloc Signal Based** » : il s'agit du ratio entre le signal total de la région de colocalisation d'un canal (1 ou 2) sur la totalité du signal du même canal. Ainsi, la mesure permet de quantifier la colocalisation de façon intensité-dépendante. Le logiciel prend en compte l'intensité des objets estimée par la procédure de segmentation, plutôt que l'intensité brute des pixels à l'intérieur d'un objet. Cela permet de mieux exclure le bruit de fond du vrai signal.
4. « **Pearson Corr Masked** » : il s'agit du coefficient de corrélation de Pearson, dont l'analyse peut être restreinte à une sélection d'une partie de l'image, par l'application d'un masque. Ce masque est réglé sur la base de l'intensité des pixels et peut donc permettre un meilleur tri des données de CCP.

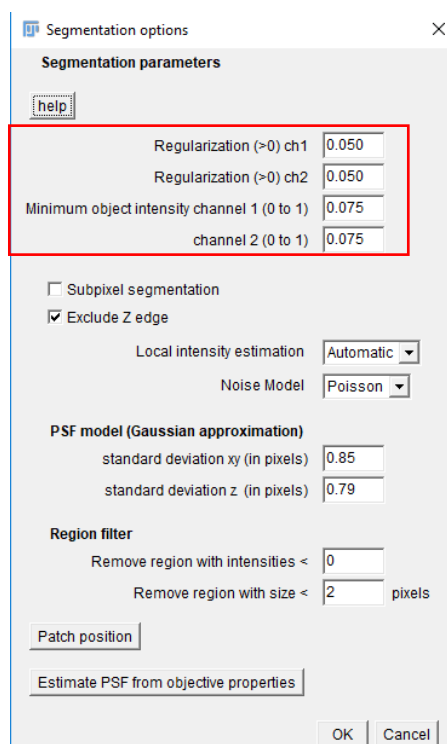
Ainsi, le Coefficient de corrélation de Pearson et le Coloc Signal Based ont été exploités pour la successive analyse statistique, étant les deux types de données adéquates pour obtenir une réponse en termes de colocalisation entre la LPV et la mitochondrie.

Concernant les paramètres choisis pour l'analyse, nous avons réglé le plug-in de la façon suivante :

1. « **Background subtraction** » : ce paramètre permet de réduire les signaux non spécifiques dus à une fluorescence du fond non liée aux objets à quantifier. Ce paramètre a été fixé à 10.



2. « **Segmentation parameters** » : ici nous avons pu modifier les limites inférieures de l'intensité des objets présents dans les deux canaux à prendre en compte pour effectuer l'analyse et pour exclure le bruit de fond.



Les résultats du CCP et du Coloc Signal Based pour chaque champ de chaque condition sont ensuite transférés dans le logiciel pour l'analyse statistique, GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA 92108).

2.7.9 Statistiques

Toutes les données issues des analyses informatiques décrites précédemment sont stockées et soumises à des tests statistiques à l'aide du logiciel GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA 92108). Ce logiciel nous permet de produire également des graphiques et de consulter les détails des différents tests appliqués aux données. Les graphiques choisis montrent la moyenne du paramètre à l'étude et l'erreur standard à la moyenne ou SEM, représenté par une barre, pour chacune des conditions expérimentales.

Pour les expériences de microscopie à fluorescence et de cytométrie en flux, le test de la variance ANOVA two-way a été choisi afin d'analyser la variance à deux facteurs, alors que le test one-way ANOVA a remplacé le précédent two-way ANOVA en présence d'une seule variable. Ensuite, des tests à *posteriori* ou post-hoc de Dunnet, Tukey et Bonferroni ont été appliqués, selon le cas, pour déterminer les différences parmi toutes les conditions.

Le test de Student ou T-test est effectué pour comparer le niveau de colocalisation entre les conditions en présence de 1 nM de la LPV et le contrôle négatif correspondant pour chaque temps d'incubation à l'étude.

Un résultat de *p*-valeur < 0,05 a été considéré significatif, selon le tableau suivant :

<i>Symbole</i>	<i>p-valeur</i>
<i>ns</i>	$P > 0,05$
*	$P \leq 0,05$
**	$P \leq 0,01$
***	$P \leq 0,001$
****	$P \leq 0,0001$

3 RESULTATS

Préambule : Dans cette section on analysera les résultats obtenus au laboratoire pendant ces trois années de doctorat. Cela sera effectué en résumant les données qui font l'objet de l'article scientifique couramment soumis au journal FASEB, tout en amplifiant le contenu par la présentation de résultats « satellites » complémentaires, souvent à caractère uniquement qualitatif. Chaque chapitre se terminera par une brève conclusion, afin d'en résumer les concepts-clé et en exposer la signification biologique. Cela sera suivi par des perspectives d'études, dont certaines nous ont permis d'avancer d'étape en étape dans la caractérisation de la NETose provoquée par la LPV.

3.1 NETose : de l'image à la quantification

3.1.1 Introduction

Les monocytes, les macrophages, mais surtout les polynucléaires neutrophiles humains sont les types cellulaires que l'EA7290 a majoritairement utilisé pour étudier les effets *in vitro* des leucotoxines staphylococciques. En effet, avec les neurones ganglionnaires, la LPV et HlgCB ciblent de préférence ces cellules de l'immunité humaine. Un même profil pourrait y être comparé : celui des cellules capables de produire des pièges extracellulaires dites "extracellular trap", ou ET. Effectivement, comme déjà décrit, ce phénomène prend le nom de NETose si la cellule concernée est un polynucléaire neutrophile. Cependant, les études plus récentes ont montré que le même phénomène est présent chez d'autres types cellulaires, tels que les monocytes et les macrophages, parmi d'autres. D'un autre point de vue, l'augmentation de la perméabilité membranaire, manifestée très tardivement chez les hPMNs exposés à des faibles concentrations de la LPV, nous a encouragé à nous interroger sur le lien potentiel entre les effets cytotoxiques de la LPV et cette mort cellulaire programmée. L'étude approfondie des manifestations intéressant les hPMNs constitue donc le corpus de ce travail de thèse.

Toutefois, bien que la méthode de purification, ainsi que les conditions de culture des cellules, assurent aux hPMNs une durée de vie adéquate et un apport d'éléments essentiels suffisants pour reproduire une situation proche du physiologique, ce type cellulaire est un modèle délicat à

manipuler, rendant difficile ou non reproductible un certain nombre de tests, comme par exemple la transfection. Ainsi, dans un premier temps il a fallu comprendre les raisons et éliminer les causes d'une variabilité de réponses aux stimuli qui apparaissait trop importante pour pouvoir appliquer une méthode rigoureuse aux expériences *in vitro*. Autrement dit, les hPMNs montraient un état très inhomogène suite à leur purification, ce qui était manifestement dépendant du donneur. Nombreuses préparations cellulaires ont ainsi dû être éliminées, en raison d'une activation exagérée des hPMNs bien avant leur stimulation par les leucotoxines. De plus, malgré les précautions et le tri des échantillons effectués avant le début de nos tests, les résultats initiaux des expériences d'immunomarquage en fluorescence étaient encore affectés par un niveau de variation intra-donneur non négligeable, comme illustré par la Figure 36.

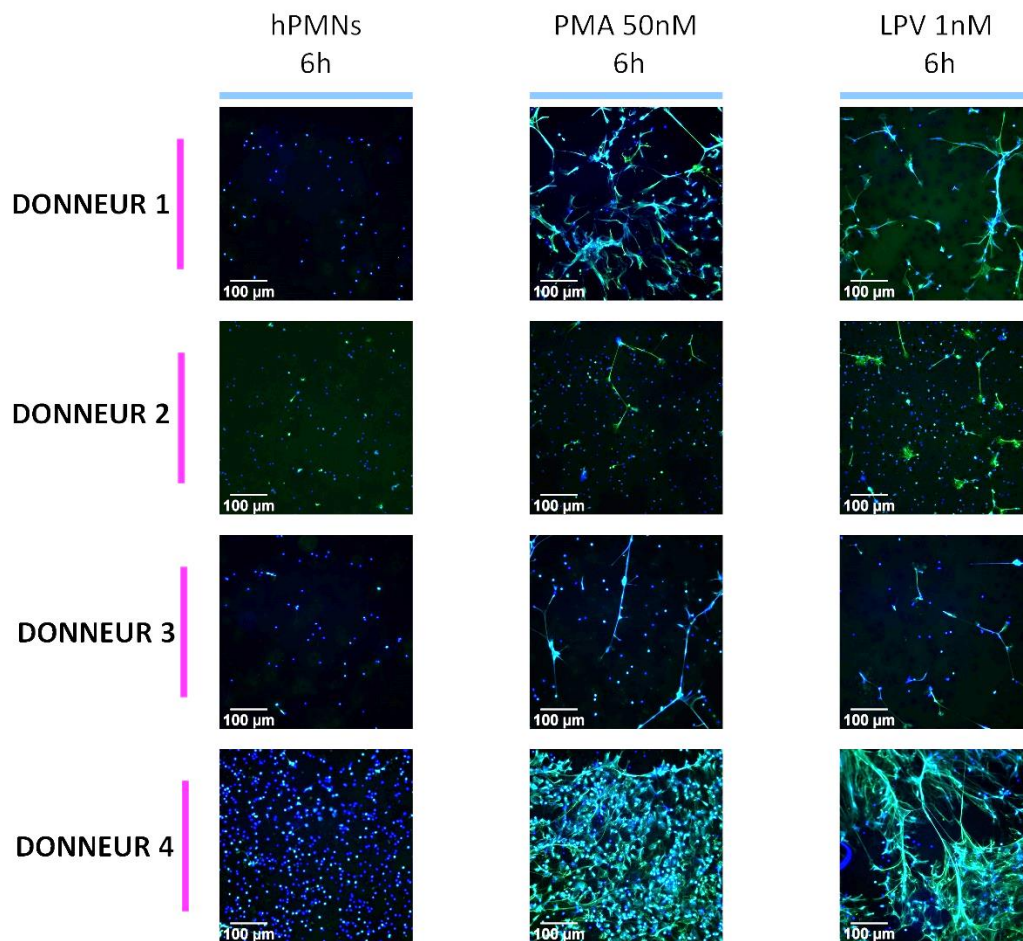


Figure 36- Les hPMNs isolés à partir de buffy coats issus de donneurs de toutes âges montraient une variabilité de réponse aux stimuli trop importante.

Différents essais d'immunomarquage de hPMNs à partir de prélèvements sanguins de donneurs de toute âge. En vert l'EN et en bleu l'Hoechst, qui marque l'ADN. Grossissement x100. Temps d'incubation= 6h.

La solution à ce premier « défi » a été obtenue en sélectionnant l'âge des donneurs. En effet, nous avons rapidement remarqué que les buffy coats dérivait le plus fréquemment de donneurs ayant plus que 50 ans. Cette donnée nous a mené à nous renseigner sur les causes qui pourraient être à la base de cette différence entre donneurs plus âgés et moins âgés. En consultant le site de l'Établissement Français du sang on peut y trouver les contre-indications au don de sang, ainsi que les critères d'exclusion.

En pratique, les donneurs de sang accepté à l'EFS, d'où nos buffy coat proviennent, peuvent être toutes personnes âgées de 18 à 70 ans, qui pèsent plus de 50 kg. Cependant, les contre-indications liées à des actes de soin, un état de santé ou des antécédents médicaux comprennent :

1. Des traitements de prise **d'antibiotiques** en cours ou arrêté depuis moins de 2 semaines.
2. La prise de **certaines médicaments** comme le Roaccutane®, mais également les corticoïdes, parmi d'autres.
3. **Infection** ou fièvre de plus de 38 °C datant de moins de 2 semaines ou des infections actives transmissibles par le sang : hépatites virales, syphilis, infection par le VIH ou par le HTLV, maladie de Chagas, parmi d'autres, ou des antécédents de paludisme.
4. Un contact récent avec une personne atteinte d'une **maladie contagieuse**.
5. Une **vaccination** effectuée depuis moins de 4 semaines.
6. Une **intervention chirurgicale** ou examen endoscopique dans les 4 derniers mois ou un soin dentaire avec risque de passage de bactéries dans le sang.
7. Des traitements par **hormones** de croissance avant 1989.
8. Des antécédents familiaux de **maladie à prion**, antécédents de **transfusion** ou de **greffe**.

Ce qui ressort de cette liste est que seulement certains traitements médicamenteux font partie des critères d'exclusion au don de sang. Par conséquent, d'autres traitements au long cours pouvant affecter l'état des hPMNs ne sont pas écartés lors de l'entretien préliminaire au don de sang. Ces médicaments peuvent avoir un effet néfaste sur les hPMNs, notamment quand ils sont accompagnés du facteur « âge » des neutrophiles, comme indiqué par Adrover et al. (Adrover et al. 2016). En effet, ces auteurs illustrent les changements et les différences entre les neutrophiles « frais », c'est-à-dire peu de temps après la mise dans la circulation sanguine, et les hPMNs « âgés ». Ces derniers seraient éliminés de la circulation sanguine suite à l'expression de certaines molécules d'adhésion, qui seraient à la base d'un phénotype proche à celui des hPMNs activés par des agonistes inflammatoires. À côté de cela, les neutrophiles semblent augmenter le nombre de lobes du noyau quand ils deviennent matures (Tak et al. 2013), ce qui leur assure une

majeure flexibilité. Cela faciliterait donc leur migration au foyer infectieux, mais pourrait également jouer un rôle encore méconnu concernant l'organisation intranucléaire ou l'expression génique.

D'un autre point de vue, des études sur le degré de gravité des pneumonies causées par *S. aureus* LPV⁺ ont montré que les patients plus jeunes présentaient un pronostic plus sombre (Gillet et al. 2002; Diep et al. 2013).

Pour toutes ces raisons, nous avons décidé de nous servir uniquement de buffy coats de donneurs moins âgés, c'est-à-dire n'ayant pas plus qu'une trentaine d'années, environ.

Une fois que cette étape a été franchie, les cellules purifiées se présentaient presque toujours en très bon état et les résultats ont été reproductibles et cohérents d'un réplicat biologique à l'autre.

3.1.2 Résultats qualitatifs

En premier lieu, je montre ici les expériences de vidéo-microscopie qui nous permettent d'évaluer l'état des hPMNs exposés à une concentration de 1 nM de LPV. Ainsi, comme l'on peut observer de la Figure 37, nous pouvons remarquer que la perméabilité membranaire, indiquée par l'entrée du BEt (en rose) atteint son maximum à 6h d'incubation avec la LPV (Figure 37 C). Tout de même, un pourcentage limité de hPMNs apparaît perméabilisé déjà après 1h/ 2h de l'exposition à la leucotoxine (Figure 37 B). Le marquage à l'Hoechst nous permet d'observer les noyaux à morphologie typiquement polylobée des hPMNs non stimulés (Figure 37 A, cellules après 10 min d'exposition à la LPV).

Il est intéressant d'examiner la photo au milieu (B, à environ 2 h du contact avec la LPV), puisque on peut remarquer que les hPMNs non perméabilisés, et donc encore marqués en bleu par le Hoechst, montrent un changement de morphologie très intéressant. En effet, leurs noyaux apparaissent plutôt ronds et il y a clairement une expansion du contenu nucléaire à un stade où la cellule est encore intègre d'un point de vue de la membrane plasmique. La morphologie polylobée est perdue et le diamètre du noyau semble augmenter. Cette étape rappelle la phase de décompactage de la chromatine nucléaire détaillée dans l'introduction (Sollberger et al. 2018b), nous poussant encore plus vers un lien LPV-NETose.

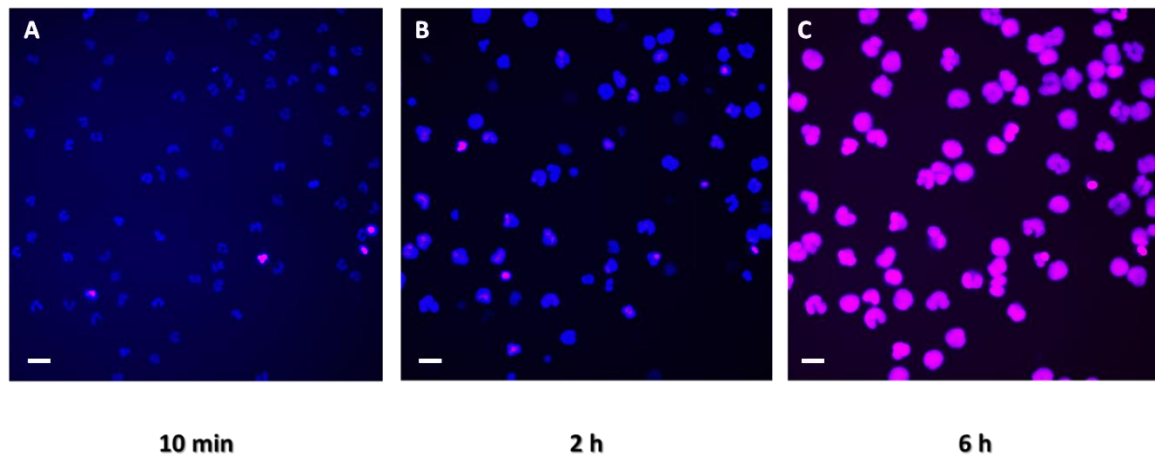


Figure 37- Des hPMNs exposés à 1nM de LPV pendant 6h.

Clichés extraits d'une expérience de vidéomicroscopie en fluorescence. Les hPMNs ont été exposés pendant 6h à 1 nM de la LPV, et pris en photo toute les minutes afin de réaliser une vidéo en *time-lapse*. Le marquage à l'Hoechst (en bleu) est choisi en raison de la possibilité de l'utiliser sur des cellules vivantes et il marque les noyaux de tous les hPMNs, étant perméable aux membranes. Un contre-marquage avec le BEt (en rose) montre l'ADN des hPMNs uniquement après perte de l'intégrité membranaire, s'agissant d'un marqueur non perméable aux membranes. Grossissement x100 et barre d'échelle= 10µm

D'ailleurs, par marquage au SYTO 9 Green, nous pouvons remarquer que les hPMNs explosent en libérant le contenu cellulaire et formant des NETs, photo D (flèche blanche) (Figure 38).

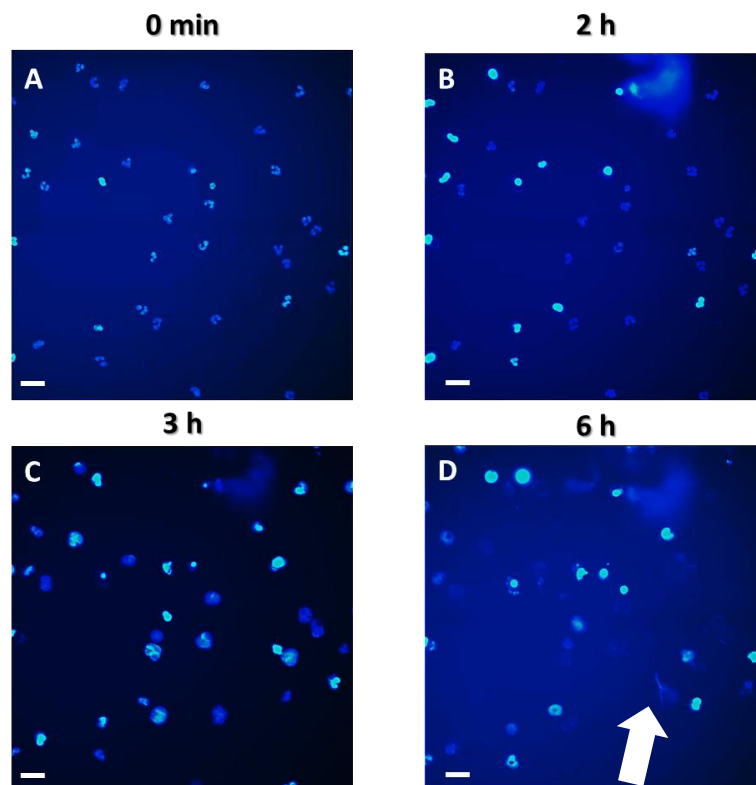


Figure 38- hPMNs exposés pendant 6 h à 1 nM de LPV et marqués au SYTO 9 Green.

Clichés extraits d'une expérience de vidéomicroscopie en fluorescence. Les hPMNS ont été exposés pendant 6h à 1 nM de la LPV et pris en photo toutes les minutes afin de réaliser une vidéo en *time-lapse*. Les cellules montrent une éjection de leur contenu après environ 3 h d'incubation avec 1nM la LPV. Le SYTO 9 Green (en vert) et le Hoechst (en bleu) nous permettent de suivre l'évolution de la morphologie des noyaux et de la chromatine des hPMNs. Grossissement x100 et barre d'échelle= 10µm

Par conséquent, les deux leucotoxines LPV et HlgCB ont été testées en contact avec les hPMNs dans le but d'analyser le pourcentage de cellules positives à l'Élastase du Neutrophile (EN), une sérine protéase utilisée comme marqueur de NETose. Les concentrations des deux toxines ont été choisies en fonction des constantes de dissociation avec le C5aR (Kd) chez les hPMNs, précédemment publiées par Tawk et al. (Tawk et al. 2015). Ces Kd indiquaient une concentration d'environ 0,25 nM pour la LPV et de 1 nM pour HlgCB. Également, les résultats obtenus par Zimmermann et collègues en 2016, nous ont donné une indication concernant les concentrations de LPV auxquelles les hPMNs montraient un pic de perméabilité membranaire au bout de 6h d'incubation (Zimmermann-Meisse 2016). Ainsi, les hPMNs ont été exposés à 1 nM et 0,1 nM de LPV, 1 nM et 0,1 nM de HlgCB, 50 nM de PMA ou laissés en absence de stimuli, dans le milieu de culture habituel. Ensuite, une concentration intermédiaire de chaque leucotoxine a été introduite : 0,25 nM pour la LPV et 0,5 nM pour la HlgCB. **Ces résultats sont décrits dans la première partie de l'article scientifique soumis au journal FASEB.** Les images de la Figure 39 montrent une expérience d'immunofluorescence représentative effectuée afin de marquer l'EN (en vert) et pouvoir calculer le pourcentage de hPMNs en NETose sur la totalité des hPMNs (marquage à l'Hoechst en bleu). Comme l'on peut clairement l'observer, la NETose est très évidente en conséquence de l'action du PMA, mais aussi de deux concentrations de la LPV : 1 nM et 0,25 nM. Concernant HlgCB, les hPMNs ne semblent pas réagir en produisant des filaments de chromatine décorés par l'EN, malgré la présence d'un nombre limité et variable de cellules positives à ce marqueur.

Il est donc évident que la morphologie des hPMNs montre une NETose temps- et dose-dépendante suite à l'action de la LPV, ce qui ne semble être pas également vrai concernant l'action de la HlgCB.

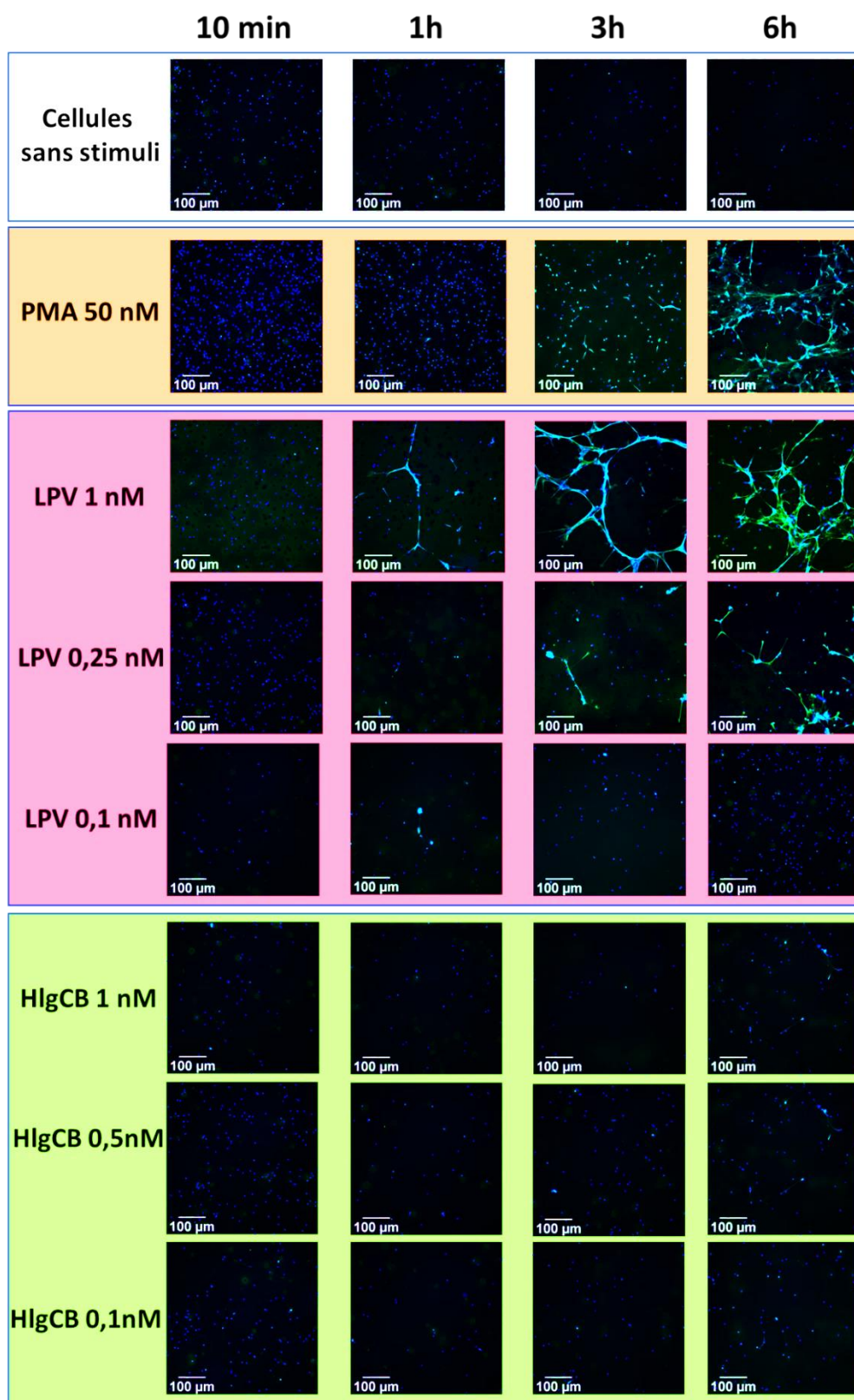


Figure 39- Résultats des expériences d'immunofluorescence avec les hPMNs exposés aux différents stimuli de à 10 min, 1h, 3h et 6h.

Expérience d'immunomarquage à différents temps d'incubation entre hPMNS et stimuli. En vert l'EN est marquée par un anticorps spécifique, et un contre-marquage à l'Hoechst permet d'observer l'ADN et les noyaux en bleu. Grossissement x100. N=7.

Le même résultat a été confirmé uniquement pour le temps d'incubation à 6h, en marquant les hPMNs exposés au PMA et à la LPV avec un anticorps anti-MPO (Figure 40). Trois marqueurs sont utilisés pour obtenir une image composite illustrant l'ADN et les noyaux avec le Hoechst, l'EN grâce à un anticorps couplé à l'Alexa488, et la MPO grâce à un anticorps couplé à l'Alexa 555.

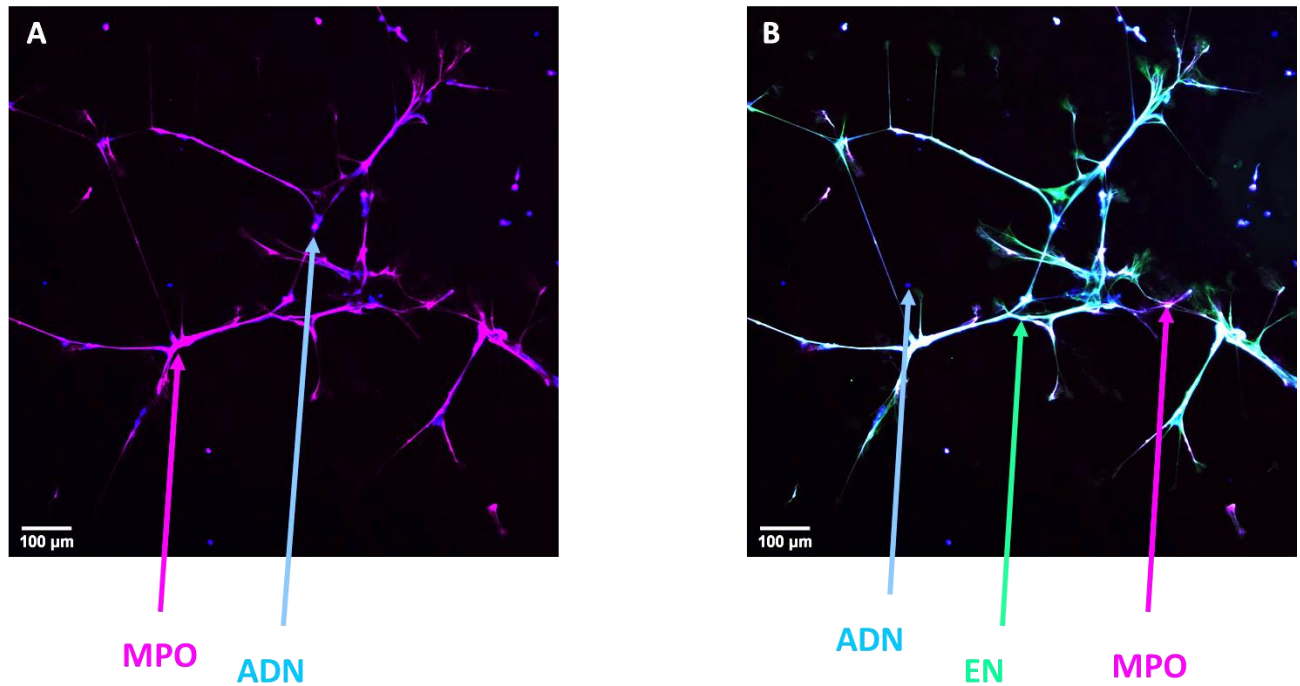
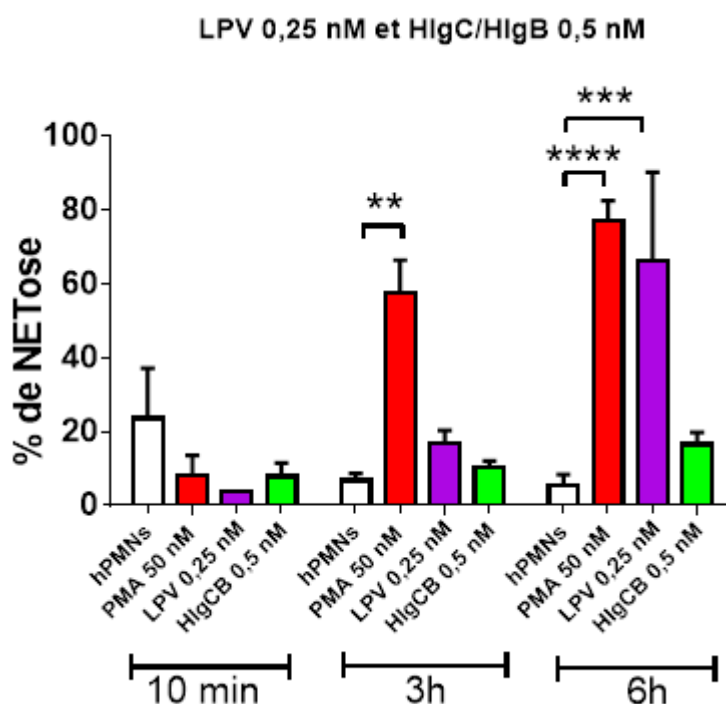
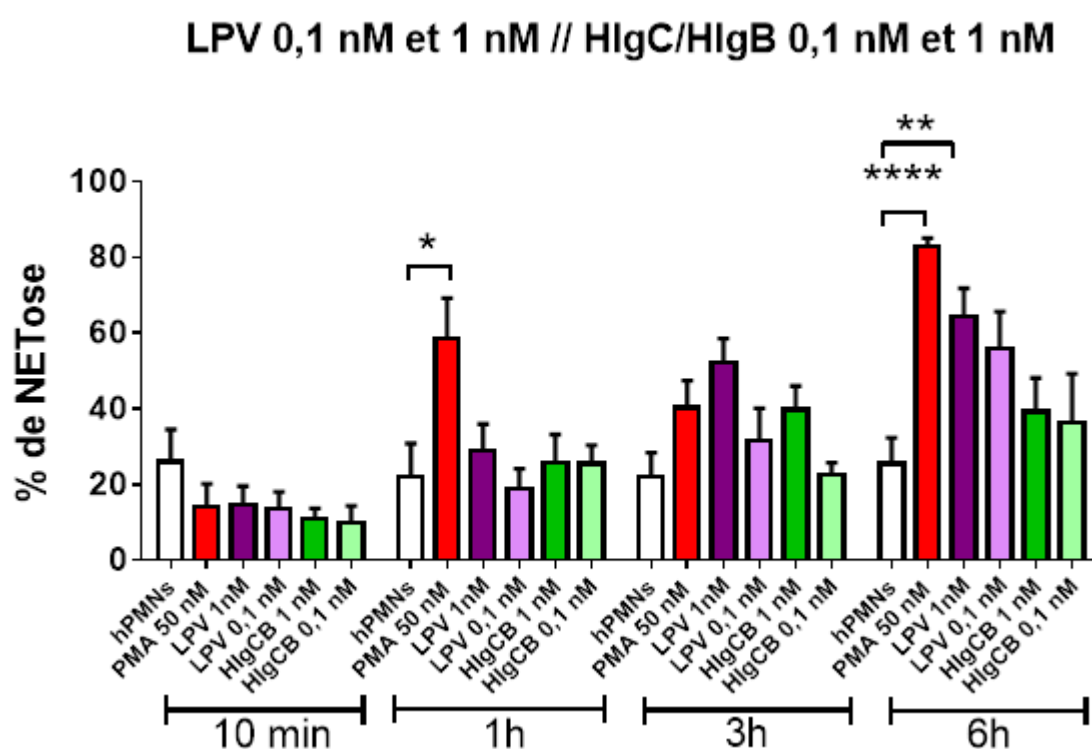


Figure 40- hPMNs exposés pendant 6 h à 1 nM de LPV et marqués pour montrer l'EN et la MPO.

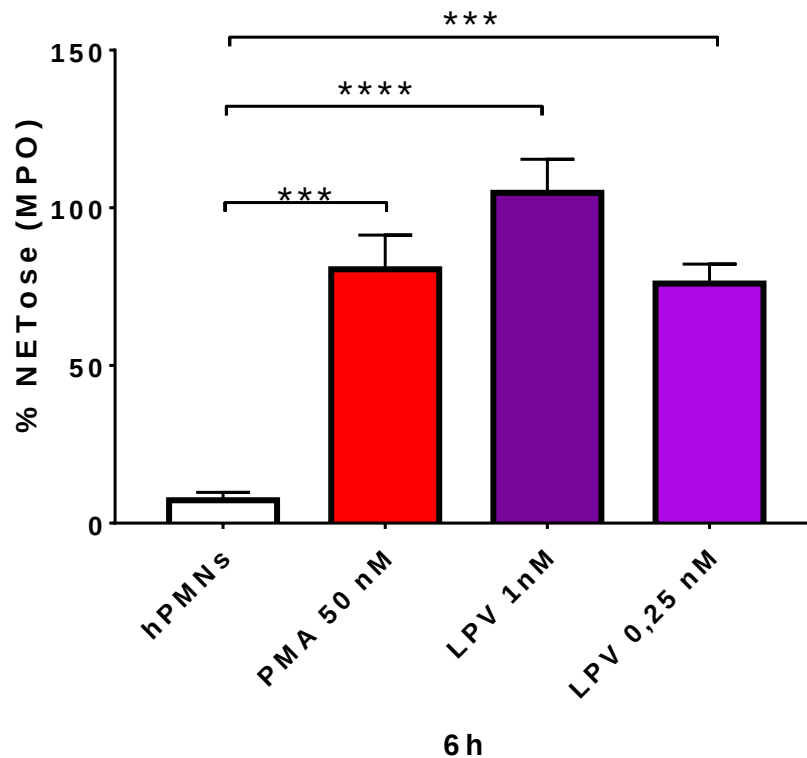
Expérience d'immunomarquage à 6h d'incubation où les hPMNS ont été exposés à 1 nM de la LPV. Les noyaux sont marqués avec le Hoechst en bleu, le MPO en rose et l'EN en vert. Grossissement x100. N= 4.

3.1.3 Résultats quantitatifs et statistiques

Huit photos par filtre d'émission fluorescente (Hoechst, EN et MPO) et par condition ont été prises et transférées au logiciel CellProfiler et les moyennes sont ensuite analysées avec le logiciel Prism en appliquant un test Two-way ANOVA et un post-hoc Bonferroni. Les deux histogrammes ci-dessous montrent en premier lieu la forte variabilité de réponse aux toxines, représenté par des barres d'erreur souvent importantes et le niveau considérable de NETose présent chez les hPMNs non stimulés (environ 30% !).



Néanmoins, les hPMNs ayant un niveau de NETose significativement plus élevé par rapport au contrôle négatif sont ceux stimulés avec le PMA et 1 nM et 0,25 nM de la LPV uniquement, reflétant ainsi l'analyse qualitative illustrée dans le paragraphe précédent. La quantification du niveau de MPO pour la LPV et le PMA à 6h donne des résultats similaires.



3.1.4 Discussion

Les expériences ont été répétées plusieurs fois en raison d'une réponse inhomogène entre un buffy coat et l'autre. Cependant, ces premiers résultats montrent clairement que la LPV et HlgCB à des si faibles concentrations ne provoquent pas les mêmes changements morphologiques chez les hPMNs. En effet, seulement la LPV est capable de provoquer une NETose significative après 6 heures d'incubation. Pourtant, la LPV à 0,1 nM ne semblerait pas être une dose suffisante pour déclencher le processus de NETose chez les hPMNs testés.

En conclusion, la LPV provoque un processus de NETose très évident pour des concentrations inférieures ou égales à 1 nM, différemment de HlgCB. Encore une fois, la LPV et HlgCB montrent une différence concernant les conséquences cellulaires chez les hPMNs. Ce résultat nous a donc permis d'identifier un nouveau processus provoqué par la LPV uniquement. Par

conséquent, nous nous sommes intéressés à cette leucotoxine et aux caractéristiques particulières du phénomène de NETose qu'elle initie chez les hPMNs.

3.1.5 Perspectives

Trois réflexions principales sont à faire en conséquence de ce premier résultat.

En premier lieu, le choix des concentrations des toxines est une étape fondamentale pour l'étude de leur apport chez les hPMNs. Notamment, les études précédentes nous ont montré que une dose trop élevée de la LPV conduit à la mort cellulaire par nécrose, alors qu'à faibles doses une apoptose était signalée (Genestier et al. 2005). Toutefois, choisir les concentrations des deux leucotoxines sur la base des publications traitant ce sujet, n'est pas une opération facile. En effet, les concentrations des leucotoxines sont très difficiles à doser dans un contexte infectieux et souvent elles varient énormément, dépendamment de la zone d'infection évaluée. Ainsi, la décision de doser les Kd chez les hPMNs et d'utiliser des concentrations proches de ces données a été le choix plus pertinent fait par l'EA7290. Néanmoins, on pourrait se demander s'il existe un seuil et comment le déterminer, afin d'évaluer le spectre de conséquences des deux leucotoxines en suivant des concentrations intermédiaires et croissantes. Autrement dit, on pourrait se demander s'il existe un passage entre apoptose, NETose et nécrose, lié notamment à la concentration de la LPV, sans exclure des processus alternatifs, tels que la Pyroptose, dont des études ont signalé un potentiel lien directe avec la NETose (Sollberger et al. 2018a).

En deuxième lieu, il est intéressant de remarquer que, puisque les hPMNs ne sont pas les seules cellules sensibles aux leucotoxines testées, un modèle cellulaire différent, comme les monocytes ou les macrophages pourrait être utilisé pour étudier l'éventuel relargage de chromatine et l'ETose provoquée par la LPV ou HlgCB. D'ailleurs, un tel modèle cellulaire *in vitro* permettrait d'appliquer des tests de plus longue durée, comme la transfection, dans le but d'inactiver des gènes spécifiques. Encore une fois, ces études ne devraient pas se limiter à l'évaluation d'Extracellular Traps ou MET (Monocytes/Macrophages extracellular Traps), mais plutôt étendre l'analyse de conséquences comme la pyroptose, parmi d'autres. Le but ultime de *S. aureus* pourrait effectivement prévoir la non-activation des monocytes, ce qui en empêcherait leur différenciation en macrophages. Ce mécanisme permettrait finalement à la bactérie de s'échapper du système immunitaire, via la neutralisation des hPMNs.

Finalement, l'étude des conséquences cellulaires propres à HlgCB n'a pas donné des réponses concluantes, ce qui pourrait être dû au fait que la leucotoxine a une fonction différente, liée à la formation de combinaisons non canoniques des sous-unités S et F avec celles de la LPV. Des expériences qui visent à étudier la réponse cellulaire à ces combinaisons croisées de sous-unités seraient à prévoir dans le but d'analyser une situation infectieuse plus complexe, en raison de la présence de souches de *S. aureus* capables de produire simultanément la LPV et HlgCB.

3.2 Dérivés réactifs de l'oxygène : *it's not only a NADPH oxidase issue*

3.2.1 Introduction

Une fois que la NETose a été identifiée étant la mort cellulaire principale causée par des faibles concentrations de LPV chez les hPMNs, nous nous sommes intéressés aux détails qui font partie de ce processus, en nous appuyant sur les connaissances présentes dans la littérature scientifique. Ainsi, la source de dérivés réactifs de l'oxygène semblait créer une « croisée de chemins » entre deux types de NETose parallèles et dépendantes du stimulus appliqué : la NETose NOX-dépendante et la NETose NOX-indépendante, terme qui, à part indiquer la non implication de la NADPH oxydase, ne donnait pas plus d'informations concernant la ou les sources alternatives. **Ces résultats sont décrits dans la deuxième partie de l'article scientifique soumis au journal FASEB.**

En résumé, la réponse à cette question a été recherchée initialement par l'inhibition pharmacologique de l'enzyme NADPH oxydase, où l'utilisation du DPI est justifiée du fait de sa capacité à empêcher le transport d'électrons à l'oxygène, en se liant au domaine flavine de l'enzyme. Suite à cette inhibition, les hPMNs sont stimulés et l'EN est recherchée par immunofluorescence. Cependant, les résultats nous ont montré tout de suite comment le PMA et la LPV différaient dans l'induction de NETose. En effet, le PMA se confirme être un stimulus induisant une NETose NOX-dépendante, puisque les cellules prétraitées avec le DPI et successivement exposées à 50 nM de PMA ne montraient quasiment plus de NETose (Figure 41).

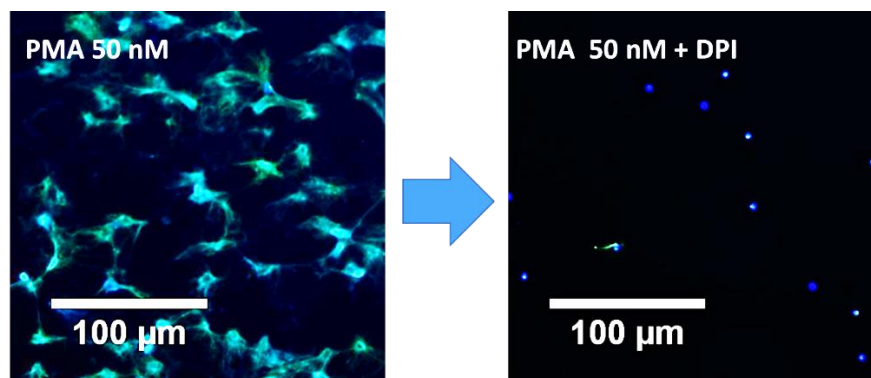


Figure 41- Effet du prétraitement au DPI sur la NETose induite par le PMA.

Expériences d'immunomarquage de hPMNs exposés aux stimuli pendant 6h. Dans la figure de gauche les hPMNs sont stimulés avec 50 nM de PMA, alors qu'à droite on remarque que le pré-traitement au DPI avant l'ajout du PMA empêche la NETose. En vert l'EN et en bleu les noyaux et l'ADN. Grossissement x100. N= 7.

Inversement, la LPV à 1nM et 0,25 nM ne montre pas une telle dépendance de la NADPH oxydase, et au contraire, la NETose provoquée par la leucotoxine chez des hPMNs prétraités au DPI apparait presque plus présente (Figure 42).

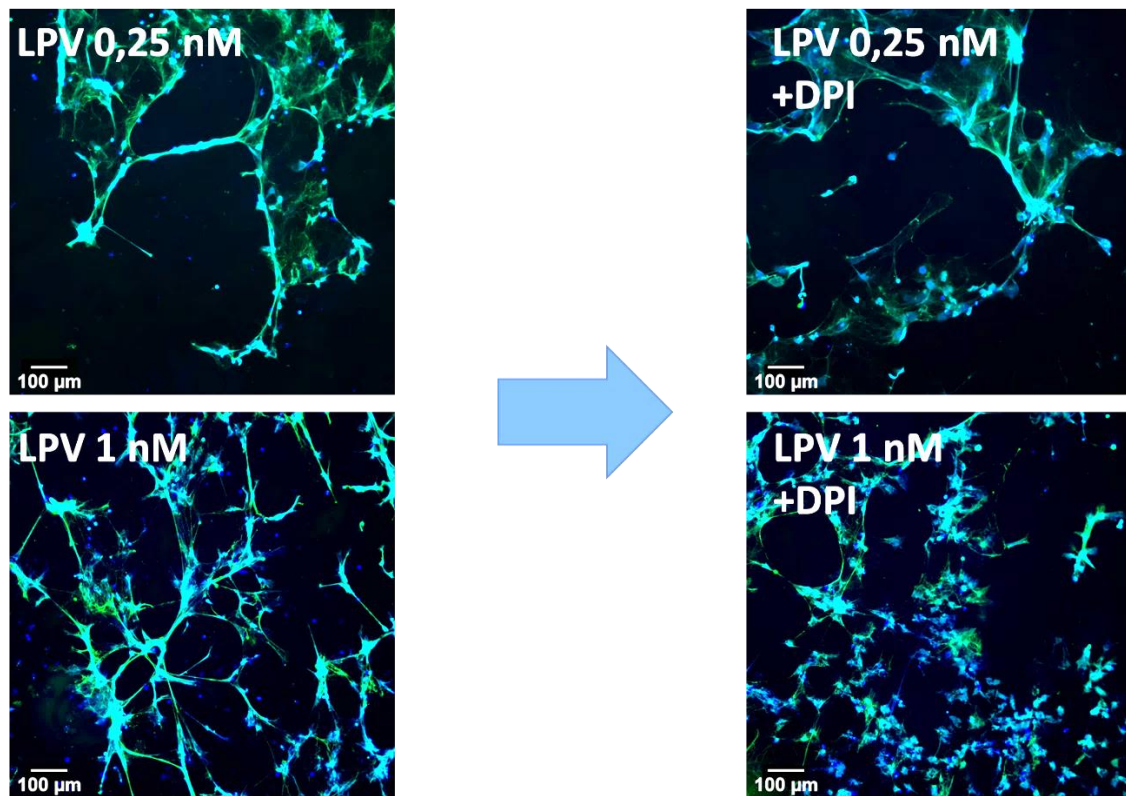


Figure 42- Le DPI n'inhibe pas la NETose provoquée par la LPV.

Expériences d'immunomarquage de hPMNs exposés aux stimuli pendant 6h. Dans les figures de gauche les hPMNs sont stimulés avec 1 nM ou 0.25 nM de la LPV, alors qu'à droite on remarque que le pré-traitement au DPI avant l'ajout du PMA n'a pas d'effet inhibiteur sur la NETose à LPV. En vert un marquage d'EN et en bleu le Hoechst marque les noyaux et l'ADN. Grossissement x100. N=7.

De ce fait, la NETose à LPV semblait être NOX-indépendante, différemment de la NETose provoquée par le PMA. Pour confirmer ces données, nous avons voulu étudier les DROs produits dans ces deux types de NETose par cytométrie en flux. Nous avons suivi la fluorescence de la sonde DHR123 pour établir le niveau de DROs cytosoliques produits par les hPMNs en contact avec les stimuli. Le test avec la sonde DHR123 est couramment utilisé en clinique pour évaluer si un patient est atteint de la Maladie Granulomateuse Chromique ou MGC, une condition génétique qui implique des anomalies de la fonction phagocytaire des neutrophiles, dues à un

défaut de la NADPH oxydase. Ce test prévoit un contrôle positif par stimulation avec le PMA, étant reconnu comme inducteur de la NADPH oxydase (Figure 43).

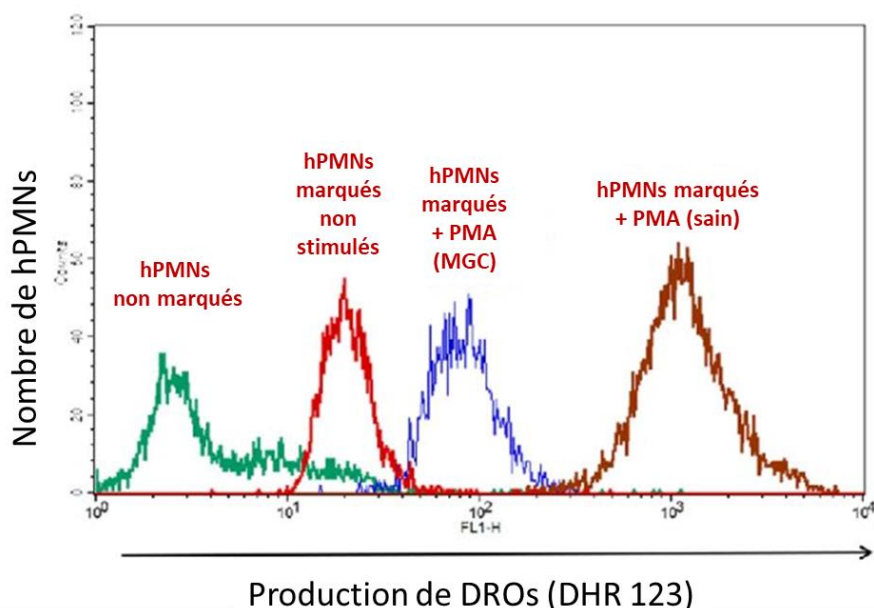


Figure 43- Exemple de résultats obtenu en clinique par l'emploi de la sonde DHR123. La Dihydrorhodamine-1,2,3 (DHR123) devient fluorescente uniquement en présence de DROs produits par la NADPH oxydase.

Résultat d'un test diagnostique qui montre que le niveau de DROs produits par les leucocytes, indiqué par la fluorescence de la DHR123. Les DROs sont très réduits chez des patients atteints de MGC. Des cellules de patients malades ou sains sont mises en contact avec la DHR123 et stimulées avec du PMA (100 ng/ml). L'analyse est effectuée avec un cytomètre en flux pour l'analyse des DROs. Ici représentées les moyennes de fluorescence des différents groupes : en rouge la fluorescence des cellules non stimulées et marquées avec la DHR, en vert les cellules non marquées, en bleu les cellules des patients atteints de MGC stimulés par le PMA, et en marron les cellules des donneurs sains stimulées avec le PMA. Figure adaptée de (Mortaz et al. 2018).

Le même test est donc effectué suite à la purification des hPMNs, qui sont mis en contact avec le PMA, la LPV ou laissés sans stimuli. Les résultats montrent que'alors que le PMA provoque effectivement une poussée oxydative due à la NADPH oxydase, la LPV ne provoque pas la libération de ce type de DROs, et en plus elle n'est pas affectée que légèrement par l'inhibition du DPI (Figure 44).

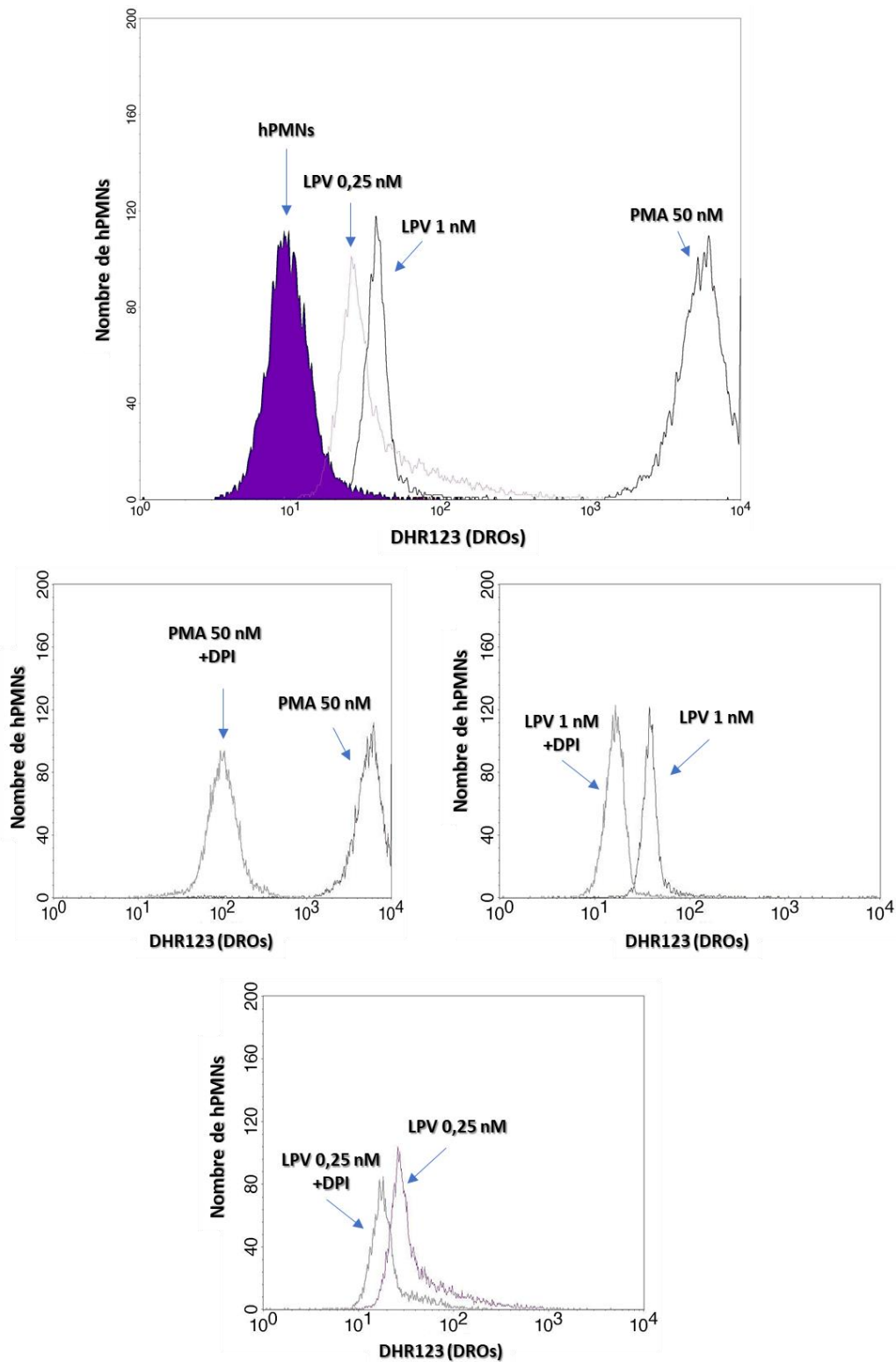


Figure 44- Le PMA, mais pas la LPV provoque un *burst* oxydatif significatif lié à l'activité de la NADPH oxydase.

Les hPMNs sont laissés dans leur milieu de culture ou bien prétraités pendant 30 min avec 20 μ M de DPI. Ensuite, la LPV ou PMA sont rajoutés aux cellules et une analyse de cytométrie en flux est réalisée. Le contrôle négatif est représenté par des cellules non stimulées. La fluorescence de la DHR123 est analysée dans le canal vert (525/530 nm). Temps d'incubation= 60 min. N=3. Cytomètre : FACSort® Beckton-Dickinson (Le Pont de Claix, France)

Néanmoins, exclure l'implication de la NADPH oxydase du processus de NETose à LPV n'est pas un élément qui apportait assez d'informations pour comprendre la mécanique à travers laquelle la leucotoxine arrive à initier un tel phénomène.

Une autre source de réactifs oxygénés était effectivement exploitée ou stimulée, afin de produire le niveau de DROs nécessaire au processus. Nous avons donc considéré l'apport de la mitochondrie, du fait que, pendant la phosphorylation oxydative, des DROs sont produits dans la cellule à partir de cette organelle. De plus, la partielle, mais non significative inhibition de DHR123 indiquée en présence de DPI suggérait que cet inhibiteur pouvait avoir eu un léger effet également au niveau mitochondrial (Lambert et al. 2008). Ainsi, par l'utilisation de la sonde MitoSOX nous avons procédé comme préalablement avec DHR123. Le MitoSOX est analysé dans le canal Jaune (583/26 nm), nous avons donc pu obtenir des résultats complètement opposés par rapport à ceux issus de l'étude avec la DHR123. En effet, contrairement au PMA, la LPV, notamment à 1 nM, provoquait une augmentation très élevée de la fluorescence du MitoSOX, ayant un pic après 1 h d'incubation. Le même phénomène était remarqué avec 0,25 nM de la LPV, bien que dans une mesure inférieure (Figure 45). Ces mêmes résultats ont été obtenus initialement avec le cytomètre FACSsort® Beckton-Dickinson (Le Pont de Claix, France) (image non montrée) et ensuite confirmés avec le cytomètre Guava easyCyte 8HT system flow cytometer (EMD, Millipore, Burlington, Massachusetts, USA), un instrument plus précis, qui nous permettait d'obtenir des données plus fiable en général (Figure 36).

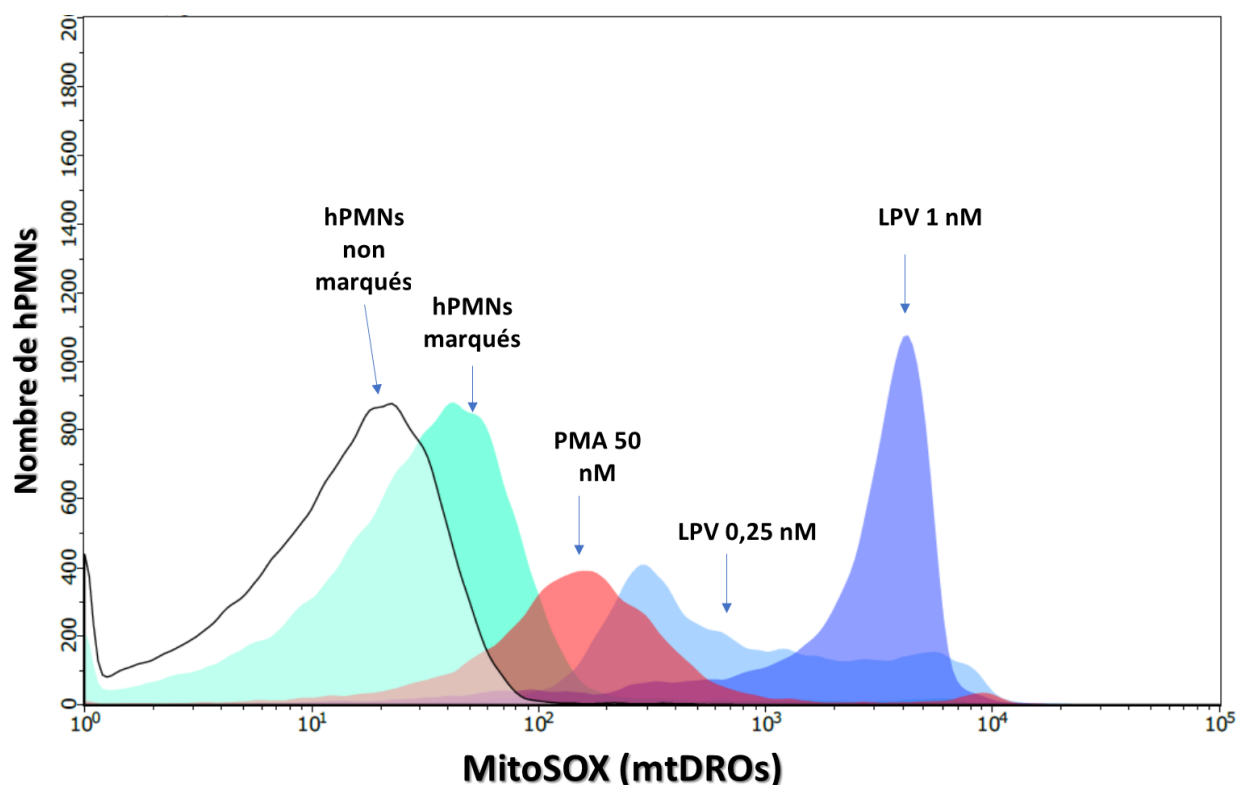


Figure 45- Les mtDROs marqués par la sonde MitoSOX avec le PMA ou la LPV.

Les hPMNs sont laissés dans leur milieu ou exposés à la LPV ou PMA. Une analyse de cytométrie en flux est réalisée afin d'évaluer les mtDROs par l'étude de la fluorescence du MitoSOX. Le contrôle négatif est représenté par des cellules non stimulées. On peut voir qu'à 1 h d'incubation les hPMNs montrent clairement une augmentation des DROs dérivant de la mitochondrie, contrairement au PMA qui ne se différencie pas significativement du contrôle négatif. Temps d'incubation= 60 min. Cytomètre: Guava easyCyte 8HT system flow cytometer (EMD, Millipore, Burlington, Massachusetts, USA). N =6.

Ce résultat a été ultérieurement vérifié de deux manières. Tout d'abord, un prétraitement des hPMNs avec le DNP est effectué avant la stimulation des cellules, afin de découpler la phosphorylation oxydative de la mitochondrie et lui empêcher de contribuer à la production de DROs dans le processus de NETose à LPV (Figure 46). L'autre par une méthode indirecte : toujours avec un prétraitement des hPMNs avec le DNP, suivi par une analyse en immunofluorescence avec un anticorps anti-EN, afin d'évaluer la NETose (Figure 47).

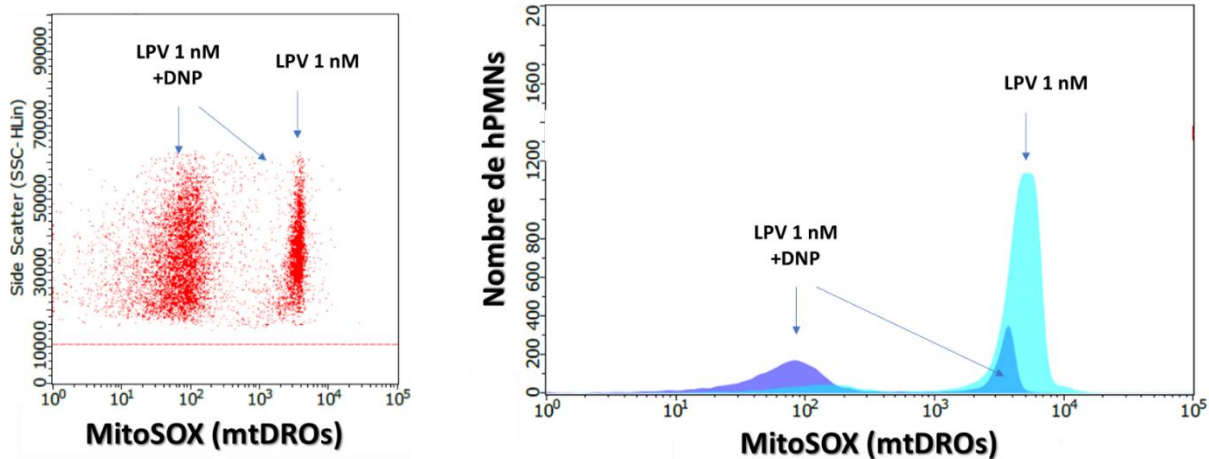


Figure 46- Fluorescence du MitoSOX associée à l'action de 1 nM de LPV à 1 h avec ou sans prétraitement au DNP (méthode directe).

Expérience de cytométrie en flux pour évaluer l'effet du découplant DNP sur la production des mtDROs. La fluorescence à 1 h a été étudiée suite à la stimulation avec 1 nM de la LPV. Un prétraitement des hPMNs avec 750 μ M de DNP est effectué afin de bloquer complètement la production de DROs mitochondriaux. Temps d'incubation= 60 min. Cytomètre : Guava easyCyte 8HT system flow cytometer (EMD, Millipore, Burlington, Massachusetts, USA). N= 3.

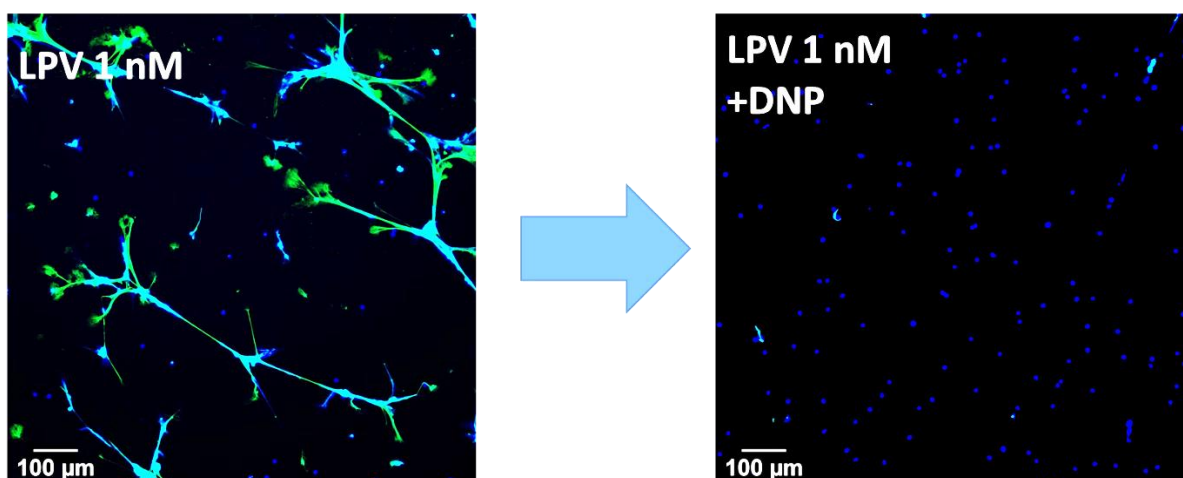


Figure 47- NETose provoquée par 1 nM de LPV à 6 h avec ou sans DNP (méthode indirecte).

Expérience d'immunomarquage pour l'évaluation de la NETose en présence ou absence du DNP à 6h. L'EN (en vert) associée à la chromatine et l'ADN extracellulaire (en bleu) a été recherchée chez les hPMNs exposés pendant 6h à 1 nM de la LPV. Un prétraitement des hPMNs avec 750 μ M de DNP est appliqué pendant 1 h afin de bloquer complètement la production de DROs de la mitochondrie. Grossissement x100. N=4.

Cependant, dans la Figure 46 on peut remarquer que deux populations cellulaires coexistent quand les hPMNs traités au DNP sont stimulés par la LPV, ce qui nous a amené à considérer deux sources alternatives de DROs, qui pouvaient potentiellement participer au processus de NETose : la Xanthine Oxydase (XO) et la Myélopéroxydase (MPO), (Kirchner et al. 2012), cette

dernière précédemment évaluée en tant que marqueur de NETose dans des expériences complémentaires. Ainsi, nous avons procédé par simple inhibition pharmacologique, en traitant les cellules avec 2 mM d'allopurinol ou 100 μ M d'ABAH ou MPO inhibitor I avant la stimulation. Nous avons pu observer par immunofluorescence que la NETose induite par la LPV dépend effectivement de la XO et de la MPO, puisque le niveau d'EN est significativement réduit en présence de chacun des inhibiteurs spécifiques (Figure 48). Étrangement, la NETose induite par le PMA n'est pas inhibée avec l'inhibiteur de la MPO.

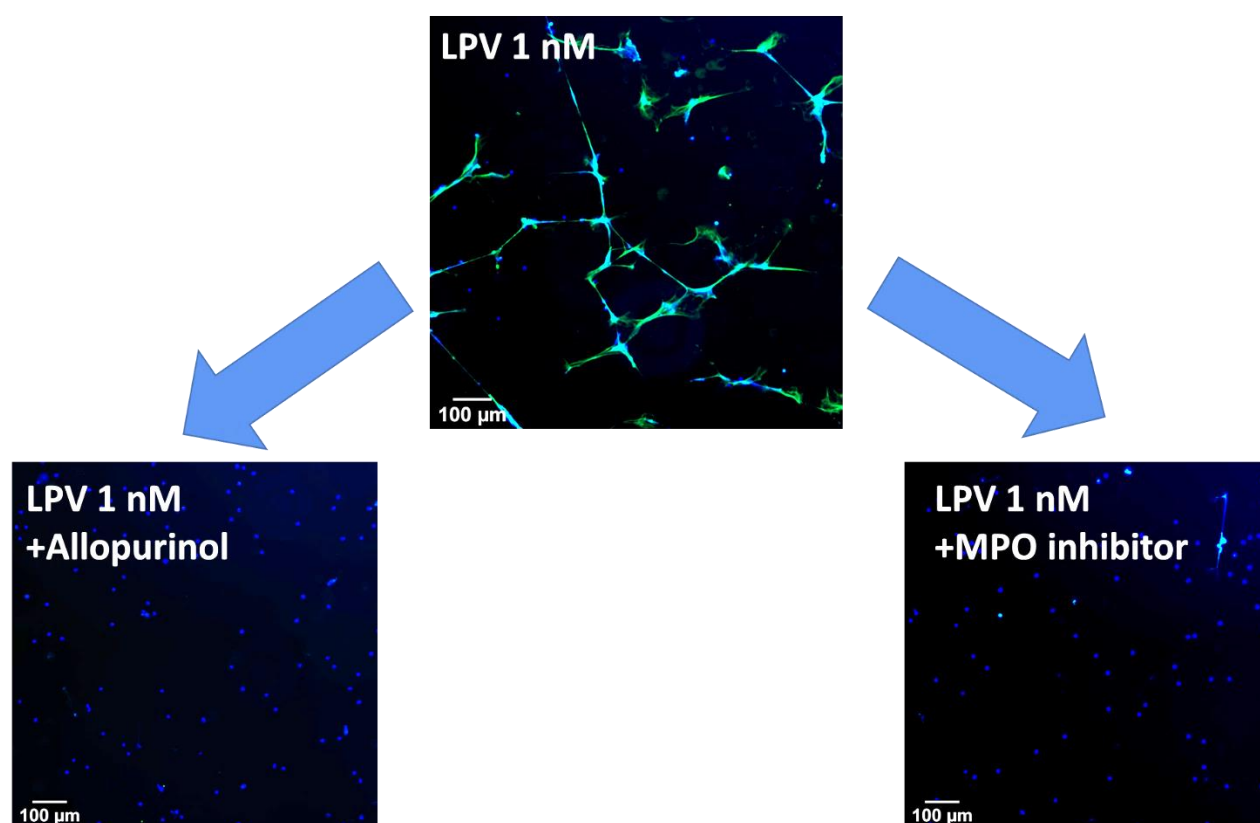


Figure 48- NETose provoquée par 1 nM de LPV à 6 h avec ou sans inhibiteurs de la XO et de la MPO.

Expérience d'immunomarquage pour l'évaluation de la NETose en présence ou absence d'Allopurinol ou de MPO inhibitor I à 6h. L'EN (en vert) associée à la chromatine et l'ADN extracellulaire (en bleu) a été étudiée à 6h d'incubation avec 1 nM de la LPV. Un prétraitement des hPMNs avec 2 mM d'Allopurinol ou 100 μ M de ABAH (MPO inhibitor I) est appliqué pour bloquer la production de DROs à partir de ces sources alternatives du neutrophile. Grossissement x100. N=3.

3.2.2 Résultats quantitatifs et statistiques

Concernant la quantification, le même procédé décrit dans le chapitre précédent a été appliqué pour les images en immunofluorescence, alors que les données de cytométrie ont été exploitées en sélectionnant la moyenne de fluorescence pour chaque condition et chaque temps d'incubation. Les analyses quantitatives reflètent la situation décrite dans le paragraphe précédent.

Ici, on propose un histogramme, absent dans l'article, qu'illustre les statistiques obtenues pour la fluorescence du DHR123 avec ou sans le DPI. Cette image résume bien le concept qu'une NETose NOX-indépendante est provoquée par la LPV, différemment du PMA (Figure 49).

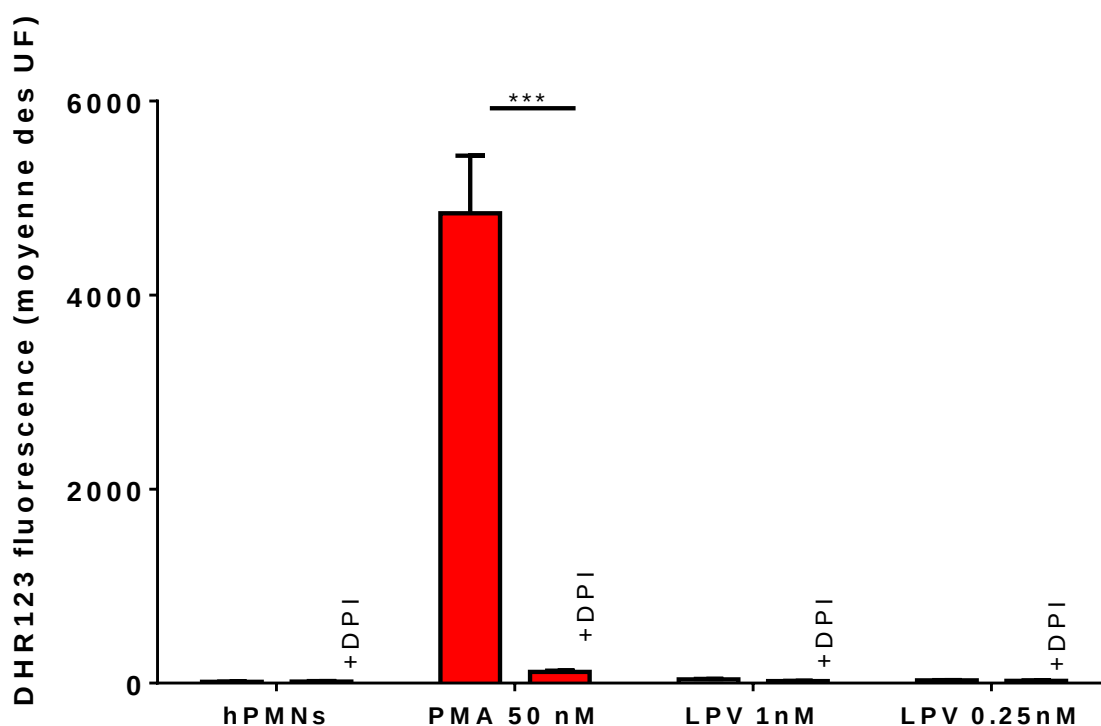


Figure 49- Le DPI inhibe significativement la fluorescence du DHR123 due au PMA.

Moyenne de fluorescence associée à la DHR123. Les hPMNs ont été stimulés pendant 1 h avec le PMA et la LPV ou laissés non stimulés. Concernant la LPV, la moyenne de fluorescence liée aux DROs générés par la NADPH oxydase n'est pas significative, contrairement à la situation avec PMA. Test appliqué : ANOVA Two-way avec un post-hoc Bonferroni. N= 3.

3.2.3 Discussion

Le fait que la LPV provoque la formation de NETs indépendamment de l'enzyme NADPH oxydase est un élément déjà introduit par Pilsczek et collègues (Pilsczek et al. 2010). Nos résultats s'alignent aux conclusions des auteurs, tout en amplifiant le concept très délicat des sources de dérivés réactifs de l'oxygène présentes chez les neutrophiles humains.

En effet, il est très intéressant de se s'attarder sur la mobilisation de DROs provoquée par la LPV, que l'on pourrait définir « non-conventionnelle ». Les phagocytes, surtout les hPMNs, ayant une action antimicrobienne par le déploiement de plusieurs mécanismes bactéricides, sont décrits comme étant capables de produire des DROs par l'assemblage des sous-unités constituant l'enzyme NADPH oxydase. Cette dernière enzyme permet le transfert d'un seul électron à l'oxygène, en le réduisant. Cela provoque tout d'abord la production d'ions superoxydes, rapidement transformés en peroxyde d'hydrogène, soit spontanément, soit par l'action d'une autre enzyme, la Superoxyde dismutase ou SOD. Le peroxyde d'hydrogène est, à son tour, utilisé par la MPO pour produire des DROs halogénés, tels que les ions hypochlorites, ou encore l'acide hypochloreux, à fort pouvoir antibactérien (Kirchner et al. 2012).

L'indépendance de l'enzyme NADPH oxydase pourrait donc indiquer que la source de DROs exploitée par la LPV est, d'une certaine manière, un élément plus proche d'une situation infectieuse, du moins dans le cas de *S. aureus* LPV⁺. À tout cela, il est nécessaire de rajouter que l'action de la MPO devrait se produire secondairement à un premier événement qui induise la formation de peroxyde d'hydrogène. Par conséquent, bien que l'inhibition d'une telle source de DROs se soit avérée nécessaire au processus de NETose à LPV, il ne s'agit pas de la première étape de production de réactifs de l'oxygène. D'ailleurs, le fait que l'inhibiteur de MPO n'ait pas bloqué la NETose à PMA pourrait être dû simplement à une dose trop faible d'un tel inhibiteur, qui pourtant est réputé efficace pour bloquer la NETose à LPV, comme indiqué dans la discussion de l'article.

Ainsi, l'identification de la mitochondrie et de la XO comme sources nécessaires au déroulement du processus est un aspect intrigant. Concernant la XO, les informations indiquant sa présence chez les hPMNs restent peu nombreuses dans la littérature scientifique. Bien que la contribution de la XO chez les hPMNs ait été évaluée au début des années 80 (Tubaro et al. 1980; Jones et al. 1985), ce qui en confirme la présence au niveau intracellulaire, les études successives décrivent l'enzyme en évaluant uniquement son apport dans des contextes différents du neutrophile

(Jarasch et al. 1981; White et al. 1996; Trager 2006; Bravard et al. 2011; Laurindo 2018). Plus récemment, la XO a été décrite comme enzyme ubiquitaire chez les cellules des mammifères, ayant un rôle dans l'activation de l'inflammasome chez les cellules myéloïdes (Lee and Lee 2006; Samouilov et al. 2007; Förstermann 2010). Toutefois, la contribution de la XO a alors été analysée par une méthode indirecte, c'est-à-dire par inhibition pharmacologique. Un inhibiteur tel que l'Allopurinol est décrit ayant un rôle parallèle de protection de l'intégrité membranaire et de la fonction de la mitochondrie (Karwinski et al. 1993; Lee and Lee 2006). On se tourne alors vers le candidat numéro un : la mitochondrie elle-même. Source de DROs en tant que produits secondaires de la phosphorylation oxydative, cette organelle semble avoir des origines bactériennes, étant le résultat d'un processus d'endosymbiose. Si l'on revient à *S. aureus*, nous pourrions nous demander pourquoi, par la production de la LPV, la bactérie ciblerait-elle la mitochondrie pour déclencher le processus de NETose, aussi bien directement (voir les résultats avec le DNP), qu'indirectement (si l'on pense à l'action de l'allopurinol sur la mitochondrie). Une réponse partielle sera donnée dans le troisième chapitre de cette thèse. Néanmoins, cet aspect reste un point d'interrogation. On pourrait alors proposer qu'il s'agit d'un premier point qui séparera ultérieurement deux processus similaires, mais dont les voies de signalisation diffèrent, en accord avec le concept de NETosis-mimics illustré par König et Andrade (König and Andrade 2016). Dans tous les cas, il s'agit objectivement de la première vraie différence entre NETose à PMA et NETose à LPV.

En outre, il ne faudrait pas négliger le comportement des hPMNs prétraités avec le DPI et ensuite stimulés avec la LPV. Le niveau de NETose augmente étrangement en présence de l'inhibiteur de la NADPH oxydase. Ce point a été brièvement analysé dans la section de l'article dédiée à la discussion : une hypothèse pourrait effectivement se baser sur les différentes formes de PKC activées par le PMA et la LPV. Deux isoformes existent et il semblerait qu'à l'activation de l'une, l'autre soit inhibée. Par conséquent, si l'on considère l'effet inhibiteur, on pourrait présumer que le blocage de l'activité de l'une pourrait causer l'induction de l'autre forme. Malgré le fait que nous pouvons uniquement rester aux hypothèses, la légère augmentation de NETose à LPV due au DPI pourrait effectivement s'expliquer par l'équilibre entre ces deux formes de PKC (Neeli and Radic 2013).

En dernier, un type de NETose qui implique des mtDROs et qui ne dépend pas de la NADPH oxydase nous a fait penser aux travaux de Doua et collaborateurs (Doua et al. 2015b). Le travail de Doua et al. décrit en effet une NETose NOX-indépendante liée à la production de mtDROs. De plus, ces auteurs indiquent qu'un tel processus est provoqué par la ionomycine et

la calcimycine (A23187,) deux ionophores du calcium d'origine bactérienne. Trois éléments étaient donc intéressants pour notre recherche : le calcium, les mtDROs et l'indépendance de la NADPH oxydase. Cette NETose alternative montrait d'autres caractéristiques particulières, telles qu'une voie de signalisation qui ne semblait pas impliquer les mêmes kinases que la NOX-dépendante, ou, du moins, pas dans la même mesure, et le rôle d'un canal du potassium activé par le calcium, le SK3.

En conclusion, les résultats de ce chapitre montrent que la LPV provoque une NETose indépendante de la NADPH oxydase, mais dépendante des mtDROs, de la XO et de la MPO. La succession de l'ensemble de ces événements reste pourtant à élucider en perspective, en analysant également les interactions entre une manifestation et l'autre au niveau mécanistique.

3.3 Quand les résidus arginines sont déiminés : la voie de signalisation intracellulaire, la citrulline, et le destin mitochondrial de la LPV

3.3.1 Introduction

Dans ce dernier chapitre, nous décrirons et analyserons plus dans les détails, les caractéristiques de la NETose induite par la LPV.

Trois sous-parties seront ici exposées : en premier lieu, l'enchaînement logique qui nous a amené à nous intéresser aux kinases impliquées dans le processus, à l'autophagie, mais également à l'analyse du rôle du canal SK3 ; deuxièmement, nous avons traité le thème de la modification post-traductionnelle de l'histone H3, dite citrullination ou deimination, et de ses implications ; dans la troisième partie, nous nous sommes basés sur trois types d'informations afin d'effectuer une analyse de la colocalisation entre la LPV et cette organelle-clé: les résultats obtenus par Zimmermann-Meisse et collègues concernant la localisation intracellulaire de la LPV (Zimmermann-Meisse et al. 2017), les données présentées dans l'article de Genestier et al. à propos de l'interaction entre LPV et mitochondrie (Genestier et al. 2005), et les résultats obtenus au laboratoire qui indiquaient l'implication de la mitochondrie et des mtDROs dans ce processus.

3.3.2 Kinases, autophagie et canal SK3

Une fois définie la première grande différence entre la NETose à PMA et celle provoquée par la LPV, nous avons voulu analyser les kinases plus fréquemment impliquées dans la NETose classique, ERK1/2 et Akt, ainsi qu'un marqueur d'autophagie cellulaire, la protéine LC3B. En effet, alors que les deux kinases sont différemment phosphorylées dans les deux types de NETose, la présence d'un processus parallèle comme l'autophagie cellulaire semblait être un point commun à toutes les formes de NETose, bien que progressivement abandonnée dans les publications apparues plus récemment sur le sujet.

Ainsi, des Western blots ont été effectués dans le but d'analyser le niveau de la phosphorylation ou de la lipidation des protéines d'intérêt. L'étude s'est d'abord focalisée sur la lipidation de la protéine LC3, impliquée dans le processus d'autophagie. Nos premiers essais ont pourtant montré que les hPMNs relarguaient un niveau de protéases très élevé dans certaines conditions, du fait

que notre « loading control », la β -tubuline, était souvent retrouvée dégradée ou absente après 1 h. Notamment, ce problème était encore plus remarquable pour les hPMNs en contact avec la LPV (Figure 50). D'ailleurs, pour ces premières expériences nous avons introduit le contrôleur positif calcimycine, utilisé jusqu'à 25 μ M (ici indiquée « A23 »). La LPV mobilise effectivement toutes les protéases contenues notamment dans les granules des hPMNs, ce qui résulte en une dégradation considérable de l'ensemble des protéines. Étrangement, ni le PMA, ni l'A23 montraient un tel niveau de protéolyse.

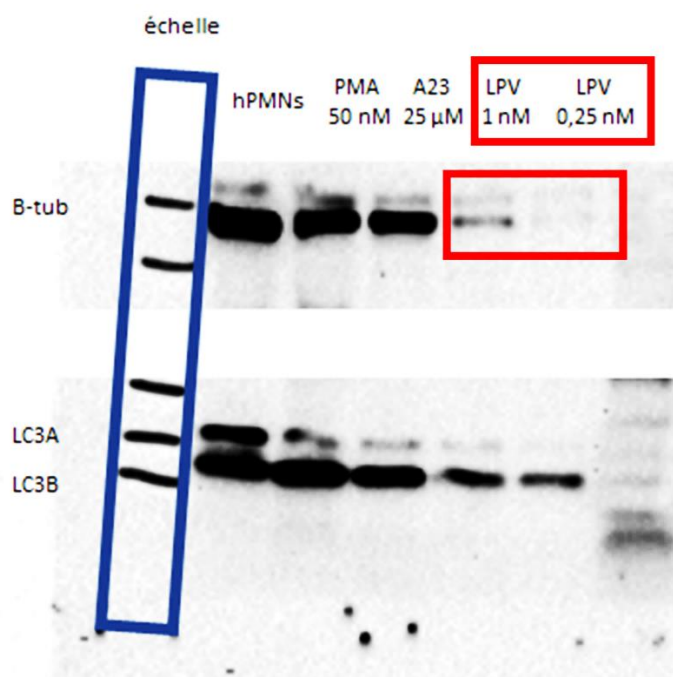


Figure 50- Révélation d'un Western blot pour l'analyse de l'autophagie cellulaire.

La protéine LC3B est recherchée afin d'évaluer l'autophagie dans les différentes conditions. La β -tubuline est recherchée afin de vérifier l'état et l'homogénéité des échantillons protéiques de chaque condition. On remarque que la LPV provoque beaucoup de protéolyse, même en présence d'inhibiteurs de protéases après 1 h d'incubation avec les hPMNs.

Nous avons donc décidé de changer deux facteurs pour résoudre ce problème technique : le temps d'incubation des hPMNs avec les stimuli, qui a été porté à 30 min, et le contrôleur interne, qui a été remplacé par la GAPDH. Cela a été fait afin d'évaluer l'impact protéolytique de la LPV sur une autre protéine de référence, et également pour avoir un contrôleur interne correspondant à un poids moléculaire apparent d'environ 37 kDa. Ce dernier aspect nous aurait facilité l'analyse de la protéine Akt, présentant un poids moléculaire apparent de 60 kDa et donc difficile à interpréter avec un contrôleur à 50 kDa comme la β -tubuline. Malgré ces changements, la bande correspondant

au contrôle interne GAPDH à 30 min n'était toujours pas présent pour la condition avec 1 nM de LPV. Apparemment, la digestion protéolytique se produisait déjà au bout de 30 minutes d'incubation avec la LPV à plus forte concentration (Figure 51).

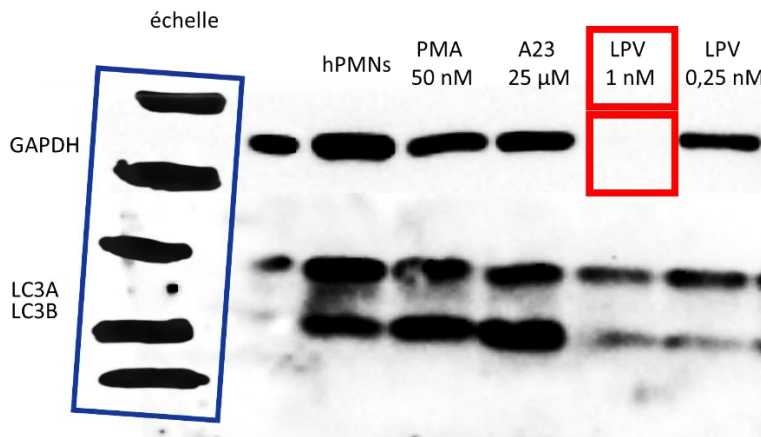


Figure 51-Révélation d'un Western blot pour l'analyse de l'autophagie cellulaire.

La protéine LC3B est recherchée par Western Blot afin d'évaluer le niveau d'autophagie, tandis que la GAPDH est marquée pour vérifier l'état et l'homogénéité des échantillons protéiques de chaque condition. On remarque que la LPV à 1 nM provoque encore trop de protéolyse, même en présence d'inhibiteurs de protéases après **30 min** d'incubation avec les hPMNs.

Un nouvel essai nous a apporté un résultat exploitable : les hPMNs laissés en contact avec les stimuli pendant 15 min montraient un niveau de protéolyse très faible. Par conséquent, nous avons fixé ce temps d'incubation pour une étude préliminaire de nos protéines (Figure 52). Les résultats ont été répétés plusieurs fois, confirmant qu'aussi bien le PMA que la LPV, du moins à 1 nM, provoquent une autophagie cellulaire, observable déjà après 15 min d'incubation avec les hPMNs.

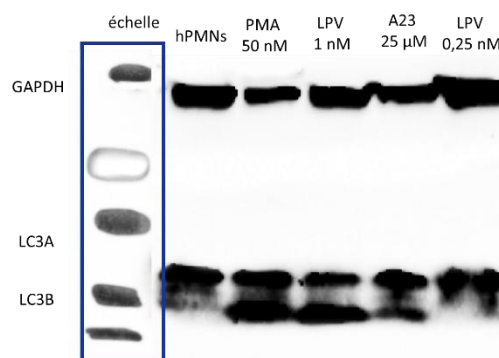


Figure 52-Révélation d'un Western blot pour l'analyse de l'autophagie cellulaire.

La protéine LC3B et la GAPDH sont étudiées par Western Blot après **15 min** d'incubation avec les stimuli. Le niveau de protéolyse de la GAPDH n'empêche plus l'analyse des résultats et les échantillons apparaissent homogènes.

Toutefois, pour étudier d'autres temps d'incubation il a fallu réévaluer la composition des tampons de lyse et de charge, en rajoutant une série supplémentaire d'anti-protéases. En effet, alors que dans des conditions standard, un tampon de lyse contenant un cocktail d'antiprotéases, comme le cOmplete™ Protease Inhibitor de Roche, suffit pour préserver l'intégrité des protéines en inhibant notamment les sérines, cystéines et métalloprotéases, la LPV semblait avoir un tel effet qu'il a fallu un apport d'inhibiteurs additionnels. Ainsi, une nouvelle composition pour les tampons a été testée avec succès (voir section « matériels » pour les détails), confirmant l'autophagie pour le PMA et la LPV, et nous permettant d'évaluer le niveau de phosphorylation de la kinase ERK (Figure 53).

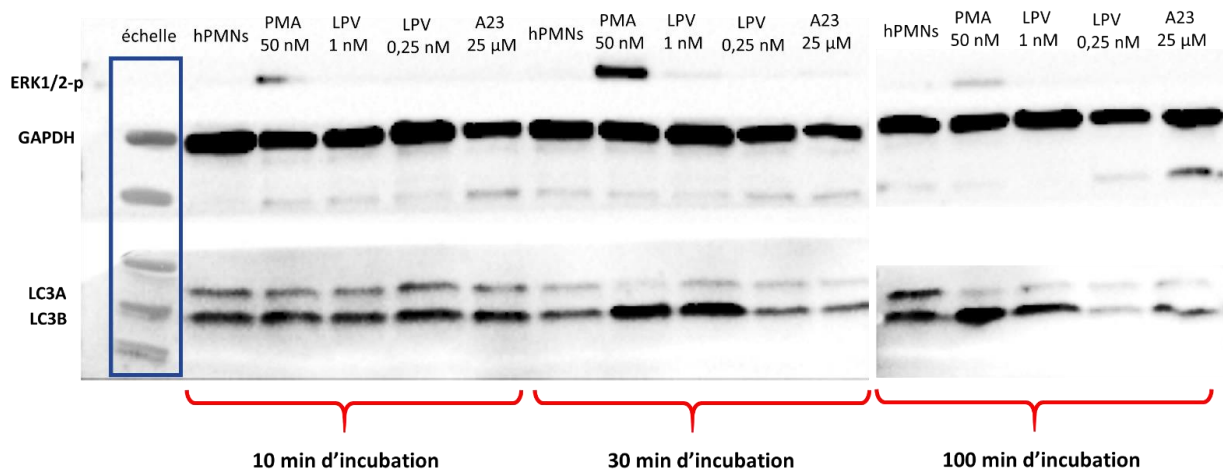


Figure 53- Révélation d'un Western blot avec marquage des protéines LC3B, GAPDH et phospho-ERK1/2.

Nous avons étudié le niveau d'autophagie par Western blot en préparant différemment nos échantillons (ajout de différents types d'antiprotéases). On peut remarquer que la GAPDH, notre contrôle interne, reste constante et homogène même à des temps d'incubation de **100 min**. D'ailleurs, on remarque que l'autophagie pour le PMA et la LPV à 1 nM est confirmée, même à des temps d'incubation plus longs.

Pourquoi est-il important de parler de la mise au point de ce protocole ? Parce que lorsque on se trouve devant une particularité uniquement liée à la LPV, cela nous donne automatiquement des informations complémentaires sur le mode d'action et les conséquences de cette leucotoxine. La question de la forte protéolyse causée par la LPV reste une question ouverte, qui néanmoins méritait d'être mentionnée. La NETose causée par la LPV pourrait donc mobiliser davantage ou différentes protéases, probablement stockées originellement dans les granules intracellulaires. Une autre hypothèse est que la rupture des granules et la libération des protéases survienne très tôt dans le processus initié par la LPV, autrement dit, avec une cinétique plus rapide par rapport au PMA et à l'A23.

Concernant la phosphorylation de la kinase Akt, elle a été initialement étudiée à 15 min avec un résultat positif uniquement pour le PMA, ce qui est une confirmation des données publiées dans la littérature (Douda et al. 2015b). Cependant cette phosphorylation n'est observée qu'à des temps d'incubation plus courts, puisqu'après 1 h toutes les conditions, y compris les hPMNs non stimulées, montrent une égale phosphorylation d'Akt (Figure 54).

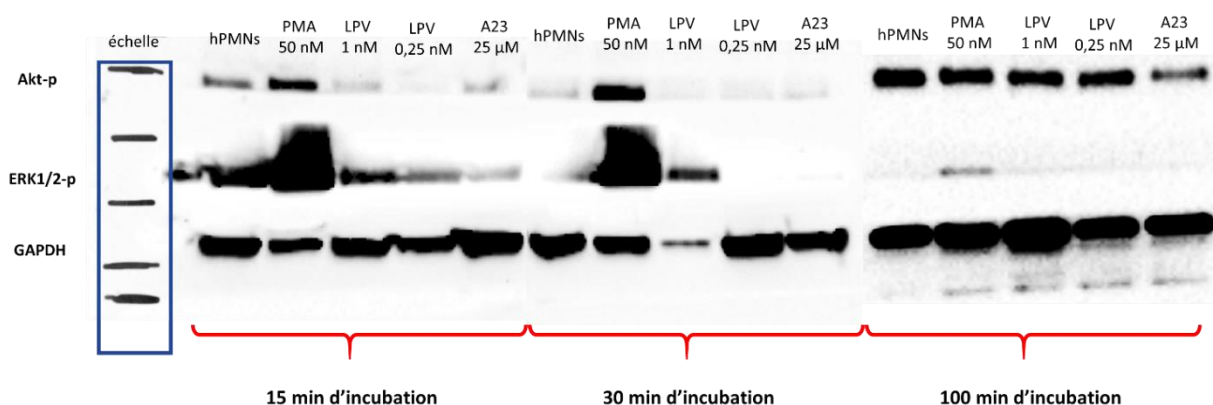


Figure 54- Révélation d'un western blot avec marquage de la GAPDH, de la phospho-ERK1/2 et de la phospho-Akt.

Analyse du niveau de phosphorylation des kinases ERK 1 et 2 par Western Blot. Aux premiers temps d'incubation étudiés, à 15 min et à 30 min, Akt résulte phosphorylée uniquement quand les hPMNs sont stimulés avec le PMA. En revanche, à 100 min la protéine semble être phosphorylée pour toutes les conditions, même en absence de stimuli.

Ensuite, à la lumière de la découverte du récepteur de LukF-PV, le CD45 (Tromp et al. 2018) nous avons voulu étudier la famille de kinases Src activées en aval de ce récepteur, dans le but d'identifier un élément du « pathway » propre à la LPV. En effet, les Src kinases sont activées par l'activité de phosphatase du CD45. Ainsi, une déphosphorylation survient au niveau du résidu tyrosine 527 des kinases Src, ce qui permet d'accéder au site actif de la molécule. Cela est suivi par la phosphorylation du résidu tyrosine 416 de la protéine (Figure 55).

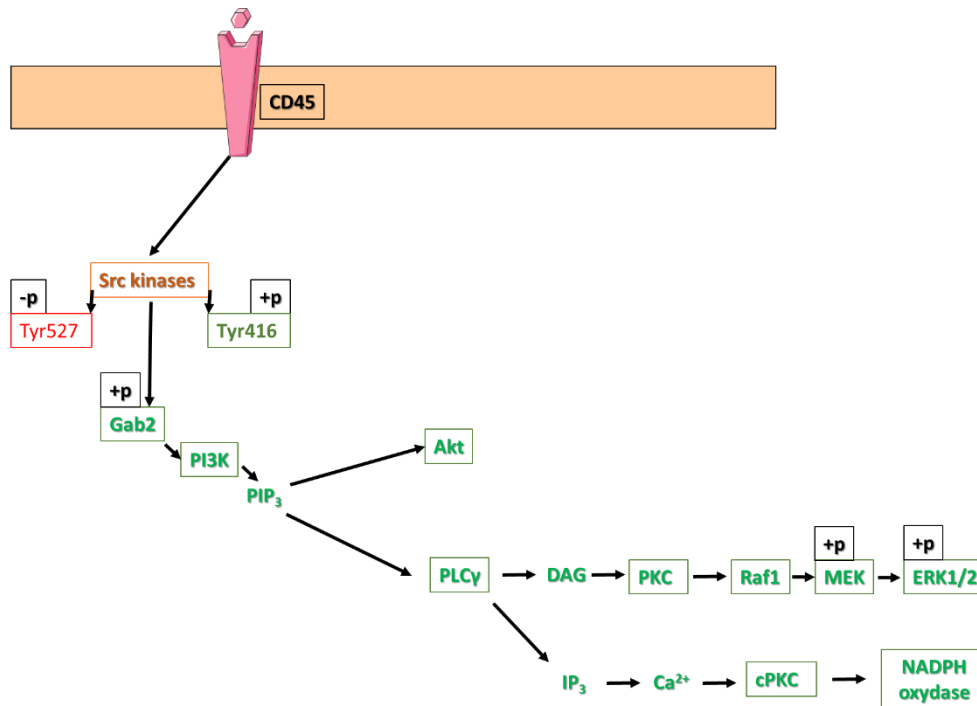


Figure 55- Voie de signalisation en aval de l'activation du récepteur CD45.

Le récepteur de membrane CD45 est une tyrosine phosphatase qui cause tout d'abord une déphosphorylation du résidu Tyr527 présent chez la famille des kinases Src, et ensuite la phosphorylation du résidu Tyr416.

Nous avons donc suivi la phosphorylation de ce dernier résidu, en employant un anticorps primaire anti-Tyr416. Cependant, ni les résultats « directs » en Western blot, ni l'inhibition pharmacologique des Src a montré une relation claire entre kinases Src et NETose à LPV (Figure 56).

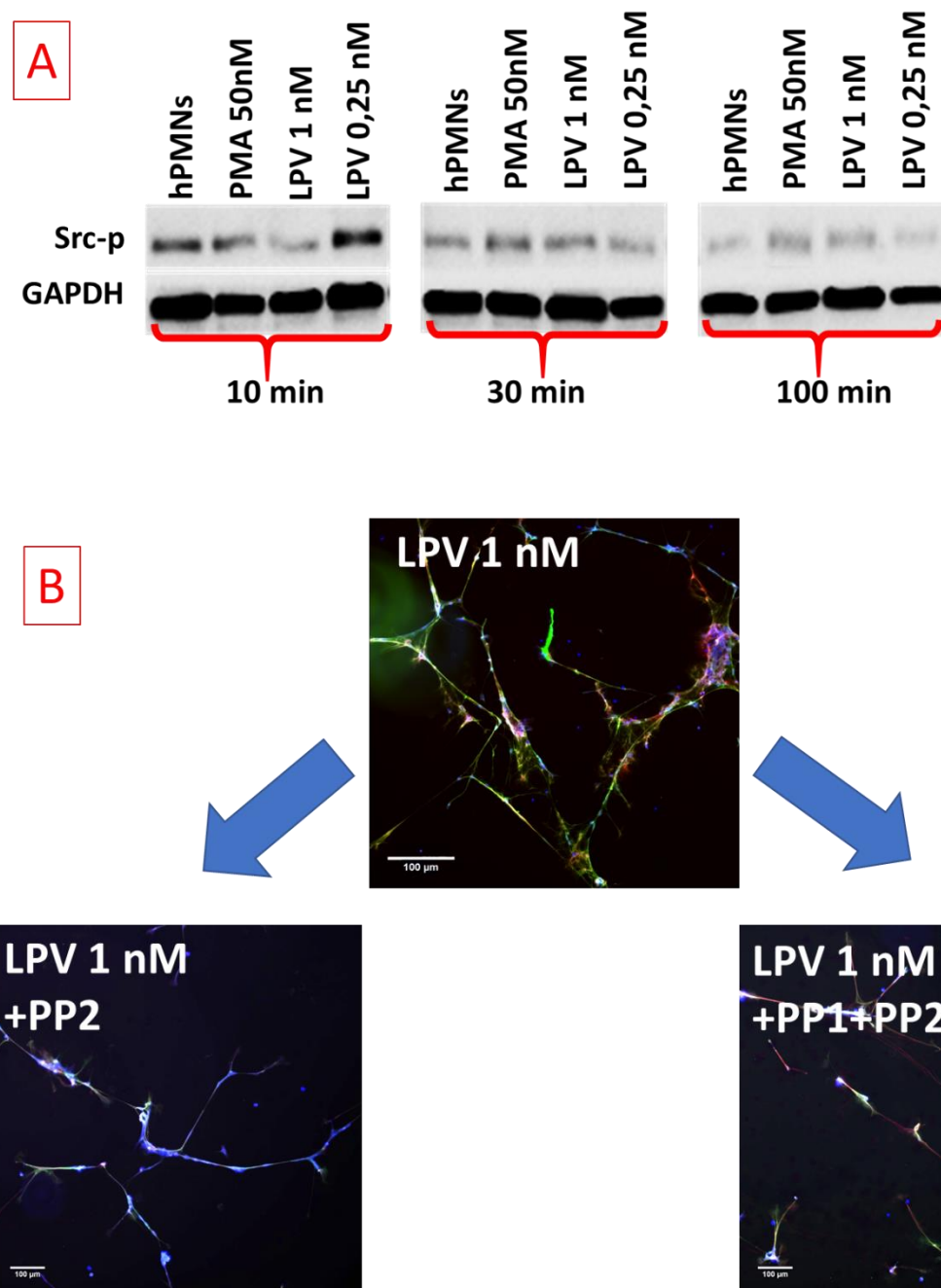


Figure 56- Les Src kinases ne sont pas impliquées dans le processus initié par la LPV.

(A) Les résultats d'analyse de l'activation de la famille de kinases Src par Western blot montrent que le niveau de Src phosphorylées est constant pour chaque condition à l'étude. N=3.

(B) L'immunofluorescence en présence des inhibiteurs de Src kinases PP1 et PP2 montrent que la LPV provoque encore un niveau significatif de NETose, comme montré par le marquage à l'Hoechst (en bleu), à l'anti-EN (en vert) et anti-MPO (rouge/jaune). N=3.

Pour résumer, ces expériences montrent que la LPV provoque une autophagie cellulaire, tout comme le PMA. Néanmoins, concernant les kinases activées, la leucotoxine se différencie du contrôle positif PMA, n'induisant pas la phosphorylation d'ERK1/ 2 et d'Akt. À côté de cela, la découverte du récepteur de la sous-unité F nous avait initialement donné une piste pour identifier

la voie de signalisation propre à la LPV. Étonnamment, nos résultats semblent indiquer que cette voie de signalisation n'est pas activée dans le processus. D'un autre point de vue, ce dernier résultat négatif n'est pas complètement surprenant, si l'on analyse la voie de signalisation en aval du CD45, après l'activation des kinases Src. En effet, on peut remarquer que cette voie implique soit Akt, soit ERK1/2, soit l'activité de la NADPH oxydase. Il s'agit de trois éléments que nous avons déjà exclu du processus de NETose à LPV.

Globalement, ces résultats, bien que négatifs, se confirment l'un l'autre, ce qui nous pousse à affirmer que la voie de signalisation de la LPV s'éloigne de la voie impliquant les kinases étudiées et majoritairement décrites pour le processus de NETose. En outre, une question concernant le rôle de la sous-unité F de la leucotoxine reste à investiguer, étant donné que la voie du CD45 ne semble pas concerner l'activité leucotoxique de la LPV.

Successivement, puisque ces résultats semblaient rapprocher la NETose provoquée par la LPV au processus décrit par Doua et collègues, nous avons voulu étudier le rôle du canal SK3 dans la NETose à LPV, en appliquant un inhibiteur pharmacologique.

En accord avec ces auteurs, nous avons remarqué une inhibition significative de NETose en présence de l'inhibiteur du canal SK3 (Figure 57).

Ce dernier résultat se rajoute et renforce l'idée que la LPV provoque une NETose semblable au processus initié par les ionophores calciques décrits par Doua et collègues en 2015. Cependant, la NETose provoquée par la calcimycine a été également testée au début de nos expériences et le résultat nous a montré que le niveau de NETose ne dépassait pas le 30%, ainsi résultant non significatif au niveau statistique (Figure 58). Ce résultat nous a surpris, puisque l'A23 est considéré comme un contrôle positif de NETose, tout comme le PMA. En revanche, Sollberger et collègues ont obtenu et publié le même résultat, ainsi confirmant que ce ionophore provoque une NETose de moindre ampleur (Sollberger et al. 2018a). Le fait que nombreuses publications considèrent la calcimycine comme un puissant inducteur du processus pourrait s'expliquer par le manque d'une méthode univoque de quantification de la NETose, comme également souligné dans les publications de Brinkmann (Brinkmann et al. 2012).

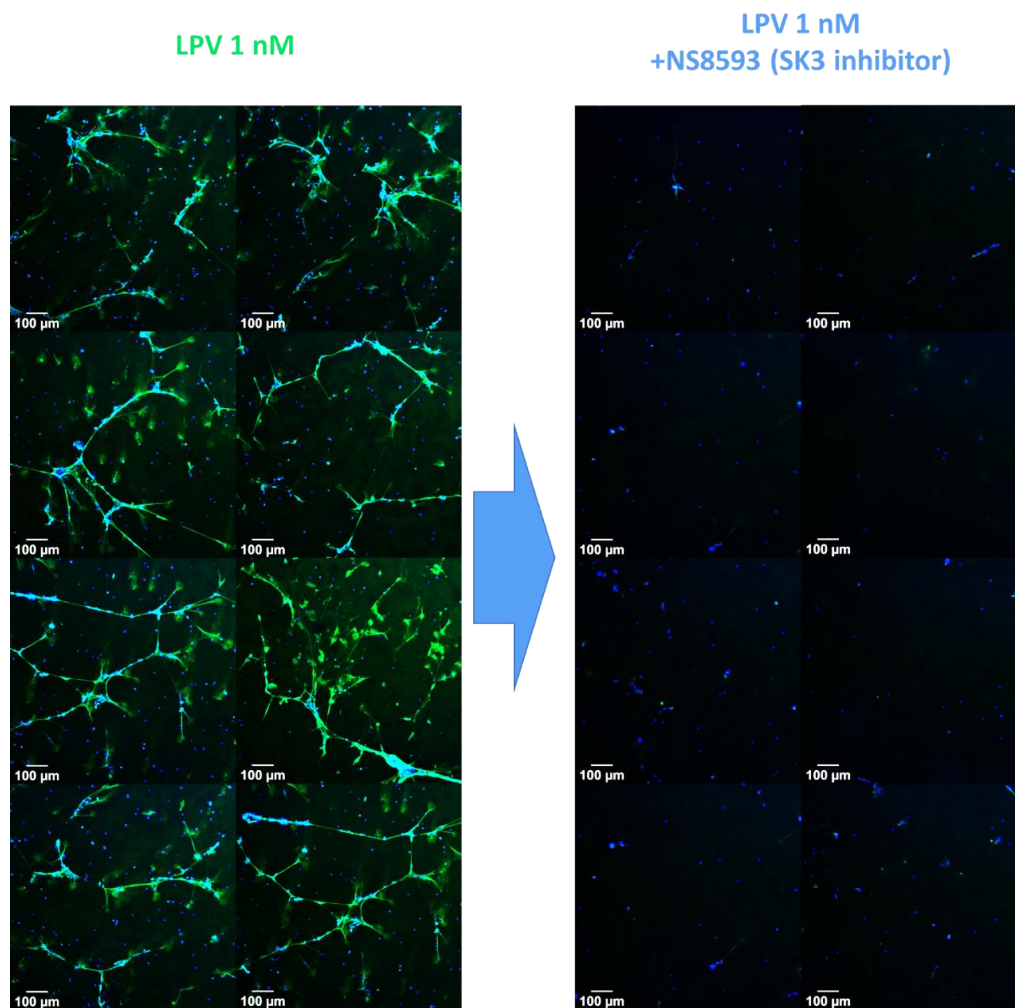


Figure 57- L'inhibition du canal SK3 des hPMNs par le traitement avec l'inhibiteur NS8593 à 100 μ M bloque la NETose causée par la LPV.

Les hPMNs sont prétraitées pendant 30 min avec l'inhibiteur du canal SK3 avant de les stimuler avec la LPV. Après 6 h nous avons évalué l'EN (en vert) et l'ADN (en bleu). Grossissement x100. Huit clichés sont montrés ici comme images représentatives d'expériences indépendantes d'immunofluorescence. N=3.

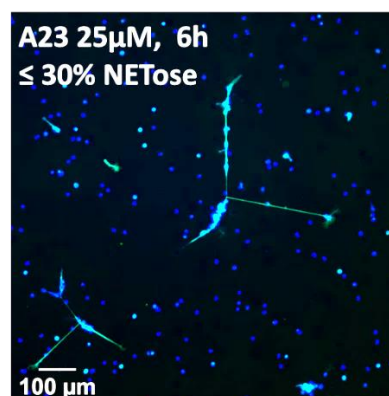


Figure 58- La NETose initiée par la calcimycine A23187.

À 6 heures la NETose provoquée par la calcimycine, ou A23187, un ionophore calcique, touche environ 30% des hPMNs testés. En vert l'EN et en bleu l'ADN. Grossissement x100. N=3.

Nous rajoutons donc le SK3 parmi les éléments nécessaires à la NETose provoquée par la LPV. Ce résultat est cohérent avec la brusque augmentation intracellulaire d'ion Ca^{2+} indiquée par Tawik et collaborateurs en 2015, qui l'ont décrit être un événement précoce de la réponse du hPMNs à la LPV. En effet, le canal SK3 est activé suite à la liaison avec des ions calcium à la calmoduline. Quatre calmodulines liées au calcium sont nécessaires pour activer le canal SK3 en se liant aux domaines spécifiques. Cela va entraîner l'ouverture du canal qui permet le flux des ions potassium K^+ (Adelman et al. 2012). En outre, Douda et al. ont suggéré un lien entre les mtDROs et le canal SK3 : d'après les auteurs, l'activation du canal SK3 induirait la production de DROs à partir de la mitochondrie en raison de l'étroite relation existante entre le niveau de potassium dans le cytosol et la respiration mitochondriale (Szewczyk et al. 2009; Dolga et al. 2013).

3.3.3 L'histone H3 citrullinée par la PAD4

La dernière partie de la section précédente se relie à l'étude sur la citrullination de l'histone H3.

En effet, si l'on pense que l'augmentation de calcium intracellulaire peut avoir un rôle dans l'activation du canal SK3, il existe chez le neutrophile humain, une enzyme également dépendante de la concentration calcique et ayant un rôle encore mal compris dans le processus de NETose : la Peptidylarginine déiminase 4 ou PAD4.

Cette enzyme a besoin de la liaison directe avec 5 ions calcium pour avoir un changement morphologique. Ce changement implique le déplacement des résidus du site actif, qui sont réarrangés en une conformation permettant l'activité catalytique (Arita et al. 2004).

Une fois activée, la PAD4 induit une modification post-traductionnelle au niveau des résidus arginines des protéines, notamment des histones. En général, il est par l'action de ses résidus catalytiques que l'enzyme provoque l'hydrolyse du groupe guanidine présent à l'extrémité de la chaîne latérale des arginines, avec la formation d'un groupe uréido- et la perte d'un ion ammonium. Ainsi, les arginines à charge positive sont transformées en un acide aminé non-codé par l'ADN, la citrulline, à charge nette neutre (Figure 59).

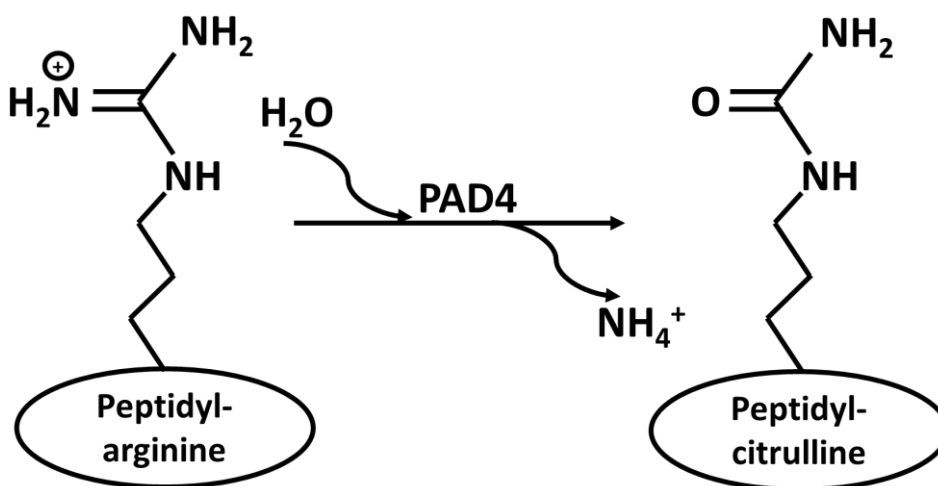


Figure 59- Schéma illustrant la réaction de citrullination, ou dé(s)imination induite par la PAD4.

Ce changement peut sembler modeste, mais la perte de la charge positive et du site d'acception pour l'ion hydrogène comporte une perte de stabilité, notamment des liens protéine-protéine, protéine-ADN ou encore protéine-ARN, en plus d'une potentielle perte d'activité due aux changements conformationnels dérivés du réarrangement intermoléculaire (Vossenaar et al. 2004).

La désimination ou déimination est également appelée citrullination du fait que la citrulline est un acide aminé initialement isolé de la pastèque. D'un point de vue physiologique, il s'agit d'une modification post-traductionnelle impliquée dans des processus comme la régulation génique et le développement des embryons, mais également dans différents mécanismes physiopathologiques, tels que la sclérose en plaque ou la polyarthrite rhumatoïde. Chez l'homme ils existent 5 isotypes d'enzymes PAD, dont le PAD4 est l'un des isotypes majoritairement présents chez le neutrophile humain (Douda et al. 2015b).

Comme déjà mentionné dans l'introduction de ce manuscrit, la citrullination des histones est un sujet controversé, notamment concernant son rôle dans le processus de NETose, qui a été initialement décrit comme essentiel dans la phase de décompactage de la chromatine (Wang et al. 2009).

Ainsi, nous avons procédé à des immunomarquages à l'aide d'un anticorps spécifique dirigé contre l'histone H3 citrullinée, l'histone plus communément étudiée comme constituant des NETs. Nos résultats nous ont permis de montrer une énième différence entre la NETose initiée par le PMA et celle initiée par la LPV. Étonnamment, le PMA montre une quasi-absence d'un

tel marqueur, alors que la LPV provoque chez les hPMNs testés un niveau de citrullination de l'histone H3 qui atteint le 75% en moyenne (Figure 60).

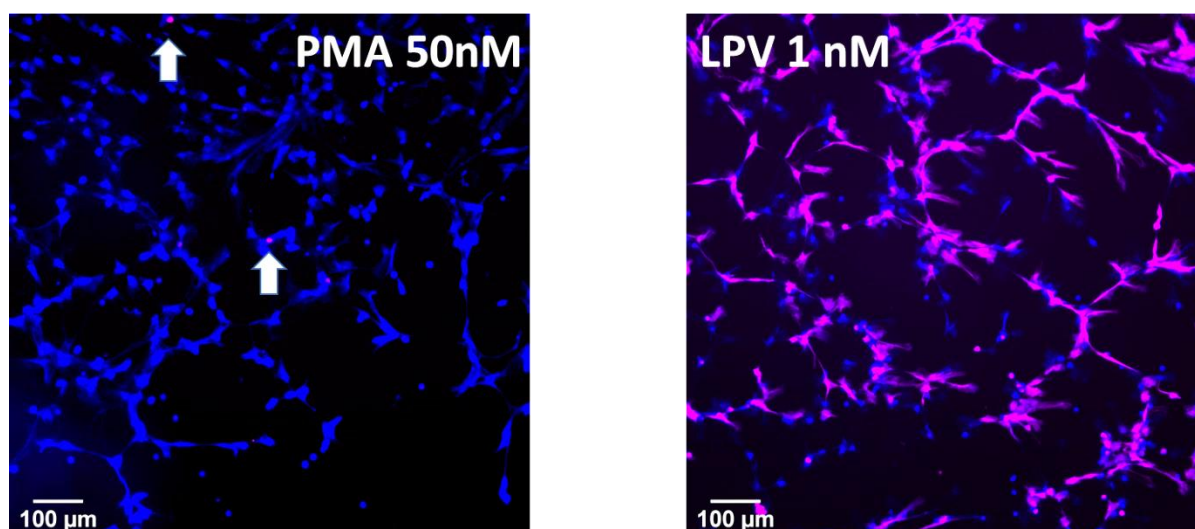


Figure 60- La citrullination de l'histone H3 étudiée par immunofluorescence.

Expérience d'immunomarquage des hPMNs exposés aux différents stimuli à 6h. L'anticorps primaire utilisé cible la forme citrullinée de l'histone H3, ici représentée en rose, tandis que le Hoechst marque l'ADN (en bleu). Les deux flèches blanches indiquent les cellules positives au citH3 liées l'action du PMA. Temps d'incubation=6h. Grossissement x100. N= 6.

Le rôle de l'enzyme PAD4 a été ensuite évalué par inhibition pharmacologique. Le marqueur citH3 est recherché chez les hPMNs exposés à la LPV en présence de la Cl-amidine, un inhibiteur irréversible des Peptidylarginine déiminases. En présence de l'inhibiteur des PADs, la LPV ne provoquait plus la citrullination de l'histone H3, comme démontré par la quasi-absence de la fluorescence liée à citH3 chez les hPMNs après 6h. Cependant, même en présence de cet inhibiteur des PADs, on pouvait encore bien remarquer les filets de chromatine relargués dans le milieu extracellulaire, une morphologie propre à la NETose observables grâce au marquage avec le Hoechst (Figure 61 B). De nouvelles expériences ont été menées afin d'évaluer si la chromatine relarguée en réponse à la LPV et en présence de l'inhibiteur des PADs était également décorée avec l'EN, confirmant donc une NETose. Nos résultats montrent que, même suite à un prétraitement avec 200 µM de Cl-amidine, la NETose causée par la LPV est toujours présente, puisque l'EN décore ces filets de chromatine (Figure 61 C).

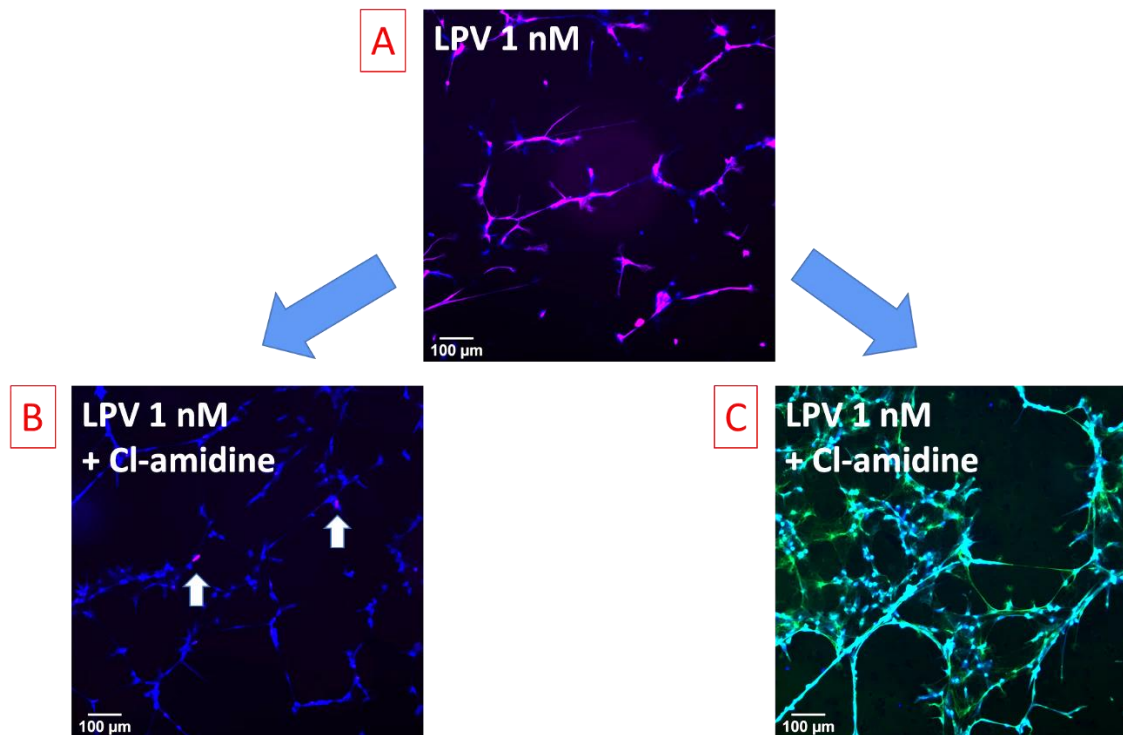


Figure 61- L'inhibition des PADs sur la citrullination de l'histone H3 et sur l'EN analysée par immunofluorescence.

(A et B) Expérience d'immunomarquage des hPMNs exposés aux différents stimuli à 6h. L'anticorps primaire utilisé cible la forme citrullinée de l'histone H3, ici représenté en rose, tandis que le Hoechst marque l'ADN (en bleu). Les deux flèches blanches indiquent les cellules positives au citH3 suite à l'action de la LPV. N= 3.

(C) l'EN marquée par un anticorps spécifique est représentée en vert. Le hPMNs ont été prétraités avec 200 μ M de Cl-amidine avant d'être exposés à 1 nM de LPV. Temps d'incubation=6h. Grossissement x100.

Nous nous sommes donc demandé si la citrullination des histones H3 causée par la LPV était également dépendante des mt DROs, tout comme le relargage d'EN, ou si elle était présente même en absence des NETs, au niveau des noyaux des hPMNs. Nos résultats ont confirmé que quand les hPMNs sont prétraités au DNP, l'inhibition des mtDROs ne permet pas à la LPV d'induire la NETose, y compris la citrullination des histones H3 (Figure 62).

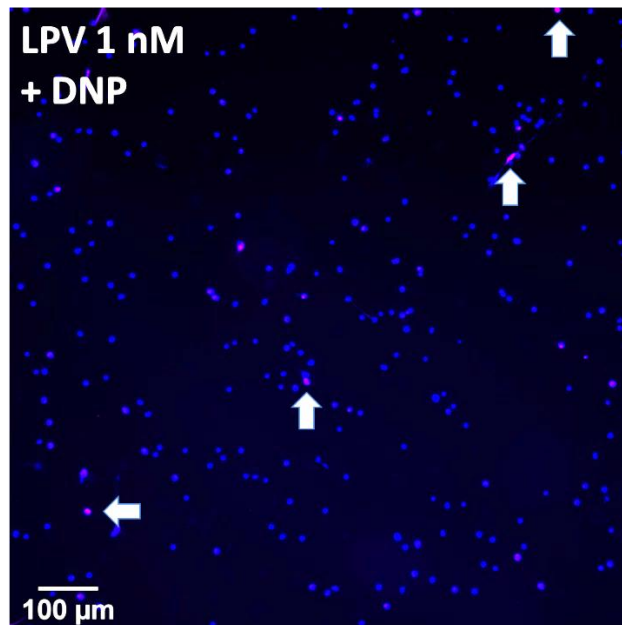


Figure 62- L'inhibition des mtDROs sur la citrullination de l'histone H3 analysée par immunofluorescence.

Expérience d'immunomarquage suite au pré-traitement des hPMNs avec DNP. L'anticorps primaire utilisé cible la forme citrullinée de l'histone H3, ici représentée en rose, tandis que le Hoechst marque l'ADN (en bleu). Les trois flèches blanches indiquent les cellules positives au citH3 suite à l'action de la LPV en présence de 750 μ M de DNP. N=3.

Différents points de conclusion peuvent dériver de ces résultats.

En premier lieu, nous pouvons affirmer que la LPV et le PMA montrent une importante différence qui éloigne les deux processus de NETose. L'absence de citrullination de l'H3 en présence du PMA et sa massive présence chez les hPMNs exposés à la LPV nous montrent que, comme déjà critiqué par König et al. (König and Andrade 2016), l'action de la PAD4 n'est pas un événement nécessaire au déroulement du processus de NETose. En effet, concernant le PMA, la NETose causée par cet inducteur ne semble pas montrer de la citrullination, au moins eu niveau de l'histone H3. Cependant, d'autres protéines pourraient présenter cette modification post-traductionnelle et cela devrait être ultérieurement étudié pour confirmer si la PAD4 et la déimination font partie du processus induit par le PMA, ou pas. Notamment, l'histone H4 devrait être considérée pour en évaluer la citrullination liée au PMA, comme montré par d'autres auteurs (Pang et al. 2013). Ensuite, concernant la LPV, nous pouvons affirmer qu'en inhibant l'activité de la PAD4, la leucotoxine est toujours capable de causer la libération de NETs chez les hPMNs, malgré cette enzyme soit responsable d'une massive citrullination des histones H3. Le manque de citrullination remarqué en présence de l'inhibiteur de PAD4 démontre que cette modification post-traductionnelle n'a pas d'impact, ni de rôle capital, dans la décompaction de la chromatine pendant le processus de NETose *per se*. Une autre fonction pourrait donc exister concernant la citrullination. L'hypothèse exposée par König et Andrade semblerait alors plausible, et la

citrullination pourrait effectivement représenter une modification ayant le but de réduire la charge et, par conséquent, l'activité antibactérienne des histones. En effet, d'après les expériences menées par l'EA7290, deux stimuli, l'un chimique, tel que le PMA, et l'autre d'origine bactérienne, comme la LPV, confirment que la citrullination est associée plutôt à un stimulus biologique. La différence dans le processus de NETose due à la nature des stimuli avait été également discutée dans une récente publication (de Bont et al. 2018). Ces auteurs ont pu mettre en évidence qu'alors que la citH3 avait été initialement retrouvée uniquement chez des hPMNs stimulés avec l'A23187, elle était effectivement absente chez les cellules en présence du PMA ou LPS. Cependant, par l'ajout d'un inhibiteur de sérine protéases, la citrullination devenait observable même avec le PMA ou le LPS. Ainsi, les auteurs ont émis l'hypothèse que l'absence de la citrullination avec le PMA était uniquement due à l'activité protéolytique de sérines protéases telles que l'EN, laquelle aurait clivé l'épitope de la citH3 le rendant ainsi non observable. Cependant, les auteurs n'ont pas pu expliquer la mécanistique à la base d'une telle activité protéolytique. En effet, d'après leur publication cette activité serait due à une enzyme, l'EN, très présente et impliquée suite à la stimulation par l'A23187 et la LPV, comme démontré tout au long de nos expériences. Ainsi, le rôle de la PAD4 resterait à définir : soit il s'agit d'une activation parallèle non corrélée avec la NETose et uniquement due à l'augmentation du calcium intracellulaire, soit cette activité et la modification post-traductionnelle qui en résulte pourraient avoir un rôle inhibiteur concernant le rôle antibactérien de la NETose, comme soutenu par König et collègues. Dans le premier cadre de figure, la citrullination serait une espèce de « accident de parcours » n'ayant pas d'effet sur la NETose, alors que dans le deuxième cas, la citrullination serait l'élément-clé qui pourrait faire la différence entre « NETose antibactérienne » et « NETose pro-bactérienne ». Pour avoir plus d'éléments à propos de sa fonction, des expériences visant à évaluer l'activité antibactérienne des deux types de NETose, sans ou avec citrullination, devraient être effectuées afin de déterminer la mortalité des bactéries exposées à des NETs décorés ou pas avec la citH3.

En outre, la citrullination est un marqueur très important, impliqué et recherché dans des cas de certaines maladies auto-immunes. En effet, l'un des tests plus couramment effectués pour confirmer la présence d'une maladie auto-immune comme la polyarthrite rhumatoïde est basé sur la recherche d'anticorps ACPA, ou « Anti-citrullinated protein antibodies ». Si l'on adhère à la théorie exposée par König et al., il pourrait exister un lien entre infections bactériennes présentant une toxine formant des pores et le développement de certaines pathologies auto-immunes. Nous restons toutefois dans le domaine des conjectures, malgré le lien entre infections

et maladies auto-immunes ne soit pas un concept nouveau ou méconnu auprès de la communauté scientifique.

En dernier, le fait que le DNP soit suffisant pour provoquer une diminution de NETose nous a encouragés à analyser la présence de citH3 suite à une telle inhibition de la mitochondrie. Les résultats qui montraient une importante inhibition de citrullination suggéraient de se focaliser sur la mitochondrie. En effet, l'activité « pore-forming » de la LPV ne semblerait jusqu'ici pas impliquée dans le processus de NETose. Ainsi, nous avons voulu en quelque sorte compléter le travail de Zimmermann-Meisse et collègues concernant l'internalisation de la LPV dans le neutrophile humain, en analysant la mitochondrie (Zimmermann-Meisse et al. 2017).

3.3.4 Voyage de la LPV dans le neutrophile humain : un passage à la mitochondrie ?

Si les études précédentes avaient démontré que la LPV ne provoque pas de pore à la membrane plasmique, mais que cette leucotoxine est rapidement internalisée dans les neutrophiles humains (Tawk et al. 2015; Zimmermann-Meisse et al. 2017), nous avons voulu intégrer ces données en nous focalisant sur l'éventuelle localisation de la leucotoxine à la mitochondrie. En effet, la LPV est partiellement retrouvée au lysosome après 20 min d'incubation et, plus tardivement elle colocalise avec l'appareil de Golgi (Zimmermann-Meisse et al. 2017). Néanmoins, seulement une partie de la fluorescence correspondante à la LPV a été retrouvée au lysosome, soit environ 30% de la totalité de la leucotoxine, pouvant être le résultat de l'activation de l'autophagie cellulaire, plutôt que représenter une étape intermédiaire d'internalisation. Ce faible pourcentage pouvait effectivement indiquer qu'une partie de la LPV aurait pu interagir également avec la mitochondrie. Cette hypothèse est d'autant plus intrigante puisque des études datant 2005, et publiée par Genestier et collaborateurs montrent par microscopie électronique en transmission que la LPV semble effectivement se localiser à la mitochondrie (Genestier et al. 2005).

Nous avons donc voulu confirmer ce dernier résultat, tout en nous appuyant sur les observations de Zimmermann-Meisse et *al.*. Une méthode expérimentale légèrement modifiée a été choisie pour compléter l'étude sur l'internalisation au microscope confocal. En effet, nous avons exposé les hPMNs à 1 nM de LPV pendant toute la durée de l'expérience et nous avons arrêté la réaction par fixation au PFA toutes les 5-10 minutes, jusqu'à un temps maximal de 50 min d'incubation.

Le dernier temps d'incubation analysé a été choisi sur la base de l'état cellulaire. En effet, après 1 h d'incubation avec la leucotoxine, les hPMNs perdent leur morphologie et l'étude de la colocalisation devient très compliquée au niveau de l'interprétation. D'ailleurs, le contrôle négatif utilisé par Zimmermann-Meisse *et al.*, a été remplacé par une condition où les hPMNs ne sont pas laissés en absence de stimuli, mais ils sont plutôt exposés à la seule sous-unité LukS-PV de la leucotoxine sans sa contrepartie LukF-PV, ce qui ne permet pas l'internalisation de la LPV à l'intérieur des hPMNs. La fluorescence correspondante à la LukS-PV en absence de la sous-unité F est effectivement retrouvée majoritairement à la membrane plasmique (Figure 63 A, B et C). Inversement, quand la LPV présente les deux sous-unités S et F, il y a une internalisation, suivie par une colocalisation entre LPV et mitochondrie à partir de 30 min d'incubation (Figure 63 D, E et F).

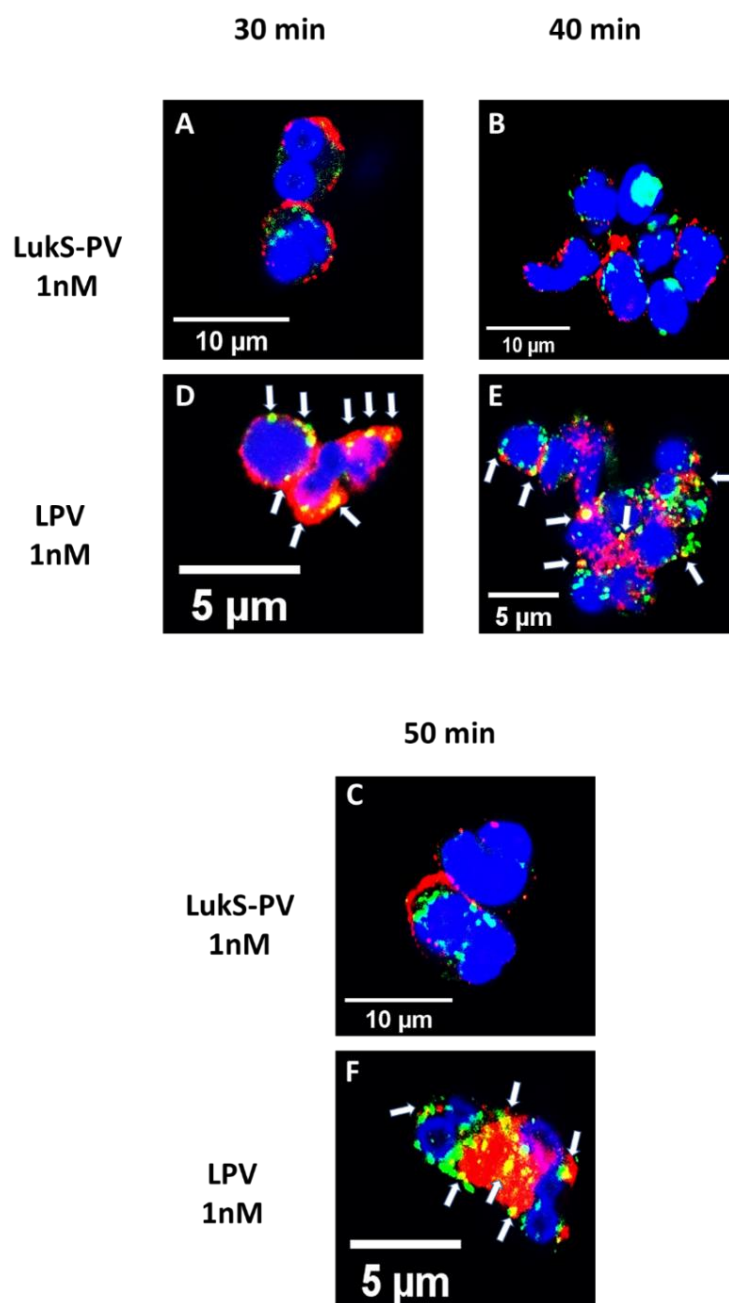


Figure 63- Colocalisation entre la LukS-PV (en rouge) et le cytochrome C de la mitochondrie (en vert).

Nous avons étudié différents temps d'incubation pour des hPMNs exposés soit à la seule sous-unité LukS-PV sans LukF-PV (A, B et C), soit avec la LPV complète (D, E et F). Nous avons remarqué une colocalisation de la LPV à la mitochondrie à partir de 30 min d'incubation (points jaune et flèches blanches). N=3

Par l'analyse du Coefficient de Corrélation de Pearson (CCP) et l'évaluation du pourcentage de LPV qui se superpose à la mitochondrie, nous avons pu quantifier cette colocalisation : le CCP à partir de 30 s'élève à environ 0.4 et environ 50% de la fluorescence correspondante à la LPV se superpose à la fluorescence du cytochrome C, maquant la mitochondrie.

Ces résultats, bien que préliminaires, indiquent la probable interaction physique entre la LPV et la mitochondrie. D'autres expériences de microscopie électronique en transmission et des tests de co-immunoprécipitation devraient être effectués pour en avoir une confirmation définitive. Néanmoins, il est intéressant de souligner le « timing » de cette colocalisation. Après environ 30 min, la LPV en concentration de 1nM semblerait se retrouver à proximité de la mitochondrie. Ainsi, si nous regardons le premier temps d'incubation auquel la LPV à 1nM provoque un niveau significatif de mtDROs (Figure 64), nous pourrions constater que les résultats des expériences de colocalisation et ceux obtenus par la cytométrie en flux sont cohérents et compatibles les uns avec les autres. Autrement dit, à partir du moment où la LPV se trouve proche de la mitochondrie, les mtDROs augmentent significativement.

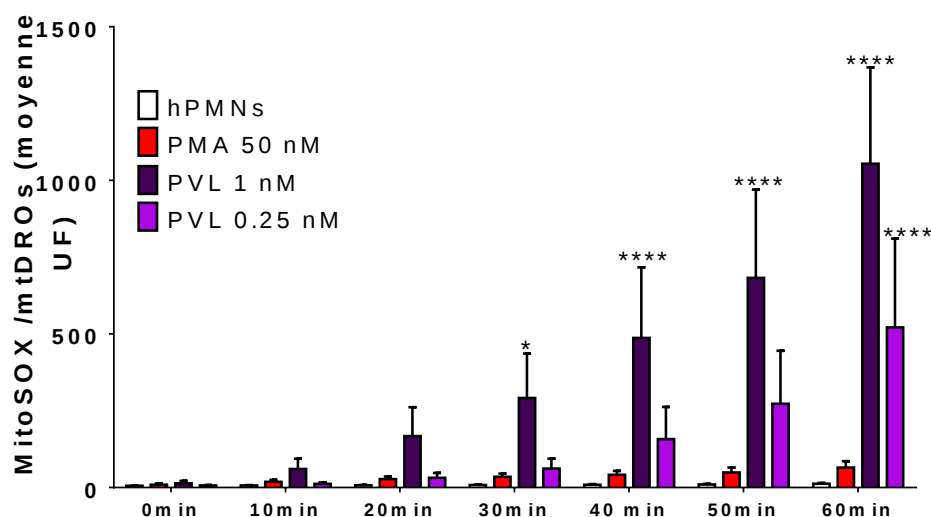


Figure 64- Analyse statistique de la moyenne de fluorescence du MitoSOX.

Nous avons étudié le niveau de mtDROs produits par les hPMNs à travers la sonde MitoSOX suite à l'action du PMA et de la LPV. Nos résultats montrent que la moyenne de fluorescence du MitoSOX augmente significativement à partir de 30 min d'incubation avec la LPV à 1 nM et plus tardivement avec 0,25 nM de la LPV. N=6.

La question qui se pose est de comprendre par quel mécanisme pourrait se produire l'augmentation des mtDROs due à la LPV. L'hypothèse de la formation d'un pore, non pas à la membrane plasmique, mais plutôt au niveau de la/des membranes de la mitochondrie pourrait être une explication fascinante, qui pourtant reste uniquement une hypothèse. Toutefois, une autre donnée, précédemment obtenue par Zimmermann-Meisse *et al.*, est à rajouter à cette discussion. En effet, ces auteurs ont également démontré que la LPV provoque une forte dépolarisation du potentiel mitochondrial, touchant plus que 60% des hPMNs testés (Zimmermann-Meisse *et al.* 2017). Ainsi si la formation d'un pore à la membrane de cette organelle est confirmée, cela expliquera la dépolarisation et la formation de mtDROs. D'ailleurs,

il est probable que la mitochondrie perde ses fonctions physiologiques pendant l'action de la LPV, et que ce bouleversement soit, au moins dans un premier temps, contrecarré par l'activation de l'autophagie dans le but d'éliminer les organelles défailantes.

En revanche, il faut également souligner que la colocalisation entre la LPV et la mitochondrie est observable principalement au niveau de la périphérie cellulaire, comme l'on peut remarquer des images (Figure 63 D). Cet aspect n'est pas à négliger, puisqu'il pourrait s'avérer que la colocalisation soit plutôt un effet passif du rapprochement entre deux éléments, la mitochondrie et la LPV. Dans ce cas, la superposition des fluorescences respective ne correspondrait pas à un effet directement dû à la leucotoxine en elle-même, mais plutôt à un événement lié à l'espace cytoplasmique très réduit causé par les changements morphologiques cellulaire et l'expansion du noyau des hPMNs durant les premières phases de la NETose.

En conclusion, ce dernier résultat ouvre la possibilité à une explication mécanistique qui prévoit que la LPV exerce son activité de « pore-forming » uniquement suite à son internalisation, et qui lui permettrait de cibler et interagir avec la mitochondrie probablement par un changement conformationnel de la protéine (due à l'environnement acide du lysosome dans lequel elle est retrouvée ?).

Un dernier commentaire reste à faire : en raison de l'origine endosymbiotique de la mitochondrie et de la nature commensale de la bactérie *S. aureus*, l'implication d'une voie de signalisation liée à la mitochondrie pourrait supporter l'idée d'une forme de communication entre la bactérie et cette organelle, ce qui a déjà été décrit concernant le microbiote intestinal (Han et al. 2019).

4 PUBLICATIONS

4.1 Abstract publié dans le journal « Toxicon »

Abstracts / Toxicon 149 (2018) 98–107

107

STAPHYLOCOCCUS AUREUS PANTON-VALENTINE LEUKOCIDIN CAUSES NETS IN HUMAN NEUTROPHILS

Viola Mazzoleni*, Gaëlle Zimmermann-Meisse, Daniel Keller, Gilles Prevost**. Université de Strasbourg, VBP EA7290, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Institut de Bactériologie, 3 rue Koeberlé, 67000 Strasbourg, France

E-mail address: viola.mazzoleni@etu.unistra.fr, prevost@unistra.fr

* Corresponding author.

Staphylococcus aureus is a major cause for many pathologies, both community and nosocomial, and it can colonize human skin in the absence of clinical symptoms. This bacterium can overpass immunity due to a variety of virulence factors often directed towards innate immunity, including bicomponent toxins (BCTs) such as Pantone-Valentine Leukocidin (PVL) and Gamma Haemolysin CB (HlgCB). Each of these two toxins is composed of two classes of subunits, S(C) and F(B), which sequentially interact with plasma membrane receptors. In particular, these S units bind a site of C5a receptor (C5aR) on target cells, such as human neutrophils, and, when combined with a F subunit, provoke cell death by an accelerated apoptosis in 40% of tested cells. Nevertheless, a Propidium Iodide labelling reveals a greater percentage of cells positive for membrane permeabilization in the presence of low concentrations of PVL. We then analysed another type of cell death called NETosis and we investigated some of the known elements involved in PMA-induced NETosis: phosphorylation of PI3K and ERK, autophagy, involvement of Reactive Oxygen Species (ROS) production and the spreading of Neutrophil Elastase (NE) shaped as extracellular chromatin-associated fibers. Immunofluorescence assays targeting LC3B protein show a significant autophagy level at early times (10 min) and low concentrations of both toxins (0.25 nM SF and 0.1 nM CB), while Western Blot results confirm only SF-induced autophagy. Moreover, an increased level of NE was found at later times (6 h) exclusively at 1 nM and 0.25 nM of PVL. Furthermore, our Western Blot data reveal that PI3K is phosphorylated after 1 h and 3 h at 1 nM and 0.25 nM PVL incubation respectively, while ERK is not. Finally, NADPH oxidase did not seem to be involved in ROS production and unexpectedly its inhibition by DPI seems to increase NE levels in the presence of SF. In contrast, mitochondrial ROS seem to be largely produced by PVL-treated PNNs. Our results suggest that even if PVL and HlgCB both target C5aR, cell consequences are different. Notably, PVL causes cell death by an accelerated apoptosis, but also via a NETosis pathway which is more like ionophore-induced NETosis, a type of NETosis being NADPH oxidase-independent and mitochondria-dependent. On the other hand, HlgCB is to be further investigated in order to define cellular

outcomes of this toxin on target cells.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, PVL, NETosis

ANATOXIN-A AND ANALOGS: OCCURRENCE, BIOSYNTHESIS AND DETECTION

Annick Mejean^{1,*}, Rabia Mazmouz¹, Insaf Essadik¹, Olivier Ploux^{1,2}. ¹ LIED, UMR 8236, CNRS Université Paris Diderot, 75013, Paris, France; ² ENSCP, Chimie ParisTech, 75005, Paris, France

E-mail address: annick.mejean@univ-paris-diderot.fr

* Corresponding author.

Freshwater cyanobacteria produce toxic secondary metabolites, the so-called cyanotoxins. Anatoxin-a and homoanatoxin-a are two potent neurotoxins produced by certain strains of cyanobacteria that are agonists of the nicotinic acetylcholine receptor, and these alkaloids provoke a rapid death of animals if ingested. The presence of these toxins in the environment poses a threat to human and animal health, and indeed animal lethal intoxications have been reported worldwide as this summer 2017, several dog deaths occurred along the Loire river after ingestion of contaminated water. We have recently identified the cluster of genes responsible for the biosynthesis of these alkaloids in *Oscillatoria* PCC 6506, a homoanatoxin-a producer¹. The biosynthetic pathway that we have proposed, based on the bioinformatic analysis of the ana cluster, shows several interesting steps, such as the oxidation of proline attached to an acyl carrier protein (ACP), and the polyketide mediated steps leading to the toxins^{1,2}. We have reconstituted, *in vitro*, the first steps of this biosynthesis^{2,3}. Ten other ana clusters have now been identified and sequenced in diverse cyanobacteria. These clusters show similarities and some differences suggesting a common evolutionary origin. In particular, the cluster from *Cylindrospermum stagnale* PCC 7417 possesses an extra gene coding for an F420-dependent oxidoreductase that is involved in the biosynthesis of dihydroanatoxin-a⁴. We have also identified in all these ana clusters, a gene coding for an efflux protein likely involved in the transport of these toxins. Preliminary data (not published) suggest that the anatoxins are excreted in the culture medium, and AnaI, the MATE type transporter, is likely involved in this process.

[1] Méjean *et al.* 2009. *J. Am. Chem. Soc.* 131: 7512-7513.

[2] Méjean *et al.* 2014. *Toxicon*. 91: 15-22.

[3] Moncoq *et al.* 2013. *Acta Cryst. D*. 69: 2340–2352.

[4] Méjean *et al.* 2016. *J. Nat. Prod.*, 79: 1775-1782.

[5] Mann *et al.* 2012. *Toxicon*. 60: 1404-1414.

Keywords: Anatoxin-a, cyanobacteria, environnement, detection, biosynthesis

4.2 Article en phase de révision, soumis au journal « The FASEB Journal »

1

1 *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine Leukocidin triggers an
2 alternative NETosis process targeting mitochondria

Viola Mazzoleni ¹, Gaëlle Zimmermann-Meisse ^{1□}, Anna Smirnova ^{2□}, Ivan Tarassov², Gilles Prévost ^{*1}

3 ¹ University of Strasbourg, CHRU Strasbourg, Fédération de Médecine Translationnelle de
4 Strasbourg, EA7290, Institut de Bactériologie, 3 rue Koeberlé, 67000 Strasbourg, France. * To
5 whom correspondence should be sent: prevost@unistra.fr ; 33 3 68 85 37 57

6 ² UMR 7156 GMGM Strasbourg University/CNRS, 4, Allée K. Roentgen, IPCB, 67000
7 Strasbourg, France.

□ These two authors participated equally to this article

*Corresponding author: prevost@unistra.fr

Shot/running title: PVL induces a mitochondrial NETosis.

8 **Nonstandard Abbreviations:**

- 9 Panton-Valentine Leukocidin (PVL)
- 10 Gamma haemolysin CB (HlgCB)
- 11 *Staphylococcus aureus* (SA)
- 12 Neutrophil extracellular traps (NETosis)
- 13 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)
- 14 C5a complement-derived peptide receptor (C5aR)
- 15 NADPH oxidase-derived reactive oxygen species (ROS)
- 16 Neutrophil elastase (NE)
- 17 Myeloperoxidase (MPO)
- 18 Citrullinated histone h3 (citH3)
- 19 NADPH oxidase (NOX)
- 20 Peptidyl arginine deiminase 4 (PAD4)
- 21 Hydrogen peroxide into hypochlorous acid (HOCl)
- 22 Enzyme xanthine oxidase (XO)
- 23 Small conductance calcium-dependent potassium channel (SK)
- 24 Mitochondrial reactive oxygen species (mtROS)
- 25 Human neutrophils (hPMNs)
- 26 Diphenyleneiodonium (DPI)
- 27 Dihydrorhodamine 123 (DHR123)
- 28 2,4-dinitrophenol (DNP)
- 29 4-amino-5-(4-methylphenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]- pyrimidine (PP1)
- 30 4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine (PP2)
- 31 The light chain of microtubule-associated protein 1a and 1b (LC3A and LC3B)
- 32 Cytochrome c (CytC)
- 33 Pearson correlation coefficient (PCC)
- 34 Protein kinase c (PKC)

Abstract

Panton-Valentine Leukocidin (PVL) is a bi-component toxin produced by 3-10% of clinical *Staphylococcus aureus* (SA) strains involved in severity of hospital and community-acquired infections. Although PVL is known as a pore-forming toxin, recent studies have challenged the formation of a pore at the plasma membrane while its endocytosis and the exact mode of action remain to be defined. *In vitro* immunolabeling of human neutrophils showed that Neutrophil Extracellular Traps (NETosis) are triggered by the action of purified PVL, but not by Gamma haemolysin CB (HlgCB), a structurally similar SA leukotoxin. PVL causes the ejection of chromatin fibers decorated with antibacterial peptides independently of NADPH oxidase oxidative burst, rather colocalizing with mitochondria and enhancing the production of reactive oxygen species from these organelles, through Ca^{2+} -activated SK channels and xanthine oxidase. Unexpectedly, this process does not seem to involve Src kinases, the main kinase family activated downstream the binding of the F subunit of PVL to CD45 receptor, while the involved kinase pathway differs from that found for the NADPH oxidase-dependent NETosis. Thus, PVL alone causes another form of NETosis that may be rather a bacterial strategy conceived to disarm and disrupt the immune response, allowing the spreading of SA.

Key words: SK channels, CD45, mitochondria, ROS, colocalization, leukocidin.

Introduction

One third of the human beings are possible carriers of *Staphylococcus aureus* (SA), a world-wide spread bacterium responsible for multiple infections (1). Despite being a commensal bacterium for healthy hosts, this pathogen mainly takes advantage of weakened immunity, thus representing one of the most common cause of both community and hospital-acquired infections. The pathogenicity of SA is due to its ability to easily adapt to human immunity through the production of diverse virulence factors that can strategically counteract various steps of the innate immune response, thus, delaying the adaptive immune response and promoting the bacterial spread to any deep tissues and organs (2–4). Historically related to difficult-to-treat infections, including antibiotic resistant strains such as the Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) (5), SA virulence factors mainly target leukocytes, as in the case of a group of bipartite leukotoxins known as “pore-forming toxins” (PFT) (2). We focused here on two PFT: the Pantan-Valentine Leukocidin (PVL), which is produced via an integrated bacteriophage (6–8) and is present in 3-10% of clinical SA strains, representing a factor that influences the severity of infection, and the Gamma-haemolysin CB (HlgCB) expressed by 99% of SA strains, which is mainly related to an haemolytic activity (9–12). PVL and HlgCB are expressed following the main *agr* regulation system, whereas the other gamma-hemolysin component HlgA is not (13). Moreover HlgA subunit is less frequently expressed by *S. aureus* strains (13). More generally, leukotoxins share structural characteristics, amongst them, PVL and the HlgCB are both composed by two subunits, one slow-eluted compound, the S subunits (31–32 kDa), LukS-PV and HlgC, respectively, and one fast-eluted compound, the F subunits (34–35 kDa), LukF-PV and HlgB, respectively. The sequential, but synergistic interaction of S and F subunits at the plasma membrane is required in order to activate target cells via the phosphorylation of the C5a complement-derived peptide receptor (C5aR) (14, 15). More specifically, S subunits of both toxins first interact with the C5aR expressed at the plasma membrane of human neutrophils, macrophages, monocytes and ganglion neurons (14, 16–18), while LukF-PV has been recently reported to be the CD45 receptor (19).

Albeit PVL and HlgCB were longer considered as two analogous pore-forming toxins (20), more recently Tawk *et al.* (2015) have shown that in the presence of 1 mM $[Ca^{2+}]_{ext}$, HlgCB causes only a weak disruption of the membrane cell integrity, whereas PVL does not modify at all the membrane resistance of target cells and never induced a pore in synthetic membranes. Moreover, other differences between PVL and HlgCB have been observed, as both the dissimilar intracellular calcium $[Ca^{2+}]_i$ mobilisation (21) and retrograde intracellular transport evidenced in human neutrophils, strongly suggest that these toxins have indeed distinct cellular outcomes (22). Besides, Zimmermann-Meisse *et al.* (2016) demonstrated that, at physiological condition of $[Ca^{2+}]_{ext}$, nanomolar or lower concentrations of PVL can lead to an early apoptosis in about 30% - 40% of tested

human neutrophils, whereas HlgCB did not. This result is in agreement with Genestier et al. (23), highlighting an additional difference between PVL and HlgCB. Interestingly, Zimmermann-Meisse et al. also revealed that about 60 % of cells exposed to the same low concentrations of the PVL showed the loss of membrane integrity within 6 h (24).

Therefore, we focused on a different late-term cellular consequence of the PVL in a culture media containing a physiological level of $[Ca^{2+}]_{ext}$ to analyse human neutrophils outcomes *in vitro*: we studied the Neutrophil Extracellular Traps (NETosis) phenomenon. NETs are DNA/chromatin fiber-like extracellular structures that can be induced by several stimuli, including microorganisms (25), as an immune defence strategy to mechanically block and enzymatically neutralise pathogens (26). This programmed cell death has been previously linked to SA secreting PVL strains (SA PVL⁺) by Pilsczek et al. (27), suggesting that SA supernatant containing PVL induces NETosis within minutes without cell lysis, while more recently Bhattacharya et al. (28) have stated that PVL cooperates with HlgAB in order to produce a biofilm-mediated NET formation, as the absence of the only PVL in SA spent media was not sufficient to block NETosis, implying that PVL alone cannot induce NETosis. However, the effect of purified PVL had not been tested directly so far and the assessment of the leukotoxins expression in the biofilm spent media used by these authors only demonstrated the presence of the F subunit of PVL, without the S subunit (28). Also, it is common knowledge that HlgAB has a main lytic activity on human erythrocytes and some T lymphocytes. Therefore, a precise study on the PVL direct contribution and intracellular signalling in human neutrophils is still lacking. The abundant literature available on the main topic shows how NETosis is a complicated and stimulus-dependent process, highlighting the presence of at least two distinct forms of this same phenomenon, based on the involvement of the enzyme NADPH oxidase (NOX) for the production of ROS. In fact, the NOX-dependent NETosis has been described as induced by Lipopolysaccharide (LPS) or PMA, amongst others (29–33), while the NOX-independent NETosis is obtained with stimuli such as the uric acid or the calcimycin, a calcium ionophore produced during the fermentation of *Streptomyces chartreusensis* (27, 34–36). This second form of NETosis leads to an increase of intracellular calcium and a subsequent increase in potassium concentration (37). The increase in intracellular calcium leads to the activation of the peptidyl arginine deiminase 4 (PAD4) (10, 34, 36, 38). Moreover, other sources of ROS, aside from NOX, exist in human neutrophils. Those alternative ROS sources can sustain NETosis, such as MPO, converting hydrogen peroxide into hypochlorous acid (HOCl), mitochondria, producing superoxide through mitochondrial OXPHOS chain activity, and the action of the cytosolic enzyme xanthine oxidase (XO) (38). Additionally, xanthine oxidase is linked to the increase of mitochondrial ROS production (39), creating a positive feedback on this organelle.

Also, Doua et al. (40) reported that a small conductance calcium-dependent potassium channel predominantly expressed in human neutrophils, named SK3, is involved in NOX-independent NETosis.

Additionally, recent studies have highlighted the role and specificity of H3 citrullination (citH3) operated by PAD4, which is solely found in the NOX-independent NETosis (41).

Our study aimed to identify some specific outcomes of the PVL in contact with human neutrophils in the absence of others *Staphylococcus aureus* elements, in order to discriminate them from the impact of the HlgCB, in the first instance, and to compare the characteristics of a classical form of NOX-dependent NETosis to the hallmarks of a likely ineffective or even detrimental form of the process. In the present study, we found another difference between two comparable leukotoxins: the sole PVL, but not HlgCB, causes a significant NETosis in human neutrophils in a NOX-independent manner, while involving mitochondria and mitochondrial ROS (mtROS), XO, MPO for ROS production. We also found that a subsequent increased autophagy takes place in parallel with NETosis, while neither Akt and ERK1/2, nor CD45 downstream-linked Src kinases, are activated. The PVL NETosis-induced chromatin fibers are decorated with NE, MPO, but also citH3, collectively showing several discrepancies in comparison with the PMA-induced NETosis. These results provide a comprehensive and a precise view of the PVL mechanism in a more physiological context, also addressing a potential link between staphylococcal infections and autoimmune diseases.

Materials and methods

Ethics Statement

Buffy coats from healthy adult volunteers, mostly aged of less than 30 years and of both sexes were purchased from the “Établissement Français du Sang” (Strasbourg, France). Written consents were collected by the Établissement Français du Sang, which keeps confidential donor information.

Human neutrophils culture media conditions

Human neutrophils (hPMNs) used for all experiments are cultured in Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI, Biowest, Nuaille, France) supplemented with either 10% foetal bovine serum (FBS) (v/v) or 0.5%

of bovine serum albumin (BSA) (w/v), the latter in order to obtain a better adherence to Petri dishes during hPMNs cell culture. Cells were then kept at 37°C with 5% CO₂ in a humidified incubator and tested for PVL and HlgCB infection for a maximum of 6h.

Inhibitors

In order to test PVL NETosis dependence on different enzymes, channels or organelles, we used a range of several specific inhibitors. More precisely, Diphenyleneiodonium chloride or DPI (D2926, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) was used at 20µM final concentration applied during 30 minutes to hPMNs prior to stimuli addition in order to inhibit NADPH oxidase machinery. Concerning mitochondrial ROS, we pre-treated hPMNs with a mitochondrial uncoupler, the 2,4-Dinitrophenol or DNP (D198501, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) at 750µM during 1h to prevent overt ROS production, preferring this type of inhibitor rather than scavengers that only neutralize already produced ROS.

Allopurinol, a potent xanthine oxidase inhibitor, was purchased from Sigma-Aldrich (A8003, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) and used at 2mM final concentration during 30 min before hPMNs stimulation. Myeloperoxidase Inhibitor-I, (sc204107, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA), an irreversible and specific inhibitor of the peroxidation activity of MPO, also named ABAH, was used at the final concentration of 100µM during 30 min before the adding of PMA and PVL. Small conductance Ca²⁺-activated potassium channel (SK) inhibitor NS8593 hydrochloride was purchased from Santa-Cruz Biotechnology (CAS No. 875755-24-1, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA) and used as hPMNs pre-treatment at 100µM, being a reversible SK3-mediated current inhibitor in human and rat SK3, that operates a decrease in calcium sensitivity. Cl-Amidine (trifluoroacetate salt), an inhibitor of protein arginine deiminases (CAS No. 1043444-18-3, Cayman Chemicals, Ann Arbor, Michigan, USA) was used at 200µM during 15 min before NETosis induction.

The 4-amino-5-(4-methylphenyl)-7-(t-butyl) pyrazolo[3,4-d]- pyrimidine (PP1), a potent but reversible Src kinases Inhibitor, (CAS No. 172889-26-8, Cayman Chemicals, Ann Arbor, Michigan, USA) was used to pre-treat hPMNs during 30 min before NETosis induction at the final concentration of 5µM, and 4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine (PP2), an irreversible Src kinases inhibitor were purchased from Sigma-Aldrich (P0042, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) and used at the final concentration of 10µM during 30 min before NETosis induction.

Antibodies and fluorescent dyes

Dihydrorhodamine 123 (DHR123) fluorescent probe, used for the determination of peroxynitrite and other cytoplasmic ROSs at the final concentration of 2.5 μ M, was obtained from Santa Cruz Biotechnology (CAS No. 109244-58-8, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA). MitoSOX™ Red mitochondrial superoxide indicator, purchased from Molecular Probes (M36008, Molecular Probes, Eugene, OR, USA), was used in order to evaluate mitochondrial superoxide in human neutrophils.

Two main antibodies were used to confirm the presence of NETosis by epifluorescence experiments: the anti-Neutrophil Elastase (ab21595, Abcam, Cambridge, UK, RRID:AB_446409), a polyclonal antibody developed in rabbits and used at the final concentration of 1 μ g/mL, and the monoclonal anti-Myeloperoxidase antibody produced in mouse (ab25989, Abcam, Cambridge, UK, RRID:AB_448948), used at the final concentration of 1 μ g/mL. The anti-Histone H3 (citrulline R2 + R8 + R17) antibody - ChIP Grade (ab5103, Abcam, Cambridge, UK, RRID:AB_304752), a polyclonal antibody developed in rabbits was used at 1 μ g/mL in order to assess and subsequently quantify the post-translation modification of the histone H3 on the NETs. The secondary antibodies Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody Alexa Fluor® 488 conjugate and Goat anti-Mouse IgM (Heavy chain) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor® 555 conjugate, purchased from Invitrogen™ (A-11034, RRID:AB_2576217 and A-21426, RRID:AB_2535847, Invitrogen™, Waltham, Massachusetts, USA), were used at a concentration of 2 μ g/ml in dilution buffer (HBSS-HEPES containing 5% FBS and 1 mg/mL BSA). Hoechst dye 32258 (94403, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) was employed at the final concentration of 10 μ g/mL to stain nuclei and DNA.

For confocal microscopy experiments we used an antibody raised against the LukS-PV in its form of fragment antigen-binding F(ab')² and produced at the Institute of Bacteriology of Strasbourg by Keller D., as previously described (15, 42). A purified Mouse Anti-Cytochrome c, Clone 6H2.B4 purchased from BD Pharmingen™ (556432, BD Pharmingen™, San Diego, CA, USA) was used at 1:100 to stain mitochondria, while DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) purchased from Sigma-Aldrich (D9542, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) was used at 1 μ g/mL final concentration to stain DNA and nuclei. The secondary antibodies F(ab')² Goat anti-Rabbit IgG-F(ab')² Fragment cross-adsorbed Antibody DyLight® 594 Conjugated and the Donkey F(ab')₂ Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488) preadsorbed were used at the final concentration of 2 μ g/ml in dilution buffer (HBSS-HEPES containing 5% FBS and 1 mg/mL BSA) and purchased from Bethyl Laboratories, Inc. (A120-212D4, RRID: AB_10698092, Bethyl Laboratoires Inc., Montgomery, Texas, USA) and from Abcam (ab181289, RRID: AB_2813900, Abcam, Cambridge, UK), respectively.

Concerning immunoblots, we routinely use a polyclonal antibody anti-GAPDH at 1:10000 (G9545, RRID:AB_796208, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) developed in rabbits as loading control in order to ensure an equal amount of total proteins for each lane, yet avoiding stripping and reprobing the Western blot membrane and allowing the evaluation of phosphorylation of tested proteins and total proteins at one glance, in the same image.

In order to study the phosphorylation of key kinases involved in NETosis, we used primary antibodies at 1:1000 developed in rabbits: an Anti-phospho-Erk1/2 (Thr202/Tyr204, Thr185/Tyr187)Antibody, recombinant clone AW39R (05-797R, RRID:AB_1587016, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), a rabbit monoclonal, Anti-phospho Akt (ser 473) (#9271, RRID:AB_329825 Cell Signaling Technologies, Danvers, Massachusetts, USA)and a rabbit polyclonal, Anti- Phospho-Src Family (Tyr416) (#2101, RRID:AB_331697, Cell Signaling Technologies, Danvers, Massachusetts, USA).

For autophagy, we used the anti- LC3B (L10382, Invitrogen™, Waltham, Massachusetts, USA), a polyclonal antibody developed in rabbits that allows to visualize both LC3A and LC3B bands.

Isolation of Human Polymorphonuclear Cells (hPMNs)

Human PMNs are prepared from about 50 mL of buffy coats from healthy donors. The cells were isolated within 24 h after blood donation, as previously described (15, 43). Briefly, human neutrophils were separated from other blood components by density gradient centrifugation with Lymphocytes separation medium (CMSMSL0101, Eurobio Scientific, Les Ulis, France). Erythrocytes are initially removed by the adding of 6% (w/vol) dextran for sedimentation, while the remaining amount is removed with a hypotonic lysis with ddH₂O, followed by 9% of NaCl addition, in order to perform an osmotic shock for 45 seconds. Finally, hPMNs are filtered, counted and resuspended in a RPMI culture media supplemented with either 10% foetal bovine serum (FBS) (v/v) (P30-3306, PAN-Biotech, Aidenbach, Germany) or 0.5% of bovine serum albumin (BSA) (wt/v) (04-100-810-C, Euromedex, Souffelweyersheim, France).

Leukotoxin Purification

The SA HlgCB and PVL toxins were purified as previously described (44), and leukotoxins mutations and purification were performed as described (45). Briefly, each subunit of both toxins is purified by affinity chromatography on glutathione-Sepharose 4B, followed by a cation-exchange fast-performance liquid

chromatography after removing the GST tag with PreScission Protease (27084301, GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA). The homogeneity of preparations is assessed by radial gel immunoprecipitation and by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis before storage at -80°C (45).

Immunocytochemical detection of NETosis by epifluorescence microscopy and quantification

Primary antibodies raised against human neutrophil elastase (NE), myeloperoxidase (MPO) and citrullinated histone H3 (citH3) were used to detect NETs in human neutrophils. Cells, (5×10^5 cells/mL in RPMI-0.5% BSA) were maintained for 10min, 1h, 3h and 6 h at 37°C , in a 5% CO_2 incubator with 1 nM, 0.25 nM and 0.1 nM of PVL or 50 nM of PMA. The same experiment was initially performed using 1 nM, 0.5 nM and 0.1 nM of HlgCB in order to assess the different cellular outcomes of the two toxins. Toxin concentrations are chosen in regards to dissociation constants (K_d) between the toxins and the common target receptor C5aR in human neutrophils (16). Where indicate, pre-treatments with different inhibitors are performed in parallel during 15min, 30 min or 1h before stimuli addition, depending on the inhibitor. After each incubation period, cells were fixed for 5 min with 4% (v/v) paraformaldehyde- HBSS-HEPES and maintained in blocking buffer (10% FBS (v/v), 5 mg/mL BSA in PBS (w/v)) overnight at 4°C after one wash step with Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) supplemented with 10mM Hepes. Cells were washed twice with HBSS before adding the primary antibodies diluted at 1 $\mu\text{g/mL}$ in the dilution buffer (HBSS-HEPES containing 5% FBS and 1 mg/mL BSA) and maintained 1 h at RT with gentle agitation. After two HBSS washes, cells were incubated with secondary Antibody coupled to Alexa Fluor® 488 or Alexa Fluor® 555 at a concentration of 2 $\mu\text{g/mL}$ in dilution buffer (HBSS-HEPES containing 5% FBS (v/v) and 1 mg/mL BSA (w/v)) for 1 h at RT with gentle agitation. Then, cells were washed and incubated for 30 min with 10 $\mu\text{g/mL}$ Hoechst 32258 for nuclei and DNA labelling, and then visualised. The observations were made with the Olympus BX60, an epifluorescence upright microscope equipped with a $10\times$ objective and a filter set which includes an UV filter for visualisation of Hoechst fluorescence, a Fluorescein filter, specific for Alexa488 fluorescence, and a Rhodamine filter, for Alexa555 fluorescence. Fluorescence microscope-obtained images were analysed with CellProfiler software version 2.2 for Windows (RRID:SCR_007358, Brod Institute, Harvard, Cambridge, MA, USA) (46), which allows the identification and count of Hoechst-positive cells and NE-, MPO- or citH3-positive cells. The results are obtained by a sequence of modules forming a pipeline, which are described and can be downloaded at: http://cellprofiler.org/published_pipelines.html. Percentage of NETing hPMNs was determined by Hoechst-stained cells/ secondary antibody-stained cells ratio, thus considering the simultaneous presence of DNA and antimicrobial proteins on NETs. This method is based on an adapted version of the formula previously described by Brinkmann and colleagues in 2012 (47).

Western Blot

Human neutrophils ($1 \times 10^7/\text{mL}$) were incubated, in RPMI-10% FBS (v/v) medium alone or with PMA or PVL at 37°C with 5% CO₂, for up to 100 min. After each incubation time-point, cells were harvested, washed twice with cold PBS and the pellets were subjected to protein extraction with RIPA buffer supplemented with 0.2% of Triton X-100 (v/v) in the presence of the Protease Inhibitor Cocktail cOmplete™ (11697498001, Roche, Bâle, Switzerland), NaVO₃ (1 mM), leupeptin (25 µM), pepstatin (25 µM), aprotinin (25 µM), NaF (25 mM), levamisole (1 mM), PMSF (1 mM) and phosphatase inhibitors (P5726, Sigma–Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Total protein concentration was determined with a protein assay reagent kit (Thermo Scientific™ Pierce™ 660nm Protein Assay, 22660, Waltham, Massachusetts, USA). The lysates were added to a 4× loading buffer containing 10% (v/v) of β-mercaptoethanol, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, leupeptin (10 µg/mL), pepstatin (10 µg/mL), aprotinin (10 µg/mL), NaF (10 mM), NaVO₃ (5 mM), and levamisole (1 mM) and heated for 5 min at 95 °C. Protein migration was performed in a sodium dodecyl sulfate 4-20% gradient polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) purchased from BioRad and transferred to a 0.22 µm nitrocellulose membrane (GE Healthcare Amersham™ Protran™ Supported NC Nitrocellulose Membranes, Chicago, Illinois, USA) for 1 h at 30 V in a blotting system (Bio-Rad, Hercules, California, USA). Membranes were placed in blocking buffer (PBS with 5% no fat dry milk) for 3 h at 4°C with gentle agitation and incubated overnight at 4°C with rabbit primary antibody (1:1000). Immunoblotting with rabbit polyclonal antibody to GAPDH (1:10000) were used as the internal loading control to ensure equivalent amounts of protein in each lane, avoiding the stripping step on nitrocellulose membranes after the revelation of phosphorylated forms of proteins of interest. Detection was achieved using appropriate HRP-linked secondary antibodies (1:50000), followed by Clarity Max™ Western ECL Blotting Substrate chemiluminescence kit (#1705062, Bio-Rad, Hercules, California, USA). Immunoreactive bands were visualized with a Chemidoc Instrument (Bio-Rad, Hercules, California, USA) and quantified with ImageJ (NIH).

Flow cytometry for ROS quantification

To measure ROS levels, human neutrophils ($1 \times 10^6/\text{mL}$ RPMI w/o Phenol Red supplemented with 10% FBS) were purified and stained with 10 µM Dihydrorhodamine or 2.5 µM of MitoSOX kept at 37 °C for 30 min in order to let the dyes enter the cells. In parallel, the pre-treatment with DNP was performed during 1h before toxins addiction. Then, PMA at 50nM, PVL at 1nM and at 0.25 nM were added, and the acquisition was started. Cells were analysed with Guava easyCyte 8HT system flow cytometer (EMD, Millipore, Burlington, Massachusetts, USA). The neutrophil population at $1 \times 10^6/\text{mL}$ was analysed at a medium flow rate of 0.59 µL/s

and selected based on Forward Scatter (FSC) and Side Scatter (SSC) parameters. DHR123 or MitoSOX fluorescence were analysed in the Green (525/30 nm) and Yellow channel (583/26 nm), respectively. Mean Fluorescence intensity (MFI) of both dyes was compared with MFI of unstimulated cells.

Immunofluorescence labelling of PVL and mitochondria, confocal microscopy and image analysis.

Freshly isolated hPMNs at 8×10^6 cells/mL in RPMI-10% FBS (v/v) were kept for 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 30 min, 40 min and 50 min at 37 °C, in a 5% CO₂ incubator in the presence of either 1nM of the PVL or 1nM of the subunit LukS-PV only. Then, cells were fixed by 4% (v/v) paraformaldehyde- HBSS-HEPES during 10 min at room temperature (RT). Next, hPMNs were permeabilized with 0.05% (v/v) of Triton X-100 containing HBSS-HEPES for 5 min and washed before being blocked for additional 30 min at RT. Another wash was performed prior to the addition of primary antibodies diluted in HBSS-HEPES containing 5% FBS and 1 mg/mL BSA. Cells were kept overnight at 4 °C and two washes were performed with HBSS-HEPES. Next, secondary antibodies were applied to cells for 1h at RT, washed twice and then stained for 5 min by 1 µg/mL DAPI for labelling nuclei. Cells were mounted on slides using Mowiol media (Mowiol 4.88; cat# 475904; Calbiochem, La Jolla, CA, USA), and stored at 4°C in a light-proof container. The observations were carried out using a Zeiss LSM 780 confocal microscope controlled by the ZEN 2010 with a 63× oil immersion objective. Ten fields of 1024 × 1024 pixels were acquired for each condition using a 305 nm diode (ultraviolet), a 488 nm argon laser, and a 561 nm diode-pumped solid-state laser. Images were analysed with the Fiji plug-in MosaicSuite by Squassh (segmentation and quantification of subcellular shapes) tool (RRID:SCR_002285) (48, 49), in order to perform segmentations and quantifications of Pearson's correlation coefficient and overlapping area of LukS-PV fluorescence with CytC fluorescence area.

Statistical Methods

Results are expressed as mean ± standard error of the mean of at least three independent experiments. GraphPad Prism version 7 for Windows software (GraphPad Software, RRID:SCR_002798, La Jolla, CA, USA) was used to calculate the means for each experimental condition, create the graphs, and obtain the statistical analysis. Student's T-test and two-way or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni, Dunnett or Tukey's post-test, were used where appropriate, to detect differences between conditions. A *p*-value < 0.05 was considered significant.

Results

PVL, but not HlgCB provokes NE-decorated chromatin fibers spreading in extracellular space

In order to study the NETosis process we performed several and separate immunofluorescence assays on human neutrophils (hPMNs) at definite time points in contact with either purified PVL or HlgCB at specific and low concentrations. PMA, an inducer of the classical NOX-dependent pathway, was routinely used at 50 nM as a positive control. Our results show a significant increase of NE associated to extracellular DNA after 6h at both 1 nM (Figure 1 C and C') and 0.25 nM (Figure 1 D and D') of the PVL, concerning about 50% additional hPMNs, if compared to spontaneous NETosis of unstimulated cells (Figure 1 I, p value= 0.0005 for PVL 1 nM and p value= 0.009 for PVL 0.25 nM). The PVL NETosis is a time-dependent process (Figure 1- figure supplement 2), and it also presents a corresponding level of MPO associated to extracellular chromatin fibers (Figure 1- figure supplement 2), confirming that PVL causes a real phenomenon of NETosis. As expected, PMA at 50 nM also causes a significant NETosis at 6h (Figure 1 B and B'), which concerns about 60% additional hPMNs, compared to the spontaneous NETosis level of unstimulated cells (Figure 1I), though showing more rapid kinetics than PVL (Figure 1- figure supplement 2). Conversely, 0.1 nM of PVL at 6h (Figure 1 E and E') causes NETosis in only about 30% additional hPMNs compared to unstimulated cells, which represents a slightly insufficient increase to be statistically significant from the negative control (Figure 1 I). Inversely, HlgCB at 1nM, 0.5 nM and 0.1 nM, fails to provoke any significant NETosis at 6h (p value> 0.05) (Figure 1 F-H), showing only about 15% of additional hPMNs positive to the NE marker (Figure 1 I).

Taken together, only purified PVL causes NETosis *in vitro*, while HlgCB does not. (figure 1 A and B). However, the NETosis level may vary according to donors, more precisely on the age of donors, as suggested by Adrover et al. (50). Neutrophils from donors > 35 y.o. showed an important amount of unstimulated cells positive to NE (about 20% of spontaneous NETosis, Figure 1 I) as demonstrated by the error bars in graphics (Figure 1 I), and by the different NETosis level obtained after stimulations (Figure 1- figure supplement 4). For this reason, all the following experiments were achieved using neutrophils of donors aged less than 30 years.

Figure 1

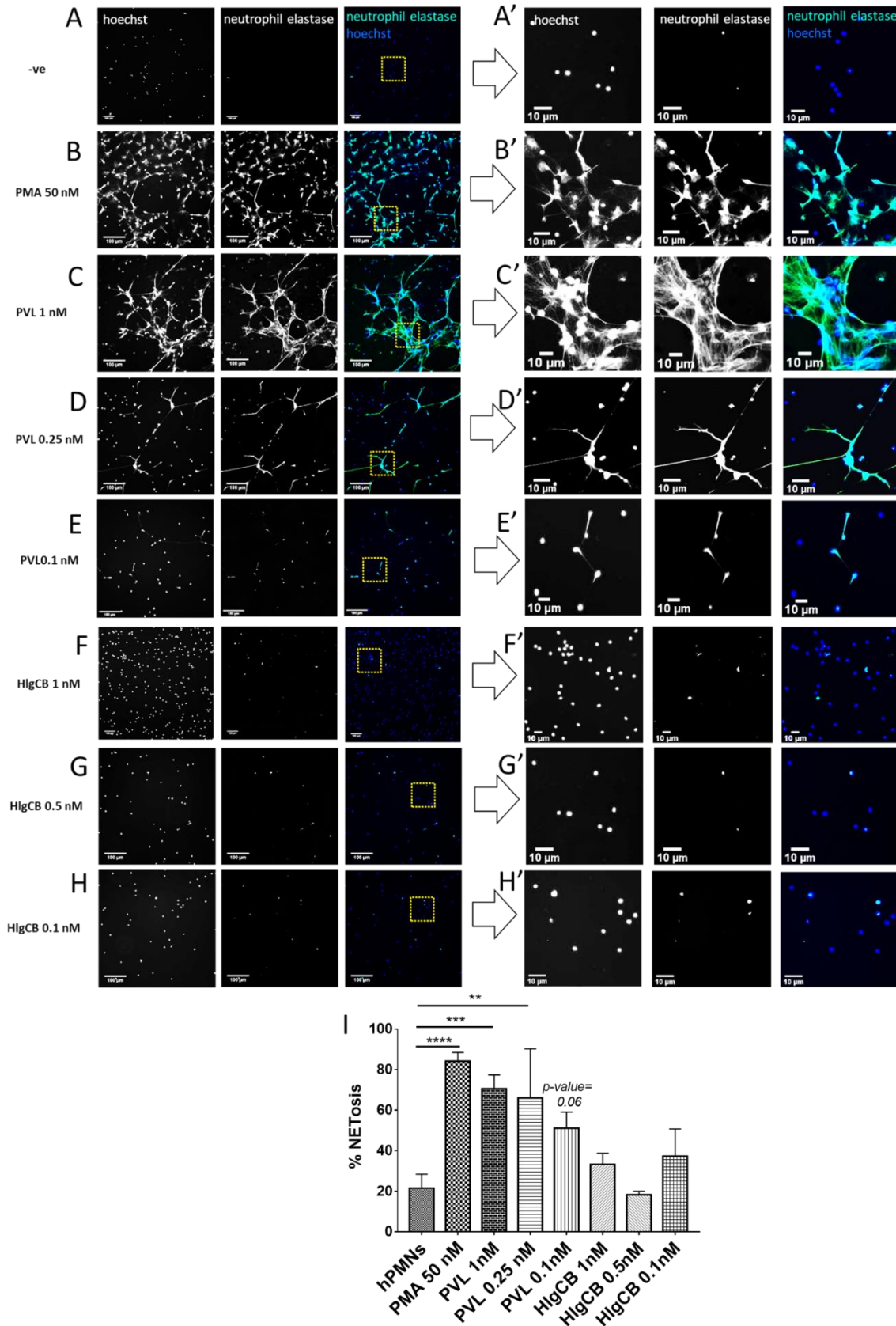


Figure 1: PVL, but not HlgCB provokes NE-decorated chromatin fibers spreading in extracellular space. Freshly isolated human neutrophils (hPMNs) were left unstimulated (A and A') or exposed for 6h to 50 nM of PMA (B and B'), PVL at 1nM (C and C'), 0.25nM (D and D'), 0.1 nM (E and E'), or HlgCB at 1 nM (F and F'), 0.5 nM (G and G') or 0.1 nM (H and H'). hPMNs were fixed with 4% PFA and stained with an anti- Neutrophil Elastase (NE) antibody (in green) and Hoechst dye to observe chromatin and nuclei (in blue). NE-positive cells were quantified using 8 random fields of view obtained from three or more different biological replicates. Images marked with prime symbols (') on the right are close-ups of the original corresponding image on the left marked with the same letter without prime symbols. Blown-up areas are highlighted with a yellow dotted square on the original image. (I) Presented is the mean with SEM. Groups were compared to unstimulated neutrophils using repeated measures one-way ANOVA and Dunnett post-test, ****p ≤ 0.0001, **p ≤ 0.01, *p < 0.05.

PVL-mediated NETosis is independent of NADPH oxidase complex but dependent on mitochondria

We focused on the involvement of NOX in PMA and PVL-induced NETosis. NOX was inhibited by pre-treating hPMNs with 20 μ M of Diphenyleneiodonium (DPI), a potent inhibitor of NADPH oxidase, NETosis level was quantified at 6h, through anti-NE antibody staining. DPI significantly inhibits PMA-induced NET formation (Figure 2 D and D'), while PVL was still able to massively cause NETosis, rather showing even a slightly rise due to DPI (Figure 2 G and G', H and H'). In fact, at 6h, 1 nM and 0.25 nM of PVL in the presence of DPI showed an increased NETosis in about 30% additional hPMNs, compared to PVL without DPI (figure 2 I).

Next, we directly investigated the source of the PVL-induced oxidative burst, which is independent of the NADPH oxidase activity. In fact, the classical microbicidal form of the process has been mainly demonstrated to involve NADPH oxidase as the primary source of reactive oxygen species (ROS), necessary for chromatin decondensation and nuclear membrane collapse (51). These ROS are usually quantified by flow cytometry, using a fluorescent indicator, the dihydrorhodamine 123 (DHR123) at 2.5 μ M, which is a nonfluorescent membrane-permeable ROS indicator that becomes fluorescent in its oxidized form, rhodamine 123, emitting a green fluorescence mainly in the presence of cytosolic reactive oxygen species originated by NOX. The mean fluorescence of DHR123 in hPMNs after the application of 1nM and 0.25 nM of PVL shows a non-significant release of cytosolic ROS for any PVL concentration (Figure 2 J). On the contrary, the positive control PMA at 50 nM fosters a very abundant and time-dependent production of ROS from hPMNs (Figure 2 J).

Together, the previous two results confirm that PVL causes NETosis independently of NADPH oxidase-produced ROS.

Nevertheless, human neutrophils possess other ROS sources aside from the NADPH oxidase (40). We primarily focused on mitochondria, which produces reactive oxygen species, such as superoxide radicals (mtROS) that can be quantified with MitoSOXTM Red at 2.5 μ M, a fluorescent probe localising into this organelle. Flow cytometry experiments showed an opposite situation compared to DHR123 tests. In fact, after 40 min the mtROS level rapidly increases when hPMNs are in contact with 1nM of PVL (Figure 2 K). At 1h, hPMNs produce a significantly high amount of mtROS even in contact with only 0.25 nM of PVL (Figure 2 K). Conversely, PMA at 50nM shows a non-significant level of mtROS at each time-point we examined. (figure 2 K)

In order to further confirm the involvement of mtROS, we tested the effect of the uncoupler of the oxidative phosphorylation 2,4-Dinitrophenol (DNP), which interferes with mitochondrial ROS production (Douda et al.

2015). Several flow cytometry assays showed a significant inhibition of mtROS production in the presence of 750 μ M of DNP for the PVL (Figure 2L). Therefore, we pre-treated hPMNs with DNP and then performed immunofluorescence experiments to quantify the PVL NETosis after a pre-treatment with this mitochondrial uncoupler. Our results showed that DNP significantly decreases the PVL NET formation in hPMNs exposed to both 1 nM (Figure 2 R and R') and 0.25 nM (Figure 2 T and T'), and inhibited NETosis in about 40% of hPMNs (Figure 2 U). On the contrary, PMA does not show any NETosis inhibition due to DNP (Figure 2 P and P').

Thus, PVL provokes NET formation via an alternative pathway, involving mitochondria as a source of ROS, without activating the NADPH oxidase machinery. However, DNP fails to completely block mtROS and NE spreading, suggesting the involvement of additional ROS sources.

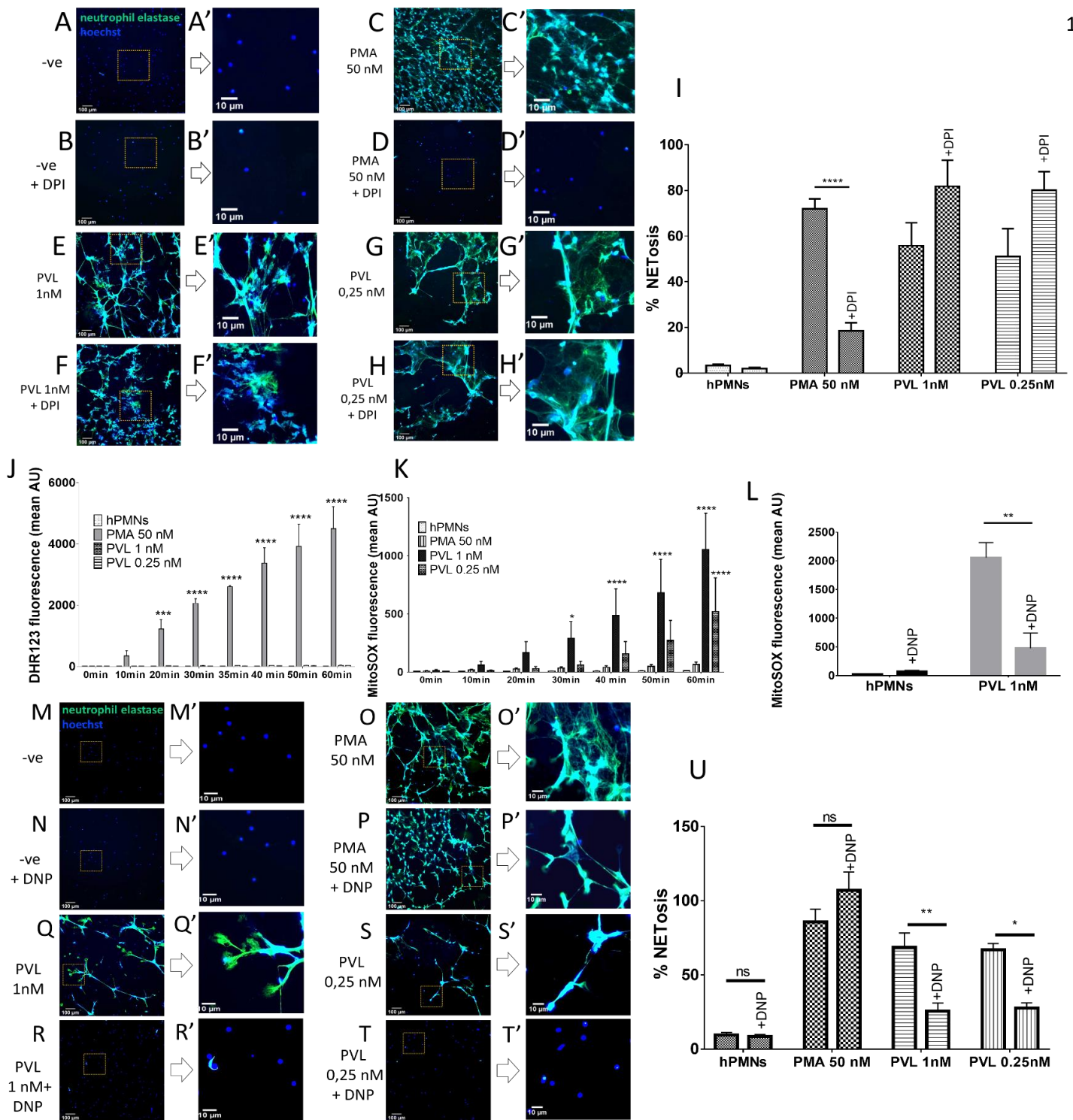


Figure 2: PVL-mediated NETosis is independent of NADPH oxidase complex but dependent on mitochondria. Immunofluorescence staining the Neutrophil Elastase (in green) and DNA and nuclei with the hoechst dye (in blue). hPMNs were left unstimulated (A and A') or exposed to 50 nM of PMA (C and C') or PVL at 1 nM (E and E'), and 0.25 nM (G and G') during 6h. A pre-treatment with of 20μM of DPI is performed during 30 min before incubation where indicated (B and B', D and D', F and F', H and H'). (I) NE-positive cells were quantified using 8 fields of view obtained from four different biological replicates. Presented is the mean with SEM. Groups were compared using repeated measures two-way ANOVA, ****p ≤ 0.0001, **p ≤ 0.01, *p < 0.05. (J) Flow cytometry analysis of cytosolic ROS production in hPMNs following DHR123 fluorescence in the presence of 50 nM of PMA, 1 nM and 0.25 nM of PVL or unstimulated after 1h. (K) Flow cytometric analysis of hPMNs loaded with a mitochondrial ROS probe, MitoSox and activated with 50 nM of PMA, 1 nM and 0.25 nM of PVL or unstimulated after 1h. (L) Flow cytometric analysis of hPMNs loaded with MitoSox, after 1h after adding 1 nM of PVL in the presence or absence of 750μM of DNP, preincubated 1h. The mean fluorescence is quantified for unstimulated hPMNs or 1nM of PVL after 1h in the absence or presence of 750μM of DNP. Presented is the mean with SEM. Groups were compared using repeated measures two-way ANOVA, **p ≤ 0.01, (n=3). (G) . Immunofluorescence staining the Neutrophil Elastase (in green) and DNA and nuclei with the hoechst dye (in blue). hPMNs were left unstimulated (M and M') or exposed to 50 nM of PMA (O and O') or PVL at 1 nM (Q and Q'), and 0.25 nM (S and S') during 6h. A pre-treatment with of 750μM of DPI is performed during 1 h before incubation where indicated (N and N', P and P', R and R', T and T'). (U) NE-positive cells were quantified using 8 fields of view obtained from four different biological replicates. Presented is the mean with SEM. Groups were compared using repeated measures two-way ANOVA, **p ≤ 0.01, *p < 0.05, ns=non significant. Images marked with prime symbols (') on the right are close-ups of the original corresponding image on the left marked with the same letter without prime symbols. Blown-up areas are highlighted with a yellow dotted square on the original image.

PVL NETosis depends on small conductance potassium channels SK and Xanthine oxidase (XO) and myeloperoxidase (MPO), as additional ROS sources.

Based on previous studies (40), we investigated the contribution of small conductance calcium-activated potassium channels (SK), as it is described as directly involved in the alternative NETosis pathway induced by calcium ionophores. We also focused on two additional alternative neutrophil ROS sources: Xanthine oxidase (XO) and Myeloperoxidase (MPO) (38). Thereby, we performed a pharmacological inhibition in order to reduce the SK channel activity by pre-treating hPMNs with 100 μ M of SK channel inhibitor NS8593. Then, we assessed NE and chromatin presence after 6 h of incubation. Our results confirm the involvement of this SK potassium channel in PVL NETosis (Figure 3 J and J', N and N'), unlike PMA NETosis (Figure 3 F and F'). In fact, for both PVL concentrations tested in the presence of this SK inhibitor, the NETosis rate decreases in about 50% of hPMNs, compared to PVL NETosis in the absence of the same inhibitor. (Figure 3 Q).

In parallel, we studied the impact of xanthine oxidase (XO) and myeloperoxidase (MPO) inhibition, pre-treating hPMNs with either Allopurinol (2 mM) or MPO inhibitor I (100 μ M), respectively, followed by immunofluorescence assays. PVL NETosis is dependent on both XO (Figure 3 K and K', O and O') and MPO (Figure 3 L and L', P and P'), as both inhibitors significantly decreased this process in 50-60% of cells in contact with PVL (Figure 3 Q), compared to the initial PVL NETosis level. Conversely, PMA showed an opposite result: this NETosis is not inhibited by any of the two additional inhibitors (Figure 3 G and G', H and H'), showing about 100% of NETosis initial rate (Figure 3Q). Collectively, these results indicate that PVL NETosis is dependent on SK channels, but also on XO and MPO activity.

Figure 3

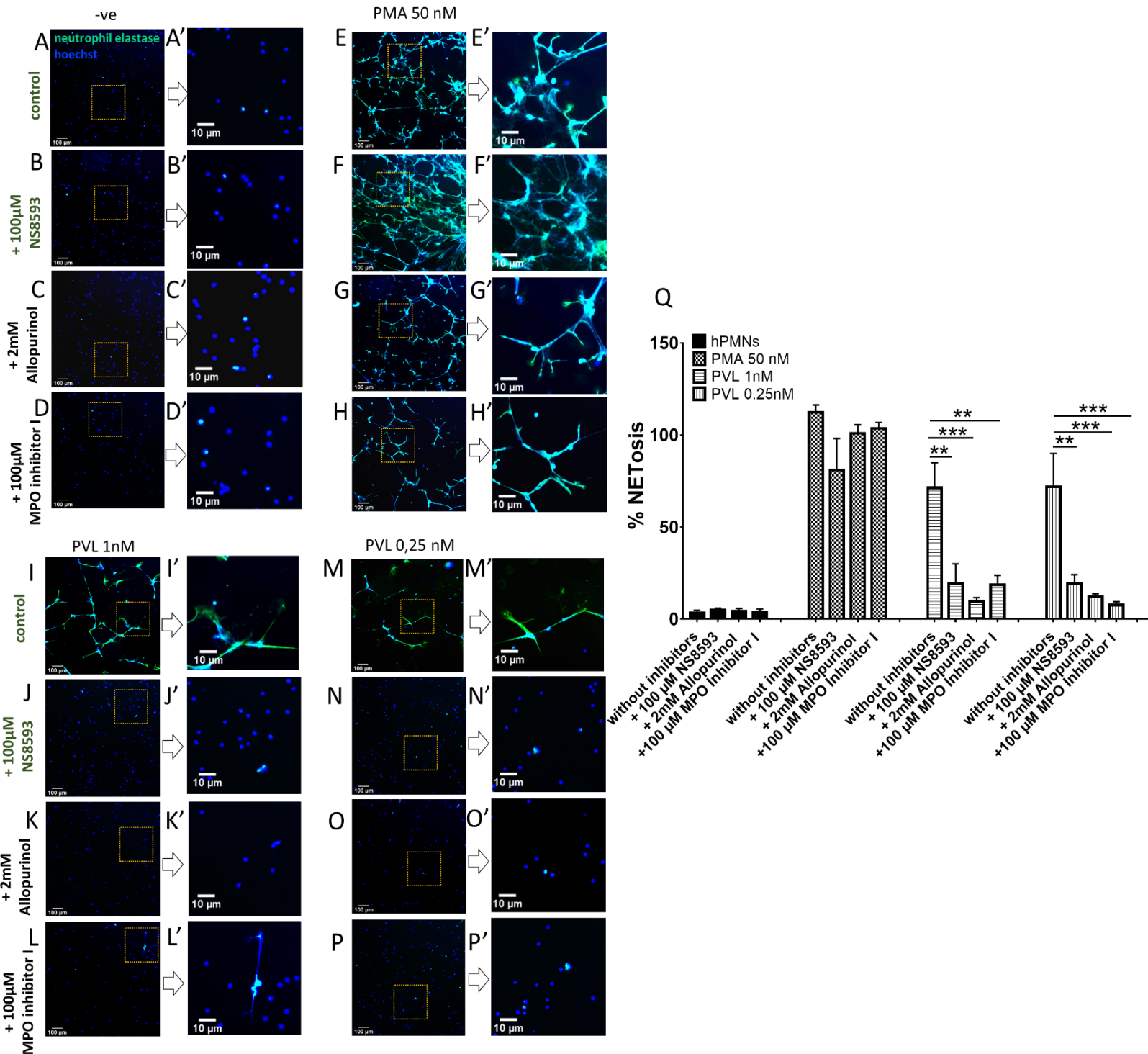


Figure 3: PVL NETosis is dependent on Xanthine oxidase (XO) and myeloperoxidase (MPO) ROS and on small conductance channel (SK). (A-P) Immunofluorescence staining hPMNs left unstimulated (A and A') or exposed to 50 nM of PMA (E and E'), PVL at 1 nM (I and I'), or 0.25 nM (M and M'), after 6h in the absence or presence of 100 μ M of the SK inhibitor NS8593 (B and B', F and F', J and J', N and N'), 2 mM of the XO inhibitor Allopurinol (C and C', G and G', K and K', O and O') or 100 μ M of Myeloperoxidase inhibitor I (D and D', H and H', L and L', P and P') applied during 30 min before the incubation. In green Neutrophil Elastase (NE) and in blue Hoechst dye to observe DNA and nuclei. (Q) NE-positive cells were quantified using 8 fields of view obtained from three different biological replicates. Presented is the mean with SEM. Groups were compared using repeated measures two-way ANOVA, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$. Images marked with prime symbols (') on the right are close-ups of the original corresponding image on the left marked with the same letter without prime symbols. Blown-up areas are highlighted with a yellow dotted square on the original image.

PVL, but not PMA presents citrullinated histone 3 on NETs, depending on PAD4 activity

A discussed aspect about the NETosis process is the presence of a particular posttranslational modification of the histone 3 (H3), named citrullination or deamination (citH3). Therefore, immunofluorescence assays allowed the assessment of citH3 in hPMNs, using an anti-citH3 primary antibody, after 6h with 50 nM of PMA or 1 nM and 0.25 nM of the PVL. Albeit PMA does not provoke any citrullination of the histone H3 (Figure 4 B and B'), 1 nM and 0.25 nM of PVL favour the citrullination of the histone H3 on NETs after a 6h-stimulation (Figure 4 C and C', D and D', respectively). This posttranslational modification concerns about 70% of hPMNs stimulated with 1 nM of PVL and 30% of hPMNs stimulated with 0.25 nM of PVL. (figure 4 E).

Then, we asked whether the mitochondrial uncoupler DNP can also inhibit the citH3. Immunofluorescence imaging and quantification show that DNP decreases the citH3 caused by PVL at 1 nM (Figure 3 J and J') and 0.25 nM (M and M'). The corresponding inhibition of citH3 concerns about 40% of tested hPMNs exposed to both PVL concentrations (Figure 4 O).

Also, as the occurrence of protein citrullination is caused by a Ca^{2+} -dependent enzyme highly expressed in peripheral blood neutrophils, the peptidylarginine deiminase 4 (PAD4), we also evaluated the citH3 level in the presence of 200 μM of Cl-amidine, a pan PADs inhibitor that inactivates the calcium-binding activity of PAD4 in an irreversible manner (52). After 6h, PVL-induced citH3 is drastically reduced in presence of Cl-amidine for PVL at both 1 nM (Figure 4 K and K') and 0.25 nM (Figure 4 N and N'), thus showing an inhibition in 77% and 39% of hPMNs, respectively, compared to citH3 level provoked by PVL in the absence of Cl-amidine (Figure 4 P). Nevertheless, in the presence of Cl-amidine, PVL NETs remain evident, as shown by the Hoechst dye (Figure 4 K and K', N and N'), and a parallel immunostaining of NE confirms that the NETosis process is not stopped by the PAD inhibitor *per se*. (Figure 4- figure supplement 1).

Globally, these results indicate a mitochondrial- and PAD4-dependent presence of citH3 only on PVL-induced NETs. However, the PAD4 inhibition does not affect the chromatin and NE liberation, while PMA is confirmed to induce NETosis albeit without histone H3 citrullination.

Figure 4

21

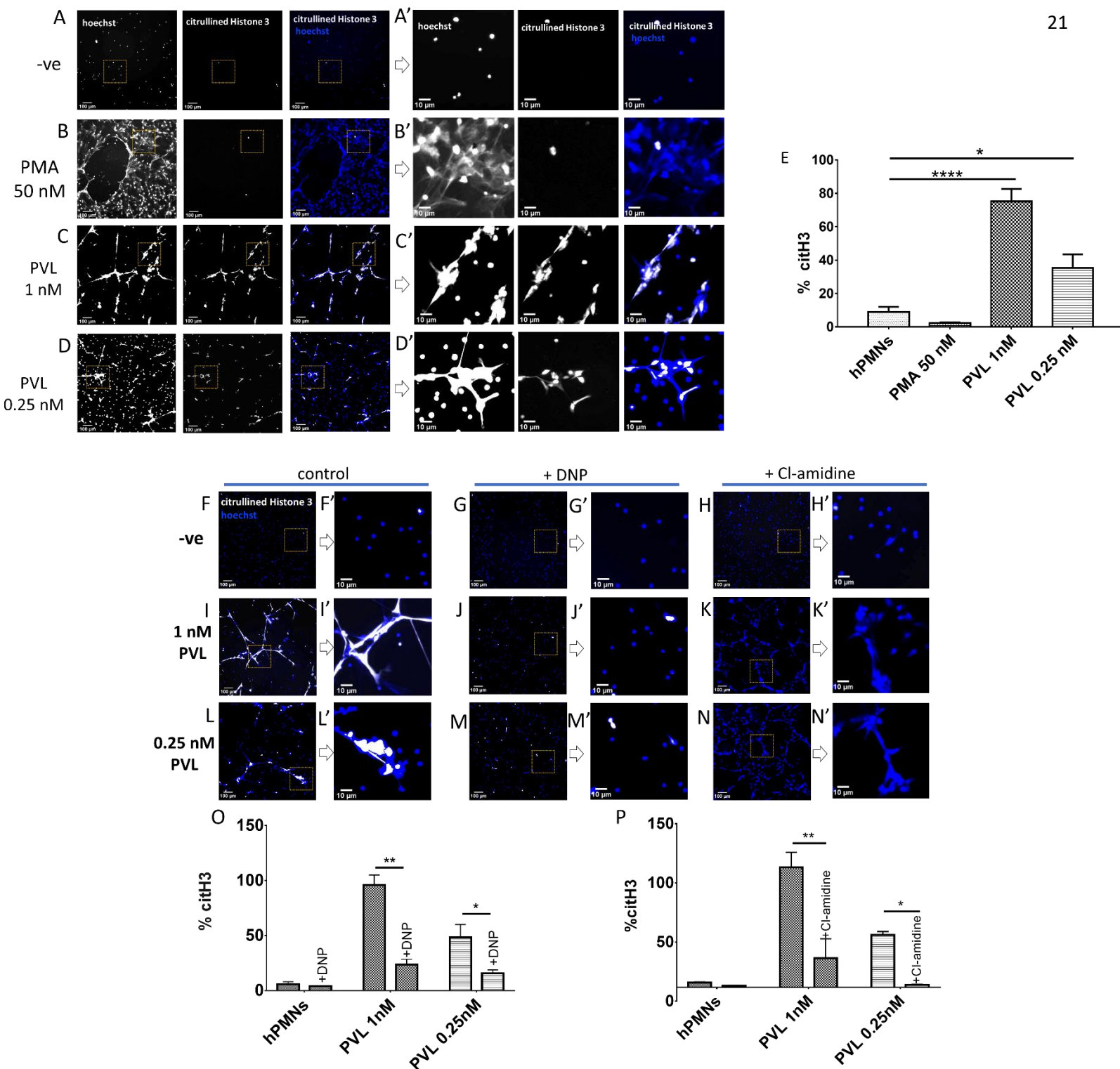


Figure 4: PVL but not PMA presents citrullinated histone 3 on NETs, depending on PAD4 activity (A-D) Immunofluorescence staining of anti-citrullinated histone H3 (yellow/white), DNA and nuclei are marked with the hoechst dye (in blue). Human neutrophils (hPMNs) unstimulated (A and A') or exposed to 50 nM of PMA (B and B'), PVL at 1 nM (C and C'), 0.25 nM (D and D') of, after 6h. (E) citH3-positive cells were quantified using 8 fields of view obtained from five different biological replicates. Presented is the mean with SEM. Groups were compared using repeated measures one-way ANOVA, **** $p \leq 0.0001$, * $p < 0.05$. (F-N) Immunofluorescence staining of anti-citrullinated histone H3 (yellow/white), DNA and nuclei are marked with the hoechst dye (in blue) in the presence or absence of DNP or Cl-Amidine. Human neutrophils (hPMNs) unstimulated (F and F') or exposed to PVL at 1 nM (I and I'), 0.25 nM (L and L') after 6h in the absence or presence of 750 μ M of DNP (G and G', J and J', M and M') or of 200 μ M of Cl-amidine (H and H', K and K', N and N'). (O) citH3-positive cells were quantified using 8 fields of view obtained from three different biological replicates with and without DNP. Presented is the mean with SEM. Groups were compared using repeated measures one-way ANOVA, ** $p \leq 0.01$, * $p < 0.05$. (P) citH3-positive cells were quantified using 8 fields of view obtained from three different biological replicates with and without Cl-amidine. Presented is the mean with SEM. Groups were compared using repeated measures one-way ANOVA, ** $p \leq 0.01$, * $p < 0.05$. Images marked with prime symbols (') on the right are close-ups of the original corresponding image on the left marked with the same letter without prime symbols. Blown-up areas are highlighted with a yellow dotted square on the original image.

PVL NETosis does not involve neither ERK1/2 and Akt phosphorylation, nor CD45 downstream kinases.

All the above-mentioned differences between PMA and PVL made us move forward and question about kinases activated during NETosis. As already highlighted by Doua et al. (53), NOX-dependent and independent NETosis do not share exactly the same signalling pathway. Therefore, we performed different immunoblots in order to assess the activation of ERK1/2 and Akt, since these two kinases are described as differently involved in PMA-induced and NOX-independent NETosis. As expected, a strong phosphorylation of ERK1/2 in human neutrophils in contact with 50 nM of PMA was observed after only 15 min of incubation (figure 5 A and B). Conversely, PVL at any tested concentration, fails to significantly activate this kinase (Figure 5 A and B). Similarly, Akt is found phosphorylated only in contact with 50 nM of PMA after 15 min (Figure 5 C and D). In fact, PVL at both 1 nM and 0.25 nM does not increase the phosphorylation of this kinase and the phospho-Akt signal results somehow even lower than hPMNs in the absence of stimulus, which might suggest an inhibition of the kinase. (Figure 5 C and D).

Moreover, as the CD45 receptor is specifically targeted by the LukF-PV subunit of PVL (19), we studied another kinase family, the Src kinases, being part of CD45 downstream pathway. A selective Src inhibitor, the PP2 was used alone or in combination with another Src inhibitor, PP1, in order to consider the effect of Src on PVL- and PMA-induced NETs by blocking different members of the Src family (54–57). Surprisingly, our immunofluorescent assays show that PMA NETosis seems partially inhibited by the pre-treatment with the combination of the Src family kinase inhibitors PP1 and PP2 (Figure 5 I and I') and by PP2 alone (Figure 5 J and J'), showing NETs in only about 30% of tested hPMNs (Figure 5 Q). Conversely, PVL NETosis is not significantly inhibited by PP1 and PP2. (Figure 5 L and L', M and M', N and N', O and O') as NETs are still present in more than 50% of tested hPMNs (Figure 5 Q).

In order to confirm the previous result, we studied the Src phosphorylation level by immunoblots at 3 different time-points using a specific antibody targeting phospho-Tyr416, the main phosphorylation site that leads to the activation of Src kinases. Our results show no significant differences in Tyr416 phosphorylation in contact with PMA or PVL at any tested time points, even though a slight disparity in Src phosphorylation can be detected in immunoblot bands at 10 min (Fig.5 R and S). Thus, PVL does not activate the Akt-ERK pathway, unlike PMA, while the intercellular signalling pathway involved downstream the CD45 stimulation operated by the LukF-PV subunit is unrelated to Src kinase family phosphorylation.

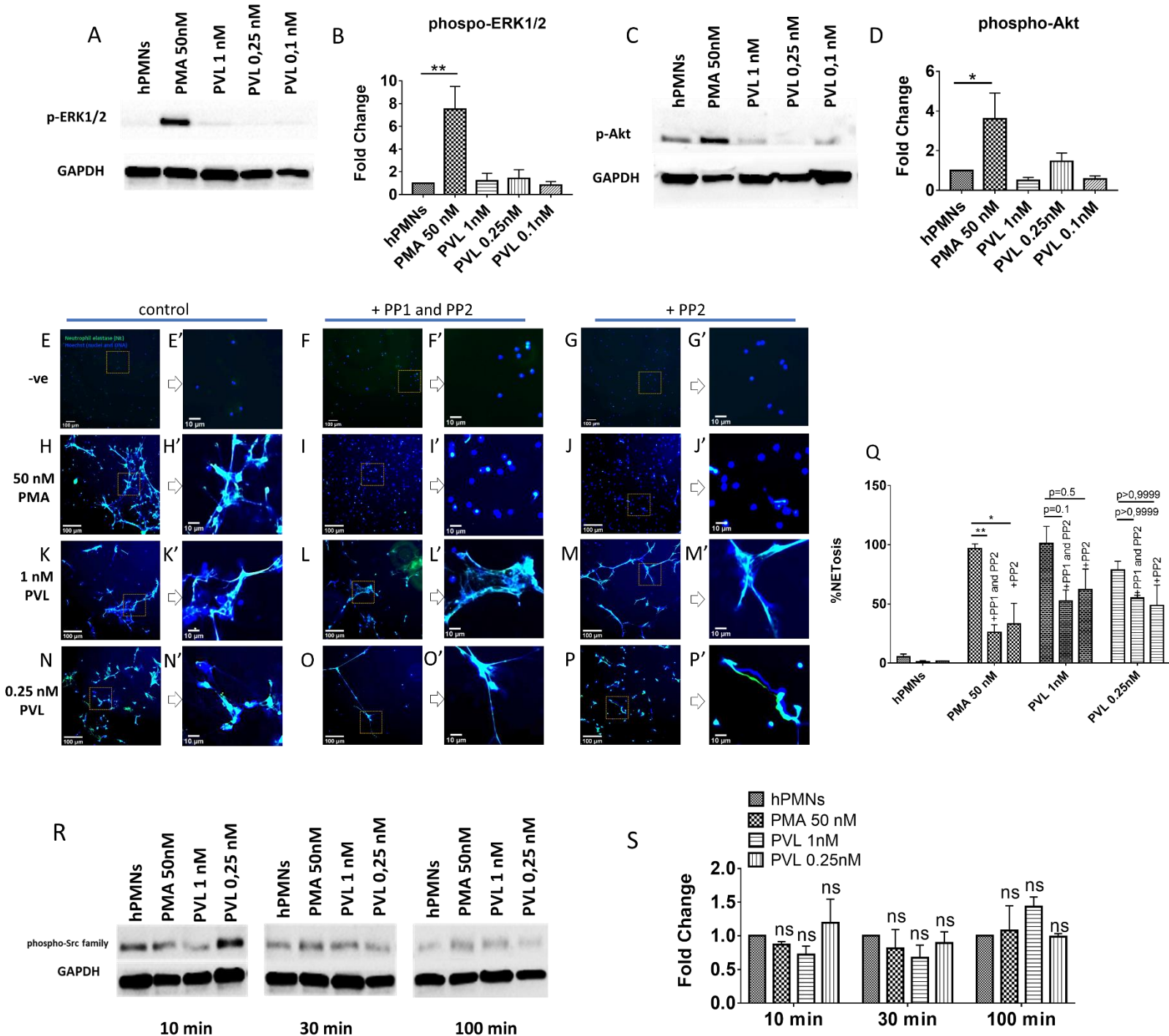


Figure 5: PVL NETosis does not involve ERK1/2 and Akt phosphorylation nor CD45 downstream pathway Src kinases. (A) Erk1/2 is not activated during PVL NETosis. Freshly isolated hPMNs are stimulated 50 nM of PMA, 1 nM, 0.25 nM and 0.1 nM of PVL or in absence of stimuli for 15 min, lysed and probed in order to detect ERK1/2 phosphorylation by immunoblotting. GAPDH in whole lysates is shown as loading control. (B) Quantification of ERK1/2 phosphorylation based on fold-change differences of optical density using Image J software. Bands are normalized with correspondent negative control (hPMNs) and GAPDH. Statistical analysis is performed with one-way ANOVA, ** $p \leq 0.01$. Analysed data of 4 separate biological replicates. (C) Akt is not activated during PVL NETosis. Freshly isolated hPMNs are stimulated 50 nM of PMA, 1 nM, 0.25 nM and 0.1 nM of PVL or in absence of stimuli for 15 min, lysed and probed in order to detect Akt phosphorylation by immunoblotting. GAPDH in whole lysates is shown as loading control. (D) Quantification of Akt phosphorylation based on fold-change differences of optical density using Image J software. Bands are normalized with correspondent negative control (hPMNs) and GAPDH. Statistical analysis is performed with one-way ANOVA, * $p < 0.05$. Analysed data of 3 separate biological replicates. (E-P) Immunofluorescence staining neutrophil Elastase (in green) and DNA and nuclei (in blue) in the presence or absence of PP1 and PP2. Human neutrophils (hPMNs) were left unstimulated (E and E') or exposed to PMA at 50 nM (H and H') PVL at 1 nM (K and K') and 0.25 nM (N and N'), after 6h in the absence or presence of the combination of Src inhibitors PP1 at 5 μ M and PP2 at 10 μ M (F and F', I and I', L and L', O and O') or only pre-treated 30min with 10 μ M of PP2 (G and G', J and J', M and M', P and P'). (Q) NE-positive cells were quantified using 8 fields of view obtained from three different biological replicates with and without Src inhibitors. Presented is the mean with SEM. Groups were compared using repeated measures one-way ANOVA, ** $p \leq 0.01$, * $p < 0.05$. The partial, yet statistically non-significant inhibition of PVL NETosis caused by Src inhibitors is highlighted by the p -value on the figure. (R) Src kinases family phosphorylation of the residue Tyr416 in hPMNs in the presence of 50 nM of PMA, 1 nM or 0.25 nM of PVL or in absence of stimuli at 10, 30 and 100 min, detected by immunoblotting. GAPDH in whole lysates is shown as loading control. (S) Quantification of Src kinases family phosphorylation based on fold-change differences of optical density using Image J software. Bands are normalized with correspondent negative control (hPMNs) and GAPDH. Statistical analysis is performed with one-way ANOVA, ns = non-significant. Analysed data of 3 separate biological replicates. Images marked with prime control (') on the right are close-ups of the original corresponding image on the left marked with the same letter without prime symbols. Blown-up areas are highlighted with a yellow dotted square on the original image.

An increased autophagy is present during both PMA and PVL NETosis

Based on the work of Remijssen et al. (51) claiming the involvement of autophagy at early times during NETosis, we investigated the ratio between the light chain of microtubule-associated protein 1A and 1B (LC3A and LC3B). In fact, during autophagosome formation, the lipidation of LC3A leads to LC3B production, which localizes in the double membrane of autophagosomes. Thus, the LC3B/LC3A ratio constitutes an appropriate marker of the autophagic process. We proceeded with different immunoblot assays in order to assess and to quantify the LC3B/LC3A ratio which increases during autophagy. hPMNs were thus exposed to PMA at 50 nM, PVL at 1 nM and 0.25 nM or left unstimulated during 10 min, 15 min, 30 min and 100 min. Our results indicate that 1nM of PVL and 50 nM of PMA provoke a significant increase of LC3B/LC3A ratio after 30 min (Figure 6 C and D), which represents about 3 folds of the ratio of unstimulated cells (Figure 6E). However, 0.25 nM of PVL failed to significantly increase the LC3B/LC3A ratio, not reaching a statistically appreciable amount of autophagy, but still showing almost twice of the LC3B/LC3A ratio found for unstimulated cells (figure 6 C, D and E). Thus, autophagy is involved in both PMA and PVL NETosis.

Figure 6

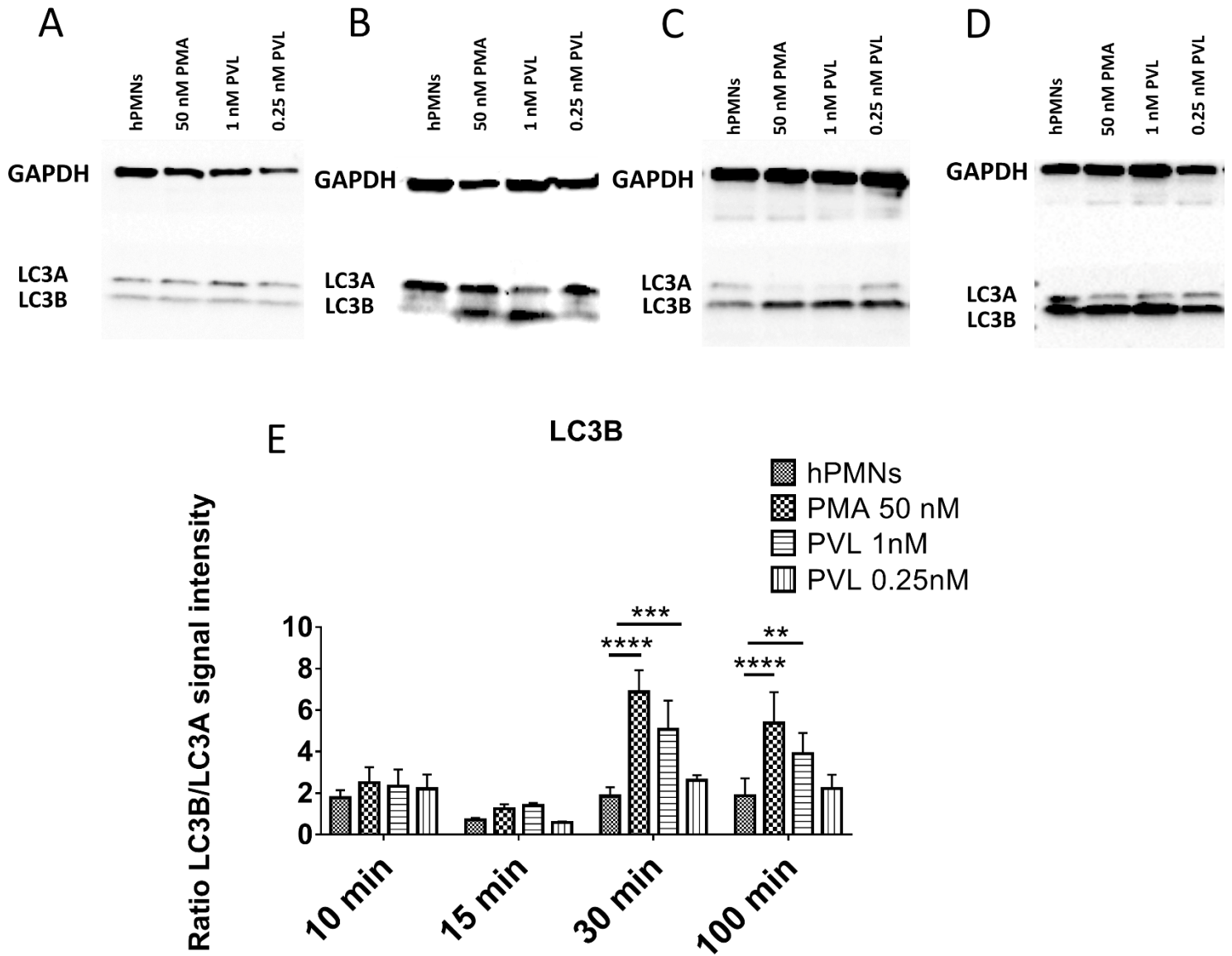


Figure 6: An increased autophagy is present during both PMA and PVL NETosis (A) LC3A and LC3B in hPMNs in the presence of 50 nM of PMA, 1 nM and 0.25 nM of PVL or in absence of stimuli at 10 min, 15 min, 30 min and 100 min, detected by immunoblotting. GAPDH in whole lysates is shown as loading control. (B) Quantification of LC3B/LC3A ratio based on optical density using Image J software. Bands are normalized with correspondent negative control (hPMNs). Statistical analysis is performed with one-way ANOVA, ****p ≤ 0.0001, ***p ≤ 0.001 **p ≤ 0.01. Representative images of 3 or more biological replicates.

Part of PVL colocalizes with mitochondria after 30 min of incubation

Genestier et al. and Zimmermann-Meisse et al. found that part of PVL internalized into hPMNs subsequently colocalizes with neutrophil subcellular compartments (22, 23). Since mitochondria appear to be “the key-organelle” involved in the PVL-induced NETosis, we wondered whether PVL tends to physically interact with this organelle. To answer this additional question, we performed separate confocal microscopy experiments using two specific antibodies in order to estimate the colocalization of the S subunit of PVL and the cytochrome C (CytC), a hemoprotein involved in the electron transport at the intermembrane space of the mitochondrion. As a control we used hPMNs exposed to the LukS-PV subunit without the corresponding LukF-PV subunit, because the absence of F subunit prevents the entry of PVL into target cells and, then, the activity of the leukotoxin (14, 16, 22). Indeed, we observed that the fluorescence of labelled LukS-PV subunits applied alone is mostly found outside of the plasma membrane of hPMNs (Fig. 7 A-C). In contrast, after 30 min of incubation with 1 nM of PVL, the Pearson Correlation Coefficient (PCC) of segmented images was significantly increased compared to the PCC of control hPMNs exposed only to the LukS-PV subunit, showing a p value < 0.0001 (Fig. 7 G). This result has been confirmed by the analysis of the area of the S subunit fluorescence overlapping with the cytochrome C fluorescence area: after 30 min of PVL incubation with cells, this overlap is found significantly increased compared to hPMNs exposed to S subunit alone with a p value < 0.0001 (Fig. 7 H). This suggests a possible physical interaction between PVL and mitochondria, that, in fact, is found to be producing a significant amount of mtROS after 20-30 min from the PVL addition (Fig 2 K), reinforcing the idea that this time point is important for the kinetic and outcomes of PVL in hPMNs.

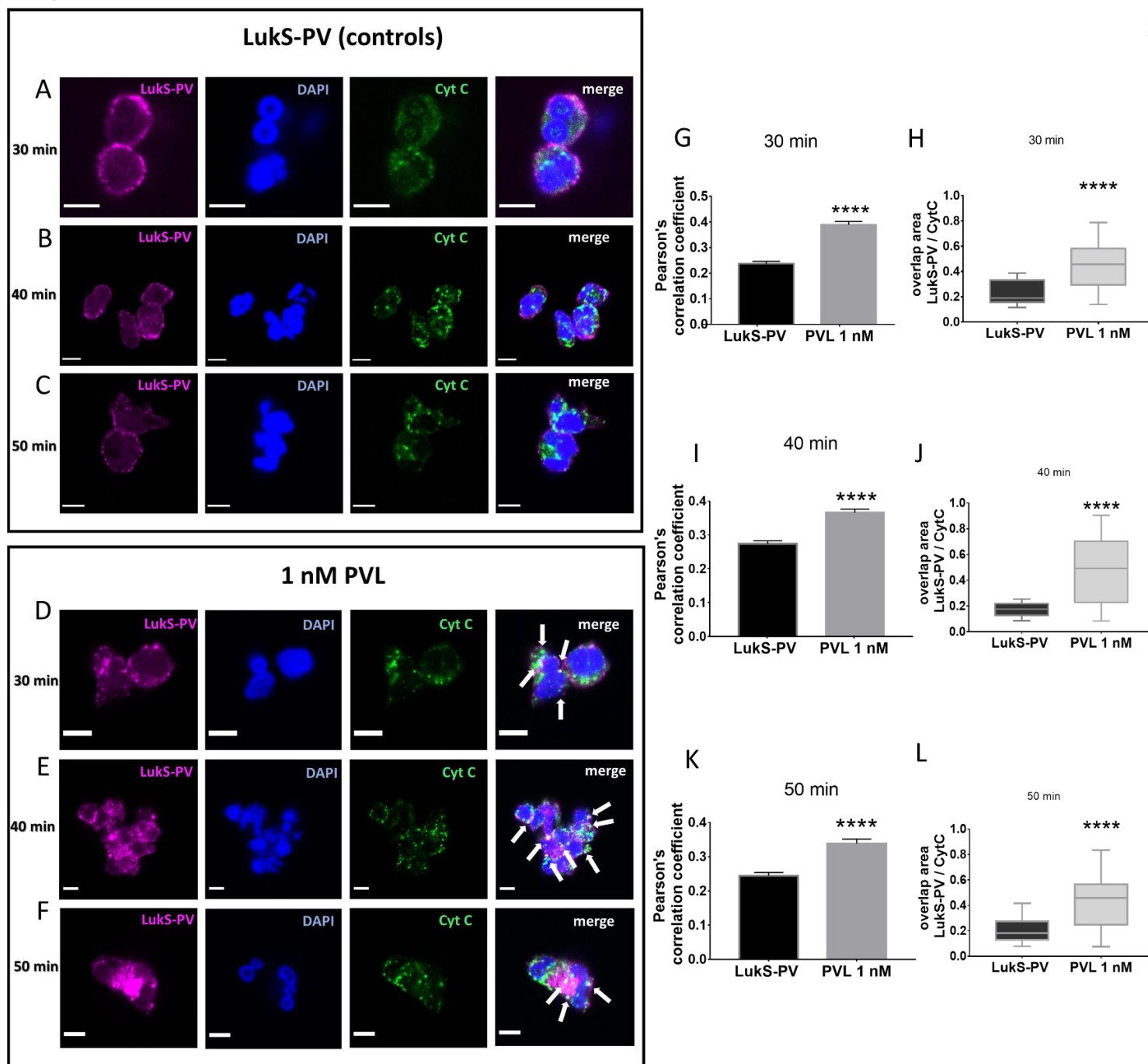


Figure 7: Part of PVL colocalizes with mitochondria after 30 min of incubation. Freshly isolated hPMNs are exposed from 5 min to 50 min to either LukS-PV subunit only at 1 nM, used as negative control (A-C), or to 1 nM of PVL (D-F), presenting both subunits, S and F. The figure shows representative confocal images of LukS-PV controls at 30 min (A), 40 min (B) and 50 min (C) after stimulation (upper box), while 1 nM of PVL was applied for 30 min (D), 40 min (E) or 50 min (F) in underneath images (lower box). hPMNs were maintained at 37°C with 5% CO₂ for 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 30 min, 40 min and 50 min. This last time-point was chosen as the cells began to be lysed after 1 h of exposition to the PVL at 1 nM. After each time-point cells were fixed with 4% PFA and permeabilized with 0.05% Triton X-100. Then, two antibodies were applied, anti-CytC antibody and anti-LukS-PV antibody, in order to immunolabel mitochondria and the LukS-PV, respectively. DAPI was used to stain nuclei and DNA. The merged images show the colocalization point between PVL and mitochondria, which are also highlighted with white arrows. (G, I and K) Pearson's correlation coefficient (PCC) were quantified using Fiji by Image J plug in Squash by analysing about 10 fields of view obtained from three different biological replicates at 30 min (G), 40 min (I) and 50 min (F), which represent time-points significantly different in terms of PCC between PVL and LUKS-PV. Presented is the mean of pooled data with SEM. Groups were compared using Student's T-test, **** p ≤ 0.0001. (H, J and L) Overlapping area of LukS-PV and CytC fluorescence was quantified using Image J analysis of the same 10 fields of view as for PCC assessment. Shown are the means of pooled data with SEM after 30 min (H), 40 min (J) and 50 min (L), which represent time-points significantly different in terms of overlapping area between PVL and LukS-PV alone. Scale bars, 5 μm.

Discussion

Pathogenic bacteria and human immune response evolve as parallel and dynamic processes. This is particularly clear in regards to an extremely widespread bacterium such as *Staphylococcus aureus*. Thus, it is not surprising that staphylococcal infections are still a major health challenge in many countries, given the ability of this bacterium to adapt to hosts and to overpass innate immunity through a large panel of virulence factors and toxins, such as PVL. Indeed, *Staphylococcus aureus* demonstrates an unexpectedly complex strategy to bypass the first lines of the human defense, possibly taking advantage, amongst others, of NETting neutrophils. The importance of a deeper understanding of PVL mode of action is needed, owing to the poor prognosis of *S. aureus* PVL⁺-infected patients and the necessity to find new therapeutic targets.

Here, we analyze more exhaustively the mechanism of PVL NETosis *in vitro* provoked by nanomolar and lower concentrations of the toxin. We can assert that in the presence of a physiological concentration of extracellular Ca²⁺, this leukotoxin provokes a peculiar form of human neutrophil cell death, the NETosis. In contrast, the HlgCB produced by SA, the other bicomponent leukotoxin whose S subunit shares the same target receptor, but not the same binding site as LukS-PV (58), fails to provoke a significant NETosis (Fig. 1), confirming a different main cellular outcome, as already suggested by previous studies (21, 22). This result is in contrast with what has been previously published (27, 28), as the PVL alone, presenting both S and F subunits, is sufficient to mediate an abundant lytic NETosis characterized by the presence of specific markers such as NE and MPO. However, the kinetic of this process seem to be slower than the PMA-induced one (Fig. 1 Supplement 1). NETosis induced in hPMNs from young donors was more constantly obtained. Intriguingly, pneumonia due to PVL-producing *S. aureus* strains is of worse prognosis in younger subjects (59, 60). Also, as the simultaneous expression of PVL and other leukotoxins, such as gamma HlgCB, arises (~5% of clinical strains), this combination of factors or any other combinations between the PVL and another leukotoxin produced by *S. aureus*, may have an impact on PVL NETosis, considering the irrespective cell targets and affinities.

Moreover, while the PMA-induced NETosis is NOX-dependent as expected, PVL NETs are produced in a NADPH-independent manner, and, on the contrary, the process seems to be in some extent increased by NADPH oxidase inhibition (Fig. 2). This unexpected enhanced level of NETosis might be linked to the different action of Protein kinase C (PKC) isoforms α and ζ , which are inversely activated in the two forms of neutrophil extracellular trap processes (61), thus, confirming the fundamentally different NETosis processes initiated by PMA and PVL.

An additional confirmation of this aspect has been found in the differential ROS source mobilisation, as PMA generates a massive time-dependent oxidative burst linked to NADPH-oxidase, while PVL causes a great generation of mtROS, essential for the PVL NETosis (Fig. 2 A-K). This result agrees with the data describing this alternative phenomenon (40). Nevertheless, despite the action of the mitochondrial uncoupler prodrug DNP that significantly decreases PVL NETs, the DNP fails to completely abolish the process, as other ROS sources, such as Xanthine oxidase (XO) and myeloperoxidase (MPO) are involved. Moreover, DNP has somewhat an inducing effect on PMA NETosis. In fact, our results show that two additional ROS sources have a major role in PVL NETosis: the XO and MPO (Fig 2 L-U), two enzymes that can either enhance mtROS generation or produce other reactive oxygen species described as crucial during NETosis process, respectively (39, 62–64). XO has been recently described as an ubiquitous enzyme in mammalian cells, whose origin is not completely established (65, 66), while its function is termed to be necessary in human myeloid cells in order to activate the inflammasome machinery (67). Moreover, one effect of the XO inhibitor we used, allopurinol, is assumed to be protective for the mitochondrial membrane integrity and function (68, 69). In fact, mitochondrial membranes also depolarize in the presence of the PVL (22). These evidences confirm once more the involvement of mitochondria, either directly or through the action of XO.

The involvement of a family of small conductance calcium-activated potassium channels (SK) was confirmed also for the PVL NETosis, validating what Douda et al. previously described about the NOX-independent NETosis induced with another type of stimulus, the calcymycin, or A23187 (53). Indeed, SK activation during PVL NETosis is likely due to the increase of intracellular calcium level, contrary to PMA NETosis. In fact, SK activation had been formerly described as unrelated to PMA NETosis (53), but surprisingly even XO and MPO appear to be non-essential for the NETosis provoked by PMA (Fig. 3). Albeit the result obtained about MPO involvement seemed to disagree with other authors who demonstrated the importance of MPO for PMA NETosis, (25, 34, 63, 70), the data obtained by Parker et al. showed that a residual activity of about 3% of normal MPO was sufficient to allow PMA-induced NETosis in the presence of only one pharmacological inhibitor (64). In fact, these same authors used a combination of two different inhibitors of MPO to completely elicit MPO activity (64). Moreover, Kenny and collaborators stated that PMA NETosis was significantly decreased in the presence of 300 μ M of the same MPO inhibitor we used in our experiments, which is 3 times the concentration we applied as a pre-treatment for hPMNs (25).

Concerning the intracellular signalling pathway, we showed that the PVL-induced NETosis differs on kinase contribution, compared to the NOX-dependent process (Fig. 5), which is coherent with what is found during ionophores-induced NETosis, previously described as a NOX-independent process (32, 53, 71, 72).

Unexpectedly, the downstream pathway activated by the CD45, the main and specific receptor for the F subunit

of PVL (19), does not seem neither necessary nor involved in the PVL process in hPMNs, suggesting another, still unknown, intracellular activation and questioning about CD45 contribution during the infection.

Concerning the presence of deiminated histone H3 on NETs, different reports outlined contradictory data, presumably because the distinction between at least two alternative forms of NETosis was not yet completely established (40, 61, 73). In fact, during NETs spreading, all cytoplasmic and nuclear content is understood as exocytosed in the form of a chromatin network decorated with antimicrobial proteins and peptides. Hence, histones are an integral part of NETs. Therefore, it is not surprising to find H3-positive cells when NETosis is established, even when the antimicrobial activity that has been attributed to histones (74–77). Nevertheless, this antimicrobial activity could be diminished or inhibited by the citrullination. Therefore, the detection of citH3 only on PVL-induced NETs, but not on PMA-induced NETs (Fig. 4), agrees with previous data reporting that “classical” antimicrobial NOX-dependent NETosis involves PKC α phosphorylation, which in turn, has been related to the inhibition of the peptidyl adenosine deiminase 4 (PAD4), thus preventing citrullination (61). In addition, the PVL-induced citrullination of the histone H3 is directly caused by PAD4, a calcium-dependent enzyme found in neutrophils and belonging to a group of five isoenzymes, each bearing a tissue and cell-specific expression. This aspect could likely relate to the rapid increase of intracellular calcium provoked by this leukotoxin in hPMNs. Nevertheless, the inhibition of PADs does not elicit PVL NETosis (Fig. 4), suggesting that H3 citrullination represents an event taking place after or independently of NETs extrusion. This result is in contrast with the hypothesized role of PADs as inducers of heterochromatin decondensation and chromatin unfolding through loss of positive charge of histones during NETosis and highlighting, therefore, a unusual difference between PVL NETosis and other NETosis stimuli (78).

The presence of citrullinated protein during NETosis has been acutely analysed by Koenig et al. in 2016 (41), pointing out that, in general, NETosis can be confused with other forms of DNA extrusion, which have morphologically similar consequences in hPMNs, despite being *de facto* biologically different processes. Moreover, Koenig et al. (41) described that the citrullination of a great variety of proteins, named hypercitrullination, can be provoked with 30nM and 100nM of PVL in a culture medium containing 1.5mM CaCl₂. This particular outcome could ensure a decrease in the antimicrobial activity of the chromatin network, disabling the arginine residues, which are critical for antimicrobial action of proteins like histones, elastase or myeloperoxidase (77, 79–81). Actually, *S. aureus* probably gains an advantage from this particular form of NETosis, because it produces a potent DNase, a catalase and a superoxide dismutase, thus allowing the digestion of NETs while creating a local aerobic condition after getting rid of the ROS produced during NETosis. In addition, high oxygen concentrations positively regulate PVL expression (42). Thus, SA-

expressing PVL could easily overpass neutrophil immunity, as well as providing essential nutriment for the bacterium, represented by neutrophil debris.

Furthermore, despite the association of antimicrobial proteins and peptides to extracellular NET fibers limits bacteria systemic spread (82), the SA DNase could induce the dissociation of these inflammatory enzymes which would be then released in the organism. This aspect could be of particular interest in the light of the role of citrullinated proteins in systemic autoimmunity (81, 83–90). In fact, citrullination affects conformation and function of targeted proteins and its presence has been often associated to degenerative diseases and immunity disruption, as in the case of Rheumatoid arthritis (RA), where antibodies against the citrullinated histone H3 represent one marker of this disease (91), but also of lupus disease (92).

Concerning autophagy, this process has been associated to NETosis (51) and found to be increased after 30min during PVL NETosis. This observation might be linked to the release of mitochondrial ROS, which could start a parallel autophagic process at early times after activation. In fact, superoxide radical is the main form of ROS known to stimulate autophagy (93), while mitochondria, probably damaged by PVL, could induce an autophagic process called mitophagy in response to their depolarization, in the attempt to get rid of defective organelles. Conversely, recent studies have indicated that mitophagy is defective in human neutrophils, which rather favours the expulsion of mitochondrial content and DNA in the extracellular space. Interestingly, extracellular mitochondrial DNA presenting oxidized residues has a precise link to some auto-immune diseases, as in the case of lupus in humans (94), reinforcing the potential connection between PVL cellular outcomes and autoimmunity.

Finally, the mitochondrial stress provoked by the PVL (Fig. 2 K, L) indicates a partial colocalization between the PVL and mitochondria in hPMNs (Fig. 7). Thus, this result completes the mechanism of intracellular trafficking described by Zimmermann-Meisse et al. Besides, our images show that the nuclei of hPMNs exposed to 1 nM of PVL rapidly decondense, occupying almost the whole cellular space and pushing all cytoplasmic elements towards the plasma membrane. This last cellular consequence must be taken into account as the assumed location of PVL might be due rather to the decrease in available cytoplasm, than to a direct effect of PVL targeting mitochondria. Nevertheless, the toxin does not remain located neither in the cytoplasm nor inside the nucleus (23, 95), while likely it interacts with intracellular membranes. The specific physical interaction between the PVL and the nuclear membrane, and/or mitochondrial membrane, remains to be assessed using the electron microscopy resolution.

In conclusion, while having revealed that no pore at the plasma membrane is formed in physiological experimental conditions, the action of the Pantan-Valentine Leukocidin may contribute to the impairment of

human infections. In fact, we can reasonably assume that in presence of extracellular Ca^{2+} a more complicated process is operated by PVL, such as a NOX-independent NETosis, starting with each subunit of the toxin binding to its specific membrane receptor. This leads to the endocytosis of the PVL into hPMNs, causing an early increase in intracellular Ca^{2+} and a strong mitochondrial oxidative response, likely performed by a potential interaction between the PVL and the mitochondrial membrane. Parallely, the mitochondrial involvement is sustained by the action of the xanthine oxidase, while the intracellular Ca^{2+} provokes the activation of the channel SK3 and PADs. The consequence of the latter is the cause of protein deimination. Therefore, during infection, this mechanism may participate to the evasion and dissemination of SA, somehow disrupting and producing an upheaval in human innate immune system. This disruption might have even long-term consequences.

Very little is known about HlgCB outcomes, which is however present in 99% of *S. aureus* strains, as it does provoke neither apoptosis nor NETosis or membrane permeabilization in human neutrophils *per se*. Further studies will aim to complete this complex signalling process in order to evaluate the efficacy of NETosis blockers in infectious models.

Acknowledgements

The authors are particularly grateful to Daniel Keller for constant support, recollection of unpublished results in frequent scientific discussions, and for the skilful preparation of leukotoxins. Viola Mazzoleni was awarded with a doctoral grant from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche to perform her doctoral studies. The experimental work was supported by grants from Direction de la Recherche (University of Strasbourg), by funds provided by industrial activity (CONNECTUS) of EA-7290 and the LabEx (Laboratory of Excellence) MitoCross (National Program PIA). The authors thank the Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP) of Strasbourg for confocal imaging facilities, and the Etablissement Français du Sang (EFS) of Strasbourg for providing human buffy coats.

Authors contributions

V.Mazzoleni, and G.Prévost conceived and designed the experiments G.Zimmermann-Meisse participated to epifluorescence assays. A.Smirnova and I.Tarassov participated in the conception, implementation and funding of confocal microscopy assays. V.Mazzoleni performed the experiments and prepared the figures. V.Mazzoleni and A.Smirnova analysed the data. G.Zimmermann-Meisse conceived the sequence of modules for NETosis

quantification performed with CellProfiler. V.Mazzoleni wrote the manuscript. V.Mazzoleni, A.Smirnova, I.Tarassov and G.Prévost revised the manuscript.

Competing interests

The funding agencies had no role in any of the study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript. None of the results obtained are part of a patent or commercial product. G.P., DK are permanent faculty members of the University of Strasbourg, IT is a permanent researcher in the CNRS and affiliated to the University of Strasbourg, AS is supported by the LabEx MitoCross. None of the authors has a conflict of interest to declare.

References

1. VandenBergh, M. F. Q., Yzerman, E. P. F., Van Belkum, A., Boelens, H. A. M., Sijmons, M., and Verbrugh, H. A. (1999) Follow-up of *Staphylococcus aureus* nasal carriage after 8 years: Redefining the persistent carrier state. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 3133–3140
2. Lowy, F. D. (1998) Medical progress: *Staphylococcus aureus* infections. *New England Journal of Medicine* **339**, 520–532
3. Chessa, D., Ganau, G., and Mazzarello, V. (2015) An overview of *staphylococcus epidermidis* and *staphylococcus aureus* with a focus on developing countries. *Journal of Infection in Developing Countries* **9**, 547–550
4. Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., and Fowler, V. G. (2015) *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews* **28**, 603–661
5. Foster, T. J. (2004) The *Staphylococcus aureus* “superbug.” *Journal of Clinical Investigation* **114**, 1693–1696
6. Boyle-Vavra, S. and Daum, R. S. (2007) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: The role of Pantone-Valentine leukocidin. *Laboratory Investigation* **87**, 3–9
7. Shallcross, L. J., Fragaszy, E., Johnson, A. M., and Hayward, A. C. (2013) The role of the Pantone-Valentine leukocidin toxin in staphylococcal disease: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases* **13**, 43–54

8. Prevost, G., Cribier, B., Couppie, P., Petiau, P., Supersac, G., Finck-Barbancon, V., Monteil, H., and Piemont, Y. (1995) Pantón-valentine leucocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infection and Immunity* **63**, 4121–4129
9. Supersac, G., Prevost, G., and Piemont, 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. *Infection and Immunity* **61**, 580–587
10. Aires-de-Sousa, M., Conceição, T., and De Lencastre, H. (2006) Unusually high prevalence of nosocomial pantón-valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* isolates in cape verde islands. *Journal of Clinical Microbiology* **44**, 3790–3793
11. Breurec, S., Fall, C., Pouillot, R., Boisier, P., Brisse, S., Diene-Sarr, F., Djibo, S., Etienne, J., Fonkoua, M. C., Perrier-Gros-Claude, J. D., Ramarokoto, C. E., Randrianirina, F., Thiberge, J. M., Zriouil, S. B., Garin, B., and Laurent, F. (2011) Epidemiology of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* lineages in five major African towns: High prevalence of Pantón-Valentine leukocidin genes. *Clinical Microbiology and Infection* **17**, 633–639
12. Otto, M. (2014) *Staphylococcus aureus* toxins. *Current Opinion in Microbiology* **17**, 32–37
13. Bronner, S., Stoessel, P., Gravet, A., Monteil, H., and Prevost, G. (2000) Variable expressions of *Staphylococcus aureus* bicomponent leucotoxins semiquantified by competitive reverse transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 3931–3938
14. Spaan, A. N., Henry, T., Van Rooijen, W. J. M., Perret, M., Badiou, C., Aerts, P. C., Kemmink, J., De Haas, C. J. C., Van Kessel, K. P. M., Vandenesch, F., Lina, G., and Van Strijp, J. A. G. (2013) The staphylococcal toxin pantón-valentine leukocidin targets human C5a receptors. *Cell Host and Microbe* **13**, 584–594
15. Meyer, F., Girardot, R., Piémont, Y., Prévost, G., and Colin, D. A. (2009) Analysis of the specificity of pantón-valentine leucocidin and gamma-hemolysin F component binding. *Infection and Immunity* **77**, 266–273
16. Tawk, M. Y., Zimmermann-Meisse, G., Bossu, J. L., Potrich, C., Bourcier, T., Dalla Serra, M., Poulain, B., Prévost, G., and Jover, E. (2015) Internalization of staphylococcal leukotoxins that bind and divert the C5a receptor is required for intracellular Ca²⁺ mobilization by human neutrophils. *Cellular Microbiology*

- 731 **17**, 1241–1257
- 732 17. Jover, E., Tawk, M. Y., Laventie, B. J., Poulain, B., and Prévost, G. (2013) Staphylococcal leukotoxins
 733 trigger free intracellular Ca²⁺ rise in neurones, signalling through acidic stores and activation of store-
 734 operated channels. *Cellular Microbiology* **15**, 742–758
- 735 18. Liu, X., Heitz, P., Roux, M., Keller, D., Bourcier, T., Sauer, A., Prévost, G., and Gaucher, D. (2018)
 736 Panton-Valentine Leukocidin Colocalizes with Retinal Ganglion and Amacrine Cells and Activates Glial
 737 Reactions and Microglial Apoptosis. *Scientific Reports* **8**, 2953
- 738 19. Tromp, A. T., Van Gent, M., Abrial, P., Martin, A., Jansen, J. P., De Haas, C. J. C., Van Kessel, K. P.
 739 M., Bardoel, B. W., Kruse, E., Bourdonnay, E., Boettcher, M., McManus, M. T., Day, C. J., Jennings, M.
 740 P., Lina, G., Vandenesch, F., Van Strijp, J. A. G., Jan Lebbink, R., Haas, P. J. A., Henry, T., and Spaan,
 741 A. N. (2018) Human CD45 is an f-component-specific receptor for the staphylococcal toxin Pantón-
 742 Valentine leukocidin. *Nature Microbiology* **3**, 708–717
- 743 20. Menestrina, G., Dalla Serra, M., Comai, M., Coraiola, M., Viero, G., Werner, S., Colin, D. A., Monteil,
 744 H., and Prévost, G. (2003) Ion channels and bacterial infection: The case of β -barrel pore-forming protein
 745 toxins of *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett*, **552**, 54-60
- 746 21. Tawk, M. Y., Zimmermann-Meisse, G., Bossu, J.-L., Potrich, C., Bourcier, T., Dalla Serra, M., Poulain,
 747 B., Prévost, G., and Jover, E. (2015) Internalization of staphylococcal leukotoxins that bind and divert the
 748 C5a receptor is required for intracellular Ca²⁺ mobilization by human neutrophils. *Cellular*
 749 *Microbiology* **17**, 1241–1257
- 750 22. Zimmermann-Meisse, G., Prévost, G., and Jover, E. (2017) Above and beyond c5a receptor targeting by
 751 staphylococcal leucotoxins: Retrograde transport of panton–valentine leucocidin and γ -Hemolysin.
 752 *Toxins* **9**, 41
- 753 23. Genestier, A. L., Michallet, M. C., Prévost, G., Bellot, G., Chalabreysse, L., Peyrol, S., Thivolet, F.,
 754 Etienne, J., Lina, G., Vallette, F. M., Vandenesch, F., and Genestier, L. (2005) *Staphylococcus aureus*
 755 Pantón-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of
 756 human neutrophils. *Journal of Clinical Investigation* **115**, 3117–3127
- 757 24. Zimmermann-Meisse, G. (2016) Internalisation des leucotoxines de *S. aureus* dans les cellules cibles et
 758 conséquences cellulaires associées. University of Strasbourg, France
- 759 25. Kenny, E. F., Herzig, A., Krüger, R., Muth, A., Mondal, S., Thompson, P. R., Brinkmann, V., von

- Bernuth, H., and Zychlinsky, A. (2017) Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *eLife* **6**, e24437
26. Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y., and Zychlinsky, A. (2004) Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* **303**, 1532–1535
27. Pilsczek, F. H., Salina, D., Poon, K. K. H., Fahey, C., Yipp, B. G., Sibley, C. D., Robbins, S. M., Green, F. H. Y., Surette, M. G., Sugai, M., Bowden, M. G., Hussain, M., Zhang, K., and Kubes, P. (2010) A Novel Mechanism of Rapid Nuclear Neutrophil Extracellular Trap Formation in Response to *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Immunology* **185**, 7413–7425
28. Bhattacharya, M., Berends, E. T. M., Chan, R., Schwab, E., Roy, S., Sen, C. K., Torres, V. J., and Wozniak, D. J. (2018) *Staphylococcus aureus* biofilms release leukocidins to elicit extracellular trap formation and evade neutrophil-mediated killing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **115**, 7416–7421
29. Fuchs, T. A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., and Zychlinsky, A. (2007) Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *Journal of Cell Biology* **176**, 231–241
30. Remijsen, Q., Berghe, T. Vanden, Wirawan, E., Asselbergh, B., Parthoens, E., De Rycke, R., Noppen, S., Delforge, M., Willems, J., and Vandenabeele, P. (2011) Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Research* **21**, 290–304
31. Kaplan, M. J. and Radic, M. (2012) Neutrophil Extracellular Traps: Double-Edged Swords of Innate Immunity. *The Journal of Immunology* **189**, 2689–2695
32. Douda, D. N., Yip, L., Khan, M. A., Grasemann, H., and Palaniyar, N. (2014) Akt is essential to induce NADPH-dependent NETosis and to switch the neutrophil death to apoptosis. *Blood* **123**, 597–600
33. Khan, M. A., Farahvash, A., Douda, D. N., Licht, J. C., Grasemann, H., Sweezey, N., and Palaniyar, N. (2017) JNK Activation Turns on LPS-And Gram-Negative Bacteria-Induced NADPH Oxidase-Dependent Suicidal NETosis. *Scientific Reports* **7**, 3409
34. Parker, H., Dragunow, M., Hampton, M. B., Kettle, A. J., and Winterbourn, C. C. (2012) Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. *Journal of Leukocyte Biology* **92**, 841–849
35. Khan, M. A. and Palaniyar, N. (2017) Transcriptional firing helps to drive NETosis. *Scientific Reports* **7**,

1–16

36. Arai, Y., Nishinaka, Y., Arai, T., Morita, M., Mizugishi, K., Adachi, S., Takaori-Kondo, A., Watanabe, T., and Yamashita, K. (2014) Uric acid induces NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **443**, 556–561
37. Itoh, T., Kanmura, Y., and Kuriyama, H. (1985) A23187 increases calcium permeability of store sites more than of surface membranes in the rabbit mesenteric artery. *The Journal of Physiology* **359**, 467–484
38. Kirchner, T., Mller, S., Klinger, M., Solbach, W., Laskay, T., and Behnen, M. (2012) The impact of various reactive oxygen species on the formation of neutrophil extracellular traps. *Mediators of Inflammation* **2012**, 849136
39. Vergeade, A., Mulder, P., Vendeville, C., Ventura-Clapier, R., Thuillez, C., and Monteil, C. (2012) Xanthine oxidase contributes to mitochondrial ROS generation in an experimental model of cocaine-induced diastolic dysfunction. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **60**, 538–543
40. Douda, D. N., Khan, M. A., Grasemann, H., and Palaniyar, N. (2015) SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**, 2817–2822
41. Konig, M. F. and Andrade, F. (2016) A critical reappraisal of neutrophil extracellular traps and NETosis mimics based on differential requirements for protein citrullination. *Frontiers in Immunology* **7**, 461
42. Finck-Barbançon, V., Prévost, G., and Piémont, Y. (1991) Improved purification of leukocidin from *Staphylococcus aureus* and toxin distribution among hospital strains. *Research in Microbiology* **142**, 75–85
43. Finck-Barbançon, V., Duportail, G., Meunier, O., and Colin, D. A. (1993) Pore formation by a two-component leukocidin from *Staphylococcus aureus* within the membrane of human polymorphonuclear leukocytes. *BBA - Molecular Basis of Disease* **1182**, 275–282
44. Werner, S., Colin, D. A., Coraiola, M., Menestrina, G., Monteil, H., and Prévost, G. (2002) Retrieving biological activity from LukF-PV mutants combined with different S components implies compatibility between the stem domains of these staphylococcal bicomponent leucotoxins. *Infection and Immunity* **70**, 1310–1318
45. Gauduchon, V., Werner, S., Prévost, G., Monteil, H., and Colin, D. A. (2001) Flow cytometric determination of Panton-Valentine leucocidin S component binding. *Infection and Immunity* **69**, 2390–

- 818 2395
- 819 46. Chang, J. H. J. H. J., Golland, P., Guertin, D. A. D. A., Clarke, C., Sabatini, D. M., Kang, I. H. I. H.,
820 Lamprecht, M. R. M. R., Moffat, J., Friman, O., Jones, T. R. T. R., Carpenter, A. E. A. E., Lindquist, R.
821 A. R. A., others, Carpenter, Anne, Jones, Thouis, Lamprecht, Michael, Clarke, Colin, Kang, In, Friman, Ola,
822 Guertin, David, Chang, Joo, Lindquist, Robert, Moffat, Jason, Golland, Polina, and Sabatini, David. (2006)
823 CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biology* 7,
824 R100
- 825 47. Brinkmann, V., Goosmann, C., Kühn, L. I., and Zychlinsky, A. (2012) Automatic quantification of in
826 vitro NET formation. *Frontiers in Immunology* 3, 413
- 827 48. Rizk, A., Paul, G., Incardona, P., Bugarski, M., Mansouri, M., Niemann, A., Ziegler, U., Berger, P., and
828 Sbalzarini, I. F. (2014) Segmentation and quantification of subcellular structures in fluorescence
829 microscopy images using Squash. *Nature Protocols* 9, 586–596
- 830 49. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S.,
831 Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K.,
832 Tomancak, P., and Cardona, A. (2012) Fiji: An open-source platform for biological-image analysis.
833 *Nature Methods* 9, 676–682
- 834 50. Adrover, J. M., Nicolás-Ávila, J. A., and Hidalgo, A. (2016) Aging: A Temporal Dimension for
835 Neutrophils. *Trends in Immunology* 37, 334–345
- 836 51. Remijsen, Q., Berghe, T. Vanden, Wirawan, E., Asselbergh, B., Parthoens, E., De Rycke, R., Noppen, S.,
837 Delforge, M., Willems, J., and Vandenabeele, P. (2011) Neutrophil extracellular trap cell death requires
838 both autophagy and superoxide generation. *Cell Research* 21, 290–304
- 839 52. Wang, Y., Li, M., Stadler, S., Correll, S., Li, P., Wang, D., Hayama, R., Leonelli, L., Han, H., Grigoryev,
840 S. A., Allis, C. D., and Coonrod, S. A. (2009) Histone hypercitrullination mediates chromatin
841 decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *Journal of Cell Biology* 184, 205–213
- 842 53. Douda, D. N., Khan, M. A., Grasemann, H., and Palaniyar, N. (2015) SK3 channel and mitochondrial
843 ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx. *Proceedings of the
844 National Academy of Sciences* 112, 2817–2822
- 845 54. Fumagalli, L., Zhang, H., Baruzzi, A., Lowell, C. A., and Berton, G. (2007) The Src Family Kinases
846 Hck and Fgr Regulate Neutrophil Responses to N -Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine . *The*

- 847 *Journal of Immunology* **178**, 3874–3885
- 848 55. Mócsai, A., Jakus, Z., Vántus, T., Berton, G., Lowell, C. A., and Ligeti, E. (2000) Kinase Pathways in
 849 Chemoattractant-Induced Degranulation of Neutrophils: The Role of p38 Mitogen-Activated Protein
 850 Kinase Activated by Src Family Kinases. *The Journal of Immunology* **164**, 4321–4331
- 851 56. Nijhuis, E., Lammers, J. W. J., Koenderman, L., and Coffey, P. J. (2002) Src kinases regulate PKB
 852 activation and modulate cytokine and chemoattractant-controlled neutrophil functioning. *Journal of*
 853 *Leukocyte Biology* **71**, 115–124
- 854 57. Hanke, J. H., Gardner, J. P., Dow, R. L., Changelian, P. S., Brissette, W. H., Weringer, E. J., Pollok, B.
 855 A., and Connelly, P. A. (1996) Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase
 856 inhibitor: Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *Journal of Biological Chemistry* **271**,
 857 695–701
- 858 58. Spaan, A. N., Schiepers, A., de Haas, C. J. C., van Hooijdonk, D. D. J. J., Badiou, C., Contamin, H.,
 859 Vandenesch, F., Lina, G., Gerard, N. P., Gerard, C., van Kessel, K. P. M., Henry, T., and van Strijp, J. A.
 860 G. (2015) Differential Interaction of the Staphylococcal Toxins Pantón–Valentine Leukocidin and γ -
 861 Hemolysin CB with Human C5a Receptors. *The Journal of Immunology* **195**, 1034–1043
- 862 59. Gillet, Y., Issartel, B., Vanhems, P., Fournet, J. C., Lina, G., Bes, M., Vandenesch, F., Piémont, Y.,
 863 Brousse, N., Floret, D., and Etienne, J. (2002) Association between Staphylococcus aureus strains
 864 carrying gene for Pantón-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young
 865 immunocompetent patients. *Lancet* **359**, 753–759
- 866 60. Diep, B. A., Gillet, Y., Etienne, J., Lina, G., and Vandenesch, F. (2013) Pantón-Valentine leucocidin and
 867 pneumonia. *The Lancet Infectious Diseases* **13**, 566
- 868 61. Neeli, I. and Radic, M. (2013) Opposition between PKC isoforms regulates histone deimination and
 869 neutrophil extracellular chromatin release. *Frontiers in Immunology* **4**, 38
- 870 62. Urban, C. F., Ermert, D., Schmid, M., Abu-Abed, U., Goosmann, C., Nacken, W., Brinkmann, V.,
 871 Jungblut, P. R., and Zychlinsky, A. (2009) Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic
 872 protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathogens* **5**, e1000639
- 873 63. Palmer, L. J., Cooper, P. R., Ling, M. R., Wright, H. J., Huissoon, A., and Chapple, I. L. C. (2012)
 874 Hypochlorous acid regulates neutrophil extracellular trap release in humans. *Clinical and Experimental*
 875 *Immunology* **167**, 261–268

64. Parker, H. and Winterbourn, C. C. (2012) Reactive oxidants and myeloperoxidase and their involvement in neutrophil extracellular traps. *Frontiers in Immunology* **3**, 424
65. Samouilov, A., Li, H., and L. Zweier, J. (2007) Nitrite as NO donor in cells and tissues. In *Radicals for Life: The Various Forms of Nitric Oxide* In Radicals for Life. The Various Forms of Nitric Oxide (Van Faassen, E., and Vanin, A.F., eds) pp. 313–336, Elsevier, Amsterdam, Netherlands
66. Förstermann, U. (2010) Uncoupling of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Cardiovascular Disease and its Pharmacological Reversal. In *Nitric Oxide* pp. 139–167 (Ignarro, L.J. ed) Academic Press, Cambridge, Massachusetts, USA
67. Abooali, M., Lall, G. S., Coughlan, K., Lall, H. S., Gibbs, B. F., and Sumbayev, V. V. (2014) Crucial involvement of xanthine oxidase in the intracellular signalling networks associated with human myeloid cell function. *Scientific Reports* **4**, 6307
68. Lee, W. Y. and Lee, S. M. (2006) Synergistic protective effect of ischemic preconditioning and allopurinol on ischemia/reperfusion injury in rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **349**, 1087–1093
69. Karwinski, W., Ulvik, R., Farstad, M., Svardal, A., Berge, R., and Soreide, O. (1993) Effect of allopurinol on the concentration of endogenous glutathione in hepatocytes after an hour of normothermic liver ischemia. *European Journal of Surgery, Acta Chirurgica* **159**, 355–359
70. Akong-Moore, K., Chow, O. A., von Köckritz-Blickwede, M., and Nizet, V. (2012) Influences of Chloride and Hypochlorite on Neutrophil Extracellular Trap Formation. *PLoS ONE* **7**, e42984
71. Hakkim, A., Fuchs, T. A., Martinez, N. E., Hess, S., Prinz, H., Zychlinsky, A., and Waldmann, H. (2011) Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nature Chemical Biology* **7**, 75–77
72. Keshari, R. S., Verma, A., Barthwal, M. K., and Dikshit, M. (2013) Reactive oxygen species-induced activation of ERK and p38 MAPK mediates PMA-induced NETs release from human neutrophils. *Journal of Cellular Biochemistry* **114**, 532–540
73. Rohrbach, A. S., Slade, D. J., Thompson, P. R., and Mowen, K. A. (2012) Activation of PAD4 in NET formation. *Frontiers in Immunology* **3**, 360
74. Miller, B. F., Abrams, R., Dorfman, A., and Klein, M. (1942) Antibacterial properties of protamine and histone. *Science* **96**, 428–430

75. Hirsch, J. G. (1958) Bactericidal action of histone. *Journal of Experimental Medicine* **108**, 925–944
76. Tagai, C., Morita, S., Shiraishi, T., Miyaji, K., and Iwamuro, S. (2011) Antimicrobial properties of arginine- and lysine-rich histones and involvement of bacterial outer membrane protease T in their differential mode of actions. *Peptides* **32**, 2003–2009
77. Cutrona, K. J., Kaufman, B. A., Figueroa, D. M., and Elmore, D. E. (2015) Role of arginine and lysine in the antimicrobial mechanism of histone-derived antimicrobial peptides. *FEBS Letters* **589**, 3915–3920
78. Leshner, M., Wang, S., Lewis, C., Zheng, H., Chen, X. A., Santy, L., and Wang, Y. (2012) PAD4 mediated histone hypercitrullination induces heterochromatin decondensation and chromatin unfolding to form neutrophil extracellular trap-like structures. *Frontiers in Immunology* **3**, 307
79. Koziel, J., Bryzek, D., Sroka, A., Maresz, K., Glowczyk, I., Bielecka, E., Kantyka, T., Pyrc, K., Svoboda, P., Pohl, J., and Potempa, J. (2014) Citrullination Alters Immunomodulatory Function of LL-37 Essential for Prevention of Endotoxin-Induced Sepsis. *The Journal of Immunology* **192**, 5363–5372
80. Li, P., Li, M., Lindberg, M. R., Kennett, M. J., Xiong, N., and Wang, Y. (2010) PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *Journal of Experimental Medicine* **207**, 1853–1862
81. Sohn, D. H., Rhodes, C., Onuma, K., Zhao, X., Sharpe, O., Gazitt, T., Shiao, R., Fert-Bober, J., Cheng, D., Lahey, L. J., Wong, H. H., Van Eyk, J., Robinson, W. H., and Sokolove, J. (2015) Local joint inflammation and histone citrullination in a murine model of the transition from preclinical autoimmunity to inflammatory arthritis. *Arthritis and Rheumatology* **67**, 2877–2887
82. Muñoz, L. E., Kaplan, M. J., Radic, M., and Herrmann, M. (2017) Editorial: NETosis 2: The excitement continues. *Frontiers in Immunology* **8**, 1318.
83. Thieblemont, N., Wright, H. L., Edwards, S. W., and Witko-Sarsat, V. (2016) Human neutrophils in auto-immunity. *Seminars in Immunology* **28**, 159–173
84. Khandpur, R., Carmona-Rivera, C., Vivekanandan-Giri, A., Gizinski, A., Yalavarthi, S., Knight, J. S., Friday, S., Li, S., Patel, R. M., Subramanian, V., Thompson, P., Chen, P., Fox, D. A., Pennathur, S., and Kaplan, M. J. (2013) NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Science Translational Medicine* **5**, 178ra40
85. Schellekens, G. A., De Jong, B. A. W., Van Den Hoogen, F. H. J., Van De Putte, L. B. A., and Van Venrooij, W. J. (1998) Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by

- 934 rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *Journal of Clinical Investigation* **101**, 273–281
- 935 86. Darrah, E., Rosen, A., Giles, J. T., and Andrade, F. (2012) Peptidylarginine deiminase 2, 3 and 4 have
936 distinct specificities against cellular substrates: Novel insights into autoantigen selection in rheumatoid
937 arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* **71**, 92–98
- 938 87. Romero, V., Fert-Bober, J., Nigrovic, P. A., Darrah, E., Haque, U. J., Lee, D. M., Van Eyk, J., Rosen, A.,
939 and Andrade, F. (2013) Immune-mediated pore-forming pathways induce cellular hypercitrullination and
940 generate citrullinated autoantigens in rheumatoid arthritis. *Science Translational Medicine* **5**, 209ra150
- 941 88. Pratesi, F., Dioni, I., Tommasi, C., Alcaro, M. C., Paolini, I., Barbetti, F., Boscaro, F., Panza, F.,
942 Puxeddu, I., Rovero, P., and Migliorini, P. (2014) Antibodies from patients with rheumatoid arthritis
943 target citrullinated histone 4 contained in neutrophils extracellular traps. *Annals of the Rheumatic*
944 *Diseases* **73**, 1414–1422
- 945 89. Tutturen, A. E. V., Fleckenstein, B., and De Souza, G. A. (2014) Assessing the citrullinome in rheumatoid
946 arthritis synovial fluid with and without enrichment of citrullinated peptides. *Journal of Proteome*
947 *Research* **13**, 2867–2873
- 948 90. Van Beers, J. J. B. C., Schwarte, C. M., Stammen-Vogelzangs, J., Oosterink, E., Božič, B., and Pruijn, G.
949 J. M. (2013) The rheumatoid arthritis synovial fluid citrullinome reveals novel citrullinated epitopes in
950 apolipoprotein E, myeloid nuclear differentiation antigen, and β -actin. *Arthritis and Rheumatism* **65**, 69–
951 80
- 952 91. Janssen, K. M. J., de Smit, M. J., Withaar, C., Brouwer, E., van Winkelhoff, A. J., Vissink, A., and
953 Westra, J. (2017) Autoantibodies against citrullinated histone H3 in rheumatoid arthritis and periodontitis
954 patients. *Journal of Clinical Periodontology* **44**, 577–584
- 955 92. Radic, M. and Muller, S. (2013) Epigenetics of Autoantigens: New Opportunities for Therapy of
956 Autoimmune Diseases. *Genetics & Epigenetics* **5**, GEG.S12144
- 957 93. Chen, Y., Azad, M. B., and Gibson, S. B. (2009) Superoxide is the major reactive oxygen species
958 regulating autophagy. *Cell Death and Differentiation* **16**, 1040–1052
- 959 94. Caielli, S., Athale, S., Domic, B., Murat, E., Chandra, M., Banchereau, R., Baisch, J., Phelps, K.,
960 Clayton, S., Gong, M., Wright, T., Punaro, M., Palucka, K., Guiducci, C., Banchereau, J., and Pascual, V.
961 (2016) Oxidized mitochondrial nucleoids released by neutrophils drive type I interferon production in
962 human lupus. *Journal of Experimental Medicine* **213**, 697–713

95. Zimmermann-Meisse, G., Prévost, G., and Jover, E. (2017) Above and beyond c5a receptor targeting by staphylococcal leucotoxins: Retrograde transport of panton–valentine leucocidin and γ -Hemolysin. *Toxins* **9**, 9010041

Supplementary figures

Figure 1 –figure supplement 1

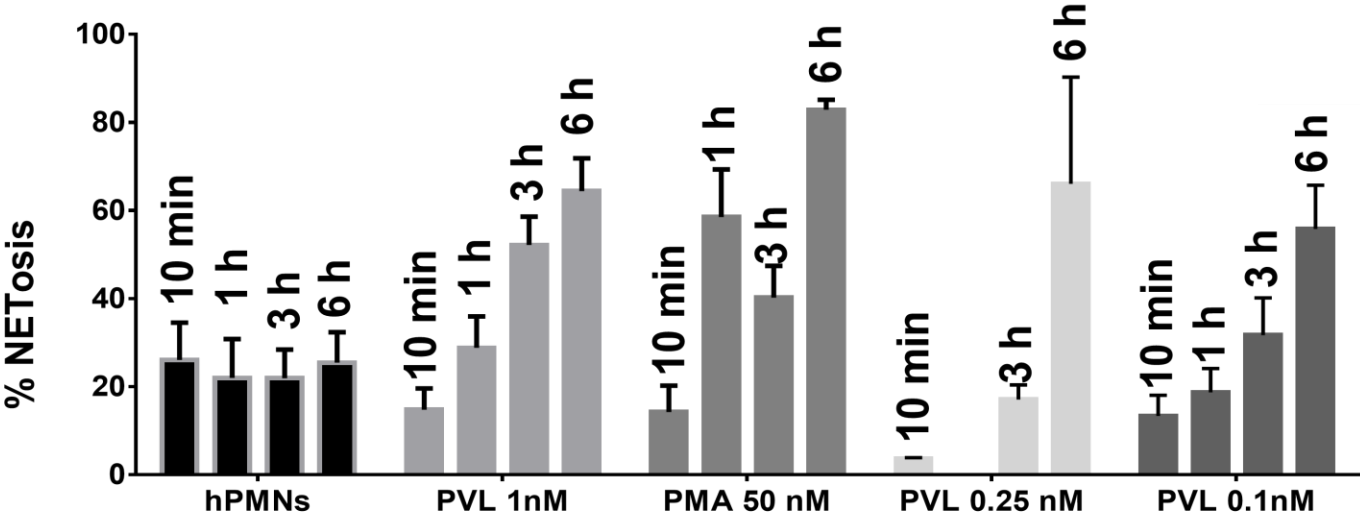


Figure 1- figure supplement 2: PVL provokes a time-dependent NETosis in hPMNs. Freshly isolated human neutrophils (hPMNs) were left unstimulated or exposed for 10min, 1h, 3h or 6h to 50 nM of PMA, PVL at 1nM, 0.25nM, 0.1 nM. hPMNs were fixed with 4% PFA and stained with an anti- Neutrophil Elastase (NE) antibody and Hoechst dye to observe chromatin and nuclei. NE-positive cells were quantified using 8 random fields of view obtained from three or more different biological replicates. Presented is the mean with SEM.

Figure 1 –figure supplement 2

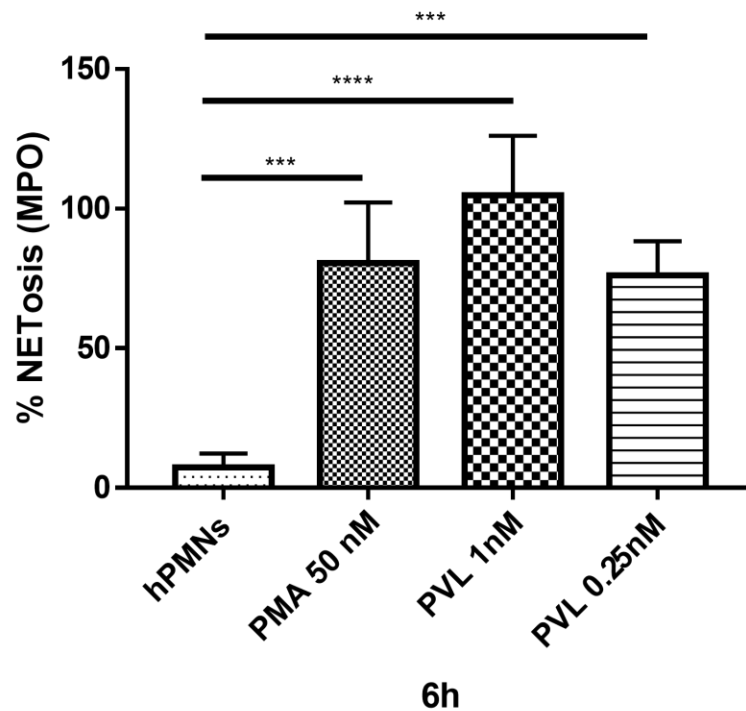


Figure 1- figure 1 supplement 3: PVL leads to MPO-decorated chromatin fibers spreading in extracellular space. Freshly isolated human neutrophils (hPMNs) were left unstimulated or exposed for 6h to 50 nM of PMA, PVL at 1nM or 0,25 nM. hPMNs were fixed with 4% PFA and stained with an anti- Myeloperoxidase (MPO) antibody and Hoechst dye to observe chromatin and nuclei. MPO-positive cells were quantified using 8 random fields of view obtained from four different biological replicates. Presented is the mean with SEM. Groups were compared to unstimulated neutrophils using repeated measures one-way ANOVA and Dunnett post-test, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

Figure 1- figure supplement 3

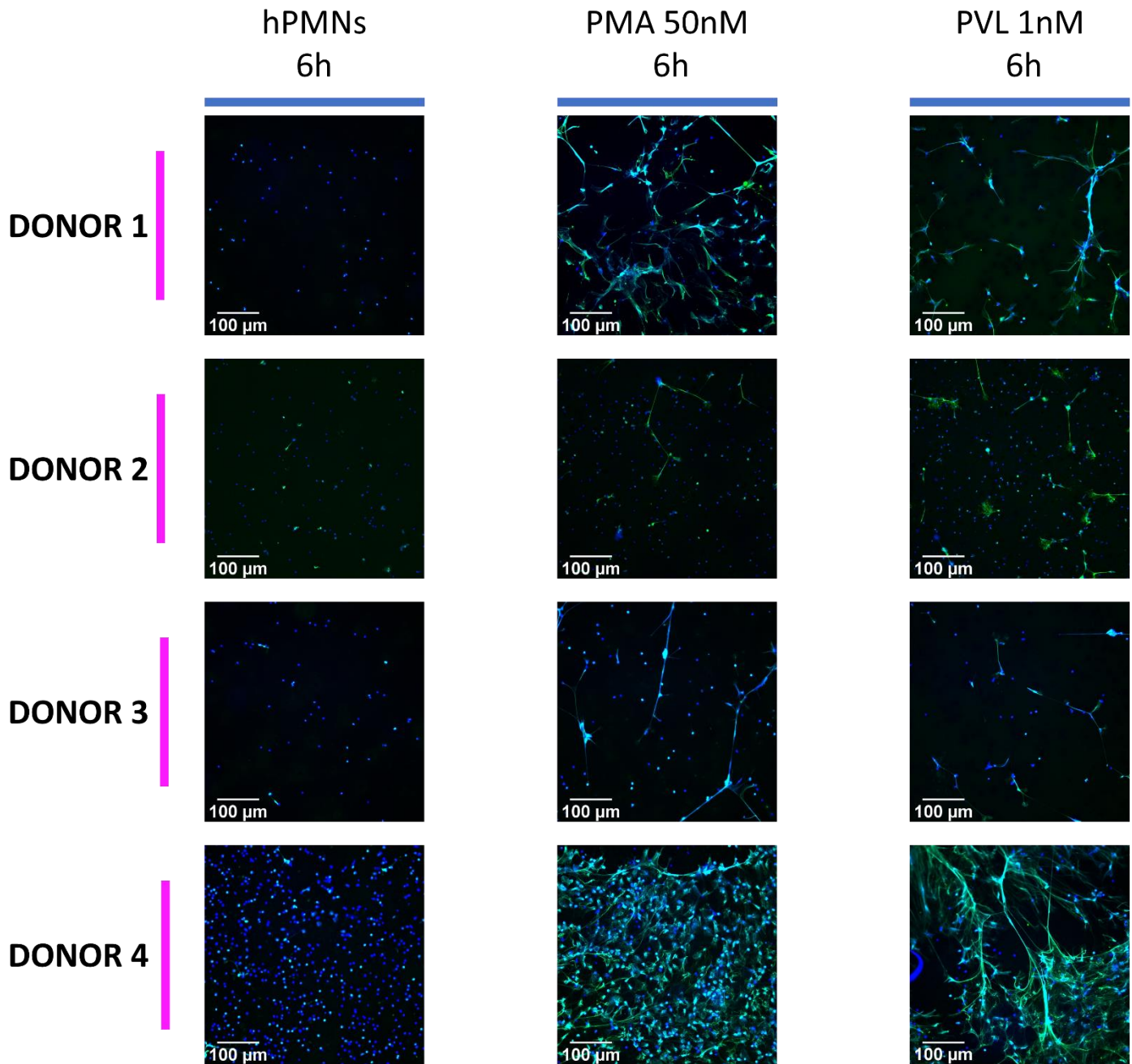
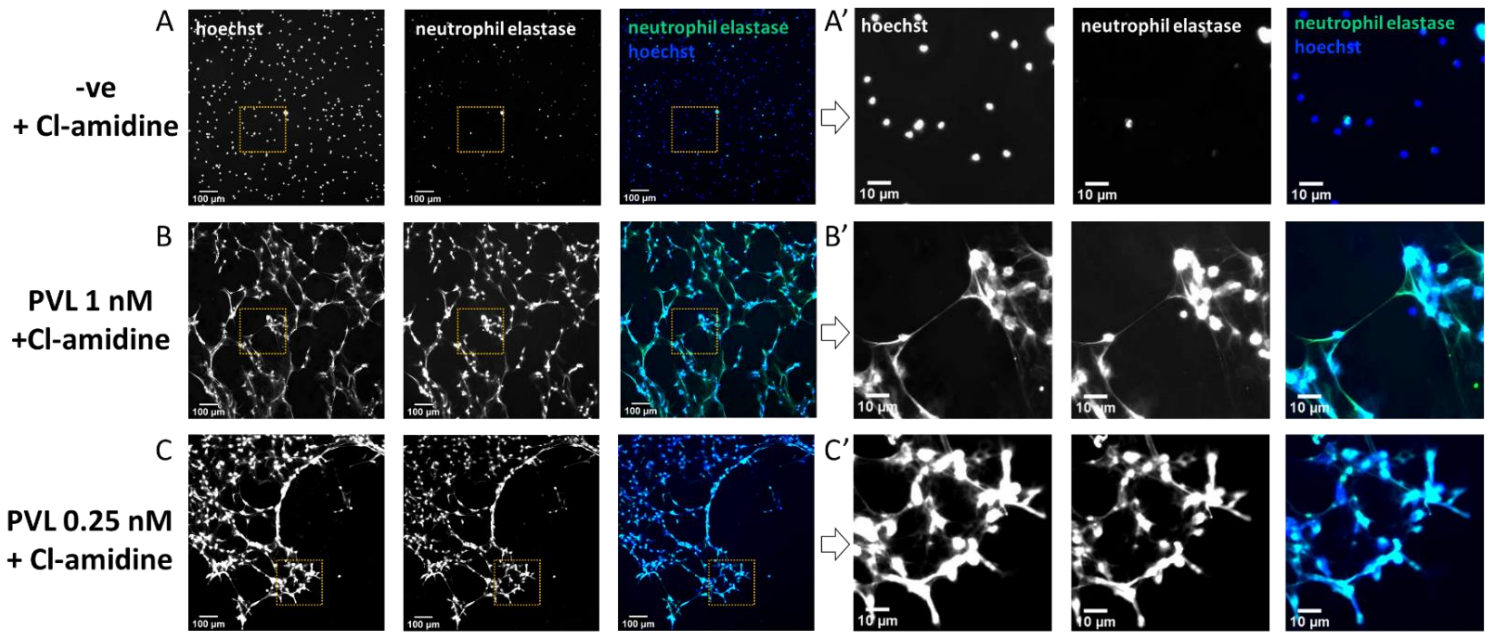


Figure 1- figure supplement 4: Important differences between each donor response to PMA and the PVL. Freshly isolated human neutrophils (hPMNs) were left unstimulated or exposed for 6h to 50 nM of PMA or PVL at 1nM. hPMNs were fixed with 4% PFA and stained with an anti- Neutrophil Elastase (NE) antibody and Hoechst dye to observe chromatin and nuclei. Cells of donors with different ages had a dissimilar outcomes in response to stimuli.

Figure 4 –figure supplement 1

**Figure 4- figure supplement 1: PAD4 inhibition fails to prevent PVL NETosis.**

Immunofluorescence staining of anti-NE(green), DNA and nuclei are marked with the hoechst dye (in blue). Human neutrophils (hPMNs) unstimulated (A and A') or exposed to PVL at 1 nM (B and B'), 0.25 nM (C and C') after 6h in the presence of 200μM of Cl-amidine.

Images marked with prime symbols (') on the right are close-ups of the original corresponding image on the left marked with the same letter without prime symbols. Blown-up areas are highlighted with a yellow dotted square on the original image.

5 CONCLUSION GÉNÉRALE

E quindi uscimmo a riveder le stelle (« Et dès lors, nous sortîmes revoir les étoiles »)

Dernier vers de l'Enfer, de la Divine Comédie de Dante Alighieri.

5.1 La NETose et *S. aureus* : une offensive stratégique via la LPV ?

Deux histoires ont trouvé dans cette thèse leur point de rencontre : la longue histoire de la bactérie la plus connue au monde, *Staphylococcus aureus*, et celle, beaucoup plus récente, de la NETose.

Effectivement, le fait que la Leucocidine de Panton et Valentine ait été longuement considérée comme une simple, mais tout aussi dangereuse, toxine formant des pores, a contribué à créer un scénario difficile à modifier. Cependant, si « la dose fait le poison », comme le disait Paracelse, l'application imprudente de concentrations massives de la LPV sur des polynucléaires neutrophiles, la façon de produire et purifier la leucotoxine et sa comparaison à la toxine sauvage restent des aspects déterminants. Après les premiers résultats qui montraient une forte nécrose des hPMNs due à la LPV, la recherche s'est tournée vers d'autres processus plus complexes pour expliquer la létalité induite par ce facteur de virulence, redouté aussi bien à l'hôpital qu'au niveau communautaire. Ainsi, les études successives ont pris en compte l'apoptose précoce comme résultat de la présence de la LPV au foyer inflammatoire. Néanmoins, l'apoptose des neutrophiles est présente, mais tout à fait limitée à une petite population cellulaire. De plus, une réaction plus « violente » était censée être causée par une toxine qui présente toutes les caractéristiques potentielles pour former un pore au niveau membranaire, mais qui, dans des conditions physiologiques en calcium extracellulaire, ne produisait pas le pore à la première membrane disponible, la membrane plasmique. La LPV rentre à l'intérieur de ses cibles cellulaires, et comme un cheval de Troie elle est transportée via le récepteur C5aR auquel elle reste liée pendant un certain temps. Ainsi, la LPV se trouve à dans les hPMNs. À partir de ce moment, peu d'informations nous sont fournies. La LPV est associée au lysosome à 20 min et ensuite à l'appareil de Golgi, après 80 min.

Dans ce laps de temps, où est-elle localisée ? Quelles conséquences cellulaires et moléculaires a-t-elle eu sur le neutrophile humain ? Et, surtout, avec quel résultat final et dans quel but ?

Ce travail de thèse a été effectué comme l'on pourrait procéder avec une enquête policière.

« Preuve A » : le calcium. Pourquoi mobiliser une telle quantité de calcium intracellulaire ? Et quel est le rôle de la concentration extracellulaire du même ion, en absence de laquelle la LPV oligomérise, forme un pré-pore et puis un véritable pore à membrane ? Le calcium apparaît ainsi comme un signal d'importance capitale pour « allumer » ou garder « éteinte » l'activité de pore-forming.

Tout d'abord, regardons les données publiées par Tawak et collègues en 2015 (Figure 65).

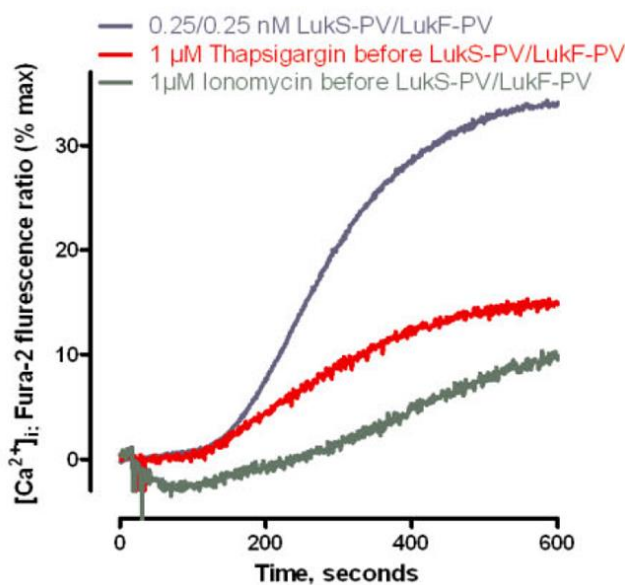


Figure 65- Résultats de l'étude des sources de calcium intracellulaire mobilisées par la LPV.

En présence de deux différents produits, le réticulum endoplasmique est préalablement vidé du calcium intracellulaire. Le relargage de cet ion est analysé grâce à la fluorescence de la sonde Fura-2, et les hPMNs sont stimulés par l'action de la LPV. En présence de Thapsigargin ou de la Ionomycine, la fluorescence du Fura-2 baisse de manière significative, ce qui suggère que cette leucotoxine mobilise le calcium intracellulaire notamment à partir du réticulum. (Tawak et al. 2015)

Il est évident que le calcium est mobilisé rapidement, avec un plateau déjà visible après 10 min d'incubation avec la LPV. Ainsi, cet effet de la LPV sur les hPMNs est l'une des toutes premières étapes du processus qu'elle déclenche. Il est intéressant de remarquer l'utilisation de la ionomycine, dans le but de vider les stocks de calcium du réticulum avant la stimulation par la LPV. La ionomycine, tout comme la calcimycine que nous avons utilisé dans nos expériences, est un puissant ionophore calcique, et cet aspect est d'autant plus intéressant puisque la LPV agit encore une fois de manière très similaire à un ionophore de ce type. La mobilisation calcique est rapide et, étant un important messenger secondaire, le calcium est impliqué dans des fonctions capitales chez le neutrophile humain, dont la dégranulation (Kankaanranta et al. 1995). Notamment, cet ion est responsable de l'activité du canal SK3 et de l'activité de l'enzyme PAD4,

à son tour responsable de la citrullination. Le SK3 et la PAD4 sont deux éléments que nous avons pu identifier comme impliqués dans « l'affaire LPV ».

« Preuve B » : la perméabilité membranaire à 6h. Comme déjà expliqué, les travaux de Zimmermann-Meisse et collaborateurs nous ont suggéré que le processus initié par la LPV devait vraisemblablement se terminer avec une rupture de la membrane plasmique très tardive. Ainsi, nous démontrons que, après l'internalisation, les hPMNs commencent à montrer des changements morphologiques qui se terminent par le relargage des filets de chromatine décorés par l'EN et la MPO. Autrement dit, la NETose est le phénomène principal initié par une faible concentration de la LPV. À *contrario*, les données sur la perméabilité membranaire de HlgCB, l'autre leucotoxine staphylococcique prise en examen au début de cette thèse, sont confirmées par nos études sur la NETose : HlgCB se comporte différemment de la LPV, ne causant pas le même processus.

« Preuve C » : la mitochondrie. Les études de Genestier et al. et de Zimmermann-Meisse et al., montraient une relation entre la LPV et la mitochondrie, qui pourtant était uniquement considérée comme faisant partie du processus d'apoptose précoce (Genestier et al. 2005; Zimmermann-Meisse et al. 2017). Cependant, l'association entre NETose NOX-indépendante, l'augmentation des mtDROs et la localisation mitochondriale de la LPV nous suggèrent un cadre de figure différent où la NETose serait un processus soutenu par les mtDROs, plutôt que par les DROs produits par la NADPH oxydase. La LPV pourrait produire un pore à la membrane des mitochondries, ce qui expliquerait la chute de potentiel remarquée dans les études de Genestier et al. et de Zimmermann-Meisse et al., la production de mtDROs et l'autophagie cellulaire que nous confirmons par nos résultats.

Le travail contenu dans cette thèse apporte donc de nouveaux éléments concernant le mode d'action de la LPV. Ainsi, bien que la NETose soit considérée une réponse immunitaire, les conséquences de la NETose à LPV ne seraient pas bénéfiques pour l'hôte. En effet, le système immunitaire pourrait, au contraire, être « piégé » à son tour par une réaction des neutrophiles qui, non seulement ne serait pas efficace contre la bactérie, en raison de la présence de la DNase et de la catalase staphylococciques, mais qui pourrait inversement s'avérer une stratégie bactérienne déployée afin d'éliminer et tirer profit de cette première ligne de défense. Cela rendrait la réponse immunitaire tardive et permettrait une plus facile dissémination bactérienne.

En termes thérapeutiques, ces nouvelles informations pourraient ouvrir des potentialités pharmacologiques, si focalisées sur l'inhibition des mtDROs ou encore du canal SK3 pour contrecarrer une infection à *S. aureus* LPV⁺. En effet, la capacité de discerner entre NETose aux fonctions antibactériennes et la NETose induite par la bactérie représenterait un avantage thérapeutique considérable pour à la fois cibler de manière plus spécifique le processus bactérien, et réduire les effets néfastes dus à une éventuelle inhibition de la NETose en tant que processus immunitaire.

5.2 Questions ouvertes et perspectives

Bien que les informations obtenues grâce à nos travaux représentent un nouveau chapitre concernant la virulence de la LPV, un certain nombre de questions restent encore sans réponse, tandis que d'autres interrogations sont issues des résultats obtenus pendant ce travail de thèse.

En premier lieu, la leucotoxine HlgCB, qui se comporte différemment de la LPV, devrait faire l'objet d'une étude à part, dans le but de collecter un nombre suffisant d'informations, et en analysant les événements qui font partie de la NETose à LPV, comme par exemple la production des mtDROs. En outre, l'étude des conséquences cellulaires des combinaisons non-canoniques de la LPV et de HlgCB devrait être considérée en raison du fait que HlgCB pourrait avoir un effet cellulaire seulement si en présence de la LPV. Cette hypothèse expliquerait pourquoi cette leucotoxine seule résulte négative à tous nos tests.

Deuxièmement, le processus de NETose causé par la LPV est malheureusement encore loin d'être complètement détaillé. Notamment, la voie de signalisation mitochondriale reste un point d'interrogation, étant donné que l'étude présente a uniquement exclu la voie empruntée par le PMA. D'ailleurs, une importance particulière devrait être accordée à l'étude du CD45, le récepteur de la sous-unité F de la LPV, dont la voie normalement activée en aval ne semblerait pas impliquée dans le processus de NETose. Il faut noter que ce récepteur n'est pas présent à la surface des neurones ganglionnaires, sensibles à la LPV. Cela remet également en question la fonction de LukF-PV au niveau de la membrane plasmique.

En troisième lieu, puisque la source majeure de calcium est le réticulum endoplasmique en ce qui concerne la LPV, le mécanisme à travers lequel la toxine induit la mobilisation de Ca²⁺ reste inconnu. De la même manière, les événements qui lient spécifiquement le SK3, l'XO et les mtDROs restent à démontrer, malgré le fait que plusieurs hypothèses aient été proposées, sur la

base de la littérature scientifique. En effet, la NETose à LPV pourrait activer le SK3 à travers l'augmentation du calcium intracellulaire. À son tour, le SK3 aurait des conséquences au niveau de la mitochondrie via la modulation de la concentration cytosolique en potassium. Cependant, la localisation de la LPV à la mitochondrie ferait penser plutôt à une interaction physique entre la leucotoxine et l'organelle, suite à laquelle les mtDROs seraient produits. Il serait d'ailleurs très intéressant d'évaluer le niveau de ces mêmes réactifs de l'oxygène en présence d'Allopurinol ou ABAH, respectivement inhibiteurs de XO et MPO. Cela permettrait d'analyser l'effet direct de ces deux sources de DROs sur la mitochondrie, et non pas uniquement sur la production de NETs. Il s'agirait donc de procéder comme on a le pu faire avec le DNP, l'inhibiteur de phosphorylation oxydative de la mitochondrie. D'ailleurs, si un pore à la mitochondrie est formé, il faudrait le confirmer par d'autres techniques, tout en détaillant le mécanisme qui permet sa liaison potentielle à la mitochondrie. On pourrait alors se demander si un récepteur ou une autre cible existe à la mitochondrie pour que la formation du pore ait lieu.

D'ailleurs, la citrullination des histones devrait être considérée comme un point de départ pour étudier d'autres protéines potentiellement citrullinées par la PAD4, un phénomène appelé « hypercitrullination » déjà suggéré par König et al. (König and Andrade 2016). De plus, il serait nécessaire de considérer les conséquences auto-immunitaires de la dissémination de résidus citrullinés due à la digestion de NETs par la DNase de *S. aureus*. En effet, une autre toxine formant des pores a été précédemment reliée à des conséquences auto-immunitaires, comme démontré dans le cas de la leucotoxine A, produite par *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (König et al. 2016).

Finalement, comme déjà suggéré précédemment, l'utilisation d'un modèle cellulaire différent, tel que le monocyte ou le macrophage, permettrait d'analyser de manière plus spécifique les éléments en jeu du processus initié par la LPV. Par exemple avec un tel modèle il serait envisageable d'employer des techniques de *silencing* ou de transfection qui remplaceraient ou intégreraient les études par inhibition pharmacologique. Néanmoins, il faudrait d'abord évaluer les conséquences cellulaires précises que cette leucotoxine peut provoquer chez ces deux types cellulaires. En effet, bien que les monocytes et les macrophages soient des cellules immunitaires, tout comme les neutrophiles, elles ont des fonctions et des caractéristiques propres, à partir d'une demi-vie beaucoup plus longue. Toutefois, il est intéressant de signaler que le processus de NETose a été récemment décrit chez les monocytes, sous le nom de METose (Granger et al. 2017). Des études préliminaires effectués par l'EA7290 sembleraient indiquer qu'un tel processus se produirait chez les monocytes testés en contact avec la LPV. Cela reste à confirmer,

en élargissant également l'étude à d'autres conséquences potentielles, telle que la pyroptose, dont la relation avec la NETose a été récemment identifiée (Sollberger et al. 2018a).

5.3 Vue générale sur la NETose : la « femme fatale » de l'immunité

C'était l'année 2015 quand pour la première fois j'ai eu la possibilité de regarder à travers l'oculaire du microscope à épifluorescence et je me suis retrouvée devant un paysage méconnu et très fascinant. Quand j'ai dû décrire ce que je venais d'observer j'ai utilisé ces mots : « C'est comme un réseau. Et c'est magnifique ».

Ce paysage fluorescent, qui m'est apparu comme un ciel étoilé, est l'image qui a « éclairé » tout mon travail de thèse et qui, au fur et à mesure, s'est dévoilée être de plus en plus inquiétante. En effet, une petite leucotoxine en très faible concentration est capable d'avoir un effet tellement funeste sur les neutrophiles humains que sa létalité apparaît tout à fait conséquente.

Après 52 h du début de l'infection, le patient positif à la souche *S. aureus* LPV⁺ décrit dans la communication personnelle de G. Prévost ne survie pas. Les enjeux liés à la compréhension du processus provoqué par la LPV n'ont jamais cessé d'être incroyablement importants.

Le phénomène de NETose est une explication à la fois très fascinante et très préoccupante, qui pourrait justifier ce mécanisme de virulence difficile à contrecarrer. Si une stratégie bactérienne est confirmée dans les années à venir, cela montrera encore une fois, d'un point de vue évolutionniste, comment une bactérie peut façonner ses techniques d'invasion et ses facteurs de virulence pour rendre inefficace et tirer profit de notre immunité. La NETose est en effet un processus qui « ne fait pas son âge ». Malgré sa découverte relativement récente, il s'agirait d'un phénomène hautement conservé. En effet, des études indiquent des stratégies immunitaires impliquant le relargage de chromatine chez les invertébrés ou chez les plantes (Wen et al. 2009; Robb et al. 2014). Ainsi, en raison des multiples résistances survenues très rapidement chez *S. aureus* après l'introduction d'un nouvel antibiotique (Figure 2), il ne serait pas surprenant que la LPV ait été « privilégiée » par *S. aureus* afin de faire face aux pièges à ADN déployés par son hôte. Mais alors, est-ce réseau de chromatine réellement antibactérien, comme dans le cas d'une NETose efficace ? Ce point reste à analyser.

Avec ce travail de thèse, nous nous sommes limités à considérer une mort cellulaire alternative, aux facettes souvent contradictoires et confuses, qui nous a poussé à nous poser des questions

sur les événements successifs et nécessaires au déroulement du processus, ainsi qu'aux éléments la constituant, jusqu'à nous faire « replonger » à l'intérieur du neutrophile, pour nous interroger sur la mitochondrie, et ainsi remonter à la surface avec à la fois des résultats et des hypothèses (Figure 66).

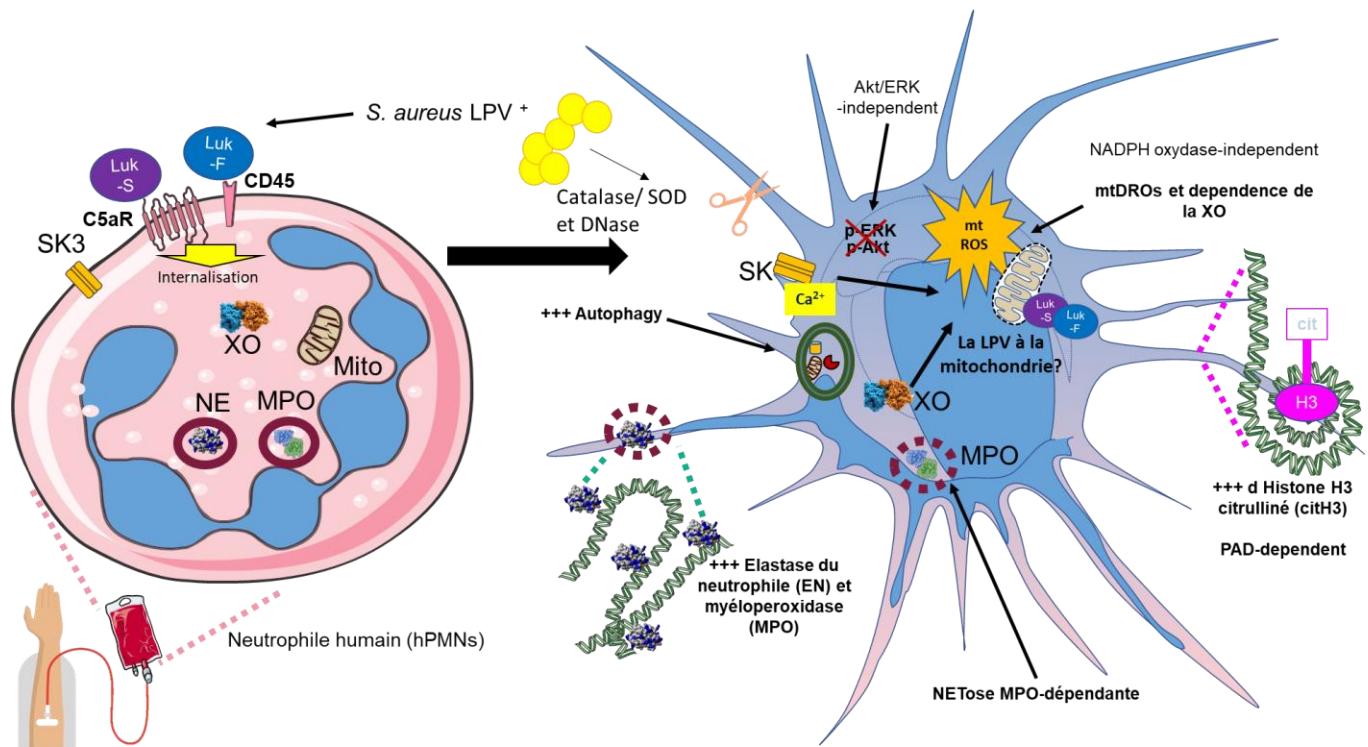


Figure 66- Schéma illustrant le processus de NETose provoqué par la LPV

Nous écrivons le mot « fin » pour ce travail de thèse avec des nouvelles pistes de recherche à parcourir, afin de trouver l'approche adéquate pour traiter efficacement les infections à *S. aureus* LPV⁺, tout en interrogeant ce même « ciel étoilé » finalement éclairci (Figure 67).

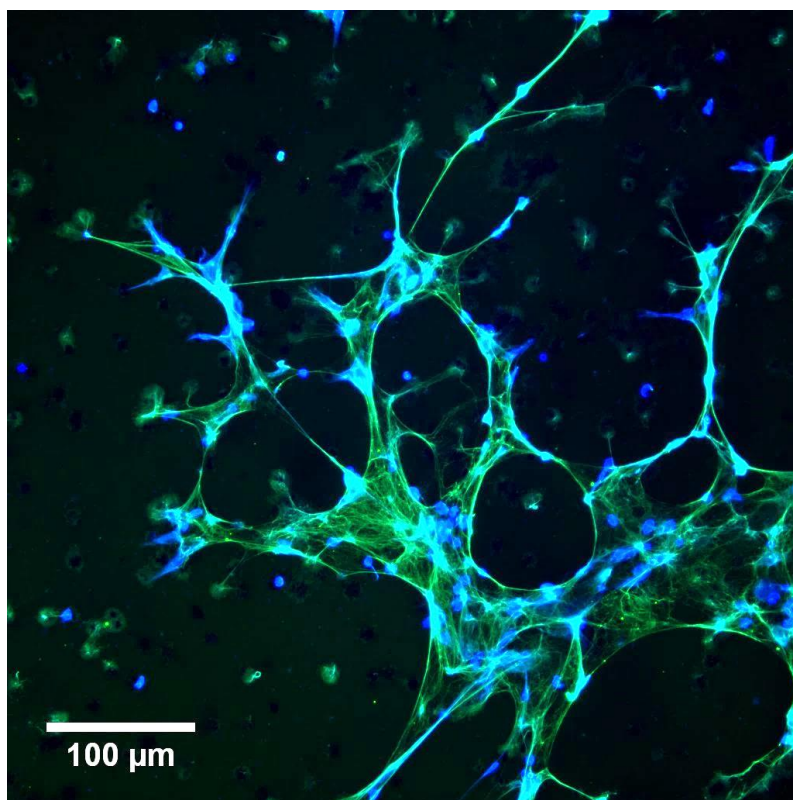


Figure 67- La LPV provoque la NETose.

En vert l'EN et en bleu l'ADN. Grossissement x100, temps d'incubation=6h.

6 BIBLIOGRAPHIE

- Abbas Ali B, Coleman G. The characteristics of extracellular protein secretion by *Staphylococcus aureus* (Wood 46) and their relationship to the regulation of α toxin formation. *Journal of General Microbiology*. 1977;
- Adelman JP, Maylie J, Sah P. Small-Conductance Ca^{2+} -Activated K^{+} Channels: Form and Function . *Annual Review of Physiology*. 2012;
- Adrover JM, Nicolás-Ávila JA, Hidalgo A. Aging: A Temporal Dimension for Neutrophils. *Trends in Immunology* [Internet]. 2016 May;37(5):334–45. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471490616000430>
- Al-Mayouf SM, Sunker A, Abdwani R, Abrawi S Al, Almurshedi F, Alhashmi N, et al. Loss-of-function variant in DNASE1L3 causes a familial form of systemic lupus erythematosus. *Nature Genetics*. 2011;
- Alderson MR, Tough TW, Davis-Smith T, Braddy S, Falk B, Schooley KA, et al. Fas ligand mediates activation-induced cell death in human t lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*. 1995;
- Alonzo F, Benson MA, Chen J, Novick RP, Shopsin B, Torres VJ. *Staphylococcus aureus* leucocidin ED contributes to systemic infection by targeting neutrophils and promoting bacterial growth in vivo. *Molecular Microbiology*. 2012;
- Alonzo F, Kozhaya L, Rawlings SA, Reyes-Robles T, Dumont AL, Myszkowski DG, et al. CCR5 is a receptor for *Staphylococcus aureus* leukotoxin ED. *Nature*. 2013;
- Alonzo F, Torres VJ. The Bicomponent Pore-Forming Leucocidins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2014;78(2):199–230.
- Amulic B, Knackstedt SL, Abu Abed U, Deigendesch N, Harbort CJ, Caffrey BE, et al. Cell-Cycle Proteins Control Production of Neutrophil Extracellular Traps. *Developmental Cell*. 2017;
- Arai Y, Yamashita K, Mizugishi K, Watanabe T, Sakamoto S, Kitano T, et al. Serum

- Neutrophil Extracellular Trap Levels Predict Thrombotic Microangiopathy after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2013;
- Argudín MA, Mendoza MC, González-Hevia MA, Bances M, Guerra B, Rodicio MR. Genotypes, exotoxin gene content, and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* strains recovered from foods and food handlers. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012;
- Arita K, Hashimoto H, Shimizu T, Nakashima K, Yamada M, Sato M. Structural basis for Ca²⁺-induced activation of human PAD4. *Nature Structural and Molecular Biology*. 2004;
- Arvidson S, Tegmark K. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*. *International journal of medical microbiology : IJMM*. 2001;
- Arya R, Princy SA. An insight into pleiotropic regulators Agr and Sar: Molecular probes paving the new way for antivirulent therapy. *Future Microbiology*. 2013.
- Arya R, Princy SA. Exploration of Modulated Genetic Circuits Governing Virulence Determinants in *Staphylococcus aureus*. *Indian Journal of Microbiology*. 2016.
- Atkins KL, Burman JD, Chamberlain ES, Cooper JE, Poutrel B, Bagby S, et al. S. aureus IgG-binding proteins SpA and Sbi: Host specificity and mechanisms of immune complex formation. *Molecular Immunology*. 2008;
- Van Avondt K, Fritsch-Stork R, Derksen RHWM, Meyaard L. Ligation of Signal Inhibitory Receptor on Leukocytes-1 Suppresses the Release of Neutrophil Extracellular Traps in Systemic Lupus Erythematosus. *PLoS ONE*. 2013;
- Azzouz D, Khan MA, Sweezey N, Palaniyar N. Two-in-one: UV radiation simultaneously induces apoptosis and NETosis. *Cell Death Discovery*. 2018;
- Baba Moussa L, Werner S, Colin DA, Mourey L, Pédelacq JD, Samama JP, et al. Decoupling the Ca²⁺-activation from the pore-forming function of the bi-component Pantón-Valentine leucocidin in human PMNs. *FEBS Letters*. 1999;
- Badarau A, Rouha H, Malafa S, Logan DT, Håkansson M, Stulik L, et al. Structure-function

- analysis of Heterodimer Formation, oligomerization, and receptor binding of the *Staphylococcus aureus* bi-component toxin LukGH. *Journal of Biological Chemistry*. 2015;
- Badiou C, Dumitrescu O, Croze M, Gillet Y, Dohin B, Slayman DH, et al. Panton-Valentine leukocidin is expressed at toxic levels in human skin abscesses. *Clinical Microbiology and Infection*. 2008;
- Ballard SA, Pertile KK, Lim M, Johnson PDR, Grayson ML. Molecular characterization of vanB elements in naturally occurring gut anaerobes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005;
- Bangert S, Levy M, Hebert AA. Bacterial resistance and impetigo treatment trends: A review. *Pediatric Dermatology*. 2012.
- Barrio MB, Rainard P, Prévost G. LukM/LukF'-PV is the most active *Staphylococcus aureus* leukotoxin on bovine neutrophils. *Microbes and Infection*. 2006;
- Behnen M, Leschczyk C, Möller S, Batel T, Klinger M, Solbach W, et al. Immobilized Immune Complexes Induce Neutrophil Extracellular Trap Release by Human Neutrophil Granulocytes via FcγRIIIB and Mac-1. *The Journal of Immunology*. 2014;
- Berg T, Firth N, Apisiridej S, Hettiaratchi A, Leelaporn A, Skurray RA. Complete nucleotide sequence of pSK41: Evolution of staphylococcal conjugative multiresistance plasmids. *Journal of Bacteriology*. 1998;
- Berube BJ, Wardenburg JB. *Staphylococcus aureus* α -toxin: Nearly a century of intrigue. *Toxins*. 2013.
- Bhakdi S, Tranum-Jensen J. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiological Reviews*. 1991.
- Bhattacharya M, Berends ETM, Chan R, Schwab E, Roy S, Sen CK, et al. *Staphylococcus aureus* biofilms release leukocidins to elicit extracellular trap formation and evade neutrophil-mediated killing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2018;115(28):7416–21.
- Bianchi M, Hakkim A, Brinkmann V, Siler U, Seger RA, Zychlinsky A, et al. Restoration of

- NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood*. 2009;
- Boakes E, Kearns AM, Ganner M, Perry C, Hill RL, Ellington MJ. Distinct bacteriophages encoding panton-valentine leukocidin (PVL) among international methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones harboring PVL. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011;
- Bonne-Année S, Kerepesi LA, Hess JA, Wesolowski J, Paumet F, Lok JB, et al. Extracellular traps are associated with human and mouse neutrophil and macrophage mediated killing of larval *Strongyloides stercoralis*. *Microbes and Infection*. 2014;
- de Bont CM, Koopman WJH, Boelens WC, Pruijn GJM. Stimulus-dependent chromatin dynamics, citrullination, calcium signalling and ROS production during NET formation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 2018;
- Borisoff JI, Joosen IA, Versteilen MO, Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, et al. Elevated levels of circulating DNA and chromatin are independently associated with severe coronary atherosclerosis and a prothrombotic state. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2013;
- Boyle-Vavra S, Daum RS. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: The role of Panton-Valentine leukocidin. *Laboratory Investigation*. 2007;87(1):3–9.
- Braff MH, Jones AL, Skerrett SJ, Rubens CE. *Staphylococcus aureus* Exploits Cathelicidin Antimicrobial Peptides Produced during Early Pneumonia to Promote Staphylokinase-Dependent Fibrinolysis . *The Journal of Infectious Diseases*. 2007;
- Brandau S, Trellakis S, Bruderek K, Schmaltz D, Steller G, Elian M, et al. Myeloid-derived suppressor cells in the peripheral blood of cancer patients contain a subset of immature neutrophils with impaired migratory properties. *Journal of Leukocyte Biology*. 2011;
- Branitzki-Heinemann K, Möllerherm H, Völlger L, Husein DM, de Buhr N, Blodkamp S, et al. Formation of neutrophil extracellular traps under low oxygen level. *Frontiers in Immunology*. 2016;
- Bravard A, Bonnard C, Durand A, Chauvin MA, Favier R, Vidal H, et al. Inhibition of xanthine oxidase reduces hyperglycemia-induced oxidative stress and improves mitochondrial alterations in skeletal muscle of diabetic mice. *American Journal of Physiology* -

- Endocrinology and Metabolism. 2011;300(3).
- Breitbach CJ, De Silva NS, Falls TJ, Aladl U, Evgin L, Paterson J, et al. Targeting tumor vasculature with an oncolytic virus. *Molecular Therapy*. 2011;
- Brinkmann V, Goosmann C, Kühn LI, Zychlinsky A. Automatic quantification of in vitro NET formation. *Frontiers in Immunology*. 2012;3(JAN).
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* [Internet]. 2004;303(5663):1532–5. Available from:
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed6&NEWS=N&AN=2004114132>
- Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin? *Journal of Cell Biology*. 2012.
- Bronner S, Jehl F, Peter JD, Ploy MC, Renault C, Arvis P, et al. Moxifloxacin efficacy and vitreous penetration in a rabbit model of *Staphylococcus aureus* endophthalmitis and effect on gene expression of leucotoxins and virulence regulator factors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003;
- Bronner S, Monteil H, Prévost G. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: Complexity and applications. *FEMS Microbiology Reviews*. 2004.
- Brown ML, O’Hara FP, Close NM, Mera RM, Miller LA, Suaya JA, et al. Prevalence and sequence variation of panton-valentine leukocidin in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012;
- von Brühl ML, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *Journal of Experimental Medicine*. 2012;
- Bukowski M, Wladyka B, Dubin G. Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *Toxins*. 2010.
- Byrd AS, O’Brien XM, Johnson CM, Lavigne LM, Reichner JS. An Extracellular Matrix–Based Mechanism of Rapid Neutrophil Extracellular Trap Formation in Response to

- Candida albicans* . The Journal of Immunology. 2013;
- Byrne ME, Rouch DA, Skurray RA. Nucleotide sequence analysis of IS256 from the *Staphylococcus aureus* gentamicin-tobramycin-kanamycin-resistance transposon Tn4001. Gene. 1989;
- Campbell AM, Kashgarian M, Shlomchik MJ. NADPH oxidase inhibits the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. Science Translational Medicine. 2012;
- Caruso RA, Bellocco R, Pagano M, Bertoli G, Rigoli L, Inferrera C. Prognostic value of intratumoral neutrophils in advanced gastric carcinoma in a high-risk area in Northern Italy. Modern Pathology [Internet]. 2002 [cited 2020 Jul 30];15(8):831–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12181268/>
- Casanova-Acebes M, Pitaval C, Weiss LA, Nombela-Arrieta C, Chèvre R, A-González N, et al. XRhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. Cell. 2013;
- Cassat JE, Skaar EP. Metal ion acquisition in *Staphylococcus aureus*: Overcoming nutritional immunity. Seminars in Immunopathology. 2012.
- Caudrillier A, Kessenbrock K, Gilliss BM, Nguyen JX, Marques MB, Monestier M, et al. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. Journal of Clinical Investigation. 2012;
- Cerutti A, Puga I, Magri G. The B cell helper side of neutrophils. Journal of Leukocyte Biology. 2013;94(4):677–82.
- Chadha AD, Thomsen IP, Jimenez-Truque N, Soper NR, Jones LS, Sokolow AG, et al. Host response to *Staphylococcus aureus* cytotoxins in children with cystic fibrosis. Journal of Cystic Fibrosis. 2016;
- Chambers HF, DeLeo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. Nature Reviews Microbiology. 2009.
- Chatfield SM, Grebe K, Whitehead LW, Rogers KL, Nebl T, Murphy JM, et al. Monosodium Urate Crystals Generate Nuclease-Resistant Neutrophil Extracellular Traps via a Distinct Molecular Pathway. The Journal of Immunology. 2018;

- Chen KW, Monteleone M, Boucher D, Sollberger G, Ramnath D, Condon ND, et al. Noncanonical inflammasome signaling elicits gasdermin D-dependent neutrophil extracellular traps. *Science Immunology*. 2018;
- Chen Y, Fang L, Yang X. Cyclic neutropenia presenting as recurrent oral ulcers and periodontitis. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*. 2013;
- Cheng NC, Wang JT, Chang SC, Tai HC, Tang YB. Necrotizing fasciitis caused by *Staphylococcus aureus*: The emergence of methicillin-resistant strains. *Annals of Plastic Surgery*. 2011.
- Cheung AL, Bayer AS, Zhang G, Gresham H, Xiong YQ. Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2004.
- Cheung GYC, Duong AC, Otto M. Direct and synergistic hemolysis caused by *Staphylococcus* phenol-soluble modulins: Implications for diagnosis and pathogenesis. *Microbes and Infection*. 2012;
- Cheung GYC, Yeh AJ, Kretschmer D, Duong AC, Tuffuor K, Fu CL, et al. Functional characteristics of the *Staphylococcus aureus* δ -toxin allelic variant G10S. *Scientific Reports*. 2015;
- Chiedozi LC. Pyomyositis. Review of 205 cases in 112 patients. *The American Journal of Surgery*. 1979.
- Chien YT, Manna AC, Projan SJ, Cheung AL. SarA, a global regulator of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*, binds to a conserved motif essential for sar-dependent gene regulation. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;
- Chu C, Wei Y, Chuang S Te, Yu C, Changchien CH, Su Y. Differences in virulence genes and genome patterns of mastitis-associated *Staphylococcus aureus* among goat, cow, and human isolates in Taiwan. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2013;
- Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nature Medicine*. 2007;

- Clarke TB, Davis KM, Lysenko ES, Zhou AY, Yu Y, Weiser JN. Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity. *Nature Medicine*. 2010;
- Claro T, Widaa A, O'Seaghdha M, Miajlovic H, Foster TJ, O'Brien FJ, et al. *Staphylococcus aureus* protein a binds to osteoblasts and triggers signals that weaken bone in osteomyelitis. *PLoS ONE*. 2011;
- Cloke T, Munder M, Taylor G, Müller I, Kropf P. Characterization of a Novel Population of Low-Density Granulocytes Associated with Disease Severity in HIV-1 Infection. *PLoS ONE* [Internet]. 2012 Nov 13 [cited 2020 Jul 31];7(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23152825/>
- Coleman DC, Sullivan DJ, Russell RJ, Arbuthnott JP, Carey BF, Pomeroy HM. *Staphylococcus aureus* bacteriophages mediating the simultaneous lysogenic conversion of β -lysin, staphylokinase and enterotoxin A: Molecular mechanism of triple conversion. *Journal of General Microbiology*. 1989;
- Comai M, Dalla Serra M, Coraiola M, Werner S, Colin DA, Monteil H, et al. Protein engineering modulates the transport properties and ion selectivity of the pores formed by staphylococcal γ -haemolysins in lipid membranes. *Molecular Microbiology*. 2002;
- Cooney J, Kienle Z, Foster TJ, O'Toole PW. The gamma-hemolysin locus of *Staphylococcus aureus* comprises three linked genes, two of which are identical to the genes for the F and S components of leukocidin. *Infection and Immunity*. 1993.
- Cortjens B, De Boer OJ, De Jong R, Antonis AFG, Sabogal Piñeros YS, Lutter R, et al. Neutrophil extracellular traps cause airway obstruction during respiratory syncytial virus disease. *Journal of Pathology*. 2016;
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*. 1999.
- Coulter SN, Schwan WR, Ng EYW, Langhorne MH, Ritchie HD, Westbrook-Wadman S, et al. *Staphylococcus aureus* genetic loci impacting growth and survival in multiple infection environments. *Molecular Microbiology*. 1998;
- Coupié P, Cribier B, Prévost G, Grosshans E, Piémont Y. Leukocidin from *Staphylococcus*

- aureus* and Cutaneous Infections: An Epidemiologic Study. Archives of Dermatology. 1994.
- Cribier B, Piémont Y, Grosshans E. Staphylococcal scalded skin syndrome in adults: A clinical review illustrated with a new case. Journal of the American Academy of Dermatology. 1994;
- Cribier B, Prévost G, Couppié P, Finek-Barbançon V, Grosshans E, Piémont Y. *Staphylococcus aureus* leukocidin: A new virulence factor in cutaneous infections?: An epidemiological and experimental study. Dermatology. 1992;
- Damgaard D, Bjørn ME, Steffensen MA, Pruijn GJM, Nielsen CH. Reduced glutathione as a physiological co-activator in the activation of peptidylarginine deiminase. Arthritis Research and Therapy. 2016;
- Dancey JT, Deubelbeiss KA, Harker and Finch LACA. Neutrophil kinetics in man. Journal of Clinical Investigation. 1976;
- Das D, Bishayi B. Contribution of Catalase and Superoxide Dismutase to the Intracellular Survival of Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* in Murine Macrophages. Indian Journal of Microbiology. 2010;
- David MZ, Medvedev S, Hohmann SF, Ewigman B, Daum RS. Increasing Burden of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Hospitalizations at US Academic Medical Centers, 2003–2008 . Infection Control & Hospital Epidemiology. 2012;
- DeFranco A, Locksley R, Robertson M. Immunity: The Immune Response to Infectious and Inflammatory Disease. 1 edition. London: Oxford University Press; 2007.
- Defres S, Marwick C, Nathwani D. MRSA as a cause of lung infection including airway infection, community-acquired pneumonia and hospital-acquired pneumonia. European Respiratory Journal. 2009.
- Deleon-Pennell KY, Tian Y, Zhang B, Cates CA, Iyer RP, Cannon P, et al. CD36 Is a Matrix Metalloproteinase-9 Substrate That Stimulates Neutrophil Apoptosis and Removal during Cardiac Remodeling. Circulation: Cardiovascular Genetics. 2016;
- Deniset JF, Kubes P. Neutrophil heterogeneity: Bona fide subsets or polarization states?

Journal of Leukocyte Biology. 2018.

Denny MF, Yalavarthi S, Zhao W, Thacker SG, Anderson M, Sandy AR, et al. A Distinct Subset of Proinflammatory Neutrophils Isolated from Patients with Systemic Lupus Erythematosus Induces Vascular Damage and Synthesizes Type I IFNs. The Journal of Immunology. 2010;

Desai J, Foresto-Neto O, Honarpisheh M, Steiger S, Nakazawa D, Popper B, et al. Particles of different sizes and shapes induce neutrophil necroptosis followed by the release of neutrophil extracellular trap-like chromatin. Scientific Reports. 2017;

Desai J, Kumar S V., Mulay SR, Konrad L, Romoli S, Schauer C, et al. PMA and crystal-induced neutrophil extracellular trap formation involves RIPK1-RIPK3-MLKL signaling. European Journal of Immunology. 2016;

Descloux E, Mohammedi I, Gillet Y, François B, Etienne J. Pneumonie nécrosante à *Staphylococcus aureus* communautaire résistant à la méticilline et producteur de leucocidine de Panton-Valentine chez un adulte. Reanimation. 2007;

Devi S, Wang Y, Chew WK, Lima R, A-González N, Mattar CNZ, et al. Neutrophil mobilization via plerixaform-mediated CXCR4 inhibition arises from lung demargination and blockade of neutrophil homing to the bone marrow. Journal of Experimental Medicine. 2013;

Dicker AJ, Crichton ML, Pumphrey EG, Cassidy AJ, Suarez-Cuartin G, Sibila O, et al. Neutrophil extracellular traps are associated with disease severity and microbiota diversity in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2018;

Diep BA, Gillet Y, Etienne J, Lina G, Vandenesch F. Panton-Valentine leucocidin and pneumonia. The Lancet Infectious Diseases. 2013.

Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clinical Microbiology Reviews. 2000;

Doery HM, Magnusson BJ, Cheyne IM, Gulasekharan J. A phospholipase in staphylococcal toxin which hydrolyses sphingomyelin. Nature. 1963;

- Dolga AM, Netter MF, Perocchi F, Doti N, Meissner L, Tobaben S, et al. Mitochondrial small conductance sk2 channels prevent glutamate-induced oxytosis and mitochondrial dysfunction. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;
- Douda DN, Grasemann H, Pace-Asciak C, Palaniyar N. A lipid mediator heptoxilin A3 is a natural inducer of neutrophil extracellular traps in human neutrophils. *Mediators of Inflammation*. 2015a;.
- Douda DN, Khan MA, Grasemann H, Palaniyar N. SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx. *Proceedings of the National Academy of Sciences [Internet]*. 2015b Mar 3;112(9):2817–22. Available from: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1414055112>
- Drancourt M, Barbieri R, Cilli E, Gruppioni G, Bazaj A, Cornaglia G, et al. Did Caravaggio die of *Staphylococcus aureus* sepsis? *The Lancet Infectious Diseases [Internet]*. 2018;18(11):1178. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309918305711>
- Dreisbach A, Van der Kooi-Pol MM, Otto A, Gronau K, Bonarius HPJ, Westra H, et al. Surface shaving as a versatile tool to profile global interactions between human serum proteins and the *Staphylococcus aureus* cell surface. *Proteomics*. 2011;
- DuMont AL, Nygaard TK, Watkins RL, Smith A, Kozhaya L, Kreiswirth BN, et al. Characterization of a new cytotoxin that contributes to *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Molecular Microbiology*. 2011;
- DuMont AL, Yoong P, Day CJ, Alonzo F, McDonald WH, Jennings MP, et al. *Staphylococcus aureus* LukAB cytotoxin kills human neutrophils by targeting the CD11b subunit of the integrin Mac-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013a;.
- DuMont AL, Yoong P, Liu X, Day CJ, Chumbler NM, James DBA, et al. Identification of a crucial residue required for *Staphylococcus aureus* LukAB cytotoxicity and receptor recognition. *Infection and Immunity*. 2014;
- DuMont AL, Yoong P, Surewaard BGJ, Benson MA, Nijland R, Strijp JAG van, et al. *Staphylococcus aureus* elaborates leukocidin AB to mediate escape from within human

- neutrophils. *Infection and Immunity*. 2013b;.
- Eash KJ, Greenbaum AM, Gopalan PK, Link DC. CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *Journal of Clinical Investigation*. 2010;120(7):2423–31.
- Eskan MA, Jotwani R, Abe T, Chmelar J, Lim JH, Liang S, et al. The leukocyte integrin antagonist Del-1 inhibits IL-17-mediated inflammatory bone loss. *Nature Immunology*. 2012;
- Etulain J, Martinod K, Wong SL, Cifuni SM, Schattner M, Wagner DD. P-selectin promotes neutrophil extracellular trap formation in mice. *Blood*. 2015;
- Falk RJ, Jennette JC. Anti-Neutrophil Cytoplasmic Autoantibodies with Specificity for Myeloperoxidase in Patients with Systemic Vasculitis and Idiopathic Necrotizing and Crescentic Glomerulonephritis. *New England Journal of Medicine*. 1988;
- Ferreras M, Höper F, Dalla Serra M, Colin DA, Prévost G, Menestrina G. The interaction of *Staphylococcus aureus* bi-component γ -hemolysins and leucocidins with cells and lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 1998;
- Finck-Barbançon V, Duportail G, Meunier O, Colin DA. Pore formation by a two-component leukocidin from *Staphylococcus aureus* within the membrane of human polymorphonuclear leukocytes. *BBA - Molecular Basis of Disease*. 1993;1182(3):275–82.
- Finck-Barbançon V, Prévost G, Piémont Y. Improved purification of leukocidin from *Staphylococcus aureus* and toxin distribution among hospital strains. *Research in Microbiology* [Internet]. 1991 Jan;142(1):75–85. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/092325089190099V>
- Fleischer B, Schrezenmeier H. T cell stimulation by staphylococcal enterotoxins. Clonally variable response and requirement for major histocompatibility complex class II molecules on accessory or target cells. *The Journal of experimental medicine* [Internet]. 1988 May 1;167(5):1697–707. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3259256>
- Forsgren A, Sjöquist J. “Protein A” from *S. aureus*. I. Pseudo-immune reaction with human gamma-globulin. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1966;

- Förstermann U. Uncoupling of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Cardiovascular Disease and its Pharmacological Reversal. In: Nitric Oxide. 2010. p. 139–67.
- Foster SJ. Molecular characterization and functional analysis of the major autolysin of *Staphylococcus aureus* 8325/4. Journal of Bacteriology. 1995;
- Foster TJ. Immune evasion by staphylococci. Nature Reviews Microbiology. 2005.
- Fowler VG, Miro JM, Hoen B, Cabell CH, Abrutyn E, Rubinstein E, et al. *Staphylococcus aureus* endocarditis: A consequence of medical progress. Journal of the American Medical Association. 2005;
- Fridlender ZG, Albelda SM. Tumor-associated neutrophils: Friend or foe? Carcinogenesis. 2012.
- Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, et al. Polarization of Tumor-Associated Neutrophil Phenotype by TGF- β : “N1” versus “N2” TAN. Cancer Cell. 2009;
- Fromageau A, Cunha P, Gilbert FB, Rainard P. Purified *Staphylococcus aureus* leukotoxin LukM/F’ does not trigger inflammation in the bovine mammary gland. Microbial Pathogenesis. 2011;
- Fu J, Tobin MC, Thomas LL. Neutrophil-like low-density granulocytes are elevated in patients with moderate to severe persistent asthma. Annals of Allergy, Asthma and Immunology [Internet]. 2014 Dec 1 [cited 2020 Jul 31];113(6):635-640.e2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25256681/>
- Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. Journal of Cell Biology. 2007;176(2):231–41.
- Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2010;
- Fueyo JM, Mendoza MC, Rodicio MR, Muñoz J, Alvarez MA, Martín MC. Cytotoxin and pyrogenic toxin superantigen gene profiles of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical mastitis in dairy cows and relationships with macrorestriction genomic

- profiles. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;
- Gabriel C, McMaster RW, Girard D, Descoteaux A. *Leishmania donovani* promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. *BMC Proceedings*. 2011;
- Galdiero MR, Garlanda C, Jaillon S, Marone G, Mantovani A. Tumor associated macrophages and neutrophils in tumor progression. *Journal of Cellular Physiology*. 2013.
- Garcia-Romo GS, Caielli S, Vega B, Connolly J, Allantaz F, Xu Z, et al. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Science Translational Medicine*. 2011;
- Gauduchon V, Werner S, Prévost G, Monteil H, Colin DA. Flow cytometric determination of Pantan-Valentine leucocidin S component binding. *Infection and Immunity*. 2001;69(4):2390–5.
- Gehrke N, Mertens C, Zillinger T, Wenzel J, Bald T, Zahn S, et al. Oxidative damage of dna confers resistance to cytosolic nuclease trex1 degradation and potentiates STING-dependent immune sensing. *Immunity*. 2013;39(3):482–95.
- Genestier AL, Michallet MC, Prévost G, Bellot G, Chalabreysse L, Peyrol S, et al. *Staphylococcus aureus* Pantan-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. *Journal of Clinical Investigation*. 2005;115(11):3117–27.
- Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet JC, Lina G, Bes M, et al. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Pantan-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet*. 2002;
- Gillman A, Breshears L, Kistler C, Finnegan P, Torres V, Schlievert P, et al. Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Enhances the Proinflammatory Effects of *Staphylococcus aureus* Gamma-Toxin on the Mucosa. *Toxins* [Internet]. 2017 Jun 28;9(7):202. Available from: <http://www.mdpi.com/2072-6651/9/7/202>
- Goerke C, Pantucek R, Holtfreter S, Schulte B, Zink M, Grumann D, et al. Diversity of prophages in dominant *Staphylococcus aureus* clonal lineages. *Journal of Bacteriology*. 2009;

- Goetz C, Dufour S, Archambault M, Malouin F, Jacques M. Importance et contrôle de biofilms formés par les staphylocoques lors d'infections intra-mammaires chez la vache laitière: Une revue bibliographique. *Revue de Medecine Veterinaire*. 2016.
- Golubchik T, Batty EM, Miller RR, Farr H, Young BC, Lerner-Svensson H, et al. Within-Host Evolution of *Staphylococcus aureus* during Asymptomatic Carriage. *PLoS ONE*. 2013;
- Gordy C, Pua H, Sempowski GD, He YW. Regulation of steady-state neutrophil homeostasis by macrophages. *Blood*. 2011;
- Gottlieb M, Long B, Koyfman A. The Evaluation and Management of Toxic Shock Syndrome in the Emergency Department: A Review of the Literature. *Journal of Emergency Medicine*. 2018;
- Granger V, Faille D, Marani V, Noël B, Gallais Y, Szely N, et al. Human blood monocytes are able to form extracellular traps. *Journal of Leukocyte Biology*. 2017;102(3):775–81.
- Graves SF, Kobayashi SD, Braughton KR, Diep BA, Chambers HF, Otto M, et al. Relative contribution of Panton-Valentine leukocidin to PMN plasma membrane permeability and lysis caused by USA300 and USA400 culture supernatants. *Microbes and Infection*. 2010;
- Graves SF, Kobayashi SD, Braughton KR, Whitney AR, Sturdevant DE, Rasmussen DL, et al. Sublytic concentrations of *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin alter human PMN gene expression and enhance bactericidal capacity . *Journal of Leukocyte Biology*. 2012;
- Gravet A, Colin DA, Keller D, Giradot R, Monteil H, Prévost G. Characterization of a novel structural member, LukeE-LukD, of the bi-component staphylococcal leucotoxins family. *FEBS Letters*. 1998;
- Gravet A, Couppié P, Meunier O, Clyti E, Moreau B, Pradinaud R, et al. *Staphylococcus aureus* isolated in cases of impetigo produces both epidermolysin A or B and lukE-lukD in 78% of 131 retrospective and prospective cases. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001;
- Gravet A, Rondeau M, Harf-Monteil C, Grunenberger F, Monteil H, Scheftel JM, et al. Predominant *Staphylococcus aureus* isolated from antibiotic-associated diarrhea is clinically relevant and produces enterotoxin A and the bicomponent toxin LukeE-LukD.

- Journal of Clinical Microbiology. 1999;
- Gresham HD, Lowrance JH, Caver TE, Wilson BS, Cheung AL, Lindberg FP. Survival of *Staphylococcus aureus* Inside Neutrophils Contributes to Infection . The Journal of Immunology. 2000;
- Grimminger F, Rose F, Sibelius U, Meinhardt M, Pötzsch B, Spriestersbach R, et al. Human Endothelial Cell Activation and Mediator Release in Response to the Bacterial Exotoxins *Escherichia coli* Hemolysin and Staphylococcal α -Toxin. Journal of Immunology. 1997;
- Grumann D, Nübel U, Bröker BM. *Staphylococcus aureus* toxins - Their functions and genetics. Infection, Genetics and Evolution. 2014;
- Grumann D, Ruotsalainen E, Kolata J, Kuusela P, Järvinen A, Kontinen VP, et al. Characterization of infecting strains and superantigen-neutralizing antibodies in *Staphylococcus aureus* bacteremia. Clinical and Vaccine Immunology. 2011;
- Gupta S, Kaplan MJ. The role of neutrophils and NETosis in autoimmune and renal diseases. Vol. 12, Nature Reviews Nephrology. 2016. p. 402–13.
- Haase H, Hebel S, Engelhardt G, Rink L. Ethylmercury and Hg²⁺ induce the formation of neutrophil extracellular traps (NETs) by human neutrophil granulocytes. Archives of Toxicology. 2016;
- Hackbarth E, Kajdacsy-Balla A. Low density neutrophils in patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and acute rheumatic fever. Arthritis & Rheumatism [Internet]. 1986 [cited 2020 Jul 31];29(11):1334–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2430586/>
- Hackbarth CJ, Chambers HF. blaI and blaR1 regulate β -lactamase and PBP 2a production in methicillin- resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1993;
- Hacker J, Kaper JB. Pathogenicity Islands and the Evolution of Microbes. Annual Review of Microbiology. 2000;
- Hair PS, Ward MD, Semmes OJ, Foster TJ, Cunnion KM. *Staphylococcus aureus* Clumping Factor A Binds to Complement Regulator Factor I and Increases Factor I Cleavage of C3b

- . The Journal of Infectious Diseases. 2008;
- Hakkim A, Fuchs TA, Martinez NE, Hess S, Prinz H, Zychlinsky A, et al. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nature Chemical Biology*. 2011;7(2):75–7.
- Hakkim A, Fürnrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UA, Brinkmann V, et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;
- Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cellular Microbiology*. 2009.
- Hamaguchi S, Seki M, Yamamoto N, Hirose T, Matsumoto N, Irisawa T, et al. Case of invasive nontypable *Haemophilus influenzae* respiratory tract infection with a large quantity of neutrophil extracellular traps in sputum. *Journal of Inflammation Research*. 2012;
- Hamam HJ, Palaniyar N. Post-translational modifications in netosis and nets-mediated diseases. *Biomolecules*. 2019.
- Han B, Lin CCJ, Hu G, Wang MC. ‘Inside Out’ – a dialogue between mitochondria and bacteria. *FEBS Journal*. 2019.
- Hanakawa Y, Selwood T, Woo D, Lin C, Schechter NM, Stanley JR. Calcium-dependent conformation of desmoglein 1 is required for its cleavage by exfoliative toxin. *Journal of Investigative Dermatology*. 2003;
- Hardwick N, Parry CM, Sharpe GR. Staphylococcal scalded skin syndrome in an adult. Influence of immune and renal factors. *British Journal of Dermatology*. 1995;
- Hatzenbuehler J, Pulling TJ. Diagnosis and management of osteomyelitis. *American Family Physician*. 2011;
- Haupt K, Reuter M, Van Den Elsen J, Burman J, Hälbig S, Richter J, et al. The *Staphylococcus aureus* protein Sbi acts as a complement inhibitor and forms a tripartite complex with host complement factor H and C3b. *PLoS Pathogens*. 2008;

- Haveri M, Hovinen M, Roslöf A, Pyörälä S. Molecular types and genetic profiles of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine intramammary infections and extramammary sites. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008;
- Haveri M, Roslöf A, Rantala L, Pyörälä S. Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. *Journal of Applied Microbiology*. 2007;
- Healy LD, Puy C, Fernández JA, Mitrugno A, Keshari RS, Taku NA, et al. Activated protein C inhibits neutrophil extracellular trap formation in vitro and activation in vivo. *Journal of Biological Chemistry*. 2017;
- Hensler T, König B, Prévost G, Piémont Y, Koller M, König W. Leukotriene B4 generation and DNA fragmentation induced by leukocidin from *Staphylococcus aureus*: Protective role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and G-CSF for human neutrophils. *Infection and Immunity*. 1994;
- Hergott CB, Roche AM, Tamashiro E, Clarke TB, Bailey AG, Laughlin A, et al. Peptidoglycan from the gut microbiota governs the lifespan of circulating phagocytes at homeostasis. *Blood*. 2016;
- Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet*. 1997;
- Hirose T, Hamaguchi S, Matsumoto N, Irisawa T, Seki M, Tasaki O, et al. Presence of neutrophil extracellular traps and citrullinated histone H3 in the bloodstream of critically ill patients. *PLoS ONE*. 2014;
- Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RAB. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*. 1999.
- Holtfreter S, Roschack K, Eichler P, Eske K, Holtfreter B, Kohler C, et al. *Staphylococcus aureus* Carriers Neutralize Superantigens by Antibodies Specific for Their Colonizing Strain: A Potential Explanation for Their Improved Prognosis in Severe Sepsis. *The Journal of Infectious Diseases*. 2006;

- Horsburgh MJ, Wharton SJ, Cox AG, Ingham E, Peacock S, Foster SJ. MntR modulates expression of the PerR regulon and superoxide resistance in *Staphylococcus aureus* through control of manganese uptake. *Molecular Microbiology*. 2002;
- Hu SCS, Yu HS, Yen FL, Lin CL, Chen GS, Lan CCE. Neutrophil extracellular trap formation is increased in psoriasis and induces human β -defensin-2 production in epidermal keratinocytes. *Scientific Reports*. 2016;
- Hua L, Cohen TS, Shi Y, Datta V, Hilliard JJ, Tkaczyk C, et al. MEDI4893* promotes survival and extends the antibiotic treatment window in a *Staphylococcus aureus* immunocompromised pneumonia model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015;
- Huang DC, Hung KD, Chan YK. A computer assisted method for leukocyte nucleus segmentation and recognition in blood smear images. In: *Journal of Systems and Software*. 2012.
- Hule GP, Bargir UA, Kulkarni M, Kambli P, Taur P, Desai M, et al. Does Pioglitazone Lead to Neutrophil Extracellular Traps Formation in Chronic Granulomatous Disease Patients? *Frontiers in immunology*. 2019;
- Inoshima I, Inoshima N, Wilke GA, Powers ME, Frank KM, Wang Y, et al. A *Staphylococcus aureus* pore-forming toxin subverts the activity of ADAM10 to cause lethal infection in mice. *Nature Medicine*. 2011;
- Iwatsuki K, Yamasaki O, Morizane S, Oono T. Staphylococcal cutaneous infections: invasion, evasion and aggression. *Journal of dermatological science*. 2006.
- Jackson MP, Iandolo JJ. Cloning and expression of the exfoliative toxin B gene from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 1986;
- Jacob CO, Yu N, Yoo DG, Perez-Zapata LJ, Barbu EA, Kaplan MJ, et al. Haploinsufficiency of NADPH Oxidase Subunit Neutrophil Cytosolic Factor 2 Is Sufficient to Accelerate Full-Blown Lupus in NZM 2328 Mice. *Arthritis and Rheumatology*. 2017;
- Jaiswal S, Jamieson CHM, Pang WW, Park CY, Chao MP, Majeti R, et al. CD47 Is Upregulated on Circulating Hematopoietic Stem Cells and Leukemia Cells to Avoid Phagocytosis. *Cell*. 2009;

- Janesch P, Rouha H, Weber S, Malafa S, Gross K, Maierhofer B, et al. Selective sensitization of human neutrophils to LukGH mediated cytotoxicity by *Staphylococcus aureus* and IL-8. *Journal of Infection*. 2017;
- Janzon L, Arvidson S. The role of the delta-lysin gene (hld) in the regulation of virulence genes by the accessory gene regulator (agr) in *Staphylococcus aureus*. *The EMBO Journal*. 1990;
- Jarasch ED, Grund C, Bruder G, Heid HW, Keenan TW, Franke WW. Localization of xanthine oxidase in mammary-gland epithelium and capillary endothelium. *Cell*. 1981;25(1):67–82.
- Jensen AG, Espersen F, Skinhøj P, Rosdahl VT, Frimodt-Møller N. *Staphylococcus aureus* Meningitis: A Review of 104 Nationwide, Consecutive Cases. *Archives of Internal Medicine*. 1993;
- Jensen SO, Lyon BR. Genetics of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiology*. 2009;4(5):565–82.
- Jiao J, Dragomir A-C, Kocabayoglu P, Rahman AH, Chow A, Hashimoto D, et al. Central Role of Conventional Dendritic Cells in Regulation of Bone Marrow Release and Survival of Neutrophils. *The Journal of Immunology*. 2014;
- Johnson A. Report on a Case of Staphylococcal Pneumonia with Staphylococcal Septicaemia: Treated with Penicillin. *The Ulster medical journal*. 1944;
- Jones HP, Grisham MB, Bose SK, Shannon VA, Schott A, McCord JM. Effect of allopurinol on neutrophil superoxide production, chemotaxis, or degranulation. *Biochemical Pharmacology*. 1985;34(20):3673–6.
- Jongerijs I, Köhl J, Pandey MK, Ruyken M, Van Kessel KPM, Van Strijp JAG, et al. Staphylococcal complement evasion by various convertase-blocking molecules. *Journal of Experimental Medicine*. 2007;
- Jover E, Tawk MY, Laventie BJ, Poulain B, Prévost G. Staphylococcal leukotoxins trigger free intracellular Ca²⁺ rise in neurones, signalling through acidic stores and activation of store-operated channels. *Cellular Microbiology* [Internet]. 2013 May;15(5):742–58. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/cmi.12069>

- Kallberg C, Ardal C, Blix HS, Klein E, Martinez EM, Lindbæk M, et al. Introduction and geographic availability of new antibiotics approved between 1999 and 2014. PLoS ONE. 2018;
- Kambas K, Mitroulis I, Ritis K. The emerging role of neutrophils in thrombosis-the journey of TF through NETs. *Frontiers in Immunology*. 2012.
- Kaneko J, Kimura T, Kawakami Y, Tomita T, Kamio Y. Pantón–valentíne leukocidin genes in a phage-like particle isolated from mitomycin C-Treated *Staphylococcus aureus* V8 (ATCC 49775). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 1997;
- Kaneko J, Kimura T, Narita S, Tomita T, Kamio Y. Complete nucleotide sequence and molecular characterization of the temperate staphylococcal bacteriophage ϕ PVL carrying Pantón-Valentine leukocidin genes. *Gene*. 1998;
- Kankaanranta H, Moilanen E, Lindberg K, Vapaatalo H. Pharmacological control of human polymorphonuclear leukocyte degranulation by fenamates and inhibitors of receptor-mediated calcium entry and protein kinase C. *Biochemical Pharmacology*. 1995;
- Kaplan CC-R and MJ. Low density granulocytes: a distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity. *Semin Immunopathol*. 2015;
- Karavolos MH, Horsburgh M, Ingham E, Foster SJ. Role and regulation of the superoxide dismutases of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*. 2003;
- Karwinski W, Ulvik R, Farstad M, Svardal A, Berge R, Soreide O. Effect of allopurinol on the concentration of endogenous glutathione in hepatocytes after an hour of normothermic liver ischemia. *European Journal of Surgery, Acta Chirurgica*. 1993;159(6–7):355–9.
- Kenny EF, Herzig A, Krüger R, Muth A, Mondal S, Thompson PR, et al. Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *eLife* [Internet]. 2017 Jun 2;6. Available from: <https://elifesciences.org/articles/24437>
- Kent B. Crossley MD, Kimberly K. Jefferson PHD, Gordon L. Archer MD, Vance G. Fowler JR MD M. *Staphylococci in Human Disease* [Internet]. Crossley KB, Jefferson KK, Archer GL, Fowler VG, editors. *Staphylococci in Human Disease*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2009. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781444308464>

- Keshav S, Chung P, Milon G, Gordon S. Lysozyme is an inducible marker of macrophage activation in murine tissues as demonstrated by in situ hybridization. *Journal of Experimental Medicine*. 1991;
- Keskinov AA, Shurin MR. Myeloid regulatory cells in tumor spreading and metastasis [Internet]. Vol. 220, *Immunobiology*. Elsevier GmbH; 2015 [cited 2020 Jul 30]. p. 236–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25178934/>
- Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönermarck U, Back W, Gross WL, Werb Z, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nature Medicine*. 2009;
- Kienhöfer D, Hahn J, Stoof J, Csepregi JZ, Reinwald C, Urbonaviciute V, et al. Experimental lupus is aggravated in mouse strains with impaired induction of neutrophil extracellular traps. *JCI insight*. 2017;
- Kirchner T, Mller S, Klinger M, Solbach W, Laskay T, Behnen M. The impact of various reactive oxygen species on the formation of neutrophil extracellular traps. *Mediators of Inflammation*. 2012;2012.
- Knox R. A New Penicillin (BRL 1241) Active Against Penicillin-Resistant Staphylococci. *British Medical Journal*. 1960;
- Von Köckritz-Blickwede M, Goldmann O, Thulin P, Heinemann K, Norrby-Teglund A, Rohde M, et al. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. *Blood*. 2008;
- Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*. 2013.
- König B, Koller M, Prévost G, Piémont Y, Alouf JE, Schreiner A, et al. Activation of human effector cells by different bacterial toxins (leukocidin, alveolysin, and erythrogenic toxin A): Generation of interleukin-8. *Infection and Immunity*. 1994;
- König B, Prévost G, König W. Composition of staphylococcal bi-component toxins determines pathophysiological reactions. *Journal of Medical Microbiology*. 1997;
- König B, Prévost G, Piémont Y, König W. Effects of *Staphylococcus aureus* leukocidins on inflammatory mediator release from human granulocytes. *Journal of Infectious Diseases*.

1995;171(3):607–13.

Konig MF, Abusleme L, Reinholdt J, Palmer RJ, Teles RP, Sampson K, et al. Aggregatibacter actinomycetemcomitans-induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis. Science Translational Medicine [Internet]. 2016 Dec 14;8(369):369ra176-369ra176. Available from: <http://stm.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/scitranslmed.aaj1921>

Konig MF, Andrade F. A critical reappraisal of neutrophil extracellular traps and NETosis mimics based on differential requirements for protein citrullination. Frontiers in Immunology [Internet]. 2016 Nov 4;7(NOV). Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2016.00461/full>

Koop G, Vrieling M, Storisteanu DML, Lok LSC, Monie T, Van Wigcheren G, et al. Identification of LukPQ, a novel, equid-adapted leukocidin of *Staphylococcus aureus*. Scientific Reports. 2017;

Laarman A, Milder F, Van Strijp J, Rooijackers S. Complement inhibition by gram-positive pathogens: Molecular mechanisms and therapeutic implications. Journal of Molecular Medicine. 2010.

Labruère R, Sona AJ, Turos E. Anti–Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Nanoantibiotics. Frontiers in Pharmacology. 2019;

Ladhani S. Recent developments in staphylococcal scalded skin syndrome. Clinical Microbiology and Infection. 2001.

Lambert AJ, Buckingham JA, Boysen HM, Brand MD. Diphenyleneiodonium acutely inhibits reactive oxygen species production by mitochondrial complex I during reverse, but not forward electron transport. Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics. 2008;1777(5):397–403.

Laurindo FRM. Redox Cellular Signaling Pathways in Endothelial Dysfunction and Vascular Disease [Internet]. Endothelium and Cardiovascular Diseases: Vascular Biology and Clinical Syndromes. Elsevier Inc.; 2018. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-812348-5.00010-6>

- Lee CY, Schmidt JJ, Johnson-Winegar AD, Spero L, Iandolo JJ. Sequence determination and comparison of the exfoliative toxin A and toxin B genes from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 1987;
- Lee WY, Lee SM. Synergistic protective effect of ischemic preconditioning and allopurinol on ischemia/reperfusion injury in rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006;349(3):1087–93.
- Legeay G, Poncin-Epaillard F, Arciola CR. New surfaces with hydrophilic/hydrophobic characteristics in relations to (no)bioadhesion. *International Journal of Artificial Organs*. 2006;
- Lehman SM, Mearns G, Rankin D, Cole RA, Smrekar F, Branston SD, et al. Design and preclinical development of a phage product for the treatment of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Viruses*. 2019;
- Leppkes M, Maueröder C, Hirth S, Nowecki S, Günther C, Billmeier U, et al. Externalized decondensed neutrophil chromatin occludes pancreatic ducts and drives pancreatitis. *Nature Communications*. 2016;
- Levi M. Management of cancer-associated disseminated intravascular coagulation. *Thrombosis Research*. 2016;
- Levine DP, Fromm BS, Reddy BR. Slow response to vancomycin or vancomycin plus rifampin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis. *Annals of Internal Medicine*. 1991;
- Li G, Wu S, Luo W, Su Y, Luan Y, Wang X. *Staphylococcus aureus* ST6-t701 isolates from food-poisoning outbreaks (2006-2013) in Xi'an, China. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2015;
- Li P, Li M, Lindberg MR, Kennett MJ, Xiong N, Wang Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *Journal of Experimental Medicine*. 2010;207(9):1853–62.
- Lin AM, Rubin CJ, Khandpur R, Wang JY, Riblett M, Yalavarthi S, et al. Mast Cells and Neutrophils Release IL-17 through Extracellular Trap Formation in Psoriasis. *The Journal*

- of Immunology [Internet]. 2011 Jul 1 [cited 2020 Jul 31];187(1):490–500. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21606249/>
- Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter M-O, Gauduchon V, et al. Involvement of Pantone-Valentine Leukocidin--Producing *Staphylococcus aureus* in Primary Skin Infections and Pneumonia. *Clinical Infectious Diseases*. 1999;
- Lina G, Vandenesch F, Etienne J, Lyon U, National C, Référence D, et al. A brief history of *Staphylococcus aureus* Pantone Valentine leukocidin. Director. 1895;
- Liu GY, Essex A, Buchanan JT, Datta V, Hoffman HM, Bastian JF, et al. *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *Journal of Experimental Medicine*. 2005;
- Lood C, Blanco LP, Purmalek MM, Carmona-Rivera C, De Ravin SS, Smith CK, et al. Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. *Nature Medicine* [Internet]. 2016;22(2):146–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.4027>
- Low DKR, Freer JH, Arbuthnott JP, Möllby R, Wadström T. Consequences of sphingomyelin degradation in erythrocyte ghost membranes by staphylococcal β -toxin (sphingomyelinase C). *Toxicon*. 1974;
- Lowy FD. *Staphylococcus aureus* Infections . *New England Journal of Medicine*. 1998;
- Luo Y, Arita K, Bhatia M, Knuckley B, Lee YH, Stallcup MR, et al. Inhibitors and inactivators of protein arginine deiminase 4: Functional and structural characterization. *Biochemistry*. 2006;
- Maicas N, Ferrándiz ML, Brines R, Ibáñez L, Cuadrado A, Koenders MI, et al. Deficiency of Nrf2 accelerates the effector phase of arthritis and aggravates joint disease. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2011;
- Malachowa N, DeLeo FR. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2010.
- Malachowa N, DeLeo FR. *Staphylococcus aureus* survival in human blood. *Virulence*. 2011;

- Malachowa N, Kobayashi SD, Freedman B, Dorward DW, DeLeo FR. *Staphylococcus aureus* Leukotoxin GH Promotes Formation of Neutrophil Extracellular Traps . The Journal of Immunology. 2013;
- Malachowa N, Whitney AR, Kobayashi SD, Sturdevant DE, Kennedy AD, Braughton KR, et al. Global changes in *Staphylococcus aureus* gene expression in human blood. PLoS ONE. 2011;
- Malech HL, DeLeo FR, Quinn MT. The Role of Neutrophils in the Immune System: An Overview. Methods in molecular biology (Clifton, NJ). 2020;
- Mariutti RB, Tartaglia NR, Seyffert N, Castro TL de P, Arni RK, Azevedo VA, et al. Exfoliative Toxins of *Staphylococcus aureus*. In: The Rise of Virulence and Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. 2017.
- Martin C, Burdon PCE, Bridger G, Gutierrez-Ramos JC, Williams TJ, Rankin SM. Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. Immunity. 2003;
- Masschalck B, Michiels CW. Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria. Critical Reviews in Microbiology. 2003.
- Maueröder C, Mahajan A, Paulus S, Gößwein S, Hahn J, Kienhöfer D, et al. Ménage-à-trois: The ratio of bicarbonate to CO₂ and the pH regulate the capacity of neutrophils to form NETs. Frontiers in Immunology. 2016;
- Mazor R, Shurtz-Swirski R, Farah R, Kristal B, Shapiro G, Dorlechter F, et al. Primed polymorphonuclear leukocytes constitute a possible link between inflammation and oxidative stress in hyperlipidemic patients. Atherosclerosis [Internet]. 2008 Apr [cited 2020 Jul 30];197(2):937–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17869258/>
- McCarthy AJ, Witney AA, Lindsay JA. *Staphylococcus aureus* temperate bacteriophage: carriage and horizontal gene transfer is lineage associated. Frontiers in cellular and infection microbiology. 2012;
- McCormick JK, Yarwood JM, Schlievert PM. Toxic Shock Syndrome and Bacterial Superantigens: An Update. Annual Review of Microbiology. 2001;

- McGuinness WA, Malachowa N, DeLeo FR. Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. Yale Journal of Biology and Medicine. 2017.
- Medzhitov R, Janeway C. J. Advances in immunology: Innate immunity. New England Journal of Medicine. 2000.
- Melehani JH, James DBA, DuMont AL, Torres VJ, Duncan JA. *Staphylococcus aureus* Leukocidin A/B (LukAB) Kills Human Monocytes via Host NLRP3 and ASC when Extracellular, but Not Intracellular. PLoS Pathogens. 2015;
- Mendoza Bertelli A, Delpino MV, Lattar S, Gai C, Llana MN, Sanjuan N, et al. *Staphylococcus aureus* protein A enhances osteoclastogenesis via TNFR1 and EGFR signaling. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease. 2016;
- Menestrina G, Dalla Serra M, Comai M, Coraiola M, Viero G, Werner S, et al. Ion channels and bacterial infection: The case of β -barrel pore-forming protein toxins of *Staphylococcus aureus*. In: FEBS Letters. 2003. p. 54–60.
- Metzler KD, Goosmann C, Lubojemska A, Zychlinsky A, Papayannopoulos V. Myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. Cell Reports. 2014;
- Młynarczyk A, Młynarczyk G, Jeljaszewicz J. The genome of *Staphylococcus aureus*: A review. Zentralblatt für Bakteriologie. 1998;
- Mohan S, Horibata S, McElwee JL, Dannenberg AJ, Coonrod SA. Identification of macrophage extracellular trap-like structures in mammary gland adipose tissue: A preliminary study. Frontiers in Immunology. 2013;
- Molina-Manso D, Del Prado G, Ortiz-Pérez A, Manrubia-Cobo M, Gómez-Barrena E, Cordero-Ampuero J, et al. In vitro susceptibility to antibiotics of staphylococci in biofilms isolated from orthopaedic infections. International Journal of Antimicrobial Agents. 2013;
- Monecke S, Müller E, Büchler J, Stieber B, Ehrlich R. *Staphylococcus aureus* in vitro secretion of alpha toxin (hla) correlates with the affiliation to clonal complexes. PLoS ONE. 2014;
- Moore GE, Gerner RE, Franklin HA. Culture of Normal Human Leukocytes. JAMA: The Journal of the American Medical Association. 1967;

- Moran GJ, Krishnadasan A, Gorwitz RJ, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB, et al. Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department. *New England Journal of Medicine*. 2006;
- Morikawa K, Inose Y, Okamura H, Maruyama A, Hayashi H, Takeyasu K, et al. A new staphylococcal sigma factor in the conserved gene cassette: Functional significance and implication for the evolutionary processes. *Genes to Cells*. 2003;
- Morinaga N, Kaihou Y, Noda M. Purification, cloning and characterization of variant LukE-LukD with strong leukocidal activity of Staphylococcal Bi-component leukotoxin family. *Microbiology and Immunology*. 2003;
- Morisaki T, Goya T, Ishimitsu T, Torisu M. The increase of low density subpopulations and CD10 (CALLA) negative neutrophils in severely infected patients. *Surgery Today* [Internet]. 1992 Jul [cited 2020 Jul 31];22(4):322–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1392343/>
- Mortaz E, Sarhifynia S, Marjani M, Moniri A, Mansouri D, Mehrian P, et al. An adult autosomal recessive chronic granulomatous disease patient with pulmonary *Aspergillus terreus* infection. *BMC Infectious Diseases*. 2018;
- Murphy K, Weaver C. Janeway's Immunobiology. 9th Edition. Garland Science. 2017.
- Nadji G, Rémati JP, Coviaux F, Mirode AA, Brahim A, Enriquez-Sarano M, et al. Comparison of clinical and morphological characteristics of *Staphylococcus aureus* endocarditis with endocarditis caused by other pathogens. *Heart*. 2005;
- Nagaraj S, Schrum AG, Cho H-I, Celis E, Gabrilovich DI. Mechanism of T Cell Tolerance Induced by Myeloid-Derived Suppressor Cells. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2010 Mar 15 [cited 2020 Jul 30];184(6):3106–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20142361/>
- Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K, Borchardt SM, Boxrud DJ, Etienne J, et al. Comparison of Community- and Health Care - Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Journal of the American Medical Association*. 2003;
- Nauseef WM, Borregaard N. Neutrophils at work. *Nature Immunology*. 2014.

- Neeli I, Khan SN, Radic M. Histone Deimination As a Response to Inflammatory Stimuli in Neutrophils. *The Journal of Immunology*. 2008;
- Neeli I, Radic M. Opposition between PKC isoforms regulates histone deimination and neutrophil extracellular chromatin release. *Frontiers in Immunology*. 2013;4(FRB):1–9.
- Neumann A, Brogden G, Jerjomiceva N, Brodesser S, Naim HY, Von Köckritz-Blickwede M. Lipid alterations in human blood-derived neutrophils lead to formation of neutrophil extracellular traps. *European Journal of Cell Biology*. 2014;
- Newsom SWB. Ogston's coccus. *Journal of Hospital Infection* [Internet]. 2008;70(4):369–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2008.10.001>
- Niles JL, McCluskey RT, Ahmad MF, Arnaout MA. Wegener's granulomatosis autoantigen is a novel neutrophil serine proteinase. *Blood*. 1989;
- Nilsson IM, Hartford O, Foster T, Tarkowski A. Alpha-toxin and gamma-toxin jointly promote *Staphylococcus aureus* virulence in murine septic arthritis. *Infection and Immunity*. 1999;
- Nilsson IM, Lee JC, Bremell T, Rydén C, Tarkowski A. The role of staphylococcal polysaccharide microcapsule expression in septicemia and septic arthritis. *Infection and Immunity*. 1997;
- Nishifuji K, Sugai M, Amagai M. Staphylococcal exfoliative toxins: “Molecular scissors” of bacteria that attack the cutaneous defense barrier in mammals. *Journal of Dermatological Science*. 2008.
- Norvick RP, Jiang D. The staphylococcal saeRS system coordinates environmental signals agr quorum sensing. *Microbiology*. 2003;
- Notes E. Toxic-Shock Syndrome - United States. Vol. 46, Morbidity and Mortality Weekly Report. 1997.
- Nourshargh S, Renshaw SA, Imhof BA. Reverse Migration of Neutrophils: Where, When, How, and Why? *Trends in Immunology* [Internet]. 2016;37(5):273–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2016.03.006>
- Novick RP. Mobile genetic elements and bacterial toxins: The superantigen-encoding

- pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. Plasmid. 2003.
- Novick RP, Projan SJ, Kornblum J, Ross HF, Ji G, Kreiswirth B, et al. The agr P2 operon: An autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. MGG Molecular & General Genetics. 1995;
- Novick RP, Ross HF, Projan SJ, Kornblum J, Kreiswirth B, Moghazeh S. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. The EMBO Journal. 1993;
- O'Sullivan KM, Lo CY, Summers SA, Elgass KD, McMillan PJ, Longano A, et al. Renal participation of myeloperoxidase in antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated glomerulonephritis. Kidney International. 2015;
- O'Toole PW, Foster TJ. Molecular cloning and expression of the epidermolytic toxin A gene of *Staphylococcus aureus*. Microbial Pathogenesis. 1986;
- Ogawa H, Miyazaki H, Kimura M. Isolation and characterization of human skin lysozyme. The Journal of investigative dermatology. 1971;
- Ogston A. "On Abscesses." Clinical Infectious Diseases. 1984;
- Ohlsen K, Lorenz U. Immunotherapeutic strategies to combat staphylococcal infections. International Journal of Medical Microbiology. 2010.
- Oliveira D, Borges A, Simões M. *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infectious diseases. Toxins. 2018.
- Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. Bone regenerative medicine: Classic options, novel strategies, and future directions. Journal of Orthopaedic Surgery and Research. 2014.
- Otagiri M, Giam Chuang VT, Immunobiology, Murphy K, Weaver C. Janeway ' S 9 Th Edition. America. 2017.
- Pang L, Hayes CP, Buac K, Yoo D, Rada B. Pseudogout-Associated Inflammatory Calcium Pyrophosphate Dihydrate Microcrystals Induce Formation of Neutrophil Extracellular Traps. The Journal of Immunology. 2013;
- Panton PN, Valentine FCO. STAPHYLOCOCCAL TOXIN. The Lancet [Internet]. 1932

Mar;219(5662):506–8. Available from:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673601244687>

Park J, Wysocki RW, Amoozgar Z, Maiorino L, Fein MR, Jorns J, et al. Cancer cells induce metastasis-supporting neutrophil extracellular DNA traps. *Science Translational Medicine*. 2016;

Park SY, Shrestha S, Youn YJ, Kim JK, Kim SY, Kim HJ, et al. Autophagy primes neutrophils for neutrophil extracellular trap formation during sepsis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2017;

Parker H, Dragunow M, Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. *Journal of Leukocyte Biology*. 2012;92(4):841–9.

Pasteur L. De l'extension de la théorie des germes à l'étiologie de quelques maladies communes. (I. «Sur les furoncles. II. «Sur l'ostéomyélite. III. «Sur la fièvre puerpérale.). *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences*. 1880.

PATTI, JM; ALLEN, BL; MCGAVIN M et al. MSCRAMM-Mediated Adherence of Microorganisms to Host Tissues. *Annual Review of Microbiology*. 1994;

Payne AB, Link-Gelles R, Azonobi I, Hooper WC, Beall BW, Jorgensen JH, et al. Invasive pneumococcal disease among children with and without sickle cell disease in the United States, 1998 to 2009. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 2013;

PC G, C C-R, L X, N L, Z G, AL A, et al. Neutrophil-related gene expression and low-density granulocytes associated with disease activity and response to treatment in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis and Rheumatology* [Internet]. 2015 [cited 2020 Jul 31];67(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25891759/>

Peranzoni E, Zilio S, Marigo I, Dolcetti L, Zanovello P, Mandruzzato S, et al. Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition. *Current Opinion in Immunology*. 2010.

Perret M, Badiou C, Lina G, Burbaud S, Benito Y, Bes M, et al. Cross-talk between *Staphylococcus aureus* leukocidins-intoxicated macrophages and lung epithelial cells

- triggers chemokine secretion in an inflammasome-dependent manner. *Cellular Microbiology*. 2012;
- Peschel A, Otto M. Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. *Nature Reviews Microbiology*. 2013.
- Pichereau S, Moran JJM, Hayney MS, Shukla SK, Sakoulas G, Rose WE. Concentration-dependent effects of antimicrobials on *Staphylococcus aureus* toxin-mediated cytokine production from peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2012;
- Pillay J, Den Braber I, Vrisekoop N, Kwast LM, De Boer RJ, Borghans JAM, et al. In vivo labeling with $^2\text{H}_2\text{O}$ reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*. 2010;
- Pilsczek FH, Salina D, Poon KKH, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, et al. A Novel Mechanism of Rapid Nuclear Neutrophil Extracellular Trap Formation in Response to *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Immunology*. 2010;185(12):7413–25.
- Pintado V, Pazos R, Jiménez-Mejías ME, Rodríguez-Guardado A, Díaz-Pollán B, Cabellos C, et al. *Staphylococcus aureus* meningitis in adults: A comparative cohort study of infections caused by meticillin-resistant and meticillin-susceptible strains. *Journal of Hospital Infection*. 2019;
- Popov L, Kovalski J, Grandi G, Bagnoli F, Amieva MR. Three-dimensional human skin models to understand *Staphylococcus aureus* skin colonization and infection. *Frontiers in Immunology*. 2014;
- Popov LM, Marceau CD, Starkl PM, Lumb JH, Shah J, Guerrero D, et al. The adherens junctions control susceptibility to *Staphylococcus aureus* α -toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;
- Postma B, Poppelier MJ, van Galen JC, Prossnitz ER, van Strijp JAG, de Haas CJC, et al. Chemotaxis Inhibitory Protein of *Staphylococcus aureus* Binds Specifically to the C5a and Formylated Peptide Receptor. *The Journal of Immunology*. 2004;
- Prévost G, Bouakham T, Piémont Y, Monteil H. Characterisation of a synergohymenotropic toxin produced by *Staphylococcus intermedius*. *FEBS Letters* [Internet]. 1995a Dec

4;376(3):135–40. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1016/0014-5793%2895%2901260-9>

Prévost G, Couppié P, Prévost P, Gayet S, Petiau P, Cribier B, et al. Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins. *Journal of Medical Microbiology*. 1995;

Prévost G, Cribier B, Couppié P, Petiau P, Supersac G, Finck-Barbancon V, et al. Pantovallentine leucocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infection and Immunity*. 1995b;63(10):4121–9.

Prince A, Wang H, Kitur K, Parker D. Humanized mice exhibit increased susceptibility to *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Journal of Infectious Diseases*. 2017;

Raber PL, Thevenot P, Sierra R, Wyczzechowska D, Halle D, Ramirez ME, et al. Subpopulations of myeloid-derived suppressor cells impair T cell responses through independent nitric oxide-related pathways. *International Journal of Cancer* [Internet]. 2014 Jun 15 [cited 2020 Jul 30];134(12):2853–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24259296/>

Rainard P, Corrales JC, Barrio MB, Cochard T, Poutrel B. Leucotoxic activities of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows, ewes, and goats with mastitis: Importance of LukM/LukF'-PV leukotoxin. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2003;

Ramos MV, Mejias MP, Sabbione F, Fernandez-Brando RJ, Santiago AP, Amaral MM, et al. Induction of Neutrophil Extracellular Traps in Shiga Toxin-Associated Hemolytic Uremic Syndrome. *Journal of Innate Immunity*. 2016;

Rasigade JP, Trouillet-Assant S, Ferry T, Diep BA, Sapin A, Lhoste Y, et al. PSMs of Hypervirulent *Staphylococcus aureus* Act as Intracellular Toxins That Kill Infected Osteoblasts. *PLoS ONE*. 2013;

Rathkey JK, Zhao J, Liu Z, Chen Y, Yang J, Kondolf HC, et al. Chemical disruption of the pyroptotic pore-forming protein gasdermin D inhibits inflammatory cell death and sepsis. *Science Immunology*. 2018;

- Rellahan BL, Jones LA, Kruisbeek AM, Fry AM, Matis LA. In vivo induction of anergy in peripheral $\nu\beta 8^+$ T cells by staphylococcal enterotoxin B. *Journal of Experimental Medicine*. 1990;
- Remijsen Q, Berghe T Vanden, Wirawan E, Asselbergh B, Parthoens E, De Rycke R, et al. Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Research* [Internet]. 2011;21(2):290–304. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2010.150>
- Reyes-Robles T, Alonzo F, Kozhaya L, Lacy DB, Unutmaz D, Torres VJ. *Staphylococcus aureus* Leukotoxin ED targets the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 to Kill leukocytes and promote infection. *Cell Host and Microbe*. 2013;
- Ribon M, Seninet S, Mussard J, Sebbag M, Clavel C, Serre G, et al. Neutrophil extracellular traps exert both pro- and anti-inflammatory actions in rheumatoid arthritis that are modulated by C1q and LL-37. *Journal of Autoimmunity*. 2019;
- Rizk A, Paul G, Incardona P, Bugarski M, Mansouri M, Niemann A, et al. Segmentation and quantification of subcellular structures in fluorescence microscopy images using Squash. *Nature Protocols*. 2014;
- Robb CT, Dyrinda EA, Gray RD, Rossi AG, Smith VJ. Invertebrate extracellular phagocyte traps show that chromatin is an ancient defence weapon. *Nature Communications*. 2014;
- Roberts H, White P, Dias I, McKaig S, Veeramachaneni R, Thakker N, et al. Characterization of neutrophil function in Papillon-Lefèvre syndrome. *Journal of Leukocyte Biology*. 2016;
- Rocha BC, Marques PE, Leoratti FM de S, Junqueira C, Pereira DB, Antonelli LR do V, et al. Type I Interferon Transcriptional Signature in Neutrophils and Low-Density Granulocytes Are Associated with Tissue Damage in Malaria. *Cell Reports* [Internet]. 2015 Dec 29 [cited 2020 Jul 31];13(12):2829–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26711347/>
- Romero V, Fert-Bober J, Nigrovic PA, Darrah E, Haque UJ, Lee DM, et al. Immune-mediated pore-forming pathways induce cellular hypercitrullination and generate citrullinated autoantigens in rheumatoid arthritis. *Science Translational Medicine*. 2013;5(209).

- Røoder BL, Wandall DA, Espersen F, Frimodt-Møller N, Skinhøj P, Rosdahl VT. Neurologic manifestations in *Staphylococcus aureus* endocarditis: A review of 260 bacteremic cases in nondrug addicts. *American Journal of Medicine*. 1997;
- Rooijackers SHM, Milder FJ, Bardoel BW, Ruyken M, van Strijp JAG, Gros P. Staphylococcal Complement Inhibitor: Structure and Active Sites. *The Journal of Immunology*. 2007;
- Rooijackers SHM, Van Wamel WJB, Ruyken M, Van Kessel KPM, Van Strijp JAG. Anti-opsonic properties of staphylokinase. *Microbes and Infection*. 2005;
- Rosales C. Neutrophil: A cell with many roles in inflammation or several cell types? *Frontiers in Physiology*. 2018;9(FEB):1–17.
- Rose F, Dahlem G, Guthmann B, Grimminger F, Maus U, Hänze J, et al. Mediator generation and signaling events in alveolar epithelial cells attacked by *S. aureus* α -toxin. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2002;
- Rouch DA, Byrne ME, Kong YC, Skurray RA. The *aacA-aphD* gentamicin and kanamycin resistance determinant of Tn4001 from *Staphylococcus aureus*: Expression and nucleotide sequence analysis. *Journal of General Microbiology*. 1987;
- Rouch DA, Messerotti LJ, Loo LSL, Jackson CA, Skurray RA. Trimethoprim resistance transposon Tn4003 from *Staphylococcus aureus* encodes genes for a dihydrofolate reductase and thymidylate synthetase flanked by three copies of IS257. *Molecular Microbiology*. 1989;
- Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, Lochnit G, Barreto G, Galuska SP, et al. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: A predominant role of histones. *PLoS ONE*. 2012;
- Sagiv JY, Michaeli J, Assi S, Mishalian I, Kisos H, Levy L, et al. Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer. *Cell Reports*. 2015;
- Sagiv JY, Voels S, Granot Z. Isolation and characterization of low- vs. High-density neutrophils in cancer. In: *Methods in Molecular Biology* [Internet]. Humana Press Inc.; 2016 [cited 2020 Jul 30]. p. 179–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27581022/>

- Samouilov A, Li H, L. Zweier J. Nitrite as NO donor in cells and tissues. In: Radicals for Life: The Various Forms of Nitric Oxide. 2007. p. 313–36.
- Sato H, Matsumori Y, Tanabe T, Saito H, Shimizu A, Kawano J. A new type of staphylococcal exfoliative toxin from a *Staphylococcus aureus* strain isolated from a horse with phlegmon. Infection and Immunity. 1994;
- Scapini P, Cassatella MA. Social networking of human neutrophils within the immune system. Blood. 2014.
- Schauer C, Janko C, Munoz LE, Zhao Y, Kienhöfer D, Frey B, et al. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. Nature Medicine. 2014;
- Scherr TD, Hanke ML, Huang O, James DBA, Horswill AR, Bayles KW, et al. *Staphylococcus aureus* biofilms induce macrophage dysfunction through leukocidin AB and alpha-toxin. mBio. 2015;
- Schmidt H, Bastholt L, Geertsen P, Christensen IJ, Larsen S, Gehl J, et al. Elevated neutrophil and monocyte counts in peripheral blood are associated with poor survival in patients with metastatic melanoma: A prognostic model. British Journal of Cancer. 2005;
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nature Methods. 2012.
- Schröder JM, Harder J. Peptides antimicrobiens naturels cutanés. Medecine/Sciences. 2006.
- Sebbag M, Chapuy-Regaud S, Auger I, Petit-Texeira E, Clavel C, Nogueira L, et al. Clinical and pathophysiological significance of the autoimmune response to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. In: Joint Bone Spine. 2004.
- Seilie ES, Bubeck Wardenburg J. *Staphylococcus aureus* pore-forming toxins: The interface of pathogen and host complexity. Seminars in Cell and Developmental Biology. 2017.
- Shan Q, Dwyer M, Rahman S, Gadjeva M. Distinct susceptibilities of corneal *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates to neutrophil extracellular trap-mediated immunity. Infection and Immunity. 2014;

- Shands KN, Schmid GP, Dan BB, Blum D, Guidotti RJ, Hargrett NT, et al. Toxic-Shock Syndrome in Menstruating Women: Association with Tampon Use and *Staphylococcus aureus* and Clinical Features in 52 Cases. *New England Journal of Medicine*. 1980;
- Sharma P, Azebi S, England P, Christensen T, Møller-Larsen A, Petersen T, et al. Citrullination of Histone H3 Interferes with HP1-Mediated Transcriptional Repression. *PLoS Genetics*. 2012;
- Shirliff ME, Mader JT. Acute septic arthritis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002.
- Shishikura K, Horiuchi T, Sakata N, Trinh DA, Shirakawa R, Kimura T, et al. Prostaglandin E2 inhibits neutrophil extracellular trap formation through production of cyclic AMP. *British Journal of Pharmacology*. 2016;
- Shukla SK, Karow ME, Brady JM, Stemper ME, Kislow J, Moore N, et al. Virulence genes and genotypic associations in nasal carriage, community-associated methicillin-susceptible and methicillin-resistant USA400 *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010;
- Sieprawska-Lupa M, Mydel P, Krawczyk K, Wójcik K, Puklo M, Lupa B, et al. Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004;
- Silversides JA, Lappin E, Ferguson AJ. Staphylococcal toxic shock syndrome: Mechanisms and management. *Current Infectious Disease Reports*. 2010.
- Silvestre-Roig C, Hidalgo A, Soehnlein O. Neutrophil heterogeneity: Implications for homeostasis and pathogenesis. *Blood*. 2016.
- Simon D, Hoesli S, Roth N, Staedler S, Yousefi S, Simon HU. Eosinophil extracellular DNA traps in skin diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2011;
- Singh VK, Moskovitz J. Multiple methionine sulfoxide reductase genes in *Staphylococcus aureus*: Expression of activity and roles in tolerance of oxidative stress. *Microbiology*. 2003;
- Sionov RV, Fridlender ZG, Granot Z, R.V. S, Z.G. F, Z. G. The Multifaceted Roles Neutrophils Play in the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenvironment* [Internet].

2014 Dec 1 [cited 2020 Jul 30];8(3):125–58. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24895166/>

- Siqueira JA, Speeg-Schatz C, Freitas FIS, Sahel J, Monteil H, Prévost G. Channel-forming leucotoxins from *Staphylococcus aureus* cause severe inflammatory reactions in a rabbit eye model. *Journal of Medical Microbiology*. 1997;
- Slade DJ, Horibata S, Coonrod SA, Thompson PR. A novel role for protein arginine deiminase 4 in pluripotency: The emerging role of citrullinated histone H1 in cellular programming. *BioEssays*. 2014;
- Snaebjarnardóttir K, Erlendsdóttir H, Reynisson IK, Kristinsson K, Halldórsdóttir S, Hardardóttir H, et al. Bacterial meningitis in children in Iceland, 1975-2010: A nationwide epidemiological study. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 2013;
- Solito S, Pinton L, Mandruzzato S. In Brief: Myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Journal of Pathology* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2020 Jul 31];242(1):7–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28097660/>
- Sollberger G, Amulic B, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular trap formation is independent of de novo gene expression. *PLoS ONE*. 2016;
- Sollberger G, Choidas A, Burn GL, Habenberger P, Lucrezia R Di, Kordes S, et al. Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps. *Science Immunology*. 2018a;.
- Sollberger G, Tilley DO, Zychlinsky A. Neutrophil Extracellular Traps: The Biology of Chromatin Externalization. *Developmental Cell*. 2018b.
- Sonawane S, Khanolkar V, Namavari A, Chaudhary S, Gandhi S, Tibrewal S, et al. Ocular surface extracellular DNA and nuclease activity imbalance: A new paradigm for inflammation in dry eye disease. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2012;
- de Souza CN, Breda LCD, Khan MA, de Almeida SR, Câmara NOS, Sweezey N, et al. Alkaline pH promotes NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation: A matter of mitochondrial reactive oxygen species generation and citrullination and cleavage of histone. *Frontiers in Immunology*. 2018;8(JAN).

- Spaan AN, Henry T, Van Rooijen WJM, Perret M, Badiou C, Aerts PC, et al. The staphylococcal toxin panton-valentine leukocidin targets human C5a receptors. *Cell Host and Microbe*. 2013;13(5):584–94.
- Spaan AN, Reyes-Robles T, Badiou C, Cochet S, Boguslawski KM, Yoong P, et al. *Staphylococcus aureus* Targets the Duffy Antigen Receptor for Chemokines (DARC) to Lyse Erythrocytes. *Cell Host and Microbe*. 2015a;.
- Spaan AN, Schiepers A, de Haas CJC, van Hooijdonk DDJJ, Badiou C, Contamin H, et al. Differential Interaction of the Staphylococcal Toxins Panton–Valentine Leukocidin and γ -Hemolysin CB with Human C5a Receptors. *The Journal of Immunology*. 2015b;.
- Spaan AN, Van Strijp JAG, Torres VJ. Leukocidins: Staphylococcal bi-component pore-forming toxins find their receptors. *Nature Reviews Microbiology* [Internet]. 2017;15(7):435–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2017.27>
- Spaan AN, Vrieling M, Wallet P, Badiou C, Reyes-Robles T, Ohneck EA, et al. The staphylococcal toxins γ -haemolysin AB and CB differentially target phagocytes by employing specific chemokine receptors. *Nature Communications*. 2014;5.
- Spaulding AR, Salgado-Pabón W, Kohler PL, Horswill AR, Leung DYM, Schlievert PM. Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*. 2013;
- Ssemaganda A, Kindinger L, Bergin P, Nielsen L, Mpendo J, Ssetaala A, et al. Characterization of neutrophil subsets in healthy human pregnancies. *PLoS ONE* [Internet]. 2014 Feb 13 [cited 2020 Jul 31];9(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24551035/>
- Staali L, Monteil H, Colin DA. The staphylococcal pore-forming leukotoxins open Ca^{2+} channels in the membrane of human polymorphonuclear neutrophils. *Journal of Membrane Biology*. 1998;
- Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in Immunology*. 2010.
- Supersac G, Piémont Y, Kubina M, Prévost G, Foster TJ. Assessment of the role of gamma-toxin in experimental endophthalmitis using a hlg-deficient mutant of *Staphylococcus*

- aureus*. Microbial Pathogenesis. 1998;
- Surewaard BGJ, De Haas CJC, Vervoort F, Rigby KM, Deleo FR, Otto M, et al. Staphylococcal alpha-phenol soluble modulins contribute to neutrophil lysis after phagocytosis. Cellular Microbiology. 2013;
- Suttorp N, Seeger W, Dewein E, Bhakdi S, Roka L. Staphylococcal alpha-toxin-induced PGI₂ production in endothelial cells: role of calcium. The American journal of physiology. 1985;
- Suzuki K, Namiki H. Phorbol 12-myristate 13-acetate induced cell death of porcine peripheral blood polymorphonuclear leucocytes. Cell Structure and Function. 1998;
- Szewczyk A, Jarmuszkiewicz W, Kunz WS. Mitochondrial potassium channels. IUBMB Life. 2009.
- Szmigielski S, Sobiczewska E, Prévost G, Monteil H, Colin DA, Jeljaszewicz J. Effect of purified staphylococcal leukocidal toxins on isolated blood polymorphonuclear leukocytes and peritoneal macrophages in vitro. Zentralblatt für Bakteriologie. 1998;
- Tak T, Tesselaar K, Pillay J, Borghans JAM, Koenderman L. What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited. Journal of Leukocyte Biology. 2013;
- Takahara H, Oikawa Y, Sugawara K. Purification and characterization of peptidylarginine deiminase from rabbit skeletal muscle. Journal of Biochemistry. 1983;
- Takei H, Araki A, Watanabe H, Ichinose A, Sendo F. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. Journal of Leukocyte Biology. 1996;
- Tam K, Torres VJ. *Staphylococcus aureus* Secreted Toxins and Extracellular Enzymes. Microbiology Spectrum. 2019;
- Tanikawa C, Espinosa M, Suzuki A, Masuda K, Yamamoto K, Tsuchiya E, et al. Regulation of histone modification and chromatin structure by the p53-PADI4 pathway. Nature Communications. 2012;

- Tappin MJ, Pastore A, Norton RS, Freer JH, Campbell ID. High-resolution ^1H NMR Study of the Solution Structure of δ -Hemolysin. *Biochemistry*. 1988;
- Tatsiy O, McDonald PP. Physiological stimuli induce PAD4-Dependent, ROS-Independent NETosis, with early and late events controlled by discrete signaling pathways. *Frontiers in Immunology*. 2018;
- Tawk MY, Zimmermann-Meisse G, Bossu JL, Potrich C, Bourcier T, Dalla Serra M, et al. Internalization of staphylococcal leukotoxins that bind and divert the C5a receptor is required for intracellular Ca^{2+} mobilization by human neutrophils. *Cellular Microbiology*. 2015;17(8):1241–57.
- Thakker M, Park JS, Carey V, Lee JC. *Staphylococcus aureus* serotype 5 capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model. *Infection and Immunity*. 1998;
- Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*. 2015;28(3):603–61.
- Toussaint M, Jackson DJ, Swieboda D, Guedán A, Tsourouktsoglou TD, Ching YM, et al. Host DNA released by NETosis promotes rhinovirus-induced type-2 allergic asthma exacerbation. *Nature Medicine*. 2017;
- Towle KM, Lohans CT, Miskolzie M, Acedo JZ, Van Belkum MJ, Vederas JC. Solution Structures of Phenol-Soluble Modulins $\alpha 1$, $\alpha 3$, and $\beta 2$, Virulence Factors from *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry*. 2016;
- Trager WF. Principles of drug metabolism 1: Redox reactions. *Comprehensive Medicinal Chemistry II*. 2006;5:87–132.
- Tromp AT, Van Gent M, Abrial P, Martin A, Jansen JP, De Haas CJC, et al. Human CD45 is an f-component-specific receptor for the staphylococcal toxin Pantón-Valentine leukocidin. *Nature Microbiology*. 2018;3(6):708–17.
- Tseng CW, Biancotti JC, Berg BL, Gate D, Kolar SL, Müller S, et al. Increased Susceptibility of Humanized NSG Mice to Pantón-Valentine Leukocidin and *Staphylococcus aureus*

- Skin Infection. PLoS Pathogens. 2015;
- Tseng CW, Kyme PA, Arruda A, Ramanujan VK, Tawackoli W, Liu GY. Innate immune dysfunctions in aged mice facilitate the systemic dissemination of methicillin-resistant *S. aureus*. PLoS ONE. 2012;
- Tsuda Y, Takahashi H, Kobayashi M, Hanafusa T, Herndon DN, Suzuki F. Three different neutrophil subsets exhibited in mice with different susceptibilities to infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Immunity. 2004;
- Tubaro E, Lotti B, Santiangeli C, Cavallo G. Xanthine oxidase: An enzyme playing a role in the killing mechanism of polymorphonuclear leucocytes. Biochemical Pharmacology. 1980;29(21):3018–20.
- Úbeda C, Tormo MÁ, Cucarella C, Trotonda P, Foster TJ, Lasa Í, et al. Sip, an integrase protein with excision, circularization and integration activities, defines a new family of mobile *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. Molecular Microbiology. 2003;
- Ueda Y, Cain DW, Kuraoka M, Kondo M, Kelsoe G. IL-1R Type I-Dependent Hemopoietic Stem Cell Proliferation Is Necessary for Inflammatory Granulopoiesis and Reactive Neutrophilia. The Journal of Immunology. 2009;
- Vandenesch F, Lina G, Henry T. *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? Frontiers in cellular and infection microbiology. 2012.
- Ventura CL, Malachowa N, Hammer CH, Nardone GA, Robinson MA, Kobayashi SD, et al. Identification of a novel *Staphylococcus aureus* two-component leukotoxin using cell surface proteomics. PLoS ONE. 2010;5(7).
- von Vietinghoff S, Ley K. Homeostatic Regulation of Blood Neutrophil Counts. The Journal of Immunology. 2008;
- Villagra-Blanco R, Silva LMR, Gärtner U, Wagner H, Failing K, Wehrend A, et al. Molecular analyses on *Neospora caninum*-triggered NETosis in the caprine system. Developmental and Comparative Immunology. 2017;
- Villanueva E, Yalavarthi S, Berthier CC, Hodgins JB, Khandpur R, Lin AM, et al. Netting

- Neutrophils Induce Endothelial Damage, Infiltrate Tissues, and Expose Immunostimulatory Molecules in Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Immunology*. 2011;
- Vincent C, Nogueire L, Clavel C, Sebbag M, Serre G. Autoantibodies to citrullinated proteins: ACPA. *Autoimmunity*. 2005;
- Vossenaar ER, Radstake TRD, Van Der Heijden A, Van Mansum MAM, Dieteren C, De Rooij DJ, et al. Expression and activity of citrullinating peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2004;
- Vrieling M, Boerhout EM, Van Wigcheren GF, Koymans KJ, Mols-Vorstermans TG, De Haas CJC, et al. LukMF' is the major secreted leukocidin of bovine *Staphylococcus aureus* and is produced in vivo during bovine mastitis. *Scientific Reports*. 2016;
- Vrieling M, Koymans KJ, Heesterbeek DAC, Aerts PC, Rutten VPMG, de Haas CJC, et al. Bovine *Staphylococcus aureus* secretes the leukocidin LukMF' to kill migrating neutrophils through CCR1. *mBio*. 2015;
- Wallace SM, Walton BI, Kharbanda RK, Hardy R, Wilson AP, Swanton RH. Mortality from infective endocarditis: Clinical predictors of outcome. *Heart*. 2002;
- Walter G, Kemmerer M, Kappler C, Hoffmann R. Treatment Algorithms for Chronic Osteomyelitis. *Deutsches Aerzteblatt Online*. 2012;
- Van Wamel WJB, Rooijackers SHM, Ruyken M, Van Kessel KPM, Van Strijp JAG. The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on β -hemolysin-converting bacteriophages. *Journal of Bacteriology*. 2006;
- Wang R, Braughton KR, Kretschmer D, Bach THL, Queck SY, Li M, et al. Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nature Medicine*. 2007;
- Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, et al. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *Journal of Cell Biology*. 2009;184(2):205–13.

- Warnatsch A, Ioannou M, Wang Q, Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science*. 2015;
- Weber C. Liver: Neutrophil extracellular traps mediate bacterial liver damage. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 2015.
- Weigel LM, Clewell DB, Gill SR, Clark NC, McDougal LK, Flannagan SE, et al. Genetic Analysis of a High-Level Vancomycin-Resistant Isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science*. 2003;
- Wen F, White GJ, Vanetten HD, Xiong Z, Hawes MC. Extracellular DNA is required for root tip resistance to fungal infection. *Plant Physiology*. 2009;
- White CR, Darley-USmar V, Berrington WR, McAdams M, Gore JZ, Thompson JA, et al. Circulating plasma xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(16):8745–9.
- White P, Sakellari D, Roberts H, Risafi I, Ling M, Cooper P, et al. Peripheral blood neutrophil extracellular trap production and degradation in chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*. 2016;
- Wilke GA, Wardenburg JB. Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in *Staphylococcus aureus* α -hemolysin - Mediated cellular injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;
- Wong KW, Jacobs WR. Mycobacterium tuberculosis exploits human interferon γ to stimulate macrophage extracellular trap formation and necrosis. *Journal of Infectious Diseases*. 2013;
- Wong SL, Demers M, Martinod K, Gallant M, Wang Y, Goldfine AB, et al. Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing. *Nature Medicine* [Internet]. 2015 Jul 9 [cited 2020 Jul 30];21(7):815–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26076037/>
- Woodin AM. Fractionation of a leucocidin from *Staphylococcus aureus*. *Biochemical Journal*. 1959 Oct;73(2):225–37.

- Woodin AM. Purification of the two components of leucocidin from *Staphylococcus aureus*. Biochemical Journal. 1960 Apr;75(1):158–65.
- Woodin AM. STAPHYLOCOCCAL LEUKOCIDIN. Annals of the New York Academy of Sciences. 1965;
- Wright J. Staphylococcal leucocidin (Neisser-Wechsberg type) and antileucociddin. Lancet. 1936;230:1002–4.
- Wu JF, Yang YH, Wang LC, Lee JH, Shen EY, Chiang BL. Antinucleosome antibodies correlate with the disease severity in children with systemic lupus erythematosus. Journal of Autoimmunity. 2006;
- Wu P, Wu D, Ni C, Ye J, Chen W, Hu G, et al. $\gamma\delta$ T17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer. Immunity [Internet]. 2014 May 15 [cited 2020 Jul 31];40(5):785–800. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24816404/>
- Wu SY, Weng CL, Jheng MJ, Kan HW, Hsieh ST, Liu FT, et al. Candida albicans triggers NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular traps through dectin-2. PLoS pathogens. 2019;
- Yalavarthi S, Gould TJ, Rao AN, Mazza LF, Morris AE, Núñez-Álvarez C, et al. Release of neutrophil extracellular traps by neutrophils stimulated with antiphospholipid antibodies: A newly identified mechanism of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. Arthritis and Rheumatology. 2015;
- Yamada T, Tochimaru N, Nakasuji S, Hata E, Kobayashi H, Eguchi M, et al. Leukotoxin family genes in *Staphylococcus aureus* isolated from domestic animals and prevalence of lukM-lukF-PV genes by bacteriophages in bovine isolates. Veterinary Microbiology. 2005;
- Yanai M, Rocha MA, Matolek AZ, Chintalacharuvu A, Taira Y, Chintalacharuvu K, et al. Separately or combined, LukG/LukH is functionally unique compared to other staphylococcal bicomponent leukotoxins. PLoS ONE. 2014;
- Yang F, Feng C, Zhang X, Lu J, Zhao Y. The Diverse Biological Functions of Neutrophils,

Beyond the Defense Against Infections [Internet]. Vol. 40, Inflammation. Springer New York LLC; 2017 [cited 2020 Jul 30]. p. 311–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27817110/>

- Yarwood JM, McCormick JK, Paustian ML, Orwin PM, Kapur V, Schlievert PM. Characterization and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3. Implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity islands. Journal of Biological Chemistry. 2002;
- Yasutomo K, Horiuchi T, Kagami S, Tsukamoto H, Hashimura C, Urushihara M, et al. Mutation of DNASE1 in people with systemic lupus erythematosus. Nature Genetics. 2001;
- Yipp BG, Kubes P. Review Article NETosis : how vital is it ? Blood. 2013;
- Yipp BG, Petri B, Salina D, Jenne CN, Scott BNV, Zbytnuik LD, et al. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. Nature Medicine. 2012;
- Yoong P, Torres VJ. The effects of *Staphylococcus aureus* leukotoxins on the host: Cell lysis and beyond. Current Opinion in Microbiology. 2013;16(1):63–9.
- Yousefi S, Mihalache C, Kozlowski E, Schmid I, Simon HU. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. Cell Death and Differentiation. 2009;
- Yousefi S, Simon D, Simon HU. Eosinophil extracellular DNA traps: Molecular mechanisms and potential roles in disease. Current Opinion in Immunology. 2012.
- Zhang D, Chen G, Manwani D, Mortha A, Xu C, Faith JJ, et al. Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. Nature. 2015;525(7570):528–32.
- Zhu W, Clark NC, McDougal LK, Hageman J, McDonald LC, Patel JB. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with Inc18-like vanA plasmids in Michigan. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2008;
- Zimmermann-Meisse G. Internalisation des leucotoxines de *S. aureus* dans les cellules cibles et conséquences cellulaires associées [Internet]. 2016. Available from:

<http://www.theses.fr/2016STRAJ113>

Zimmermann-Meisse G, Prévost G, Jover E. Above and beyond c5a receptor targeting by staphylococcal leucotoxins: Retrograde transport of panton–valentine leucocidin and γ -Hemolysin. *Toxins*. 2017;9(1).

LISTE DES COMMUNICATIONS

6.1 ARTICLES ET REVUES

1. Participation à l'écriture d'une revue à publier dans le journal de type « Critical reviews in Microbiology »
2. *Abstract* publié dans le journal « Toxicon » en Juillet 2018
DOI : <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.02.039> .

Titre : « *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine Leukocidin causes NETs in human neutrophils »

Auteurs : Viola Mazzoleni ¹, Gaëlle Zimmermann-Meisse ¹, Daniel Keller ¹, Gilles Prévost ¹

¹ *University of Strasbourg, CHRU Strasbourg, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, EA7290, Institut de Bactériologie, 3 rue Koeberlé, 67000 Strasbourg, France*

3. Article en premier auteur concernant les résultats obtenus sur la LPV et la NETose soumis au journal THE FASEB JOURNAL (<https://www.fasebj.org/>), en review depuis le 27 Novembre 2019).

Titre de l'article : « *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine Leukocidin triggers an alternative NETosis process targeting mitochondria »

Auteurs : Viola Mazzoleni ¹, Gaëlle Zimmermann-Meisse ¹, Smirnova Anna², Ivan Tarassov², Gilles Prévost ¹

¹ *University of Strasbourg, CHRU Strasbourg, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, EA7290, Institut de Bactériologie, 3 rue Koeberlé, 67000 Strasbourg, France.*

² *UMR 7156 GMGM Strasbourg University/CNRS, 67000 Strasbourg, France*

6.2 LISTE DES COMMUNICATIONS ORALES ET PAR AFFICHES

2016 : SFET (Société Française pour l'Étude des Toxines), 23èmes rencontres en toxicologie organisées à l'Institut Pasteur à Paris. 5 et 6 Décembre 2016.

Présentation de poster.

Titre : *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine Leukocidin causes NETosis in human neutrophils

Auteurs : **Viola Mazzoleni**, Gaëlle Zimmermann-Meisse, Emmanuel Jover, Daniel Keller, Gilles Prévost.

2017 : ETOX18 (European Workshop on Bacterial Protein Toxins), tenu à l'Institut Pasteur, à Paris du 26 au 30 juin 2017.

Présentation du poster contenant les premiers résultats.

Titre : *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine Leukocidin causes NETs in human neutrophils

Auteurs : **Viola Mazzoleni**, Gaëlle Zimmermann-Meisse, Daniel Keller, Gilles Prévost.

2017 : SFET (Société Française pour l'Étude des Toxines), 24èmes rencontres en toxicologie organisées à l'Institut Pasteur à Paris du 7 au 8 décembre 2017.

Présentation du poster avec les résultats et présentation orale à l'Auditorium François Jacob.

Titre : *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine Leukocidin causes NETosis in human neutrophils

Auteurs : **Viola Mazzoleni**, Gaëlle Zimmermann-Meisse, Daniel Keller, Gilles Prévost.

2018: SSM (SWISS SOCIETY FOR MICROBIOLOGY) - ANNUAL CONGRESS 2018, Institute of Microbiology Lausanne. Du 28 au 30 août 2018.

Présentation d'un poster.

Titre : *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine Leukocidin causes alternative NETosis in human neutrophils

Auteurs : **Viola Mazzoleni**, Margaux Dreyer, Gaëlle Zimmermann-Meisse, Daniel Keller, Gilles Prévost.

2018 : SFET (Société Française pour l'Étude des Toxines), 25èmes rencontres en toxicologie organisées à l'Institut Pasteur à Paris, le 28 et 29 Novembre 2018.

Communication orale et poster.

Titre : *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine Leukocidin causes alternative NETosis in human neutrophils

Auteurs : **Viola Mazzoleni**, Margaux Dreyer, Gaëlle Zimmermann-Meisse, Daniel Keller, Gilles Prévost.

2019 : SMS (Séminaire de Microbiologie de Strasbourg), congrès tenu le 28 Mars 2019 à Strasbourg.

Communication orale et poster.

Titre : *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine Leukocidin causes alternative NETosis in human neutrophils

Auteurs : **Viola Mazzoleni**, Gaëlle Zimmermann-Meisse, Margaux Dreyer, Daniel Keller, Gilles Prévost.

2019 : FMTS (Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg) Edition 2019 : 25 et 26 Avril 2019.

Communication orale et poster.

Titre : *Staphylococcus aureus* Pantón-Valentine Leukocidin causes an alternative NETosis in human neutrophils presenting histone 3 citrullination on NETs.

Auteurs : Viola Mazzoleni*, Gaëlle Zimmermann-Meisse, Daniel Keller, Gilles Prévost.

NETs Symposium : 4 Octobre 2019 - Strasbourg, France

Communication orale (en anglais)

Titre: *Staphylococcus aureus* Pantón-Valentine Leukocidin triggers an alternative NETosis process targeting mitochondria.

Auteurs: **Viola Mazzoleni**, Gaëlle Zimmermann-Meisse, Smirnova Anna, Ivan Tarassov, Gilles Prévost.

La Leucocidine de Panton-Valentine initie une forme alternative de NETose qui passe par la voie mitochondriale

Résumé

Staphylococcus aureus (SA) est une bactérie commensale, mais aussi un pathogène agressif pouvant sécréter nombreux facteurs de virulence, dont la Leucocidine de Panton et Valentine (LPV). La LPV est une leucotoxine bipartite appartenant à la famille des « toxines formant des pores » qui représente un facteur de gravité dans les infections. Cependant, plus récemment la formation d'un pore à la membrane plasmique a été démenti, alors que l'endocytose de la LPV dans les neutrophiles humains est suivie par une tardive perméabilisation membranaire. Ce phénomène représente une forme non classique de Neutrophil Extracellular Trap ou NETose, dépendant de la production de dérivés réactifs de l'oxygène mitochondriaux. Si un pore est présent, il est vraisemblablement formé à la mitochondrie, en raison d'une partielle colocalisation entre la LPV et cette organelle. La NETose à LPV serait alors plutôt une stratégie bactérienne pour se débarrasser de l'immunité de l'hôte et ainsi permettre la dissémination de SA.

Mots-clés : Leucocidine de Panton et Valentine, *Staphylococcus aureus*, Neutrophil extracellular trap, mitochondrie, dérivés réactifs de l'oxygène, citrullination, kinases, NADPH oxydase-indépendant, immunocytochimie.

Abstract

Staphylococcus aureus (SA) is a commensal bacterium, but also an aggressive pathogen that can secrete many virulence factors, including Panton and Valentine Leucocidine (PVL). PVL is a bipartite leukotoxin belonging to the "pore-forming toxin" family, involved in the increased severity of infections. However, more recently the formation of a pore at the plasma membrane has been refused, while the endocytosis of PVL in human neutrophils is followed by a late membrane permeabilization. In fact, a non-classic form of Neutrophil Extracellular Trap process or NETosis has been identified as the main PVL outcome, depending on the generation of mitochondrial reactive oxygen species. If a pore is present, it is likely formed at the mitochondria, as suggested by a partial colocation between PVL and this organelle. Therefore, the PVL NETosis could rather represent a bacterial strategy to get rid of host immunity in order to allow the following spreading of SA.

Key words: Panton-Valentine Leucocidine, *Staphylococcus aureus*, Neutrophil extracellular trap, mitochondria, reactive oxygen species, citrullination, kinases, NADPH oxidase-independent, immunocytochemistry.