

Université de Montréal

Identification de Glycosphingolipides Responsables de l'Attachement de
l'Entérotoxine Thermostable STb d'*Escherichia coli* avec la Muqueuse du
Jéjunum Porcin

Par

Elodie Rousset

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de

Philosophiae Doctor (Ph. D.)

En microbiologie et immunologie

Septembre 1998

©Elodie Rousset, 1998



W
4
U58
1998
U.116

Université de Montréal

Identification de Glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchors de l'Annexe 1
L'Annexe 1 est une protéine transmembranaire de 27 kDa localisée à la surface de
Jérome Poirier

Par

Éric Roussel

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de

Philosophie Doctor (Ph.D.)

En microbiologie et immunologie



1998
Éric Roussel, 1998

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Identification de Glycosphingolipides Responsables de l'Attachement de l'Entérotoxine
Thermostable STb d'*Escherichia coli* avec la Muqueuse du Jéjunum Porcin

Présentée par :

Elodie Rousset

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Réal Lallier,	Président-rapporteur
Dr. J. Daniel Dubreuil,	Directeur de recherche
Dre. Josée Harel,	Co-directrice de recherche
Dr. George Szatmari,	Membre du jury
Dr. Michel Frenette,	Examineur externe

Thèse acceptée le 28.10.1998

SOMMAIRE

Les *Escherichia coli* entérotoxigènes (ETEC) produisent 2 classes de toxines responsables de diarrhées sévères chez les humains et les animaux. D'une part, les entérotoxines thermolabiles, LTI et LTII, sont des oligomères protéiques de type A-B fortement apparentées à la toxine du choléra. D'autre part, les entérotoxines thermostables, STa et STb, sont des monomères protéiques distincts, respectivement de 2.0 et 5.2 kDa. Le mécanisme de la toxine STb pour conduire à la sécrétion de fluides dans la lumière intestinale est encore très peu compris, alors que les connaissances sur les mécanismes d'action utilisés par les autres entérotoxines des ETEC sont abondantes. Pour initier le processus sécrétoire, une étape d'attachement à la surface des cellules épithéliales intestinales est généralement requise pour une entérotoxine. Dans le but d'apporter de nouvelles informations sur cette première étape, l'attachement entre la toxine STb et son tissu cible naturel, le jéjunum porcin, a été étudié.

Premièrement, une méthode semi-quantitative en microscopie à fluorescence a été élaborée de façon à observer l'attachement de la toxine STb, préalablement marquée par de la biotine, avec des sections transversales fines de jéjunum. Certaines caractéristiques de l'attachement observé ont été déterminées. L'attachement est très rapide avec la bordure en brosse des villosités, et est dépendant de la concentration de toxine. Les températures de 4 à 37 °C, ainsi que la présence ou l'absence d'ions n'affectent pas l'attachement. En revanche, l'attachement s'est révélé nettement dépendant du pH. Un optimum de toxine fixée est obtenu autour de pH 6.0, correspondant au pH du jéjunum *in vivo* compris entre 5.5 et 6.5 chez le porc. Enfin, d'autres tissus porcins que le jéjunum sont fixés par la toxine, suggérant que les molécules impliquées dans l'attachement de STb sont exprimées dans divers tissus. Nous avons alors examiné la nature des structures de surface cellulaire impliquées dans l'attachement de STb. L'incubation de la toxine a été réalisée sur les sections de tissu prétraitées soit chimiquement, soit à l'aide d'enzymes spécifiques. Il a été montré que les chaînes saccharidiques de surface sont impliquées dans l'attachement. Le prétraitement à l'aide de la neuraminidase de *Clostridium perfringens* a abolit complètement l'attachement de STb au tissu, indiquant l'implication de groupes d'acide neuraminique portés par les chaînes saccharidiques. Les protéines et leurs glycoconjugués de surface ne semblent pas responsables de l'attachement observé. Par contre, les molécules fixées par STb seraient de nature lipidique. Les glycolipides impliqués dans la fixation de STb observé avec le jéjunum sont composés d'un céramide et d'une chaîne oligosaccharidique (ou glycosphingolipides).

Deuxièmement, l'attachement de STb a été mesuré avec divers glycosphingolipides purs. Une méthode consistant à incuber la toxine STb sur une membrane de PVDF après y avoir déposé chacun des lipides, a permis de comparer l'attachement dans les conditions optimales préalablement établies avec le tissu. Les résultats ont confirmé que la présence des chaînes saccharidiques est requise pour l'attachement de STb. Les groupements d'acide neuraminique de certains gangliosides se sont avérés aussi être des structures essentielles reconnues par STb. Un glycosphingolipide, appelé sulfatide (ou sulfo-galactosylcéramide), portant un seul galactose sulfaté dans sa partie glucidique a démontré l'attachement le plus fort avec STb. Par ailleurs, l'attachement de STb avec le sulfatide a été fortement inhibé par un excès de sulfatide. La charge ionique du groupement sulfate ne serait pas seule responsable, car l'attachement n'a pas été inhibé ni par le galactosylcéramide, ni par un polymère de glucoses sulfatés (ou dextran sulfaté). De plus, l'attachement a résisté à l'action du tétraméthylurée, un fort inhibiteur des interactions hydrophobes. Ces expériences ont indiqué que la spécificité d'attachement apparaît dépendre à la fois du groupement sulfate et du galactose portés par le sulfatide. Nous avons ensuite recherché la présence du sulfatide au niveau du tissu de l'hôte. Les lipides totaux ont été extraits des cellules épithéliales ou du mucus du jéjunum porcin par la méthode classique de Folch, et analysés en chromatographie sur couche mince de silice. Dans chacun des fractionnements, un lipide présentait le même profil de migration en chromatographie sur couche mince que le sulfatide standard, et a été reconnu par un anticorps monoclonal anti-sulfatide. Finalement, ce lipide isolé de la couche de silice a démontré un fort attachement avec la toxine STb.

En conclusion, la toxine STb présente une activité lectine avec des glycosphingolipides. L'ensemble des résultats indiquent que STb comporte au moins 2 sites d'attachement avec les glycosphingolipides, l'un pour les acides neuraminiques portés par des gangliosides, et l'autre pour le galactose sulfaté porté par le sulfatide. Ces molécules, étant présentes sur les cellules cibles de l'action de la toxine, sont fortement suspectées de jouer le rôle de récepteurs dans le mécanisme moléculaire sécrétoire de STb.

Mots clés : *Escherichia coli*, diarrhée, entérotoxine thermostable STb, site d'attachement, récepteur, glycosphingolipide.

TABLE DES MATIERES

	page
IDENTIFICATION DU JURY	ii
SOMMAIRE	iii
TABLE DES MATIERES	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES.....	x
LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS	xiii
DEDICACE.....	xv
REMERCIEMENTS	xvi
I. INTRODUCTION	1
II. REVUE DE LITTERATURE	3
1. L'entérotoxine thermostable STb produite par <i>Escherichia coli</i>	4
1. 1. Généralités sur la toxine STb	4
1. 1. 1. Rétrospective.....	4
1. 1. 2. Prévalence	5
1. 1. 3. Gène <i>estB</i>	6
1. 1. 4. Biogénèse	7
1. 1. 5. Caractéristiques physicochimiques	9
1. 1. 6. Structure	10
1. 1. 7. Antigénicité, immunogénicité et vaccination.....	12
1. 2. Mécanisme d'action de la toxine STb.....	13
1. 2. 1. Changements histologiques.....	13
1. 2. 2. Dose et temps d'action.....	14
1. 2. 3. Effecteur membranaire et messenger secondaire.....	15
1. 2. 4. Médiateurs sécrétoires intestinaux	16
1. 2. 5. Système nerveux entérique et muscles lisses circulaires	18
1. 2. 6. Transport des ions	21
1. 3. Attachement de la toxine STb avec la muqueuse.....	22
1. 3. 1. Prédications sur le domaine d'attachement de STb avec un récepteur	22
1. 3. 2. Attachement avec la membrane plasmique.....	24

1. 3. 3. Attachement avec la surface cellulaire.....	25
1. 3. 4. Récepteur pour la toxine STb.....	26
2. Interactions des toxines bactériennes entériques avec la muqueuse intestinale.....	29
2. 1. Bases physiologiques cellulaires.....	29
2. 1. 1. Complexité de la pathophysiologie intestinale	29
2. 1. 2. Attributs d'un récepteur membranaire pour une entérotoxine	31
2. 1. 3. Diversité fonctionnelle de l'attachement d'une entérotoxine	33
2. 1. 3. 1. Activation de l'adénylate cyclase.....	33
2. 1. 3. 2. Activation de la guanylate cyclase.....	36
2. 1. 3. 3. Voie du calcium	36
2. 1. 3. 4. Réarrangement du cytosquelette	38
2. 1. 3. 5. Arrêt de la synthèse protéique.....	39
2. 1. 3. 6. Formation de pores membranaires	40
2. 2. Bases biochimiques cellulaires	41
2. 2. 1. Nature et structure d'un site d'attachement d'un récepteur	41
2. 2. 1. 1. Différents constituants de la surface cellulaire	41
2. 2. 1. 2. Caractéristiques des glycoconjugués de surface cellulaire	42
2. 2. 2. Reconnaissance et attachement d'un glycoconjugué	44
2. 2. 2. 1. Principe de « clé-serrure ».....	44
2. 2. 2. 2. Reconnaissance de séquences internes.....	45
2. 2. 2. 3. Attachement de faible affinité.....	46
2. 2. 3. Familles de spécificité d'attachement	47
2. 2. 4. Variants de ligands	50
2. 2. 5. Sites d'attachement multifactoriels	51
III. MATERIEL, METHODES ET RESULTATS	53
Article 1: Binding characteristics of <i>Escherichia coli</i> enterotoxin b (STb) to the pig jejunum and partial characterization of the molecule involved. Rousset E., J. Harel and J. D. Dubreuil (1998). <i>Microbial Pathogenesis</i> 24 : 277-88.....	54
Article 2: Sulfatide from the pig jejunum brush border epithelial cell surface is involved in binding of <i>Escherichia coli</i> enterotoxin b (STb). Soumis pour publication dans <i>Infection and Immunity</i> , réf. # IAI800-98	67
IV. DISCUSSION ET CONCLUSIONS	111
V. BIBLIOGRAPHIE	129

VI. ANNEXES.....	xviii
Annexe 1: Binding of <i>Escherichia coli</i> enterotoxin b (STb) to lipids isolated from pig jejunum brush border epithelial cells and mucus. Dubreuil J. D., E. Rousset and J. Harel. Proceeding du 8 ^{ème} congrès d'ETOX (European Workshop Conference on Bacterial Protein Toxin, 1997)	xix
Annexe 2: Does <i>Escherichia coli</i> STb enterotoxin bind to sulfatides? Rousset E. and J. D. Dubreuil. Proceeding du 15 ^{ème} congrès d'IPVS (International Pig Veterinary Society, 1998)	xxii
Annexe 3: Graphiques représentant l'attachement dose-dépendant et saturable de la toxine STb avec le sulfatide	xxv

LISTE DES TABLEAUX

	page
II. REVUE DE LITTERATURE	
Tableau 1. Récepteurs rapportés chez les toxines bactériennes entériques associées à une sécrétion intestinale.	34
III. MATERIEL, METHODES ET RESULTATS	
Article 1.	
Table 1. Binding of STb to pretraited pig jejunal section.	59
Article 2.	
Table 1. Oligosaccharide structure of glycolipids used in this study.	102

LISTE DES FIGURES

	page
II. REVUE DE LITTERATURE	
Figure 1. Modèle de la biogénèse de l'entérotoxine STb par <i>Escherichia coli</i>	8
Figure 2. Séquence primaire et arrangement des 2 ponts disulfures (SS) de l'entérotoxine STb mature (schéma modifié de Dreyfus <i>et al.</i> , 1992).	10
Figure 3. Représentation de la structure tridimensionnelle de l'entérotoxine STb (modifiée de Sukumar <i>et al.</i> , 1995).	11
Figure 4. Modèle schématique du mécanisme d'action de l'entérotoxine STb sur l'épithélium intestinal.	20
Figure 5. Relations de structure/fonction basées sur les modifications d'acides aminés de l'entérotoxine STb, d'après les études menées par Arriaga <i>et al.</i> (1995), Fujii <i>et al.</i> (1994), Dreyfus <i>et al.</i> (1992), et sur la structure établie par Sukumar <i>et al.</i> (1995).	23
Figure 6. Coupe longitudinale de villosités de la muqueuse intestinale montrant les composants cellulaires et l'organisation histologique.	30
Figure 7. Structure du monosialoganglioside GM1, le récepteur membranaire commun aux toxines CT et LT.	48
III. MATERIEL, METHODES ET RESULTATS	
Article 1.	
Figure 1. SDS-PAGE and Western blot of STb and biotinylated STb.	56
Figure 2. Effect of pH on STb binding to jejunal circular sections.	57

Figure 3. Summary of the different treatments performed on the pig jejunum to determine the STb binding molecule chemical identity.....	58
Article 2.	
Figure 1. Relative binding of STb toxin to various lipids and glycolipids.	103
Figure 2. Dose-dependent binding of STb toxin to sulfatide.	104
Figure 3. Effect of various chemicals on STb toxin binding to sulfatide.	105
Figure 4. Competition assay of STb toxin binding to sulfatide.	106
Figure 5. Occurrence of sulfatide-like glycolipid in pig jejunal mucus and epithelial cells.	107
Figure 6. Determination of the epithelial localization of sulfatide on pig jejunal mucosa using immunocytochemistry and a monoclonal anti-sulfatide antibody.	108
Figure 7. Binding of STb toxin to the sulfatide isolated from pig jejunal epithelial cells.	109
Figure 8. Inhibition assay of the biological activity of STb.	110
IV. DISCUSSION ET CONCLUSIONS	
Figure 1. Structure générale d'un ganglioside typique, le monosialoganglioside GM2.	114
Figure 2. Structures générales d'un galactosylcéramide et d'un 3'sulfo - galactosylcéramide ou sulfatide.	115
Figure 3. Modèle séquentiel proposé pour l'attachement de la toxine STb avec la surface de ses cellules cibles.....	127

VI. ANNEXES

Annexe 1.

Figure 1. Binding of STb toxin (1 μ g) to commercially available lipids (5 μ g) coated in methanol as revealed using a multiplate enzyme-linked immunosorbent binding assay xxi

Annexe 2.

Figure 1. Preparations of pig jejunal epithelial cells (C), and mucus (M), molecular weight standards (kDa) separated using a SDS-PAGE 12 % transferred on PVDF membrane and overlaid with STb toxin xxiii

Figure 2. Pure glycolipids separated by high-density Phastgel[®], transferred on PVDF membrane and overlaid with STb toxin. xxiii

Figure 3. Pure sulfatide (S), pig jejunal epithelial cells lipid extract (Lc) and mucus lipid extract (Lm) separated by high-density Phastgel[®], stained with either Coomassie blue (A) or silver (B) xxiii

Annexe 3.

Figure 1. Attachement de la toxine STb au sulfatide préalablement déposé sur membrane de PVDF (polyvinylidene difluoride). xxvi

LISTE DES SIGLES ET ABBREVIATIONS

AMPC	adénosine monophosphate 3',-5' cyclique
Ca ²⁺	ion calcium
CaMKII	protéine kinase (ou phosphotransférase) de type II dépendante du complexe calmoduline-Ca ²⁺
Cer	céramide
CFTR	récepteur transmembranaire de la mucoviscidose (ou fibrose kystique)
CHO	lignée de cellules épithéliales humaines (chinese hamster ovary)
CJT	toxine de <i>Campylobacter jejuni</i>
CPE	entérotoxine de <i>Clostridium perfringens</i>
CPR	protéine catabolique represseur
CT	toxine cholérique (de <i>Vibrio cholerae</i>)
DAG	diacyl glycérol
EAEC	<i>Escherichia coli</i> entéroaggrégative
EAST	toxine thermostable des EAEC
EC	cellule entérochromaffine
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ETEC	<i>Escherichia coli</i> entérotoxinogène
G	protéine G ou protéine régulatrice de liaison au GTP
Gal	galactose
GalNAc	N-acétyl-D-galactosamine
Gb	globoside
GC-C	guanylate cyclase de type C
GD	disialoganglioside
G _i	protéine G inhibitrice
Glc	glucose
GlcNAc	N-acétyl-D-glucosamine
GM	monosialoganglioside
GMPc	guanosine monophosphate 3',-5' cyclique
G _s	protéine G stimulatrice
GT	trisialoganglioside

5-HT	5-hydroxytryptamine ou sérotonine
5-HT ₂	récepteur de type 2 de la 5-HT
5-HT ₃	récepteur de type 3 de la 5-HT
HT29 / C1	lignée de cellules épithéliales dérivée d'un carcinome de côlon humain
IP ₃	phosphatidylinositol 1, 4, 5-triphosphate
IS	séquence d'insertion
KLH	keyhole limpet hemocyanin
LT	toxine thermolabile d' <i>E. coli</i>
MBP	protéine de liaison au maltose (maltose binding protein)
Man	mannose
MCDK	lignée de cellules épithéliales rénales de chien (Madin-Darby)
NeuAc	acide N-acétyl neuraminique
NeuGc	acide N-glycolyl neuraminique
Omp	protéine de la membrane externe (outer membrane protein)
PGE ₂	prostaglandine de type 2 de la série E
pI	point isoélectrique
PKA	protéine kinase (ou phosphotransférase) dépendante de l'AMPc
PKC	protéine kinase (ou phosphotransférase) dépendante du calcium
PKG	protéine kinase (ou phosphotransférase) dépendante du GMPc
PLA ₂	phospholipase A ₂ (métabolisme de l'acide arachidonique)
PLC	phospholipase C (métabolisme du phosphatidylinositol)
PT	toxine pertussique
RBL-2H3	lignée de leucocytes basophiles de rat
SEB	entérotoxine B de <i>Staphylococcus aureus</i>
SLTou VT	toxine shiga-like ou vérotoxine d' <i>Esherichia coli</i>
SNE	système nerveux entérique
ST	toxine thermostable d' <i>Esherichia coli</i>
TDH	hémolysine thermostable directe de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
T84	lignée de cellules épithéliales dérivée d'un carcinome de côlon humain
VT	vérotoxine

A mes parents

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet, et plus particulièrement :

Docteur J. Daniel Dubreuil, professeur titulaire au département de pathologie et microbiologie de la faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour m'avoir dirigé tout au long de ce projet, pour sa confiance et ses nombreux conseils ainsi que sa grande disponibilité ;

Docteure Josée Harel, professeure titulaire au département de pathologie et microbiologie de la faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, pour l'intérêt qu'elle a toujours porté à ce projet, pour m'avoir fait partager son dynamisme scientifique et pour ses encouragements ;

Docteur John M. Fairbrother, professeur titulaire au département de pathologie et microbiologie, et Docteur Jacques Lussier, professeur agrégé au département de biomédecine vétérinaire, de la faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, et membres de mon comité de conseil de Ph. D., pour leurs commentaires et leurs suggestions sur le déroulement de ce travail ;

Ann Letellier, assistante de recherche du laboratoire à mon arrivée, pour tout son dévouement et sa généreuse collaboration sur le projet ;

Clarisse Desautels et Jules Deslandes pour leur aide précieuse et leurs conseils techniques en microscopie ;

Docteur Maan Abul-Milh, chercheur post-doctoral, pour m'avoir fait part de son expertise pointue dans le domaine des glycosphingolipides ;

Thérèse Gendron-Bernard et Annie Borduas, ainsi que Micheline Saint-Germain pour leur bonne humeur accueillante et leur indispensable contribution administrative ;

L'ensemble des membres du Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP) pour leur agréable collaboration, et spécialement chacun des étudiants et stagiaires que j'ai côtoyé au sein du laboratoire pour tous nos échanges scientifiques et autres... ;

L'Université de Montréal et la Faculté de médecine vétérinaire de Saint-Hyacinthe pour m'avoir accordé plusieurs bourses doctorales ;

Le Conseil de Recherche de Sciences Naturelles Canadien (OGPO139070) et les Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (93-ER-0214) qui ont rendu possible cette étude grâce à leur support financier ;

Les personnes du laboratoire de Microbiologie de l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA) de Clermont-Ferrand qui m'ont permis de vivre cette expérience épanouissante au Québec et qui m'ont toujours chaleureusement encouragé ;

Et finalement, ma famille et mes amis pour leur compréhension et leur générosité.

I. INTRODUCTION

La plupart des souches d'*Escherichia coli* font partie de la microflore indigène de l'intestin et participent principalement à la protection de l'hôte contre une infection par les pathogènes. A l'intérieur de cette espèce, certaines souches colonisent l'intestin, et/ou envahissent plus ou moins profondément les cellules épithéliales, et/ou produisent une ou plusieurs toxines. Les *Escherichia coli* entérotoxinogènes (ou ETEC), sécrétant des entérotoxines dans la lumière intestinale, sont les plus fréquents agents responsables de la «tourista», et sont aussi impliquées dans les diarrhées chez les enfants des pays sous-développés, ainsi que chez les animaux. Chez les animaux d'élevage, cette maladie peut conduire à des pertes économiques importantes en raison de la mortalité, du ralentissement du gain de poids, et du coût de la médication. Les ETEC produisant l'entérotoxine STb sont une cause importante de diarrhée chez le porc, particulièrement après le sevrage (Blanco *et al.*, 1997). Une diarrhée est une augmentation de la fréquence et/ou de la fluidité de mouvements de l'intestin provoquée par l'induction de sécrétion d'électrolytes et d'eau dans la lumière intestinale. Le mécanisme d'action moléculaire utilisé par STb pour déclencher une sécrétion de fluide dans la lumière intestinale demeure encore très peu compris, et n'apparaît correspondre à aucun de ceux reportés dans la pathogénèse des autres entérotoxines (Peterson et Whipp, 1995). La première étape du processus toxique sécrétoire de STb, soit l'attachement à une molécule dite «récepteur», n'est toujours pas élucidée. Chez les cellules eucaryotes, les récepteurs jouent un rôle primordial dans la communication de cellule à cellule et dans la transduction spécifique d'un signal. Au cours de l'évolution, de nombreux micro-organismes pathogènes ont sélectionné des sites d'attachement spécifiques à leurs ligands pour leur colonisation et/ou invasion ainsi que pour l'effet de leurs toxines sur les cellules cibles de l'hôte. Il est acquis aujourd'hui que l'attachement à la cellule hôte est l'étape initiale d'un processus d'infection. Cette étude menée sur l'entérotoxine thermostable STb vise à apporter des connaissances sur la première étape de son mécanisme d'action. Les deux grands objectifs que nous nous sommes fixés sont : 1) de mettre en évidence l'attachement de STb à la surface des cellules cibles, et 2) d'identifier les molécules impliquées dans cet attachement.

II. REVUE DE LITTÉRATURE

1. L'entérotoxine thermostable STb produite par *Escherichia coli*

1. 1. Généralités sur la toxine STb

1. 1. 1. Rétrospective

Les *Escherichia coli* entérotoxinogènes (ETEC) produisent des toxines protéiques responsables de diarrhées chez les animaux et les humains. Ces entérotoxines sont classées selon leur stabilité thermique. Les toxines thermolabiles, LTI et LTII, sont des protéines multimériques fortement apparentées à la toxine du choléra CT sur les plans antigénique, fonctionnel et structural (Takeda *et al.*, 1983; Spangler, 1992; Kaper *et al.*, 1995). Elles appartiennent au grand groupe de toxines bactériennes de type A-B, composées d'une sous-unité A portant l'activité enzymatique et de 5 sous-unités B responsables de l'attachement au récepteur. Par contre, les toxines thermostables, STa et STb, sont des monomères peptidiques, respectivement de 2.5 et 5.2 kDa. Ces 2 sous-classes de ST ont été distinguées en 1978 (Burgess *et al.*, 1978). La toxine STa est soluble dans le méthanol et active dans le modèle du souriceau, alors que STb est insoluble dans le méthanol, inactive dans le modèle du souriceau, mais active dans les anses intestinales ligaturées du porcelet. La terminologie STA, STI, ST1, STmouse et STB, STII, ST2 ou STpig est aussi utilisée (Olsson et Söderlind, 1980; Monckton et Hasse, 1988; Kupersztoch *et al.*, 1990). De plus, il existe deux variants de STa, de 18 et 19 acides aminés, qui résultent de 2 clivages indépendants du précurseur, désignés respectivement STIa ou STaP et STIb ou STaH (Moseley *et al.*, 1983; Rasheed *et al.*, 1990). Aucun variant de STb n'est connu.

STb est la moins étudiée des entérotoxines d'*E. coli*, principalement en raison de sa purification tardive. Elle a été purifiée à partir d'une souche sauvage d'*E. coli* d'origine porcine (Dubreuil *et al.*, 1991), puis de souches recombinantes (Fujii *et al.*, 1991; Dreyfus *et al.*, 1992; Bossé *et al.*, 1993; Handl *et al.*, 1993). Les recherches ont d'abord porté sur les aspects épidémiologiques et génétiques, les caractéristiques physicochimiques et l'immunogénicité de la toxine STb. Elles s'orientent à présent vers son architecture moléculaire et son mécanisme d'action détaillé (Dubreuil, 1997).

1. 1. 2. Prévalence

Les diarrhées causées par la toxine STb semblent dépendre à la fois de l'espèce de l'animal et de l'âge de l'animal. Les études portant sur l'incidence de la toxine STb montrent en effet que, produite seule ou en association avec d'autres toxines, elle est fortement associée aux souches ETEC provenant de porcs sevrés souffrant de diarrhées (Moon *et al.*, 1983; De Castro *et al.*, 1984; Mainil *et al.*, 1986; Moon *et al.*, 1986; Wilson et Francis, 1986; Fairbrother *et al.*, 1988; Monckton et Hasse, 1988; Söderlind *et al.*, 1988; Fairbrother *et al.*, 1989; Nagy *et al.*, 1990; Woodward *et al.*, 1990; Woodward et Wray, 1990; Handl *et al.*, 1992; Osek et Truszczynski, 1992; Blanco *et al.*, 1997).

L'étude de Handl *et al.* (1992) en est un exemple représentatif. Parmi les souches ETEC, provenant de porcs de moins d'une semaine à plus de 6 semaines et souffrant de diarrhée sur l'année 1989 en Suède, la toxine STb a été 2 fois plus communément retrouvée que la toxine STa (respectivement à 82 % et 39 %), et plus que la toxine LT (53%). On remarque qu'à l'inverse de STa, la fréquence de STb est très faible chez les porcs de moins d'une semaine, alors qu'elle est très élevée chez les porcelets de plus d'une semaine (91 à 93%). De plus, STb ne semble pas causer de diarrhée sévère chez les porcs nouveaux-nés (Casey *et al.*, 1998). Dans une étude espagnole récente, la production de plusieurs toxines a été comparée parmi des souches *E. coli* isolées de porcs nouveau-nés/ sevrés et souffrant d'une diarrhée ou de la maladie de l'œdème. Chez le porc, les souches *E. coli* vérotoxigènes (VTEC) produisent la vérotoxine de l'œdème (VTe), appelée aussi VT2v ou SLTIIv pour variant de VT2 ou de SLTII (Marques *et al.*, 1986). Blanco *et al.* (1997) montrent que STb est la toxine la plus prévalente devant STa, LT puis VTe.

Certaines études montrent également la présence de STb, avec une incidence très faible, chez des souches ETEC d'origine bovine (Echeverria *et al.*, 1985; Mainil *et al.*, 1990; Shin *et al.*, 1994), aviaire (Akashi *et al.*, 1993) et même humaine (Weikel *et al.*, 1986a; Lortie *et al.*, 1991c; Handl et Flock, 1992; Okamoto *et al.*, 1993). Un des facteurs gouvernant la spécificité d'hôte est corrélé à la sensibilité de STb envers les protéases présentes dans la lumière intestinale, en particulier les protéases de type trypsine (Whipp, 1987; Whipp, 1990; Hitotsubashi *et al.*, 1992a). C'est ainsi que l'addition d'inhibiteur de trypsine dans les anses intestinales ligaturées a permis de développer d'autres modèles animaux que le porc, à savoir la souris, le rat, le veau, le lapin (Dubreuil *et al.*, 1991; Fujii *et al.*, 1991; Whipp, 1991; Hitotsubashi *et al.*, 1992a; Fujii *et al.*, 1995).

Parfois, des souches ETEC produisant STb peuvent être retrouvées chez des porcs ne souffrant pas de diarrhée (Söderlind *et al.*, 1988). L'absence de maladie serait due à l'absence de structure d'adhésion sur la bactérie, de conditions environnementales prédisposantes pour la production de la toxine ou encore à la susceptibilité de l'hôte. En effet, l'absence de maladie peut s'expliquer du fait de l'absence de récepteur fonctionnel sur les cellules cibles ou bien de toute autre molécule intracellulaire impliquée dans le processus d'action de la toxine.

1. 1. 3. Gène *estB*

En 1983, deux équipes ont parallèlement cloné et séquencé le gène *estB* codant pour la toxine STb (Lee *et al.*, 1983; Picken *et al.*, 1983). Au départ, le gène *estB* a aussi été désigné *estA* (Mazaitis *et al.*, 1981; Picken *et al.*, 1983; Lawrence *et al.*, 1990). La séquence déduite en acides aminés correspond à un peptide précurseur de STb (PréSTb) de 71 acides aminés, dont les 23 premiers acides aminés représentent la séquence signal. Cette séquence a été confirmée à partir de la molécule mature purifiée (Kupersztoch *et al.*, 1990).

Le gène *estB* est plasmidique, flanqué de 2 séquences d'insertion IS2, et porté par le transposon Tn4521 de 9kb (Lee *et al.*, 1985; Hu *et al.*, 1987; Hu et Lee, 1988). La transposition du gène *estB* n'a jamais été mise en évidence. Pourtant, parmi différents isolats cliniques, le gène de structure de STb est bordé de séquences flanquantes hétérogènes, suggérant que le gène *estB* pourrait être retrouvé sur différents transposons (Lee *et al.*, 1985). De plus, ce gène est souvent retrouvé associé à un ou plusieurs autres gènes codant pour la production des entérotoxines LT et STa, des vérotoxines, de facteurs de colonisation, de colicines, pour la résistance aux antibiotiques, et pour des fonctions de transfert (Echeverria *et al.*, 1985; Harnett et Gyles, 1985). La combinaison la plus communément observée est LT-STb avec le facteur d'adhésion F4 (ou K88), mais aucun sérotype en particulier ne lui est associée (Blanco *et al.*, 1997; Dubreuil, 1997).

La transcription du gène *estB* semble être contrôlée par un promoteur faible, ce qui expliquerait les quantités minimales de toxine obtenues à partir des souches sauvages (Spandau et Lee, 1987; Lawrence *et al.*, 1990). Le promoteur du gène *estB* porterait une activité élevée de liaison à l'ARN polymérase, mais une activité faible d'initiation transcriptionnelle. La séquence du site d'initiation transcriptionnelle présente une forte

homologie avec la séquence consensus de la région -10 (« Pribnow box ») des *E. coli*, excepté pour la thymine finale invariante qui est remplacée par une guanine. La séquence du site de liaison de l'ARN polymérase est homologue à la séquence consensus correspondante ou région -35 (Lawrence *et al.*, 1990). Il faut noter également que la distance séparant la région -10 et la région -35 n'est pas de 17 pb mais de 15 pb. Néanmoins, les connaissances sur la force du promoteur ne sont pas clairement établies, et d'autres éléments, qui n'ont pas été étudiés, peuvent expliquer la faible expression du gène *estB*.

Busque *et al.*, (1995) ont montré que la production de STb est régulée par la répression catabolique, impliquée dans l'expression de certains facteurs de virulence chez *E. coli*, comme la toxine STa (Alderete et Robertson, 1977). En présence d'AMPc, la protéine catabolique repressur (ou CRP) se complexe avec l'AMPc. L'AMPc-CRP lie alors spécifiquement l'ADN et induit la transcription du gène, le gène *estB* est ainsi positivement régulé par l'AMPc. Par contre, en présence de glucose, l'adénylate-cyclase qui produit l'AMPc à partir de l'ATP est inactive. L'expression de la toxine est réprimée. Une séquence de régulation présente une identité de 72 % avec la séquence consensus du site de liaison à la protéine CRP (Busque *et al.*, 1995). Elle est localisée 26 nucléotides en amont de la région -35 du gène *estB*, et comprend 22 paires de base (pb) avec 6 pb séparant 2 motifs. L'alignement indique que le premier motif de cette séquence est moins conservé que le second.

1. 1. 4. Biogénèse

Les données sont suffisamment abondantes pour décrire le déroulement de la biogénèse de la toxine STb (Fig. 1). STb est une toxine extracellulaire d'abord synthétisée dans le cytoplasme sous forme du précurseur, PréSTb, de 71 acides aminés (8100 Da).

La séquence signal est clivée, lors du passage de la membrane interne, générant un peptide de 48 acides aminés (5200 Da) (Kupersztoch *et al.*, 1990; Fujii *et al.*, 1991; Dreyfus *et al.*, 1992). Le passage de la membrane interne est dépendant du système de sécrétion SecA, le système de sécrétion général pour la plupart des protéines du périplasme ou de la membrane externe chez *E. coli* (Kupersztoch *et al.*, 1990).

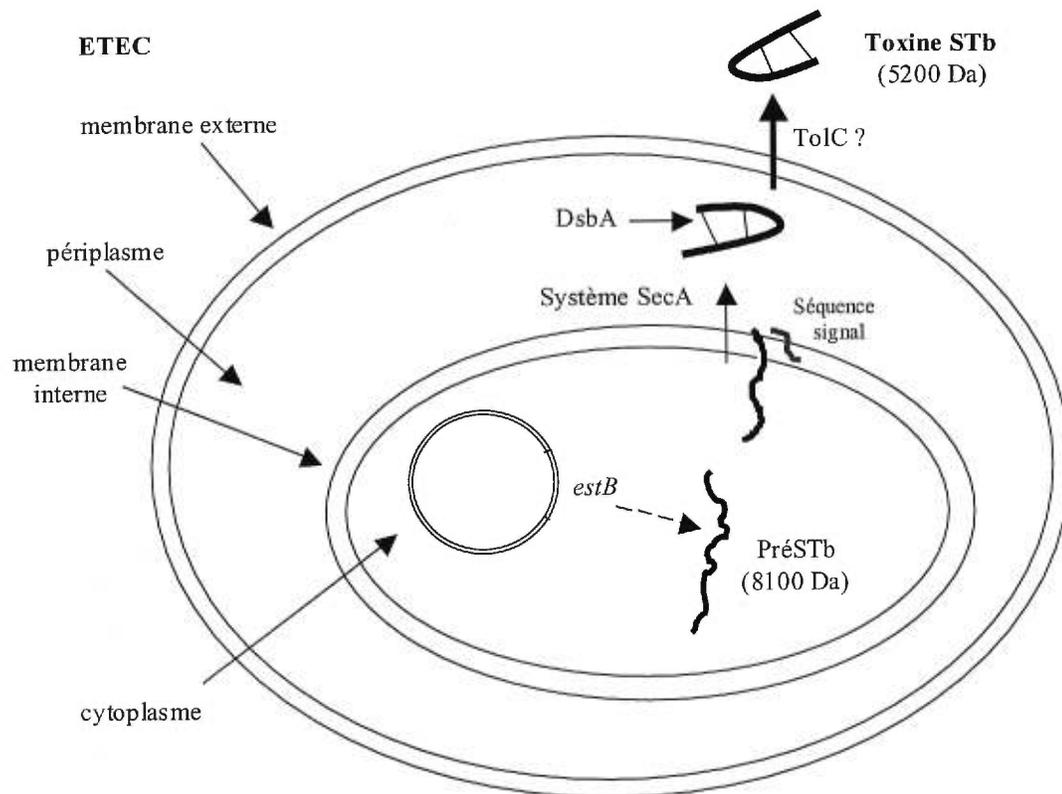


Figure 1. Modèle de la biogénèse de l'entérotoxine STb par *Escherichia coli*.

Les expériences de mutagenèse dirigée menées sur les cystéines ont indiqué que les 2 ponts disulfures de STb sont formés dans le périplasm pour protéger le peptide des protéases périplasmiques (Dreyfus *et al.*, 1992; Arriaga *et al.*, 1995). Dreyfus *et al.* (1992) suggèrent que le repliement doit empêcher les protéases périplasmiques similaires à la trypsine d'agir sur les 6 lysines et les 2 arginines du peptide STb. La nature exacte des enzymes responsables de la protéolyse de la forme réduite (-SH) de STb est en cours d'étude. Les produits des gènes *degP* ou *ompT*, codant pour des protéases respectivement périplasmique et périplasmique ancrée à la membrane externe, ne seraient pas impliqués.

La protéine périplasmique, DsbA, responsable de la formation des ponts disulfures de certaines protéines du périplasm ou de la membrane externe chez *E. coli* (Bardwell *et al.*, 1991), agit sur STb dans le périplasm (Foreman *et al.*, 1995; Okamoto *et al.*, 1995). Okamoto *et al.* (1995) ont proposé un modèle de la formation des ponts disulfures du peptide STb par la protéine DsbA. La première étape est le clivage entre les acides aminés

en position 37 et 38 par une protéase de type trypsine. Un pont disulfure est alors formé par DsbA entre les cystéines en position 44 et 59. Ce pont semble induire un changement conformationnel rendant la molécule résistante à la protéolyse périplasmique. La formation du deuxième pont est ensuite catalysée, toujours par la protéine DsbA, entre les cystéines C33 et C71. Il a été montré que DsbA agit également sur les autres entérotoxines d'*E. coli*, STa et LT (Yu *et al.*, 1992; Findlay *et al.*, 1993; Yamanaka *et al.*, 1994).

Le peptide, correctement replié en raison des 2 ponts disulfures, est immédiatement relâché dans le milieu extracellulaire. Contrairement à STa, aucun clivage supplémentaire n'est nécessaire au passage de STb à travers la membrane externe (Moon *et al.*, 1986). La sécrétion nécessite non seulement le produit du gène *dsbA* quant à la formation des ponts, mais également de *tolC* (Foreman *et al.*, 1995). La protéine TolC est un canal d'ions de la membrane externe chez *E. coli* qui est bloqué par les peptides (Benz *et al.*, 1993). Les toxines de la famille des RTX (« Repeats in ToXins »), notamment l'hémolysine HlyA d'*E. coli*, requièrent la protéine de membrane externe TolC dans leur machinerie particulière de sécrétion (Wandersman et Delepelaire, 1990). Foreman *et al.* (1995) suggèrent que le peptide STb pourrait être sécrété directement à travers cette protéine TolC.

1. 1. 5. Caractéristiques physicochimiques

La protéine STb mature, caractérisée par une faible masse moléculaire de 5200 Da, comprend peu d'acides aminés aromatiques, soit 1 tyrosine, 2 phénylalanines et aucun tryptophane. Il en résulte une faible absorbance à 280 nm, son maximum d'absorption a été estimé à 214 nm (Handl *et al.*, 1993). Elle est par contre riche en acides aminés basiques, soit 1 histidine, 2 arginines et 6 lysines. A la différence de STa, dont le point isoélectrique (pI) est acide, celui de STb est basique. Le pI de STb a été déterminé à 9.6 (Handl *et al.*, 1993), et à 9.7 (Fujii *et al.*, 1994).

Certaines caractéristiques physicochimiques ont été déterminées sur la toxine STb pure ou sur des surnageants de cultures. L'activité biologique et/ou l'immunogénicité de la molécule STb résistent à une température de 65°C pendant 30 minutes (Dubreuil *et al.*, 1991), comme à 100°C pendant 30 minutes (Burgess *et al.*, 1978; Weikel *et al.*, 1986b; Fujii *et al.*, 1991), à des pH variant de 2.0 à 12.0 (Dubreuil *et al.*, 1991), de 4.0 à 11.0 (Sukumar *et al.*, 1995), des pourcentages de méthanol variant de 60 à 93, même s'il y a

précipitation (Burgess *et al.*, 1978; Fujii *et al.*, 1991), à 100 % d'acétonitrile (Fujii *et al.*, 1991), à 50 % d'acide formique, à 8 M d'urée et à 2.5 % de sodium dodécyl-sulfate (Dubreuil *et al.*, 1991). Par contre, ces propriétés sont abolies en présence de béta-mercaptoéthanol à 2 % (Fujii *et al.*, 1991), et de protéases similaires à la trypsine (Whipp, 1987; Fujii *et al.*, 1991; Dreyfus *et al.*, 1992).

1. 1. 6. Structure

La figure 2 représente les 48 acides aminés du peptide STb mature. La forme en boucle Ω est maintenue grâce à 2 ponts disulfures entre les cystéines C44 et C59 et entre C33 et C71 (Fujii *et al.*, 1991).

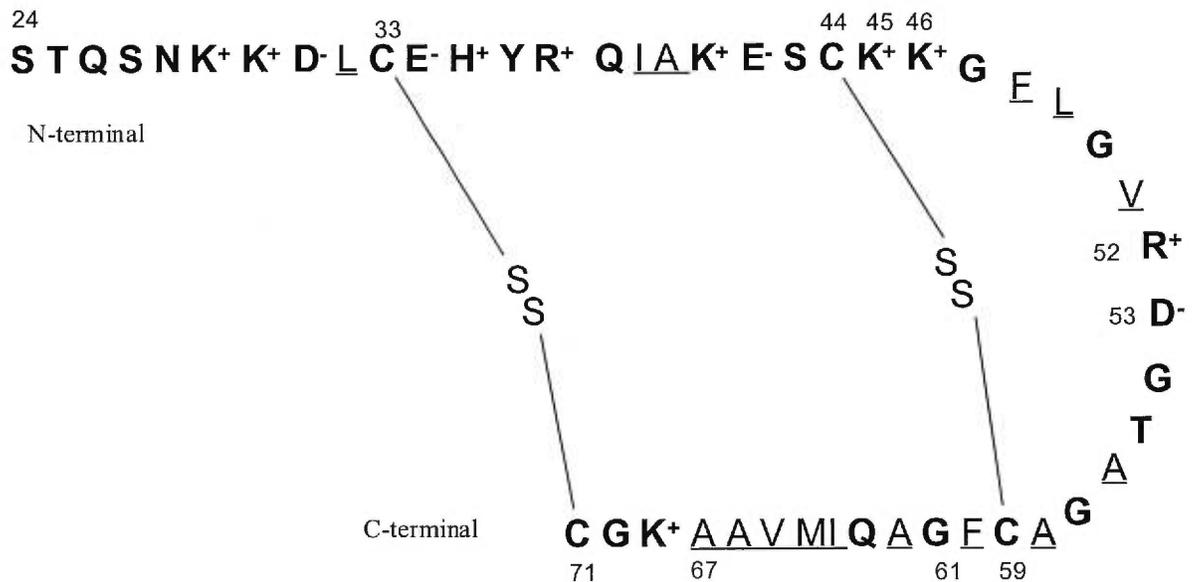


Figure 2. Séquence primaire et arrangement des 2 ponts disulfures (SS) de l'entérotoxine STb mature (schéma modifié de Dreyfus *et al.*, 1992). La numérotation des acides aminés considère l'élimination des 23 premiers acides aminés durant la sécrétion. X : acide aminé, X : acide aminé hydrophobe (non polaire), X : acide aminé hydrophile neutre (polaire), X⁺ : acide aminé hydrophile basique (polaire), X⁻ : acide aminé hydrophile acide (polaire).

La structure tridimensionnelle cristallographique de STb n'a pas encore été déterminée. Néanmoins, Sukumar *et al.* (1995) ont établi un modèle de la structure, basé sur des analyses de spectroscopies en résonance magnétique nucléaire et en dichroïsme circulaire (Fig. 3). La molécule contient $73 \pm 2\%$ d'hélices α , et $4 \pm 2\%$ de tours β . La structure des 9 premiers acides aminés du côté N-terminal reste à être étudiée.

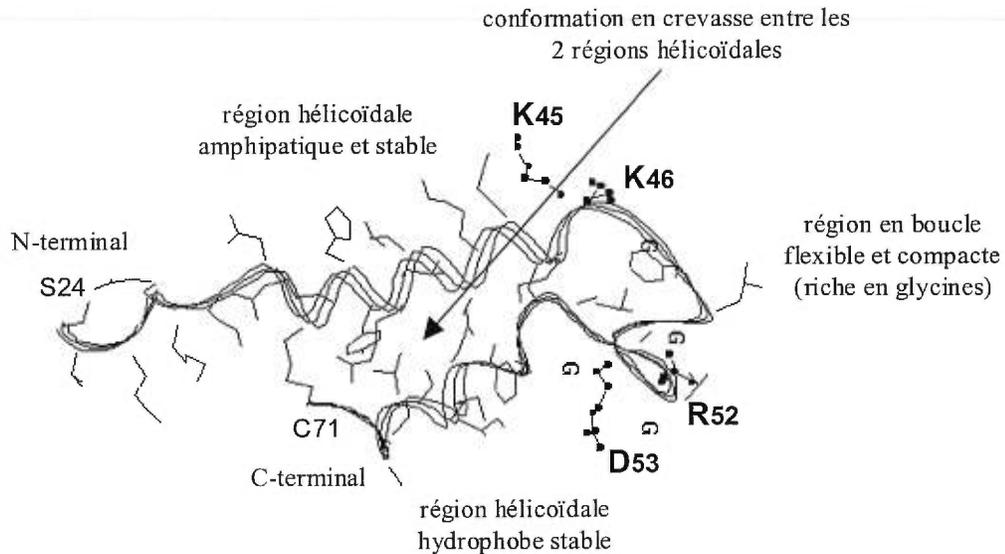


Figure 3. Représentation de la structure tridimensionnelle de l'entérotoxine STb (modifiée de Sukumar *et al.*, 1995). En gras sont représentées les chaînes latérales des acides aminés K45, K46, R52 et D53 exposées dans la boucle et impliquées dans la toxicité.

Alors que la région C-terminale est riche en acides aminés hydrophobes, les 9 acides aminés basiques contenus dans STb sont localisés en majorité du côté N-terminal. La région N-terminale en hélices α des résidus 33 à 46 est amphipatique, et fait face à la région C-terminale hydrophobe en hélices α des résidus 61 à 67. Cette partie centrale de la molécule forme une crevasse, dont les 2 bordures sont les 2 régions hélicoïdales. Dans la région amphipatique, plusieurs acides aminés polaires sont exposés à l'extérieur, tels que D31, H35, Q38, K41, E42, K45 et K46, conférant une surface fortement polaire à la molécule. Les chaînes latérales des acides aminés hydrophobes, qui ont la propriété de se tourner vers l'intérieur de la molécule, forment des contacts lâches entre les 2 régions hélicoïdales. Par exemple, les acides aminés Y36 et R37 étendent leurs chaînes latérales vers l'intérieur s'associant avec la chaîne latérale de la valine V66. Le même phénomène d'association des chaînes latérales tournées vers l'intérieur a lieu entre les acides aminés A40 avec A62 et Q63. Le motif central comprend donc 2 faces séparées, l'une hélicoïdale amphipatique et l'autre hélicoïdale hydrophobe, et est stabilisé à la fois par les 2 ponts disulfures et des contacts hydrophobes.

Les 14 acides aminés, entre les cystéines C44 à C59, correspondent à une région en boucle (Fig. 2). Quatre glycines, dont la propriété est de former des structures de charnière,

sont espacées presque symétriquement dans la boucle et permettent une grande mobilité à cette région (Dreyfus *et al.*, 1992). La boucle est riche en acides aminés hydrophobes (F48, V51, A56, A58). Elle expose aussi 2 paires d'acides aminés chargés, l'une à l'extrémité, R52 et D53, et l'autre en bordure, K45 et K46 (Fig. 3). Cette région apparaît plutôt compacte dans la mesure où sa dimension est de seulement 4.7 Å (Sukumar *et al.*, 1995). Pour résumer, la région de la boucle est flexible et étroite, contient un groupe d'acides aminés hydrophobes et expose 2 paires d'acides aminés chargés.

1. 1. 7. Antigénicité, immunogénicité et vaccination

Les épitopes conformationnels ne sont pas connus, mais des prédictions à l'aide du modèle d'Hopp et Wood basées sur le profil d'hydrophilicité indiquent la présence de 3 épitopes linéaires majeurs (Urban *et al.*, 1990). Ils sont localisés dans la région N-terminale, aux positions respectives 26-31, 29-34 et 41-46. Une équipe de chercheurs a obtenu des anticorps contre une molécule de STb conjuguée (STb-KLH) (Hitotsubashi *et al.*, 1992a). Ces anticorps neutralisent l'activité de STb, mais pas l'activité de STa, ni celle de CT, indiquant que les épitopes antigéniques de STb sont distincts de ceux de STa ou CT. L'immunogénicité de STb est faible, c'est pourquoi il s'avère difficile au premier abord de produire des anticorps neutralisant son activité entérotoxique. Lorsque la toxine STb émulsifiée avec de l'adjuvant complet de Freund est injectée à des lapins, le titre en anticorps obtenu est significatif. Mais ce titre reste faible même après 8 inoculations répétitives avec de l'adjuvant incomplet de Freund, et le sérum ne neutralise pas l'activité de STb (Dubreuil *et al.*, 1991).

D'autres chercheurs ont produit un sérum en injectant soit une protéine de fusion (OmpF-STb-béta galactosidase), ou un fragment de STb de 19 acides aminés conjugué (fragment de STb-KLH), contenant 6 des 9 acides aminés basiques du côté N-terminal pour favoriser la production d'anticorps (Lawrence *et al.*, 1990). Le sérum obtenu s'est avéré neutralisant. Mais il réagit peu avec les faibles dilutions de l'entérotoxine dans le surnageant de culture, et présente des réactions croisées avec des composés inconnus des souches ne produisant pas STb. En 1996, Dubreuil *et al.* ont construit deux protéines de fusion avec la protéine de liaison au maltose (MBP). L'une des protéines de fusion contient la toxine STb mature (MBP-STb), l'autre contient les résidus 31 à 53 de STb (MBP-STb2).

Les deux protéines de fusion induisent la production d'anticorps. Seul MBP-STb conserve son activité biologique, et seul l'antisérum contre MBP-STb neutralise l'activité biologique de STb (Dubreuil *et al.*, 1996). La connaissance de la structure tridimensionnelle et des épitopes conformationnels de la toxine devrait donc être utile pour élaborer des protéines de fusion plus appropriées.

Les vaccins commerciaux, utilisés dans l'immunisation des truies afin de protéger leur progéniture *via* le colostrum, sont basés sur la prévalence des souches ETEC causant des diarrhées chez les porcs. Généralement, ils contiennent une souche *E. coli* portant les fimbriae F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P) ou F41 (Moon et Bunn, 1993). Ces fimbriae ne sont cependant pas toujours impliqués dans les diarrhées causées par les ETEC (Casey *et al.*, 1992). Une alternative est de compléter ces vaccins avec des toxoïdes. Dans ce sens, certains vaccins ont été décrits contenant une sous-unité de LT fusionnée à STa (Sanchez *et al.*, 1986; Clements, 1990). Pourtant, STb est un facteur de virulence communément retrouvé, seul ou en combinaison avec les autres entérotoxines, chez les porcelets de plus d'une semaine souffrant de diarrhée (chap. 1. 1. 2.). De nouveaux vaccins, basés non seulement sur les adhésines, mais aussi sur STb ou un fragment de STb, pourraient permettre une protection plus définitive contre les infections des ETEC causant des diarrhées chez les porcs de plus d'une semaine.

1. 2. Mécanisme d'action de la toxine STb

1. 2. 1. Changements histologiques

Les observations des modifications histologiques de l'épithélium intestinal, causés par STb, apparaissent contradictoires. Il est probable que ces contradictions soient dues à la diversité des travaux basés au départ sur l'utilisation de surnageants de culture contenant STb, et, plus récemment, sur la toxine purifiée. Il a été observé que la perte de villosités de l'épithélium intestinal chez le porc, induite à l'aide d'un virus approprié, résulte en une absence de réponse à STb (Whipp *et al.*, 1985). La réponse sécrétoire de STb semble donc être dépendante de l'intégrité des villosités. Lorsque la toxine STb est incubée pendant 2 heures sur un jéjunum porcin intact, des altérations microscopiques de la muqueuse intestinale sont induites (Whipp *et al.*, 1986; Rose *et al.*, 1987; Whipp *et al.*, 1987). En

particulier, des cellules épithéliales responsables de l'absorption sont éliminées et les villosités sont partiellement atrophiées. Les auteurs supposent que cela peut expliquer la diminution des capacités d'absorption intestinale, et donc contribuer à l'ampleur de la maladie. En revanche, d'autres chercheurs n'ont observé aucune lésion de l'épithélium intestinal. Hitotsubashi *et al.* (1992b) n'ont observé aucun dommage cellulaire ou inflammatoire du jéjunum après 3 heures d'exposition avec de la toxine STb pure et chez la souris. La toxine cause uniquement une dilatation des capillaires de la sous-muqueuse et une diminution de l'épaisseur de la lamina propria. De même, aucun dommage n'a été observé après 3 à 6 heures chez un modèle porcin (Kennedy *et al.*, 1984). Ainsi, la toxine STb peut être considérée comme une toxine cytotonique, mais ne semble pas être une cytotoxine, dans la mesure où elle ne cause pas de dommages inflammatoires de façon reproductible.

1. 2. 2. Dose et temps d'action

La toxine du choléra (CT) est la plus puissante des entérotoxines cytotoniques décrites. Une expérience a montré que l'ingestion de seulement 25 µg de toxine CT pure induit 21.9 litres de diarrhée sur une durée de 93 heures chez des volontaires (Levine *et al.*, 1983). En comparaison, une activité sécrétoire élevée peut être attribuée à STb quant à sa dose d'action et à son effet dans le temps.

Les mesures obtenues *in vivo* dans les anses intestinales ligaturées indiquent qu'une faible quantité de toxine STb est produite par les souches sauvages d'*E. coli* (Urban *et al.*, 1990; Dubreuil *et al.*, 1991). En 1995, Peterson et Whipp ont montré que la concentration minimale de STb provoquant une accumulation de fluides d'environ 1 ml/cm d'intestin en 2 heures est de 38 ng/ml (35 pmol). Le déclenchement d'une réponse similaire nécessite une concentration moindre de STa, à savoir 24 ng/ml (60 pmol), mais au moins 3000 fois plus de CT, soit 64 µg/ml (3.81 pmol). En fait, CT nécessite un délai de 4 heures pour qu'une concentration de seulement 52 ng/ml suffise pour déclencher une accumulation de 1 ml/cm d'intestin.

Chronologiquement, la réponse *in vivo* due à STb diffère de celles dues à STa et à CT. La réponse sécrétoire causée par STa est déclenchée après 1 heure, donc plus rapidement par rapport aux 2 heures requises pour STb (Weikel et Guerrant, 1985; Weikel *et al.*,

1986b; Whipp, 1987; Whipp, 1990; Hitotsubashi *et al.*, 1992a). Peterson et Whipp (1995) ont comparé les sécrétions dues à STb, STa et CT sur la durée. Les auteurs ont démontré que STb, similairement à STa, induit une sécrétion rapidement et d'une durée brève, commençant à diminuer après 2 heures. Les expériences de Hitotsubashi *et al.* (1992a) indiquent que la diminution du taux de fluides accumulés est plus lente pour STb que pour STa. Après 8 heures, l'accumulation des fluides est encore présente dans le cas de STb, et pratiquement absente dans le cas de STa. La réponse due à CT est complètement différente, car elle stimule une sécrétion après un certain délai, et sur une durée nettement plus prolongée (Peterson et Whipp, 1995).

1. 2. 3. Effecteur membranaire et messager secondaire

Peterson et Whipp (1995) ont observé que des co-injections de STb avec soit STa, soit CT, engendrent des réponses additives. Ces expériences démontrent que STb cause une diarrhée par un mécanisme d'action distinct de celui de STa et de CT. L'attention est aujourd'hui portée sur la compréhension détaillée de ce mécanisme d'action (Fig. 4).

La toxine STb induit rapidement une réponse dose-dépendante de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} chez différentes lignées cellulaires d'origine intestinale ou non intestinale (Dreyfus *et al.*, 1993). Alors que les entérotoxines LT et STa stimulent respectivement la production intracellulaire de l'AMPc et du GMPc, le mécanisme d'action de STb est indépendant de l'augmentation intracellulaire des nucléotides cycliques (Kennedy *et al.*, 1984; Weikel et Guerrant, 1985; Weikel *et al.*, 1986b; Hitotsubashi *et al.*, 1992a; Peterson et Whipp, 1995). Autre que l'AMPc ou le GMPc, le calcium intracellulaire est aussi un médiateur connu pour les transports intestinaux de fluides et d'ions à travers l'épithélium. Dreyfus *et al.* (1993) ont mis en évidence que la toxine STb déclenche l'ouverture d'un canal calcique localisé dans la membrane plasmique. Grâce à l'utilisation d'agents bloquants, les auteurs ont démontré que STb induit un influx à partir de Ca^{2+} extracellulaire et non d'une réserve interne. L'influx de Ca^{2+} dans la cellule n'a pas lieu par un canal à ouverture dépendante du voltage de type L, de type N ou de type T.

Ces mêmes auteurs ont montré que l'ouverture du canal est dépendante de l'attachement de STb avec un récepteur couplé à une protéine régulatrice de liaison au GTP (ou protéine G). L'ouverture du canal est, en effet, bloquée par des antagonistes de protéine

G, comme la toxine pertussique (PT) ou la somatostatine. La toxine PT est souvent utilisée pour mettre en évidence l'implication ou non de protéines G, car elle catalyse l'ADP-ribosylation de la

sous-unité α de différentes protéines G trimériques (α , β , γ) (Kaslow et Burns, 1992). L'ADP-ribosylation conduit à empêcher la liaison de la sous-unité α avec le récepteur et donc son effet physiologique régulateur selon l'effecteur impliqué. La protéine G, impliquée dans l'ouverture du canal à Ca^{2+} suite à l'action de STb, serait une protéine G inhibitrice de type 3 (G_{i3}) (Harville *et al.*, 1995). Ainsi, STb stimule un canal à Ca^{2+} dans la membrane plasmique dont l'ouverture dépend d'un ligand (récepteur) et est régulée par une protéine G (Fig. 4).

1. 2. 4. Médiateurs sécrétoires intestinaux

De nombreux résultats, accumulés ces dernières années, indiquent que l'action de STb implique 2 médiateurs sécrétoires (ou sécrétagogues). La sérotonine ou 5-hydroxytryptamine (5-HT) et la prostaglandine E_2 (PGE_2) sont libérés de façon dose-dépendante et rapide dans la lumière d'anses intestinales ligaturées traitées par STb chez différents modèles animaux (Hitotsubashi *et al.*, 1992b; Fujii *et al.*, 1995; Harville et Dreyfus, 1995; Peterson et Whipp, 1995). Cependant, les sites d'action de ces hormones, comme les mécanismes utilisés par STb pour stimuler leur libération, ne sont pas clairement élucidés. La monocouche de cellules épithéliales, exposées à la lumière intestinale, est composée d'entérocytes au sommet des villosités (ou villi) et de cellules entérochromaffines à la base (ou cellules endocrines) pouvant libérer, respectivement, la PGE_2 et la 5-HT. La toxine STb est produite dans l'intestin et peut donc agir directement sur ces cellules. Les médiateurs libérés peuvent ensuite interagir avec d'autres types cellulaires du tissu intestinal, que ce soit de la muqueuse, de la sous-muqueuse ou de la musculuse, et stimuler alors indirectement l'action de STb en amplifiant la sécrétion d'électrolytes ou encore le péristaltisme de l'intestin.

L'observation histologique d'anses intestinales ligaturées traitées par STb montre une dilatation des capillaires, probablement due au changement du volume sanguin des cellules intestinales mucosales (Hitotsubashi *et al.*, 1992a). Cet effet est caractéristique de l'action des prostaglandines. Plusieurs données indiquent que la toxine STb stimule la synthèse et

l'excrétion de la PGE₂. L'analyse des tissus et des fluides indique une exportation rapide de la PGE₂ à partir des cellules après sa synthèse (Hitotsubashi *et al.*, 1992a). Les inhibiteurs de la cyclooxygénase, enzyme responsable de la synthèse des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique, tels que l'aspirine et l'indométhacine, réduisent de manière significative la réponse sécrétoire à STb (Hitotsubashi *et al.*, 1992a). L'action de STb provoque une augmentation intracellulaire dose-dépendante d'acide arachidonique et d'acide phosphatidique, indiquant que le métabolisme de l'acide arachidonique est stimulé par STb (Fujii *et al.*, 1995). Le Ca²⁺ intracellulaire est connu pour contrôler à la fois la phospholipase A₂ (PLA₂) et la phospholipase C (PLC), des enzymes ancrées à la membrane et essentielles pour la libération de l'acide arachidonique au sein des cellules à partir des phospholipides membranaires. Il a été confirmé que la PLC est impliquée dans la réponse à STb suite à l'utilisation d'un inhibiteur de cette enzyme, la néomycine. La synthèse et la libération de la PGE₂ apparaissent résulter de l'augmentation du calcium intracellulaire et de la stimulation de la « cascade » de l'acide arachidonique (Fig. 4).

D'après une étude basée sur une lignée cellulaire modèle de leucocytes basophiles de rat (RBL-2H3), la libération de la 5-HT par les cellules entérochromaffines intestinales est due à l'action directe de STb (Harville et Dreyfus, 1996). Cette étude a démontré le rôle à part entière d'une protéine G sensible à la toxine pertussique (PT). La toxine STb active une protéine G indépendamment de la concentration extra- ou intra- cellulaire d'ions Ca²⁺, ce qui conduit à la libération de la 5-HT (Fig. 4). Les auteurs de cette étude ont proposé que STb, peptide basique, pourrait activer directement une protéine G, et conduire à la libération de la 5-HT par les cellules entérochromaffines. Certains peptides basiques ont en effet été décrits comme responsables de l'exocytose de médiateurs sécrétoires suite à l'activation directe de la protéine G_{i3} par une voie indépendante d'un récepteur et de la concentration de Ca²⁺ (Aridor *et al.*, 1990; Weingarten *et al.*, 1990; Aridor *et al.*, 1993). Lors de l'insertion membranaire de ces peptides basiques, il semble que la simple perturbation de la bicouche lipidique peut permettre d'activer directement une protéine G. Des résultats récents ont montré que l'attachement de STb à des cellules intestinales *in vitro* entraîne une association stable avec la bicouche lipidique, ce qui appuie cette hypothèse (Chao et Dreyfus, 1997a).

Le traitement avec la kétansérine, un antagoniste du récepteur 5-HT₂, réduit la sécrétion intestinale en réponse à STb (Harville et Dreyfus, 1995). La 5-HT, une fois libérée, apparaît

donc stimuler à son tour la réponse sécrétoire de STb. La 5-HT libérée dans la lumière intestinale serait en grande partie impliquée dans l'augmentation de la réponse en PGE₂. L'utilisation de la kétansérine a pour effet de diminuer partiellement la libération de la PGE₂ provoquée par STb (Harville et Dreyfus, 1995). Le récepteur 5HT₂ est connu pour conduire à la synthèse de prostaglandines dans la cellule par la voie du phosphatidylinositol. Comme il est décrit dans la figure 4, le récepteur 5-HT₂ active la phospholipase C en présence de Ca²⁺. L'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) est alors libéré au sein des cellules par l'action catalytique de la phospholipase C. L'IP₃ est un second messenger important qui va activer des canaux calciques du réticulum endoplasmique. Le calcium libre dans le cytosol va ensuite activer la PLA₂, dont l'action est de libérer de l'acide arachidonique, le précurseur pour la synthèse des prostaglandines. Harville et Dreyfus suggèrent que la formation de la PGE₂ est due en partie à l'action de la 5-HT, notamment suite à la stimulation du récepteur 5-HT₂. La libération de la 5-HT semble donc impliquée pour amplifier la réponse en PGE₂, mais l'utilisation de l'indométhacine, un inhibiteur de la synthèse des prostaglandines, indique que la PGE₂ libérée n'a par contre aucun effet sur la libération de la 5-HT.

Ainsi, deux médiateurs sont libérés en réponse à STb. L'action directe de STb conduit à l'activation d'une protéine G des cellules entérochromaffines, stimulant la libération de la 5-HT indépendamment du calcium. STb active aussi directement un canal à Ca²⁺ couplé à une protéine G, l'entrée de Ca²⁺ dans la cellule active la PLA₂ conduisant à la formation de la PGE₂. La PGE₂ serait également synthétisée indirectement grâce à l'action de la 5-HT sur le récepteur 5-HT₂ lié à la PLC dans la membrane des cellules épithéliales (Fig. 4).

1. 2. 5. Système nerveux entérique et muscles lisses circulaires

Il a été montré que des souches *E. coli*, productrices de STa et STb, déclenchent une sécrétion en partie *via* le système nerveux entérique (SNE), localisé sous l'épithélium (Eklund *et al.*, 1985). La lidocaïne, la tétrodoxtine et l'atropine, des agents influençant l'activité nerveuse entérique, diminuent significativement la réponse sécrétoire chez le rat et le chat. De plus, Peterson et Whipp (1995) suggèrent que le SNE jouerait un rôle important dans la pathogénèse de STb, du fait de la libération dose-dépendante à la fois de la PGE₂ et de la 5-HT. Ces deux médiateurs sécrétoires sont libérés de façon similaire dans

le mécanisme d'action de la toxine CT. Or, il a été montré que dans le processus de CT, les signaux entérotoxiques sont transférés à partir des cellules entérochromaffines jusqu'aux cryptes épithéliales et aux muscles lisses circulaires *via* les neurones situés sous l'épithélium (Eklund *et al.*, 1987). Harville et Dreyfus (1995) considèrent que l'action de la 5-HT est à elle seule un indicateur de la participation du SNE. Plusieurs sous-types de récepteurs pour la 5-HT ont été identifiés. Ces récepteurs permettent à la 5-HT d'agir non seulement sur la muqueuse mais aussi sur la séreuse *via* le SNE (Peterson *et al.*, 1994). Le récepteur 5-HT₃, par exemple, conduit à l'activation des neurones lorsqu'il est stimulé par la fixation de la 5-HT. Ce récepteur est impliqué dans le mécanisme d'action de CT, mais pas dans ceux de LT et STa (Mourad *et al.*, 1995). Le récepteur 5-HT₃ serait également impliqué dans le mécanisme d'action de STb (Harville et Dreyfus, 1996).

Également, la toxine STb agit directement sur les cellules musculaires lisses, qui contrôlent la motilité de l'intestin (Hitotsubashi *et al.*, 1992b). Lorsque la toxine est appliquée sur la séreuse de l'iléon *in vitro*, elle induit rapidement une accélération de la motilité spontanée et de faibles contractions. Par contre, lorsque la toxine est appliquée sur la muqueuse, elle induit plus tardivement l'accélération de la motilité de l'intestin en absence de contraction. Cette induction n'est pas inhibée par l'atropine, indiquant que l'accélération n'est pas due à l'excitation des nerfs cholinergiques. Mais la papavérine, qui cause une relaxation des muscles lisses, inhibe l'induction, suggérant une action directe de STb sur les muscles lisses. Dans un contexte *in vivo*, il est possible qu'une quantité suffisante de STb traverse la couche épithéliale de la muqueuse jusqu'aux cellules musculaires lisses. Les auteurs émettent l'hypothèse que la bactérie adhérente à la surface de la muqueuse produit des protéines, dont certaines peuvent assister la traversée de STb vers la lamina propria, comme cela a été décrit pour *V. cholerae* (Fasano *et al.*, 1991).

La toxine STb pourrait donc être classée dans le groupe des toxines bactériennes entériques à activité neuronale, d'après la plus récente classification effectuée par Sears et Kaper (1996). Ces données suggèrent, en effet, qu'au moins une partie de l'activité sécrétoire de la toxine peut être attribuée à la libération d'un ou plusieurs médiateurs du SNE, ainsi qu'à l'action de STb sur l'activité des muscles lisses de l'intestin.

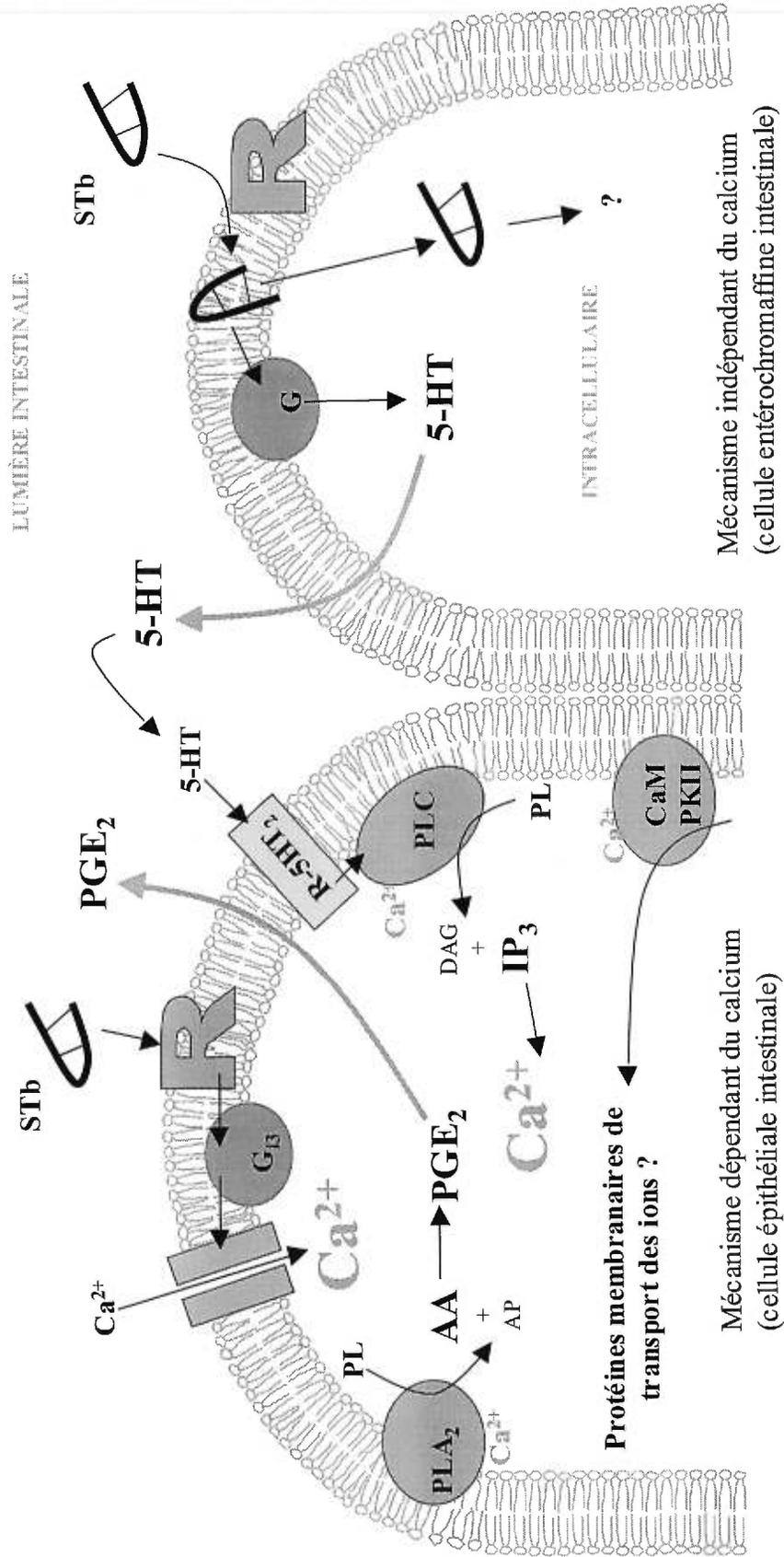


Figure 4. Modèle schématique du mécanisme d'action de l'entérotoxine STb sur l'épithélium intestinal. R, récepteur potentiel de STb; G, protéine G; Ca²⁺, calcium; CaM: calmoduline; PKII: protéine kinase II; PLA₂, phospholipase A₂; PLC, phospholipase C; PL, phospholipide; AP, acide phosphatidique; AA, acide arachidonique; IP₃: inositol 1,4,5-trisphosphate; DAG, diacyl glycérol; PGE₂, prostaglandine E₂; 5-HT, 5-hydroxytryptamine; R-5HT₂: récepteur de type 2 de la 5-HT.

1. 2. 6. Transport des ions

Plusieurs données indiquent qu'une quantité minimale de toxine STb cause très rapidement une sécrétion anormale d'anions dans la lumière intestinale, ce qui entraîne une accumulation d'électrolytes dans l'intestin, suivie de la sécrétion d'eau par un phénomène d'osmose, et provoque alors une diarrhée. La toxine STb induit rapidement un flux électrolytique et une différence de potentiel à travers la muqueuse intestinale porcine montée en chambre d'Ussing, et non à travers la séreuse (Weikel et Guerrant, 1985). L'étude du transport intestinal d'ions *in vitro* montre que la toxine n'a aucun effet apparent sur le flux de chlore (Cl⁻) (Weikel *et al.*, 1986b; Whipp *et al.*, 1987). Les mesures du contenu en électrolytes d'anses ligaturées intestinales indiquent que l'anion majeur secreté en réponse à STb serait le bicarbonate HCO₃⁻.

Le mécanisme d'action de STb ne pourra être complètement établi que si le mécanisme moléculaire est non seulement démontré, mais aussi corrélé avec la sécrétion intestinale. Or, le transport des ions à travers l'épithélium de la muqueuse intestinale est très peu compris dans la réponse sécrétoire due à la toxine STb. Récemment, il a été montré que le calcium entrant dans la cellule active ensuite la calmoduline, qui à son tour active la protéine kinase II (Fujii *et al.*, 1997). La calmoduline est une protéine de liaison au Ca²⁺, que l'on trouve soit libre dans le cytosol, soit associée à une kinase. La kinase II activée est probablement responsable ensuite de l'activité d'autres enzymes et de protéines membranaires de transport des ions (Fig. 4). Toutefois, la nature moléculaire du mécanisme de transport des ions n'a pas été identifiée.

Fujii *et al.* (1997) proposent le canal CFTR (ou récepteur transmembranaire de la mucoviscidose) comme candidat. CFTR est un canal d'ions Cl⁻ régulé par les kinases dépendantes de l'AMPc (PKA) (Wagner *et al.*, 1992). Par exemple, chez des souris souffrant de mucoviscidose et n'exprimant pas de récepteur CFTR, aucune sécrétion de fluide n'est déclenchée en réponse à la toxine du choléra ou à la toxine STa (Chao *et al.*, 1994; Gabriel *et al.*, 1994). Chez les mammifères, la perméabilité aux ions Cl⁻ du petit intestin opère entièrement par CFTR localisé dans la membrane apicale des cellules villositaires (Bear *et al.*, 1992). Or, la protéine CFTR est requise également pour la sécrétion de HCO₃⁻, et est stimulée dans les diverses voies de l'AMPc, du GMPc ou du Ca²⁺ (Forte *et al.*, 1992; Seidler *et al.*, 1997). Fujii *et al.* (1997) estiment que la voie du calcium impliquée dans le mécanisme de STb pour la sécrétion de fluide est essentiellement

celle de la kinase II activée par la calmoduline complexée au Ca^{2+} (CaMKII). Par ailleurs, la séquence en acides aminés du canal CFTR contient 12 sites consensus de phosphorylation pour la CaMKII (Kemp et Pearson, 1990). Aussi, pour la sécrétion de HCO_3^- , il est fort probable que le canal CFTR soit phosphorylé par la CaMKII, activée, elle, par les ions Ca^{2+} .

1. 3. Attachement de la toxine STb avec la muqueuse

1. 3. 1. Prédications sur le domaine d'attachement de STb avec un récepteur

Les caractéristiques physicochimiques, les notions sur l'architecture moléculaire de STb, ainsi que les expériences de modification de certains acides aminés de STb ont permis d'élaborer des prédictions sur le domaine d'attachement de STb avec un récepteur potentiel. Plusieurs modifications de certains acides aminés de STb ont été réalisées par des agents chimiques et par mutagenèse dirigée (Fig. 5). L'arginine en position 52 (R52) et l'acide aspartique en position 53 (D53), qui sont localisés à l'extrémité de la structure en boucle de STb (Fig. 3), ont été substitués individuellement pour une sérine, de façon à éliminer la charge. L'activité sécrétoire de ces toxines mutées est considérablement réduite, de façon plus marquée concernant la mutation de l'arginine que celle de l'acide aspartique. De plus, ces deux toxines mutées n'ont pas inhibé l'activité sécrétoire de la toxine STb native. Elles ne semblent donc pas affecter l'attachement de STb avec le récepteur présumé. Par conséquent, les acides aminés R52 et D53 pourraient être impliqués dans le domaine d'attachement de STb (Dreyfus *et al.*, 1992). Similairement, les substitutions des lysines, aux positions 45 et 46 (K45 et K46), entraînent une diminution marquée de l'activité biologique. L'implication fonctionnelle de ces deux acides aminés n'a pas été établie plus précisément (Fujii *et al.*, 1994). Enfin, les quatre cystéines qui forment les deux ponts disulfures, maintenant la structure en boucle, sont cruciales pour l'activité entérotoxique de STb (Arriaga *et al.*, 1995). Les acides aminés K45 et K46, R52 et D53 de la structure en boucle sont donc suspectés d'appartenir au domaine d'attachement de STb avec un récepteur potentiel (Fig. 3). Pour le moment, les données obtenues sont basées sur l'activité biologique de différents mutants de STb, mais aucune étude n'a été réalisée sur un système direct détectant l'attachement STb-récepteur.

Les études visant à démontrer l'attachement de la toxine STb avec des cellules de la muqueuse n'ont été amorcées que très récemment. D'une part, Hitotsubashi *et al.* (1994) ont reporté un attachement spécifique de STb avec une protéine extraite à partir de membranes de cellules de la muqueuse intestinale de souris. D'autre part, Chao et Dreyfus (1997) ont montré un attachement spécifique de STb avec les cellules des lignées HT29 et T84, dérivées de cellules épithéliales d'un carcinome de côlon humain. Dans cette étude, l'attachement de la toxine a lieu non avec une protéine ou une glycoprotéine, mais probablement avec les lipides membranaires. Les auteurs montrent que l'attachement conduit à une association stable avec la bicouche lipidique, et à une internalisation de la toxine STb. L'ensemble des résultats obtenus jusqu'ici nous informe peu sur l'action directe de STb au niveau de la surface cellulaire. Par ailleurs, aucune étude n'a encore été réalisée au niveau du tissu cible, soit le petit intestin porcin.

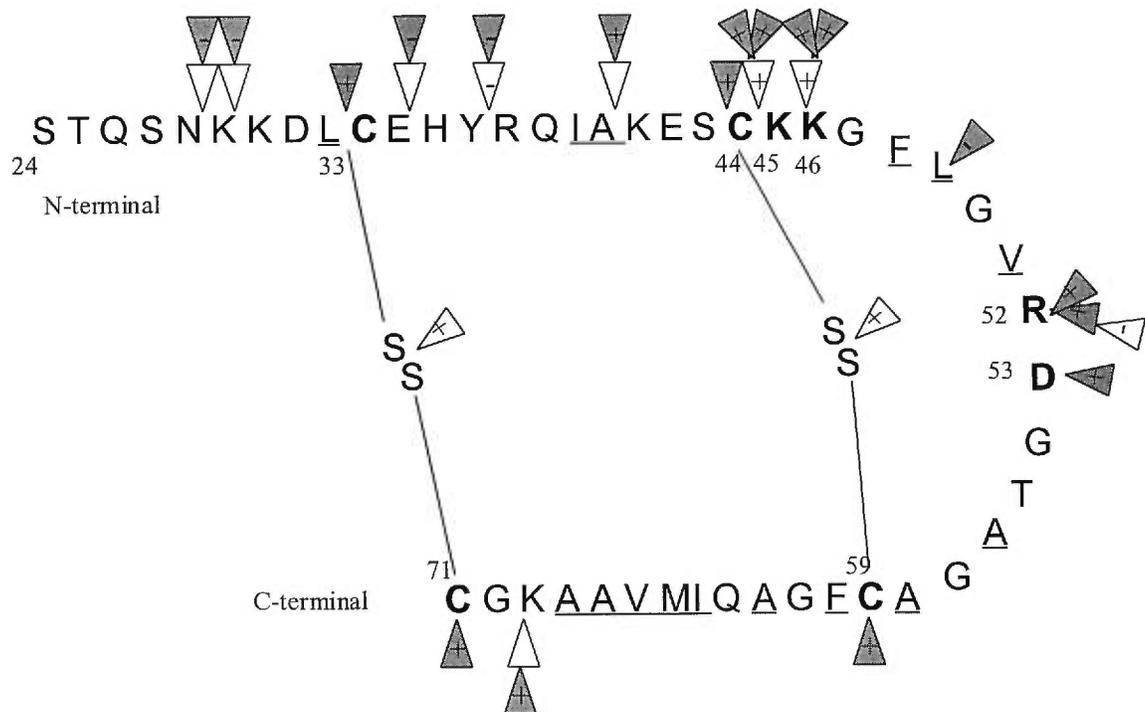


Figure 5. Relations de structure/fonction basées sur les modifications d'acides aminés de l'entérotoxine STb, d'après les études menées par Arriaga *et al.* (1995), Fujii *et al.* (1994), Dreyfus *et al.* (1992), et sur la structure établie par Sukumar *et al.* (1995).

X : acide aminé hydrophobe (non polaire); X : acide aminé hydrophile (polaire); SS: pont disulfure; ▽ : point de modification chimique; ▴ : point de modification par mutagenèse dirigée; + : activité toxique affectée du mutant; - : activité toxique intacte du mutant; X : acide aminé important dans la toxicité.

1. 3. 2. Attachement avec la membrane plasmique

La partie N-terminale amphipatique hélicoïdale des résidus 33 à 46 de STb correspond à un motif connu ayant la propriété de s'associer aux lipides membranaires (Segrest *et al.*, 1990; Sukumar *et al.*, 1995). Chao et Dreyfus (1997a) ont montré qu'après attachement à la surface, la toxine s'intègre de façon stable dans la membrane plasmique des cellules épithéliales intestinales en culture (Fig. 4). Récemment, une étude sur l'attachement de STb avec des cellules épithéliales intestinales isolées de rat a été abordée (Chao et Dreyfus, 1997b). Les résultats de cette étude confirment que STb peut s'associer avec la bicouche lipidique. En effet, l'attachement avec les cellules est résistant aux faibles concentrations d'ions divalents (CaCl_2 et MgCl_2), et est sensible au tétraméthylurée, un fort inhibiteur des interactions hydrophobes. D'après Handl *et al.* (1993), le pI hautement basique de STb (9.6) suggère que les acides aminés polaires chargés positivement doivent être exposés, et peuvent favoriser une association avec les surfaces polaires chargées négativement. Néanmoins, les résultats de Chao et Dreyfus (1997b) suggèrent que STb interagit avec les lipides de la membrane plasmique par les queues d'acides gras hydrophobes et non polaires, plutôt que par les têtes polaires anioniques des phospholipides.

Chao et Dreyfus (1997a) ont démontré que la toxine STb est internalisée (Fig. 4). Le mécanisme d'internalisation utilisé est encore indéterminé. Que ce soit avec des cellules différenciées ou non, une quantité significative de toxine est retrouvée libre dans le cytoplasme. Les auteurs suggèrent qu'aucun des mécanismes classiques connus suite à l'attachement « ligand-récepteur » n'est impliqué, à savoir l'endocytose dépendante ou indépendante de clathrine, l'internalisation calvéolaire ou la micropinocytose. En effet, le processus utilisé dans l'internalisation de STb est indépendant de la température ou encore du réarrangement du cytosquelette, de l'énergie ou de conditions hypertoniques. La toxine semble traverser librement la bicouche lipidique.

Hitotsubashi *et al.* (1994) ont mis en évidence l'attachement spécifique de la toxine STb avec une protéine de 25 kDa non glycosylée. Cette dernière est issue d'extraits protéiques membranaires de cellules épithéliales, obtenus par solubilisation avec un détergent. L'attachement de STb avec cette protéine de 25 kDa a été observé uniquement pour l'intestin, et pas pour la rate, le foie, le poumon et le rein. Chao et Dreyfus (1997a) n'ont pu confirmer ce résultat avec les lignées cellulaires intestinales, où les protéines membranaires n'étaient pas extraites par un détergent. Par conséquent, ces auteurs ont

suggéré que la protéine de 25 kDa identifiée par Hitotsubashi *et al.*, (1994) n'est pas exposée en surface cellulaire, mais est plutôt soit cytoplasmique, soit intramembranaire. Cette protéine pourrait donc être une cible pour la toxine STb, mais pas au niveau de la surface extracellulaire. Actuellement, il est postulé que la toxine STb, dans sa forme associée à la membrane plasmique, doit interagir avec une protéine G ou une autre protéine régulatrice périphérique (Fig. 4). La protéine de 25 kDa, fixant spécifiquement la toxine, pourrait être une molécule cible activée directement par STb dans les cellules entérochromaffines ou dans les cellules épithéliales (Harville *et al.*, 1995; Harville et Dreyfus, 1996; Chao et Dreyfus, 1997a).

1. 3. 3. Attachement avec la surface cellulaire

Pour permettre cette association hydrophobe avec les queues des phospholipides membranaires, un attachement de la toxine STb avec la surface cellulaire doit fort probablement précéder l'insertion de la toxine dans la bicouche lipidique (Fig. 4). D'après les travaux de Chao et Dreyfus (1997a), STb démontre un attachement spécifique avec la surface des cellules épithéliales intestinales HT29 et T84 en culture. L'attachement de STb avec les cellules est indépendant de la température à 4, 22 ou 37 °C, et, présente un taux d'association constant et rapide de $0.2 \pm 0.3/ \text{min}$, atteignant l'équilibre entre 5 et 10 minutes. De plus, un nombre très élevé de sites d'attachement est présent à la surface des cellules ($\geq 10^6$ par cellule).

Le programme LIGAND utilisé pour analyser les résultats des expériences de Scatchard a permis de démontrer qu'aucun récepteur de forte affinité n'est impliqué à la surface des cellules testées. L'attachement de STb avec les cellules est de faible affinité ($K_D \leq 10^{-5}$ M). Le profil de compétition obtenu étant graduel et limité, même avec un excès de 1000 fois de toxine non marquée, les auteurs suggèrent l'existence de multiples récepteurs à la surface cellulaire. Néanmoins, les auteurs soulignent que le programme LIGAND utilisé n'est pas adapté pour déterminer s'il y a plus d'une spécificité d'attachement sur la molécule de STb.

Chao et Dreyfus (1997a) ont étudié ensuite l'implication de certaines structures à la surface cellulaire dans l'attachement de STb. Ce dernier n'est pas affecté lorsque les cellules HT29 et T84 sont soumises à une protéolyse à l'aide de la trypsine, indiquant que

les protéines ne sont pas impliquées. L'action de l'endoglycosidase F/peptide N-glycosidase F, ainsi que l'action de la tunicamycine, clivant ou inhibant respectivement toute glycosylation en liaison N- aux protéines de surface, n'affectent pas l'attachement de STb. L'attachement n'a donc pas lieu avec une glycoprotéine portant des liaisons N-glycosidiques. L'attachement de STb n'implique pas non plus les sulfates des protéoglycans de surface, le chlorate de sodium qui inhibe la sulfatation des glycosaminoglycans n'ayant aucun effet. Le rôle des acides sialiques a été également étudié grâce au traitement des cellules avec la neuraminidase de *Vibrio cholerae*. Les auteurs concluent que les acides sialiques terminaux ne semblent pas impliqués. Une dernière étude a été abordée sur l'attachement de STb avec les lipides neutres, les glycolipides et les phospholipides isolés à partir des cellules épithéliales intestinales de rat (Chao et Dreyfus, 1997b). STb s'attache avec différentes affinités à certains lipides commerciaux purs. Le lactosylcéramide et l'acide arachidonique présentent une affinité plus élevée que les phospholipides, le cholestérol ou les glycolipides portant des acides sialiques (gangliosides). Cette étude est encore trop succincte pour permettre de définir l'implication des lipides et des glycoconjugués lipidiques dans l'attachement de STb à la surface cellulaire.

1. 3. 4. Récepteur pour la toxine STb

La spécificité du processus d'action décrit précédemment nous conduit à penser que STb interagit spécifiquement avec un récepteur (Fig. 4). Cependant, aucun récepteur membranaire pour STb n'a été identifié. Les entérotoxines ont en général une forte affinité pour l'épithélium intestinal, et particulièrement pour la bordure en brosse des entérocytes. De nombreuses études ont montré que ces toxines s'attachent de façon spécifique avec les cellules par l'intermédiaire de récepteurs fonctionnels. On considère, en effet, qu'un récepteur membranaire pour une toxine est un site présent sur les tissus auxquels la toxine est fixée spécifiquement, et cet attachement est corrélé à l'activité biologique de la toxine. Il est généralement acquis que la stimulation directe et très rapide d'un mécanisme d'action spécifique par une quantité minime de toxine ne peut être gouvernée que par la présence de récepteurs spécifiques à la surface cellulaire. Les travaux étant très récents, l'étape d'initiation du mécanisme d'action de STb à la surface cellulaire reste encore indéterminée, et plusieurs points de complexité sont à prendre en compte.

La spécificité tissulaire et/ou cellulaire de l'action de STb n'est pas claire. Hitotsubashi *et al.* (1994) démontrent une spécificité d'attachement de STb au tissu intestinal *via* une protéine membranaire de 25 kDa. En revanche, Dreyfus *et al.* (1993) supposent qu'un récepteur pour STb doit être présent à la fois sur les types cellulaires d'origine intestinale ou non. Chao et Dreyfus (1997a) montrent que l'attachement est de moindre affinité pour les cellules CHO et les fibroblastes par rapport aux cellules épithéliales intestinales HT29 et T84. Aucune différence n'est observée quant au taux d'attachement de STb du côté membranaire apical ou basolatéral des cellules intestinales. Lorsqu'un quart de la quantité de toxine liée est intégré dans le cas des cellules polarisées, alors la moitié l'est dans le cas des cellules indifférenciées. Dans l'ensemble, *in vivo*, la toxine STb a le potentiel d'agir directement sur plusieurs types de cellules, à savoir les cellules épithéliales et les cellules entérochromaffines de la muqueuse épithéliale, et probablement sur les cellules musculaires lisses de la musculature (Hitotsubashi *et al.*, 1992b; Dreyfus *et al.*, 1993; Harville et Dreyfus, 1996; Chao et Dreyfus, 1997a). Dans la mesure où la toxine est sécrétée dans la lumière intestinale, l'action primaire et directe de STb doit avoir lieu au niveau de la surface des cellules intestinales en contact avec la lumière.

Un autre point d'interrogation concerne le nombre de récepteurs pour STb. L'action directe et primaire de STb apparaît mettre en jeu sélectivement plusieurs voies de signalisation moléculaire. Le mécanisme dépendant de l'augmentation du taux de calcium intracellulaire, décrit dans la figure 4, comporte l'activation d'une protéine G et la stimulation de l'ouverture d'un canal à calcium, l'activation d'une kinase dépendante de la calmoduline, et l'activation de phospholipases, l'augmentation des taux d'acide arachidonique et de prostaglandine E₂. Le mécanisme serait indépendant du calcium dans les cellules sécrétoires entérochromaffines et conduirait à la synthèse et l'exocytose de la 5-hydroxytryptamine *via* l'activation directe d'une protéine G. Le mécanisme utilisé par STb, et dont le rôle est le plus hypothétique, est celui de l'insertion membranaire de la toxine, de son association avec la bicouche lipidique et de son internalisation dans la cellule.

La distribution et la composition des lipides et des protéines en fonction des types cellulaires doivent probablement être responsables des différences de résultats observées. Les données suggèrent que STb implique plusieurs spécificités d'attachement de faible affinité. Enfin, ces sites seraient présents en densité élevée à la surface des cellules épithéliales intestinales. La nature de ces sites d'attachement de surface ne serait ni

protéique, ni glycoprotéique, mais probablement lipidique, voire glycolipidique. Les fractionnements comme les cultures primaires à partir de tissus sont souvent difficiles à produire, et les cultures cellulaires montrent des différences importantes comparées avec les cellules correspondantes *in vivo*. Un système d'étude sur l'hôte s'avère crucial dans le but d'identifier une ou des molécules fonctionnant comme récepteur pour la toxine STb à la surface de la muqueuse intestinale.

2. Interactions des toxines bactériennes entériques avec la muqueuse intestinale

2. 1. Bases physiologiques cellulaires

2. 1. 1. Complexité de la pathophysiologie intestinale

L'épithélium intestinal représente la plus étendue des interfaces entre l'environnement externe et le milieu interne de l'hôte. C'est une structure complexe contenant de nombreux types cellulaires (Fig. 6). Les villosités de la muqueuse font saillie dans la lumière de l'intestin. Chaque villosité comprend un axe central de tissu conjonctif et une couche de cellules épithéliales columnaires appuyée sur une lame basale. Les cellules épithéliales sont générées à la base des villosités, et se différencient lorsqu'elles migrent jusqu'au sommet des villosités, où elles sont ensuite éliminées par desquamation. Les microvillosités des entérocytes se projettent du pôle apical des cellules vers la lumière pour former ensemble une bordure en brosse absorbante. Elles sont constituées par des plissements membranaires et offrent une grande surface d'échange. En fait, le mécanisme sécrétoire est peu sollicité dans les conditions usuelles, mais est une des composantes fondamentales des diarrhées les plus sévères. Les entérocytes possèdent, dans leur membrane apicale, des canaux protéiques qui ont des propriétés spécifiques dans le transport des ions. Pour causer une diarrhée, un pathogène entérique doit interférer avec les fonctions sécrétoires des cellules intestinales de façon directe ou indirecte. Les effets directs sont généralement attribués aux entérotoxines. Une activité sécrétoire est déclenchée dans certaines portions de l'intestin, suite à une diminution de la réabsorption du sodium et à une augmentation de la sécrétion du chlore, ou de bicarbonate. Cette accumulation d'électrolytes dans la lumière intestinale entraîne, par phénomène d'osmose, une perte d'eau des cellules épithéliales (Keusch et Donowitz, 1983). Plusieurs facteurs de l'hôte, tels que les neurohormones libérées par les cellules entérochromaffines, les neurotransmetteurs du SNE, les cellules musculaires intestinales, les cytokines libérées par les cellules épithéliales ou les cellules immunitaires de la sous-muqueuse, peuvent contribuer à la sécrétion intestinale, et donc indirectement à l'action des entérotoxines (Sears et Kaper, 1996).

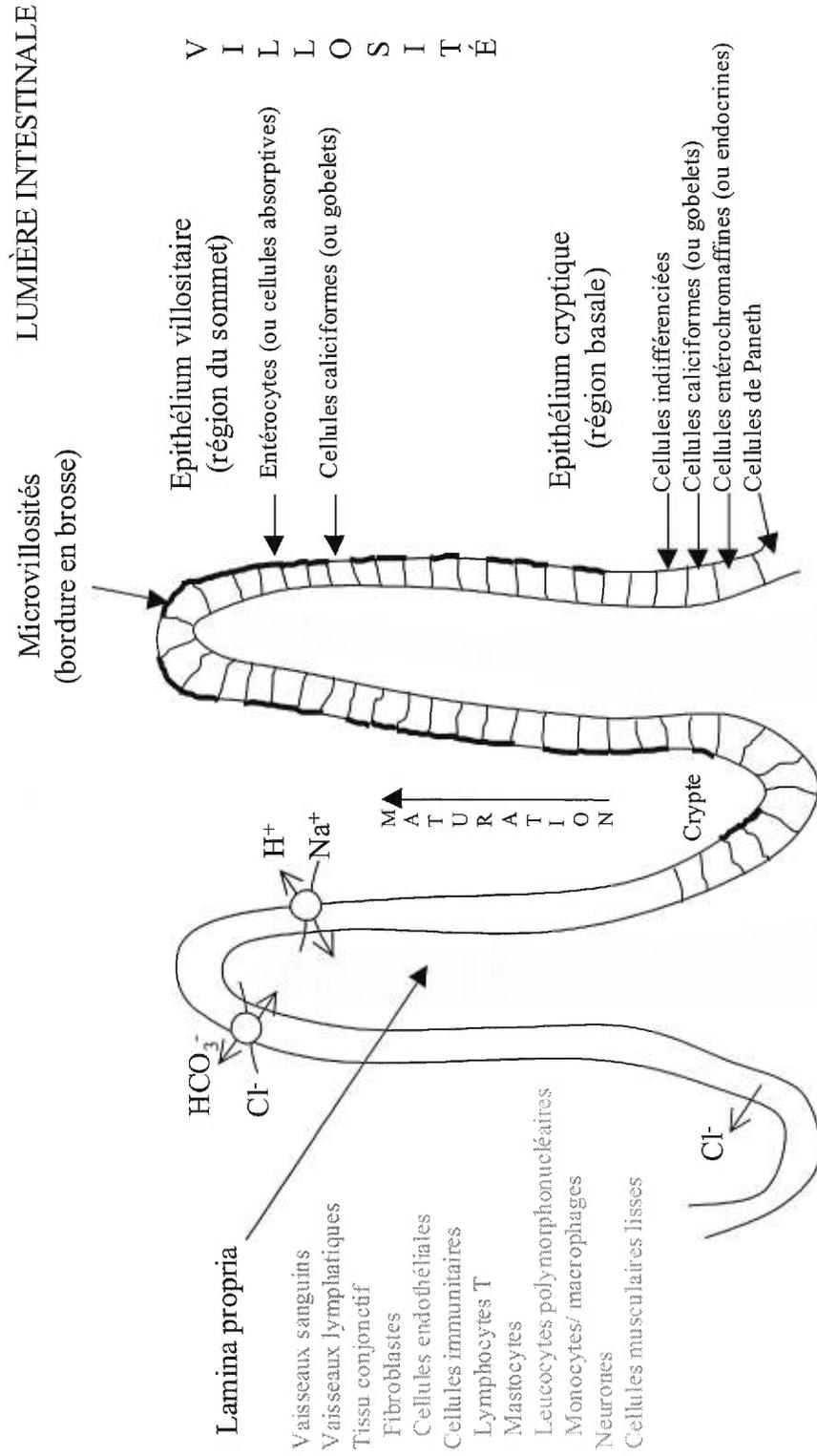


Figure 6. Coupe longitudinale de villosités de la muqueuse intestinale montrant les composants cellulaires et l'organisation histologique. Les transports d'ions principaux des cellules épithéliales sont représentés: l'absorption du sodium Na^+ (∇), la sécrétion de chlore Cl^- , et la sécrétion de bicarbonate HCO_3^- (\uparrow).

Les entérotoxines bactériennes protéiques sont généralement classées selon leurs caractéristiques biochimiques et structurales d'une part : masse moléculaire, nombre de sous-unités, sensibilité à la chaleur ou aux enzymes et d'autre part, selon leurs modes d'action ou leurs types d'activités biologiques. Sur la base de cette dernière classification, ces molécules peuvent être distinguées en 2 groupes: les entérotoxines cytotoniques et les entérotoxines cytotoxiques (Gemmell, 1984; Fasano *et al.*, 1990; Lucas *et al.*, 1991). Les entérotoxines cytotoniques affectent les cellules épithéliales intestinales pour en altérer directement les fonctions sécrétoires. Le caractère principal de ces entérotoxines réside dans leur pouvoir d'induire une réponse sécrétoire en anses intestinales ligaturées chez un modèle animal (Bergdoll, 1988). La toxine du choléra et les entérotoxines produites par les *E. coli* enterotoxinogènes (ETEC) provoque ce type de diarrhée non-inflammatoire rapide et déshydratant. Par contre, les entérotoxines cytotoxiques, peu ou pas actives dans les anses intestinales ligaturées, agissent sur l'épithélium intestinal en y provoquant des dommages histologiques importants. Les représentants des entérotoxines cytotoxiques les plus connus sont les vérotoxines VT1, VT2 (ou toxine « Shiga-like », SLTI, SLTII) des *E. coli*, la toxine Shiga ou vérotoxine de *Shigella*, la toxine A de *Clostridium difficile* et l'entérotoxine CPE de *Clostridium perfringens*.

Il n'est cependant pas toujours évident de grouper chaque toxine entérique dans l'un de ces 2 types d'activité. Par ailleurs, l'augmentation de la réponse sécrétoire d'une toxine peut aussi dépendre, non seulement de facteurs de l'hôte, mais aussi de plusieurs facteurs bactériens, tels que les facteurs de colonisation intestinale, et/ou les facteurs d'invasion de l'épithélium. L'expression d'une protéine de virulence peut également avoir un effet sur un autre facteur de virulence. Par exemple, la neuraminidase produite par *V. cholerae* catalyse la conversion de longs gangliosides en monosialogangliosides GM1. GM1 étant le récepteur de la toxine CT, cela permet d'augmenter l'attachement de la toxine avec les cellules et donc la réponse sécrétoire de CT (Galen *et al.*, 1992).

2. 1. 2. Attributs d'un récepteur membranaire pour une entérotoxine

Les neurotransmetteurs, les hormones, incluant les facteurs de croissance, et les messagers du système immunitaire, tels que les cytokines, exercent leurs actions sur les cellules cibles par l'intermédiaire de récepteurs membranaires. Seules les hormones liposolubles et de petite taille traversent directement la membrane plasmique.

Classiquement, les sites d'attachement des récepteurs sont occupés par un agoniste, c'est-à-dire la molécule qui va induire une réponse à partir du récepteur. Le processus utilisé, appelé « transduction du signal », implique 2 étapes consécutives caractéristiques. Le récepteur capte le messenger physiologique extracellulaire, puis communique l'information au compartiment intracellulaire. Le signal intracellulaire va à son tour propager la réponse pour activer la sécrétion, le métabolisme, la contraction, la croissance ou d'autres effets de la régulation cellulaire. Les cellules intestinales possèdent 4 voies intracellulaires principales pour réguler le transport transépithélial des ions : les voies dépendantes du Ca^{2+} , le GMPc, l'AMPc et le réarrangement du cytosquelette (Keusch et Donowitz, 1983; Weikel *et al.*, 1985; Fasano, 1997). Une toxine entérique peut donc utiliser au moins l'un de ces régulateurs du transport des électrolytes des cellules intestinales pour induire une sécrétion, ou d'autres voies pour exercer des effets physiologiques propres aux cytotoxines.

Les connaissances sur les mécanismes d'action de chaque toxine varient considérablement. Pour quelques cas seulement, le mécanisme moléculaire est compris en détail. Les toxines bactériennes sont généralement divisées en deux groupes en fonction de leur site d'action : celles qui agissent sur une cible intracellulaire et celles qui agissent sur la membrane plasmique (Eidels *et al.*, 1983; Menestrina *et al.*, 1994; Ganguly et Kaur, 1996). Certaines toxines agissent sur un récepteur stimulant la libération ou la production d'un second messenger intracellulaire (comme le GMPc ou le calcium), qui active souvent une kinase. D'autres agissent sur la cellule *via* une activité enzymatique intrinsèque. Ce sont le plus souvent les toxines de type A-B. La sous-unité B (« Binding ») permet la liaison de la toxine au récepteur de la cellule eucaryote, alors que la sous-unité A (« Activity »), qui possède une fonction enzymatique spécifique agissant à l'intérieur de la cellule, est transloquée à travers la membrane cellulaire eucaryote vers son substrat dans le cytosol. Enfin, des toxines s'insèrent directement dans la membrane plasmique, créant un pore de plus ou moins grande taille. La réponse des entérotoxines dites cytotoniques implique souvent l'activation d'un système cyclasique (adénylate ou guanylate cyclase). Le mécanisme d'action des entérotoxines dites cytotoxiques est généralement moins connu, mais est corrélé dans la plupart des cas à une perturbation des grandes fonctions cellulaires, comme la synthèse protéique, ou la perméabilité aux ions, aux acides aminés ou au glucose.

Comme pour les hormones, la sélectivité de la réponse aux toxines dépend en général de récepteurs particuliers à la surface des cellules. Dans le processus d'action d'une toxine,

l'attachement à la surface des cellules animales de l'hôte est reconnu comme une étape caractéristique essentielle à comprendre pour déterminer comment les fonctions intestinales sont spécifiquement altérées pour provoquer une diarrhée. L'attachement des entérotoxines constitue en l'occurrence l'étape initiale de la pathologie, et en conséquence, les récepteurs membranaires des entérotoxines jouent un rôle aussi important que les toxines elles-mêmes au niveau des infections intestinales. Le tableau 1 récapitule les entérotoxines bactériennes associées à une diarrhée et dont le récepteur membranaire est connu.

2. 1. 3. Diversité fonctionnelle de l'attachement d'une entérotoxine

2. 1. 3. 1. Activation de l'adénylate cyclase

Parmi les mécanismes d'action établis chez les entérotoxines bactériennes, le mieux compris à un niveau moléculaire est celui de la toxine cholérique (CT). De nombreuses études ont montré que CT reconnaissait un récepteur spécifique unique, le glycolipide GM1, à la surface de nombreuses cellules, et induisait une élévation du taux d'AMPc proportionnel au nombre de sites reconnus (van Heyningen *et al.*, 1971; Cuatrecasa, 1973; Holmgren *et al.*, 1975; Fishman et Atikkan, 1980; Fishman, 1982a; Griffiths *et al.*, 1986).

La toxine CT exerce son activité toxique en se fixant à la surface cellulaire par l'intermédiaire de ses 5 sous-unités B. Les sous-unités B forment une structure pentamérique très stable, tel un anneau étroit, avec un trou central où est connectée la sous-unité A (Sixma *et al.*, 1991; Sixma *et al.*, 1993a; Sixma *et al.*, 1993b). La sous-unité A comprend 2 composants (A1 et A2) générés par protéolyse et reliés par un pont disulfure. Le fragment A1 possède l'activité ADP-ribosyltransférase, et le fragment A2 assure la liaison de la sous-unité A1 et du pentamère de sous-unités B. Chaque sous-unité B porte un site d'attachement spécifique de la portion glucidique du ganglioside GM1. Les 5 sous-unités de la toxine CT s'attachent en fait avec 5 molécules de GM1 (Miller-Podraza *et al.*, 1982). Les sites d'attachement des sous-unités B sont localisés au niveau de la surface externe du cylindre formé par le pentamère. Ainsi, un attachement étroit a lieu entre la base de l'anneau de sous-unités B et la bicouche *via* des sites saccharidiques liés à des lipides.

Tableau 1. Récepteurs rapportés chez les toxines bactériennes entériques associées à une sécrétion intestinale.

Sources bactériennes	Entérotoxines	Récepteurs membranaires	Références
<i>Aeromonas</i> (<i>A. hydrophila</i> , <i>A. sobria</i>)	Aérolysine	Glycosylphosphatidylinositol-Thyroglobuline 1 Glycophorine	Nelson <i>et al.</i> , 1997 Garland et Buckley, 1988
<i>Campylobacter jejuni</i>	Entérotoxine CJT (ou LT-like)	Monosialoganglioside GM1	Klipstein et Engert, 1985; Calva <i>et al.</i> , 1989
<i>Clostridium difficile</i>	Toxine A (CdTa)	Glycolipide ou glycoprotéine (nLc5Cer, Ag X, Ag Y, Ag I) Sucrase isomaltase	Krivan <i>et al.</i> , 1986; Tucker et Wilkins, 1991; Pothoulakis <i>et al.</i> , 1991, Teneberg <i>et al.</i> , 1996; Smith <i>et al.</i> , 1997 Pothoulakis <i>et al.</i> , 1996
<i>Clostridium perfringens</i> (types A, D et C)	Entérotoxine CPE	Protéine CPE-R (22.029 kDa) Autre protéine	Katahira <i>et al.</i> , 1997a, 1997b
<i>E. coli</i> entéroaggrégative	Entérotoxine thermostable EAST1	Guanylate cyclase C (GC-C)	Savarino <i>et al.</i> , 1993
<i>E. coli</i> entérotoxinoène	Toxine thermostable STa	GC-C Autre molécule ?	Giannella <i>et al.</i> , 1983; Schultz <i>et al.</i> , 1990; de Sauvage <i>et al.</i> , 1991 Almenoff <i>et al.</i> , 1994; Mann <i>et al.</i> , 1993
	Toxine thermolabile LT-Ip	GM1	Holmgren <i>et al.</i> , 1973; Moss <i>et al.</i> , 1979
	Toxine thermolabile LT-Ih	Galactoprotéines Polyglycosylcéramides	Holmgren <i>et al.</i> , 1982; Zemelman <i>et al.</i> , 1989; Griffiths et Critchley, 1991; Shida <i>et al.</i> , 1994, 1996; Orlandi <i>et al.</i> , 1994
	Toxine thermolabile LT-IIa	Disialoganglioside GD1b	Fukuta <i>et al.</i> , 1988; Connell <i>et al.</i> , 1995; van den Akker <i>et al.</i> , 1996
	Toxine thermolabile LT-IIb	Disialoganglioside GD1a	Lingwood <i>et al.</i> , 1987; O'Brien <i>et al.</i> , 1987; Waddel <i>et al.</i> , 1988, 1990
<i>E. coli</i> vérotoxinoène	Vérotoxines VT-I et VT-II	Globotriosylcéramide Gb3 Galactosylglobotetraosylcéramide Gb5	De Grandis <i>et al.</i> , 1989; Samuel <i>et al.</i> , 1990; Keusch <i>et al.</i> , 1995 Khuruna <i>et al.</i> , 1991
<i>Salmonella typhimurium</i>	Vérotoxine VTe (VT-IIv) Toxine Stn	Globotetraosylcéramide Gb4 GM1 ?	De Grandis <i>et al.</i> , 1989; Samuel <i>et al.</i> , 1990; Keusch <i>et al.</i> , 1995 Khuruna <i>et al.</i> , 1991
<i>Shigella dysenteriae</i> (<i>S. flexneri</i> , <i>S. boydii</i> , <i>S. sonnei</i>)	Toxine Shiga (vérotoxine)	Gb3 Glycoprotéine	Jacewicz <i>et al.</i> , 1986, 1989; Lindberg <i>et al.</i> , 1987 Keusch et Jacewicz, 1977; Keusch <i>et al.</i> , 1986
<i>Vibrio cholerae</i>	Toxine du choléra CT	GM1	van Heyningen <i>et al.</i> , 1971; Cuatrecasas, 1973; Holmgren <i>et al.</i> , 1975; Moss <i>et al.</i> , 1976; Magnani <i>et al.</i> , 1980; Fishman et Attikan 1980
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Hémolysine thermostable directe TDH	Trisialoganglioside GT1b ?	Fasano <i>et al.</i> , 1997

L'attachement à la cellule induit soit la translocation rapide de la sous-unité A1 directement à travers la membrane, soit l'endocytose de la toxine CT avec le fragment A1 restant associé à la membrane endosomale. Le mécanisme d'insertion membranaire n'est pas très clair (Tomasi et Montecucco, 1981; Sixma *et al.*, 1992). Il est proposé que le clivage du pont disulfure, libérant le fragment A1, rende ce fragment hydrophobe. De plus, les sous-unités B joueraient un rôle important dans l'orientation topologique de ce fragment par rapport à la surface membranaire. A l'intérieur de la cellule, la sous-unité A1 catalyse l'ADP-ribosylation d'une arginine (R201) de la sous-unité α de la protéine stimulatrice Gs de l'adénylate-cyclase intestinale (Levis et Bourne, 1992). Cette ADP-rybosylation bloque l'activité GTPase de la sous-unité α . La sous-unité α liée au GTP active alors en permanence la sous-unité catalytique de l'adénylate-cyclase. Une production constitutive d'AMPc intracellulaire est ainsi déclenchée. Cette augmentation d'AMPc active les protéines kinases dépendantes de l'AMPc (PKA), ce qui entraîne la phosphorylation de protéines membranaires, notamment les canaux de transport des ions tels que les canaux CFTR pour la sécrétion des ions de chlore dans la lumière intestinale (Cheng *et al.*, 1991).

La toxine LT d'*E. coli* reconnaît également le récepteur membranaire GM1, par l'intermédiaire de ses sous-unités B, et conduit aux mêmes effets dans les cellules et dans l'intestin que la toxine CT (Holmgren *et al.*, 1985; Griffiths *et al.*, 1986; Sixma *et al.*, 1991). Alors que la toxine CT s'attache au GM1 avec une grande sélectivité, la toxine LT fixe d'autres récepteurs membranaires, non reconnus par CT, et qui sont fonctionnels pour LT (Holmgren *et al.*, 1982; Zemelman *et al.*, 1989; Griffiths et Critchley, 1991; Orlandi *et al.*, 1994; Shida *et al.*, 1994). En raison de la présence souvent en grand nombre de récepteurs fonctionnels, uniquement reconnus par LT, l'attachement et la réponse de LT n'est pas inhibée par les sous-unités B de la toxine CT ajoutée en excès *in vitro* (Holmgren *et al.*, 1982). Le ganglioside GM1 semble être aussi le récepteur de l'entérotoxine CJT de *Campylobacter jejuni*, qui est une toxine proche de LT (Klipstein et Engert, 1985; Calva *et al.*, 1989). Par contre, l'aérolysine d'*Aeromonas* (*A. hydrophila* et *A. sobria* notamment) induit des effets proches de ceux de CT et de LT, notamment l'augmentation d'AMPc intracellulaire, mais ne reconnaît pas GM1 (Chopra *et al.*, 1992). L'aérolysine est tout de même assez éloignée fonctionnellement de CT et LT. Elle n'est pas seulement cytotonique, mais aussi cytotoxique, car elle induit la formation de pores membranaires (Chopra *et al.*, 1992).

2. 1. 3. 2. Activation de la guanylate cyclase

Une classe de toxines bactériennes entériques stimule directement une guanylate-cyclase, augmentant le taux intracellulaire de GMPc à l'origine de la fuite des électrolytes. L'exemple le plus connu est celui de la toxine thermostable STa d'*E. coli*. La toxine STa fixe et stimule la guanylate cyclase de type C (GC-C), qui est une protéine transmembranaire N-glycosylée, de 140 à 160 kDa, localisée au pôle apical des cellules épithéliales intestinales (Giannella *et al.*, 1983; Frantz *et al.*, 1984; Schultz *et al.*, 1990; Mezoff *et al.*, 1992; Vaandrager *et al.*, 1993).

L'attachement de STa à ce récepteur de surface cellulaire (appelé STaR/GC) induit un changement de conformation propageant la transduction du signal du côté intracellulaire, c'est-à-dire au niveau du domaine catalytique de l'enzyme. La protéine kinase C (PKC) phosphoryle et active ce domaine intracellulaire. Le site de phosphorylation serait la sérine en position 1029 du STaR/GC pour la PKC (Crane et Shanks, 1996). Ainsi, suite à l'attachement de STa, une production de GMPc est déclenchée, qui conduit à l'augmentation de la sécrétion intestinale de chlore et à l'inhibition de l'absorption de sodium (Field *et al.*, 1978; Guarino *et al.*, 1987a; Huott *et al.*, 1988; Forte *et al.*, 1992; Parkinson *et al.*, 1997).

Le ligand naturel qui stimule l'enzyme GC-C chez les mammifères est la guanyline, un peptide de 15 acides aminés présentant 50% d'homologie avec la toxine STa (Currie *et al.*, 1992; Greenberg *et al.*, 1997). Plusieurs autres toxines thermostables apparaissent appartenir à la même classe que STa. La toxine EAST1 des *E. coli* entéroaggrégatives est très apparentée à la guanyline. Le domaine d'attachement de la guanyline et de l'entérotoxine STa avec le récepteur protéique GC-C serait identique à celui de EAST1 (Savarino *et al.*, 1993; Yamamoto *et al.*, 1997). La toxine thermostable de *Yersinia enterocolitica*, souvent impliquée dans les gastroentérites de l'enfant, rappelle également STa par sa structure et son mode d'action (Robins-Browne *et al.*, 1993).

2. 1. 3. 3. Voie du calcium

Les ions Ca^{2+} sont soit sous forme libre, à une concentration maintenue à environ 100 mM dans la plupart des cellules, soit en réserve à des concentrations plus élevées dans différents compartiments, tels que les fluides extracellulaires ou interstitiels, les

mitochondries, et le réticulum endoplasmique. Plusieurs voies signalisatrices du calcium sont connues. Néanmoins, les mécanismes sont très peu définis pour les entérotoxines qui stimulent une sécrétion par des mécanismes dépendants de voies du calcium.

L'entérotoxine de *Clostridium perfringens* (CPE) est essentiellement cytotoxique, probablement en provoquant un arrêt de la synthèse protéique, mais elle induit aussi une réponse sécrétoire en anses ligaturées. Ses effets physiologiques sont en grande partie dus à un changement de la perméabilité des cellules, et notamment à un influx de Ca^{2+} (Matsuda et Sugimoto, 1979; McClane *et al.*, 1988b). CPE semble agir sur les cellules épithéliales par un mécanisme en plusieurs étapes : attachement avec la surface cellulaire, insertion membranaire puis formation d'un pore perméable aux ions (Sugimoto *et al.*, 1988; McClane et Wnek, 1990; Hanna et McClane, 1991). Le pore est constitué d'un hétérocomplexe entre la molécule de toxine et 2 protéines membranaires de 70 et 50 kDa (Wnek et McClane, 1986; Wnek et McClane, 1989; Katahira *et al.*, 1997a). L'attachement et l'insertion membranaire sont des étapes indépendantes des cations divalents, alors que les étapes consécutives sont dépendantes du calcium (Sherman *et al.*, 1994). La fixation de CPE sur les entérocytes impliquerait 2 classes distinctes de récepteurs protéiques, dont un a été récemment cloné (Katahira *et al.*, 1997a; Katahira *et al.*, 1997b).

Quelques données suggèrent également un mécanisme dépendant du calcium pour l'hémolysine thermostable directe TDH de *Vibrio parahaemolyticus* (Tang *et al.*, 1994; Raimondi *et al.*, 1995). Tang *et al.* (1994) suggèrent que l'hémolyse causée par TDH consiste en un processus comportant au moins 2 étapes, soit un attachement à la surface des érythrocytes précédant un attachement nécessaire à la formation de pores membranaires. Cette toxine apparaît s'attacher au trisialoganglioside GT1b comme récepteur de surface cellulaire (Raimondi *et al.*, 1995; Yoh *et al.*, 1995).

D'après les informations obtenus ces cinq dernières années, la toxine STb d'*E. coli* appartient à cette catégorie dont l'action initiale conduit à l'augmentation du taux de Ca^{2+} dans le cytosol (Fig. 4). Seules les étapes se déroulant dans les cellules épithéliales seraient dépendantes du calcium, alors que le mécanisme de libération de la 5-HT par les cellules entérochromaffines de la base des villosités serait indépendant du calcium (Harville et Dreyfus, 1996). Le calcium intracellulaire active le métabolisme de l'acide arachidonique pour la synthèse de la PGE2 (Fujii *et al.*, 1995), mais la voie principale serait celle de la calmoduline (Fujii *et al.*, 1997). Les différentes étapes seraient les suivantes : 1) la toxine

STb se fixe à un récepteur membranaire, encore non identifié, ce qui active une protéine G stimulant l'ouverture d'un canal et l'entrée du Ca^{2+} extracellulaire dans la cellule (Dreyfus *et al.*, 1993), 2) le Ca^{2+} intracellulaire active la calmoduline, une protéine complexant le Ca^{2+} , qui à son tour active la kinase II dépendante de la calmoduline (Fujii *et al.*, 1997), 3) la kinase II activée va probablement catalyser la phosphorylation de certaines protéines, telles que des protéines membranaires de transport des ions.

2. 1. 3. 4. Réarrangement du cytosquelette

Une autre voie des toxines bactériennes entériques pour communiquer avec les cellules intestinales est le réarrangement du cytosquelette. Le cytosquelette des entérocytes aide à maintenir la polarité et la structure des cellules épithéliales. L'actine est présente dans les cellules sous 2 formes majeures : l'actine G monomérique (globulaire) et l'actine F polymérique (filamenteuse). Cette dernière est le constituant principal des microfilaments du cytosquelette et des fibres de stress des cellules. L'actine F est donc à la base de la forme de la cellule et surtout à la base de fonctions cellulaires essentielles, telles que la motilité, l'adhésion, la phagocytose et la division.

Les entérotoxines les plus représentatives de cette catégorie sont des toxines clostridiales, comme la toxine C2 de *Clostridium botulinum* (Aktories et Wegner, 1992; Fritz *et al.*, 1995), ou la toxine A de *Clostridium difficile* (ou CDTa). Le récepteur de CDTa a été le plus étudié parmi ceux des entérotoxines ayant une activité dirigée contre l'actine (Krivan *et al.*, 1986; Clark *et al.*, 1987; Pothoulakis *et al.*, 1991; Tucker et Wilkins, 1991; Pothoulakis *et al.*, 1996; Teneberg *et al.*, 1996; Sauerborn *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997). CDTa est cytotonique et peut exercer aussi des effets cytotoxiques (Tucker *et al.*, 1990). L'activité enzymatique intrinsèque de la toxine A est l'activité glucosyltransférase. Elle modifie une thréonine (T37) des petites protéines G monomériques de sous-type Rhô. L'addition d'une seule molécule de glucose bloque l'association de la protéine Rhô avec son effecteur, dissociant les microfilaments d'actines F du cytosquelette endothélial, important dans la fonction de barrière de l'endothélium (Just *et al.*, 1995; Hippenstiel *et al.*, 1997). Toutefois, l'identification du récepteur n'est toujours pas clairement établie. Il semble que plusieurs récepteurs, à la fois de nature glycoprotéique et glycolipidique, soient reconnus au niveau des cellules épithéliales intestinales (Smith *et al.*, 1997).

2. 1. 3. 5. Arrêt de la synthèse protéique

La vérotoxine (ou toxine Shiga) de *Shigella dysenteriae* type 1 et les vérotoxines VT, (ou SLT) apparentées chez *E. coli* sont des toxines A-B (O'Brien et Holmes, 1987; Stein *et al.*, 1992; Jemal *et al.*, 1995), pour lesquelles le mécanisme d'action a été partiellement élucidé. Les vérotoxines provoquent un détachement et une destruction irréversible des cellules Vero en culture, et induisent une réponse sécrétoire et entéronécrosante dans l'intestin. L'activité sécrétoire est encore mal comprise, mais l'effet cytotoxique est aujourd'hui bien expliqué (Gyles, 1992; Takeda, 1997).

L'attachement du pentamère de sous-unités B induit l'entrée de la sous-unité A dans la cellule (Sandvig *et al.*, 1989). La toxine est internalisée par voie endocytosique, et les vésicules formées, contenant la toxine, fusionnent avec des lysosomes. La sous-unité A1 provenant du clivage du composant A (par réduction d'un pont disulfure) passe dans le cytosol où elle s'associe à la sous-unité 60S du ribosome (Reisbig *et al.*, 1981). L'activité N-glycosidase de la sous-unité A1 clive l'adénine en position 4324 de l'extrémité 3' de l'ARNr 28S du complexe ribosomal, inhibant l'action du facteur d'élongation peptidique, et donc la synthèse protéique (Endo *et al.*, 1988; Tesh et O'Brien, 1991b). L'inhibition de la synthèse protéique aboutit à la mort de la cellule. Ce mécanisme rend compte de l'activité entéronécrosante de la vérotoxine. L'effet sécrétoire serait corrélé à la destruction des cellules épithéliales impliquées dans l'absorption intestinale du sodium.

Le pentamère de sous-unités B de la vérotoxine se fixe aux membranes cellulaires sur un récepteur spécifique. Le globotriosylcéramide Gb3 (le glycolipide du groupe sanguin P) est le récepteur à la fois pour la toxine Shiga, et pour les toxines VTI et VTII (Jacewicz *et al.*, 1986; Lindberg *et al.*, 1987; Waddel *et al.*, 1988). Le récepteur de la toxine Shiga a été mis en évidence principalement sur les cellules Hela et les cellules Vero. En fait, peu de lignées cellulaires reconnaissent cette toxine, et il est intéressant de remarquer que, mis à part les cellules Véro, seules les cellules humaines y sont sensibles (Eiklid et Olsnes, 1980). Il a été montré que la toxine Shiga *in vivo* ne s'attache qu'aux cellules villositaires qui contiennent Gb3 et non aux cellules cryptiques qui sont démunies de ce glycolipide (Kandel *et al.*, 1989). Cet attachement sélectif permet à la toxine Shiga d'affecter essentiellement l'absorption du sodium propres aux cellules du sommet des villosités, et d'altérer légèrement et indirectement la sécrétion de chlore par les cellules cryptiques à la base des villosités.

2. 1. 3. 6. Formation de pores membranaires

Plusieurs entérotoxines bactériennes exercent une action commune sur la membrane plasmique des cellules, à savoir la formation de pores. L'insertion membranaire d'une toxine avec création dans la bicouche lipidique d'un pore conduisant à la sécrétion est un mécanisme encore hypothétique chez les toxines bactériennes entériques. Il est d'ailleurs possible que seule la formation de pores ne soit pas suffisante pour causer une réponse sécrétoire du tissu intestinal. Par exemple, la toxine TDH et la toxine CPE citées plus haut peuvent causer la formation de canaux perméables aux ions, et le mécanisme utilisé apparaît principalement être dépendant des voies du calcium.

De manière générale, il semble que la concentration de toxine soit importante dans l'attachement des toxines formant des pores. La toxine α de *S. aureus* est la mieux connue parmi ces toxines. Il a été montré que l'attachement de la forme monomérique de la toxine α peut avoir lieu soit avec un récepteur protéique spécifique de forte affinité (Hildebrand *et al.*, 1991), soit avec des lipides (Forti et Menestrina, 1989). Le processus d'oligomérisation, d'insertion et de formation d'un pore transmembranaire semble dépendre de la présence de récepteurs spécifiques lorsque la concentration de toxine est très faible à la surface cellulaire. Les récepteurs ont probablement pour rôle de concentrer la toxine par diffusion latérale à la surface de la bicouche, favorisant alors l'oligomérisation et l'insertion. Le mode d'action pour la formation de pores par l'aérolysine d'*Aeromonas* est apparenté à celui de la toxine α . Les pores de l'aérolysine sont légèrement sélectifs en anions, à la différence des pores formés par CPE et TDH (Chakraborty *et al.*, 1990). L'aérolysine s'attache aux cellules par un récepteur, et forme alors un canal heptamérique dans la membrane (Buckley, 1992; Wilmsen *et al.*, 1992; Moniatte *et al.*, 1996). L'attachement précède l'étape d'oligomérisation, et cette dernière est requise pour la formation du pore dans la bicouche lipidique (Garland et Buckley, 1988). Les sites requis pour l'attachement sont distincts de ceux nécessaires à l'oligomérisation et à la formation de pores. Le récepteur fonctionnel de l'aérolysine serait la glycophorine dans certains cas, ou la thyroglobuline-1 ancrée à un glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Garland et Buckley, 1988; Buckley, 1992; Cowell *et al.*, 1997; Nelson *et al.*, 1997). Il est important de noter que les protéines ancrées au GPI ont le potentiel d'une très grande mobilité latérale, ce qui est un avantage pour une toxine qui doit devenir compétente dans l'oligomérisation après l'attachement pour s'insérer dans la membrane.

Des structures secondaires caractéristiques sont partagées par les toxines formant des pores. La toxine α de *S. aureus* comporte des hélices α amphipatiques et hydrophobes dans sa région N-terminale. Cette propriété structurale est retrouvée chez le mastoparan du venin de serpent, l'équinoxine d'anémone de mer, des peptides de fusion membranaire de certains virus (Katsu *et al.*, 1990; Thiaudiere *et al.*, 1991; Belmonte *et al.*, 1994). Cette région servirait à l'ancrage d'un monomère de la toxine dans la bicouche lipidique et à l'association des monomères entre eux. Il est intéressant de rappeler que la toxine STb d'*E. coli* comporte également ce motif N-terminal, et qu'elle s'insère de façon stable dans la membrane plasmique (Sukumar *et al.*, 1995; Chao et Dreyfus, 1997a). De plus, la toxine STb, similairement à la toxine α , comporte une zone flexible riche en glycine connectant les 2 régions N- et C- terminales (Fig. 3). Cependant, le rôle de cette insertion membranaire dans l'action de la toxine STb n'a pas été élucidé.

2. 2. Bases biochimiques cellulaires

2. 2. 1. Nature et structure d'un site d'attachement d'un récepteur

2. 2. 1. 1. Différents constituants de la surface cellulaire

Les récepteurs pour les entérotoxines bactériennes présentent une diversité au niveau de leurs fonctions et également au niveau de leurs structures et de leurs spécificités. Dans les mécanismes moléculaires de pathogénèse, la grande majorité des associations connues apparaissent basées sur la reconnaissance spécifique d'un ligand protéique par un glycoconjugué à la surface de la cellule hôte. Le plus souvent, la partie glycosylée est impliquée dans la spécificité de l'attachement (Dimmock, 1982; Eidels *et al.*, 1983; Jones et Isaacson, 1983; Bernardi *et al.*, 1997). Chez les toxines bactériennes entériques, les sites d'attachement glycosylés, dont les structures sont les mieux décrites, sont le monosialoganglioside GM1 pour les toxines CT et LT, et le globotriosylcéramide Gb3 pour les vérotoxines.

Certaines interactions protéine-protéine sont également connues entre pathogène et hôte (Beachey *et al.*, 1988). La séquence en acides aminés détermine le site d'attachement (Janin et Chothia, 1990). En général, chez les toxines bactériennes, les toxines possédant

plusieurs domaines d'attachement, comme CT, LT ou VT, reconnaissent la partie glucidique portée par des lipides ou des protéines, alors que les toxines présentant un seul domaine d'attachement, comme la toxine diphtérique ou la toxine STa, semblent reconnaître un site protéique (Hirayama *et al.*, 1992; Wada *et al.*, 1996).

Par ailleurs, des entérotoxines reconnaissent des sites sur de simples lipides membranaires (le cholestérol, les phospholipides tels que la phosphatidylcholine, et les sphingolipides tels que la sphingomyéline). Dans la plupart des cas, ce sont les toxines endommageant la membrane plasmique. Ces toxines peuvent utiliser certains lipides, non comme récepteur membranaire, mais plutôt comme accepteur de faible affinité (Forti et Menestrina, 1989; Menestrina *et al.*, 1990). Les lipides sont des composants fondamentaux et très abondants de la membrane plasmique, ils sont répandus sur différents types cellulaires mais ne présentent pas de caractéristiques spécifiques.

2. 2. 1. 2. Caractéristiques des glycoconjugués de surface cellulaire

Plusieurs caractéristiques peuvent expliquer pourquoi les glycoconjugués sont le plus souvent impliqués comme sites d'attachement spécifiques parmi les constituants de surface cellulaire. Leur caractéristique majeure est leur abondance à la surface de la cellule animale, notamment des cellules épithéliales des surfaces mucosales, site de colonisation normal des bactéries et porte d'entrée principale des infections. Les chaînes glucidiques détectées à la surface des membranes cellulaires sont composées de 1 à 20 sucres dont les plus connus sont le glucose, le galactose, le mannose, le fucose, ou les sucres aminés comme la N-acétylglucosamine, la N-acétylgalactosamine et l'acide neuraminique (IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, 1978; IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature, 1986). Par conséquent, ces structures saccharidiques exposées à la surface des cellules sont des sites privilégiés pour la reconnaissance des toxines bactériennes, notamment dans l'intestin.

Les glycoconjugués membranaires sont présents sous différentes formes: glycoprotéines, protéoglycans et glycolipides. Ces glycoconjugués ont une portion hydrophobe de leur molécule solidement ancrée dans la membrane cellulaire, et une portion saccharidique exposée à la surface externe de cette membrane. Les glycoconjugués les moins fortement associés aux membranes sont les glycoprotéines, telles que les mucines, et

les protéoglycans, dans la mesure où ces molécules peuvent être sécrétées (Paulson, 1989). Les glycoconjugués protéiques ont plusieurs chaînes souvent différentes liées au même peptide. Ces chaînes sont liées aux sérines (S) ou aux thréonines (T) formant une liaison O-glycosidique, ou liées aux asparagines (N) formant une liaison N-glycosidique. La partie peptidique peut traverser la membrane. En revanche, les glycolipides ont la particularité de porter une seule chaîne saccharidique par molécule. La partie lipidique semble exclusivement localisée dans le feuillet externe de la bicouche lipidique. Dans la plupart des cas, les glycolipides sont strictement liés à la membrane et sont absents des sécrétions (Karlsson, 1986). Toutefois, l'intestin dispose d'un très rapide renouvellement de cellules épithéliales, qui sont libérées de l'épithélium et dégradées dans la lumière intestinale. C'est pourquoi les glycolipides peuvent être présents dans le mucus intestinal.

La majorité des glycoconjugués de la surface cellulaire jouent un rôle dans la protection et la structure de l'intégrité de la cellule. C'est le cas essentiellement des chaînes riches en mannose liées en N- aux protéines. Ces chaînes sont abondantes à la surface des cellules et ne semblent montrer que peu de variation parmi les espèces, les individus, les tissus et les cellules. Par contre, les chaînes liées en O- aux protéines, comme dans les mucines qui ne contiennent pas de mannose, et les chaînes liées aux lipides démontrent une forte variation. Les chaînes liées en O- des glycoprotéines semblent porter les mêmes séquences que les chaînes des glycolipides, à l'exception du premier monosaccharide, qui est généralement le GalNAc α au lieu du Glc β pour les glycolipides. La complexité de ces chaînes augmente en fonction de l'évolution des espèces. Les chaînes diffèrent par la nature, le nombre et l'agencement des sucres. Ces derniers jouent un rôle fondamental quant à l'affinité des glycoconjugués pour certaines toxines. Il existe un grand nombre de spécificités d'attachement avec la partie glycosylée des glycoconjugués. Cette grande variabilité structurale des chaînes saccharidiques, comparée à la séquence en acides aminés des protéines, favorise la possibilité d'un changement de récepteurs grâce à très peu de mutations sur le ligand.

La topologie moléculaire et le réarrangement des molécules à la surface cellulaire sont également des éléments importants dans l'attachement et la pénétration d'une toxine. La partie glycosylée d'une glycoprotéine est en général plus longue et apparaît plus exposée et plus accessible que la partie glycosylée d'un glycolipide. De plus, les constituants lipidiques et protéiques d'une bicouche ne sont pas immobiles mais en perpétuel

mouvement. Cette situation dynamique au niveau de la surface cellulaire autorise des diffusions latérales et des échanges de position par les molécules ancrées dans la bicouche lipidique. Pour accéder à un site très proche de la membrane, il semble que le ligand nécessite l'induction d'une diffusion latérale des composants masquant la surface. Cette théorie a d'ailleurs été émise pour l'adhésion cellulaire (Bell *et al.*, 1984). Le modèle cinétique d'adhésion cellulaire décrit indique que les forces de répulsion impliquées lors du rapprochement d'une particule semblent induire une diffusion latérale et une réorganisation des composants de surface permettant alors un attachement de faible énergie.

2. 2. 2. Reconnaissance et attachement d'un glycoconjugué

2. 2. 2. 1. Principe de « clé-serrure »

Un attachement peut avoir lieu soit par une association aspécifique, souvent de nature non polaire, soit par une interaction spécifique de type « clé-serrure » comparable à la combinaison d'un antigène avec son anticorps, ou d'une enzyme avec son substrat (Kabat, 1988; Thurin, 1988; Padlan et Kabat, 1991; Braden *et al.*, 1995). Le plus souvent, l'association est spécifique pour former des complexes stables et conférer une activité au complexe formé.

La reconnaissance moléculaire de deux protéines entre elles ou d'une protéine et d'un site saccharidique dépend de la complémentarité stérique et électrostatique des surfaces se combinant. L'ajustement serré des deux surfaces rend compte du fait que la fixation spécifique est une interaction non covalente extrêmement solide. Plus la spécificité est grande, et plus le profil moléculaire du ligand épouse la forme du site d'attachement. La conformation cristallographique des complexes ligand-récepteur montre généralement la séquence d'attachement prenant place entre deux domaines majeurs du ligand protéique, qui enserrant un site actif placé dans une poche. Les deux lobes sont souvent assez hydrophobes alors que la poche de fixation est hydrophile. Le site spécifique à une séquence saccharidique ressemble à une cavité pour l'attachement de courtes séquences terminales, et à un sillon profond ou crevasse pour des séquences plus longues ou internes (Karlsson, 1986).

Certaines forces électrostatiques entrent en jeu dans la reconnaissance entre les groupements du site d'attachement saccharidique et les acides aminés du site actif du

ligand. Généralement, les chaînes latérales de ces acides aminés sont engagées dans des liaisons hydrogènes. Le ligand protéique interagit avec des groupements polaires d'oxygène ou d'azote très proches, qui sont issus des unités saccharidiques. Parfois, les acides aminés du site actif portent des sites anioniques ou cationiques qui entrent en jeu dans la reconnaissance *via* des liaisons ioniques. Ces interactions fortement polaires déterminent entièrement la spécificité de l'attachement.

En plus de ces forces polaires, la séquence saccharidique expose une surface à caractère non polaire. Cette dernière est formée d'un anneau d'atomes d'hydrogène qui s'étend autour des groupements polaires. Cette surface va former un contact hydrophobe avec les chaînes latérales d'acides aminés hydrophobes appartenant à la protéine complémentaire. Ce contact est la contribution majeure pour la stabilité du complexe. Les interactions hydrophobes sont connues, en effet, pour jouer un rôle crucial dans le maintien des structures moléculaires en place.

2. 2. 2. 2. Reconnaissance de séquences internes

Les ligands des micro-organismes à activité lectine partagent la propriété de reconnaître des séquences terminales mais aussi internes dans la chaîne saccharidique (Bock *et al.*, 1988; Karlsson *et al.*, 1992; Angstrom *et al.*, 1994), à la différence de la plupart des anticorps qui reconnaissent des parties terminales seulement (Thurin, 1988). Cette propriété est à l'origine du terme « isorécepteurs ».

Une série de glycoconjugués peut présenter un même site d'attachement placé à différents endroits dans la chaîne. Les isorécepteurs possèdent une séquence minimale d'attachement en commun, mais des groupements voisins distincts. Les sites saccharidiques d'attachements identiques retrouvés à différentes positions vont, par conséquent, présenter des conformations préférentielles pour l'accessibilité du site par le ligand. La spécificité d'attachement est une notion large par rapport au site minimal d'attachement (ou épitope d'attachement). La conformation environnante de l'épitope d'attachement confère une affinité optimale parmi une famille d'isorécepteurs. La toxine Shiga, par exemple, reconnaît le disaccharide Gal α 1-4Gal (Lindberg *et al.*, 1987). Parmi une série d'isorécepteurs portant ce disaccharide en position terminale ou interne, plusieurs sont reconnus par la toxine. Cependant, le globotriosylcéramide Gb3 présente la plus forte affinité et joue également un

rôle important dans le tropisme de la toxine (Boyd *et al.*, 1993; Boyd *et al.*, 1994).

La reconnaissance du site en position interne de la chaîne est une activité lectine unique pour le ligand. En effet, les différences en fonction des espèces et des tissus résident majoritairement dans la partie terminale de la chaîne saccharidique. C'est un avantage pour la toxine, nécessitant un attachement à la muqueuse, car elle évite ainsi ces différences en position terminale, alors que l'anticorps est produit notamment pour les détecter.

2. 2. 2. 3. Attachement de faible affinité

L'affinité du complexe est généralement mesurée par la constante de dissociation K_D ou la donnée inverse qui est la constante d'association K_A . La constante K_A varie entre 10^7 et 10^{11} M^{-1} pour les complexes anticorps-antigène qui sont de forte affinité (Braden *et al.*, 1995). Même si les systèmes de forte affinité existent, ceux de faible affinité sont souvent sélectionnés par les toxines bactériennes et de nombreux autres ligands de pathogènes (Karlsson *et al.*, 1992).

La constante d'association du récepteur de STa est forte (environ 10^9 M^{-1}) (Guarino *et al.*, 1987b). Plus la valeur de K_A est forte, plus la toxine se fixe fermement à son récepteur. Cet attachement de forte affinité est inhibé par la molécule récepteur sous forme soluble même à de faibles concentrations. En revanche, le site galabiose ($\text{Gal}\alpha 1\text{-4Gal}$) reconnu par la toxine Shiga n'est pas un compétiteur efficace. L'attachement de la toxine Shiga avec les cellules cibles n'est pas inhibé par des concentrations élevées du disaccharide $\text{Gal}\alpha 1\text{-4Gal}$ libre. La constante K_A d'un site d'attachement d'une sous-unité B de la toxine est de l'ordre de 10^3 M^{-1} . Un attachement de faible affinité n'est pas inhibé par un oligosaccharide soluble univalent, même à des concentrations élevées. Par conséquent, les méthodes classiques de compétition basées sur l'inhibition avec des oligosaccharides solubles ne peuvent pas être utilisées pour démontrer la spécificité de l'attachement. En fait, la toxine Shiga nécessite une multivalence de la séquence disaccharide pour un attachement efficace avec les cellules cibles (Lindberg *et al.*, 1987). Lorsque le site $\text{Gal}\alpha 1\text{-4Gal}$ est présenté de façon multivalente en conjugaison avec de la BSA (albumine de sérum bovin), l'inhibition est efficace. L'inhibition est optimale lorsque 25 résidus de $\text{Gal}\alpha 1\text{-4Gal}$ sont liés avec la BSA. Aucune inhibition n'est obtenue avec le composé $(\text{Gal}\alpha 1\text{-4Glc})_{25}\text{-BSA}$, où le lactose au lieu du galabiose est lié avec la BSA.

Le site d'attachement de faible affinité doit être présenté sous sa forme multivalente à la surface des cellules, et ce phénomène est largement influencé par l'état de la membrane et en particulier par sa fluidité (Spiegel *et al.*, 1984). L'attachement de la toxine CT requiert aussi un attachement multivalent (Fishman et Atikkan, 1980). Il est supposé qu'une molécule de toxine CT s'attache premièrement à une seule molécule de GM1 et se déplace alors latéralement à la surface de la membrane plasmique de façon à rencontrer une autre molécule de GM1. Similairement à la toxine Shiga, l'affinité d'attachement pour une seule sous-unité B de CT avec l'oligosaccharide porté par GM1 est plutôt faible. Cependant, comme l'attachement de CT avec la membrane est pentavalent, la constante d'association de la toxine avec la cellule est forte (de l'ordre de 10^{10} M^{-1}).

Karlsson *et al.*, (1992) estiment que l'attachement de faible affinité relève d'une complémentarité insuffisante entre la protéine et le site saccharidique. Pour qu'un inhibiteur (de synthèse par exemple) de cet attachement soit efficace en compétition, soit le site saccharide doit être multivalent, soit s'il est univalent, l'affinité des sites individuels doit être augmentée par rapport à l'affinité naturelle. Ce type d'attachement de faible affinité apparaît constituer un avantage à la surface des cellules. Il est fort probable qu'il ait été sélectionné de façon à contrer les inhibitions par des oligosaccharides solubles et univalents présents à la surface des cellules cibles en raison de diverses dégradations enzymatiques.

2. 2. 3. Familles de spécificités d'attachement

Acide neuraminique (ou sialique)

Les groupements d'acide neuraminique (NeuAc, NeuGc) sont présents en densité élevée à la surface des cellules (Higa et Paulson, 1985a). Ce sont des constituants des glycoconjugués lipidiques, comme protéiques. Ces groupes sont reconnus par des virus (Dimmock, 1982; Higa *et al.*, 1985b), des bactéries (Jones et Isaacson, 1983) et des toxines (Fishman *et al.*, 1993). Il s'agit d'une très grande famille comportant plusieurs types de spécificité d'attachement.

L'acide neuraminique joue notamment un rôle dans le site d'attachement spécifiquement reconnu par les toxines CT et LT. Le monosialoganglioside GM1 est un glycosphingolipide complexe, dont la structure biochimique est aujourd'hui caractérisée (Lanne *et al.*, 1994). Cette molécule de 1.5 kDa porte un pentasaccharide composé d'un

« core » de lactosylcéramide ($\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta 1-1\text{Cer}$) auquel sont liés un galactose (Gal), un groupe de N-acétylgalactosamine (GalNAc) et un groupe d'acide neuraminique (NeuAc) (Fig. 7). L'attachement de la sous-unité B de la toxine CT nécessite à la fois le galactose interne du « core » et l'acide neuraminique en position terminal lié sur ce galactose, avec une légère contribution du N-acétylgalactosamine (Merritt *et al.*, 1994; Shoham *et al.*, 1995).

Le pentasaccharide porté par GM1 n'a pas été retrouvé dans les formes glycoconjuguées aux protéines. Sélectionner un récepteur tel que GM1 semble représenter un double avantage pour la toxine CT (Eidels *et al.*, 1983; Pacuszka *et al.*, 1991). Premièrement, le récepteur étant le plus souvent absent dans les sécrétions, la toxine évite d'être éluée avec les glycoprotéines sécrétées et assure ainsi un attachement membranaire. Deuxièmement, un site d'attachement porté par un glycolipide crée un contact intime avec la bicouche lipidique, crucial surtout pour les toxines qui doivent traverser la membrane.

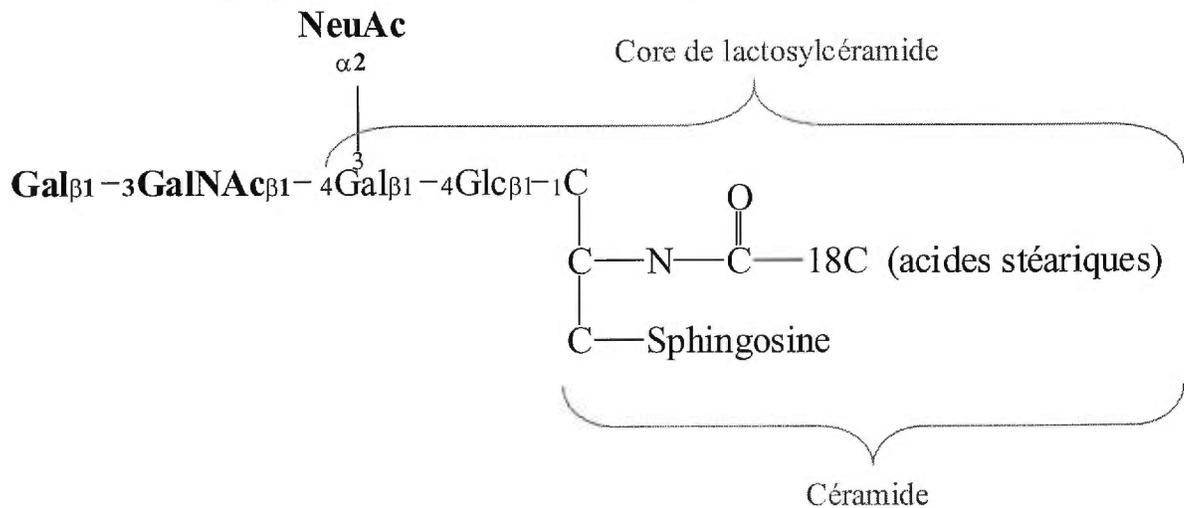


Figure 7. Structure du monosialoganglioside GM1, le récepteur commun aux toxines CT et LT. L'acide N-acétyl neuraminique (NeuAc ou NANA) fait partie de la structure des gangliosides.

Galabiose

Comme pour le pentasaccharide porté par GM1, le disaccharide $\text{Gal}\alpha 1-4\text{Gal}$ apparaît être exclusivement exprimé dans les glycolipides retrouvés dans les tissus humains (Yang *et al.*, 1994). La toxine Shiga de *Shigella dysenteriae* type 1 et les vérotoxines VTI et VTII d'*E. coli* reconnaissent ce site galabiose dans le globotriosylcéramide Gb3 (Lindberg *et al.*, 1987; Lingwood *et al.*, 1987; Waddel *et al.*, 1988). Le galactose terminal est crucial dans

l'activité d'attachement de ces toxines. Le galabiosylcéramide a été proposé comme récepteur pour l'entérotoxine B de staphylocoque (SEB) dans les cellules humaines de rein (Chatterjee *et al.*, 1995). Dans le galabiosylcéramide, le site Gal α 1-4Gal est localisé plus près de la bicouche que dans le globotriosylcéramide. Le Gb3 porte ce disaccharide en position terminale et espacé du céramide par un seul saccharide. Ce phénomène de proximité membranaire est important pour l'attachement, car il peut contribuer à l'insertion membranaire d'un ligand.

N-acétylgalactosamine et N-acétylglucosamine

Les hexosamines GalNAc et GlcNAc sont exprimés par de nombreux glycoconjugués à la fois lipidiques et protéiques. Plusieurs études ont indiqué que la toxine LT de type I s'attache à des galactoprotéines sur les cellules épithéliales intestinales chez certaines espèces, mais pas la toxine CT. D'un côté, LT-I reconnaît des glycoprotéines et des polyglycosylcéramides préparés à partir de tissus cibles respectivement humain et de lapin. Les données de modélisation moléculaire ont montré que l'épitope d'attachement est limité au disaccharide terminal Gal β 1-4GlcNAc (Karlsson *et al.*, 1996). D'un autre côté, Shida *et al.*, (1996) suggèrent que LT-I reconnaît certaines chaînes oligosaccharidiques de type mucine contenant la séquence terminale Gal β 1-3GalNAc. La séquence GalNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc serait également intimement impliquée dans le site d'attachement de la toxine A de *C. difficile* à la fois sur des glycoprotéines et des glycolipides (Krivan *et al.*, 1986; Teneberg *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1997).

Mannose

Le mannose est utilisé par de nombreuses bactéries pour leur adhérence (Beachey *et al.*, 1988; Svanborg-Eden *et al.*, 1988; Wold *et al.*, 1988). Par exemple, le fimbriae de type 1 des entérobactéries comprend une sous-unité protéique mineure, FimH, qui démontre un attachement spécifique au mannose sur les cellules épithéliales intestinales (Abraham *et al.*, 1988). Le mannose est très représenté à la surface des cellules et dans le mucus, mais seulement dans certaines glycoprotéines. Il s'agit des glycoprotéines portant les chaînes de type riche en mannose liées en N-. La plupart des chaînes liées en O- des glycoprotéines, incluant les mucines, ne contiennent pas de mannose. De plus, les oligosaccharides

contenant du mannose sont absents des glycolipides chez les mammifères. Le mannose étant très abondant parmi certaines glycoprotéines et absent dans les mucines sécrétées, l'attachement aux cellules ne peut pas être inhibé efficacement par des glycoconjugués sécrétés. Le mannose permet donc d'assurer un attachement du ligand avec la membrane cellulaire. Curieusement, aucune toxine entérique n'est connue pour s'attacher spécifiquement au mannose. Une seule étude montre que l'attachement de la toxine C2 de *C. botulinum* avec la thyroglobuline est inhibé par le mannose, suggérant que ce site peut appartenir à l'épitope d'attachement (Sugii et Kozaki, 1990).

Lactose

Les isorécepteurs avec le lactose Gal β 1-4Glc comme site minimal d'attachement sont reconnus spécifiquement par de nombreuses adhésines de bactéries pathogènes ou de la flore normale, principalement dans le côlon (Hansson, 1983; Stromberg *et al.*, 1988; Karlsson *et al.*, 1992). Ce site est porté exclusivement par des glycolipides. Le mode d'attachement à cette séquence dans le lactosylcéramide (Gal β 1-4Glc β 1-1Cer) présente généralement une sélection particulière pour les céramides (Hansson, 1983). Il semble que la spécificité minimale du site d'attachement soit le lactose, tandis que la structure du céramide influence la présentation du lactose, ce qui est crucial vis-à-vis de l'accessibilité pour le ligand (Karlsson *et al.*, 1992). L'attachement au lactosylcéramide est très répandu pour les adhésines des pathogènes entériques, cependant ce type de spécificité n'a pas été rapporté chez les toxines bactériennes entériques.

2. 2. 4. Variants de ligands

Il est fréquent de rencontrer des variants de ligands. Ces ligands diffèrent légèrement dans leurs spécificités d'attachement. Chaque famille de spécificité d'attachement est corrélée avec des ligands nécessitant la même séquence minimale. Cependant, les membres individuels se distinguent par leurs préférences pour certains isorécepteurs. Par conséquent, les sites d'attachement complémentaires des ligands protéiques doivent être apparentés au niveau structural (Karlsson *et al.*, 1992). Des mutations de ces ligands sont considérées affecter 1 ou quelques acides aminés pour induire des modifications structurales fines du site et conduire à un changement de spécificité d'attachement entre 2 isorécepteurs. Par

contre, ces mutations doivent être beaucoup plus grandes pour conduire à un changement entre 2 familles d'isorécepteurs. De même, il est supposé qu'un attachement à une séquence terminale présentant une séquence voisine d'un seul côté va nécessiter des mutations importantes si le changement de spécificité du ligand s'oriente vers la reconnaissance d'une séquence interne.

De telles modifications des ligands peuvent expliquer les changements dans la sélectivité de divers tissus de l'hôte pour l'infection. Par exemple, le récepteur membranaire de la toxine VTe ou VTIIv, de la maladie de l'œdème du porc, est le globotétraoacycléramide Gb4 ou globoside (De Grandis *et al.*, 1989). Le site minimal d'attachement est la séquence Gal α 1-4Gal à la fois pour la toxine VTII et pour le variant de VTII. Il a été montré qu'un changement dans l'attachement par les vérotoxines entre le Gb4 (pour VTIIv) et le Gb3 (pour VTII) peut expliquer la différence du tropisme cellulaire de l'infection respectivement chez le porc et l'humain (Samuel *et al.*, 1990).

2. 2. 5. Sites d'attachement multifactoriels

L'attachement multifactoriel définit l'existence de plusieurs spécificités d'attachement pour un même ligand. Une spécificité d'attachement supplémentaire peut représenter un récepteur alternatif pour la toxine. Par exemple, comparativement au récepteur ubiquitaire, GM1 de CT et LT, le récepteur GC-C de STa est présent uniquement dans l'intestin. La stimulation de GC-C par STa est plus grande dans le petit intestin que dans le côlon (Guarino *et al.*, 1987b; Kuhn *et al.*, 1994), et, en général, moins de récepteurs à STa sont trouvés dans le côlon (Cohen *et al.*, 1988; Krause *et al.*, 1994). En revanche, la réponse à STa en flux d'électrolytes, telle que mesurée en chambre d'Ussing, est plus forte dans le côlon (Kuhn *et al.*, 1994). Il est possible que la toxine STa soit inactivée à différents niveaux dans différentes régions de l'intestin, comme il a été montré dans le jéjunum et l'iléon (Cohen *et al.*, 1989). Une autre hypothèse est basée sur la présence de récepteurs pour STa « non GC-C » dans le côlon. Dans ce cas, les récepteurs non GC-C pourraient être corrélés à une voie de signalisation alternative, permettant cette plus forte réponse en flux d'électrolytes dans le côlon. La présence d'un nouveau récepteur pour STa est fortement suggérée (Almenoff *et al.*, 1993; Mann *et al.*, 1993; Almenoff *et al.*, 1994).

Dans le cas de plusieurs toxines bactériennes, des résultats récents s'orientent vers un

mécanisme d'attachement en 2 ou plus de 2 étapes. Le site d'attachement de première étape serait impliqué dans le ciblage et le tropisme de l'infection. Le site d'attachement de deuxième étape servirait à établir un attachement membranaire. Ce mécanisme a été proposé pour la toxine LT, considérant que l'attachement de l'anneau de sous-unités B au GM1 devait être précédé de l'attachement avec un site plus distant de la membrane cellulaire. Il a été observé que la toxine LT démontre un attachement 10 fois plus fort que la toxine CT dans le petit intestin de lapin. Un site récepteur membranaire additionnel à GM1 pour LT a désormais été identifié (Holmgren *et al.*, 1982; Zemelman *et al.*, 1989; Griffiths et Critchley, 1991; Angstrom *et al.*, 1994; Orlandi *et al.*, 1994; Teneberg *et al.*, 1994; Shida *et al.*, 1996). Il est surprenant que 2 bactéries qui colonisent le même tissu, le petit intestin, et utilisent le même système cible pour leurs toxines, diffèrent dans leur attachement. Il est possible que les 2 bactéries adhèrent différemment, de telle façon que la toxine d'*E. coli* nécessite un mécanisme en 2 étapes. L'attachement avec les résidus N-acétyllactosamine (Gal β 1-4GlcNAc) des glycoprotéines ou des polyglycosylcéramides plus allongées serait suivi de l'attachement clé au GM1 très proche de la bicouche lipidique. De cette manière, les glycolipides courts comme GM1, qui sont souvent peu accessibles directement du fait de la présence de chaînes saccharidiques plus étendues, deviendraient alors accessibles suite à la première étape d'attachement. Dans ce modèle, l'accessibilité serait induite suite à l'attachement au site de première étape. De façon similaire, Lindberg *et al.* (1987) ont constaté que certaines lignées cellulaires sont résistantes à l'action de la toxine Shiga (internalisation et arrêt de la synthèse protéique), alors que les sites récepteur sont présents en densité élevée. Ces résultats suggèrent qu'il existe au moins 2 classes de récepteurs distincts sur le plan fonctionnel, et qui ne sont pas toujours exprimés. Les auteurs proposent que l'attachement au site galabiose à proximité de la bicouche lipidique correspond à un récepteur fonctionnel pour la pénétration de la toxine, alors que d'autres sites plus éloignés vont permettre l'attachement avec la surface cellulaire, mais pas la pénétration.

La susceptibilité de l'hôte vis-à-vis d'une infection est significativement dépendante de ses caractéristiques spécifiques, comme l'espèce, l'âge ou la lignée génétique. La distribution des sites d'attachement peut expliquer très souvent le tropisme d'un micro-organisme et notamment d'une toxine (Mobassaleh *et al.*, 1988; Mobassaleh *et al.*, 1989). Toutefois, les stratégies utilisées par les toxines sont certainement encore plus élaborées et peut-être plus insidieuses qu'il n'était envisagé.

III. MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS

Article 1 : Binding characteristics of *Escherichia coli* enterotoxin b (STb) to the pig jejunum and partial characterization of the molecule involved

E. Rousset, J. Harel & J. D. Dubreuil

Microbial Pathogenesis (1998, 24 : 277-288)



Binding characteristics of *Escherichia coli* enterotoxin b (STb) to the pig jejunum and partial characterization of the molecule involved

Elodie Rousset, Josée Harel & J. Daniel Dubreuil*

Groupe de recherche sur les maladies infectieuses du porc (GREMIP), Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, C. P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6

(Received June 26, 1997; accepted in revised form December 18, 1997)

Escherichia coli heat-stable enterotoxin b (STb) causes severe diarrhoea in weaning piglets. STb most probably has to bind to intestinal epithelial cells in order to achieve its effect. Using biotinylated biologically active STb, we developed a semi-quantitative binding assay using indirect fluorescence microscopy. We demonstrated the attachment of the biotinylated toxin to microvilli of the pig jejunum. However, binding was abolished when biotinylated STb was either boiled or treated with 2-mercaptoethanol, treatments known to abolish biological activity. Different characteristics of STb attachment to the pig small intestine were determined. The reaction was rapid and reached maximum intensity after approximately 10 min. The binding was pH dependent showing an optimum at pH 5.8. Incubation at either 4°C, 25°C or 37°C did not affect the binding. No competition was observed with non-biotinylated STb. However, preincubation of biotinylated STb with streptavidin conjugated to horseradish peroxidase completely abolished the binding. Pig tissues other than jejunum demonstrated binding towards STb including duodenum, ileum, caecum, colon, liver, lung, spleen and kidney. The molecule involved was then partially characterized. Metaperiodate treatment of the jejunum sections abrogated binding but protease treatment had no effect. Enzymatic treatments of jejunal sections demonstrated that N- and O-glycosidases, and several exoglycosidases did not affect binding, whereas reduced binding was observed with ceramide glycanase and α -glucosidase, and was completely abolished following neuraminidase treatment. Overall, our results suggest that *in vitro* STb binding was rapid, pH dependent, temperature independent, not restricted to jejunum and involves a molecule that seems to be composed of a ceramide moiety, terminal neuraminic acid and/or α -linked terminal glucose residue(s).

© 1998 Academic Press Limited

Key words: *Escherichia coli*, heat-stable enterotoxin b, receptor, binding assay, glycolipid.

* Author for correspondence.

Introduction

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) produces two types of enterotoxins, classified as heat-labile toxins, LTI and LTII, and heat-stable toxins, STa and STb (also named STI and STII, respectively), which cause net fluid and electrolyte secretions, leading to diarrhoea, dehydration and, in severe cases, death of the animal. To initiate disease, many enterotoxins have to recognize and bind to host cell surface molecules, such as proteins, glycoproteins or lipid glycoconjugates, serving as their receptors [1].

The heat-stable enterotoxin b (STb) is the most prevalent toxin associated with ETEC causing diarrhoeal disease in weaning piglets 6–10 weeks old [2, 3]. While the epidemiological, physicochemical and genetic aspects of STb have been studied since the identification of STb by Burgess *et al.* [4], the mechanism of action of STb is poorly understood and particularly the interaction between the toxin and the intestinal epithelial cells [5]. In 1995, Peterson and Whipp [6] compared the secretory response of purified toxins using the pig intestinal loop assay. They demonstrated that maximal doses of STa and STb when mixed together yielded additive effects on fluid secretion, suggesting distinct mechanisms of action for STa and STb. The same phenomenon was noted with CT and STb. The STb toxin has been reported to elicit a rapid secretory response of brief duration [7–9]. Moreover, STb increases short-circuit current when the toxin is delivered to the mucosal but not the serosal side of intestinal tissue mounted in Ussing chambers [10]. Whipp *et al.* [11] reported that the secretory response of STb is dependent on the integrity of the villous epithelium.

At the molecular level, although the structure of STb [12], and regions of the molecule required for biological activity have been studied [13, 14, 15], further analysis will be necessary to identify the amino acid residues involved in the interaction of STb with its putative receptor. Dreyfus *et al.* [16] suggested that STb functions by opening a G-protein-linked-receptor-operated Ca^{++} channel in the plasma membrane of different cell lines. Hitotsubashi *et al.* [17] demonstrated the specific binding of ^{125}I -labelled STb to mouse intestinal villus cell membranes. The identified STb binding protein did not contain saccharide and was found in the intestine of CD-1 mouse but was absent from the other tissues tested. Recently, Chao and Dreyfus [18] studied the

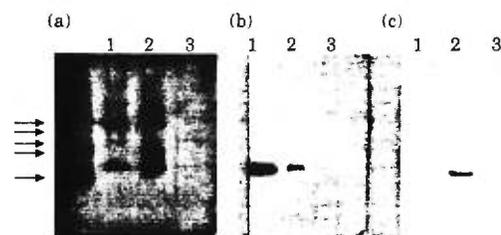


Figure 1. SDS-PAGE and Western blot of STb and biotinylated STb. (a) SDS-PAGE. (b) Western blot using a polyclonal monospecific antibody against STb. (c) Western blot using a streptavidin horseradish peroxidase conjugate. 1: STb 2: biotinylated STb 3: biotin. Wells 1 and 2 contain 4 μ g STb. On the left, peptide molecular weight standard is indicated by arrows, from top to bottom 16 949, 14 404, 8159, 6214 and 2512 Da.

interaction of STb with cultured human intestinal epithelial cells. Together, their results indicate that STb binds with low affinity to the plasma membrane of cultured epithelial cells and polarized T84 cells, probably to membrane lipids, and becomes stably associated with the lipid bilayer.

We have investigated the presence of a component(s) acting as a STb receptor in pig intestine where STb naturally acts. Primary attention has been given to the jejunum since it was observed that STb induced a more consistent secretory response in rat jejunal loops compared with other parts of the intestine (E. Rousset and J. D. Dubreuil, unpublished result). In the present study, we examined the binding of STb to pig jejunum microvilli, and determined certain binding characteristics of STb. A preliminary characterization of the molecule involved in STb binding was performed using chemical and enzymatic treatments of the pig jejunum.

Results

We first determined if STb toxin was biotinylated. Figure 1 shows that STb is detected both by polyclonal IgG directed against STb and by streptavidin conjugated to horseradish peroxidase, indicating that biotin molecules are fixed to STb. The *in vivo* activity of the biotinylated toxin in ligated rat intestinal segments was then evaluated. A similar accumulation of fluid was noted for STb (ratio of 0.15 ± 0.04 ,

STb binding to pig jejunum

$P < 0.005$) and biotinylated STb (ratio of 0.11 ± 0.04 , $P < 0.005$) compared to the control. These data indicated that the biological activity was not affected by fixation of biotin to STb and that recognition and binding to the molecule acting as the receptor was not influenced by the toxin modification. Thus, biotinylated STb could be used to study the toxin attachment to pig tissues.

Development of the STb binding assay

Using 8-week-old pig jejunum sections, the binding of biotinylated STb was visualized following incubation with a streptavidin-FITC conjugate. The specificity of the *in vitro* test was confirmed as incubation on pig tissue of either unbiotinylated toxin, biotin or streptavidin-FITC, individually or in combination resulted in a negative response. On the other hand, when biotinylated STb was boiled for 15 min or treated with 2-mercaptoethanol, treatments known to affect the biological activity, the binding was completely abolished.

STb dose-response evaluation on pig jejunum

Titration of biotinylated STb showed that 10 ng of toxin added to 5 μm thick jejunum section was the detection limit of the method. The response was shown to be dose dependent (data not shown) and 50 ng toxin gave consistent results. The observed fluorescence after 2 min was restricted to a coarse region surrounding villi and crypt cells of the intestinal mucosal epithelium. As the incubation time of STb was increased, the fluorescent region became more important reaching saturation after 10 min. The fluorescence started at the microvilli cells exposed to the intestinal lumen and proceeded towards the lamina propria. Fluorescence was observed for mucosa, muscosa and serosa but not for submucosa. An incubation period of 2 min was retained as it corresponded to a preferential binding to intestinal epithelium. An incubation period of 10 min was retained for pretreatment experiments of the pig tissue as it was easier to visualize the result. We then determined whether the incubation conditions of STb with the jejunum sections could affect the binding reaction.

279

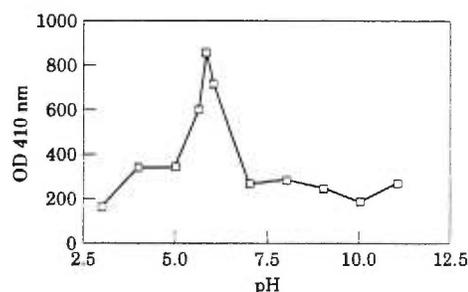


Figure 2. Effect of pH on STb binding to jejunal circular sections. Binding of biotinylated STb to pig jejunal circular sections was carried out at various pH. A streptavidin-peroxydase conjugate was incubated and the developed colour was recorded at 410 nm in an ELISA reader. The curve represents the average of three experiments.

Incubation temperature effect on STb binding

The effect of incubation temperature on the binding to pig jejunum was investigated. No difference in binding was noted when incubation temperatures of 4°C, 25°C or 37°C were compared.

Effect of binding buffer pH and molarity

Using buffers of different pH, quantitative experiments were performed with jejunum circular sections in order to determine whether pH had an effect on STb binding. As shown in Figure 2, binding was optimal at pH 5.8 but decreased as buffer was either acidified or alkalinized. For this reason, all binding assay to pig tissues was performed using phosphate buffer of pH 5.8 as it showed the maximum binding activity. It was also noted that the molarity of the buffer had an influence on binding. In fact, a 0.1 M compared to a 0.01 M buffer phosphate buffer promoted binding. The influence of ions was investigated to determine if the STb-receptor interaction is ion-dependent. Addition of EDTA, a chelator of divalent ions, or addition of CaCl_2 , MgCl_2 or NaCl to the buffer did not result in any observable change in binding reaction.

STb binding assay standard conditions

Following experimental determination of STb binding to pig jejunum under different conditions, the standard conditions retained for the

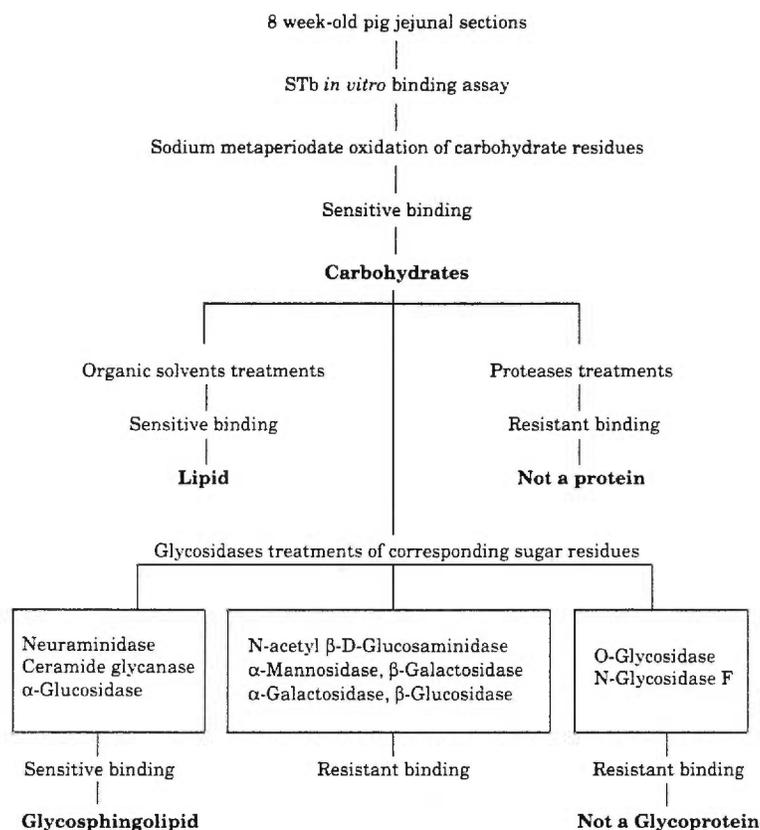


Figure 3. Summary of the different treatments performed on the pig jejunum to determine the STb binding molecule chemical identity.

STb binding assay were the following: reactions used 50 ng of biotinylated STb for 2 or 10 min (for pig jejunum pretreatment experiments) at 25°C in a 0.1 M phosphate buffer adjusted to pH 5.8, without addition of ions or chelators.

the *in vitro* binding assay we developed. Using the conditions already described, sections of 5 μ m of duodenum, ileum, caecum, colon, liver, lung, spleen and kidney from 8-week-old pigs demonstrated binding activity towards STb.

Competition assay and binding of STb to other pig tissue

A 100-fold molar excess of unbiotinylated STb, incubated on the sections before the binding assay did not prevent binding of biotinylated STb. In the same way, preincubation of the toxin with non-neutralizing IgG directed against STb did not affect binding. However, when biotinylated STb was preincubated with streptavidin conjugated to horseradish peroxidase, STb binding to pig jejunum was completely abolished. STb binding to other tissues was examined using

Partial characterization of the STb binding molecule

In order to determine the chemical nature of the molecule present on the pig jejunum responsible for the binding of STb, different chemical and enzymatic treatments known to have well defined effects were used to treat the pig tissues before performing the binding assay (Table 1). First, metaperiodate treatment abrogated binding of STb suggesting that some sugars could be responsible for STb binding. Protease-treated tissue sections including trypsin, elastase and

STb binding to pig jejunum

281

Table 1. Binding of STb to pretreated pig jejunal section. All treatments were carried out at least three times on different tissue sections

Pretreatment of tissue	Binding
None	+
Sodium metaperiodate	-
Trypsin	+
Elastase	+
Protease V8	+
N-Glycosidase F	+
O-Glycosidase	+
Acetone/chloroform/methanol	-
Ceramide glycanase	-
α -Galactosidase	+
β -Galactosidase	+
α -Glucosidase	-
β -Glucosidase	+
N-acetyl β -D-Glucosaminidase	+
α -Mannosidase	+
Neuraminidase	-

Standard conditions were used for binding of STb to promote specific binding to the pig jejunum. Biotinylated toxin (50 ng) was incubated in presence of pig tissue for 10 min at 25°C in a 0.1 M phosphate buffer, pH 5.8.

protease V8 revealed no altered binding towards STb. Enzymatic digestions with N-glycosidase F and O-glycosidase, which hydrolyse respectively the glycan chains N- and O-linked present in glycopeptides/proteins, did not affect binding of STb. Tissue treatment with a solution composed of methanol and chloroform in the same proportions, a solution known to solubilize lipids, abolished the binding to microvilli cells. Acetone is a solvent that can hardly solubilize phospholipids. On the other hand, glycolipids are highly soluble in this solvent which displaces them onto the cell surface. After acetone treatment, binding to intestinal epithelium was abolished but was seen for cells surrounding microvilli. When acetone treatment was followed by the methanol and chloroform solution, binding was completely abolished. Treatment of tissue sections with ceramide glycanase, which hydrolyses the glycosyl β 1-1 linkage between the ceramide moiety and the oligosaccharide chain of the glycosphingolipid, significantly reduced the binding of STb. To further characterize the nature of the sugar residue(s) involved in binding, a panel of exoglycosidases were tested. Enzymes such as α - and β -galactosidases, β -glucosidase, N-acetyl β -D-glucosaminidase and α -mannosidase did not affect binding. On the other hand, α -glucosidase reduced binding and

neuraminidase completely abolished the binding. Figure 3 summarizes the different treatments performed on the pig jejunum in order to determine the binding molecule chemical identity.

Discussion and conclusions

Relatively little information exists about the natural host cell surface component acting as receptor for STb. This study was conducted to determine the *in vitro* binding characteristics of STb enterotoxin to the pig jejunum and chemically characterize the STb binding molecule present on this swine tissue.

To achieve our goal, a semi-quantitative *in vitro* assay using fluorescence microscopy was developed. STb toxin was chemically coupled to biotin and this covalently modified toxin was shown to be biologically active *in vivo* using a rat loop assay. Thus, if the toxin has to bind to a molecule present on the intestinal epithelium in order to initiate a cascade of events leading to fluid secretion, the biotinylated STb toxin could still realize these steps. Using streptavidin-fluoroisothiocyanate conjugate, the binding of STb could be visualized in fluorescence microscopy. Controls consisting of either the streptavidin conjugated to FITC, biotin X-NHS, or unbiotinylated STb, individually or in combination, gave a negative response.

Using our *in vitro* assay, we determined that STb could bind as well to crypts as to villi of the jejunal brush border. A preferential binding was observed for the intestinal epithelium when STb was incubated for 2 min or less. However, with increasing incubation time (more than 5 min), STb was binding to cells composing the intestinal tissue. We observed that after increased incubation time, STb could bind to musculosa and to serosa. These observations could indicate that the molecule binding STb is also present on cell types other than those forming the brush border and since we were using cryostat jejunal sections, those cells could now come into contact with the toxin and bind to it. *In vivo* such a contact would not take place as the integrity of the tissue is not affected by STb [7, 19, 20]. On the other hand, we cannot exclude the possibility that binding to those cells exists *in vivo*, since STb is known to act on muscle cells of isolated section of ileum and enhance the spontaneous motility of the intestine [21].

Hitotsubashi *et al.* [21] explained that STb could reach the muscle layer by passing through the mucosa and entering into the lamina propria of the intestine as reported in the case of *Vibrio cholerae* [22]. STb structure comprises two disulfide bridges and when either one or both of those chemical bonds are oxidized, the toxic activity is completely abolished [15]. Thus, to ensure the specificity of the assay, we use heat-inactivated or 2-mercaptoethanol-treated biotinylated STb and showed that the toxin could no longer bind to the intestinal epithelium.

Binding of STb to the jejunum was observed as early as 2 min and was maximal after 10 min, indicating a rapid binding reaction. This result correlates with previous experiments using either mounted tissue or animal models that indicated that STb induces a rapid response [6, 8, 23]. Recently, using cultured human intestinal epithelial cells, Chao and Dreyfus [18] reported that STb readily associated with intestinal epithelial cells, reaching equilibrium within 5 to 10 min.

All pig tissue tested showed a binding towards STb suggesting that a common molecule responsible for the attachment could be present on all these tissues. Such is the case with LT toxin and cholera toxin (CT), which binds to a membrane glycolipid, the ganglioside GM1 [24], whereas the effect of STa toxin, which binds to a membrane-bound guanylyl cyclase [25] appears to be tissue specific [26]. Thus, if a particular receptor is a ubiquitous molecule, then the toxin that utilizes such a receptor could affect (or at least bind to) a variety of tissues and cells from many animal species, unlikely to be encountered during the natural physiological interaction. Dreyfus *et al.* [16] have shown that cells of different origins including Mardin-Darby canine kidney (MDCK), HT-29/C₁ intestinal epithelial cells and primary rat pituitary cells were affected by STb toxin. On the other hand, a study by Hitotsubashi *et al.* [17] indicated that only mouse ileum was binding STb and that a protein of 25 kDa responsible for the process was not present on the other mouse tissues tested.

In our study, a 100-molar-fold excess of STb could not compete for binding with biotinylated STb. A competition study by Chao and Dreyfus [18] indicated that competition, for STb, was limited and gradual. In fact, binding of ¹²⁵I-STb to T84 cells was reduced by approximately 50% in presence of five-fold excess of unlabelled STb but interestingly the binding did not decrease

further in the presence of 100- to 1000-fold excess STb. This result suggests that either STb binds to a low affinity receptor on the pig jejunum, or that multiple interactions could occur between STb and host cells, so that only a partial inhibition was obtained and could not be visualized using our semi-quantitative toxin-host cell binding assay. In fact, the study of Chao and Dreyfus [18] indicated that STb probably interacts with the cell membrane lipid bilayer and showed that STb binding was specific but not saturable. No inhibition was obtained when biotinylated STb was preincubated with IgG purified from a non-neutralizing polyclonal antiserum directed against STb. This result can be explained if we consider the fact that *in vivo* IgG present in the serum we used could not neutralize the toxic activity and that recognition and reaction with the receptor (the first reaction needed to be toxic) was not inhibited. On the other hand, preincubation of biotinylated STb with the streptavidin-peroxydase conjugate inhibited the binding. Hitotsubashi *et al.* [17] showed that STb binds to a 25 kDa protein, and the binding was specific as it was inhibited by unlabelled STb. To this day, those data were not confirmed or contradicted. Collectively, these results strengthen the argument that more than one binding molecule may exist for STb toxin, and the different assays employed could provide a way to elucidate these multifactorial interactions. For example, when K88 adhesin receptors were initially identified, attention was directed towards a glycoprotein receptor involved in the haemagglutination of guinea-pig erythrocytes by K88 [27]. Attention was then directed towards a brush border glycolipid receptor for K88 [28]. More recently, it has been established that piglet mucus contains both glycoprotein and glycolipid receptors specific for K88 fimbriae [29]. It is known that most bacterial toxins involve several molecules in attachment to target cells. For example, although GM1 is the principal receptor for both LT and CT, the LT toxin also binds to a glycoprotein receptor for which CT lacks affinity [30], and which is expressed with a marked variation in different strains of rat, different animal species [31], and in the adult rat but not in neonatal rat intestine [32]. The authors proposed that the toxin first interacts with this low-affinity receptor and favours interaction with the high-affinity receptor GM1. For STa toxin, guanylyl cyclase-C (GC-C) was identified as the receptor [25]. More recently, Almenoff *et al.* [33] have reported that STa also

binds to another molecule in addition to GC-C.

We then determined whether incubation conditions of STb with jejunum sections could affect the binding reactions. In our study, no temperature dependence on STb binding was observed between 4 and 37°C. These results are consistent with those of Chao and Dreyfus [18] obtained with cultured human intestinal cells. The binding activity of STb, as reported, reached an equilibrium by 5 to 10 min at all temperatures tested (i.e. 4, 22 and 37°C). None the less, in their study, the total binding of ¹²⁵I-STb to intestinal cells at 4 and 22°C was about 50% lower than at 37°C.

Interestingly, optimal binding to jejunum was observed at a pH of 5.8, an acidic pH similar to the situation found for this tissue *in vivo* (Fig. 2). A similar phenomenon was noted for adhesion of *Helicobacter pylori* to T₈₄ human intestinal cell monolayers where binding was increased by three- to four-fold compared to neutrality [34]. The pH-dependent binding observed could imply that the conformation of the toxin or its putative receptor is modified and that a peculiar form allows optimal binding. STb binding in response to pH variation was also observed in the fluorescence microscopy assay (data not shown). Sukumar *et al.* [12], using circular dichroism, suggested that the secondary structure of STb seemed independent of pH between 4.0 and 11.0. Future studies could be directed towards a better understanding of this observation, and thus to know whether pH-dependent binding could be a key-factor in regulation of STb toxicity. On the other hand, divalent or monovalent ions did not seem to be required nor did it interfere with the binding process. It is likely that the high concentration of positive charge on STb, with a pI of 9.6 [14, 35] could promote, in a certain way, interaction with the negatively charged cell surface. Seignole *et al.* [36] suggested that charged surface molecules on the intestine may play a role of attractor for K99 fimbriae binding, via an interaction between opposite charges. Chao and Dreyfus [18] propose that STb could interact with intestinal cells through association with the plasma membrane phospholipids by a weak ionic interaction with polar head groups.

Finally we determined the chemical nature of the molecule involved in STb recognition and binding. We observed that STb binding was abolished by treating the jejunum sections with organic solvents known to solubilize lipids. This could suggest that a lipid or lipid-containing

molecule could be implicated. On the other hand, protease treatment of the tissue did not affect binding. Similarly, Chao and Dreyfus [18] indicated that STb binding to cultured intestinal cells was not affected by trypsin. Their results, as ours, strongly indicated that STb is binding to a nonproteinaceous receptor(s) on the cell surface.

Because sodium metaperiodate, a chemical which cleaves the C-C bond between adjacent hydroxyl groups of sugars, did abolish the binding it could indicate that sugar molecules could be implicated. Enzymes hydrolysing specific terminal sugars were used to determine the nature of the sugar(s) recognized by STb. Neuraminidase treatment abolished binding while α -glucosidase decreased binding. Ceramide glycanase altered the binding and in a way supported the results observed with the organic solvents. The physical incorporation of glycolipids into eukaryotic cell membrane may be responsible for the partial decrease of STb binding observed following ceramide glycanase treatment. Glycolipid head groups are mobile and extended straight up from the surface of the cellular lipid bilayers whereas the lipid portion is embedded in the lipid bilayers. In fact, sugar residues should be, in general, more accessible to enzymes than the lipid moiety of glycolipids [37]. Taken together, these results seem to indicate that a molecule containing a ceramide moiety and either terminal neuraminic acid and/or glucose could be responsible for STb binding. These sugars are not part of a glycoprotein since N- and O-glycosidases did not affect binding. Binding of STb via glycoproteins was also ruled out by Chao and Dreyfus [18]. We thus presume that STb could recognize neuraminic acid and/or glucose (α -linked) molecules, in terminal position, present on a ceramide molecule. In other words, STb could bind to a glycosphingolipid as is the case for numerous toxins of bacterial origin [38]. Our data using another type of assay confirmed many of the observations recently published by Chao and Dreyfus [18]. For now, some of the differences observed by our group can be attributed to the fact that we are using pig tissue and not cultured human cell lines. This choice is crucial since a study by Weikel *et al.* [8] on STb action on human ileal mucosa indicated that it did not respond electrogenically in an Ussing chamber when compared to the piglet jejunum.

In summary, we have provided evidence that STb toxin binds to the pig jejunum, its natural

target tissue. We demonstrated that the binding molecule could be glycolipidic in nature containing neuraminic acid, and/or α -glucose molecules. We now propose to further characterize the molecule involved to understand more precisely the interaction involved in STb-mediated secretion.

Materials and methods

STb production and purification

As previously described, STb enterotoxin was purified using an *E. coli* recombinant strain harbouring the pMalp-STb plasmid coding for a fusion protein composed of the maltose binding protein (MBP) and the mature STb [39]. Briefly, the recombinant strain was grown in Luria Bertani medium containing 50 μ g/ml ampicillin at 37°C with agitation (200 rpm). When the OD_{600nm} was equal to 0.5, the expression of the fusion protein was induced by addition of IPTG to a final concentration of 0.3 mM. Three hours later, cells were harvested by centrifugation and gently washed in 20% sucrose. After centrifugation, the cells were suspended in 5 mM MgSO₄ at 4°C for 10 min. Following centrifugation, the supernatant representing the osmotic shock fluid was filter sterilized (0.22 μ m). The fusion protein MBP-STb was affinity-purified using an amylose resin (New England Biolabs, Mississauga, Ontario, Canada) according to the described method [35]. The fusion protein was then cleaved overnight at 4°C with 1.0 unit of Xa factor per mg of MBP-STb directly in amylose column elution buffer. Cleaved material was loaded on a Poros R2/H-10/100 reverse phase-column (PerSeptive Biosystems, Cambridge, MA, U.S.A.). The column coupled to a Waters 625 Liquid Chromatography system (Waters, Milford, MA, U.S.A.) was equilibrated in water and eluted with acetonitrile; both solvents contained 0.1% trifluoroacetic acid. The peaks were monitored using a Waters 990 Photodiode array detector. The peak containing STb was lyophilized and stored at -20°C.

STb biotinylation

STb biotinylation was performed following the method of Schryvers [40]. Sulfosuccinimidyl-6-(biotinamido)-hexanoate (biotin-XNHS, Calbiochem, San Diego, CA, USA) was dissolved

in dimethylsulfoxide to a final concentration of 25 mM. Twenty microlitres were added to 100 μ g purified STb dissolved in 0.9 ml of distilled water. The reaction mix was incubated for 2 h at 4°C with gentle end-to-end rotation. The reaction was then stopped by adding 100 μ l glycine (10 mg/ml in H₂O) and incubating for 2 h at 4°C. Biotinylated STb was dialysed against distilled water using a 2000 Da cut-off membrane for 4 h at 4°C. The biotinylation reaction efficiency was verified by Western blot using streptavidin conjugated to horseradish peroxidase. Biological activities of biotinylated and native STb were compared using ligated rat intestinal segments.

Frozen pig tissue sections preparation

Tissue samples from killed 8-week-old specific pathogen free pigs including liver, lung, spleen, kidney, duodenum, jejunum, ileum, caecum and colon were obtained. The tissue samples were embedded in Tissue-Tek OCT compound (Miles Inc., Elkhart, IN, U.S.A.), frozen immediately in liquid nitrogen for 3 h and stored at -70°C. Frozen sections of 5 μ m thickness were prepared using a Leitz 720 cryostat (Heidelberg, Germany) as reported by Dozois *et al.* [41]. The tissue sections were directly mounted on poly-L-lysine-coated glass slides (Canlab, Mississauga, Ontario, Canada), fixed for 10 min at 25°C with 1% (wt/vol) paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 5.8 (PB) and then washed three times with PB, air-dried and stored at -70°C until use.

In vitro STb binding assay

Each paraformaldehyde-fixed tissue section was incubated with 50 ng of biotinylated STb in 5 μ l of PB into a moist chamber at 25°C for 2 or 10 min. After four washings to remove unbound toxin, the tissue sections were air-dried. The slides were incubated with streptavidin conjugated to fluorescein-isothiocyanate (Calbiochem) at a dilution of 1:100 in 0.05 M carbonate buffer pH 9.0, in a dark moist chamber at 25°C for 1 h, then washed four times and air-dried. Sections were mounted in FA mounting fluid pH 9.0 (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) and observed at magnifications of 400 \times and 1000 \times on a Leitz microscope combined with a fluorescence epicondenser. Before all experiments, titration of STb was established with

STb binding to pig jejunum

concentrations ranging from 0.5 ng to 5 μ g per 5 μ l of PB per tissue section. Streptavidin conjugated to either FITC, biotin X-NHS or unbiotinylated STb, individually or in combination, were applied to the tissue sections as controls.

Physical and chemical treatments of STb

The following treatments were performed prior to the binding assay. (1) Time. To study the effect of time on STb binding, biotinylated toxin was incubated with pig jejunum for 1, 2, 5, 10, 20, 30 min or 2 h. (2) Temperature. In order to determine the influence of temperature on the rate of binding, incubation of STb was performed at 4°C, 25°C or 37°C. (3) Heat and 2-mercaptoethanol. Biotinylated STb was either boiled for 15 min or treated in the presence of 0.57 M 2-mercaptoethanol. Pig jejunum was also treated with 2-mercaptoethanol before incubation with biotinylated STb as control. (4) Chelator and ions. To determine if ions were involved in the binding of STb, biotinylated STb was incubated either with 1 or 10 mM EDTA, 1 or 5 mM CaCl₂ or 5 mM MgCl₂ or 150 mM NaCl. (5) Competition experiments. In order to inhibit STb interaction with the pig jejunum, 5 μ g (or 100-fold molar excess of unlabelled STb) were incubated on tissue sections for 30 min before performing the binding assay. In addition, 50 ng of biotinylated STb was preincubated for 30 min with either 20 μ g IgG (non-neutralizing serum) or 5 μ l of streptavidin conjugated to horseradish peroxidase.

Influence of pH on binding

Jejunum from 8-week-old specific pathogen free pigs were obtained, rinsed with cold PBS 0.1 M pH 7.4, incised, opened and frozen immediately in OCT for 3 h in liquid nitrogen, and stored at -70°C, until use. Frozen jejunum was cut using a punch (diameter of 5 mm) and placed in 100 μ l 0.1 M buffer at pH from 3.0 to 11.0. Acetate buffer was used for pH from 3.0 to 6.0, phosphate buffer was used to pH from 5.6 to 9.0 and Tris-HCl buffer was used for pH from 8.0 to 11.0. Then, 50 ng of biotinylated STb toxin was added and incubated for 30 min with the pig jejunum circular section. Subsequently, the buffer was discarded and the tissue washed and 100 μ l streptavidin conjugated to peroxidase was

added at a final dilution of 1:100 in 0.1 M phosphate buffer pH 7.0, and incubated for 1 h. The buffer was discarded and 200 μ l 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid) 4 mg/ml in citrate-phosphate buffer, pH 4.5 and H₂O₂ 25 μ l/10 ml was added to each tube. After 15 min of revelation, tubes were centrifuged and the supernatant was distributed in wells of a microtitre plate. Plates were read at 410 nm using a spectrophotometer (Dynatech MR 5000).

Chemical and enzymatic treatments of jejunal sections

Tissue sections were treated as follows and assayed for STb binding as described above. (1) Organic solvents. In order to examine the role of lipids in STb binding, tissue sections were treated with organic solvents. First, cold acetone (4°C) was used to ensure exteriorization of membrane glycolipids [42]. The sections were incubated with cold acetone for 10 min at 4°C and washed four times with the same solvent. The sections were then placed into a tank where the atmosphere was previously saturated with chloroform/methanol (1:1, vol/vol) for 15 min at 25°C and subsequently washed with the same solvent mix. The chloroform/methanol mix was used to solubilize lipids [42]. (2) Proteases. Tissue sections were incubated at 37°C in a moist chamber for 2 h with either 25 μ g (92.5 U) of trypsin (from bovine pancreas, Calbiochem), 166 μ g (14 U) of elastase (from pig pancreas, Sigma, Oakville, Ontario, Canada) or 20 μ g (15 U) of protease V8 (from *S. aureus*, Boehringer Mannheim) in 10 μ l 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0. After treatment, the sections were rinsed five times with PB containing protease inhibitors (0.4 mM PMSF, 1 mM EDTA) and the STb binding assay was carried out. Controls were performed by treating the sections without adding the enzyme. (3) N- and O-glycosidases. Treatments with N-glycosidase F or O-glycosidase (Boehringer Mannheim) were carried out according to the manufacturer's instructions. The sections were incubated either with 60 ng (1.5 U) of N-Glycosidase F in 20 mM cacodylate buffer pH 6.0, or 0.3 μ g (3 mU) of O-glycosidase in 10 μ l of PB at 37°C in a moist chamber for 16 h. Tissue sections treated in the same way but without the enzyme served as controls. (4) Sodium metaperiodate. Sodium metaperiodate oxidation was performed by treating jejunal sections with 10 μ l

of either 10 mM or 100 mM of sodium metaperiodate (Sigma) in 0.2 M sodium acetate buffer pH 5.0 at 25°C in a dark moist chamber for 1 h in the dark. Controls were carried out in parallel but omitting the sodium metaperiodate. (5) Glycosidases. Tissue sections were also treated with a battery of glycosidases, at 37°C in a moist chamber, following manufacturer's instructions (Boehringer Mannheim): 33.34 µg (0.5 U) of α-galactosidase (from green coffee beans) or 35 µg (0.5 U) of α-glucosidase (from yeast) in 0.1 M phosphate buffer pH 6.5; 166.67 ng (0.5 mU) of β-galactosidase (from bovine testes) in 0.1 M citrate-phosphate buffer pH 4.3; 2.5 µg (0.5 U) β-glucosidase (from sweet almonds) or 91 µg (0.5 U) of N-acetyl B-D-glucosaminidase (from beef kidney) in 0.1 M citrate buffer pH 4.5; 33.34 µg (0.5 U) of α-mannosidase (from jack bean) in 0.125 M acetic acid-NaOH buffer pH 4.5, 1 nM ZnCl₂, EDTA 1 nM; 35.71 µg (0.5 mU) of ceramide glycanase (from leech) in 0.05 M sodium acetate buffer pH 5.0; neuraminidase (from *C. perfringens*, Sigma) used at either 32.2 (1 U) or 322.6 µg (10 U) in 10 µl of PB. In control experiments, sections were incubated under similar conditions without the corresponding enzyme.

Protein determination

Protein concentration was determined by the method of Lowry as modified by Markwell *et al.* [43] using bovine serum albumin as the standard.

Western blot analysis

Western blot analysis was performed using Immunodyne™ membrane (Pall Biosupport Division, Glen Cove, NY, U.S.A.) to ensure STb biotinylation. Transfer was conducted as described [35]. The unreacted sites were blocked in 2% (wt/vol) skimmed milk in PBS, 20 mM, pH 7.4. Streptavidin conjugated to horseradish peroxidase at a dilution of 1:1000 was incubated 1 h at 25°C. Alternatively, after blocking, the membrane was probed with a monospecific polyclonal antiserum against STb (1:300), followed by goat anti-rabbit serum conjugated to horseradish peroxidase (1:2000). The reactive bands were visualized using 4-chloro-1-naphthol and H₂O₂ following the method of Hawkes [44].

Ligated rat intestinal segments

In vivo biological activity of STb was determined in ligated rat intestinal segments as described previously [45]. Briefly, 6- to 10-week-old white rats (Sprague-Dawley) were anaesthetized and the jejunum was exteriorized following a mid-line incision. Ligated intestinal segments of 5 cm in length were made and injected with 500 µl 20 mM Tris-HCl buffer containing 5 µg native STb, 5 µg biotinylated STb or control consisting of only the buffer. Two hours later, the animals were killed and the amount of fluid accumulated in the loop was measured. Results are expressed as the ratio of millilitres of fluid accumulated per centimeter of ligated intestinal segment. Values are the average ± standard deviation (SD) of four to eight determinations from four separate experiments. The data were analysed using the statistical Student's test.

Acknowledgements

The authors were supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (OGPO139070) and "Fonds pour la formation de chercheurs et l'Aide à la recherche (93-ER-0214)". The authors acknowledge Clarisse Desautels and Jules Deslandes for technical help with fluorescence microscopy techniques.

References

- 1 Karlsson K. Animal glycolipids as attachment sites for microbes. *Chem Phys Lipids* 1986; **42**: 153–72.
- 2 Handl CE, Olsson E, Flock JI. Evaluation of three different STb assays and comparison of enterotoxin pattern over a five-year period in Swedish porcine *Escherichia coli*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1992; **15**: 505–10.
- 3 Moon HW, Schneider RA, Moseley SL. Comparative prevalence of four enterotoxin genes among *Escherichia coli* isolated from swine. *Am J Vet Res* 1986; **47**: 210–12.
- 4 Burgess MN, Bywater RJ, Cowley CM, Mullan NA, Newsome PM. Biological evaluation of a methanol-soluble, heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits, and calves. *Infect Immun* 1978; **21**: 526–31.
- 5 Dubreuil JD. *Escherichia coli* STb enterotoxin (A review). *Microbiology* 1997; **143**: 1783–95.
- 6 Peterson JW, Whipp SC. Comparison of the mechanisms of action of cholera toxin and heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1995; **63**: 1452–61.
- 7 Kennedy DJ, Greenberg RN, Dunn JA, Abernathy R,

- Ryerse JS, Guerrant RL. Effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin STb on intestines of mice, rats, rabbits, and piglets. *Infect Immun* 1984; **46**: 639–43.
- 8 Weikel SC, Nellans HN, Guerrant RL. *In vivo* and *in vitro* effects of a novel enterotoxin, STb, produced by *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1986; **153**: 983–901.
 - 9 Harville BA, Dreyfus LA. Involvement of 5-hydroxytryptamine and prostaglandin E₂ in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b. *Infect Immun* 1995; **63**: 745–50.
 - 10 Weikel CS, Guerrant RL. STb enterotoxin of *Escherichia coli*: cyclic nucleotide-independent secretion. *Ciba Found Symp* 1985; **112**: 94–115.
 - 11 Whipp SC, Moon HW, Kennedy LJ, Argenzio RA. Effect of virus-induced destruction of villous epithelium on intestinal secretion induced by heat-stable *Escherichia coli* enterotoxins and prostaglandin E₁ in swine. *Am J Vet Res* 1985; **46**: 637–42.
 - 12 Sukumar M, Rizo J, Wall M, Dreyfus LA, Kuperztoch YM, Gierasch LM. The structure of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b by nuclear magnetic resonance and circular dichroism. *Protein Sci* 1995; **4**: 1718–29.
 - 13 Dreyfus LA, Urban RG, Whipp SC, Slaughter C, Tachias K, Kuperztoch YM. Purification of the STB enterotoxin *Escherichia coli* and the role selected amino acids on its secretion, stability and toxicity. *Mol Microbiol* 1992; **6**: 2397–406.
 - 14 Fujii Y, Okamoto Y, Hitotsubashi S, Saito A, Akashi N, Okamoto K. Effect of alterations of basic amino acid residues of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II on enterotoxicity. *Infect Immun* 1994; **62**: 2295–301.
 - 15 Arriaga YL, Harville BA, Dreyfus LA. Contribution of individual disulfide bonds to biological action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B. *Infect Immun* 1995; **63**: 4715–20.
 - 16 Dreyfus LA, Harville B, Howard DE, Shaban R, Beatty DM, Morris SJ. Calcium influx mediated by the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B (STB). *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 3202–6.
 - 17 Hitotsubashi S, Fujii Y, Okamoto K. Binding protein for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II in mouse intestinal membrane. *FEMS Microbiol Lett* 1994; **122**: 297–302.
 - 18 Chao KL, Dreyfus LA. Interaction of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B with cultured human intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 1997; **65**: 3209–17.
 - 19 Whipp SC, Moseley SL, Moon HW. Microscopic alterations in jejunal epithelium of 3-week-old pigs induced by pig-specific, mouse-negative, heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin. *Am J Vet Res* 1986; **47**: 615–18.
 - 20 Rose R, Whipp SC, Moon HW. Effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b on small intestinal villi in pigs, rabbits, and lambs. *Vet Pathol* 1987; **24**: 71–9.
 - 21 Hitotsubashi S, Akagi M, Saitou A, Yamanaka H, Fujii Y, Okamoto K. Action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II on isolated sections of mouse ileum. *FEMS Microbiol Lett* 1992; **90**: 249–52.
 - 22 Fasano A, Baudry B, Pumplun DW, et al. *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 5242–6.
 - 23 Whipp SC. Assay for enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable toxin b in rats and mice. *Infect Immun* 1990; **58**: 930–4.
 - 24 Holmgren J. Comparison of the tissue receptors for *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* enterotoxins by means of gangliosides and natural cholera toxin. *Infect Immun* 1973; **8**: 851–9.
 - 25 Schultz S, Green CK, Yuen PST, Garbers DL. Guanylyl cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor. *Cell* 1990; **63**: 941–8.
 - 26 Guerrant RL, Hugues JM, Chang B, Robertson DC, Murad F. Activation of intestinal guanylate cyclase by heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: studies of tissue specificity, potential receptors, and intermediates. *J Infect Dis* 1980; **142**: 220–7.
 - 27 Gibbons RA, Jones GW, Sellwood R. An attempt to identify the intestinal receptor for the K88 adhesin by means of a hemagglutination inhibition test using glycoproteins and fractions from sow colostrum. *J Gen Microbiol* 1975; **86**: 228–40.
 - 28 Kearns MJ, Gibbons, RA. The possible nature of the pig intestinal receptor for the K88 antigen of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 1979; **6**: 165–8.
 - 29 Blomberg L, Krivan HC, Cohen PS, Conway PL. Piglet ileal mucus contains protein and glycolipid (galactosylceramide) receptors specific for *Escherichia coli* K88 fimbriae. *Infect Immun* 1993; **61**: 2526–31.
 - 30 Holmgren J, Fredman P, Lindblad M, Svennerholm AM, Svennerholm L. Rabbit intestinal glycoprotein receptor for *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin lacking affinity for cholera toxin. *Infect Immun* 1982; **38**: 424–33.
 - 31 Griffith SL, Critchley DR. Characterization of the binding sites for *Escherichia coli* heat-labile toxin type I in intestinal brush borders. *Biochem Biophys Acta* 1991; **1075**: 154–61.
 - 32 Zimmelman BV, Chu SH, Walker WA. Host response to *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin via two microvillus membrane receptors in the rat intestine. *Infect Immun* 1989; **57**: 2947–52.
 - 33 Almenoff JS, Jurka J, Schoolnik GK. Induction of heat-stable enterotoxin receptor activity by a human Alu repeat. *J Biol Chem* 1994; **269**: 16610–17.
 - 34 Courthesy-Theulaz I, Porta N, Pringault E, et al. Adhesin of *Helicobacter pylori* to polarized T84 human intestinal cell monolayers is pH dependent. *Infect Immun* 1996; **64**: 3827–32.
 - 35 Handl CE, Harel J, Flock JI, Dubreuil JD. High yield of active STb enterotoxin from a fusion protein (MBP-STb) expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 1993; **4**: 275–81.
 - 36 Seignolle, D, Mouricout M, Duval-Flah Y, Quintard B, Julien R. Adhesion of K99 fimbriated *Escherichia coli* to pig intestinal epithelium: correlation of adhesive and non-adhesive phenotypes with the sialoglycolipid content. *J Gen Microbiol* 1991; **137**: 1591–1601.
 - 37 Grant CWM. Cell surface structural implications of some experiments with isolated glycolipids and glycoproteins. *Can J Biochem Cell Biol* 1984; **62**: 1151–7.
 - 38 Fishman PH, Pacuszka T, Orlandi PA. Gangliosides as receptors for bacterial enterotoxins. *Adv Lipid Res* 1993; **25**: 165–87.
 - 39 Bossé M, Handl CE, Lortie LA, Harel J, Dubreuil JD. Fusion of the genes encoding *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b (STb) and the maltose-binding protein to obtain mature STb enterotoxin. *J Gen Microbiol* 1993; **139**: 631–8.
 - 40 Schryvers AB. Identification of the transferrin- and lactoferrin-binding proteins in *Haemophilus influenzae*. *J Med Microbiol* 1989; **29**: 121–30.
 - 41 Dozois MC, Chanteloup N, Dho-Moulin M, Brée A,

- Desautels C, Fairbrother J. Bacterial colonization and *in vivo* expression of F1 (type 1) fimbrial antigens in chickens experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Dis* 1994; **38**: 231-9.
- 42 Christie WW. The isolation of lipids from tissues. In *Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids*, 2nd ed. Oxford: Pergamon Press, 1982: 17-23.
- 43 Markwell MAK, Hass SM, Bieber LL, Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in the membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 1978; **87**: 206-10.
- 44 Hawkes R. Identification of concanavalin A-binding proteins after sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis and protein blotting. *Anal Biochem* 1982; **123**: 143-6.
- 45 Dubreuil JD, Fairbrother JM, Lallier R, Larivière S. Production and purification of heat-stable enterotoxin b from a porcine *Escherichia coli* strain. *Infect Immun* 1991; **59**: 198-203.

Article 2 : Sulfatide from the pig jejunum brush border epithelial cell surface is involved in binding of *Escherichia coli* enterotoxin b (STb)

E. Rousset, J. Harel & J. D. Dubreuil

(Infection & Immunity, # IAI800-98, manuscrit soumis et retourné après modifications recommandées par l'éditeur)

Sulfatide from the Pig Jejunum Brush Border Epithelial Cell Surface is Involved in Binding of *Escherichia coli* Enterotoxin b (STb)

Running title : STb binding to sulfatide

Authors : Elodie Rousset, Josée Harel, and J. Daniel Dubreuil*. Groupe de recherche sur les maladies infectieuses du porc (GREMIP), Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6.

*Corresponding author. Address : Groupe de recherche sur les maladies infectieuses du porc (GREMIP), Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6. Phone : (450) 773-8521 ext. 8433. Fax : (450) 778-8108. E-mail : dubreuid@ere.umontreal.ca

ABSTRACT

Escherichia coli STb enterotoxin binding capacity to various glycolipids of defined structure was investigated using a quantitative dot-blot overlay assay on PVDF membrane. STb toxin bound strongly to acidic glycosphingolipids, including sulfatide (or 3'-sulfogalactosylceramide) and several gangliosides, but not significantly to their derivatives, which are galactosylceramide and asialogangliosides, respectively. The highest binding affinity of STb toxin was exhibited for sulfatide. STb bound to pure sulfatide in a dose-dependent and saturable manner with a detection level of a few nanograms. The binding was not inhibited by tetramethylurea, which is a strong disrupter of hydrophobic interactions, as well as by the anionic sulfated polymer of glucose, dextran sulfate, indicating that the binding is not due solely either to hydrophobic or to ionic interactions via the sulfate group of the sulfatide. The specificity of the binding was confirmed as a 500 fold molar excess of sulfatide inhibited STb binding by approximately 45 %, whereas no competition was obtained with galactosylceramide under the same conditions. Taken together, our data indicated that a galactose residue linked to a sulfate group is required for the binding specificity of STb. Then, total lipids extracted either from the mucous layer or from the epithelial cells of the pig jejunum brush border, the natural target of STb, were analyzed by thin-layer chromatography (TLC). Both extracts contained a lipidic molecule with a relative mobility on TLC plate similar to that of the sulfatide standard. The migrated lipid extracted directly from a preparative TLC plate was confirmed to be sulfatide, as it was recognized by laminin, a sulfated glycolipid binding protein, and by a monoclonal antibody directed against sulfatide. In overlay assay on PVDF membrane, STb bound to the

sulfatide prepared from porcine jejunum as well as to the sulfatide standard. Thus, these findings suggest that terminal oligosaccharide sequence Gal(3SO₄)β1- on sulfatide could mediate binding of STb to its target cells, and supporting a recent report (Rousset, E., J. Harel, and J.D. Dubreuil, *Microb. Pathog.*, 24 : 277-288, 1998), probably terminal sialic acid residue on another glycosphingolipid. Moreover, pretreatments in the ligated intestinal loop assay with laminin or sulfatase altered the biological activity of STb. In summary, we present data indicating that sulfatide represents a functional receptor for the STb toxin.

INTRODUCTION

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC), which produce enterotoxins, are a worldwide, economically important agent of diarrhea in animals and humans. These enterotoxins are classified as heat-labile toxins (LT-I and LT-II), which are multimeric proteins that resemble cholera toxin in structure and function (28, 39), and heat-stable toxins (STa and STb), which are peptides with no sequence homology and distinct mechanism of action (10, 35). Among the knowledge acquired on the heat-stable enterotoxin b (STb), the steps leading to diarrhea, especially those involving the initial binding of STb to the intestinal epithelial cell surface, are poorly understood (11).

Early and later reports indicated that ETEC strains producing STb are closely associated with weaning pig diarrheal diseases (2, 4, 46). STb enterotoxin induced a rapid fluid accumulation in the small intestine leading to diarrhea, as it was demonstrated by *in vivo* studies in ligated intestinal loop in a variety of animal models (45), and caused increased short circuit current across stripped porcine intestinal mucosa (43, 44). Unlike the other *E. coli* enterotoxins, intestinal secretion is independent of a cyclic nucleotide elevation (32, 35, 43). *In vitro* experiments with several different cell lines, of intestinal and nonintestinal origin, indicated that STb activates a pertussis toxin sensitive GTP-binding regulatory protein (G_{i3}), resulting in calcium ion entry through a receptor-dependent ligand-gated Ca^{2+} channel (9, 20). The elevated intracellular Ca^{2+} concentration in response to STb has been involved in activation of calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) through the Ca^{2+} -calmodulin pathway (16). The protein kinase II might be implicated in activation of an undetermined channel conducting intestinal ion transport. *In vivo*, STb

treatment results in a dose-dependent increase of prostaglandin E₂ (PGE₂) and 5-hydroxytryptamine (5-HT), which are two intestinal secretagogues (35). STb has been reported to stimulate arachidonic acid release from membrane phospholipids, apparently through phospholipases A₂ and C activity via a Ca²⁺-dependent mechanism, and subsequent formation and secretion of PGE₂ (15, 23, 35). In contrast, a Ca²⁺-independent mechanism was shown to mediate STb action via G protein activation for the release of 5-HT, presumably from intestinal enterochromaffin cells (19, 35). Furthermore, Chao and Dreyfus (6) have recently shown that after binding to the cell surface, STb is internalized into the cytoplasm following a stable association with lipids of the cell plasma membrane. They demonstrated that STb may penetrate into cells through an unknown receptor-mediated mechanism and suggested that STb may directly traverse the membrane bilayer.

However, the molecular details by which STb toxin binding could occur onto the plasma membrane surface remain unknown. Mucosal surfaces are the ports of entry and major sites of many infectious agents. A considerable number of microbes, including viruses, bacteria, fungi and parasites, bind to specific carbohydrate moieties on the mucosal surfaces (29). This property has been linked, in many cases, to the essential attachment to the host cells, enabling colonization and infection and potentially mediating a toxic effect on the host cells. These carbohydrate moieties may be present in either glycoproteins, proteoglycans or glycolipids (30). We postulated that the intestinal epithelial cell membrane surface may expose specific attachment sites for STb toxin. *In vitro*, attachment of STb toxin to intestinal epithelial cells have been studied, but its host receptors have not been identified. Chao and Dreyfus (6) determined that STb does not bind to proteins, glycoproteins or proteoglycans on the surface of cultured human epithelial cells, but presumably directly to membrane lipids. Hitotsubashi *et al.* (22) showed that STb binds

specifically to a protein of 25 kDa from mouse intestinal epithelial cell protein extracts. Nevertheless, Chao and Dreyfus (6) suggested that the identified 25 kDa-protein does not appear to be exposed on the cell surface. In our previous study (38), treatments of porcine jejunal thin sections before toxin binding assay with either sodium metaperiodate, organic solvents, or ceramide glycanase decreased STb binding, whereas no effect was observed following treatments with several specific proteases and O-glycosidase or N-glycosidase F. These data strongly indicated that glycosphingolipids present on epithelial cells surface of the pig jejunum, the STb natural host tissue, could be responsible for the attachment of the toxin. Moreover, terminal sialic acid residues were presumed to be involved in the binding to the pig jejunum, as pretreatment with neuraminidase from *Clostridium perfringens* completely inhibited the binding of STb to the cell surface.

In the present paper, binding of STb to various commercially available glycolipids was studied to examine the oligosaccharide structure recognized by STb toxin using an overlay assay on PVDF membrane. We report strong binding of STb toxin to terminal Gal(3SO₄)β1-residues of sulfatide, and a relatively weaker binding to terminal sialic acid residues found in several gangliosides. We further determined that sulfatide occurring in the total lipid extract of pig jejunum mucosal surface was bound by STb. Finally, the sulfatide appeared functional as laminin, a sulfated glycolipid binding protein, or sulfatase pretreatments of ligated rat intestinal loops inhibited significantly the *in vivo* action of STb. Those data indicated that sulfatide represents a functional STb receptor.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Tetramethylurea was purchased from American Chemicals Ltd. (Montreal, Qc, Canada). Orcinol ferric chloride spray reagent (Bial's reagent), dextran sulfate (Mr 10,000), dextran (Mr 9,500), sulfatase (type VI) from *Aerobacter aerogenes*, laminin from basement membrane of Engelbreth-Holm-Swarm mouse sarcoma, rabbit anti-laminin antibodies, NBT (nitro blue tetrazolium), BICP (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate), 4CN (4-chloro-1-naphthol) and fluorescein isothiocyanate (FITC)-antimouse IgG were from Sigma-Aldrich Ltd. (Oakville, ON, Canada). Alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G and horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin were obtained from Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. (Mississauga, ON, Canada). Polyclonal antibodies to STb toxin were produced by immunizing rabbits with pure STb (12). Mouse monoclonal antibody to sulfatide was kindly provided by Dr Pam Fredman, University of Göteborg, Sweden.

Lipids and glycolipids. Cholesterol (CHL), phytosphingosine (PG) from yeast, lactosylceramide from bovine, glucosylceramide from human (Gaucher's) spleen, globotriosylceramide and globotetraosylceramide from human erythrocytes, monosialoganglioside GM3, and all the following glycolipids from bovine brain: disialoganglioside GD3, monosialoganglioside GM2, monosialoganglioside GM1, trisialoganglioside GT1b, disialoganglioside GD1a, disialoganglioside GD1b, asialoganglioside GM1, galactosylceramide and sulfatide were purchased from Sigma-Aldrich Ltd. (Oakville, ON, Canada).

STb purification. STb enterotoxin was purified according to the described method (18). Briefly, the fusion protein MBP-STb was produced using an *Escherichia coli* recombinant strain harboring the pMal-STb plasmid coding for a fusion protein composed of the maltose binding protein (MBP) and the mature form of STb (3). The fusion protein was affinity-purified using an amylose resin (New England Biolabs Ltd., Mississauga, ON, Canada). After cleaving the fusion protein with factor Xa, STb was purified on a Poros R2/H-10/100 reverse phase-column (PerSeptive Biosystems, Cambridge, MA, USA) coupled to a Waters 625 Liquid Chromatography system (Waters, Milford, MA, USA). The peaks were monitored using a Waters 990 Photodiode array detector. Purified STb was lyophilized and stored at -20 °C. The purity of the toxin was routinely verified by N-terminal sequence analysis using Edman degradation (Applied Biosystem gas-phase sequencer, model 470 A) as described before (18). The biological activity of STb was assessed by the rat ligated intestinal loop assay (12).

Extraction of total lipids from preparation of pig jejunal epithelial cells and mucus. Pathogen-free pigs about 8-weeks-old who had fasted for 24 h were euthanized. The jejunum was surgically excised and rinsed with ice-cold phosphate buffered saline (PBS). In order to prepare jejunal epithelial cells, the jejunum was opened longitudinally and then cut into pieces and thoroughly rinsed with ice-cold PBS. The epithelial cells were harvested by scraping the mucosa with a microscope slide. The scraped cells were homogenized with a Tissue Grinder (Wheaton, NJ, USA) for 5 min. In order to prepare mucus from the porcine jejunum, the jejunum was also opened longitudinally and cut into pieces. The mucus was then harvested in PBS by gently scraping the mucosa with a rubber

policeman stirrer. Crude mucus was subjected to ultracentrifugation at 27,000 x g for 30 min, and the supernatant was filter sterilized (0.22 μ m).

Lipids were prepared by the chloroform-methanol extraction method (13). One volume of preparation corresponded to 1 ml of either the homogenized scraped jejunal epithelial cells or the ultracentrifugated and filtered jejunal mucus. Briefly, 20 vol of mixture of chloroform/ methanol, 2: 1 (v/v) containing 0.25% of concentrated HCl was added and yielded a homogeneous single phase suspension after vortexing. The extract was allowed to stand for at least 20 min, and was pelleted by centrifugation (15,000 g for 20 min) to remove the nonsoluble material, mainly composed of proteins. The supernatant, corresponding to the total lipid extract, was decanted. The extract was concentrated by evaporation of the solvent in a fume hood under a stream of nitrogen. The quantity of lipid was estimated using dry weight.

Lipids separation using thin-layer chromatography (TLC). Various lipid standards and total lipids extracts were chromatographed on aluminium-backed TLC plates coated with silica gel 60, AL SIL G/ UV₂₅₄, 250 mm (Whatman Ltd., Maidstone, Kent, England) using the solvent system of chloroform/ methanol/ CaCl₂ 0.02 % in water, 55 : 45 : 10 (v/v). Chromatograms were developed by spraying with Bial's reagent, as recommended by the manufacturer, to display sugars, glycolipids, sulfolipids and gangliosides with different colorations. Two dimensional TLC was carried out as follows. The first dimension was developed in the neutral solvent system of chloroform/ methanol/ CaCl₂ 0.02 % in water, 55 : 45 : 10 (v/v), and the second dimension was developed in the acidic solvent system of chloroform/ methanol/ acetone/ acetic acid/ water, 80 : 20 : 40 : 20 : 10 (v/v).

Isolation of sulfatide following preparative thin-layer chromatography. Total lipids extracted from pig jejunum epithelial cells were applied in a linear configuration across a 5-cm width of the aluminium backed TLC plate. Sulfatide standards were spotted at each end of the TLC plates, and chromatography was performed using chloroform/methanol/ CaCl₂ 0.02 % in water, 55 : 45 : 10 (v/v) as the solvent. Following the migration, standard lanes were cut out and stained with the Bial's spray reagent. The regions corresponding to the band of sulfatide on the remaining unstained plates were scraped with a disposable scalpel, and the silica gel was collected. A blank control experiment was done consisting of silica gel where no lipid material was applied. The putative sulfatide and the control were eluted from the collected silica gel by extraction with 2 ml of chloroform/methanol, 2 : 1 (v/v) per mg of silica gel. Solvent was separated from the silica gel by centrifugation at 5,000 g for 20 min. The extraction was conducted three times, and the solvent was pooled and evaporated. Then, the eluted putative sulfatide was resuspended in methanol and the control was resuspended in the same volume of methanol.

For identification of the eluted putative sulfatide, both extracts were submitted to either recognition with laminin, a glycoprotein which binds specifically to sulfated glycolipids (37), or immunodetection with mouse monoclonal antibody to sulfatide (14). Both extracts in methanol were dotted in triplicate on polyvinylidene difluoride membrane (PVDF, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). The methanol was allowed to evaporate for 10 min. The membrane with dotted extracts was blocked for 1 h in PBS (0.1 M, pH 7.4) supplemented with BSA 1 %. The technique used to detect the binding of laminin was modified from the method described by Iida *et al.* (25). In brief, after blocking, the membrane was overlaid with laminin at a concentration of 1 or 100 µg/ml in PBS for 2 h. Then after washing, the membrane was incubated for 1 h with rabbit anti-laminin

antibodies diluted 1/500 in PBS, washed and incubated for 1 h with goat anti-rabbit IgG conjugated to alkaline phosphatase diluted 1/2000 in PBS. After washing the membrane, the bound laminin was detected using color development with 7.5 ml of the revelation buffer containing 0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl and 0.05 M MgCl₂ to which 33 µl of NBT (75 µg/ µl in 70 % dimethylformamide), and 25 µl of BICP (50 µg/ µl in 100 % dimethylformamide). The reaction was stopped after 10 min by addition of H₂O. The immunodetection method with antisulfatide was carried out as follows. The blocked membrane was incubated with mouse monoclonal anti-sulfatide at a dilution of 1/100 in PBS for 2 h. Horseradish-peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse Ig, diluted 1/4000 in PBS, was used as the second antibody. Solutions of 4-CN and H₂O₂ were used to reveal the peroxidase reaction product using the method of Hawkes (21). Experiments omitting laminin and anti-sulfatide respectively were done as negative controls.

Dot Blot STb binding assay on PVDF membrane. This assay was developed to quantify the binding of STb toxin to various glycolipids. Each step was performed at 25°C. A PVDF membrane was dotted with 1 µl of each glycolipid in methanol. The solvent was allowed to evaporate for 10 min, the membrane was blocked for 1 h with PBS (0.1 M, pH 7.4) supplemented with BSA 1 %, and overlaid for 10 min with 50 µl/ cm² of STb at a concentration of 0.1 µg/ ml in phosphate buffer PB (0.1 M, pH 5.8). The membrane was rinsed 5 times with PBS to remove unbound toxin, and incubated for 1 h with a rabbit polyclonal antiserum directed against STb diluted 1/500 in PBS to detect bound toxin. The membrane was rinsed and incubated for 1 h with the alkaline phosphatase-conjugate diluted 1/2000 in PBS. After washing the membrane, color development was carried out using

NBT and BICP as described above. Experiments omitting STb were done as negative controls.

Quantitative binding of STb to glycolipids was determined by densitometric analysis (Alpha Imager™ 2000, Canberra Packard Ltd., Montreal, Qc, Canada) of the PVDF membranes. For analysis, the background of the membrane was subtracted for each value to allow for possible small differences in background within and between membranes. The mean densitometric value obtained for each glycolipid on the control membrane, without STb, was subtracted from the mean densitometric value obtained on the membrane with STb overlay. The results shown are the mean \pm standard deviation of triplicate determinations and represent quantitative binding of STb.

Treatments of STb with various chemicals. STb was incubated for 10 min in presence of various chemicals prior to the STb binding assay. The applied method was carried out as described above in the standard protocol. STb was preincubated with either 0.01 M or 0.50 M of tetramethylurea (TMU), and with either 0.05 or 1 mg/ml of dextran (Mr 9,500) or dextran-sulfate (Mr 10,000). For the competition experiments, STb was preincubated with either sulfatide or galactosylceramide in 500 fold molar excess. For each experiment, positive control was done under the same conditions in the absence of the chemical tested.

Immunocytochemistry. Freshly excised jejunum of pig about 6-weeks-old was cut into small pieces and was immediately frozen in OCT compound (Miles Inc., Elkhard, IL, U.S.A.) and stored at -70 °C. Sections 5 μ m thick were cut with a cryostat microtome (LEICA, model CM3050) and were thaw-mounted on poly-L-lysine-coated glass slides

(Canlab, Mississauga, ON, Canada). After a brief immersion of the slides in cold acetone, the diluted antisulfatide monoclonal antibody (1/50) in PBS was applied to tissue sections and incubated 10 hours at 4 °C. After washing in PBS five times, diluted fluorescein isothiocyanate (FITC)-antimouse IgG (1/64) in PBS was applied and these sections were incubated 10 hours at 4 °C in a dark chamber, and latter washed five times. Control slides without the first antibody were run in parallel. Slides were mounted in FA mounting fluid pH 9,0 (Difco Laboratories, Detroit, MI, U.S.A.) and observed using a Leitz microscope combined with a fluorescence epicondenser at a magnification of 100 x and of 500 and 1000 x under oil immersion.

Ligated rat intestinal loop assay. *In vivo* action of STb was determined in ligated rat intestinal loop assay as described previously (12). Briefly, six- to eight-week-old white male rats (Sprague-Dawley) were fasted for 48 h and anesthetized. The small intestine was exteriorized following a midline abdominal incision and rinsed with 8 ml of 0,85 % of saline solution containing 300 µg of trypsin inhibitor (TI) (Boehringer Mannheim, GmbH, Germany) per ml. A serie of ligated segments (loops) of 5 cm in lenght were made in the small intestine and injected with 500 µl of the test material in 20 mM Tris hydrochloride buffer (pH 6,8) containing 300 µg of TI per ml. Each loop received either 2 units of sulfatase, 400 µg of laminin or the buffer only and were then incubated for 20 min before the addition of 5 µg of pure STb. One rat also received either a dilution 1/100 of the anti-sulfatide monoclonal antibody, a mouse monoclonal antibody anti-LPS O-chain of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype I or the buffer only. The abdominal incision was closed and later, the rats were euthanized and the amount of fluid accumulated in the loop was measured. Results are expressed as the ratio of millimeters of fluid accumulated per

centimeter of ligated intestinal segment. Values are the average \pm standard deviation (SD) of at least three experiments and were evaluated statistically by Student's *t* test.

RESULTS

Binding of STb toxin to glycolipids. Various standards of neutral lipids, acidic and neutral glycolipids were subjected to dot blot STb binding assay on PVDF membrane to compare their affinities for STb (Table 1). As shown in Figure 1, among the glycolipids tested, STb bound strongly to sulfatide but also more weakly to several gangliosides. The highest binding affinity for STb was obtained with sulfatide and so, the binding level of sulfatide was set arbitrarily at 100 %, for comparison purpose. A binding level relative to that of sulfatide of 30 % or less was shared by all neutral glycolipids and every lipid tested, suggesting that neutral carbohydrate were not significantly involved in STb recognition.

The following gangliosides : GM3, GM2, and GD1b exhibited binding levels of at least 40 % relatively to the sulfatide. The binding to GM3 was of 54 % whereas it was less than 25 % to lactosylceramide (asialo-GM3). The levels of GD1b and GM1 binding were approximately 46 % and 33 %, respectively, whereas it was less than 15 % for asialo-GM1. Thus, the relative binding levels between these related glycolipids of the sialo- and asialo-gangliosides series indicated that the absence of the sialic acid resulted in a remarkable difference in binding to STb toxin. This result suggested that sialic acid residues are involved in the binding process. Interestingly, binding less than 30 % when compared to sulfatide was observed for galactosylceramide; the latter being the precursor structure of sulfatide where a terminal sulfate is added to the 3-position of the galactose. The difference obtained between these two structurally related structures suggested that the sulfate group on the glycolipid participates in the interaction of the STb toxin.

Binding epitope of sulfatide for STb toxin. Since STb bound to sulfatide with the highest affinity among the lipids tested, further experiments were conducted to determine the nature of this interaction. The binding of STb (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) to increasing amounts of sulfatide was dose-dependent (Fig. 2). This result shows that STb bound avidly to sulfatide, even at concentrations less than 100 ng. Saturation was obtained around 1 μg of sulfatide within the concentration range used. The decreased binding may be due to superposition of glycolipid and ligand-glycolipid complexes occurring on the PVDF membrane, which might be washed away as the amount of glycolipid increased.

The nature of the interaction between STb and the sulfatide was further characterized by determining the effect of various chemicals on binding (Fig. 3). STb toxin (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was preincubated with a fixed concentration of the tested chemicals and subsequently added to 1 μg of immobilized sulfatide on PVDF membrane. The toxin was treated with tetramethylurea (TMU), which strongly disrupts hydrophobic interactions. The binding of STb in the presence of TMU was not affected compared to the untreated control. Thus, the hydrophobic ceramide moiety of the sulfatide did not appear to be responsible for the interaction with STb.

The difference of binding efficiencies observed between the sulfatide and galactosylceramide may be attributed to the charge of the sulfate group. As STb is a basic peptide (17, 18), it is possible that the binding was simply due to ionic charges. To determine the importance of the sulfate group, the toxin was incubated with either dextran or sulfated dextran. Those compounds exerted no significant effect on the binding of STb to sulfatide, suggesting that it is not solely the result of an ionic interaction (Fig. 3). Furthermore, binding to dextran and sulfated dextran was assayed by incubation with STb. No binding of STb was observed to 0.05 μg or 100 μg of dextran or dextran sulfate

immobilized on nitrocellulose membranes (data not shown). The data indicate that recognition may also involved the stereospecificity between STb and both the sulfate group and the galactose residue that seems to constitute the recognized binding epitope. We also examined the ability of the sulfatide to compete for STb binding. Sulfatide in 500 fold molar excess was a potent competitor of STb binding with approximately 45 % inhibition from total binding obtained, whereas the corresponding amount of galactosylceramide showed no detectable inhibition (Fig. 4).

Occurrence of sulfatide-like glycolipid in lipids extracted from pig jejunal epithelial cells and mucus. Total lipids were extracted from the mucosal cell surface and mucus of the pig jejunum, and were resolved on the thin-layer chromatogram. Many of the lipid molecules were detected by Bial's reagent and were therefore regarded as glycolipids. One of them had a mobility similar to that of the standard sulfatide (Fig. 5). Identification of the lipid contained in this band was performed. We observed that the band comigrated with standard sulfatide when total lipids extract was submitted to two dimensional TLC using a different elution system (data not shown). Thus, the band of interest did not correspond to a mixture of lipids, suggesting a composition and a structure similar to the standard sulfatide.

The jejunal lipid contained in this sulfatide-like band was extracted and purified to homogeneity from the TLC plate. The preparations of the jejunal lipid and of a silica gel control were overlaid with laminin, a glycoprotein which specifically binds to sulfated glycolipids. Laminin bound to the extracted lipid but not to the extracted silica gel control. Furthermore, the jejunal lipid was specifically recognized by a monoclonal anti-sulfatide antibody (data not shown). The epitope recognized by this monoclonal antibody, developed

by Fredman *et al.* (14), is the terminal Gal(3SO₄)β1- and part of the hydrophobic region of the ceramide. These results indicated that sulfatide was present in the total lipid extract of the pig jejunum mucosal surface. Moreover, an immunocytochemistry study of pig jejunum using the monoclonal anti-sulfatide antibody revealed that epithelial cells of the mucosa were specifically labeled, and that no staining was observed in controls in which the first antibody was omitted (Fig. 6). Thus, sulfatide was shown to be accessible to STb toxin on the target cell surface.

Binding activity of STb toxin to the sulfatide obtained from the pig jejunum mucosal cell surface. Using TLC, the sulfatide band from the total lipids preparation of epithelial cells was 4 time less intense than the band corresponding to 5 μg of sulfatide standard as determined by densitometry (Fig. 5), indicating that approximately 1.25 μg of sulfatide is contained in 200 μg of total lipid extract (or 0.62 %). As shown in figure 7, the eluted epithelial cell sulfatide was bound by STb in the dot blot STb binding assay on PVDF membrane. The amounts of eluted sulfatide dotted were from 80 μg and 240 μg of jejunal epithelial cell total lipids extract. The corresponding amounts of eluted sulfatide were thus estimated to 0.5 μg and 1.5 μg, respectively. The results indicate that the binding levels measured with the eluted sulfatide are similar to those with the sulfatide standard shown in Figure 2, in which 0.5 μg and 1.5 μg resulted in binding levels of approximately 7300 and 8700 (DU, Densitometric Unit), respectively. Thus, the binding of STb to the sulfatide identified in the porcine jejunum seems dose-dependent and saturable similarly to the sulfatide standard.

Functional receptor activity of sulfated glycolipid for STb toxin. In the *in vivo*

model, the biological activity of STb was strongly inhibited when the intestinal loops were pretreated with either sulfatase or laminin before addition of STb, while the ratio obtained when either sulfatase or laminin was injected alone into the loops were similar to the loop control containing only the buffer (Fig. 8). An inhibition of approximately 100 % of the STb-mediated secretion was observed following pretreatment with sulfatase. Thus, the sulfation of cell surface molecules seems crucial for biological activity of STb. The pretreatment with laminin decreased the biological response of STb by approximately 71 %, indicating the functionality of the sulfated glycolipids, including the sulfatide present in the cell membrane. Additional evidence provided the functional activity of the sulfatide, as we have observed a reduction of secretion due to STb by 35 % following a pretreatment with the diluted monoclonal anti-sulfatide antibody (1/100) (data not shown).

DISCUSSION

The interaction of most extracellular toxins, like the *E. coli* STb enterotoxin, to host cells is thought to be an important first step in pathogenesis in order to elicit a specific toxic effect. This pathogenic event is most likely to take place through the binding of the toxin to specific receptors on target cells. In the search of the molecules which serve as STb receptor, we have recently investigated the interaction of STb at the surface of the epithelial cells of the pig jejunum brush border (38). Our study indicated that oxidation of the carbohydrates from the cell surface by sodium metaperiodate treatment significantly inhibited STb binding, suggesting that the binding could be mediated by a lectin-like activity of the STb toxin. We have also shown that the glycoconjugate molecules bound by STb were lipid and not proteinaceous in nature.

In this study, a simple binding assay for the STb toxin was developed, in which densitometric analysis provided a mean for quantitation of bound toxin to various purified lipids and glycolipids containing different oligosaccharide structures (Table 1). A polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane was used because of its stability in various organic solvents in addition to its capacity to immobilize glycolipids with high efficiency (5, 41). Several optimal parameters of the STb binding reaction to the pig jejunum thin sections were established in our previous study (38). Here, the binding assay was performed under the same optimal conditions (with STb at a final concentration of 0.1 $\mu\text{g/ml}$, in phosphate buffer 0.1 M, pH 5.8 for 10 min). Of the many tested lipids and glycolipids, STb toxin selectively bound to acidic glycolipids (Fig. 1). Sulfatide, which is a molecule carrying an anionic sulfate residue, showed the strongest binding affinity. STb toxin did

also significantly bind to several gangliosides and the negatively charged sialic acid residues appeared to be involved in this reaction. The implication of acidic glycolipids in STb binding was not surprising. Since mature STb is a basic peptide with a pI of 9.6 (18), the binding of STb to acidic molecules suggested that a strong stereospecific and electrostatic bond can be formed between a protonated nitrogen of STb and the anionic site on the glycolipid. In other words, most of the affinity of the acidic glycolipids with STb may require an intact three dimensional structure containing some specific positively charged amino acids. Of interest, three positively charged amino acid residues K45, K46 and R52 and one negatively charged amino acid residue D53 containing in STb were previously shown to be crucial for enterotoxicity and were presumed to belong to a receptor-binding domain (10, 17).

The specificity of STb binding to sulfatide was demonstrated here by several indirect and direct evidences. We have shown that this binding was strong, dose-dependent and saturable, and, not due to either hydrophobic or sulfate group ionic interactions alone. Finally, the specificity was supported as the binding was competed by an excess of the sulfatide. Differences in STb binding levels between sulfatide and galactosylceramide indicated that the sulfation of the carbohydrate chain was important for binding (Fig. 1). However, the sulfate group itself was not sufficient to explain STb binding, since sulfated dextran, a sulfated polymer of glucose, had no effect on binding of STb to sulfatide (Fig. 3). Sulfatide competition suggested that the binding was dependent on the sulfate group linked on the galactosyl moiety (Fig. 4). As STb was not competed by galactosylceramide, it indicated that the unsubstituted galactosyl residue was not sufficient to allow STb binding. The sulfation of this carbohydrate seems important for binding. Thus, the binding goes beyond simple charge interactions with an anionic group and has also some specificity for

the nature of the carbohydrate with a particular chain geometry and distribution of negative charge. These results indicate that STb binding specificity for sulfatide requires the Gal(3SO₄)β1- residue.

A lipid preparation from the pig jejunum exhibited one lipid with a mobility on TLC similar to the standard sulfatide (Fig. 5), and the sulfatide identification was confirmed by specific detections with laminin binding and with a anti-sulfatide monoclonal antibody. Our findings indicated that substantial amounts of sulfatide were present in porcine epithelial cells and associated with the mucous layer. Glycolipids are membrane-bound molecules and do not appear in secretions, except when shed with epithelial cells. The small intestinal epithelium is continuously renewed by the proliferation of some mitotically active crypt cells, which migrate towards the top of the villi where they desquamate. The presence of sulfatide in mucus could be explained in part by the abundance of this substance at the cell surface and also by the procedure retained for mucus preparation, in which the interstitial mucus was harvested and may therefore contain some epithelial cells.

The cellular surface localization and abundance of sulfatide was confirmed in pig jejunal mucosa using immunocytochemistry (Fig. 6). Multiple functions have been proposed for sulfatide, including a role in sodium chloride transport (31), in myelin compaction by its association with the encephalitogen basic protein (8), as opiate receptors (7), and a role in cell adhesion (36, 40). Although this sulfated glycolipid is most abundant in the white matter of the brain, it is also found in the extracellular matrix, in mucus, and on the surface of epithelial cells of many mammalian tissues. Sulfatide has been already shown to be the most predominant acidic glycosphingolipid in rabbit and human gastric mucosa (33, 34). Because of its acid-resistant nature and the high negative charge of the sulfated sugar moiety, it was assumed that sulfatide might play a role in protection of the mucosa.

From this point of view, enrichment of the pig jejunum mucosa with sulfatide is consistent with the physiological relevance of this particular substance to mucosal function, because the pH of the jejunum is relatively acid, varying between 5.5 and 6.5. Moreover, the localization of sulfatide on mucosal cell surface indicates that this molecule could also be recognized and utilized as a receptor. We have effectively shown that sulfatide was present in the total lipids extract of the pig jejunum mucosal surface and that this jejunal sulfatide was bound by STb toxin (Fig. 7). The binding activity of STb to sulfatide corroborates the inhibition of the secretory response evoked by STb in the ligated loop model observed with either sulfatase or laminin pretreatments (Fig. 8). The elimination of sulfate groups of various carbohydrate sequence, including the sulfate groups on the galactose residues present in sulfatide, abolished completely STb activity. In addition, the STb enterotoxicity was strongly affected following the action of the laminin, a 850-kDa cell adhesion protein which binds specifically to sulfated glycolipids and does not bind to other anionic lipids, including gangliosides, phospholipids, or cholesterol-3-sulfate (37). The monoclonal anti-sulfatide antibody also altered STb toxicity. Together, these data indicate that sulfatide molecule functions as a receptor for STb interaction *in vivo*.

Investigations will be pursued in order to determine if sulfatide is the unique functional receptor for STb. Effectively, the reported results also support that terminal sialic acid residues of gangliosides might be involved in the binding of STb. Significant binding was obtained with several gangliosides, including GM3, GM2 and GD1b, whereas binding to asialo-GM1 and asialo-GM3 (lactosylceramide) was 3 and 4 times less, respectively (Fig. 1). Because of the unique structural difference between these molecules is the presence or absence of sialic acid residues, it appears that sialic acid residues are important for STb binding to gangliosides. Binding of STb to gangliosides was expected because it was

already described that pretreatment of pig jejunal epithelial cells surface with the neuraminidase from *Clostridium perfringens* completely abolished the binding of STb (38). The effect on STb binding following the pretreatment of HT29 and T84 human intestinal epithelial cells with a neuraminidase from *Vibrio cholerae* was also studied by Chao and Dreyfus (6). The results have shown that the neuraminidase pretreatment did not reduce the binding of STb to the cells. While both the pH of the assay binding buffer and the nature of the cells used were different, the neuraminidase specificity cleavage appears to be the most important difference between the two studies. In fact, the enzyme from *C. perfringens* preferentially cleaves sialic acid in terminal location and linked α 2-3 to galactose, whereas the enzyme from *V. cholerae* used by Chao and Dreyfus (6) selectively cleaves terminal sialic acid linked α 2-6 to galactose. Therefore, our data highlighted the importance of sialic acid in α 2-3 linkage to galactose for the binding of STb. Interestingly, the GM3 ganglioside, which exhibited the strongest binding to STb in comparison with the other tested gangliosides, contains a short carbohydrate sequence, where NeuAc α 2-3Gal β 1- is found in terminal position (Table 1). However, the commercially available gangliosides tested in this study did not allow us to identify which ganglioside in the target tissue total lipids extract could be responsible for STb binding. Further analysis are in progress in our laboratory to examine the role of gangliosides in STb toxin binding, but one challenging hypothesis may be developed to describe the relevant binding of STb to its target cells.

First, since the *C. perfringens* neuraminidase treatment of pig jejunum completely abolished STb binding, it was thought that STb could not exhibit binding to glycosphingolipids other than gangliosides (38). Nevertheless, a strong binding level toward sulfatide obtained from the pig jejunal epithelial cells was shown (Fig. 7). Thus, sulfatide and some gangliosides are present on the cell surface of the jejunum and could be

all bound by STb toxin. Then, if these two attachment sites are required for STb on the target cells, the data let us hypothesize a multistep attachment process where sulfatide-mediated binding occurs only if the attachment to ganglioside takes place first. This hypothesis could explain why the binding of STb to sulfatide could not be detected after neuraminidase treatment that affects the ganglioside binding to the pig jejunum. Second, Chao and Dreyfus (6) have observed that elimination of sulfated structures by pretreatment of human intestinal epithelial cell lines with sodium chlorate did not decrease the binding of STb to the cells. Sodium chlorate, which is a potent inhibitor of cellular sulfotransferases, induces expression of surface glycoproteins and glycolipids lacking sulfate groups (24). According to our proposed model, after elimination of surface sulfation, binding to sialic acid of gangliosides would be nevertheless possible. The observed binding might represent binding to ganglioside in absence of sulfated structures. Third, we present evidence that the sulfated structures act as biologically functional receptors for STb, as sulfatase pretreatment in ligated rat intestinal loop assay abolished STb enterotoxicity (Fig. 8). Overall in this study, cell surface sulfated glycolipids were shown to be required in both binding and biological activities of STb. We thus propose a multistep binding model for STb on epithelial cells : the binding to ganglioside could represent the first step, which might be important to facilitate the subsequent binding to sulfatide. This second step could ensure an intimate contact of the toxin with the host cell membrane due to the shorter structure of the sulfatide molecule.

The competitive binding experiments performed by Chao and Dreyfus (6) indicated that unlabeled STb could specifically compete with ^{125}I -STb binding to a receptor on T84 and HT29 cells, but failed to reduce by more than 50 % of the binding in the presence of 5-, 100- and 1000- fold excess STb. The authors concluded that the STb toxin-epithelial cell

interactions could be characterized by binding to a high number of binding sites and that STb could interact with multiple receptors. Based on our previous study (38) and the results of this study, at least two glycolipid molecules could effectively be involved in STb recognition and binding to pig jejunum. STb toxin could bind both sialic acid and sulfated galactose residues on gangliosides and sulfatide, respectively. These glycosphingolipids could serve as multiple attachment sites for STb toxin. Interestingly, the parallel occurrence of sialic acid and sulfate group specificities has been observed for some lectins. For example, the vascular adhesion family of selectins exhibited specificity for the blood group oligosaccharides sialyl-Lewis^x and sialyl-Lewis^a bearing either a sialic acid linked α 2-3 or a sulfate group on carbon 3 of the nonreducing terminal galactose (42). Another example is the natural killer cell called lectin NKR-P1, which bound α 2-3 linked sialic acid- or sulfate-modified galactosyl determinants on tumor cell membrane constituents, with greater affinity for the latter (1). Complete characterization of the STb -sulfatide and -ganglioside binding reactions should help to develop a STb-receptor model to study the process at the molecular level.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants to J.D. D. from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (OGP0139070) and Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (93-ER-0214). The authors wish to express their appreciation to Dr Pam Fredman, Göteborg University, Sweden, for providing the anti-sulfatide monoclonal antibody used in this study, to Dr Maan Abul Milh for his helpful suggestions, and to Hans-E. Beausoleil and Vincent Labrie for their precious collaboration with the rat loop assays.

REFERENCES

1. **Bazouska, K., C.-T. Yuen, J. O'Brien, R. A. Childs, W. Chai, A. M. Lawson, K. Drbal, A. Fiserová, M. Popìsil, and T. Feizi.** 1994. Oligosaccharide ligands for NKR-P1 protein activate NK cells and cytotoxicity. *Nature*. 372:150-157.
2. **Blanco, M., J. E. Blanco, E. A. Gonzales, A. Mora, W. Jansen, T. A. T. Gomes, F. Zerbini, T. Yano, A. F. P. de Castro, and J. Blanco.** 1997. Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different O:K:H serotypes: relationship with toxic phenotypes. *J. Clin. Microbiol.* 35:2958-2963.
3. **Bossé, M., C. E. Handl, L. A. Lortie, J. Harel, and J. D. Dubreuil.** 1993. Fusion of the genes encoding *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b (STb) and the maltose-binding protein to obtain mature STb enterotoxin. *J. Gen. Microbiol.* 139:631-638.
4. **Burgess, M. N., R. J. Bywater, C. M. Cowley, N. A. Mullan, and P. M. Newsome.** 1978. Biological evaluation of a methanol-soluble, heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits, and calves. *Infect. Immun.* 21:526-531.
5. **Chabraoui, F., E. A. Derrington, F. Mallie-Didier, C. Confavreux, C. Quincy, and C. Caudie.** 1993. Dot-blot immunodetection of antibodies against GM1 and other gangliosides on PVDF-P membranes. *J. Immunol. Methods.* 165:225-230.

6. **Chao, K. L., and L. A. Dreyfus.** 1997a. Interaction of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B with cultured human intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* 65:3209-3217.
7. **Craves, F. B., B. Zalc, L. Leybin, N. Baumann, and H. H. Loh.** 1980. Antibodies to cerebroside sulfate inhibit the effects of morphine and β -endorphin. *Science.* 207:75-76.
8. **Demel, D. A., U. London, W. S. M. Geurts Van Hessel, F. G. A. Vossenberg, and V. D. L.L.M.** 1973. The specific interaction of myelin basic protein with lipids at the air-water interface. *Biochim. Biophys. Acta.* 311:506-519.
9. **Dreyfus, L. A., B. Harville, D. E. Howard, R. Shaban, D. M. Beatty, and S. J. Morris.** 1993. Calcium influx mediated by the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B (ST_B). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:3202-3206.
10. **Dreyfus, L. A., R. G. Urban, S. C. Whipp, C. Slaughter, K. Tachias, and Y. M. Kupersztoch.** 1992. Purification of the ST_B enterotoxin of *Escherichia coli* and the role of selected amino acids on its secretion, stability and toxicity. *Mol. Microbiol.* 6:2397-2406.
11. **Dubreuil, J. D.** 1997. *Escherichia coli* ST_b enterotoxin. *Microbiology.* 143:1783-1795.
12. **Dubreuil, J. D., J. M. Fairbrother, R. Lallier, and S. Larivière.** 1991. Production and purification of heat-stable enterotoxin b from a porcine *Escherichia coli* strain. *Infect. Immun.* 59:198-203.

13. **Folch, J., M. Lees, and G. H. Sloane Stanley.** 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226:497-509.
14. **Fredman, P., L. Mattson, K. Andersson, P. Davidsson, I. Ishizuka, S. Jeansson, J. E. Mansson, and L. Svennerholm.** 1988. Characterization of the binding epitope of a monoclonal antibody to sulphatide. *Biochem. J.* 251:17-22.
15. **Fujii, Y., Y. Kondo, and K. Okamoto.** 1995. Involvement of prostaglandin E2 synthesis in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *FEMS Microbiol. Lett.* 130:259-265.
16. **Fujii, Y., T. Nomura, H. Yamanaka, and K. Okamoto.** 1997. Involvement of Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase II in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *Microbiol. Immunol.* 41:633-636.
17. **Fujii, Y., Y. Okamuro, S. Hitotsubashi, A. Saito, N. Akashi, and K. Okamoto.** 1994. Effect of alterations of basic amino acid residues of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II on enterotoxicity. *Infect. Immun.* 62:2295-2301.
18. **Handl, C. E., J. Harel, J. I. Flock, and J. D. Dubreuil.** 1993. High yield of active STb enterotoxin from a fusion protein (MBP-STb) expressed in *Escherichia coli*. *Prot. Expr. Purif.* 4:275-281.
19. **Harville, B. A., and L. A. Dreyfus.** 1996. Release of serotonin from RBL-2H3 cells by the *Escherichia coli* peptide toxin STb. *Peptides.* 17:363-366.
20. **Harville, B. A., B. J. Morris, and L. A. Dreyfus.** Involvement of heterotrimeric G-protein (G α i3) in the mechanism of action of *Escherichia coli* enterotoxin B. General Meeting of the American Society for Microbiology, Washington, DC. 1995: B-215.

21. **Hawkes, R.** 1982. Identification of concanavalin A-binding protein after sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis and protein blotting. *Anal. Biochem.* 123:143-146.
22. **Hitotsubashi, S., Y. Fujii, and K. Okamoto.** 1994. Binding protein for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II in mouse intestinal membrane. *FEMS Microbiol. Lett.* 122:297-302.
23. **Hitotsubashi, S., Y. Fujii, H. Yamanaka, and K. Okamoto.** 1992a. Some properties of purified *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *Infect. Immun.* 60:4468-4474.
24. **Hoogewerf, A. J., L. A. Cisar, D. C. Evans, and A. Bensadoun.** 1991. Effect of chlorate on the sulfation of lipoprotein lipase and heparan sulfate proteoglycans. Sulfation of heparan sulfate proteoglycans affects lipoprotein lipase degradation. *J. Biol. Chem.* 266:16564-16571.
25. **Iida, N., T. Toida, Y. Kushi, S. Handa, P. Fredman, L. Svennerholm, and I. Ishizuka.** 1989. A sulfated glucosylceramide from rat kidney. *J. Biol. Chem.* 264:5974-5980.
26. **IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, C. B. N.** 1978. The nomenclature of lipids. *Biochem. J.* 171:21-35.
27. **IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature, J. C. B. N.** 1986. Nomenclature of glycoproteins, glycopeptides and peptidoglycans. Recommendations 1985. *Eur. J. Biochem.* 159:1-6.
28. **Kaper, J. B., J. G. Morris, Jr., and M. M. Levine.** 1995. Cholera. *Clin. Microbiol. Rev.* 8:48-86.

29. **Karlsson, K. A.** 1995. Microbial recognition of target-cell glycoconjugates. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:622-635.
30. **Karlsson, K. A., J. Ångstrom, J. Bergstrom, and B. Lanne.** 1992. Microbial interaction with animal cell surface carbohydrates. *APMIS-Supl.* 100:71-83.
31. **Karlsson, K. A., B. E. Samuelson, and G. O. Steen.** 1974. The lipid composition and Na⁺-K⁺-dependent adenosine triphosphatase activity of the salt (nasal) gland of eider duck and herring gull. *Eur. J. Biochem.* 46:243-258.
32. **Kennedy, D. J., R. N. Greenberg, J. A. Dunn, R. Abernathy, J. S. Ryerse, and R. L. Guerrant.** 1984. Effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin STb on intestines of mice, rats, rabbits, and piglets. *Infect. Immun.* 46:639-643.
33. **Natomi, H., T. Saitoh, K. Sugano, M. Iwamori, M. Fukayama, and Y. Nagai.** 1993. Systematic analysis of glycosphingolipids in the human gastrointestinal tract: enrichment of sulfatides with hydroxylated longer-chain fatty acids in the gastric and duodenal mucosa. *Lipids.* 28:737-742.
34. **Natomi, H., K. Sugano, M. Iwamori, F. Takaku, and Y. Nagai.** 1988. Region-specific distribution of glycosphingolipids in the rabbit gastrointestinal tract: preferential enrichment of sulfoglycolipids in the mucosal regions exposed to acid. *Biochim. Biophys. Acta.* 961:213-222.
35. **Peterson, J. W., and S. C. Whipp.** 1995. Comparison of the mechanisms of action of cholera toxin and the heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 63:1452-1461.
36. **Roberts, D. D., and V. Ginsburg.** 1988. Sulfated glycolipids and cell adhesion. *Arch. Anal. Biochem. Biophys.* 267:405-415.

37. **Roberts, D. D., C. N. Rao, J. L. Magnani, S. S.L., L. A. Liotta, and V. Ginsburg.** 1985. Laminin binds specifically to sulfated glycolipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:1306-1310.
38. **Rousset, E., J. Harel, and J. D. Dubreuil.** 1998. Binding characteristics of *Escherichia coli* enterotoxin b (STb) to the pig jejunum and partial characterization of the molecule involved. *Microb. Pathog.* 24:277-288.
39. **Spangler, B. D.** 1992. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol. Rev.* 56:622-647.
40. **Suzuki, Y., Y. Toda, T. Tamatani, T. Watanabe, T. Suzuki, T. Nakao, K. Murase, M. Kiso, A. Hasegawa, K. Tadano-Aritomi, I. Ishizuka, and M. Miyasaka.** 1993. Sulfated glycolipids are ligands for a lymphocyte homing receptor, L-selectin (LECAM-1), binding epitope in sulfated sugar chain. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 190:426-434.
41. **Taki, T., S. Handa, and D. Ishikawa.** 1994. Blotting of glycolipids and phospholipids from a high-performance thin-layer chromatogram to a polyvinylidene difluoride membrane. *Anal. Biochem.* 221:312-316.
42. **Varky, A.** 1994. Selectin ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:7390-7397.
43. **Weikel, C. S., and R. L. Guerrant.** 1985. STb enterotoxin of *Escherichia coli*: cyclic nucleotide-independent secretion, p. 94-115. *In* R. Evered, and J. Whelan (ed.), *Microbial toxins and diarrhoeal disease*, vol. 112. Ciba Foundation Symposium, Pittman, London.
44. **Weikel, C. S., H. N. Nellans, and R. L. Guerrant.** 1986b. *In vivo* and *in vitro* effects of a novel enterotoxin, STb, produced by *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 153:893-901.

45. **Whipp, S. C.** 1987. Protease degradation of *Escherichia coli* heat-stable, mouse-negative, pig-positive enterotoxin. *Infect. Immun.* 55:2057-2060.
46. **Whipp, S. C., H. W. Moon, and R. A. Argenzio.** 1981. Comparison of enterotoxic activities of heat-stable enterotoxins from class 1 and class 2 *Escherichia coli* of swine origin. *Infect. Immun.* 31:245-251.

TABLE 1. Oligosaccharide structure^a of glycosphingolipids used in this study.

Name	Abbreviation	Structure
3-Sulfogalactosylceramide (Sulfatide)	SFT	Gal(3SO ₄)β1Cer
Galactosylceramide	GalCer	Galβ1Cer
Lactosylceramide	LacCer	Galβ1-4Glcβ1Cer
Glucosylceramide	GlcCer	Glcβ1Cer
Globotriosylceramide (P ^k -antigen)	Gb3	Galα1-4Galβ1-4Glcβ1Cer
Globotetraosylceramide (P-antigen)	Gb4	GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glcβ1Cer
Monosialoganglioside GM3	GM3	NeuAcα2-3Galβ1-4Glcβ1Cer
Monosialoganglioside GM2	GM2	GalNAcβ1-4[NeuAcα2-3]Galβ1-4Glcβ1Cer
Monosialoganglioside GM1	GM1	Galβ1-3GalNAcβ1-4[NeuAcα2-3]Galβ1-4Glcβ1Cer
Disialoganglioside GD3	GD3	[NeuAcα2-8,NeuAcα2-3]Galβ1-4Glcβ1Cer
Disialoganglioside GD1a	GD1a	NeuAcα2-3Galβ1-3GalNAcβ1-4[NeuAcα2-3]Galβ1-4Glcβ1Cer
Disialoganglioside GD1b	GD1b	Galβ1-3GalNAcβ1-4[NeuAcα2-8,NeuAcα2-3]Galβ1-4Glcβ1Cer
Trisialoganglioside GT1b	GT1b	NeuAcα2-3Galβ1-3GalNAcβ1-4[NeuAcα2-8,NeuAcα2-3]Galβ1-4Glcβ1Cer
Asialoganglioside GM1	AGM1	Galβ1-3GalNAcβ1-4Galβ1-4Glcβ1Cer

^aThe carbohydrate nomenclature is according to the recommendations of the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN) (26) and the Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) (27).

FIG. 1. Relative binding of STb toxin to various lipids and glycolipids. Lipids tested (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in methanol) were immobilized on PVDF membrane at 1 $\mu\text{g}/\text{spot}$, and the binding of STb toxin (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was measured after 10 min as described under «Materials and Methods». Values represent the average of at least duplicate experiments (three spots per experiment) analysed by densitometry. STb binding to sulfatide was taken as 100 % and relative binding to other lipids was calculated in percentage as follows: (mean densitometric value of lipid x 100)/(mean densitometric value of sulfatide). The standard deviations are shown. For oligosaccharide structures of glycolipids, see Table 1.

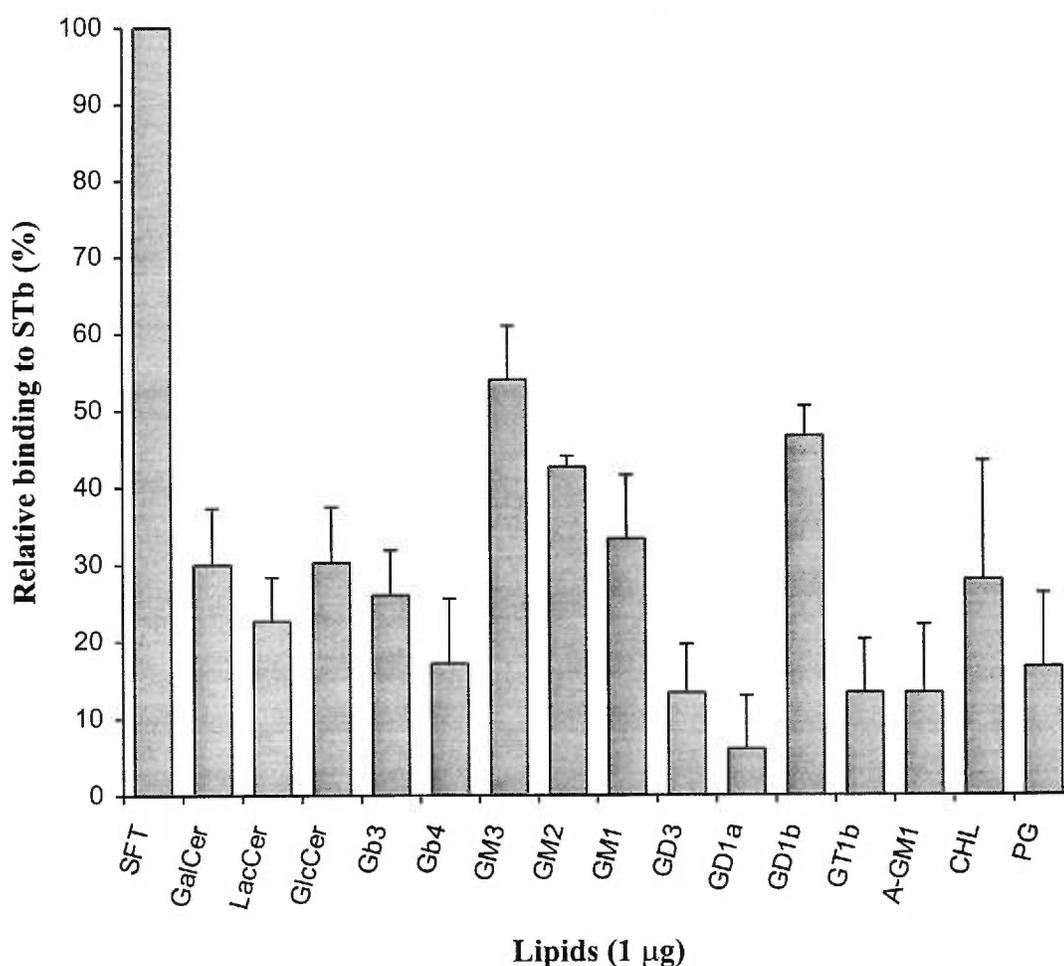


FIG 2. Dose-dependent binding of STb toxin to sulfatide. Sulfatide was immobilized on PVDF membrane at various concentrations ranging from 0.001 to 2 μg in 1 μl of methanol, and the binding of STb toxin (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was measured after 10 min as described under «Materials and Methods». Values represent the average of duplicate experiments (three spots per experiment) analysed by densitometry. The standard deviations from the mean are shown.

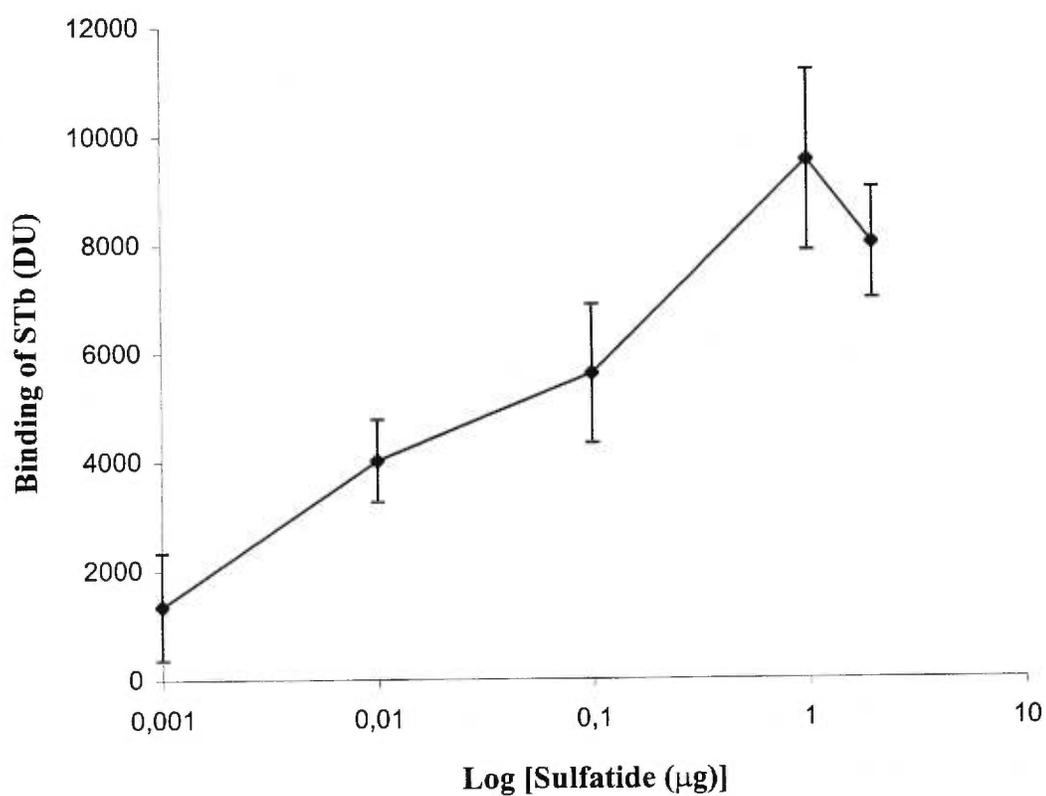


FIG 3. Effect of various chemicals on STb toxin binding to sulfatide. Sulfatide (1 μg) was immobilized on PVDF membrane. Incubation of STb toxin (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was performed for 10 min with either 0.05 or 0.1 M of tetramethylurea (TMU), 0.05 or 1 mg/ml of dextran (DX, Mr 9500) or dextran sulfate (DS, Mr 10000), before adding to immobilized sulfatide. Then, the binding of STb toxin was measured after 10 min as described under «Materials and Methods». Values represent the average of duplicate experiments (three spots per experiment) analysed by densitometry. The standard deviations from the mean are shown.

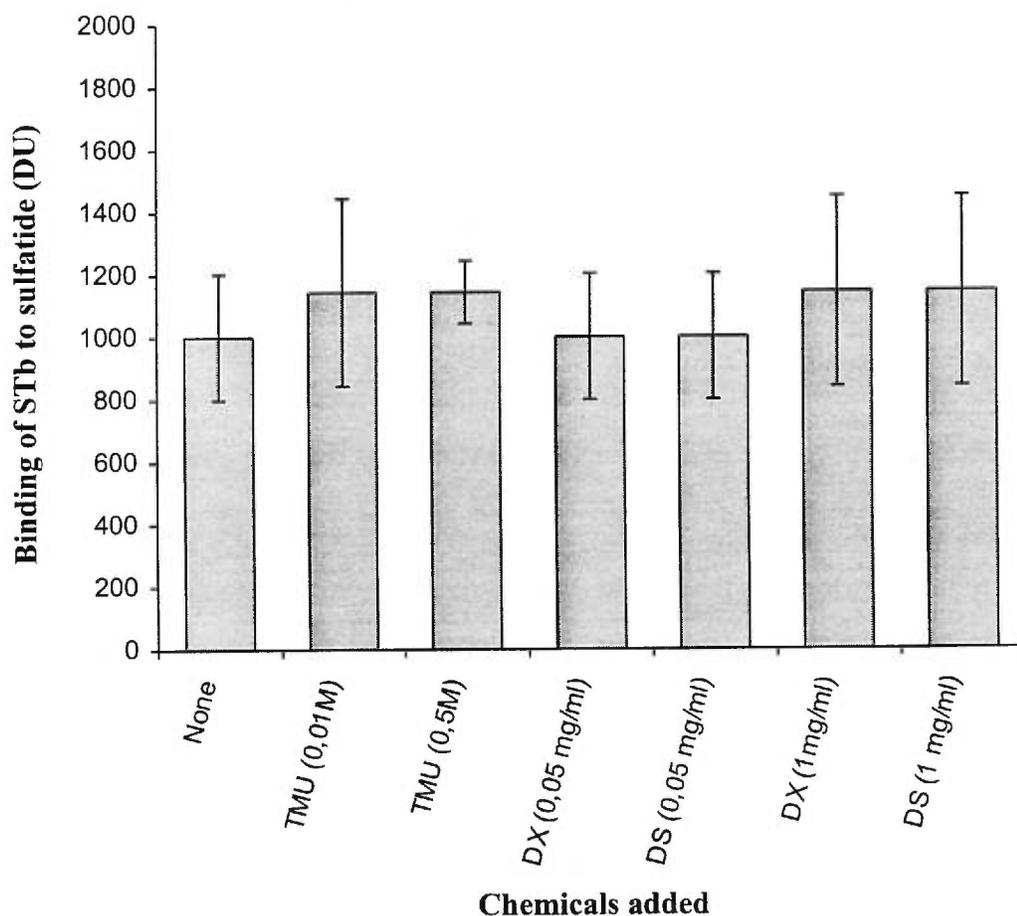


FIG 4. Competition assay of STb toxin binding to sulfatide. After sulfatide (1 μg) was immobilized on PVDF membrane, STb toxin (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) preincubated for 10 min with 500 fold molar excess of either the sulfatide or galactosylceramide was added. Then, the binding of STb toxin was measured after 10 min as described under «Materials and Methods». Values represent the binding of STb to sulfatide, and are the average of duplicate experiments (three spots per experiment) analysed by densitometry. The standard deviations from the mean are shown.

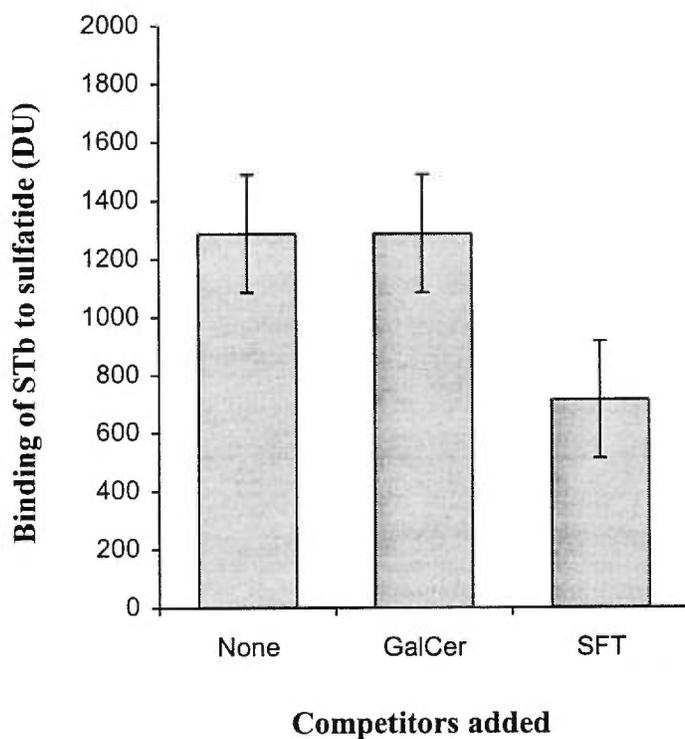


FIG 5. Occurrence of sulfatide-like glycolipid in pig jejunal mucus and epithelial cells. Total lipid extracts were separated by thin layer chromatography developed in chloroform/methanol/ 0.02 % CaCl_2 in water, 55 : 45 : 10 (v/v), and visualized with Bial's reagent. Lanes contain : (1), total lipids extracted from mucus of pig jejunum (200 μg); (2), total lipids extracted from epithelial cells of pig jejunum (200 μg); (3), sulfatide standard (5 μg); (4), glycolipid standards ; GalCer (10 μg), GlcCer (10 μg), LacCer (10 μg), Gb3 (2.5 μg), Gb4 (2.5 μg), GM3 (2.5 μg), GM2 (2.5 μg), GM1 (2.5 μg), GD3 (2.5 μg), GD1a (2.5 μg), GD1b (2.5 μg), GT1b (2.5 μg), AGM1 (2.5 μg). Reference glycolipids are indicated in the right margin. The arrow indicates the sulfatide. For abbreviations, see Table 1.

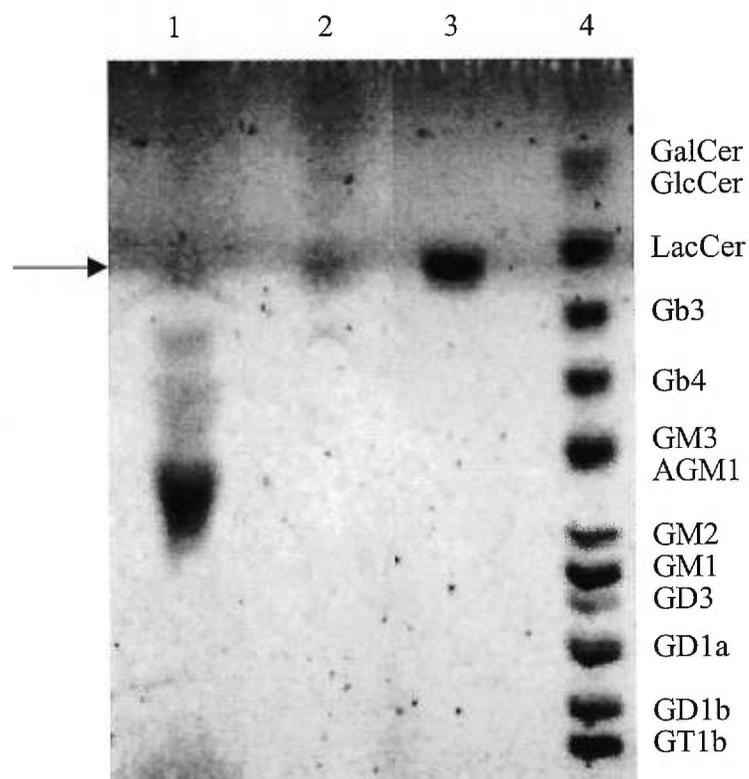


FIG 6. Determination of the epithelial localization of sulfatide on pig jejunal mucosa using immunocytochemistry and a monoclonal anti-sulfatide antibody. A : pig jejunum showing immunofluorescence of the villi, x 100. B : control experiment where the primary antibody was omitted, x 100. C : pig jejunum showing the immunofluorescence of the epithelial cells, x 500.

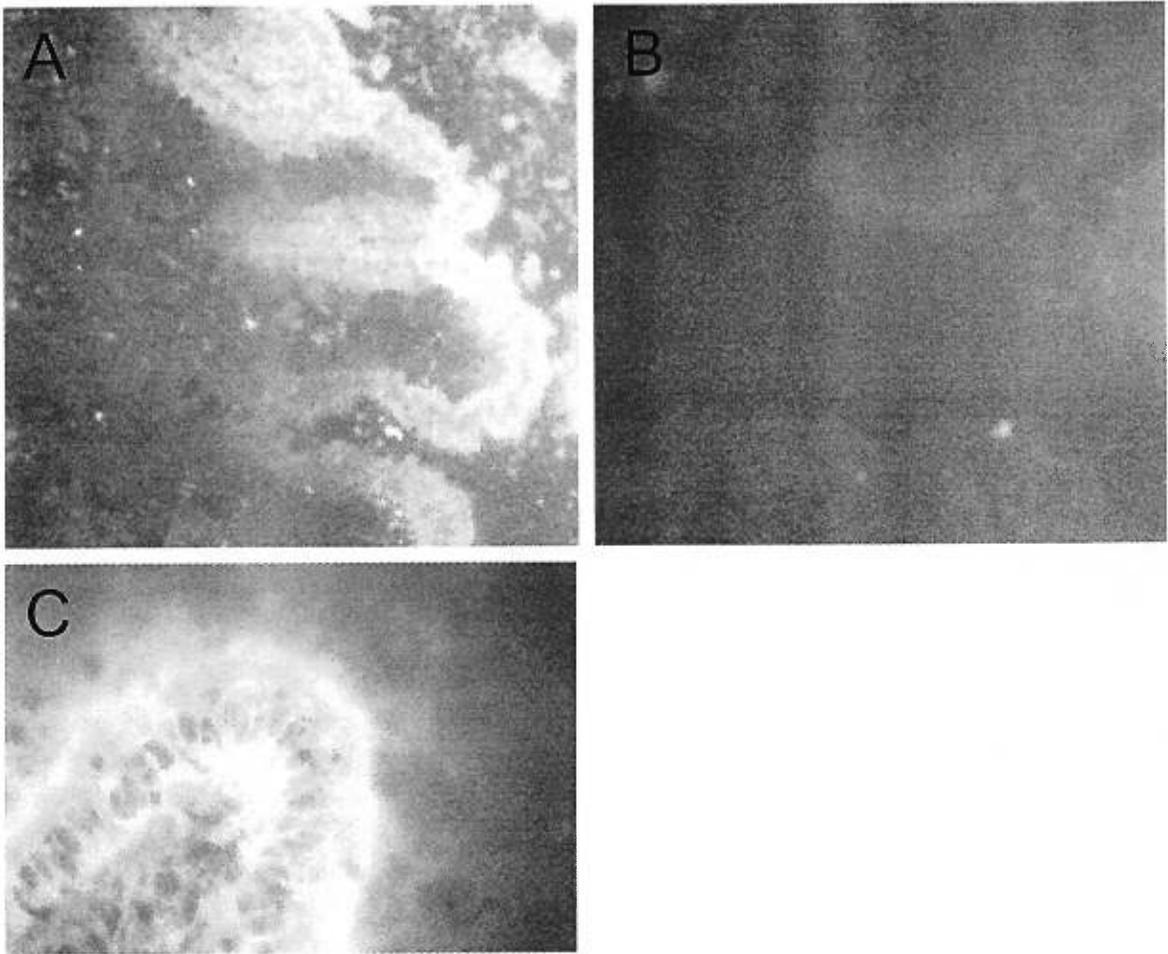


FIG 7. Binding of STb toxin to the sulfatide isolated from pig jejunal epithelial cells. Following extraction from preparative TLC developed in chloroform/ methanol/ 0.02 % CaCl₂ in water, 55 : 45 : 10 (v/v), the eluted pig jejunal sulfatide was immobilized on PVDF membrane, and the binding of STb toxin was measured after 10 min as described under «Materials and Methods». The binding was calculated by subtracting the mean densitometric value obtained for the silica gel control from the mean densitometric value obtained for the eluted sulfatide. Values represent the average of triplicate experiment (three spots per experiment) analysed by densitometry. The standard deviations from the mean are shown.

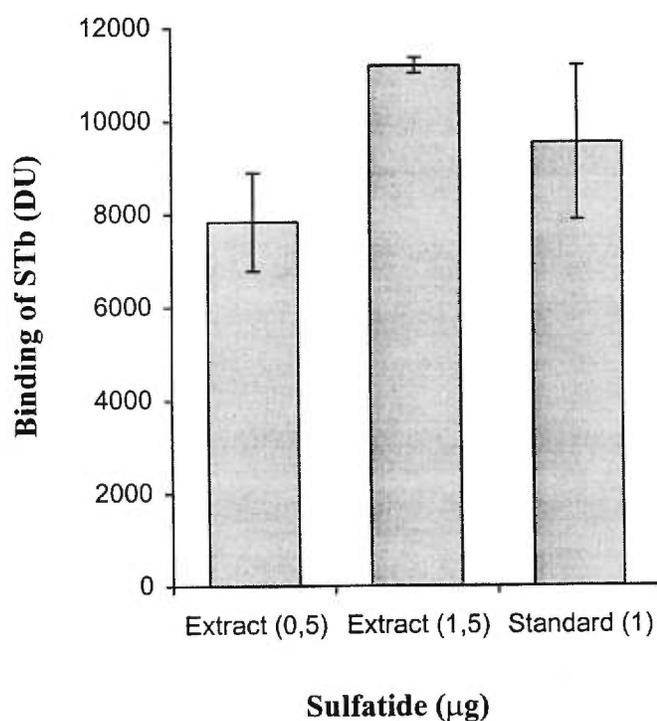
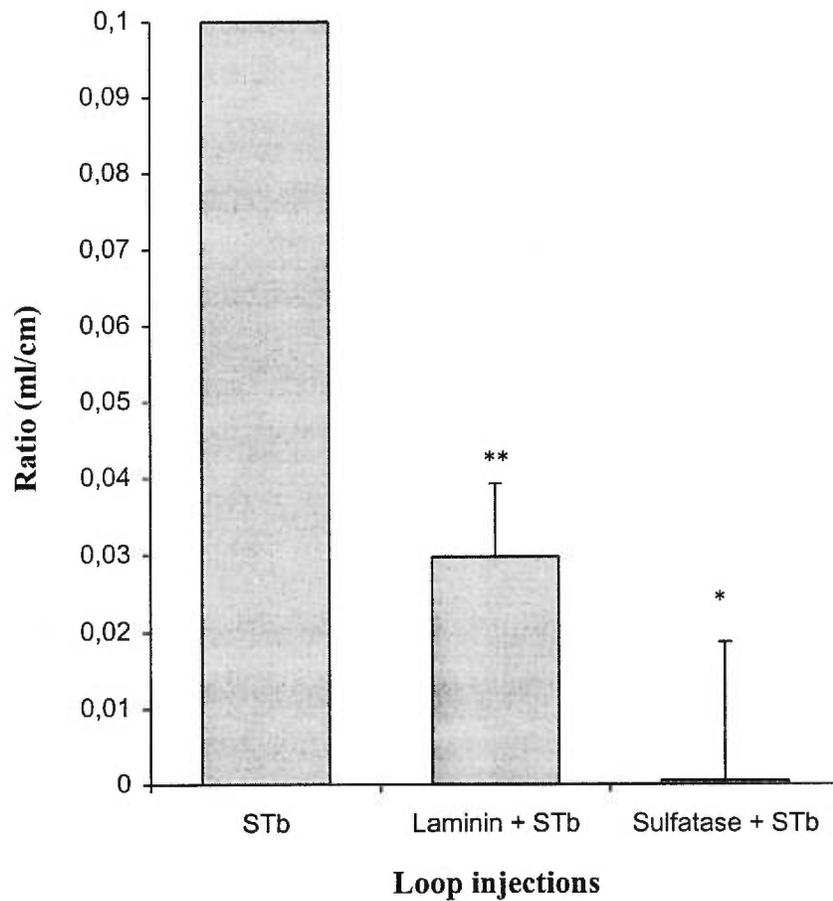


FIG 8. Inhibition assay of the biological activity of STb. STb provoked-secretion was measured in ligated rat small intestinal loops. Each loop received 5 μg of STb diluted in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 6,8) containing 300 μg of TI per ml following pretreatments with either laminin (400 μg) or sulfatase (2 units) during 20 min. The standard deviations are shown. Each ratio was significantly different to the STb maximal ratio (0,1 ml/ cm) using the statistical Student *t* test analysis. * $p < 0,01$, ** $p < 0,005$.



IV. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Cette étude menée sur l'entérotoxine thermostable STb visait à apporter des connaissances sur la première étape de son mécanisme d'action. Elle a été divisée en deux grands objectifs qui consistaient : 1) à mettre en évidence l'attachement de STb à la surface des cellules cibles, et 2) à identifier les molécules impliquées dans cet attachement.

Avant d'aborder la discussion et les conclusions générales, voici un rappel des principaux résultats obtenus lors de ce projet de recherche, ainsi que deux figures décrivant la structure de glycosphingolipides.

Premier article.

→ La toxine STb se fixe à la surface des cellules épithéliales du jéjunum porcin et plusieurs caractéristiques de l'attachement ont été déterminées

- L'attachement observé avec la bordure en brosse jéjunale est rapide et dépend de la concentration de toxine
- La présence des 2 ponts disulfures, qui maintiennent la conformation en boucle de la toxine, est requise pour l'attachement
- Des anticorps spécifiquement dirigés contre STb (IgG polyclonaux et non neutralisants) ne masquent pas le site d'attachement sur la toxine, et l'attachement n'est pas compétitionné par un excès molaire de 100 fois de toxine
- La température, ainsi que la présence ou l'absence d'ions, n'ont aucun effet sur l'attachement, mais l'attachement dépend du pH, il est optimal autour de pH 6.0
- L'attachement n'est pas restreint au tissu jéjunal, il a été observé avec tous les autres tissus porcins testés (i. e. le duodénum, l'iléon, le caecum, le côlon, le foie, le poumon, la rate et le rein)

→ Les sites spécifiquement impliqués dans l'attachement de STb avec le jéjunum porcin sont portés par des glycosphingolipides de surface, probablement des gangliosides

- L'action de prétraitements spécifiques sur les sections de jéjunum montre que

certaines structures de surface sont spécifiquement impliquées dans l'attachement de STb

- L'attachement n'a pas lieu avec des structures de nature protéique ou glycoprotéique, mais avec des glycosphingolipides
- Les acides neuraminiques (ou acides sialiques), portés par les glycosphingolipides appelés gangliosides (Fig. 1), seraient des sites spécifiquement impliqués dans l'attachement de STb

• **Second article (première version soumise à IAI).**

→ La toxine STb présente une forte affinité pour le sulfatide, et porterait une spécificité d'attachement pour le galactose sulfaté terminal du sulfatide

- Parmi une batterie de glycosphingolipides purs, le sulfatide ou 3'sulfogalactosylcéramide (Fig. 2) est le plus fortement fixé par STb, alors que l'attachement n'est pas significatif avec le galactosylcéramide (Fig. 2)

- L'attachement est moindre mais significatif avec certains gangliosides, tandis qu'aucun attachement significatif n'a été relevé avec les asialogangliosides

- Les lipides neutres non glycosylés testés démontrent un attachement non significatif

- L'épitope spécifique d'attachement porté par le sulfatide implique à la fois le groupement sulfate et le galactose

→ Le sulfatide est présent à la fois dans les cellules épithéliales de la muqueuse et dans le mucus du jéjunum porcin

- Les extraits de lipides totaux, préparés à partir des cellules épithéliales de la muqueuse ou de la couche de mucus recouvrant les cellules, contiennent un lipide possédant des caractéristiques de composition et de structure similaire au standard de sulfatide

- Ce lipide est un sulfatide, car il est détecté par la laminine, molécule reconnaissant spécifiquement les glycolipides sulfatés, et également par un anticorps monoclonal dirigé spécifiquement contre le sulfatide

- La toxine STb se fixe avec une forte affinité au sulfatide identifié dans le jéjunum

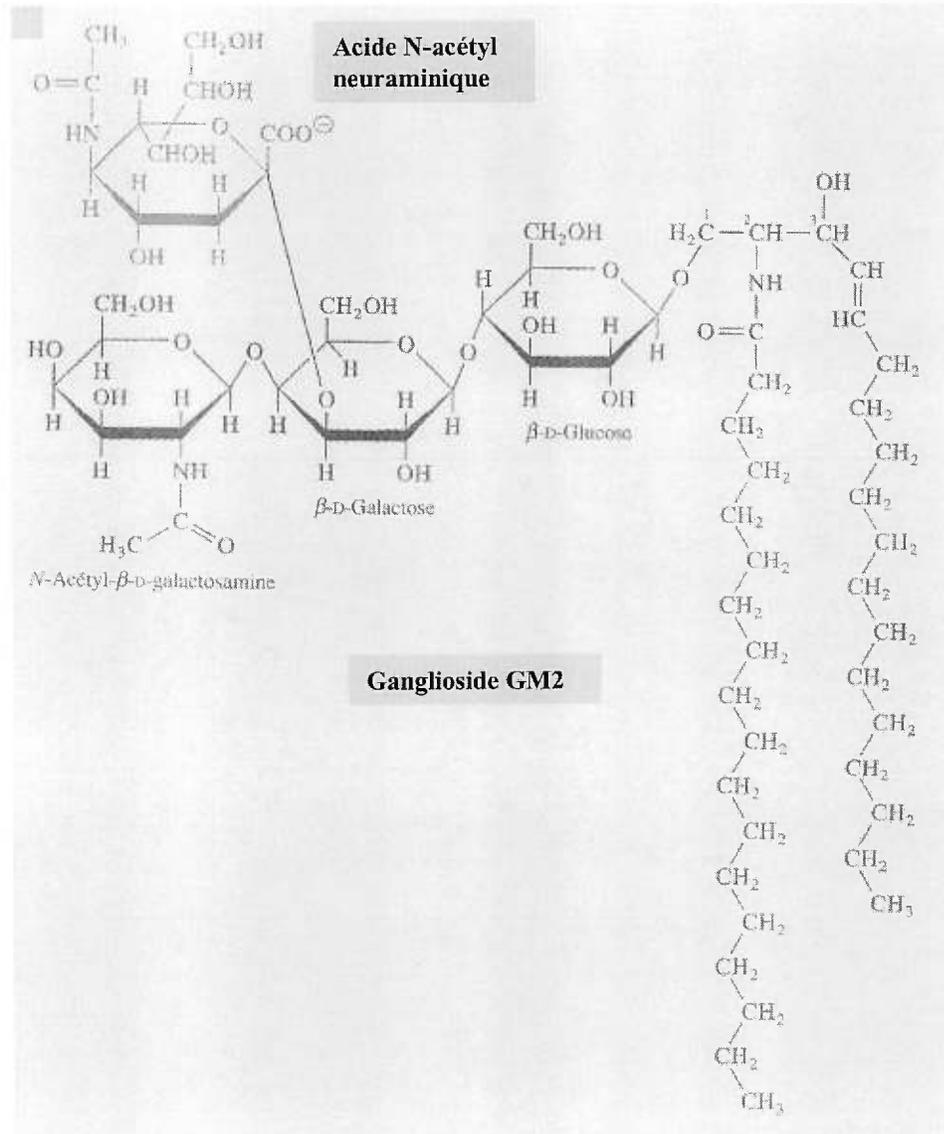


Figure 1. Structure générale d'un ganglioside typique, le monosialoganglioside GM2.

Les gangliosides sont des glycolipides dont les chaînes oligosaccharidiques liées au céramide portent un ou plusieurs acides N-acétylneuraminiques. Ce dernier est un dérivé acétylé d'un sucre aminé à neuf carbones, un membre de la famille des acides sialiques. La présence du groupe carboxyle de l'acide N-acétylneuraminique confère un caractère anionique (ou acide) aux gangliosides.

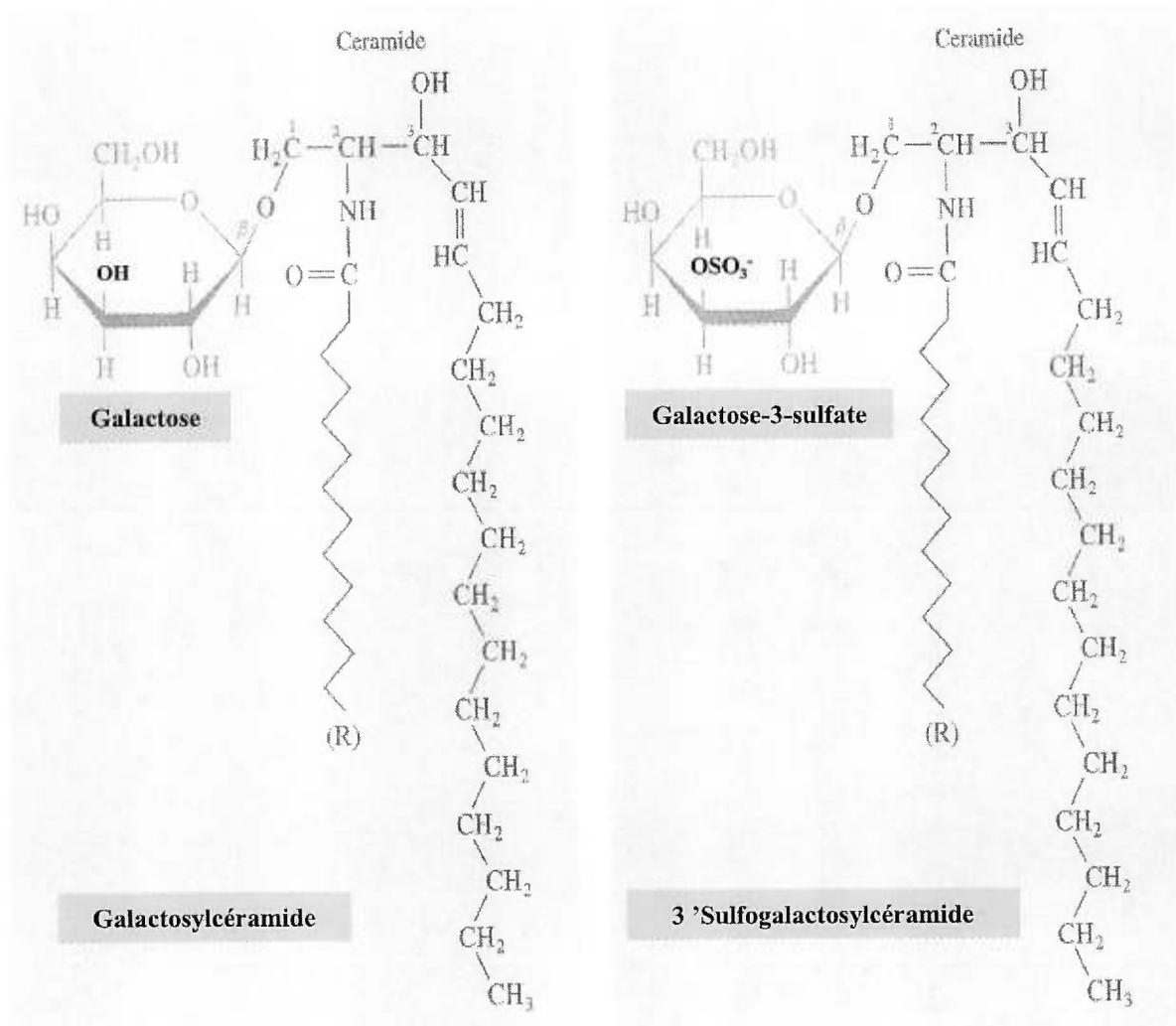


Figure 2. Structures générales d'un galactosylcéramide et d'un 3'sulfo-galactosylcéramide ou sulfatide.

Le β -D-galactose est lié au groupe hydroxyle du carbone C-1 d'un céramide. Le sulfatide est synthétisé à partir du galactosylcéramide par adjonction d'un groupement ester sulfate en position 3 du galactose. Le groupement sulfate confère au sulfatide un caractère fortement acide.

Les galactosylcéramides, appelés encore galactocérebrosides, sont des cérebrosides dont la tête polaire est faite d'un seul résidu galactosyle. Dans les tissus des mammifères, on trouve aussi des glucocérebrosides, lipides où le groupe β -glucosyle a pris la place du β -galactosyle sur le C-1 d'un céramide. D'autres lipides sont apparentés, dont le résidu galactosyle porte une chaîne linéaire contenant jusqu'à quatre monosaccharides supplémentaires. R, enchaînement d'acides gras.

DISCUSSION

Au cours de notre étude portant sur la première étape d'attachement du mécanisme d'action de l'entérotoxine STb, il s'avérait important de travailler sur les cellules cibles. Le pouvoir d'une toxine peut refléter la présence et le nombre des récepteurs impliqués sur les membranes des cellules cibles. En fait, l'expression de molécules de surface jouant le rôle de récepteurs de la toxine peut varier en fonction de différents paramètres, tels que l'espèce, l'âge, la partie de l'intestin ou le type de cellule.

La toxine STb est produite par certaines souches d'*E. coli* entérotoxigènes (ETEC) dans la lumière intestinale, et induit rapidement une accumulation de fluide et d'électrolytes, provoquant alors une diarrhée chez l'animal. Parmi les entérotoxines produites par *E. coli*, STb est communément retrouvée chez des souches isolées de porcs, souffrant de diarrhée, âgés de plus d'une semaine et surtout pendant et après le sevrage (Burgess *et al.*, 1978; Whipp *et al.*, 1981; Blanco *et al.*, 1997; Dubreuil, 1997). L'activité entérotoxique de STb est mesurée par la méthode des anses intestinales ligaturées chez différents modèles animaux. Généralement, l'accumulation de fluide induite par STb est plus abondante dans la portion jéjunale du petit intestin. La susceptibilité à la toxine STb apparaît donc être dépendante de l'âge et de la portion intestinale. C'est pourquoi les sites d'attachement de STb, susceptibles d'initier son processus sécrétoire, ont été recherchés à la surface des cellules épithéliales de la bordure en brosse du jéjunum provenant de porcs sevrés.

Aucun système d'étude sur l'hôte n'a été auparavant mis en place dans le but d'identifier une ou des molécules impliquées dans l'attachement de la toxine STb à la surface de la muqueuse intestinale (Hitotsubashi *et al.*, 1994; Chao et Dreyfus, 1997a). Alors que des progrès importants ont été obtenus sur des systèmes modèles, peu d'efforts ont été réalisés sur les cellules cibles pour comprendre le mécanisme d'action et surtout pour identifier le récepteur membranaire de STb.

Ce constat reflète probablement la nécessité de techniques plutôt laborieuses pour travailler sur le tissu de l'hôte. Par exemple, l'obtention d'un tel matériel chez l'humain

reste évidemment très limité. Dans le cas de la toxine A de *Clostridium difficile*, la découverte en 1986 de la séquence d'attachement $\text{Gal}\alpha 1\text{-3Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}$ dans des tissus animaux laissait supposer que cette séquence était portée par le récepteur fonctionnel pour les cellules rénales chez les humains (Krivan *et al.*, 1986). Cependant, cette séquence nécessite l'activité de la transférase du $\text{Gal}\alpha$, et cette activité enzymatique semble absente dans les tissus humains. Ces derniers expriment, en fait, d'autres séquences avec une affinité similaire, incluant la séquence $\text{GalNAc}\beta 1\text{-3Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}$ (Teneberg *et al.*, 1996). Ces informations n'auraient pu être obtenues suite aux expériences réalisées uniquement sur des modèles cellulaires ou des composés standards. Ainsi, les études d'attachement et également de structure des sites d'attachement utilisant les molécules issues des cellules cibles chez l'hôte sont essentielles.

Les premiers travaux de ce projet ont été réalisés sur les sections de jéjunum porcine, et ont permis à la fois de mettre en évidence l'attachement de STb avec la surface des cellules, et d'établir les conditions optimales de cet attachement. Ce système d'attachement *in vitro* a constitué alors la base pour déterminer la nature des molécules impliquées dans la fixation de STb sur le tissu cible.

Nous avons démontré que des glycosphingolipides présents sur les cellules des villosités du jéjunum porcine sont impliqués dans l'attachement de STb. De nombreux autres types cellulaires, sont également reconnus par la toxine. Dreyfus *et al.* avaient déjà suggéré, en 1993, que le récepteur de STb devait être présent sur différents types cellulaires, dans la mesure où la toxine induit une augmentation rapide et dose-dépendante de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} dans différentes lignées cellulaires d'origine intestinale ou non intestinale. Les glycosphingolipides sont présents dans la plupart des cellules chez les mammifères. Il n'est donc pas surprenant que la toxine STb s'attache à tous les tissus testés provenant d'organes autres que l'intestin, et à des cellules autres que celles composant les villosités intestinales. C'est d'ailleurs le cas du ganglioside GM1, le récepteur des toxines CT et LT, qui est présent et fonctionnel chez de nombreux types cellulaires (Fishman *et al.*, 1993). En revanche, le récepteur GC-C de la toxine thermostable STa est de nature protéique et est spécifique du tissu intestinal (Guerrant *et al.*, 1980; Giannella *et al.*, 1983).

Deux méthodes indépendantes ont été essentiellement utilisées pour étudier les structures portées par les glycosphingolipides impliqués dans l'attachement de STb.

L'étude sur des sections fines de jéjunum porcin décrite dans le premier article de cette thèse, et l'étude en Dot-Blot sur des glycosphingolipides purs décrite dans le second article, ont montré que la toxine STb se fixe au niveau de chaînes glucidiques. La plupart des glycoconjugués de surface n'ont pas seulement un rôle de protection et de structure pour le maintien de l'intégrité de la cellule, mais joue aussi un rôle capital dans les différentes fonctions cellulaires avec le milieu extérieur. D'après l'ensemble des connaissances, de nombreuses toxines possèdent une activité lectine, qui leur permet de s'attacher à la surface des cellules (Karlsson, 1995). Pour résumer l'ensemble de ces 2 articles, nous avons déterminé que la molécule de STb comporterait 2 sites d'attachement spécifiques distincts. L'un des sites reconnus implique les acides neuraminiques terminaux de gangliosides, et l'autre le galactose sulfaté terminal du sulfatide.

L'attachement au sulfatide a été étudié lors du second article de la thèse. La structure du sulfatide est présentée dans la figure 1 de ce chapitre. Nous avons montré que la toxine STb présente la plus forte affinité pour le sulfatide parmi une batterie de glycosphingolipides purs. Nous avons mis en évidence qu'à la fois le galactose et le groupement sulfate contribuent à l'attachement de STb avec le sulfatide.

La structure essentielle d'attachement de STb avec le sulfatide comporte donc le sucre sulfaté $\text{HSO}_4\text{-3Gal}\beta\text{1}$. De nombreux autres ligands possèdent une spécificité d'attachement pour un sucre sulfaté. Certaines études ont montré que ce type d'attachement peut conduire l'action du ligand sur la cellule cible. Plusieurs adhésines de bactéries s'attachent à des sucres sulfatés pour coloniser ou envahir le tissu de l'hôte, par exemple chez *Borrelia burgdorferi* (Isaacs, 1994), *Helicobacter pylori* (Saitoh *et al.*, 1991; Ascencio *et al.*, 1993; Huesca *et al.*, 1996), *Staphylococcus aureus* (Liang *et al.*, 1992; Alston *et al.*, 1997), *Mycoplasma pneumoniae* et *M. hyopneumoniae* (Krivan *et al.*, 1989; Lingwood *et al.*, 1990; Zielinski et Ross, 1993), *Bordetella pertussis* (Brennan *et al.*, 1991; Hannah *et al.*, 1994; Menozzi *et al.*, 1994; Geuijen *et al.*, 1996), *Streptococcus pyogenes* (Schmidt *et al.*, 1993) et *Escherichia coli* (Prasadarao *et al.*, 1993; Stins *et al.*, 1994). Certains virus initient leur entrée dans leurs cellules cibles *via* l'attachement à des sucres sulfatés portés par leurs

récepteurs, comme le virus HSV (herpes simplex virus) (WuDunn et Spear, 1989; Shieh *et al.*, 1992; Spear *et al.*, 1992; Banfield *et al.*, 1995; Feyzi *et al.*, 1997), et les cytomégalovirus (CMV) (Compton *et al.*, 1993). Également, des protozoaires s'attachent à ces sites pour induire leur invasion, tels que les trypanosomes (Ortega-Barria et Pereira, 1992; Herrera *et al.*, 1994), et les sporozoïtes de la malaria (Pancake *et al.*, 1992). Par contre, cette spécificité d'attachement avec un sucre sulfaté a été démontrée pour la première fois, lors de ce travail, chez une entérotoxine bactérienne. Les séquences en acides aminés des différents ligands cités auparavant, lorsqu'elles sont connues, pourront être comparées avec la séquence de STb. Ces comparaisons devraient apporter des informations sur les acides aminés de STb impliqués dans l'attachement avec la séquence HSO₄-3Galβ1.

Les résultats présentés dans les 2 articles indiquent une autre spécificité d'attachement pour STb, contenant un acide neuraminique (NeuAc). Tout d'abord, l'attachement de STb a été complètement inhibé suite à un prétraitement du tissu avec la neuraminidase de *Clostridium perfringens*. Cette enzyme clive les acides neuraminiques en position terminale sur un galactose dans l'ordre préférentiel des liaisons $\alpha(2-3) > \alpha(2-6) > \alpha(2-8)$. De plus, lors de l'étude comparant l'affinité de STb parmi divers glycosphingolipides purs, l'attachement est significatif avec GM3 et GM2, gangliosides portant un acide neuraminique terminal en liaison $\alpha(2-3)$ sur un galactose. Pour exemple, la structure du ganglioside GM2 est présentée dans le figure 2 de ce chapitre.

Les deux études suggèrent qu'une autre spécificité d'attachement existe pour STb, qui doit correspondre au site NeuAc $\alpha(2-3)$ Gal porté par certains gangliosides. C'est d'ailleurs une spécificité d'attachement retrouvée pour les entérotoxines CT et LT avec GM1, et d'autres toxines (Fishman *et al.*, 1993). Chao et Dreyfus (1997a) ont également étudié l'implication des acides neuraminiques de surface dans l'attachement de STb avec des cellules en culture. Ils ont utilisé la neuraminidase de *Vibrio cholerae*, qui clive les acides neuraminiques dans un ordre préférentiel différent, à savoir les liaisons $\alpha(2-6) > \alpha(2-3) > \alpha(2-8)$. Ils ont montré que l'action de cette enzyme n'a aucun effet sur l'attachement de STb avec les lignées de cellules épithéliales. L'ensemble de ces données indiquent que si les acides neuraminiques sont impliqués dans l'attachement avec les cellules en culture utilisées, comme avec les sections de jéjunum porcin, alors ces acides neuraminiques ne

sont pas liés en $\alpha(2-6)$ mais plutôt en $\alpha(2-3)$ sur le galactose. La séquence NeuAc $\alpha(2-3)$ Gal en position terminale et portée par un glycolipide semble donc être une autre spécificité d'attachement de la toxine STb.

Une des perspectives principales de ce projet sera d'identifier les gangliosides impliqués dans l'attachement de STb avec les cellules cibles. Deux stratégies pourront être employées. D'un côté, les gangliosides peuvent être isolés de l'extrait de lipides totaux par la technique de fractionnement de Folch, de façon à rechercher les gangliosides qui sont reconnus par la toxine. Puis, les gangliosides d'intérêt pourront être caractérisés par comparaison avec différents gangliosides purs après séparation préparative en chromatographie sur couche mince. Ultérieurement, la composition et la séquence de la chaîne saccharidique, ainsi que la structure pourront être élucidées par les techniques en spectroscopie de masse et en résonance magnétique nucléaire. D'un autre côté, divers « isorécepteurs », portant le site NeuAc $\alpha(2-3)$ Gal, peuvent être obtenus commercialement, et leurs affinités avec STb pourront être comparées. Cette approche devrait permettre de déterminer quel ganglioside est préférentiellement fixé par STb en fonction de la séquence saccharidique environnante, et de définir précisément l'épitope spécifique d'attachement.

Plusieurs arguments indiquent que les deux classes d'attachement mises en évidence sont spécifiques pour STb. Tout d'abord, l'attachement de la toxine avec le tissu est inhibé complètement suite à l'action d'une exoglycosidase clivant spécifiquement la liaison entre un acide neuraminique en position terminale et un galactose. Ensuite, l'attachement de STb en Dot-blot avec le sulfatide pur est inhibé à plus de 50% avec un excès molaire de seulement 5 fois de sulfatide. Par ailleurs, la détection de l'attachement est rapide et sensible dans les deux méthodes employées. D'une part, elle nécessite une faible quantité de toxine sur les sections de tissus (de l'ordre de 50 ng). D'autre part, le seuil de détection est inférieur à 100 ng de sulfatide pur lors de l'étude de l'attachement sur membrane en Dot-Blot. Enfin, l'attachement sur le tissu nécessite que la structure tridimensionnelle de STb soit maintenue par ses 2 ponts disulfures. Il serait à présent intéressant de déterminer les constantes d'affinité pour chacun de ces sites d'attachement avec STb.

Il a été difficile d'évaluer au départ la spécificité de l'attachement de la toxine avec le tissu. Il était inattendu qu'un excès de toxine non marquée (100 fois) ne déplace pas

l'attachement de la toxine marquée. Parallèlement, Chao et Dreyfus (1997a) ont montré que le nombre de sites d'attachement à la surface des cellules en culture était très élevé ($> 10^6$ /cellule), au point que l'excès de toxine non marquée utilisé était insuffisant pour inhiber complètement l'attachement de STb, même avec un excès de 1000 fois. Le nombre de sites d'attachement disponibles serait nettement supérieur à la quantité de toxine fixée. De plus, aux vues des derniers résultats obtenus par Chao et Dreyfus (1997a) sur l'insertion membranaire de STb, il est probable que l'excès de toxine s'attache et se stabilise très rapidement à l'intérieur de la membrane plasmique, laissant libres les sites d'attachement de surface pour la toxine marquée. Pour ces différentes raisons, les expériences de compétition de l'attachement de STb avec la surface des cellules ont été au premier abord difficiles à évaluer pour conclure sur la spécificité de l'attachement.

Par ailleurs, l'attachement n'a pas été affecté non plus par des anticorps polyclonaux dirigés spécifiquement contre STb. Ce résultat permet toutefois de comprendre pourquoi les anticorps utilisés ne sont pas neutralisants de l'activité biologique de la toxine. La raison apparaît résider dans leur incapacité à inhiber l'attachement initial du mécanisme d'action. Les anticorps, fixés sur STb, ne semblent pas masquer, ou contraindre par empêchement stérique, le site d'attachement sur la toxine. Sukumar *et al.* (1995) ont déterminé que la structure en boucle de STb contenant le site d'attachement potentiel est de très petite taille. Ces résultats nous laissent supposer que la surface de STb se combinant avec le site saccharidique doit être effectivement très restreinte, et cela signifie que très peu d'acides aminés doivent être impliqués dans chacune des spécificités d'attachement. Des expériences ultérieures de mutagenèse dirigée dans la séquence du domaine actif d'attachement devraient permettre d'assigner précisément les acides aminés impliqués dans chacun des sites complémentaires d'attachement de STb.

Ces sites portés par les glycoconjugués de surface sont le plus souvent responsables de la reconnaissance pour le ciblage des cellules, de la translocation de la toxine dans la cellule, ou encore de la transduction du signal à travers la membrane plasmique de la cellule. Néanmoins, la corrélation entre l'activité d'une toxine et sa fixation n'est pas toujours simple. En effet, cet attachement peut faire appel par exemple à des récepteurs non fonctionnels ou à des phénomènes coopératifs entre les sites. Plusieurs méthodes pourraient être utilisées pour démontrer si les glycosphingolipides fixés par la toxine sont aussi des

récepteurs fonctionnels pour STb.

Les études *in vitro* sont généralement basées sur la propriété des glycosphingolipides à s'intégrer spontanément dans la bicouche lipidique des cellules auxquelles ils sont ajoutés. Les travaux de Fishman et Atikkan (1980) montrent que l'activité cyclasique de la toxine CT n'est pas induite dans les cellules gliales, qui sont déficientes en GM1. Lorsque ces cellules sont incubées avec le ganglioside GM1, les cellules deviennent sensibles à la toxine. D'une part, la fixation de CT est observée, et d'autre part, la production d'AMPc est déclenchée, alors que les autres gangliosides testés n'ont aucun effet. Une étude similaire a été réalisée pour la vérotoxine et son récepteur Gb3 (Waddel *et al.*, 1990). Plusieurs modèles cellulaires ont été mis en place pour étudier l'activité toxique de STb *in vitro* (Dreyfus *et al.*, 1992; Harville et Dreyfus, 1996; Fujii *et al.*, 1997; Chao et Dreyfus, 1997a), mais aucune lignée cellulaire insensible à la toxine STb n'a été rapportée. Or, cette approche nécessite une lignée ne contenant pas le récepteur potentiel à étudier dans la membrane plasmique des cellules. Les connaissances acquises sur les sites fixés par STb à la surface des cellules cibles devraient permettre de sélectionner une lignée cellulaire appropriée.

Sachant que la toxine STb est faiblement représentée parmi les ETEC isolées de porcs nouveau-nés (Handl et Flock, 1992), et qu'elle n'apparaît pas déclencher de diarrhée sévère chez ces même porcs (Casey *et al.*, 1998), il est concevable que les sites récepteurs de STb soient absents sur le tissu cible de ces porcs. Une autre étude consisterait à déterminer la distribution des sites d'attachement, tels que le sulfatide, dans le petit intestin des porcs nouveau-nés. Le sevrage et l'âge, la différenciation cellulaire, influencent généralement l'expression de certaines molécules de la surface cellulaire de l'intestin en réponse au régime alimentaire et à la croissance de l'animal. Par exemple, la toxine Shiga ne déclenche aucune sécrétion dans l'intestin de lapin jusqu'à l'âge de 16 jours, où son récepteur Gb3 commence à être exprimé. La susceptibilité à la toxine Shiga augmente avec l'expression de Gb3, qui est régulée en fonction du développement de l'animal (Mobassaleh *et al.*, 1989). Une localisation immunohistochimique des sites sulfatides pourrait être réalisée en marquant des sections fines de tissu, issu de porcs nouveau-nés, avec l'anticorps monoclonal anti-sulfatide. Si aucun sulfatide n'est détecté à la surface de la bordure en brosse intestinale, ou si leur nombre est très faible, cela pourrait expliquer pourquoi les porcs nouveau-nés ne sont pas susceptibles à l'action toxique de STb. Cette approche serait

indirecte pour mettre en évidence que le sulfatide intervient dans la pathologie, mais permettrait à priori d'apporter également des informations sur une comparaison entre les porcs nouveau-nés résistants et les porcs sevrés sensibles à l'action sécrétoire de STb. La même stratégie pourrait être employée avec les sites gangliosides, lorsqu'ils seront clairement identifiés.

L'activité *in vivo* pourrait être la base d'étude pour établir la relation entre la fixation de la toxine et son activité biologique. L'activité *in vivo*, mesurée dans les anses intestinales ligaturées, de la toxine STb pourrait être comparée avec celle d'anses préalablement incubées avec des anticorps dirigés spécifiquement contre les sites d'attachement. Cette expérience serait concluante si elle montre qu'il y a inhibition spécifique du processus sécrétoire de STb.

L'interprétation de l'ensemble des résultats obtenus permet d'élaborer certaines hypothèses quant au rôle de chacune de ces classes de sites d'attachement pour la toxine STb. Une première hypothèse concerne la sélectivité du mode d'action de STb. Différents récepteurs peuvent être impliqués dans la mesure où la toxine STb apparaît déclencher différentes voies de signalisation sur différents types cellulaires. Une voie serait responsable d'étapes dépendantes du calcium *via* une protéine G pour l'activation de la kinase II dépendante de la calmoduline, et la libération de la prostaglandine PGE₂ par les cellules épithéliales intestinales. Une autre voie induirait la libération de la 5-hydroxytryptamine (5-HT) par les cellules entérochromaffines intestinales, toujours *via* une protéine G, mais indépendamment du calcium (Fig. 4, Chap. II). Ainsi, l'activation d'un récepteur conduirait à des étapes indépendantes du calcium pour la libération de la 5-HT par les cellules entérochromaffines, tandis qu'un récepteur différent serait responsable des étapes dépendantes du calcium par les cellules épithéliales. Il serait donc important de démontrer si l'existence de sites spécifiques distincts à la surface cellulaire peut gouverner le mode d'action sélectif particulier utilisé par STb en fonction de types cellulaires.

Toutefois, ce mode d'action sélectif utilisé par STb peut également avoir recours au même processus d'attachement sur les différents types de cellule, mais les types cellulaires peuvent posséder différents éléments du processus intracellulaire. Les résultats suggèrent, en effet, que les 2 sites mis en évidence sont nécessaires à l'attachement. D'un côté, la

toxine STb présente une affinité nettement plus marquée pour le sulfatide que pour les gangliosides tels que GM3 et GM2. La différence est de l'ordre de 40-50%. D'un autre côté, curieusement, le prétraitement du tissu avec la neuraminidase inhibe complètement l'attachement. Ainsi, lorsque les sites neuraminiques sont éliminés à la surface du tissu, alors STb semble incapable de s'attacher. Or, si on considère que le sulfatide présent à la surface des cellules mucosales est également responsable d'un attachement fort avec STb, les résultats indiquent que lorsque les gangliosides ne sont pas fixés par STb, aucun attachement significatif n'est observé avec le sulfatide sur les sections de tissu. Il semble que l'attachement de STb aux gangliosides soit un prérequis pour que l'attachement au sulfatide ait lieu. Il est possible que la toxine STb fixe des sites d'acides neuraminiques suffisamment éloignés de la membrane plasmique pour être accessibles, et, cette étape d'attachement de la toxine serait requise pour l'attachement consécutif au sulfatide. Le modèle ainsi proposé est schématisé dans la figure 3.

Quelques arguments nous permettent d'appuyer cette seconde hypothèse. Le sulfatide est un glycolipide très court dans la mesure où il ne porte qu'un seul résidu galactosyl. Plusieurs chercheurs se sont intéressés à l'attachement des ligands aux glycolipides courts ancrés dans la membrane plasmique des cellules. L'accessibilité d'un site d'attachement très proche de la bicouche lipidique, tel que le sulfatide, requiert souvent un système d'étapes séquentielles.

Le marquage des chaînes saccharidiques de surface à l'aide de la galactose oxydase et du NaBH₄ tritié montre que les glycolipides à courtes chaînes, tels que le lactosylcéramide (Gal β 1-4Glc β 1-1Cer) et le glucosylcéramide (Glc β 1-1Cer), ne sont pratiquement pas marqués, à l'inverse des glycolipides plus longs. La galactose oxydase de 12 kDa semble atteindre difficilement les sites étroitement associés à la membrane (Lampio *et al.*, 1984). La situation dynamique au niveau de la surface cellulaire consiste en des diffusions latérales et en des échanges de position par les molécules ancrées dans la bicouche lipidique. Pour accéder à un site très proche de la membrane, il semble nécessaire que le ligand induise une diffusion latérale des composants masquant la surface. Cette théorie a été émise pour l'adhésion cellulaire (Bell *et al.*, 1984).

Le processus d'attachement proposé pour la toxine STb peut être comparé à celui des

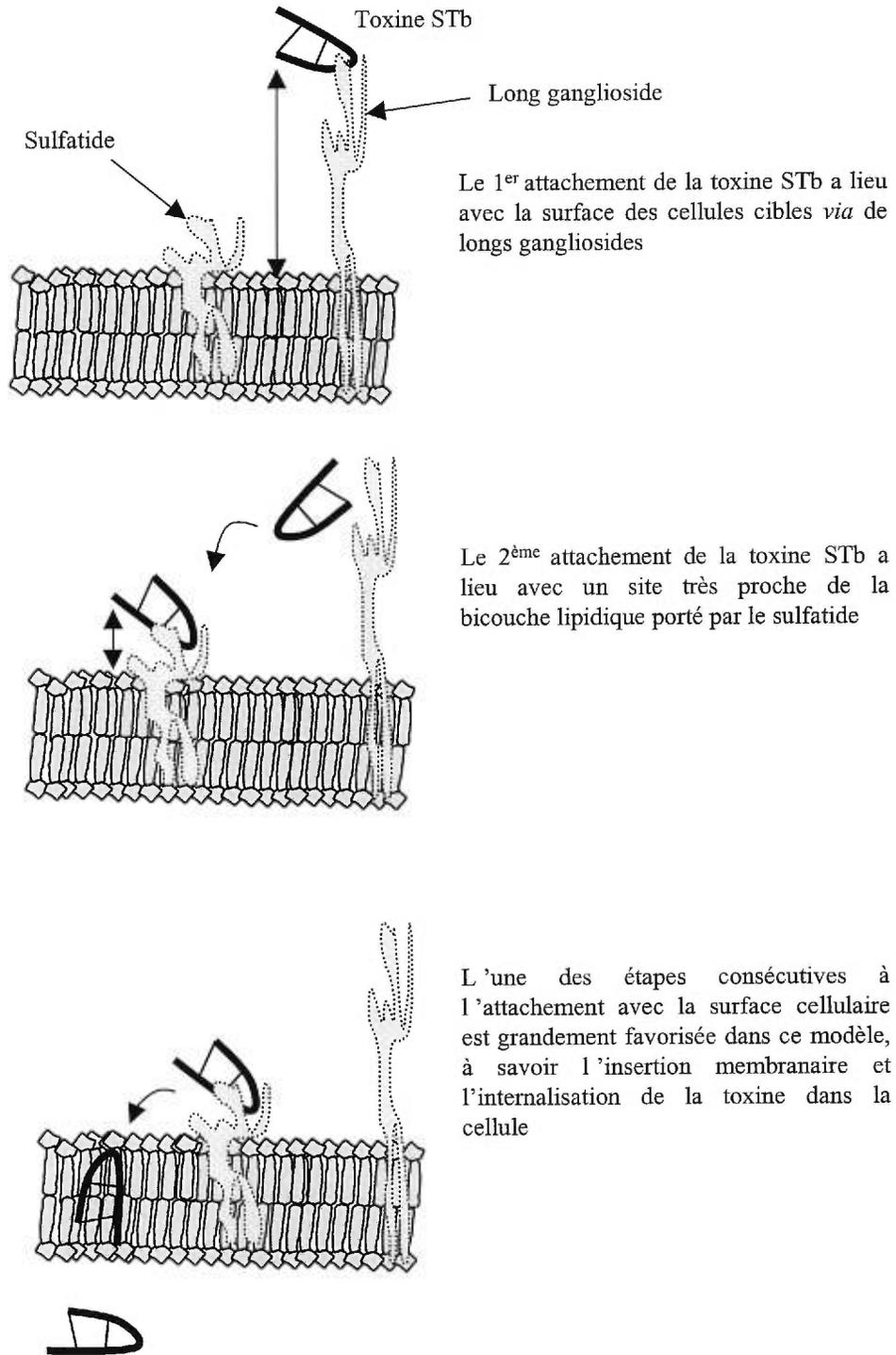
fimbriae S. Une adhésion multifactorielle a été décrite pour les *E. coli* portant les fimbriae S, *via* la protéine fimbriaire majeure SfaA avec le sulfatide (Prasadarao *et al.*, 1993), et *via* l'activité lectine de l'adhésine SfaS spécifique pour le NeuAc α (2-3)Gal contenu dans les glycoprotéines et les gangliosides (Moch *et al.*, 1987). L'élimination des acides neuraminiques de la surface cellulaire par un traitement avec une neuraminidase bloque complètement l'attachement des *E. coli* portant les fimbriae S, alors que des micelles de glycolipides sulfatés bloquent l'attachement à 50 % seulement (Prasadarao *et al.*, 1993). Les auteurs suggèrent que l'adhésion des *E. coli* portant les fimbriae S, gouvernée par les glycolipides sulfatés, est importante pour assurer un contact intime du micro-organisme avec la membrane de l'hôte dans la pathogénèse de la méningite à *E. coli*, de façon à favoriser ensuite la traversée de la barrière endothéliale du cerveau.

Dans le modèle séquentiel d'attachement proposé pour la toxine STb (Fig. 3), l'attachement au sulfatide constitue l'attachement clé avec la membrane plasmique. Le sulfatide est un glycolipide court, favorisant par conséquent une proximité membranaire très élevée pour la toxine. Chao et Dreyfus (1997) ont démontré que la toxine s'insère dans la bicouche lipidique suite à l'attachement de surface. Il est probable que l'attachement avec le sulfatide joue un rôle important dans la pénétration de la toxine (Fig. 3). Cette seconde étape d'attachement serait essentielle pour positionner la toxine de manière étroite avec la cellule de l'hôte pour sa pénétration.

Le modèle séquentiel proposé pour STb permet d'expliquer qu'aucun attachement pour le sulfatide n'ait été observé sur le tissu après l'élimination des acides neuraminiques terminaux. De plus, ce modèle suggère que les sites d'acides neuraminiques doivent être portés par de longs gangliosides. Ainsi, ces sites étaient d'autant plus facilement accessibles par la neuraminidase. Par contre, un attachement résiduel de la toxine a été observé suite au clivage à la base de la chaîne oligosaccharidique des glycosphingolipides par la céramide glycanase. Le site de clivage de cette endoglycosidase doit être difficilement accessible sur le tissu.

Pour identifier les gangliosides impliqués dans l'attachement de STb avec les cellules cibles, il sera important de considérer que ces gangliosides doivent appartenir à la catégorie des polyglycosylcéramides, dont les chaînes oligosaccharidiques sont longues et fortement

polaires (Fig. 3). Les polyglycosylcéramides (PGC) possèdent des chaînes de polylactosamine typiques sur lesquelles sont branchés des fucoses terminaux, des galactoses terminaux et des acides neuraminiques terminaux (Miller-Podraza *et al.*, 1982; Miller-Podraza *et al.*, 1993). Les polyglycosylcéramides contiennent en moyenne un acide neuraminique toutes les 15 unités saccharidiques.



Le 1^{er} attachement de la toxine STb a lieu avec la surface des cellules cibles *via* de longs gangliosides

Le 2^{ème} attachement de la toxine STb a lieu avec un site très proche de la bicouche lipidique porté par le sulfatide

L'une des étapes consécutives à l'attachement avec la surface cellulaire est grandement favorisée dans ce modèle, à savoir l'insertion membranaire et l'internalisation de la toxine dans la cellule

Figure 3. Modèle séquentiel proposé pour l'attachement de la toxine STb avec la surface de ses cellules cibles.

CONCLUSIONS

En conclusion, nous avons mis en évidence pour la première fois l'attachement de STb avec le tissu cible chez l'hôte naturel. Nous avons démontré que la toxine STb s'attache au tissu par l'intermédiaire de glycosphingolipides de surface. Plus précisément, l'ensemble des résultats indique que la toxine STb comprendrait 2 sites d'attachement distincts avec la surface des cellules cibles, l'un contenant un acide neuraminique terminal porté par des gangliosides, qui restent à être identifiés, et l'autre pour le galactose sulfaté en 3' porté par le sulfatide.

Nous supposons que ces 2 sites distincts d'attachement peuvent jouer le rôle de récepteurs membranaires pour la toxine STb. En effet, la fonction cellulaire d'un récepteur pour une toxine dépend de la fixation spécifique entre ces deux molécules. Ainsi, l'attachement de STb avec les deux classes de sites peut être corrélé avec l'activité biologique de la toxine, dans la mesure où ces sites sont présents sur les cellules cibles.

Nous avons proposé que ces 2 sites distincts d'attachement sont impliquées dans un attachement séquentiel avec les cellules cibles. Un attachement de première étape avec des sites neuraminiques serait nécessaire pour que le second attachement avec le sulfatide ait lieu efficacement. Le site d'attachement porté par le sulfatide doit probablement déterminer la susceptibilité. Les études futures devraient s'orienter vers la vérification du modèle séquentiel d'attachement dans l'initiation du mécanisme d'action de STb.

Comprendre l'attachement des toxines bactériennes avec la muqueuse intestinale est essentiel pour déterminer comment ces pathogènes altèrent spécifiquement les fonctions intestinales pour causer une diarrhée. Les connaissances basées sur les structures de complexes toxine-récepteur ouvrent également un important champ d'applications pratiques. L'application la plus spectaculaire est de synthétiser des analogues qui soient de plus forte affinité que les sites d'attachement naturels pour être utilisés en tant qu'inhibiteur thérapeutique. Ces connaissances peuvent même être une base d'étude des interactions impliquées dans l'action des hormones, ou dans l'adhésion des cellules entre elles chez les mammifères.

V. BIBLIOGRAPHIE

Abraham S.N., D. Sun, J.B. Dale and E.H. Beachey (1988). Conservation of the D-mannose-adhesion protein among type 1 fimbriated members of the family Enterobacteriaceae. *Nature* **336**: 682-4.

Akashi N., S. Hitotsubashi, H. Yamanaka, Y. Fujii, T. Tsuji, A. Miyama, J.E. Joya and K. Okamoto (1993). Production of heat-stable enterotoxin II by chicken clinical isolates of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* **109**: 311-5.

Aktorics K. and A. Wegner (1992). Mechanisms of the cytopathic action of actin-ADP-ribosylating toxins. *Molecular Microbiology* **6**: 2905-8.

Alderete J.F. and D.C. Robertson (1977). Repression of heat-stable enterotoxin synthesis in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* **17**: 629-33.

Almenoff J.S., J. Jurka and G.K. Schoolnik (1994). Induction of heat-stable enterotoxin receptor activity by a human Alu repeat. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 16610-7.

Almenoff J.S., S.I. Williams, L.A. Scheving, A.K. Judd and G.K. Schoolnik (1993). Ligand-based histochemical localization and capture of cells expressing heat-stable enterotoxin receptors. *Molecular Microbiology* **8**: 865-73.

Alston W.K., D.A. Elliott, M.E. Epstein, V.B. Hatcher, M. Tang and F.D. Lowy (1997). Extracellular matrix heparan sulfate modulates endothelial cell susceptibility to *Staphylococcus aureus*. *Journal of Cellular Physiology* **173**: 102-9.

Angstrom J., S. Teneberg and K.A. Karlsson (1994). Delineation and comparison of ganglioside-binding epitopes for the toxins of *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, and *Clostridium tetani*: evidence for overlapping epitopes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 11859-63.

Aridor M., G. Rajmilevich, M.A. Beaven and R. Sagi-Eisenberg (1993). Activation of exocytosis by the heterotrimeric G protein G₁₃. *Science* **262**: 1569-72.

Aridor M., L.M. Traub and R. Sagi-Eisenberg (1990). Exocytosis in mast cells by basic secretagogues: evidence for direct activation of GTP-binding proteins. *Journal of Cell Biology* **111**: 909-17.

Arriaga Y.L., B.A. Harville and L.A. Dreyfus (1995). Contribution of individual disulfide bonds to biological action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B. *Infection and Immunity* **63**: 4715-20.

Ascencio F., L.A. Fransson and T. Wadstrom (1993). Affinity of the gastric pathogen *Helicobacter pylori* for the N-sulphated glycosaminoglycan heparan sulphate. *Journal of Medical Microbiology* **38**: 240-4.

Banfield B.W., Y. Leduc, L. Esford, R.J. Visalli, C.R. Brandt and F. Tufaro (1995). Evidence for an interaction of herpes simplex virus with chondroitin sulfate proteoglycans during infection. *Virology* **208**: 531-9.

Bardwell J.C., K. McGovern and J. Beckwith (1991). Identification of a protein required for disulfide bond formation *in vivo*. *Cell* **67**: 581-9.

Beachey E.H., C.S. Giampapa and S.N. Abraham (1988). Bacterial adherence. Adhesin receptor-mediated attachment of pathogenic bacteria to mucosal surfaces. *American Review of Respiratory Disease* **138**: S45-8.

Bear C.E., C.H. Li, N. Kartner, R.J. Bridges, T.J. Jensen, M. Ramjeesingh and J.R. Riordan (1992). Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Cell* **68**: 809-18.

Bell G.I., M. Dembo and P. Bongrand (1984). Cell adhesion. Competition between nonspecific repulsion and specific bonding. *Biophysical Journal* **45**: 1051-64.

Belmonte G., G. Menestrina, C. Pederzoli, I. Krizaj, F. Gubensek, T. Turk and P. Macek (1994). Primary and secondary structure of a pore-forming toxin from the sea anemone, *Actinia equina* L., and its association with lipid vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta* **1192**: 197-204.

Benz R., E. Maier and I. Gentschev (1993). TolC of *Escherichia coli* functions as an outer membrane channel. *Zentralblatt für Bakteriologie* **278**: 187-96.

Bernardi A., L. Raimondi and F. Zuccotto (1997). Simulation of protein-sugar interactions: a computational model of the complex between ganglioside GM1 and the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. *Journal of Medical Chemistry* **40**: 1855-62.

Blanco M., J.E. Blanco, E.A. Gonzales, A. Mora, W. Jansen, T.A.T. Gomes, F. Zerbini, T. Yano, A.F.P. de Castro and J. Blanco (1997). Genes coding for enterotoxins

and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different O:K:H serotypes: relationship with toxic phenotypes. *Journal of Clinical Microbiology* **35**: 2958-63.

Bock K., K.A. Karlsson, N. Stromberg and S. Teneberg (1988). Interaction of viruses, bacteria and bacterial toxins with host cell surface glycolipids. Aspects on receptor identification and dissection of binding epitopes. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **228**: 153-86.

Bossé M., C.E. Handl, L.A. Lortie, J. Harel and J.D. Dubreuil (1993). Fusion of the genes encoding *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b (STb) and the maltose-binding protein to obtain mature STb enterotoxin. *Journal of General Microbiology* **139**: 631-8.

Boyd B., G. Magnusson, Z. Zhiuyan and C.A. Lingwood (1994). Lipid modulation of glycolipid receptor function. Availability of Gal(alpha 1-4)Gal disaccharide for verotoxin binding in natural and synthetic glycolipids. *European Journal of Biochemistry* **223**: 873-8.

Boyd B., G. Tyrrell, M. Maloney, C. Gyles, J. Brunton and C. Lingwood (1993). Alteration of the glycolipid binding specificity of the pig edema toxin from globotetraosyl to globotriaosyl ceramide alters *in vivo* tissue targetting and results in a verotoxin 1-like disease in pigs. *Journal of Experimental Medicine* **177**: 1745-53.

Braden B.C., W. Dall'Acqua, E. Eisenstein, B.A. Fields, F.A. Goldbaum, E.L. Malchiodi, R.A. Mariuzza, F.P. Schwarz, X. Ysern and R.J. Poljak (1995). Protein motion and lock and key complementarity in antigen-antibody reactions. *Pharmaceutica Acta Helvetica* **69**: 225-30.

Brennan M.J., J.H. Hannah and E. Leininger (1991). Adhesion of *Bordetella pertussis* to sulfatides and to the GalNAc beta 4Gal sequence found in glycosphingolipids. *Journal of Biological Chemistry* **266**: 18827-31.

Buckley J.T. (1992). The channel-forming toxin aerolysin. *FEMS Medical Microbiology and Immunology* **5**: 13-7.

Burgess M.N., R.J. Bywater, C.M. Cowley, N.A. Mullan and P.M. Newsome (1978). Biological evaluation of a methanol-soluble, heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits, and calves. *Infection and Immunity* **21**: 526-31.

Busque P., A. Letellier, J. Harel and J.D. Dubreuil (1995). Production of

Escherichia coli STb enterotoxin is subject to catabolite repression. *Microbiology* **141**: 1621-7.

Calva E., J. Torres, M. Vazquez, V. Angeles, H. de la Vega and G.M. Ruiz-Palacios (1989). *Campylobacter jejuni* chromosomal sequences that hybridize to *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* LT enterotoxin genes. *Gene* **75**: 243-51.

Casey T.A., C.J. Herring, R.A. Schneider, B.T. Bosworth and S.C. Whipp (1998). Expression of heat-stable enterotoxin STb adherent *Escherichia coli* is not sufficient to cause severe diarrhea in neonatal pigs. *Infection and Immunity* **66**: 1270-2.

Casey T.A., B. Nagy and H.W. Moon (1992). Pathogenicity of porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* that do not express K88, K99, F41, or 987P adhesins. *American Journal of Veterinary Research* **53**: 1488-92.

Chakraborty T., A. Schmid, S. Notermans and R. Benz (1990). Aerolysin of *Aeromonas sobria*: evidence for formation of ion-permeable channels and comparison with alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity* **58**: 2127-32.

Chao A.C., F.J. de Sauvage, Y.J. Dong, J.A. Wagner, D.V. Goeddel and P. Gardner (1994). Activation of intestinal CFTR Cl⁻ channel by heat-stable enterotoxin and guanylin via cAMP-dependent protein kinase. *EMBO Journal* **13**: 1065-72.

Chao K.L. and L.A. Dreyfus (1997a). Interaction of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B with cultured human intestinal epithelial cells. *Infection and Immunity* **65**: 3209-17.

Chao K.L. and L.A. Dreyfus (1997b). Interaction of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B (STB) with rat intestinal epithelial cells and intestinal cell lipids. General Meeting of the American Society for Microbiology, Miami, FL.

Chatterjee S., M. Khullar and W.Y. Shi (1995). Digalactosylceramide is the receptor for staphylococcal enterotoxin-B in human kidney proximal tubular cells. *Glycobiology* **5**: 327-33.

Cheng S.H., D.P. Rich, J. Marshall, R.J. Gregory, M.J. Welsh and A.E. Smith (1991). Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel. *Cell* **66**: 1027-36.

Chopra A.K., T.N. Vo and C.W. Houston (1992). Mechanism of action of a

cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*. FEMS Microbiology Letters **70**: 15-9.

Clark G.F., H.C. Krivan, T.D. Wilkins and D.F. Smith (1987). Toxin A from *Clostridium difficile* binds to rabbit erythrocyte glycolipids with terminal Gal alpha 1-3Gal beta 1-4GlcNAc sequences. Archives of Biochemistry and Biophysics **257**: 217-29.

Clements J.D. (1990). Construction of a nontoxic fusion peptide for immunization against *Escherichia coli* strains that produce heat-labile and heat-stable enterotoxins. Infection and Immunity **58**: 1159-66.

Cohen M.B., A. Guarino, R. Shukla and R.A. Giannella (1988). Age-related differences in receptors for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin in the small and large intestine of children. Gastroenterology **94**: 367-73.

Cohen M.B., M.R. Thompson and R.A. Giannella (1989). Differences in jejunal and ileal response to *E. coli* enterotoxin: possible mechanisms. American Journal of Physiology **257**: G118-23.

Compton T., D.M. Nowlin and N.R. Cooper (1993). Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. Virology **193**: 834-41.

Connell T.D. and R.K. Holmes (1995). Mutational analysis of the ganglioside-binding activity of the type II *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin LT-IIb. Molecular Microbiology **16**: 1995.

Cowell S., W. Aschauer, H.J. Gruber, K.L. Nelson and J.T. Buckley (1997). The erythrocyte receptor for the channel-forming toxin aerolysin is a novel glycosylphosphatidylinositol-anchored protein. Molecular Microbiology **25**: 343-50.

Crane J.K. and K.L. Shanks (1996). Phosphorylation and activation of the intestinal guanylyl cyclase receptor for *Escherichia coli* heat-stable toxin by protein kinase C. Molecular and Cellular Biochemistry **165**: 111-20.

Cuatrecasa P. (1973). Gangliosides and membrane receptors for cholera toxin. Biochemistry **12**: 3558-66.

Currie M.G., K.F. Fok, J. Kato, J.R. Moore, F.K. Hamra, K.L. Duffin and C.E. Smith (1992). Guanylin: an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **89**: 947-51.

De Castro A.F., M.S. Gatti, M.B. Serafim, J.R. Brito and D.S. de Barcellos (1984). Significance of thermostable enterotoxin produced by porcine enteropathogenic *Escherichia coli*. *Veterinary Record* **115**: 518-9.

De Grandis S., H. Law, J. Brunton, C. Gyles and C.A. Lingwood (1989). Globotetraosylceramide is recognized by the pig edema disease toxin. *Journal of Biological Chemistry* **264**: 12520-5.

De Sauvage F.J., T.R. Camerato and D.V. Goeddel (1991). Primary structure and functional expression of the human receptor for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *Journal of Biological Chemistry* **266**: 17912-8.

Dimmock N.J. (1982). Review article of initial stages in infection with animal viruses. *Journal of General Virology* **59**: 1-22.

Dreyfus L.A., B. Harville, D.E. Howard, R. Shaban, D.M. Beatty and S.J. Morris (1993). Calcium influx mediated by the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B (ST_B). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 3202-6.

Dreyfus L.A., R.G. Urban, S.C. Whipp, C. Slaughter, K. Tachias and Y.M. Kupersztoch (1992). Purification of the ST_B enterotoxin of *Escherichia coli* and the role of selected amino acids on its secretion, stability and toxicity. *Molecular Microbiology* **6**: 2397-406.

Dubreuil J.D. (1997). *Escherichia coli* ST_b enterotoxin. *Microbiology* **143**: 1783-95.

Dubreuil J.D., J.M. Fairbrother, R. Lallier and S. Larivière (1991). Production and purification of heat-stable enterotoxin b from a porcine *Escherichia coli* strain. *Infection and Immunity* **59**: 198-203.

Dubreuil J.D., A. Letellier and J. Harel (1996). A recombinant *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b (ST_b) fusion protein eliciting neutralizing antibodies. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **13**: 317-23.

Echeverria P., J. Seriwatana, D.N. Taylor, C. Tirapat and B. Rowe (1985).

Escherichia coli contains plasmids coding for heat-stable b, other enterotoxins, and antibiotic resistance. *Infection and Immunity* **48**: 843-6.

Eidels L., R.L. Proia and D.A. Hart (1983). Membrane receptors for bacterial toxins. *Microbiological Reviews* **47**: 596-620.

Eiklid K. and S. Olsnes (1980). Interaction of *Shigella shigae* cytotoxin with receptors on sensitive and insensitive cells. *Journal of Receptor Research* **1**: 199-213.

Eklund S., I. Brunsson, M. Jodal and O. Lundgren (1987). Changes in cyclic 3'5'-adenosine monophosphate tissue concentration and net fluid transport in the cat's small intestine elicited by cholera toxin, arachidonic acid, vasoactive intestinal polypeptide and 5-hydroxytryptamine. *Acta Physiologica Scandinavica* **129**: 115-25.

Eklund S., M. Jodal and O. Lundgren (1985). The enteric nervous system participates in the secretory response to the heat stable enterotoxins of *Escherichia coli* in rats and cats. *Neuroscience* **14**: 673-81.

Endo Y., K. Tsurugi, T. Yutsudo, Y. Takeda, T. Ogasawara and K. Igarashi (1988). Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the toxins. *European Journal of Biochemistry* **171**: 45-50.

Fairbrother J.M., A. Broes, M. Jacques and S. Lariviere (1989). Pathogenicity of *Escherichia coli* O115:K"V165" strains isolated from pigs with diarrhea. *American Journal of Veterinary Research* **50**: 1029-36.

Fairbrother J.M., S. Lariviere and W.M. Johnson (1988). Prevalence of fimbrial antigens and enterotoxins in nonclassical serogroups of *Escherichia coli* isolated from newborn pigs with diarrhea. *American Journal of Veterinary Research* **49**: 1325-8.

Fasano A. (1997). Cellular microbiology: how enteric pathogens socialize with their intestinal host. *American Society for Microbiology News* **63**: 259-65.

Fasano A., B. Baudry, D.W. Pumphin, S.S. Wasserman, B.D. Tall, J.M. Ketley and J.B. Kaper (1991). *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 5242-6.

Fasano A., B.A. Kay, R.G. Russell, D.R. Maneval, Jr. and M.M. Levin (1990).

Enterotoxin and cytotoxin production by enteroinvasive *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* **58**: 3717-23.

Feyzi E., E. Trybala, T. Bergstrom, U. Lindahl and D. Spillmann (1997). Structural requirement of heparan sulfate for interaction with herpes simplex virus type 1 virions and isolated glycoprotein C. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 24850-7.

Field M., L.H. Graf, W.J. Laird and P.L. Smith (1978). Heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: in vitro effects on guanylate cyclase activity, cyclic GMP concentration, and ion transport in small intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**: 2800-4.

Findlay G., J. Yu and T.R. Hirst (1993). Analysis of enterotoxin synthesis in a *Vibrio cholerae* strain lacking DsbA, a periplasmic enzyme involved in disulphide bond formation. *Biochemical Society Transactions* **21**: 212S.

Fishman P.H. (1982a). Role of membrane gangliosides in the binding and action of bacterial toxins. *Journal of Membrane Biology* **69**: 85-97.

Fishman P.H. and E.E. Atikkan (1980). Mechanism of action of cholera toxin: effect of receptor density and multivalent binding on activation of adenylate cyclase. *Journal of Membrane Biology* **54**: 51-60.

Fishman P.H., T. Pacuszka and P.A. Orlandi (1993). Gangliosides as receptors for bacterial enterotoxins. *Advances in Lipid Research* **25**: 165-87.

Foreman D.T., Y. Martinez, G. Coombs, A. Torres and Y.M. Kupersztoch (1995). TolC and DsbA are needed for the secretion of STB, a heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **18**: 237-45.

Forte L.R., P.K. Thorne, S.L. Eber, W.J. Krause, R.H. Heeman, S.H. Hancis and J.D. Corbin (1992). Stimulation of intestinal Cl⁻ transport by heat-stable enterotoxin: activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *American Journal of Physiology* **263**: C607-C15.

Forti S. and G. Menestrina (1989). Staphylococcal alpha-toxin increases the permeability of lipid vesicles by cholesterol- and pH-dependent assembly of oligomeric channels. *European Journal of Biochemistry* **181**: 767-73.

Frantz J.C., L. Jaso-Friedman and D.C. Robertson (1984). Binding of *Escherichia*

coli heat-stable enterotoxin to rat intestinal cells and brush border membranes. *Infection and Immunity* **43**: 622-30.

Fritz G., P. Schroeder and K. Aktories (1995). Isolation and characterization of a *Clostridium botulinum* C2 toxin-resistant cell line: evidence for possible involvement of the cellular C2II receptor in growth regulation. *Infection and Immunity* **63**: 2334-40.

Fujii Y., M. Hayashi, S. Hitotsubashi, Y. Fuke, H. Yamanaka and K. Okamoto (1991). Purification and characterization of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *Journal of Bacteriology* **173**: 5516-22.

Fujii Y., Y. Kondo and K. Okamoto (1995). Involvement of prostaglandin E2 synthesis in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *FEMS Microbiology Letters* **130**: 259-65.

Fujii Y., T. Nomura, H. Yamanaka and K. Okamoto (1997). Involvement of Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase II in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *Microbiology and Immunology* **41**: 633-6.

Fujii Y., Y. Okamuro, S. Hitotsubashi, A. Saito, N. Akashi and K. Okamoto (1994). Effect of alterations of basic amino acid residues of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II on enterotoxicity. *Infection and Immunity* **62**: 2295-301.

Fukuta S., J.L. Magnani, E.M. Twiddy, R.K. Holmes and V. Ginsburg (1988). Comparison of the carbohydrate-binding specificities of cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins LTh-I, LT-IIa, and LT-IIb. *Infection and Immunity* **56**: 1748-53.

Gabriel S.E., K.N. Brigman, B.H. Koller, R.C. Boucher and M.J. Stutts (1994). Cystic fibrosis heterozygote resistance to cholera toxin in the cystic fibrosis mouse model. *Science* **266**: 107-9.

Galen J.E., J.M. Ketley, A. Fasano, S.H. Richardson, S.S. Wasserman and J.B. Kaper (1992). Role of *Vibrio cholerae* neuraminidase in the function of cholera toxin. *Infection and Immunity* **60**: 406-15.

Ganguly N.K. and T. Kaur (1996). Mechanism of action of cholera toxin and other toxins. *Indian Journal of Medical Research* **104**: 28-37.

Garland W.J. and J.T. Buckley (1988). The cytolytic toxin aerolysin must aggregate to disrupt erythrocytes, and aggregation is stimulated by human glycophorin. *Infection and*

Immunity **56**: 1249-53.

Gemmell C.G. (1984). Comparative study of the nature and biological activities of bacterial enterotoxins. *Journal of Medical Microbiology* **17**: 217-35.

Geuijen C.A., R.J. Willems and F.R. Mooi (1996). The major fimbrial subunit of *Bordetella pertussis* binds to sulfated sugars. *Infection and Immunity* **64**: 2657-65.

Giannella R.A., M. Luttrell and M. Thompson (1983). Binding of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin to receptors on rat intestinal cells. *American Journal of Physiology* **245**: G492-8.

Greenberg R.N., M. Hill, J. Crytzer, W.J. Krause, S.L. Eber, F.K. Hamra and L.R. Forte (1997). Comparison of effects of uroguanylin, guanylin, and *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin STa in mouse intestine and kidney: evidence that uroguanylin is an intestinal natriuretic hormone. *Journal of Investigative Medicine* **45**: 276-82.

Griffiths S.L. and D.R. Critchley (1991). Characterization of the binding sites for *Escherichia coli* heat-labile toxin type I in intestinal brush borders. *Biochimica et Biophysica Acta* **1075**: 154-61.

Griffiths S.L., R.A. Finkelstein and D.R. Critchley (1986). Characterization of the receptor for cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile toxin in rabbit intestinal brush borders. *Biochemical Journal* **238**: 313-22.

Guarino A., M. Cohen, M. Thompson, K. Dharmasathaphorn and R. Giannella (1987a). T84 cell receptor binding and guanyl cyclase activation by *Escherichia coli* heat-stable toxin. *American Journal of Physiology* **253**: G775-80.

Guarino A., M.B. Cohen, G. Overmann, M.R. Thompson and R.A. Giannella (1987b). Binding of *E. coli* heat-stable enterotoxin to rat intestinal brush borders and to basolateral membranes. *Digestive Diseases and Sciences* **32**: 1017-26.

Guerrant R.L., J.M. Hughes, B. Chang, D.C. Robertson and F. Murad (1980). Activation of intestinal guanylate cyclase by heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: studies of tissue specificity, potential receptors, and intermediates. *Journal of Infectious Diseases* **142**: 220-8.

Gyles C.L. (1992). *Escherichia coli* cytotoxins and enterotoxins. *Canadian Journal of Microbiology* **38**: 734-46.

Handl C.E. and J.I. Flock (1992). STb producing *Escherichia coli* are rarely associated with infantile diarrhoea. *Journal of Diarrhoeal Diseases Research* **10**: 37-8.

Handl C.E., J. Harel, J.I. Flock and J.D. Dubreuil (1993). High yield of active STb enterotoxin from a fusion protein (MBP-STb) expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* **4**: 275-81.

Handl C.E., E. Olsson and J.I. Flock (1992). Evaluation of three different STb assays and comparison of enterotoxin pattern over a five-year period in Swedish porcine *Escherichia coli*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **15**: 505-10.

Hanna P.C. and B.A. McClane (1991). A recombinant C-terminal toxin fragment provides evidence that membrane insertion is important for *Clostridium perfringens* enterotoxin cytotoxicity. *Molecular Microbiology* **5**: 225-30.

Hannah J.H., F.D. Menozzi, G. Renauld, C. Locht and M.J. Brennan (1994). Sulfated glycoconjugate receptors for the *Bordetella pertussis* adhesin filamentous hemagglutinin (FHA) and mapping of the heparin-binding domain on FHA. *Infection and Immunity* **62**: 5010-9.

Hansson G.C. (1983). The subcellular localization of the glycosphingolipids in the epithelial cells of rat small intestine. *Biochimica et Biophysica Acta* **733**: 295-9.

Harnett N.M. and C.L. Gyles (1985). Linkage of genes for heat-stable enterotoxin, drug resistance, K99 antigen, and colicin in bovine and porcine strains of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *American Journal of Veterinary Research* **46**: 428-33.

Harville B.A. and L.A. Dreyfus (1995). Involvement of 5-hydroxytryptamine and prostaglandin E2 in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B. *Infection and Immunity* **63**: 745-50.

Harville B.A. and L.A. Dreyfus (1996). Release of serotonin from RBL-2H3 cells by the *Escherichia coli* peptide toxin STb. *Peptides* **17**: 363-6.

Harville B.A., B.J. Morris and L.A. Dreyfus (1995). Involvement of heterotrimeric G-protein (G α i3) in the mechanism of action of *Escherichia coli* enterotoxin B. General Meeting of the American Society for Microbiology, Washington, DC.

Herrera E.M., M. Ming, E. Ortega-Barria and M.E. Pereira (1994). Mediation of *Trypanosoma cruzi* invasion by heparan sulfate receptors on host cells and penetrin

counter-receptors on the trypanosomes. *Molecular and Biochemical Parasitology* **65**: 73-83.

Higa H.H. and J.C. Paulson (1985a). Sialylation of glycoprotein oligosaccharides with N-acetyl-, N-glycolyl-, and N-O-diacetylneuraminic acids. *Journal of Biological Chemistry* **260**: 8838-49.

Higa H.H., G.N. Rogers and J.C. Paulson (1985b). Influenza virus hemagglutinins differentiate between receptor determinants bearing N-acetyl-, N-glycolyl-, and N,O-diacetylneuraminic acids. *Virology* **144**: 279-82.

Hildebrand A., M. Pohl and S. Bhakdi (1991). *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. Dual mechanism of binding to target cells. *Journal of Biological Chemistry* **266**: 17195-200.

Hippenstiel S., S. Tannert-Otto, N. Vollrath, M. Krull, I. Just, K. Aktories, C. von Eichel-Streiber and N. Suttorp (1997). Glucosylation of small GTP-binding Rho proteins disrupts endothelial barrier function. *American Journal of Physiology* **272**: L38-43.

Hirayama T., A. Wada, N. Iwata, S. Takasaki, Y. Shimonishi and Y. Takeda (1992). Glycoprotein receptors for a heat-stable enterotoxin (STh) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* **60**: 4213-20.

Hitotsubashi S., M. Akagi, A. Saitou, H. Yamanaka, Y. Fujii and K. Okamoto (1992b). Action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II on isolated sections of mouse ileum. *FEMS Microbiology Letters* **69**: 249-52.

Hitotsubashi S., Y. Fujii and K. Okamoto (1994). Binding protein for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II in mouse intestinal membrane. *FEMS Microbiology Letters* **122**: 297-302.

Hitotsubashi S., Y. Fujii, H. Yamanaka and K. Okamoto (1992a). Some properties of purified *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *Infection and Immunity* **60**: 4468-74.

Holmgren J. (1973). Comparison of the tissue receptors for *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* enterotoxins by means of gangliosides and natural cholera toxoid. *Infection and Immunity* **8**: 851-9.

Holmgren J., P. Fredman, M. Lindblad, A.M. Svennerholm and L. Svennerholm (1982). Rabbit intestinal glycoprotein receptor for *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin lacking affinity for cholera toxin. *Infection and Immunity* **38**: 424-33.

- Holmgren J., M. Lindblad, P. Fredman, L. Svennerholm and H. Myrvold (1985).** Comparison of receptors for cholera and *Escherichia coli* enterotoxins in human intestine. *Gastroenterology* **89**: 27-35.
- Holmgren J., I. Lönnroth, J.-E. Mansson and L. Svennerholm (1975).** Interaction of cholera toxin and membrane GM1 ganglioside of the small intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **72**: 2520-4.
- Hu S.T. and C.H. Lee (1988).** Characterization of the transposon carrying the STII gene of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics* **214**: 490-5.
- Hu S.T., M.K. Yang, D.F. Spandau and C.H. Lee (1987).** Characterization of the terminal sequences flanking the transposon that carries the *Escherichia coli* enterotoxin STII gene. *Gene* **55**: 157-67.
- Huesca M., S. Borgia, P. Hoffman and C.A. Lingwood (1996).** Acidic pH changes receptor binding specificity of *Helicobacter pylori*: a binary adhesion model in which surface heat shock (stress) proteins mediate sulfatide recognition in gastric colonization. *Infection and Immunity* **64**: 2643-8.
- Huott P.A., W. Liu, J.A. McRoberts and R.A. Gianella (1988).** Mechanism of action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin in a human colonic cell line. *Journal of Clinical Investigation* **82**: 514-23.
- Isaacs R.D. (1994).** *Borrelia burgdorferi* bind to epithelial cell proteoglycans. *Journal of Clinical Investigation* **93**: 809-19.
- IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature C.B.N. (1978).** The nomenclature of lipids. *Biochemical Journal* **171**: 21-35.
- IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature J.C.B.N. (1986).** Nomenclature of glycoproteins, glycopeptides and peptidoglycans. Recommendations 1985. *European Journal of Biochemistry* **159**: 1-6.
- Jacewicz M., H. Clausen, E. Nudelman, A. Donohue-Rolfe and G.T. Keusch (1986).** Pathogenesis of shigella diarrhea. XI. Isolation of a *Shigella* toxin-binding glycolipid from rabbit jejunum and HeLa cells and its identification as globotriaosylceramide. *Journal of Experimental Medicine* **163**: 1391-404.
- Janin J. and C. Chothia (1990).** The structure of protein-protein recognition sites.

Journal of Biological Chemistry **265**: 16027-30.

Jemal C., J.E. Haddad, D. Begum and M.P. Jackson (1995). Analysis of Shiga toxin subunit association by using hybrid A polypeptides and site-specific mutagenesis. *Journal of Bacteriology* **177**: 3128-32.

Jones G.W. and R.E. Isaacson (1983). Proteinaceous bacterial adhesins and their receptors. *Critical Reviews in Microbiology* **10**: 229-60.

Just I., M. Wilm, J. Selzer, G. Rex, C. von Eichel-Streiber, M. Mann and K. Aktories (1995). The enterotoxin from *Clostridium difficile* (ToxA) monoglucosylates the Rho proteins. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 13932-6.

Kabat E.A. (1988). Antibody complementarity and antibody structure. *Journal of Immunology* **141**: S25-36.

Kandel G., A. Donohue-Rolfe, M. Donowitz and G.T. Keusch (1989). Pathogenesis of *Shigella* diarrhea. XVI. Selective targetting of Shiga toxin to villus cells of rabbit jejunum explains the effect of the toxin on intestinal electrolyte transport. *Journal of Clinical Investigation* **84**: 1509-17.

Kaper J.B., J.G. Morris, Jr. and M.M. Levine (1995). Cholera. *Clinical Microbiological Review* **8**: 48-86.

Karlsson K.A. (1986). Animal glycolipids as attachment sites for microbes. *Chemistry and Physics of Lipids* **42**: 153-72.

Karlsson K.A. (1995). Microbial recognition of target-cell glycoconjugates. *Current Opinion in Structural Biology* **5**: 622-35.

Karlsson K.A., J. Ångstrom, J. Bergstrom and B. Lanne (1992). Microbial interaction with animal cell surface carbohydrates. *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica - Supplement* **100**: 71-83.

Karlsson K.A., S. Teneberg, J. Angstrom, A. Kjellberg, T.R. Hirst, J. Berstrom and H. Miller-Podraza (1996). Unexpected carbohydrate cross-binding by *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. Recognition of human and rabbit target cell glycoconjugates in comparison with cholera toxin. *Bioorganic Medicinal Chemistry* **4**: 1919-28.

Kaslow H.R. and D.L. Burns (1992). Pertussis toxin and target eukaryotic cells:

binding, entry, and activation. *FASEB Journal* **6**: 2684-90.

Katahira J., N. Inoue, Y. Horiguchi, M. Matsuda and N. Sugimoto (1997b). Molecular cloning and functional characterization of the receptor for *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Journal of Cell Biology* **136**: 1239-47.

Katahira J., H. Sugiyama, N. Inoue, Y. Horiguchi, M. Matsuda and N. Sugimoto (1997a). *Clostridium perfringens* enterotoxin utilizes two structurally related membrane proteins as functional receptors *in vivo*. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 26652-8.

Katsu T., M. Kuroko, T. Morikawa, K. Sanchika, H. Yamanaka, S. Shinoda and Y. Fujita (1990). Interaction of wasp venom mastoparan with biomembranes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1027**: 185-90.

Kemp B.E. and R.B. Pearson (1990). Protein kinase recognition motif. *Trends in Biological Sciences* **15**: 342-6.

Kennedy D.J., R.N. Greenberg, J.A. Dunn, R. Abernathy, J.S. Ryerse and R.L. Guerrant (1984). Effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin STb on intestines of mice, rats, rabbits, and piglets. *Infection and Immunity* **46**: 639-43.

Keusch G.T. and M. Donowitz (1983). Pathophysiological mechanisms of diarrhoeal diseases: diverse aetiologies and common mechanisms. *Scandinavian Journal of Gastroenterology - Supplement* **84**: 33-43.

Keusch G.T. and M. Jacewicz (1977). Pathogenesis of *Shigella* diarrhea. VII. Evidence for a cell membrane toxin receptor involving beta1 leads to 4-linked N-acetyl-D-glucosamine oligomers. *Journal of Experimental Medicine* **146**: 535-46.

Keusch G.T., M. Jacewicz, D.W.K. Acheson and Donohue-Rolfe (1995). Globotriaosylceramide, Gb3, is an alternative functional receptor for Shiga-like toxin 2e. *Infection and Immunity* **63**: 1138-41.

Keusch G.T., M. Jacewicz and A. Donohue-Rolfe (1986). Pathogenesis of *Shigella* diarrhea: evidence for an N-linked glycoprotein *Shigella* toxin receptor and receptor modulation by β -galactosidase. *Journal of Infectious Diseases* **153**: 238-48.

Khurana S., N.K. Ganguly, M. Khullar, D. Panigrahi and B.N. Walia (1991). Studies on the mechanism of *Salmonella typhimurium* enterotoxin-induced diarrhoea. *Biochimica et Biophysica Acta* **1097**: 171-6.

Klipstein F.A. and R.F. Engert (1985). Immunological relationship of the B subunits of *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins. *Infection and Immunity* **48**: 629-33.

Krause W.J., R.H. Cullingford, R.H. Freeman, S.L. Eber, K.C. Richardson, K.F. Fok, M.G. Currie and L.R. Forte (1994). Distribution of heat-stable enterotoxin on Cl⁻ secretion in human gut. *Journal of Anatomy* **184**: 407-17.

Krivan H.C., G.F. Clark, D.F. Smith and T.D. Wilkins (1986). Cell surface binding site for *Clostridium difficile* enterotoxin: evidence for a glycoconjugate containing the sequence Gal alpha 1-3Gal beta 1-4GlcNAc. *Infection and Immunity* **53**: 573-81.

Krivan H.C., L.D. Olson, M.F. Barile, V. Ginsburg and D.D. Roberts (1989). Adhesion of *Mycoplasma pneumoniae* to sulfated glycolipids and inhibition by dextran sulfate. *Journal of Biological Chemistry* **264**: 9283-8.

Kuhn M., K. Adermann, J. Jahne, W.G. Forssmann and G. Rechkemmer (1994). Segmental differences in the effects of guanylin and *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin on Cl⁻ secretion in human gut. *Journal of Physiology* **479**: 433-40.

Kupersztoch Y.M., K. Tachias, C.R. Moomaw, L.A. Dreyfus, R. Urban, C. Slaughter and S. Whipp (1990). Secretion of methanol-insoluble heat-stable enterotoxin (STB): energy- and SecA-dependent conversion of pre-STB to an intermediate indistinguishable from the extracellular toxin. *Journal of Bacteriology* **172**: 2427-32.

Lampio A., J. Finne, D. Homer and C.G. Gahmberg (1984). Exposure of the major human red-cell glycolipid, globoside, to galactose oxidase. *European Journal of Biochemistry* **145**: 77-82.

Lanne B., B. Schierbeck and K.A. Karlsson (1994). On the role of the carboxyl group of sialic acid in binding of cholera toxin to the receptor glycosphingolipid, GM1. *Journal of Biochemistry* **116**: 1269-74.

Lawrence R.M., P.T. Huang, J. Glick, J.D. Oppenheim and W.K. Maas (1990). Expression of the cloned gene for enterotoxin STb of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* **58**: 970-7.

Lee C.H., S.T. Hu, P.J. Swiatek, S.L. Moseley, S.D. Allen and M. So (1985). Isolation of a novel transposon which carries the *Escherichia coli* enterotoxin STII gene.

Journal of Bacteriology **162**: 615-20.

Lee C.H., S.L. Moseley, H.W. Moon, S.C. Whipp, C.L. Gyles and M. So (1983). Characterization of the gene encoding heat-stable toxin II and preliminary molecular epidemiological studies of enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable toxin II producers. *Infection and Immunity* **42**: 264-8.

Levine M.M., J.B. Kaper, R.E. Black and M.L. Clements (1983). New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. *Microbiological Review* **47**: 510-50.

Levis M.J. and H.R. Bourne (1992). Activation of the alpha subunit of Gs in intact cells alters its abundance, rate of degradation, and membrane avidity. *Journal of Cell Biology* **119**: 1297-307.

Liang O.D., F. Ascencio, L.A. Fransson and T. Wadstrom (1992). Binding of heparan sulfate to *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity* **60**: 899-906.

Lindberg A.A., J.E. Brown, N. Stromberg, M. Westling-Ryd, J.E. Schultz and K.A. Karlsson (1987). Identification of the carbohydrate receptor for Shiga toxin produced by *Shigella dysenteriae* type 1. *Journal of Biological Chemistry* **262**: 1779-85.

Lingwood C.A., H. Law, S. Richardson, M. Petric, J.L. Brunton, S. De Grandis and M. Karmali (1987). Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin *in vitro*. *Journal of Biological Chemistry* **262**: 8834-9.

Lingwood C.A., P.A. Quinn, S. Wilansky, A. Nutikka, H.L. Ruhnke and R.B. Miller (1990). Common sulfoglycolipid receptor for mycoplasmas involved in animal and human infertility. *Biology of Reproduction* **43**: 694-7.

Lortie L.A., J.D. Dubreuil and J. Harel (1991c). Characterization of *Escherichia coli* strains producing heat-stable enterotoxin b (STb) isolated from humans with diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology* **29**: 656-9.

Lucas F., M. Popoff and G. Corthier (1991). Les entérotoxines bactériennes: structure, mode d'action. *Annales en Recherche Vétérinaire* **22**: 147-62.

Magnani J.L., D.F. Smith and V. Ginsburg (1980). Detection of gangliosides that bind cholera toxin: direct binding of ¹²⁵I-labeled to thin-layer chromatograms. *Analytical Biochemistry* **109**: 399-402.

Mainil J.G., F. Bex, E. Jacquemin, P. Pohl, M. Couturier and A. Kaeckenbeeck (1990). Prevalence of four enterotoxin (STaP, STaH, STb, and LT) and four adhesin subunit (K99, K88, 987P, and F41) genes among *Escherichia coli* isolates from cattle. *American Journal of Veterinary Research* **51**: 187-90.

Mainil J.G., S.L. Moseley, R.A. Schneider, K. Sutch, T.A. Casey and H.W. Moon (1986). Hybridization of bovine *Escherichia coli* isolates with gene probes for four enterotoxins (STaP, STaH, STb, LT) and one adhesion factor (K99). *American Journal of Veterinary Research* **47**: 1145-8.

Mann E.A., M.B. Cohen and R.A. Giannella (1993). Comparison of receptors for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin: novel receptor present in IEC-6 cells. *American Journal of Physiology* **264**: G172-8.

Marques L., M.A. Moore, J.G. Wells, I.K. Wachsmuth and A.D. O'Brien (1986). Production of Shiga-like toxin by *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Diseases* **154**: 338-41.

Matsuda M. and N. Sugimoto (1979). Calcium-independent and dependent steps in action of *Clostridium perfringens* enterotoxin on HeLa and Vero cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **91**: 629-36.

Mazaitis A.J., R. Maas and W.K. Maas (1981). Structure of a naturally occurring plasmid with genes for enterotoxin production and drug resistance. *Journal of Bacteriology* **145**: 97-105.

McClane B.A. and A.P. Wnek (1990). Studies of *Clostridium perfringens* enterotoxin action at different temperatures demonstrate a correlation between complex formation and cytotoxicity. *Infection and Immunity* **58**: 3109-15.

McClane B.A., A.P. Wnek, K.I. Hulkower and P.C. Hanna (1988b). Divalent cation involvement in the action of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. Early events in enterotoxin action are divalent cation-independent. *Journal of Biological Chemistry* **263**: 2423-35.

Menestrina G., C.L. Bashford and C.A. Pasternak (1990). Pore-forming toxins: experiments with *S. aureus* alpha-toxin, *C. perfringens* theta-toxin and *E. coli* haemolysin in lipid bilayers, liposomes and intact cells. *Toxicon* **28**: 477-91.

Menestrina G., G. Schiavo and C. Montecucco (1994). Molecular mechanisms of action of bacterial protein toxins. *Molecular Aspects of Medicine* **15**: 79-193.

Menozzi F.D., R. Mutombo, G. Renaud, C. Gantiez, J.H. Hannah, E. Leininger, M.J. Brennan and C. Locht (1994). Heparin-inhibitable lectin activity of the filamentous hemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis*. *Infection and Immunity* **62**: 769-78.

Merritt E.A., T.K. Sixma, K.H. Kalk, B.A. van Zanten and W.G. Hol (1994). Galactose-binding site in *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT) and cholera toxin (CT). *Molecular Microbiology* **13**: 745-53.

Mezoff A.G., R.A. Giannella, M.N. Eade and M.B. Cohen (1992). *Escherichia coli* enterotoxin (STa) binds to receptors stimulates guanyl cyclase, and impairs absorption in rat colon. *Gastroenterology* **102**: 816-22.

Miller-Podraza H., C. Andersson and K.A. Karlsson (1993). New method for the isolation of polyglycosylceramides from human erythrocyte membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1168**: 330-9.

Miller-Podraza H., R.M. Bradley and P.H. Fishman (1982). Biosynthesis and localization of gangliosides in cultured cells. *Biochemistry* **21**: 3260-5.

Mobassaleh M., A. Donohue-Rolfe, M. Jacewicz, R.J. Grand and G.T. Keusch (1988). Pathogenesis of shigella diarrhea: evidence for a developmentally regulated glycolipid receptor for shigella toxin involved in the fluid secretory response of rabbit small intestine. *Journal of Infectious Diseases* **157**: 1023-31.

Mobassaleh M., S.K. Gross, R.H. McCluer, A. Donohue-Rolfe and G.T. Keusch (1989). Quantitation of the rabbit intestinal glycolipid receptor for Shiga toxin. Further evidence for the developmental regulation of globotriaosylceramide in microvillus membranes. *Gastroenterology* **97**: 384-91.

Moch T., H. Hoschutzky, J. Hacker, K.D. Kroncke and K. Jann (1987). Isolation and characterization of the alpha-sialyl-beta-2,3-galactosyl-specific adhesin from fimbriated *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**: 3462-6.

Monckton R.P. and D. Hasse (1988). Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in piggeries in Victoria by DNA hybridisation using K88, K99, LT, ST1 and ST2 probes.

Veterinary Microbiology 16: 273-81.

Moniatte M., F.G. van der Goot, J.T. Buckley, F. Pattus and A. van Dorselaer (1996). Characterization of the heptameric pore-forming complex of the *Aeromonas* toxin aerolysin using MALDI-TOF mass spectrometry. *FEBS Letters* 384: 269-72.

Moon H.W., A.L. Baetz and R.A. Giannella (1983). Immunization of swine with heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin coupled to a carrier protein does not protect suckling pigs against an *Escherichia coli* strain that produces heat-stable enterotoxin. *Infection and Immunity* 39: 990-2.

Moon H.W. and T.O. Bunn (1993). Vaccines for preventing enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in farm animals. *Vaccine* 11: 213-00.

Moon H.W., R.A. Schneider and S.L. Moseley (1986). Comparative prevalence of four enterotoxin genes among *Escherichia coli* isolated from swine. *American Journal of Veterinary Research* 47: 210-2.

Moseley S.L., M. Samadpour-Motalebi and S. Falkow (1983). Plasmid association and nucleotide sequence relationships of two genes encoding heat-stable enterotoxin production in *Escherichia coli* H-10407. *Journal of Bacteriology* 156: 441-3.

Moss J., P.H. Fishman, V.C. Manganiello, M. Vaughan and R.O. Brady (1976). Functional incorporation of ganglioside into intact cells: induction of cholera responsiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73: 1034-7.

Mourad F.H., L.J. O'Donnell, J.A. Dias, E. Ogutu, E.A. Andre, J.L. Turvill and M.J. Farthing (1995). Role of 5-hydroxytryptamine type 3 receptors in rat intestinal fluid secretion induced by cholera and *Escherichia coli* enterotoxins. *Gut* 37: 340-5.

Nagy B., T.A. Casey and H.W. Moon (1990). Phenotype and genotype of *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhea in Hungary. *Journal of Clinical Microbiology* 28: 651-3.

Nelson K.L., S.M. Raja and J.T. Buckley (1997). The glycosylphosphatidylinositol-anchored surface glycoprotein Thy-1 is a receptor for the channel-forming toxin aerolysin. *Journal of Biological Chemistry* 272: 12170-4.

O'Brien A.D. and R.K. Holmes (1987). Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiological*

Review 51: 206-20.

Okamoto K., T. Baba, H. Yamanaka, N. Akashi and Y. Fujii (1995). Disulfide bond formation and secretion of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *Journal of Bacteriology* **177**: 4579-86.

Okamoto K., Y. Fujii, N. Akashi, S. Hitotsubashi, H. Kurazono, T. Karasawa and Y. Takeda (1993). Identification and characterization of heat-stable enterotoxin II-producing *Escherichia coli* from patients with diarrhea. *Microbiology and Immunology* **37**: 411-4.

Olsson E. and O. Söderlind (1980). Comparison of different assays for definition of heat-stable enterotoxigenicity of *Escherichia coli* porcine strains. *Journal of Clinical Microbiology* **11**: 6-15.

Orlandi P.A., D.R. Critchley and P.H. Fishman (1994). The heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* binds to polylactosaminoglycan-containing receptors in CaCo-2 human intestinal epithelial cells. *Biochemistry* **33**: 12886-95.

Ortega-Barria E. and M.E. Pereira (1992). Entry of *Trypanosoma cruzi* into eukaryotic cells. *Infectious Agents and Disease* **1**: 136-45.

Osek J. and M. Truszczyński (1992). Occurrence of fimbriae and enterotoxins in *Escherichia coli* strains isolated from piglets in Poland. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* **15**: 285-92.

Pacuszka T., R.M. Bradley and P.H. Fishman (1991). Neoglycolipid analogues of ganglioside GM1 as functional receptors of cholera toxin. *Biochemistry* **30**: 2563-70.

Padlan E.A. and E.A. Kabat (1991). Modeling of antibody combining sites. *Methods in Enzymology* **203**: 3-21.

Pancake S.J., G.D. Holt, S. Mellouk and S.L. Hoffman (1992). Malaria sporozoites and circumsporozoite proteins bind specifically to sulfated glycoconjugates. *Journal of Cell Biology* **117**: 1351-7.

Parkinson S.J., A.E. Alekseev, L.A. Gomez, F. Wagner, A. Terzic and S.A. Waldman (1997). Interruption of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin-induced guanylyl cyclase signaling and associated chloride current in human intestinal cells by 2-chloroadenosine. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 754-8.

Paulson J.C. (1989). Glycoproteins: what are the sugar chains for? *Trends in Biochemical Sciences* **14**: 272-6.

Peterson J.W., Y. Lu, S. Duncan, J. Cantu and A.K. Chopra (1994). Interactions of intestinal mediators in the mode of action of cholera toxin. *Journal of Medical Microbiology* **41**: 3-9.

Peterson J.W. and S.C. Whipp (1995). Comparison of the mechanisms of action of cholera toxin and the heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* **63**: 1452-61.

Picken R.N., A.J. Mazaitis, W.K. Maas, M. Rey and H. Heyneker (1983). Nucleotide sequence of the gene for heat-stable enterotoxin II of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* **42**: 269-75.

Pothoulakis C., R.J. Gilbert, C. Cladaras, I. Castagliuolo, G. Semenza, Y. Hitti, J.S. Montcrief, J. Linevsky, C.P. Kelly, S. Nikulasson, H.P. Desai, T.D. Wilkins and J.T. LaMont (1996). Rabbit sucrase-isomaltase contains a functional intestinal receptor for *Clostridium difficile* toxin A. *Journal of Clinical Investigation* **98**: 641-9.

Pothoulakis C., J.T. LaMont, R. Eglow, N. Gao, J.B. Rubins, T.C. Theoharides and B.F. Dickey (1991). Characterization of rabbit ileal receptors for *Clostridium difficile* toxin A. Evidence for a receptor-coupled G protein. *Journal of Clinical Investigation* **88**: 119-25.

Prasad Rao N.V., C.A. Wass, J. Hacker, K. Jann and K.S. Kim (1993). Adhesion of S-fimbriated *Escherichia coli* to brain glycolipids mediated by *sfaA* gene-encoded protein of S-fimbriae. *Journal of Biological Chemistry* **268**: 10356-63.

Raimondi F., J.P. Kao, J.B. Kaper, S. Guandalini and A. Fasano (1995). Calcium-dependent intestinal chloride secretion by *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin in a rabbit model. *Gastroenterology* **109**: 381-6.

Rasheed J.K., L.M. Guzman-Verduzco and Y.M. Kupersztoch (1990). Two precursors of the heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: evidence of extracellular processing. *Molecular Microbiology* **4**: 265-73.

Reisbig R., S. Olsnes and K. Eiklid (1981). The cytotoxic activity of *Shigella* toxin. Evidence for catalytic inactivation of the 60 S ribosomal subunit. *Journal of Biological*

Chemistry 256: 8739-44.

Robins-Browne R.M., T. Takeda, A. Fasano, A.M. Bordun, S. Dohi, H. Kasuga, G. Fang, V. Prado, R.L. Guerrant, G. Fang and et al. (1993). Assessment of enterotoxin production by *Yersinia enterocolitica* and identification of a novel heat-stable enterotoxin produced by a noninvasive *Y. enterocolitica* strain isolated from clinical material. *Infection and Immunity* 61: 764-7.

Rose R., S.C. Whipp and H.W. Moon (1987). Effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b on small intestinal villi in pigs, rabbits, and lambs. *Veterinary Pathology* 24: 71-9.

Saitoh T., H. Natomi, W.L. Zhao, K. Okuzumi, K. Sugano, M. Iwamori and Y. Nagai (1991). Identification of glycolipid receptors for *Helicobacter pylori* by TLC-immunostaining. *FEBS Letters* 282: 385-7.

Samuel J.E., L.P. Perera, S. Ward, O.B. AD, V. Ginsburg and H.C. Krivan (1990). Comparison of the glycolipid receptor specificities of Shiga-like toxin type II and Shiga-like toxin type II variants. *Infection and Immunity* 58: 611-8.

Sanchez J., B.E. Uhlin, T. Grundstrom, J. Holmgren and T.R. Hirst (1986). Immunoactive chimeric ST-LT enterotoxins of *Escherichia coli* generated by *in vitro* gene fusion. *FEBS Letters* 208: 194-8.

Sandvig K., S. Olsnes, J.E. Brown, O.W. Petersen and B. van Deurs (1989). Endocytosis from coated pits of Shiga toxin: a glycolipid-binding protein from *Shigella dysenteriae* type 1. *Journal of Cell Biology* 108: 1331-43.

Sauerborn M., P. Leukel and C. von Eichel-Streiber (1997). The C-terminal ligand-binding domain of *Clostridium difficile* toxin A (TcdA) abrogates TcdA-specific binding to cells and prevents mouse lethality. *FEMS Microbiological Letters* 155: 45-54.

Savarino S.J., A. Fasano, J. Watson, B.M. Martin, M.M. Levine, S. Guandalini and P. Guerry (1993). Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 3093-7.

Schmidt K.H., F. Ascencio, L.A. Fransson, W. Kohler and T. Wadstrom (1993). Studies on binding of glycosaminoglycans to *Streptococcus pyogenes* by using ¹²⁵I-

heparan sulphate as a probe. *Zentralblatt für Bakteriologie* **279**: 472-83.

Schultz S., C.K. Green, P.S. Yuen and D.L. Garbers (1990). Guanylyl cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor. *Cell* **63**: 941-8.

Sears C.L. and J.B. Kaper (1996). Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiological Reviews* **60**: 167-215.

Segrest J.P., H. De Loof, J.G. Dohlman, C.G. Brouillette and G.M. Anantharamaiah (1990). Amphipathic helix motif: classes and properties. *Proteins* **8**: 103-17.

Seidler U., I. Blumenstein, A. Kretz, D. Viellard-Baron, H. Rossmann, W.H. Colledge, M. Evans, R. Ratcliff and M. Gregor (1997). A functional CFTR protein is required for mouse intestinal cAMP-, cGMP- and Ca(2+)-dependent HCO₃⁻ secretion. *Journal of Physiology* **505**: 411-23.

Sherman, S., E. Klein and B.A. McClane (1994). *Clostridium perfringens* type A enterotoxin induces tissue damage and fluid accumulation in rabbit ileum. *Journal of Diarrhoeal Diseases Research* **12**: 200-7.

Shida K., K. Takamizawa, M. Nagaoka, T. Tsuji and T. Osawa (1994). *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin binds to glycosylated proteins with lactose by amino carbonyl reaction. *Microbiology and Immunology* **38**: 273-9.

Shida K., K. Takamizawa, T. Takeda and T. Osawa (1996). Characterization by Western blotting of mouse intestinal glycoproteins bound by *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin type I. *Microbiology and Immunology* **40**: 71-5.

Shieh M.T., D. WuDunn, R.I. Montgomery, J.D. Esko and P.G. Spear (1992). Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans. *Journal of Cell Biology* **116**: 1273-81.

Shin S.J., Y.F. Chang, M. Timour, T.L. Lauderdale and D.H. Lein (1994). Hybridization of clinical *Escherichia coli* isolates from calves and piglets in New York State with gene probes for enterotoxins (STaP, STb, LT), Shiga-like toxins (SLT-1, SLT-II) and adhesion factors (K88, K99, F41, 987P). *Veterinary Microbiology* **38**: 217-25.

Shoham M., T. Sherf, J. Anglisher, M. Levitt, E.A. Meritt and W.G. Hol (1995). Structural diversity in a conserved cholera toxin epitope involved in ganglioside binding.

Protein Science 4: 841-8.

Sixma T.K., A. Aguirre, A.C. Terwisscha van Scheltinga, E.S. Wartna, K.H. Kalk and W.G. Hol (1992). Heat-labile enterotoxin crystal forms with variable A/B5 orientation. Analysis of conformational flexibility. *FEBS Letters* **305**: 81-5.

Sixma T.K., K.H. Kalk, B.A. van Zanten, Z. Dauter, J. Kingma, B. Witholt and W.G. Hol (1993a). Refined structure of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin, a close relative of cholera toxin. *Journal of Molecular Biology* **230**: 890-918.

Sixma T.K., S.E. Pronk, K.H. Kalk, E.S. Wartna, B.A. van Zanten, B. Witholt and W.G. Hol (1991). Crystal structure of a cholera toxin-related heat-labile enterotoxin from *E. coli*. *Nature* **351**: 371-7.

Sixma T.K., P.E. Stein, W.G. Hol and R.J. Read (1993b). Comparison of the B-pentamers of heat-labile enterotoxin and verotoxin-1: two structures with remarkable similarity and dissimilarity. *Biochemistry* **32**: 191-8.

Smith J.A., D.L. Cooke, S. Hyde, S.P. Borriello and R.G. Long (1997). *Clostridium difficile* toxin A binding to human intestinal epithelial cells. *Journal of Medical Microbiology* **46**: 953-8.

Söderlind O., B. Thafvelin and R. Mollby (1988). Virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from Swedish piglets with diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology* **26**: 879-84.

Spandau D.F. and C.H. Lee (1987). Determination of the promoter strength of the gene encoding *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *Journal of Bacteriology* **169**: 1740-4.

Spangler B.D. (1992). Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiological Review* **56**: 622-47.

Spear P.G., M.T. Shieh, B.C. Herold, D. WuDunn and T.I. Koshy (1992). Heparan sulfate glycosaminoglycans as primary cell surface receptors for herpes simplex virus. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **313**: 341-53.

Spiegel S., J. Schlessinger and P.H. Fishman (1984). Incorporation of fluorescent gangliosides into human fibroblasts: mobility, fate, and interaction with fibronectin. *Journal of Cell Biology* **99**: 699-704.

Stein P.E., A. Boodhoo, G.J. Tyrrell, J.L. Brunton and R.J. Read (1992). Crystal structure of the cell-binding B oligomer of verotoxin-1 from *E. coli*. *Nature* **355**: 748-50.

Stins M.F., N.V. Prasad Rao, L. Ibric, C.A. Wass, P. Lockett and K.S. Kim (1994). Binding characteristics of S fimbriated *Escherichia coli* to isolated brain microvascular endothelial cells. *American Journal of Pathology* **145**: 1228-36.

Stromberg N., M. Ryd, A.A. Lindberg and K.A. Karlsson (1988). Studies on the binding of bacteria to glycolipids. Two species of *Propionibacterium* apparently recognize separate epitopes on lactose of lactosylceramide. *FEBS Letters* **232**: 193-8.

Sugii S. and S. Kozaki (1990). Hemagglutinating and binding properties of botulinum C2 toxin. *Biochimica et Biophysica Acta* **1034**: 176-9.

Sugimoto N., M. Takagi, K. Ozutsumi, S. Harada and M. Matsuda (1988). Enterotoxin of *Clostridium perfringens* type A forms ion-permeable channels in a lipid bilayer membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **156**: 551-6.

Sukumar M., J. Rizo, M. Wall, L.A. Dreyfus, Y.M. Kupersztoch and L.M. Gierasch (1995). The structure of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b by nuclear magnetic resonance and circular dichroism. *Protein Science* **4**: 1718-29.

Svanborg-Eden C., S. Hausson, U. Jodal, G. Lidin-Janson, K. Lincoln, H. Linder, H. Lomberg, P. de Man, S. Marild, J. Martinell and et al. (1988). Host-parasite interaction in the urinary tract. *Journal of Infectious Diseases* **157**: 421-6.

Takeda Y. (1997). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *World Health Statistics Quarterly* **50**: 74-80.

Takeda Y., T. Honda, H. Sima, T. Tsuji and T. Miwatani (1983). Analysis of antigenic determinants in cholera enterotoxin and heat-labile enterotoxins from human and porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* **41**: 50-3.

Tang G.Q., T. Iida, K. Yamamoto and T. Honda (1994). A mutant toxin of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin which has lost hemolytic activity but retains ability to bind to erythrocytes. *Infection and Immunity* **62**: 3299-304.

Teneberg S., T.R. Hirst, J. Angström and K.A. Karlsson (1994). Comparison of the glycolipid-binding specificities of cholera toxin and porcine *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin: identification of a receptor-active non-ganglioside glycolipid for the heat-labile

toxin in infant rabbit small intestine. *Glycoconjugate Journal* **11**: 533-40.

Teneberg S., I. Lonnroth, J.F. Torres Lopez, U. Galili, M.O. Halvarsson, J. Angström and K.A. Karlsson (1996). Molecular mimicry in the recognition of glycosphingolipids by Gal alpha 3 Gal beta 4 GlcNAc beta-binding *Clostridium difficile* toxin A, human natural anti alpha-galactosyl IgG and the monoclonal antibody Gal-13: characterization of a binding-active human glycosphingolipid, non-identical with the animal receptor. *Glycobiology* **6**: 599-609.

Tesh V.L. and A.D. O'Brien (1991b). The pathogenic mechanisms of Shiga toxin and the Shiga-like toxins. *Molecular Microbiology* **5**: 1817-22.

Thiaudiere E., O. Siffert, J.C. Talbot, J. Bolard, J.E. Alouf and J. Dufourcq (1991). The amphiphilic alpha-helix concept. Consequences on the structure of staphylococcal delta-toxin in solution and bound to lipids. *European Journal of Biochemistry* **195**: 203-13.

Thurin J. (1988). Binding sites of monoclonal anti-carbohydrate antibodies. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **139**: 59-79.

Tomasi M. and C. Montecucco (1981). Lipid insertion of cholera toxin after binding to GM1-containing liposomes. *Journal of Biological Chemistry* **256**: 11177-81.

Tucker K.D., P.E. Carrig and T.D. Wilkins (1990). Toxin A of *Clostridium difficile* is a potent cytotoxin. *Journal of Clinical Microbiology* **28**: 869-71.

Tucker K.D. and T.D. Wilkins (1991). Toxin A of *Clostridium difficile* binds to the human carbohydrate antigens I, X, and Y. *Infection and Immunity* **59**: 73-8.

Urban R.G., E.M. Pipper, L.A. Dreyfus and S.C. Whipp (1990). High-level production of *Escherichia coli* STb heat-stable enterotoxin and quantification by a direct enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology* **28**: 2383-8.

Vaandrager A.B., S. Schulz, H.R. De Jonge and D.L. Garbers (1993). Guanylyl cyclase is an N-linked glycoprotein receptor that accounts for multiple heat-stable enterotoxin-binding proteins in the intestine. *The Journal of Biological Chemistry* **268**: 2174-9.

van den Akker F., S. Sarfaty, E.M. Twiddy, T.D. Connell, R.K. Holmes and W.G. Hol (1996). Crystal structure of a new heat-labile enterotoxin, LT-IIb. *Structure* **4**: 665-78.

van Heyningen W.E., C.C.J. Carpenter, N.F. Pierce and W.B. Greenough III (1971). Deactivation of cholera toxin by ganglioside. *Journal of Infectious Disease* **124**.

Wada A., T. Hirayama, H. Kitaura, J. Fujisawa, M. Hasegawa, Y. Hidaka and Y. Shimonishi (1996). Identification of ligand recognition sites in heat-stable enterotoxin receptor, membrane-associated guanylyl cyclase C by site-directed mutational analysis. *Infection and Immunity* **64**: 5144-50.

Waddel T., S. Head, M. Petric, A. Cohen and C. Lingwood (1988). Globotriosyl ceramide is specifically recognized by the *Escherichia coli* verocytotoxin 2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **152**: 674-9.

Waddel T.A., A. Cohen and C. Lingwood (1990). Reconstitution of verotoxin sensitivity in receptor-deficient cell lines using the receptor glycolipid globotriosylceramide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 7898-901.

Wagner J.A., T.V. McDonald, P.T. Nghiem, A.W. Lowe, H. Schulman, D.C. Gruenert, L. Stryer and P. Gardner (1992). Antisense oligodeoxynucleotides to the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator inhibit cAMP-activated but not calcium-activated chloride currents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 6785-9.

Wandersman C. and P. Delepelaire (1990). TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 4776-80.

Weikel C.S. and R.L. Guerrant (1985). STb enterotoxin of *Escherichia coli*: cyclic nucleotide-independent secretion. *Microbial toxins and diarrhoeal disease*. R. Evered and J. Whelan. Pittman, London, Ciba Foundation Symposium. **112**: 94-115.

Weikel C.S., H.N. Nellans and R.L. Guerrant (1986b). *In vivo* and *in vitro* effects of a novel enterotoxin, STb, produced by *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Diseases* **153**: 893-901.

Weikel C.S., J.J. Sando and R.L. Guerrant (1985). Stimulation of porcine jejunal ion secretion *in vivo* by protein kinase-C activators. *Journal of Clinical Investigation* **76**: 2430-5.

- Weikel C.S., K.M. Tiemens, S.L. Moseley, I.M. Huq and R.L. Guerrant (1986a).** Species specificity and lack of production of STb enterotoxin by *Escherichia coli* strains isolated from humans with diarrheal illness. *Infection and Immunity* **52**: 323-5.
- Weingarten R., L. Ransnas, H. Mueller, L.A. Sklar and G.M. Bokoch (1990).** Mastoparan interacts with the carboxyl terminus of the alpha subunit of Gi. *Journal of Biological Chemistry* **265**: 11044-9.
- Whipp S.C. (1987).** Protease degradation of *Escherichia coli* heat-stable, mouse-negative, pig-positive enterotoxin. *Infection and Immunity* **55**: 2057-60.
- Whipp S.C. (1990).** Assay for enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable toxin b in rats and mice. *Infection and Immunity* **58**: 930-4.
- Whipp S.C. (1991).** Intestinal responses to enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable toxin b in non-porcine species. *American Journal of Veterinary Research* **52**: 734-7.
- Whipp S.C., E. Kokue, R.W. Morgan, R. Rose and H.W. Moon (1987).** Functional significance of histologic alterations induced by *Escherichia coli* pig-specific, mouse-negative, heat-stable enterotoxin (STb). *Veterinary Research Communications* **11**: 41-55.
- Whipp S.C., H.W. Moon and R.A. Argenzio (1981).** Comparison of enterotoxic activities of heat-stable enterotoxins from class 1 and class 2 *Escherichia coli* of swine origin. *Infection and Immunity* **31**: 245-51.
- Whipp S.C., H.W. Moon, L.J. Kemeny and R.A. Argenzio (1985).** Effect of virus-induced destruction of villous epithelium on intestinal secretion induced by heat-stable *Escherichia coli* enterotoxins and prostaglandin E1 in swine. *American Journal of Veterinary Research* **46**: 637-42.
- Whipp S.C., S.L. Moseley and H.W. Moon (1986).** Microscopic alterations in jejunal epithelium of 3-week-old pigs induced by pig-specific, mouse-negative, heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin. *American Journal of Veterinary Research* **47**: 615-8.
- Wilmsen H.U., K.R. Leonard, W. Tichelaar, J.T. Buckley and F. Pattus (1992).** The aerolysin membrane channel is formed by heptamerization of the monomer. *EMBO Journal* **11**: 2457-63.
- Wilson R.A. and D.H. Francis (1986).** Fimbriae and enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with colibacillosis. *American Journal of*

Veterinary Research 47: 213-7.

Wnek A.P. and B.A. McClane (1986). Comparison of receptors for *Clostridium perfringens* type A and cholera enterotoxins in isolated rabbit intestinal brush border membranes. *Microbial Pathogenesis* 1: 89-100.

Wnek A.P. and B.A. McClane (1989). Preliminary evidence that *Clostridium perfringens* type A enterotoxin is present in a 160,000-Mr complex in mammalian membranes. *Infection and Immunity* 57: 574-81.

Wold A.E., M. Thorssen, S. Hull and C.S. Eden (1988). Attachment of *Escherichia coli* via mannose- or Gal alpha 1----4Gal beta-containing receptors to human colonic epithelial cells. *Infection and Immunity* 56: 2531-7.

Woodward M.J., R. Kearsley, C. Wray and P.L. Roeder (1990). DNA probes for the detection of toxin genes in *Escherichia coli* isolated from diarrhoeal disease in cattle and pigs. *Veterinary Microbiology* 22: 277-90.

Woodward M.J. and C. Wray (1990). Nine DNA probes for detection of toxin and adhesin genes in *Escherichia coli* isolated from diarrhoeal disease in animals. *Veterinary Microbiology* 25: 55-65.

WuDunn D. and P.G. Spear (1989). Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *Journal of Virology* 63: 52-8.

Yamamoto T., N. Wakisaka, F. Sato and A. Kato (1997). Comparison of the nucleotide sequence of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 genes among diarrhea-associated *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* 147: 89-95.

Yamanaka H., M. Kameyama, T. Baba, Y. Fujii and K. Okamoto (1994). Maturation pathway of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin I: requirement of DsbA for disulfide bond formation. *Journal of Bacteriology* 176: 2906-13.

Yang Z., J. Bergstrom and K.A. Karlsson (1994). Glycoproteins with Gal alpha 4Gal are absent from human erythrocyte membranes, indicating that glycolipids are the sole carriers of blood group P activities. *Journal of Biological Chemistry* 269: 14620-4.

Yoh M., N. Morinaga, M. Noda and T. Honda (1995). The binding of *Vibrio parahaemolyticus* ¹²⁵I-labeled thermostable direct hemolysin to erythrocytes. *Toxicon* 33: 651-7.

Yu J., H. Webb and T.R. Hirst (1992). A homologue of the *Escherichia coli* DsbA protein involved in disulphide bond formation is required for enterotoxin biogenesis in *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology* **6**: 1949-58.

Zemelman B.V., S.H. Chu and W.A. Walker (1989). Host response to *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin via two microvillus membrane receptors in the rat intestine. *Infection and Immunity* **57**: 2947-52.

Zielinski G.C. and R.F. Ross (1993). Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine ciliated respiratory tract cells. *American Journal of Veterinary Research* **54**: 1262-9.

VI. ANNEXES

Annexe 1 : Binding of *Escherichia coli* enterotoxin b (STb) to lipids isolated
from pig jejunum brush border epithelial cells and mucus

J. D. Dubreuil, E. Rousset & J. Harel

Proc. 8th ETOX, Hacker *et al.*, (Eds.), Bacterial Protein Toxins : p 136-137,
Zentralblatt für Bakteriologie, Suppl. 29, 1998.

Binding of *Escherichia coli* Enterotoxin b (Stb) to Lipids Isolated from Pig Jejunum Brush Border Epithelial Cells and Mucus

Dubreuil, J. D., Rousset, E. and Harel, J.

Departement de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, 3200 Rue Sicotte, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6

OVERVIEW

Enterotoxigenic *Escherichia coli* cause disease in man and animals by elaboration of heat-labile and heat-stable toxins. These enterotoxins alter normal intestinal homeostasis causing water, ions secretion and diarrhea. One of these toxins, the heat-stable enterotoxin b (STb) is a 48 amino acid peptide that is responsible for severe diarrhea in weaning piglets (1). STb, as was shown for other toxins, most probably recognizes and binds to a specific molecule present on the surface of intestinal epithelial cells (2). We investigated the characteristics governing the recognition and binding processes of STb to the pig intestinal tissue and the chemical nature of the molecule involved.

in vitro BINDING ASSAY/BINDING CHARACTERISTICS OF STb

We developed a semi-quantitative *in vitro* assay involving fluorescence microscopy to assess binding of STb to pig tissues. STb was biotinylated using sulfosuccinimidyl-6-(biotinamido)-hexanoate (Calbiochem) as recommended by the manufacturer. Biotinylated toxin retained its full toxicity compared to unmodified STb as demonstrated in rat loop assay (3). As STb was shown, by our group, to induce a more consistent secretory response in pig jejunum, binding to this tissue was particularly studied. Thus, frozen sections of pig jejunum were done using a cryostat and fixed to glass slides on which the binding assay was performed. The binding of biotinylated toxin was revealed using a streptavidin-fluoroisothiocyanate conjugate. We demonstrated that, using this system, the conjugate alone did not interact with the pig tissues. In addition, denatured biotinylated STb (100°C/ 15 min) or 2-mercaptoethanol treated toxin could no longer bind to the jejunum.

The conditions required to obtain a consistent observable binding of STb to the pig jejunum were determined. No competition, even at 100-fold molar excess of native STb was observed indicating probably that the binding was unsaturable. On the other hand, the binding was rapid occurring within minutes. Binding was observed to jejunal crypts and villi. The reaction was temperature independent between 4 and 37°C and ions like Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Cl⁻ (10 mM) and Na⁺ (150 mM) or the presence of EDTA did not affect the binding. However, the binding was pH dependent and showed a maximum around pH 6. Other pig tissues sections tested including liver, lung, spleen, kidney, duodenum, ileum, caecum and colon demonstrated binding of STb to a certain degree.

CHEMICAL NATURE OF THE BINDING MOLECULE

Chemicals and enzymes were used to treat pig jejunum sections in order to resolve the chemical nature of the binding molecule. When the tissue sections were treated with organic solvents known to displace lipids (methanol-chloroform), binding of STb was abrogated. Proteolytic enzymes did not, however, affect the binding indicating that proteins were not involved in this reaction. Sodium metaperiodate, a chemical cleaving the C-C bonds between adjacent hydroxyl groups of sugars, abolished the binding of STb indicating that sugar moieties could be involved in the process. Glycosidases with definite specificities were used to pin-point the peculiar sugar(s) recognized by the toxin. Out of a battery of enzymes tested, neuraminidase completely abrogated binding while ceramide glycanase and alpha-glucosidase greatly reduced the binding.

BINDING OF STb TO EPITHELIAL CELL EXTRACTED LIPIDS AND TO MUCUS

As the study with whole jejunal sections indicated a lipidic nature for the binding molecule, a total lipid extraction from scraped epithelial cells was done using the method of Folch (4). As expected, STb showed affinity for this extract shown to contain no protein. Using a multiplate enzyme-linked immunosorbent binding assay (5), we measured the affinity of adsorbed commercially available lipids and glycosphingolipids to STb. GD1a, GT1b and sulfatides (Fig. 1) (ceramide containing molecules) were binding STb whereas no binding to ceramide was observed (data not shown). Mucus freshly recovered as described by Waddell *et al* (6) from pig jejunum was tested for STb binding. Using SDS-PAGE and overlay binding, we observed a band of low Mr (<15 kDa) to which STb was binding. This band was not stained with Coomassie blue and was extracted by methanol-chloroform indicating most probably a lipidic nature.

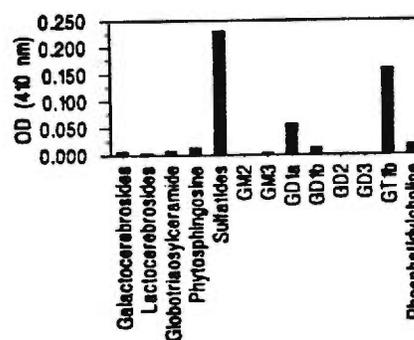


Figure 1. Binding of STb toxin (1 μ g) to commercially available lipids (5 μ g) coated in methanol as revealed using a multiplate enzyme-linked immunosorbent binding assay.

REFERENCES

1. Dubreuil, J.D. (1997). *Escherichia coli* STb enterotoxin. A review. *Microbiology* **143**, 1783-1795.
2. Sears, C.L. and Kaper, J.B. (1996). Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol. Rev.* **60**, 167-215.
3. Dubreuil, J.D., Fairbrother, J.M., Lallier, R. and Larivière, S. (1991). Production and purification of heat-stable enterotoxin b from a porcine *Escherichia coli* strain. *Infect. Immun.* **59**, 198-203.
4. Folch, J., Lees, M. Sloane Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497-509.
5. Lindberg, A.A., Brown, J.E., Strömberg, N., Westling-Ryd, M., Schultz, J.E., Karlsson, K.-A. (1987). Identification of the carbohydrate receptor for shiga toxin produced by *Shigella dysenteriae* type 1. *J. Biol. Chem.* **262**, 1779-1785.
6. Waddell, T.E., Lingwood, C.A., Gyles, C.L. (1996). Interaction of verotoxin 2e with pig intestine. *Infect. Immun.* **64**, 1714-1719.

Annexe 2 : Does *Escherichia coli* STb enterotoxin bind to sulfatides?

E. Rousset & J. D. Dubreuil

Proceeding du 15^{ème} congrès d'IPVS

(International Pig Veterinary Society, 1998)

DOES *ESCHERICHIA COLI* STb ENTEROTOXIN BIND TO SULFATIDES ?

E. Rousset, J.D. Dubreuil

GREMIP, Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6

Introduction

Porcine enterotoxic colibacillosis can originate from two distinct types of enterotoxin delineated by their heat stability characteristic. The heat-labile enterotoxins (LT) are oligomeric toxins with structural and functional similarities to cholera toxin. The heat-stable enterotoxins (STa and STb) are low-molecular-mass toxins that can be incubated at 100°C for 30 min without affecting their toxic activity. STb is a 48-amino-acid basic peptide with two disulfide bonds of which the integrity is critical for biological activity. *In vitro* experiments using several cell lines of intestinal and non intestinal origin indicated that STb activates a G protein (G₁₃) resulting in calcium ion entry through a ligand-gated calcium ion channel. The increase of Ca²⁺ concentration could stimulate arachidonic acid release from membrane phospholipids. *In vivo*, addition of STb results in a dose-dependent rise in arachidonic acid level and subsequent release of prostaglandin E₂, a known secretagogue. The toxin also mediates the release of 5-hydroxytryptamine involved in secretion. However, a target cell surface receptor for STb has not been elucidated (1). We have investigated the initial binding of STb to porcine intestinal epithelial cells and mucus. A preliminary characterization of the molecule involved was performed (2). We now report on molecules found in total lipid extracts, that *in vitro* shows high binding capacity toward STb.

Materials and methods

STb and glycoconjugates: STb was produced and purified to homogeneity using an *E. coli* recombinant strain harboring the pMalp-STb plasmid as already described (3). Pure sulfatide (or sulfogalactosylceramide) and galactosylceramide were from Sigma.

Preparation and lipid extraction of pig jejunal epithelial cells and mucus: Pathogen-free pigs 8-weeks old who had fasted for 24 h were euthanized. Crude mucus was prepared from the jejunum by gently scraping the mucosa with a rubber policeman. The sample was centrifuged (27,000 x g/min) and the supernatant was filter sterilized (0,22 µm). The epithelial cells were obtained by scraping the mucosa with a microscope slide, and homogenized for 5 min with a tissue grinder. Total lipid of either mucus or epithelial cells was extract using the method of Folch (4).

PVDF binding assay after electrophoresis: Samples were separated using either SDS-PAGE 12% or high density Phastgel® (Pharmacia). The separated material was transferred to PVDF membrane. STb at 0.5 µg in 50 µl/cm² was then overlaid and revealed using anti-STb antibodies. Alternatively, gels were stained using either Coomassie blue or silver.

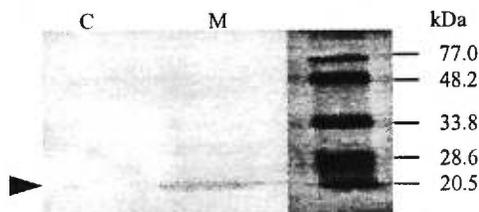


Figure 1. Preparations of pig jejunal epithelial cells (C), and mucus (M), molecular weights standards (kDa) separated using a SDS-PAGE 12%, transferred on PVDF membrane and overlaid with STb toxin.

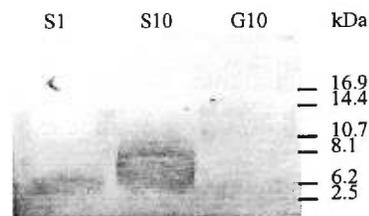


Figure 2. Pure glycolipids separated by high-density Phastgel®, transferred on PVDF membrane and overlaid with STb toxin. Lanes contain: 1 µg of sulfatide (S1); 10 µg of sulfatide (S10); 10 µg of galactosylceramide (G10).

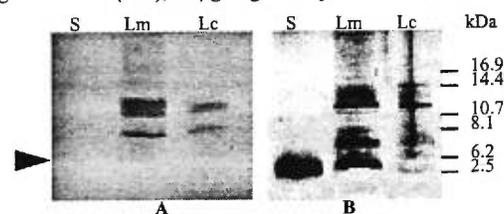


Figure 3. Pure sulfatide (S), pig jejunal epithelial cell lipid extract (Lc) and mucus lipid extract (Lm) separated by high-density Phastgel®, stained with either Coomassie blue (A) or silver (B).

Results and discussion

Binding of STb toxin to pig jejunum preparations after electrophoresis: The PVDF membrane, which is available for blotting both lipids and proteins (5) was used for STb overlay binding assays. Pig jejunal epithelial cells and mucus preparations demonstrated one band in the front of the gel binding STb toxin (Fig. 1).

Binding of STb toxin to pure sulfatide on SDS-PAGE: As pure sulfatide was assumed to bind STb with the highest affinity among a variety of glycolipids (2), we investigated its electrophoretic migration pattern. Technical difficulties encountered when several pure glycolipids were separated by SDS-PAGE lead us to develop a method using high density Phastgel®, which is usually performant in separation of peptides. We confirmed that STb bound avidly to sulfatide (Fig. 2). The binding was dose-dependent, whereas no binding was observed with an apparent glycolipid lacking the sulfate group, the galactosylceramide.

Preliminary characterization of the STb binding component isolated from pig jejunum: Total lipid extracts from pig jejunum preparations were separated using high density Phastgel®, and compared with sulfatide (Fig. 3). The lowest band in the lipid extracts migrated approximately at 6.2kDa, similarly to sulfatide. Interestingly, this band, as sulfatide, was detected after silver nitrate staining, but not with Coomassie blue which is a specific dye for protein. Taken together, these data suggest that this band correspond to sulfatide or at least a lipidic molecule with similar biochemical characteristics.

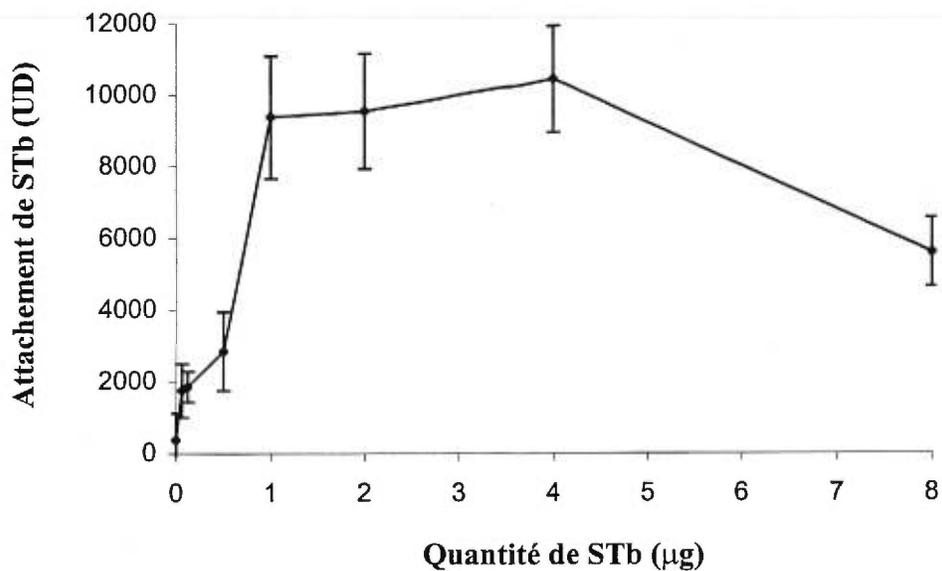
In conclusion, sulfatide is a candidate target molecule for STb binding to initiate its enterotoxic mechanism. Further studies using classical methods in lipidology and in ligand-receptor binding would be helpful to determine if sulfatide is the only receptor for STb found in the jejunum.

References :

1. Dubreuil, J.D. (1997) *Escherichia coli* STb enterotoxin. A review. *Microbiology*, **143**,1783-1795.
2. Dubreuil, J.D., Rousset, E., Harel, J. (1998) Binding of *Escherichia coli* enterotoxin b (STb) to lipids isolated from pig jejunum brush border epithelial cells and mucus. 8th ETOX Proceeding.
3. Bossé, M., Handl, C.E., Lortie, L.A., Harel, J., Dubreuil, J.D. (1993) Fusion of the genes encoding *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b (STb) and the maltose binding protein to obtain mature STb enterotoxin. *J. Gen. Microbiol.*, **139**,631-638.
4. Folch, J. Lees, M. Sloane Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**,497-509.
5. Taki, T., Handa, S., Ishikawa, D. (1994) Blotting of glycolipids and phospholipids from a high-performance thin-layer chromatogram to a polyvinylidene difluoride membrane. *Anal. Biochem.*, **221**,312-316.

Annexe 3 : Graphiques représentant l'attachement dose-dépendant et saturable de la toxine STb avec le sulfatide

A.



B.

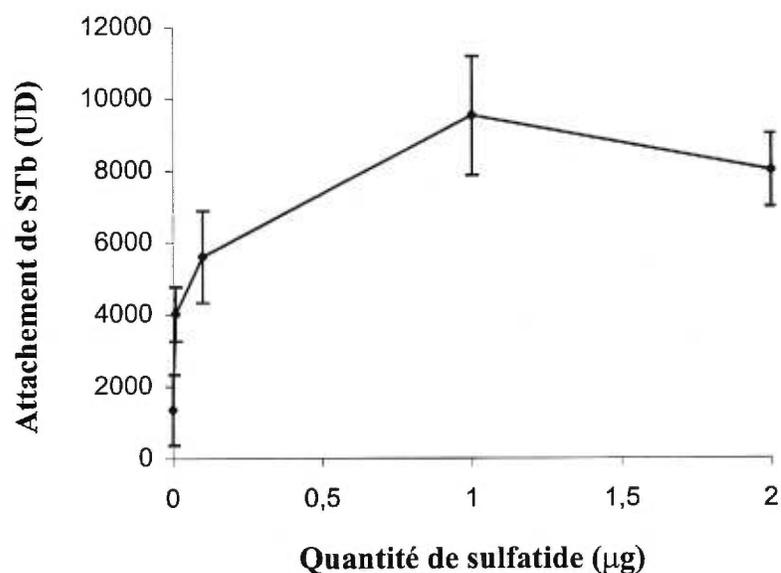


Fig. 1. Attachement de la toxine STb au sulfatide préalablement déposé sur membrane de PVDF (polyvinylidène difluoride). Le niveau d'attachement de STb avec le sulfatide a été mesuré par analyse densitométrique (UD, unité densitométrique). A : STb en quantités croissantes (0 à 8 µg par ml) en fonction d'une quantité fixe de sulfatide (1 µg). B : STb en quantité fixe (1 µg/ml) en fonction de quantités croissantes de sulfatide (0,001 à 2 µg).