

Université de Montréal

Étude de l'attachement de l'entérotoxine STb d'Escherichia coli à son  
récepteur cellulaire et du mécanisme d'action suivant cet attachement au  
récepteur

Par

Vincent Labrie

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de

Philosophiae Doctor (Ph.D.)

en science vétérinaire

option microbiologie

Août 2001

©Vincent Labrie, 2001



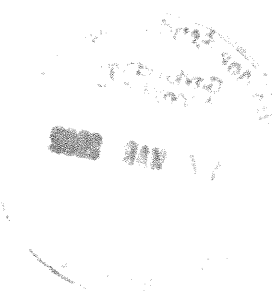
SF

607

U54

2002

v.004



Université de Montreal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Étude de l'attachement de l'entérotoxine STb d'*Escherichia coli*  
à son récepteur cellulaire et du mécanisme d'action suivant cet attachement au  
récepteur

Présenté par:

Vincent Labrie

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Mario Jacques,  
Président-rapporteur

Dr J.Daniel Dubreuil,  
Directeur de recherche

Dre Josée Harel,  
Co-directrice de recherche

Dr Sylvain Quessy,  
Membre du jury

Dr Michel Frenette,  
Examineur externe

Dr Serge Messier,  
Représentant de la FES

Thèse acceptée le 5 Février 2002

**SOMMAIRE**

L'entérotoxine thermostable b (STb) produite par *Escherichia coli* entérotoxigène (ETEC) est responsable du déséquilibre électrolytique intestinal menant à la diarrhée. STb est un polypeptide basique de 48 acides aminés avec une masse moléculaire de 5.2 kDa et un point isoélectrique de 9.6. La structure 3D de STb obtenue lors d'études en résonance magnétique nucléaire révèle deux hélices  $\alpha$  antiparallèles, l'une amphipathique et l'autre hydrophobe, séparées par une boucle riche en glycine. La structure de STb est stabilisée par la présence de deux ponts disulfures aux extrémités des hélices. Le sulfatide (SFT) a été démontré comme étant un récepteur fonctionnel de STb.

L'attachement de STb au récepteur fonctionnel SFT représente la première étape du processus sécrétoire causant la diarrhée. Jusqu'à maintenant, rien n'était connu sur les acides aminés de STb impliqués dans l'attachement et peu sur ceux impliqués dans l'entérotoxicité. Dix-sept mutants ponctuels de la toxine STb ont été produits et purifiés. L'entérotoxicité de ces 17 mutants a été déterminée par un essai dans les anses intestinales ligaturées chez le rat alors que l'attachement au SFT a été évalué à l'aide d'un essai de liaison en microplaque. Les interactions hydrophobes et électrostatiques sont importantes pour l'attachement de STb. Des mutations (F37K, I41S et M42S) introduites dans l'hélice  $\alpha$  hydrophobe présentant une hydrophobicité réduite ont diminué d'environ 85% l'activité de liaison au SFT et l'entérotoxicité. La boucle C<sub>21</sub> –C<sub>36</sub> a également contribué à la liaison au SFT. Nous avons observé une réduction des activités de liaison au SFT et entérotoxiques pour des mutants produits au niveau des acides aminés basiques (K22, K23 et R29) de cette boucle.

Nous avons aussi démontré pour la première fois la propriété de STb à former des hexamères et heptamères de façon indépendante de la température, en présence ou en absence de son récepteur (SFT) libre ou ancré dans un liposome. L'intégrité de la structure de STb est nécessaire puisqu'il n'y a pas eu oligomérisation en condition réductrice. Les traitements de STb à la tétraméthylurée (TMU) et différents détergents ont inhibé l'oligomérisation. Les mutants F37K, I41S et M42S n'ont pu former des oligomères. Donc, les acides aminés hydrophobes F37, I41 et M42 semblent être impliqués dans l'oligomérisation.

À l'aide d'un essai avec un anticorps anti-STb marqué à l'or suivi d'une visualisation en microscopie électronique, nous avons observé *in vivo* les événements suivant l'attachement de STb aux cellules épithéliales d'intestin de rat. Les données obtenues suggèrent que la toxine STb et la protéine de fusion MBP-STb sont internalisées tandis que la toxine mutée I41E-M42R ayant un profil d'hydrophobicité réduit n'a pas été internalisé. Dans notre étude, aucune organelle cellulaire semble particulièrement visée par la toxine.

En conclusion, ces données suggèrent qu'il y a une oligomérisation de STb via son hélice  $\alpha$  hydrophobe correspondant à l'attachement STb-STb. La boucle C<sub>21</sub> -C<sub>36</sub> de STb est impliquée dans la liaison au SFT et suivant cet attachement d'un oligomère de STb au SFT, il y a une étape d'internalisation de STb.

**Mots clés :** *Escherichia coli*, entérotoxine STb, oligomérisation, récepteur, sulfatide, internalisation

## SUMMARY

The heat-stable enterotoxin b (STb) secreted by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) causes net fluid and electrolyte secretion leading to animal diarrhea. STb is a 48-amino acids polypeptide having a molecular mass of 5.2 kDa and an isoelectric point of 9.6. As revealed by nuclear magnetic resonance, the STb structure possess two antiparallel  $\alpha$  helix, one amphipathic facing the other hydrophobic and both separated by a glycine rich loop. The STb structure is stabilized by two disulfide bridges at the end of both helix. The sulfatide (SFT) has been shown to be a functional receptor for STb.

Binding of STb to the functional receptor SFT constitutes the first step in inducing secretory diarrhea in intestinal lumen of animals. Until now, nothing was known about STb amino acids involved in attachment and few things was known about those involved in enterotoxicity. Seventeen site-specific mutants of STb toxin were produced and purified. Enterotoxicity of the 17 mutants was determined using a rat loop assay and binding was evaluated using a microtiter plate binding assay. Both hydrophobic and electrostatic interactions are important for STb attachment. When mutations (F37K, I41S and M42S) were introduced into the hydrophobic  $\alpha$ -helix to lessen hydrophobicity, binding activity and enterotoxicity decreased by more than 6-fold. The loop defined by C21 and C36 also made specific contributions. Mutants generated at basic residues (K22, K23 and R29) within this region exhibited both reduced binding activities and reduced toxic activities.

We also report for the first time on STb property to forms hexamers and heptamers in a temperature independent fashion in presence or absence of its receptor (SFT) anchored in a 50 nm liposome or as a free molecule. Full STb structure integrity is necessary for its oligomerization as this process is not observed under reducing condition in presence of  $\beta$ -mercaptoethanol. STb treatment with tetramethylurea (TMU) and different detergents prevented oligomerization. Using mutants F37K, I41S and M42S resulted in the incapacity to form oligomers. Thus, amino acids F37, I41 and M42 seem to be involved in oligomerization.

The fate of STb bound to rat intestinal epithelium cells was followed using an anti-toxin gold labeled assay and transmission electron microscopy. The data suggest that STb toxin and the fusion protein MBP-STb were internalized whereas its mutant I41E-M42R with reduced hydrophobicity did not show internalization. No subcellular compartment seems to be particularly targeted.

Taken together, these data suggest there is an oligomerization of STb through its C-terminal hydrophobic  $\alpha$ -helix corresponding to a STb-STb inter-binding. The STb loop seems to be involved in SFT binding and following the attachment of a STb oligomer to SFT, there is an internalization step of STb.

**Keywords:** : *Escherichia coli*, enterotoxin STb, oligomérisation, sulfatide receptor, internalization



## TABLE DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY	ii
SOMMAIRE	iii
SUMMARY	vi
TABLE DES MATIÈRES	viii
LISTE DES TABLEAUX	xi
LISTE DES FIGURES	xii
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	xvi
DÉDICACE	xix
REMERCIEMENTS	xx
<b>I. INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>II. REVUE DE LITTÉRATURE</b>	<b>4</b>
1. <i>Escherichia coli</i>	5
1.1 Généralités	5
1.2 Classification	5
1.3 Diarrhée colibacillaire	7
2. Entérotoxines	7
2.1. Généralités	7
2.2. Classification	7
2.3. Entérotoxine STb	8
2.3.1. Prévalence	8
2.3.2. Structure et caractéristiques	10
2.3.3. Biogenèse	13
2.3.4. Génétique	15
2.3.5. Mutagenèse	16
2.3.6. Mode d'action	19
2.3.6.1. Attachement	19
2.3.6.2. Mécanisme	20
3. Oligomérisation	23

3.1. L'antigène protecteur de <i>Bacillus anthracis</i>	23
3.2. L' $\alpha$ toxine de <i>Staphylococcus aureus</i>	24
3.3. L'aérolysine d' <i>Aeromonas hydrophila</i>	24
3.4. La toxine diphtérique de <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	25
3.5. La $\delta$ toxine de <i>Staphylococcus aureus</i>	26
4. Canaux membranaires	26
4.1 Généralités	26
4.1.1 Bicouche lipidique planaire (PLB)	27
4.1.2 Taille du pore	28
4.1.3 Effets de la charge du pore	28
4.1.4 Barrière de canal	29
4.2 Canaux potassiques	30
4.3 Canaux calciques	31
4.4 Autres canaux	32
4.5 Toxines formant des pores membranaires	33
4.5.1 L' $\alpha$ toxine de <i>Staphylococcus aureus</i>	33
4.5.2 L'aérolysine d' <i>Aeromonas hydrophila</i>	33
4.5.3 L'endotoxine cristalline de <i>Bacillus thuringiensis</i>	34
4.5.4 Les toxines RTX	35
4.5.5 La $\delta$ toxine de <i>Staphylococcus aureus</i>	36
<b>III. MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS</b>	<b>38</b>
Article 1: Binding to sulfatide and enterotoxicity of various <i>Escherichia coli</i> STb mutants. V. Labrie, H.-E. Beausoleil, J. Harel & J.D. Dubreuil. (2001). Microbiology. sous presse.	39
Article 2: Oligomerization of <i>Escherichia coli</i> enterotoxin b through its C-terminal hydrophobic $\alpha$ -helix. Labrie V., J. Harel and J. D. Dubreuil (2001). Biochimica et Biophysica Acta 1535: 128-133	63
Article 3: : <i>Escherichia coli</i> heat-stable enterotoxin b (STb) <i>in vivo</i> internalization within rat intestinal epithelial cells. V. Labrie, J. Harel & J.D. Dubreuil. (soumis)	81

<b>IV. DISCUSSION</b>	94
Conclusions	104
<b>V. BIBLIOGRAPHIE</b>	105
<b>VI. ANNEXES</b>	xxi
 Annexe 1: Functional analysis of <i>Escherichia coli</i> STb enterotoxin binding to sulfatide using site-directed mutagenesis. V. Labrie, H.-E. Beausoleil, J. Harel and J. D. Dubreuil. Proceeding du 9 <sup>ème</sup> congrès d'ETOX (European Workshop Conference on Bacterial Protein Toxin, 2000)	xxii
 Annexe 2: Trypan blue uptake by chinese hamster ovary cultured epihelial cells : a cellular model to study <i>Escherichia coli</i> STb enterotoxin. H.-E. Beausoleil, V. Labrie & J.D. Dubreuil. Toxicon. sous presse, 2001.	xxv
 Annexe 3: Relation courant-voltage de la toxine STb en PLB	xlviii

## LISTE DES TABLEAUX

### II. REVUE DE LITTÉRATURE

Tableau 1. Activité de différents mutants de substitution chez STb	18
Tableau 2. Concentration en ions libres et potentiels d'équilibre pour le muscle squelettique de mammifère	27
Tableau 3. Propriétés des canaux formés par des toxines bactériennes dans des membranes lipidiques	35

### III. MATERIEL, METHODES ET RESULTATS

#### Article 1.

Table 1. Synthetic <i>est B</i> mutagenic primers used in this study.	59
---	----

#### Article 2.

Table 1. Biological activity of STb mutants as determined in previous studies.	59
--	----

#### Article 3.

Table 1. Internalization of STb toxin (A) and mutant I41E-M42R (B) within rat jejunal epithelial cell as revealed with anti-STb labeled with gold particles	90
---	----

### V. ANNEXES

#### Annexe 2.

Table 1: STb mutants used in this study	xlv
---	-----

## LISTE DES FIGURES

### II. REVUE DE LITTERATURE

- Figure 1. Séquence primaire et arrangement des deux ponts disulfures (SS) de l'entérotoxine STb mature. La numérotation des acides aminés reflète l'élimination des 23 premiers acides aminés de la séquence signal conférant ainsi la position 1 à la première sérine. En souligné: les acides aminés hydrophobes. **En gras**: les acides aminés hydrophobes. Les étoiles ★ représentent les acides aminés pour lesquels des mutants ont déjà été obtenus par d'autres groupes de recherche (voir tableau # 1). 10
- Figure 2. Représentation tridimensionnelle de l'entérotoxine STb, modifiée de Sukumar *et al.*, (1995). 12
- Figure 3. Sulfatide 19
- Figure 4. Mécanisme d'action de STb 21

### III. MATERIEL, METHODES ET RESULTATS

#### Article 1.

- Figure 1. Amino acid sequence of mature STb enterotoxin. Cys-10 to Lys-23 represents the stretch forming the amphipathic  $\alpha$ -helix and Gly-38 to Ala-44 represents the hydrophobic  $\alpha$ -helix. Bold letters represent amino acids targeted for mutagenesis. 60

- Figure 2. HPLC chromatograms at 220 nm of purified STb and selected mutants. **A**, mutant I41E-M42R representing the group losing hydrophobicity upon mutation. **B**, native STb. **C**, mutant K22A-K23A representing the group acquiring hydrophobicity upon mutation. Polypeptides were eluted with a gradient of acetonitrile containing 0.1% trifluoroacetic acid using a reverse-phase C<sub>8</sub> microbore column. 61
- Figure 3. Relative binding to sulfatide (grey box) and enterotoxicity (white box) of various STb mutants compared to STb native toxin. Left box shows the results obtained for substitutions in the loop. Right box, substitutions introduced in the C-terminal hydrophobic  $\alpha$ -helix. STb binding to sulfatide and enterotoxicity was taken as 100% and relative activity of the mutants calculated as a percentage. No experiments on biological activity was done for mutant D30V and F37D. The standard deviations are shown. Mutants significantly different from STb were determined using the statistical Student's *t* test. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ . 62
- Article 2.
- Figure 1. Amino acid sequence of mature STb enterotoxin. Cys-10 to Lys-23 and Gly-38 to Ala-44 represent respectively the stretch forming the amphipathic  $\alpha$ -helix and the hydrophobic  $\alpha$ -helix. Bold letters represent amino acid residues targeted for mutagenesis. 76
- Figure 2. Oligomerisation of STb toxin. Samples were separated on 15% gel and visualized by Western-blot. STb cross-linked in the presence of a 75-fold molar excess of BS<sup>3</sup> (condition used in all experiments) (lane 1), a 25-fold molar excess of BS<sup>3</sup> (lane 2), 0.5 mg/ml sulfatide (lane 3), and 2 mg/ml sulfatide containing liposome (lane 4). 77
- Figure 3. Chemical cross-linking reactions done in presence of 5%  $\beta$ -mercaptoethanol (21°C) or in absence of 5%  $\beta$ -mercaptoethanol at 4, 21, 37, and 56°C. 78

- Figure 4. Effect of TMU and different detergents on STb oligomerization. 79
- Figure 5. Oligomerization of different STb mutants using (A) chemical cross-linking reaction or using (B) the dot blot overlay assay. The presence of STb-STb interaction(+) or its absence(-) were noted. 80

### Article 3.

- Figure 1. Distribution within epithelial cells of rat intestine of STb toxin as detected by gold labeled anti-STb. A and B represent PBS negative controls whereas C and D are STb-treated rat intestine. In A and C, intestinal microvilli are shown whereas in B and D, we can observe intracellular compartments. Bars = 10 nm. 90

## **IV. DISCUSSION ET CONCLUSION**

- Shéma 1. Modèle proposé du mécanisme d'action de la toxine STb 100

## **V. ANNEXES**

### Annexe 1.

- Figure 1. Amino acid sequence of mature STb toxin with disulfide bonds position. In bold, the mutated amino acids. xxiii
- Figure 2. Relative binding to SFT of STb and mutants using MPBA. Mutants are indicated using the one-letter code for amino acids. xxiv

### Annexe 2.

Figure 1. a) Dye uptake for STb-treated cells line. Each cell lines : A-549 (□), CHO (◆), HT-29 (■), IEC-18 (●) and PK-1 (○) were treated with 4 μg of STb toxin for 10<sup>6</sup> cells. The trypan blue dye intake by cells was measured over time as described in Material and Methods. b) Effect of the concentration of STb on dye uptake by CHO cells (b). The trypan blue dye intake by CHO cells, incubated with different concentration of STb toxin (2 μg:○, 4 μg:● and 8 μg: ■), was measured over time. Values represent averages of at least three experiments. Standard deviations for CHO cell line are indicated.

xlv

Figure 2 : Comparison between the percentage of enterotoxicity (black bar) in the rat loop assay and dye uptake (white bar) in the CHO cells for the 16 STb mutants tested (Table 1). All values were adjusted on the basis of results obtained for native STb toxin, which was arbitrarily set to 100% for both assays. Standard deviations from mean of at least three experiments is indicated.

xlvi

Figure 3 : Regression curve between the rat loop assay and the trypan blue dye uptake assay in CHO cells. Each dot represents a mutant. The bold line represent the experimental curve and the plain line represent the theoretical curve. The equation for the experimental curve and the R<sup>2</sup> coefficient are shown.

xlvii

### Annexe 3.

Figure 1 : Current-voltage relation of STb toxin

1



## LISTE DES SIGLES ET ABBREVIATIONS

5-HT	5-hydroxytryptamine ou sérotonine
Å	Ångström
AE	anhydride ethoxyformique
AEEC	<i>Escherichia coli</i> attachants effaçants
AM	anhydride maléique
AMPC	adénosine monophosphate cyclique
APN	aminopeptidase N
BFP	bundle-forming pili
BS <sup>3</sup>	bis (sulfosuccinimidyl) suberate
C <sub>8</sub> Glc	<i>n</i> -octylglucoside
CaMK II	protéine kinase II Ca <sup>2+</sup> -calmoduline-dependante
CCCP	carbonylcyanide- <i>m</i> -chlorophenylhydrazone
CD	dichroïsme circulaire
CFA	colonizing factor antigen
CFTR	récepteur transmembranaire de la mucovidose ( ou fibrose kystique)
CHAPS	acide cholique sulfobetaine
CRP	protéine de répression catabolique
Cry	δ-endotoxine cristalline de <i>Bacillus thuringiensis</i>
CSA	<i>coli</i> surface antigen
DPPC	dodecylphosphocholine
<i>E coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	<i>Escherichia coli</i> entéroadhérentes
EAR	erythrocyte aerolysin receptor
ECL	“enhanced chemiluminescence”, chimioluminescence intensifiée
EF	facteur d’œdème de <i>Bacillus anthracis</i>
EHEC	<i>Escherichia coli</i> entéro-hémorragiques
EIEC	<i>Escherichia coli</i> entéroinvasives
ELISA	“enzyme-linked immunosorbent assay”, essai immunoenzymatique
EPEC	<i>Escherichia coli</i> entéro-pathogènes

ETEC *Escherichia coli* entérotoxigènes  
Gal Galactose  
GalNAc *N*-acetylgalactosamine  
GC-C guanylate cyclase de type C  
Glc Glucose  
GM1 galactosyl-*N*-acetylgalactosaminyl-[*N*-acetylneuraminy]-galactosylglucosyl-  
GMPc guanosine monophosphate cyclique  
GPI glycosylphosphatidylinositol  
GTP guanosine triphosphate  
kb kilo paire de bases  
kDa kilo Dalton  
 $K_d$  constante de dissociation  
LC-MS chromatographie liquide- masse spectométrie  
LEE locus d'effacement d'entérocyte  
LF facteur létal de *Bacillus anthracis*  
LT "heat-labile toxin", toxine thermosensible  
MALDI-TOF Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight  
MBP "maltose binding protein", protéine liant le maltose  
Mr Masse relative  
NeuAc *N*-acetylneuraminique  
NMR résonance magnétique nucléaire  
NOE nuclear overhauser enhancement  
Omp protéine membranaire externe  
PA antigène protecteur de *Bacillus anthracis*  
PCF putative colonization factor  
PI point isoélectrique  
PFT toxine formant des pores  
Pg phénylglyoxale  
PGE<sub>2</sub> prostaglandine E<sub>2</sub>  
PLA<sub>2</sub> phospholipase A<sub>2</sub>  
PLB Planar Lipid Bilayer  
PLC phospholipase C  
pS picosiemens

PT toxine pertussique

QELS dispersion de la lumière quasi-élastique

RTX répétitions dans les toxines

SDS-PAGE électrophorèse en gel poly acrylamide avec du sodium dodecyl sulfate

SFT sulfatide

STa “heat-stable toxin type a”, toxine thermostable de type a

STb “heat-stable toxin type b”, toxine thermostable de type b

Thy-1 glycoprotéine majeur de surface des lymphocytes T des rongeurs

TMU tétraméthylurée

VTEC *Escherichia coli* vérotoxinogènes

*VVV*

*Panem et circenses*

*P*

## REMERCIEMENTS

Daniel  
 Josée  
 Hans le fignoleur  
 Ti-ouis le ...  
 Marc  
 Cathie  
 Isabelle  
 Genevièvre  
 Marina  
 Norm  
 Dre Kornblatt  
 les Has Been  
 les Never Was  
 GRÉMIP  
 Yolande et Hélène  
 Thérèse et Annie  
 Céline F  
 Dominique  
 Clarisse  
 l'autre Céline  
 Carlos  
 Micheline  
 Marco et Lou  
 Johnny  
 Mario  
 Sylvain  
 Michel  
 FCAR  
 U de M  
 FMV  
 CRSNG  
 La bonne-femme Lacombe  
 Le père Boileau  
 La belle province  
 Métro Tarte  
 JT pizza  
 Phil, Le Belge, Francis, Atef et Marcelo le macrophage  
 Dan, Mike, Simon et Gros Dave  
 Ben le baron de la framboise et monsieur barbue  
 Denise  
 Renaud  
 Jacky  
 Charlotte et Justine  
 Joe et Elvis  
 Marilou

# INTRODUCTION

# I

Pour plusieurs pathogènes, la production de toxines constitue un moyen efficace de perturber l'homéostasie de l'hôte. Parmi ceux-ci, les souches d'*Escherichia coli* entérotoxigènes (ETEC) sécrètent des entérotoxines, notamment l'entérotoxine STb, responsables de diarrhée colibacillaire. Cette infection entraîne des pertes économiques importantes pour l'industrie porcine.

Depuis 1999, un pas de géant a été franchi dans le domaine du mécanisme d'action de STb. Le sulfatide (SFT) a été découvert comme récepteur fonctionnel et son attachement caractérisé (Beausoleil & Dubreuil, 2001; Rousset *et al.*, 1998). Cependant, côté ligand, on connaît très peu chose sur STb lors de sa liaison avec le SFT. Ce petit peptide doit posséder des éléments qui lui sont propres et lui permettant une spécificité de liaison avec le SFT ainsi qu'une spécificité d'action biologique. De même, ce qu'il advient après cette interaction toxine-récepteur demeure encore méconnu. La cascade d'événements entre l'attachement au récepteur et l'activation d'une protéine G, impliquée dans le mécanisme d'action, n'est pas encore découverte, il y a donc une carence au niveau des connaissances du mécanisme d'action de STb.

Le SFT est un glycolipide portant une charge négative. Sa partie lipidique ancrée à la membrane ne peut donc pas transduire de signal pour activer la protéine G, il doit y avoir un déplacement supplémentaire de la toxine STb afin de poursuivre la pathogenèse chez la cellule hôte.

Au niveau de relation structure-fonction, on peut obtenir indirectement beaucoup d'information à partir des séquences primaires et des structures secondaires des protéines et ainsi proposer certaines hypothèses.

Les objectifs visés pour cet ouvrage étaient de: I) démontrer et caractériser l'oligomérisation de la toxine STb, II) déterminer l'importance de certains acides aminés de STb dans la liaison avec le SFT et dans l'entérotoxicité. Particulièrement, dans la boucle C21-C36, les acides aminés basiques K22, K23 et R29, l'acide aminé D30 ainsi que les glycines 24, 27, 31 et 34 seront ciblés. Nous nous intéresserons aussi à trois acides aminés hydrophobe (F37, I41 et M42) situés dans l'hélice  $\alpha$  hydrophobe de STb. III) En

outre, nous viserons à démontrer la capacité de STb à interagir avec la membrane par la mise en évidence d'une formation de canaux membranaires en condition artificielle et IV) démontrer l'internalisation *in vivo* de STb ainsi que de déterminer le rôle possible de son hélice  $\alpha$  hydrophobe dans ce mécanisme.

Suite à différentes expériences, cette étude a permis d'améliorer la compréhension du processus sécrétoire causé par l'entérotoxine STb.



**REVUE DE LA LITTÉRATURE**

**II**

# 1. *Escherichia coli*

## 1.1 Généralités

Membre de la famille des *Enterobacteriaceae*, on retrouve *Escherichia coli* présent dans la microflore indigène du tube digestif des animaux, y compris l'homme, en plus d'être répandu un peu partout dans la nature (Brenner, 1984; Starr *et al.*, 1981). Étant la plus connue parmi ses pairs, son génome est désormais séquencé en entier (Perna *et al.*, 2001; TMD, TIGR Microbial Database). La majorité des souches vivent une relation de commensalisme avec l'hôte protégeant celui-ci contre une infection par certaines bactéries pathogènes (Nataro & Kaper, 1998). Toutefois, certaines souches d'*E. coli* sont des agents causals de pathologies intestinales, en plus d'être associées à d'autres types infections telles les infections urinaires, respiratoires, cutanées et du système nerveux (Farmer & Kelly, 1991). *E. coli* est un bâtonnet à coloration Gram-négatif, anaérobie facultatif qui fut isolé pour la première fois par Theodor Escherich en 1885 (Brenner, 1984).

## 1.2 Classification

Physiologiquement, on peut distribuer les souches d'*E. coli* parmi 16 biotypes majeurs d'après leur capacité à fermenter certains sucres. Immunologiquement, le répertoire d'*E. coli* se répartit en plusieurs centaines de sérotypes suivant l'expression de certains antigènes à la surface de la bactérie. Parmi ceux-ci, il y a les lipopolysaccharides (LPS) dont on compte 167 types d'antigènes O répertoriés, l'antigène capsulaire K avec ses 74 sérotypes, lequel représente une structure polysaccharidique acide entourant certaines bactéries (Lior, 1994). L'antigène H, de nature protéique, incluant 53 sérotypes, représente le flagelle utile à la mobilité du micro-organisme, et la structure filamenteuse du fimbriae présente l'antigène protéique F comportant une vingtaine de sérotypes.

Pour les souches causant des problèmes entériques d'*E. coli*, on retrouve un classement basé sur les propriétés pathologiques de la bactérie. I) les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC) lesquels sont caractérisés par la production d'entérotoxines. Outre ces entérotoxines, on

peut retrouver différents facteurs d'adhérence, notamment CFA (Colonizing Factor Antigen), CSA (Coli Surface Antigen) et PCF (Putative Colonization Factor) chez l'humain, de même que F<sub>4</sub> (K88), F<sub>5</sub> (K99), F<sub>6</sub> (987P) et F<sub>41</sub> principalement, chez le porcelet (Smyth *et al.*, 1994). II) Les *E. coli* entéropathogènes (EPEC) aussi connus sous le nom d'*E. coli* attachants et effaçants (Attaching and Effacing *E. coli* (AEEC)) se distinguent par les lésions obtenues par la destruction des microvillosités et de l'adhérence intime des bactéries. On retrouve la présence du facteur d'adhérence BFP (Bundle-Forming Pili). Également présent, sur le locus d'effacement d'entérocyte (LEE), les gènes *eae* (*E. coli* attaching and effacing) codant pour une intimine, et *esp* (EPEC-secreted proteins), associés aux lésions AE (Donnenberg *et al.*, 1997; Knutton, 1994; Zhu *et al.*, 1994). III) Au début des années 70, on rapporte une nouvelle forme de diarrhée envahissante, aussi nommée dysenterie, que l'on associe à la catégorie d'*E. coli* entéro-invasifs (EIEC) (DuPont *et al.*, 1971). Le caractère invasif des EIEC est dû à des gènes de virulence présents sur un plasmide pInV lesquels sont probablement responsables de la dysenterie (Sears & Kaper, 1996). L'entérotoxine EIEC ou ShET2 (*Shigella* enterotoxin 2) serait à l'origine de cette diarrhée. IV) Un autre groupe établi depuis 1982, les *E. coli* vérotoxino-gènes (VTEC) aussi connus sous l'appellation *E. coli* à toxine Shiga-like (SLTEC) ou entéro-hémorragiques (EHEC) sont associés à la présence de sang dans les selles. Leur digne représentant du séro-groupe O157:H7 appartient aux VTEC (Johnson *et al.*, 1983; Karmali, 1989). Les vérotoxines VT1 (SLTI) ou VT2 (SLTII), produites par les souches VTEC, ont une activité létale envers les lignées cellulaires Vero et HeLa. Une variante de ces toxines, VT2e, est impliquée dans la maladie de l'œdème chez le porc (Marques *et al.*, 1986). Tout comme chez le groupe EPEC, certaines souches VTEC possèdent le locus LEE pouvant causer les lésions histopathologiques d'attachement-effacement (AE) (Sears & Kaper, 1996). V) Les *E. coli* entéro-agrégatifs (EAEC, EAggEC), nommés ainsi pour leur propriété d'agrégation sur cellules Hep-2, constituent un important facteur quant à la diarrhée persistante des jeunes enfants des pays en voie de développement (Sears & Kaper, 1996).

Il existe d'autres groupes d'*E. coli* associés à des pathologies non-entériques tels que: les *E. coli* septicémiques (SEPEC), uropathogènes (UPEC) et à méningite (MENE) causant respectivement des septicémies, des infections du tractus urinaire et méningites.

### 1.3 Diarrhée colibacillaire

La diarrhée colibacillaire est un terme employé pour décrire une entérite plus ou moins sévère qui entraîne une déshydratation partielle ou sévère pouvant causer la mort (Dunne, 1975; Ensminger & Parker, 1984). Cette perte d'eau et la sécrétion d'électrolytes dans la lumière intestinale conduit à une augmentation de la fréquence des mouvements intestinaux et/ou du volume fluide intestinal. Les diarrhées sont en général responsables aux États-Unis de la mort d'environ 11% des porcelets avant le premier mois de vie (Moon & Bunn, 1993). En plus du haut taux de mortalité, les ETEC causent des pertes économiques importantes à cause du retard de croissance, la perte de poids et le coût en soins divers des porcelets qui sont affectés par ces bactéries (Moon & Bunn, 1993; Söderlind *et al.*, 1988)

## 2. Entérotoxines

### 2.1. Généralités

Les entérotoxines produites par les ETEC sont les plus fréquents agents responsables de la diarrhée du voyageur (Sack, 1990), tout en affectant également les animaux. Dans les pays en voie de développement, on qualifie souvent les ETEC d'infanticide. Au Canada, c'est à Gyles et Barnum en 1969 que l'on attribue les premiers pas vers l'identification d'une entérotoxine causant la diarrhée porcine (Gyles & Barnum, 1969). Mais deux ans plus tôt en Angleterre, Smith et Halls (1967) avaient fait de même à l'aide de surnageant de culture (Smith & Halls, 1967).

### 2.2. Classification

Les entérotoxines produites par les ETEC sont différenciées en deux groupes selon leur stabilité à la chaleur (65°C pendant 30 min.). Soit d'une part, celles qui résistent au traitement thermique que l'on dit thermostable (ST), soit d'autre part, celles qui sont

inactivées par la chaleur que l'on nomme thermosensibles (LT) (Germani *et al.*, 1989; Guerrant, 1985).

Les toxines thermosensibles LTI et LTII forment des entités multimériques de type A-B, c'est-à-dire une sous-unité A portant la fonction entérotoxique liée à 5 sous-unités B (Gyles, 1992) ayant le rôle d'attachement au récepteur GM1. Par ailleurs, le profil antigénique, fonctionnel et structural est très similaire à celui de la toxine du choléra CT (Kaper *et al.*, 1995; Spangler, 1992; Takeda *et al.*, 1983). Les toxines LT sont codées par les différentes variantes du gène *elt*, selon l'espèce concerné. Le gène est arrangé en deux cistrons *eltA* et *eltB* codant pour leur sous-unité respective et porté par un plasmide (Williams-Smith, 1968).

Les deux toxines thermostables, STa ou STI et STb ou STII, ont été dissociées en 1978 par l'étude de Burgess *et al.* (1978). Comparativement aux toxines LT, elles sont des peptides monomériques de très faible poids moléculaires, soit respectivement de 2.1 et 5.108 kDa (théorique) ou 5.103 (LC-MS). La différenciation entre ces toxines se situe au niveau de la solubilité de STa dans le méthanol et de son activité chez le souriceau alors qu'au contraire STb est insoluble dans le méthanol et inactif chez le souriceau. STa est une toxine possédant 3 ponts disulfures; elle existe sous deux formes, STIa ou STaP et STIb ou STaH, de 18 et 19 acides aminés, respectivement (Okamoto *et al.*, 1987). Ces deux formes originent de deux précurseurs différents, pré-pro-STa, de 72 aa lesquels subissent chacun deux clivages (Moseley *et al.*, 1983; Rasheed *et al.*, 1990). Ce précurseur est codé sur un plasmide à l'intérieur du transposon Tn1681 (Sekizaki *et al.*, 1985; So & McCarthy, 1980).

## 2.3. Entérotoxine STb

### 2.3.1. Prévalence

La production de STb est d'abord associée aux ETEC porcins bien qu'aussi présente chez les souches retrouvées chez d'autres espèces animales tels que le poulet (Akashi *et al.*, 1993), le boeuf (Echeverria *et al.*, 1985a; Mainil *et al.*, 1986; Mainil *et al.*, 1990; Shin *et*

*al.*, 1994), le chien (Hammermueller *et al.*, 1995), le chevreuil, la marmotte (Caprioli *et al.*, 1991) et l'homme (Echeverria *et al.*, 1985a; Handl & Flock, 1992; Lortie *et al.*, 1991; Okamoto *et al.*, 1993; Weikel *et al.*, 1986a). Les diarrhées causées par la toxine STb semblent aussi être influencées par l'âge de l'animal. À cet effet, le gène codant pour STb est fortement associé aux souches ETEC provenant de porcs sevrés (6 semaines) souffrant de diarrhée. Alors que chez le porcelet nouveau-né, il ne semble pas y avoir une pathologie sévère associée comme le démontre l'étude de Casey *et al.* (1998) dans laquelle on utilise des porcelets âgés de moins d'un jour (Casey *et al.*, 1998).

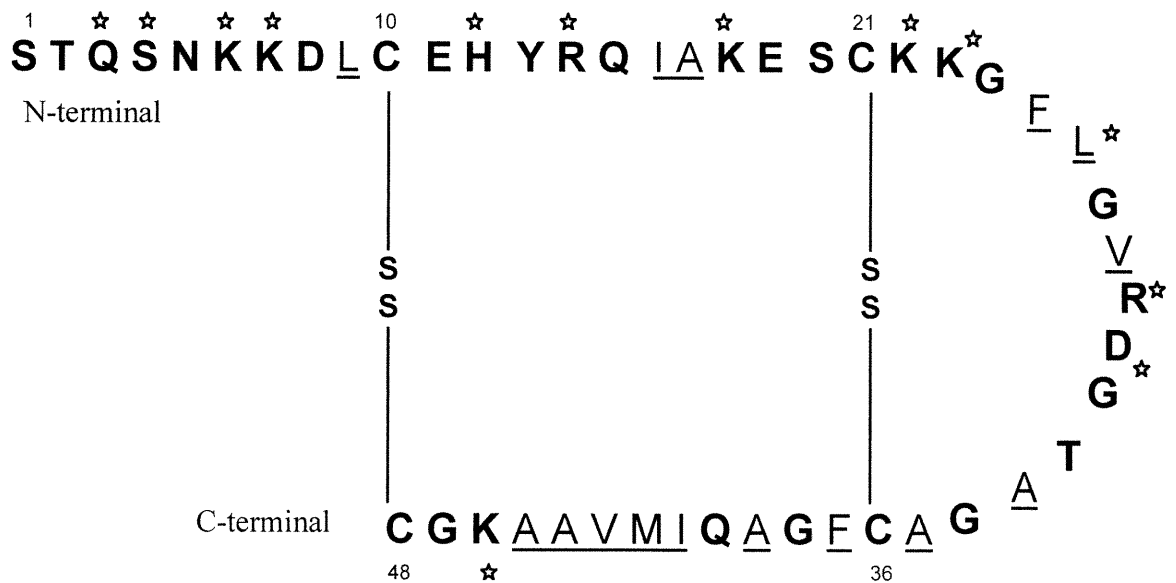
Bien que l'on retrouve habituellement les souches ETEC productrice de STb chez les porcs malades, il arrive parfois d'en retrouver chez des porcs sains (Dubreuil, 1997; Söderlind *et al.*, 1988). L'explication plausible de cette situation serait l'absence d'un environnement propice, le niveau de susceptibilité de l'hôte, une quantité faible de toxines ou encore l'absence de structures d'adhésion. À cet effet, différentes études (Fairbrother *et al.*, 1989; Nagy *et al.*, 1990; Söderlind *et al.*, 1988; Woodward & Wray, 1990) mentionnent l'existence de souches STb<sup>+</sup>, sans facteurs d'adhésion connus détectés, causant ou ne causant pas la diarrhée.

L'association des souches STb<sup>+</sup> avec la colibacillose a été démontrée à maintes reprises (Blanco *et al.*, 1997; De Castro *et al.*, 1984; Fairbrother *et al.*, 1988; Fairbrother *et al.*, 1989; Handl *et al.*, 1992; Mainil *et al.*, 1986; Monckton & Hasse, 1988; Moon *et al.*, 1983; Moon *et al.*, 1986; Nagy *et al.*, 1990; Osek & Truszczynski, 1992; Söderlind *et al.*, 1988; Wilson & Francis, 1986; Woodward & Wray, 1990; Woodward *et al.*, 1990). Notamment, en 1986, Moon *et al.* démontrent, par hybridation à l'aide d'une sonde STb, que chez 74% des ETEC isolés de porcs malades on retrouve le gène *estB*. De plus, chez les porcs malades âgés de plus d'une semaine, on rencontre une forte prédominance, 33%, de souches étant seulement STb<sup>+</sup>(STa<sup>-</sup> et LT<sup>-</sup>). Inversement, la toxine STa est beaucoup plus fréquente chez le porcelet nouveau-né. En outre, différentes combinaisons de STb avec d'autres toxines: STa, LT et VT ont été répertoriées chez *E. coli*. En ce sens, récemment, Blanco *et al.* (1998) ont démontré que STb était la toxine la plus retrouvée. Hormis cette prévalence, on note aussi l'association LT-STb comme étant la plus répandue. Concernant

les adhésines, le fimbriae F<sub>4</sub> est le plus souvent exprimé en présence de STb (Dubreuil, 1997).

### 2.3.2. Structure et caractéristiques

STb est synthétisé à partir du gène *estB* sous la forme d'un précurseur, pré-STb, de 71 acides aminés d'un poids moléculaire (PM) de 8100 Da (Lee *et al.*, 1983; Picken *et al.*, 1983). Les 23 premiers acides aminés présentent un caractère plutôt hydrophobe, et servent de peptide signal pour l'export (Kupersztoch *et al.*, 1990). La toxine mature libérée dans le périplasme comporte 48 acides aminés pour un Mr de 5200 Da (Fig.1). Parmi ceux-ci, il y a 4 cystéines formant deux paires de ponts disulfures entre C10 et C48 et entre C21 et C36 (Fujii *et al.*, 1991). La présence de plusieurs acides aminés basiques, 1 histidine, 2 arginines et 6 lysines, confère un pI de 9.6 (Fujii *et al.*, 1994; Handl *et al.*, 1993) à la toxine STb. Comparativement, STa qui ne possède pas d'acide aminé basique dans sa forme mature a un pI plus acide (3.98) (Robertson *et al.*, 1983).



**Figure 1.** Séquence primaire et arrangement des deux ponts disulfures (SS) de l'entérotoxine STb mature. La numérotation des acides aminés reflète l'élimination des 23 premiers acides aminés de la séquence signal conférant ainsi la position 1 à la sérine. En souligné: les acides aminés hydrophobes. **En gras**: les acides aminés hydrophiles. Les

étoiles (★) représentent les acides aminés pour lesquels des mutants chimiques et ponctuels ont déjà été obtenus par d'autres groupes de recherche (voir tableau # 1).

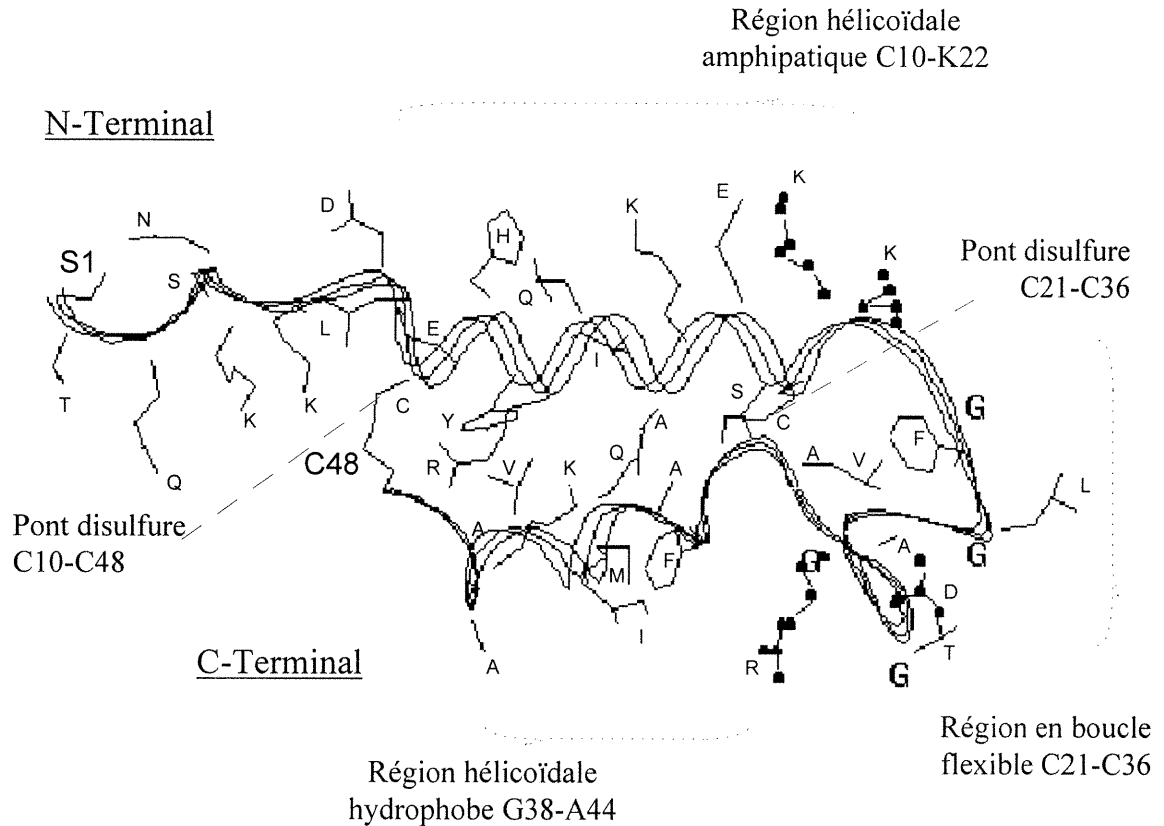
On obtient une absorbance maximale à 214 nm et faiblement à 280nm dû à la présence d'un petit nombre d'acides aminés aromatiques, 1 tyrosine, 2 phénylalanines et aucun tryptophane (Handl *et al.*, 1993). Notons, en outre, l'absence de proline pouvant procurer une rigidité à la structure et la région riche en glycine au niveau de la boucle conférant une certaine flexibilité.

La toxine STb possède des propriétés de résistance à divers facteurs physico-chimiques dont la thermorésistance grâce à laquelle, durant 30 min., la toxine résiste à des températures de 65°C (Dubreuil *et al.*, 1991) et 100°C (Burgess *et al.*, 1978; Fujii *et al.*, 1991; Weikel *et al.*, 1986b) sans perdre son activité biologique. Elle résiste aussi à des pH variant de 2 à 12 (Dubreuil *et al.*, 1991; 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% acétonitrile (Fujii *et al.*, 1991), à 50% d'acide formique, à 8M d'urée et à 2.5% de SDS (Dubreuil *et al.*, 1991). Cependant, l'entérotoxicité est éliminée en présence d'agent réducteur des ponts disulfures, tel que 2% de béta-mercaptoéthanol (Fujii *et al.*, 1991) et de protéases de la famille de la trypsine (Dreyfus *et al.*, 1992; Fujii *et al.*, 1991; Whipp, 1987b).

Une étude de la structure de STb en solution par spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (RMN) a permis de déterminer l'arrangement tridimensionnel de la toxine (Sukumar *et al.*, 1995). Le squelette de STb a été établi à l'aide d'approximations de distances interprotonales dérivées d'analyses NOE (Nuclear Overhauser Enhancement) intégrées aux procédures de géométrie distale et de simulation d'hybridation. L'imagerie par RMN 2D et 3D démontre une région hélicoïdale amphipatique entre les résidus 10 à 22, N-terminale, dont certains de ceux-ci polaires (D8, H12, Q15, L18, E19, L22 et L23) sont exposés dans le solvant tandis que les résidus hydrophobes du côté opposé font contact avec les résidus hydrophobes de l'hélice  $\alpha$  en C-terminale; Y13 et R14 s'associent avec V43 et A17 avec A39 et Q40. Cette hélice alpha en C-terminale s'étend de l'acide aminé 38 à 44 et elle est hautement hydrophobe quant à l'exposition des chaînes latérales des résidus F37,



I41 et M42 dans le solvant. Le rapprochement des deux hélices laisse donc un espace inter-hélicoïdale de dimension subatomique,  $4.7\text{\AA}$  entre les deux carbones alpha de C21 et C36, à caractère hydrophobe.



**Figure 2.** Représentation tridimensionnelle de l'entérotoxine STb, modifiée de Sukumar *et al.* (1995).

La séquence comprenant les acides aminés 21 à 36 peut être définie comme une boucle  $\Omega$  ceinturée par le pont disulfure (Leszczynski & Rose, 1986). On rencontre dans cette boucle un regroupement d'acides aminés hydrophobes, soit, F25, V28, A33 et A35. La boucle expose aussi 2 paires d'acides aminés chargés, l'une à l'extrémité, (R29 et D30), et l'autre en bordure, (K23 et K23).

Sukumar *et al.* (1995) ont aussi étudié la structure de STb par spectroscopie en dichroïsme circulaire (CD). Les auteurs montrent que pour la forme non dénaturée de STb, on observe

73  $\pm$ 2% d'hélice alpha, 4  $\pm$ 2% de structure bêta et 22% de structure a périodique. Toutefois, la forme réduite de la toxine comporte 20% d'hélice alpha, 29% de structure bêta et 51% de structure a périodique. Ceci montre donc que la réduction des ponts disulfures résulte en un changement drastique de la structure concordant avec la perte d'activité biologique. L'importance de la structure secondaire de la toxine non dénaturée a été mise en évidence lors de la formation et la stabilisation des ponts disulfures puisque lorsque la toxine STb, sous forme réduite, est mise en présence de 8M urée, il y a diminution, par un facteur de 40, du niveau de STb mature. Les ponts disulfures stabiliseraient donc la molécule en présence d'agents chaotropiques, préservant l'entérotoxicité de STb. Quant à la structure tridimensionnelle en cristallographie de STb, elle n'a pas encore été déterminée.

L'entérotoxine STb est très peu immunogène et la production d'anticorps neutralisant son activité biologique s'avère un travail laborieux. Lorsque la toxine STb émulsifiée avec de l'adjuvant complet de Freund est injectée à des lapins, on obtient un titre sérique significatif. Malgré 8 inoculations répétées avec de l'adjuvant incomplet de Freund, le titre reste faible et les anticorps produits sont incapable de neutraliser l'entérotoxicité. Toutefois, l'utilisation de protéines de fusion, tel que Maltose Binding Protein (MBP)-STb, augmente l'immunogénicité et résulte en production d'un antiserum neutralisant (Dubreuil *et al.*, 1991).

### 2.3.3. Biogenèse

Globalement, il y a d'abord synthèse de la molécule pré-STb, comportant 71 acides aminés, au niveau du cytoplasme. Puis lors du passage de la membrane interne, cette forme immature subit un clivage de sa séquence signal libérant ainsi un peptide de 48 acides aminés (Dreyfus *et al.*, 1992; Fujii *et al.*, 1991; Kupersztoch *et al.*, 1990). Cette translocation du pré-STb emploierait le système général de sécrétion rencontré chez *E.coli* (Kupersztoch *et al.*, 1990). En ce sens, l'auteur a notamment démontré la dépendance énergétique de cette migration à travers la membrane interne par l'inhibition à l'aide du CCCP (carbonylcyanide-m-chlorophenylhydrazone), un ionophore protonique contrant le

couplage énergétique. En utilisant un mutant thermosensible *secA*, il démontre aussi la nécessité du système de sécrétion SecA, tout comme pour STa. Par contre, contrairement à STa, il ne met en évidence aucune étape de maturation pour le passage de la toxine du périplasma vers l'extérieur.

La transition de STb vers le périplasma conduit à la formation des deux ponts disulfures nécessaires à l'activité biologique de la toxine; ceci protégerait la toxine d'une protéolyse (Arriaga *et al.*, 1995; Dreyfus *et al.*, 1992). À ce sujet, Foreman *et al.* (1995) écartent la possibilité de l'implication des protéases codées par *degP* et *ompT* et conclut qu'une enzyme autre serait responsable.

Tout comme pour les entérotoxines LT et STa (Findlay *et al.*, 1993; Yamanaka *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 1992), la protéine périplasmique DsbA responsable de la formation des ponts disulfures de protéines du périplasma et de la membrane externe (Bardwell, 1994; Bardwell *et al.*, 1991) intervient aussi auprès de STb. À l'aide d'un transposon synthétique, Foreman *et al.* (1995) ont criblé le mutant *dsbA* formant les deux ponts disulfures à un rythme plus lent et, par conséquent, la forme réduite de STb en est protéolysée. Par conséquent, un phénotype STb<sup>-</sup> où la toxine est digérée au niveau du périplasma. Comparativement, STa n'est point assujettie à une telle forme d'attaque de la part de protéases, de type trypsine, puisque ne possédant pas dans sa forme mature, d'arginines et de lysines, acides aminés qui sont les sites de coupures des protéases de type trypsine. Une autre étude démontre l'implication de DsbA dans la formation des ponts disulfures de STb (Okamoto *et al.*, 1995). Dans un mutant *dsbA* exprimant un phénotype STb<sup>-</sup>, on introduit le gène sauvage *dsbA* lequel restaure un phénotype STb<sup>+</sup>.

En dernière étape, STb traverserait la membrane externe bactérienne à l'aide de la protéine TolC (Foreman *et al.*, 1995); une protéine membranaire externe (Omp) possédant des domaines périplasmiques et extracellulaires (Hackett & Reeves, 1983; Niki *et al.*, 1990). De la même manière qu'ils ont fait pour le mutant *dsbA*<sup>-</sup> en utilisant le transposon synthétique, Foreman *et al.* (1995) ont criblé des mutants *tolC*<sup>-</sup> incapables de sécréter STb dans le milieu extracellulaire. La caractérisation récente de TolC comme un canal ionique pouvant être bloqué par des peptides (Benz *et al.*, 1993) est compatible avec la notion selon laquelle

TolC pourrait être une protéine membranaire externe à travers laquelle STb et d'autres polypeptides extracellulaires voyageraient. À cet égard, TolC est requis pour la sécrétion de l'hémolysine HlyA (Wandersman & Delepelaire, 1990) et de colicine V chez *E. coli* (Gilson *et al.*, 1990). Foreman *et al.* (1995) éliminent l'hypothèse de la présence de protéines intermédiaires qui seraient impliquées dans la sécrétion de STb via TolC puisqu'ils n'ont pu isoler de mutants pour d'autres gènes. Notons cependant que pour l'hémolysine HlyA, ce passage est indirect (Gray *et al.*, 1989).

#### 2.3.4. Génétique

L'entérotoxine STb est encodée par le gène *estB*. Le clonage et le séquençage de ce gène a démontré qu'il est constitué de moins de 800 pb. Lorsque comparée à STa, on observe aucune homologie (Lee *et al.*, 1983; Picken *et al.*, 1983). On retrouve le gène *estB* sur des plasmides hétérogènes lesquels codent aussi pour d'autres entérotoxines, tels que LT et STa, les vérotoxines, des facteurs de colonisation, la résistance aux antibiotiques, la production de colicines et des facteurs de transfert (Echeverria *et al.*, 1985b; Harnett & Gyles, 1985). Le gène *estB* ferait partie d'un élément mobile d'environ 9 kb, le transposon Tn4521 (Hu & Lee, 1988; Hu *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 1985). Bien qu'il soit juxtaposé par des éléments d'insertion IS2 défectueux, il possède tout de même la propriété de se transposer d'un plasmide à l'autre (Hu & Lee, 1988; Lee *et al.*, 1985). Le gène *estB* semble être uniforme en grandeur avec des séquences adjacentes hétérogènes suggérant sa présence chez différents transposons (Lee *et al.*, 1985).

La difficulté de détecter et d'isoler la toxine STb produite par les souches sauvages suggérait un faible niveau d'expression du gène *estB*. À cet effet, Spandau et Lee (1987) ont étudié la régulation de cette expression et ont remarqué la présence d'un promoteur relativement faible. En ce sens, la boîte Pribnow (région -10) du gène *estB* démontre une bonne homologie avec la séquence consensus pour les *E. coli* (TATAAT) sauf pour le T final, nommé T invariable, qui est remplacé par un G dans cette séquence. Quant à la région -35 du promoteur, elle est très homologue à la séquence consensus -35 (TTGACA). Par

conséquent, il est possible que le promoteur de *estB* soit capable lier l'ARN polymérase, en région -35, mais en étant un faible initiateur de transcription (Spandau & Lee, 1987).

L'expression de STb est soumise à une répression catabolique, tout comme observé pour STa (Alderete & Robertson, 1977; Stieglitz *et al.*, 1988). Une région de 22pb d'ADN montrant 72% d'identité avec la séquence consensus liant le CRP (Catabolic Repression Protein) a été découverte 26 nucléotides en amont de la région -35 du gène *estB*. Un effet répressif du glucose sur la production de STb et l'abolition de cet effet par l'ajout d'AMPc a été observée. Ce phénomène a été noté à l'aide de souches mutantes *crp<sup>-</sup>* et *cya<sup>-</sup>* (codant respectivement pour la protéine récepteur de l'AMPc et pour l'adénylate cyclase) (Busque *et al.*, 1995). La répression catabolique est due à l'inactivation de l'adénylate cyclase lorsque le glucose est internalisé par la bactérie, donc moins d'ATP transformé en AMPc.

### 2.3.5. Mutagénèse

Jusqu'à maintenant, on a tenté d'établir le rôle de certains acides aminés de STb, notamment concernant l'activité biologique. La valeur de 9.6 comme pI pour STb suppose qu'il y aurait quelques chaînes latérales d'acides aminés basiques se projetant vers l'extérieur de STb. Fujii *et al.* (1994) ont, dans un premier temps, procédé à une mutagénèse chimique au niveau de ces acides aminés avec trois agents chimiques à action spécifique: le phénylglyoxale (Pg) agissant sur l'arginine, l'anhydride ethoxyformique (AE) pour l'histidine et l'anhydride maléique (AM) pour l'histidine et la lysine. Ces auteurs ont observé que seulement le traitement avec l'AM diminuait l'entérototoxicité de STb. En sachant que le traitement de l'histidine avec AE ne donne aucune perte significative de toxicité, on peut ainsi attribuer la perte d'activité de STb à la modification des lysines par AM.

Par la suite, les auteurs ont procédé à une mutagénèse dirigée (Tableau 1) au niveau des acides aminés basiques (1His, 2Arg et 6Lys). L'étude démontre l'importance relative des lysines 18 et 46 dont lorsque mutées, chacune de ces toxines mutantes présentent le quart de

la toxicité de STb sauvage (Fujii *et al.*, 1994). Mais la plus grande variation s'est retrouvée pour les lysines 22 et 23 où chaque mutant montre seulement 10% de la toxicité de STb sauvage et 2.5% lors d'une double mutation de ces deux acides aminés. Les auteurs proposent que la région NH<sub>2</sub>-terminale précédant C10 ne serait pas impliquée dans l'activité de STb à cause de l'absence de perte de toxicité pour les mutants Q3, S4, K6 et K7, tel qu'observé avec STa. Cette activité biologique se situerait plutôt dans la région C10 à C48.

Pour l'arginine 29, on rencontre un point de discordance; Fujii *et al.* (1994) prétendent que lorsque substituée par une isoleucine (R29I), la toxicité n'est pas affectée. Par contre, Dreyfus *et al.* (1992) affirment que leur substitution par une sérine (R29S) résulte en une diminution de 8 fois de la toxicité de STb mutée. Il est à noter que les acides aminés de substitution ne sont pas les mêmes, et l'équipe de Dreyfus n'ont pas effectué leurs essais avec de la toxine purifiée. Dreyfus *et al.* ont aussi montré que la mutation D30S réduisait la toxicité de ce mutant à 39% de celle de STb sauvage (Dreyfus *et al.*, 1992). Les auteurs démontrent aussi qu'il n'y a pas d'interférence de l'activité sécrétoire de STb sauvage lorsque co-incubé avec chacun des mutants R29S et D30V dans les anses. Indirectement, ceci suggère que ces derniers ne compétitionnent pas pour l'attachement au récepteur potentiel de STb.

La mutagénèse a aussi permis de déterminer l'implication de chacun des deux ponts disulfures de STb. Ainsi, les deux ponts sont nécessaires pour la structure et l'activité toxique de STb, l'élimination d'un seul pont disulfure annule l'entérotoxicité (Arriaga *et al.*, 1995). Jusqu'à maintenant, tous ces mutants ont été produits en vue d'étudier leur activité biologique. Aucun mutant n'a été produit dans le but de déterminer le site de liaison au récepteur potentiel.

**Tableau 1.** Activité de différents mutants de substitution pour STb

Mutations	Activité biologique	Références
Q3	100%	Fujii <i>et al.</i> (1994)
S4	100%	Fujii <i>et al.</i> (1994)
K6N, K7I	50% <sup>a</sup>	Fujii <i>et al.</i> (1994)
C10S, C48S	0%	Arriaga <i>et al.</i> (1995)
H12V	50% <sup>a</sup>	Fujii <i>et al.</i> (1994)
R14L	50% <sup>a</sup>	Fujii <i>et al.</i> (1994)
K18G	25%	Fujii <i>et al.</i> (1994)
C21S	0%	Dreyfus <i>et al.</i> (1992)
C21S, C36G	0%	Arriaga <i>et al.</i> (1995)
K22L	10%	Fujii <i>et al.</i> (1994)
K23T	10%	Fujii <i>et al.</i> (1994)
K22I, K23N	2.5%	Fujii <i>et al.</i> (1994)
L26I	97.2%	Dreyfus <i>et al.</i> (1992)
R29I	50% <sup>a</sup>	Fujii <i>et al.</i> (1994)
R29S	12.7% <sup>b</sup>	Dreyfus <i>et al.</i> (1992)
D30V	39% <sup>c</sup>	Dreyfus <i>et al.</i> (1992)
K46S	25%	Fujii <i>et al.</i> (1994)
K18G, K46S	10%	Fujii <i>et al.</i> (1994)
C48S	0%	Dreyfus <i>et al.</i> (1992)

<sup>a</sup> Selon les auteurs, cette réduction est non significative car les essais d'anses ligaturées ne sont pas assez précis

<sup>b</sup>  $P < 0.01$

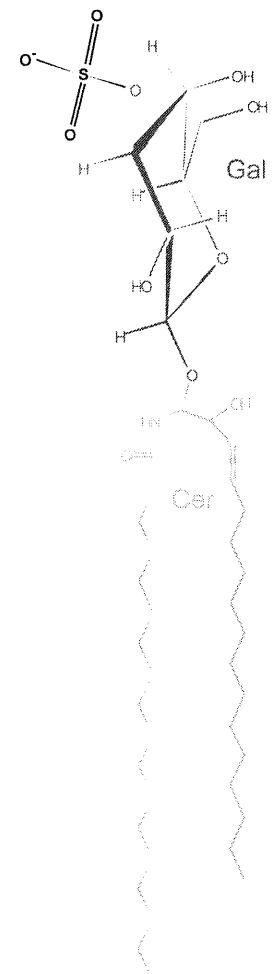
<sup>c</sup>  $P < 0.05$

### 2.3.6. Mode d'action

#### 2.3.6.1. Attachement et interaction cellulaire

La spécificité de l'action biologique de STb suggèrait fortement la présence d'un récepteur avec lequel STb interagirait. À cet effet, Hitotsubashi *et al.* (1994) ont reporté un attachement spécifique de STb à une protéine membranaire non-glycosylée de 25 kDa provenant de cellules de la muqueuse d'intestin de souris. Chao et Dreyfus (1997), n'ayant pu confirmer ces résultats avec leur lignée cellulaire T84 et HT29, suggèrent que la-dite protéine serait plutôt intramembranaire ou cytoplasmique, et non exposée à la surface. Chao et Dreyfus (1997) ont également démontré que la toxine STb est internalisée par un mécanisme encore inconnu.

Récemment, Rousset *et al.* (1998) ont démontré l'attachement de STb aux microvillosités du jéjunum de porc. Cette interaction a lieu rapidement et a lieu indépendamment de la température et de façon dépendante du pH (pH optimum de 5.8). Une caractérisation partielle de la molécule impliquée, suite à différents traitements affectant les protéines, les glucides et les lipides suggère qu'elle serait composée d'une partie céramide et d'acide(s) neuraminique(s) terminal(aux) et/ou de  $\alpha$ -glucose(s) terminal(aux). Lors de pré-traitements avec soit la laminine, une protéine liant le sulfatide (SFT), soit la sulfatase ou un anticorps monoclonal anti-SFT dans des expériences d'anses ligaturés de jéjunum de rat, le SFT a été démontré comme étant un récepteur fonctionnel (Rousset *et al.*, 1998). Beausoleil *et al.* (2001) suggèrent que le galactose 3-sulfate du SFT serait l'épitope reconnu par STb (Beausoleil & Dubreuil, 2001). L'interaction entre le SFT et STb est température-dépendante, pH indépendante et de faible affinité, soit un  $K_d$  de  $2-6 \pm 1.5 \mu\text{M}$  (Beausoleil & Dubreuil, 2001). Étant donné la nature différente du SFT avec la protéine de 25 kDa de l'équipe d'Hitotsubashi *et al.*



**Figure 3.** Sulfatide



(1994), Rousset *et al.* (1998) indiquent qu'il est connu qu'une toxine peut s'attacher à plus d'un récepteur (Holmgren *et al.*, 1982).

Dubreuil *et al.* (1991) ont rapporté que le pI hautement basique (9.6) de STb suggère que les acides aminés polaires chargés positivement doivent être exposés, et peuvent favoriser une association avec les têtes polaires des lipides membranaires chargés négativement en surface des cellules. Chao et Dreyfus (1997) ont suggéré que STb interagirait avec les lipides de la membrane plasmique par les queues hydrophobes, plutôt que par les têtes hydrophiles des phospholipides.

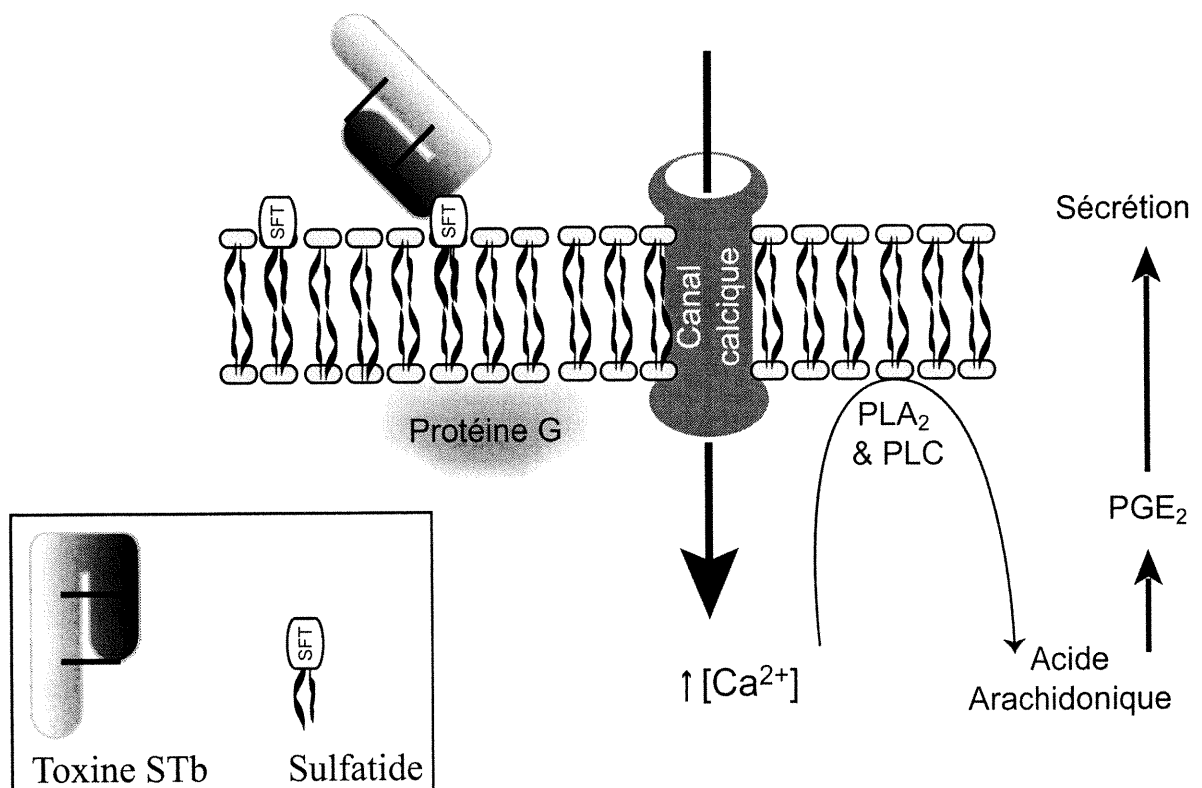
#### 2.3.6.2. Mécanisme d'action

Les expériences de co-injection de STb avec soit STa ou soit la toxine du choléra (CT) démontrent que la diarrhée provoquée par la toxine STb implique un mécanisme d'action différent de STa et CT. Cinétiquement, la réponse *in vivo* due à STb diffère de celle de STa et de CT. Pour STa, on a une réponse sécrétoire après une 1 heure, comparativement aux 2 heures requises pour STb (Hitotsubashi *et al.*, 1992b; Weikel & Guerrant, 1985; Weikel *et al.*, 1986b; Whipp, 1987b; Whipp, 1990). De plus, l'accumulation de fluide causée par STb diffère de celles par STa et CT à savoir que cette accumulation de fluide pour STb dure plus longtemps que pour STa et moins longtemps que CT. Pour ces trois toxines, le maximum d'accumulation de fluide survient après différents temps d'incubation: 3 h, 2 h et 8 h pour STb, STa et CT, respectivement (Hitotsubashi *et al.*, 1992a).

Contrairement aux entérotoxines LT et STa, le mécanisme d'action de STb est indépendant de l'augmentation intracellulaire des nucléotides cycliques (Hitotsubashi *et al.*, 1992a; Kennedy *et al.*, 1984; Peterson & Whipp, 1995; Weikel & Guerrant, 1985; Weikel *et al.*, 1986b). Cependant, la toxine STb induit rapidement une réponse dose-dépendante de la concentration intracellulaire de  $Ca^{2+}$  chez différentes lignées cellulaires d'origine intestinale, rénale ou pituitaire (Dreyfus *et al.*, 1993). Le calcium intracellulaire est notamment impliqué dans le processus de transport intestinal de fluide et d'ions à travers

l'épithélium. Dreyfus *et al.* ont aussi démontré, par l'utilisation d'agent bloquant, la thapsigargine et l'acide cyclopiazonique, que le calcium ne provient pas d'une réserve interne, mais plutôt d'une source extracellulaire et suggèrent l'implication d'un canal calcique voltage-indépendant au niveau de la membrane plasmique cellulaire.

L'utilisation d'antagonistes de protéine G, telle que la toxine pertussique (PT) ou la somatostatine, pour bloquer l'ouverture du canal calcique indique un signal dépendant de l'interaction de STb avec un récepteur couplé à une protéine régulatrice de liaison au GTP (Dreyfus *et al.*, 1993). De même, l'utilisation des antagonistes de calmoduline W-7, W-5 et KN-93, des inhibiteurs de protéine kinase II  $\text{Ca}^{2+}$ -calmoduline dépendante (CaMK II), montre l'importance de cette protéine, CaMK II, dans le mécanisme sécrétoire de STb (Fujii *et al.*, 1997). L'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  à l'intérieur des cellules épithéliales de l'intestin activerait la protéine CaMK II, ce qui conduirait à la stimulation et à l'ouverture d'un quelconque canal chlorure  $\text{Ca}^{2+}$  dépendant ( $\text{Cl}_{\text{Ca}}$ ) (Ho *et al.*, 2001) et par la suite à la sécrétion de fluide. Les auteurs suggèrent que ce mécanisme serait davantage important que la voie impliquant l'acide arachidonique.



**Figure 4.** Mécanisme d'action connu de STb

Tout indique que l'action de STb implique 2 médiateurs sécrétoires. La sérotonine (5-HT) et la prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) sont libérés de façon dose-dépendante et rapide dans la lumière d'anses ligaturées traitées par STb chez différents modèles animaux (Fujii *et al.*, 1995; Harville & Dreyfus, 1995; Hitotsubashi *et al.*, 1992b; Peterson & Whipp, 1995). Une première voie consisterait en l'action de STb conduisant à une augmentation intracellulaire dose-dépendante d'acide arachidonique et d'acide phosphatidique (Fujii *et al.*, 1995). Le taux intracellulaire de Ca<sup>2+</sup> aurait un effet sur la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) et la phospholipase C (PLC), des enzymes ancrées à la membrane dont la PLA<sub>2</sub> qui catalyserait la libération d'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires. L'utilisation d'inhibiteur de PLC, la néomycine, a permis de confirmer l'implication de la PLC dans la réponse à la toxine STb. La transformation, par la suite, de l'acide arachidonique en prostaglandines par une cyclooxygénase, a été démontrée par l'inhibition de cette dernière enzyme avec l'aspirine et l'indométhacine où on note une réduction de la réponse à STb (Dubreuil, 1999; Hitotsubashi *et al.*, 1992a). Par ailleurs, ces auteurs ont observé une rapide exportation de PGE<sub>2</sub> dans les fluides des anses intestinales ligaturées en réponse à STb

Une seconde voie provient de la sécrétion de 5-HT par les cellules entérochromaffines intestinales, situées à la base des villosités (Harville & Dreyfus, 1996). Des expériences avec un antagoniste du récepteur 5-HT<sub>2</sub>, la kétansérine, révèle une diminution de la sécrétion intestinale, ce qui montre l'importance du 5-HT dans la stimulation de la réponse à STb (Harville & Dreyfus, 1995). L'utilisation de l'antagoniste a de plus montré qu'il y avait diminution de la libération de PGE<sub>2</sub> dû à STb, probablement, selon les auteurs, du fait que la stimulation du récepteur 5-HT<sub>2</sub> conduirait la formation de PGE<sub>2</sub>. Donc, pour cette seconde voie, STb interagirait avec un récepteur inconnu présent chez la cellule entérochromaffine, cette interaction stimulerait une protéine G, conduisant à la libération de 5-HT. À son tour, le 5-HT se lie à un récepteur 5-HT<sub>2</sub> au niveau des cellules épithéliales intestinales résultant, par la voie du phosphatidylinositol, en la formation du sécrétagogue PGE<sub>2</sub>.

Une faible concentration de STb est nécessaire pour causer une sécrétion rapide d'anions dans la lumière intestinale menant au phénomène d'osmose qui résulte en une sécrétion d'eau hors de la cellule. Certaines analyses du contenu en électrolytes des anses ligaturées

intestinales révèlent que le principal ion sécrété, en réponse à STb, est l'anion bicarbonate  $\text{HCO}_3^-$  (Argenzio *et al.*, 1984; Weikel *et al.*, 1986b) et aussi le  $\text{Cl}^-$  (Weikel & Guerrant, 1985) selon la recherche. Par contre une étude du transport d'ions *in vitro* indique que la toxine n'a aucune effet apparent sur le flux de  $\text{Cl}^-$  (Weikel *et al.*, 1986b; Whipp *et al.*, 1987a). Récemment, il a été démontré que la sécrétion intestinale de  $\text{HCO}_3^-$ , empruntant les voies d'AMPc, GMPc ou  $\text{Ca}^{2+}$ , nécessite un canal protéique fonctionnel nommé le Cystic Fibrosis Transmembrane Receptor (CFTR) (Seidler *et al.*, 1997). Pour STb, Fujii *et al.* (1997) proposent un canal CFTR, quoique non connu encore, lors de la réponse sécrétoire. En ce sens, l'influx massif de  $\text{Ca}^{2+}$  à l'intérieur de la cellule épithéliale intestinale mènerait à l'activation de la kinase II (CaMKII), tel que discutée précédemment. Considérant que le CFTR contient 12 sites consensus de phosphorylation cibles de la CaMKII (Kemp & Pearson, 1990), il y aurait probablement phosphorylation du CFTR par la kinase II activée résultant en l'ouverture d'un canal et la sécrétion de  $\text{HCO}_3^-$ .

### 3. Oligomérisation de toxines

#### 3.1. L'antigène protecteur de *Bacillus anthracis*

L'antigène protecteur (PA), le facteur léthal (LF) et le facteur d'œdème (EF) sont trois protéines sécrétées par *Bacillus anthracis* connues comme la toxine de l'anthrax. Elles représentent respectivement la sous-unité A et les deux sous-unités B. La composante PA (83 kDa) se lie spécifiquement à un récepteur à la surface cellulaire et est ensuite clivée à la séquence RKKR<sup>167</sup> par la furine, une protéase cellulaire. Le complexe récepteur-PA clivé (PA63) est internalisé par endocytose dans un endosome. Suivant une acidification de l'endosome, il y a ensuite insertion membranaire de PA63 et formation d'un canal oligomérique. La formation de l'oligomère permet la translocation des facteurs EF et LF dans le cytoplasme. Après coloration négative en microscopie électronique, l'oligomère a été démontré comme étant un heptamère. Par la suite, à l'aide d'expériences en cristallographie, Petosa *et al.* (1997) ont confirmé la nature heptamérique de l'oligomère (Petosa *et al.*, 1997).

### 3.2. L' $\alpha$ -toxine de *Staphylococcus aureus*

L' $\alpha$ -toxine est un polypeptide soluble de 33 kDa considéré comme un facteur de virulence majeur de *S. aureus*. Lors de son interaction avec la membrane, l' $\alpha$ -toxine subit une transition d'un état hydrophile à amphiphile. Ensuite, il y aurait insertion membranaire de monomères. Cette toxine s'oligomérisse à la surface de cellules de mammifères (et de liposomes) pour former un oligomère incrusté dans la membrane de 220 kDa. Une analyse aux rayons-X à basse résolution de microcristaux d' $\alpha$ -toxine nous révèle que l'oligomère aurait une molécularité heptamérique (Gouaux *et al.*, 1994). De même, des évidences électrophysiologiques prouvent la stœchiométrie heptamérique lors de l'étude de conductance du canal formé par l' $\alpha$ -toxine de *S. aureus*. L'observation de sept sauts lors d'étude en bicouche lipidique planaire (PLB) suggère que le canal fonctionnel formé par l' $\alpha$ -toxine en bicouche lipidique plane est un heptamère (Krasilnikov *et al.*, 2000).

### 3.3. L'aérolysine d'*Aeromonas hydrophila*

Autant la proaérolysine que l'aérolysine se lient aux protéines fixées au GPI (glycosylphosphatidylinositol), mais l'activation de la protoxine est absolument nécessaire à l'étape subséquente dans la formation de canal, soit l'oligomérisation. L'aérolysine s'oligomérisse en fonction de sa concentration. Seulement une concentration de toxine supérieure à 10  $\mu$ M (approximativement) permet la formation d'oligomères. La plupart des oligomères formés en solution s'aggrègent et précipitent, mais si ceux-ci sont formés près d'une bicouche lipidique, ils s'y insèrent pour former un canal. Par contre, lorsque l'aérolysine se lie à un récepteur tel que EAR (Erythrocyte Aerolysin Receptor) ou Thy-1 (glycoprotéine majeur de surface des lymphocytes T des rongeurs) sur une bicouche lipidique, l'oligomérisation aura lieu à une plus faible concentration, soit inférieure à 0.1 nM.

L'oligomère d'aérollysine est une structure très stable et facilement observable en gel SDS-PAGE. Il y a dissociation de l'oligomère en présence d'acide formique, mais non en présence d'un acide ou d'une base faible, d'urée, de détergents ou à température élevée. La force d'association entre les monomères d'aérollysine est le résultat d'interactions non-covalentes coopératives entre un grand nombre d'acides aminés. Les domaines 2 et 3 sont impliqués dans l'oligomérisation, particulièrement deux régions du domaine 2; l'une contenant des histidines (H107 et H132) lesquelles doivent être protonées pour qu'il y ait oligomérisation (Buckley *et al.*, 1995) et l'autre riche en tryptophanes (W371 et W373) (van der Goot *et al.*, 1993).

L'analyse des images de cristaux bi-dimensionnelles d'oligomères indique que l'oligomère est formé de sept monomères d'aérollysine (Wilmsen *et al.*, 1992). La symétrie heptamérique a été confirmée par mesure directe de la masse de l'oligomère en spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight) (Moniatte *et al.*, 1996). L'intégration des données de la structure tri-dimensionnelle du monomère avec les images bi-dimensionnelles obtenues de cristaux suggère que les feuillets  $\beta$  du domaine 3 du monomère interagissent pour former l'heptamère générant un tonneau amphipatique avec une surface externe hydrophobe et l'intérieur hydrophile (Wilmsen *et al.*, 1992).

### 3.4. La toxine de *Corynebacterium diphtheriae*

La toxine diphtérique est une protéine de 58 kDa relâchée dans le surnageant de souche toxigénique de *Corynebacterium diphtheriae* (Collier, 1982; Pappenheimer jr, 1977). Sharpe *et al.* (1999) proposent que la toxine diphtérique forme des oligomères à stœchiométrie variable et que la grandeur des pores formés dépend de l'état d'oligomérisation. Il y aurait une relation entre le niveau d'oligomérisation et la concentration de toxine diphtérique (Sharpe & London, 1999).

### 3.5. La $\delta$ -toxine de *Staphylococcus aureus*

La  $\delta$ -toxine de *Staphylococcus aureus* est un petit polypeptide amphipatique de 26 acides aminés (Janzon *et al.*, 1989). En solution aqueuse, une partie de la  $\delta$ -toxine forme une hélice- $\alpha$  et cette hélicité dépend de la concentration de la toxine, soit 31% à 0.2  $\mu$ M jusqu'à 78% à une quantité de 4  $\mu$ M (Thiaudiere *et al.*, 1991).

La réorganisation en hélice  $\alpha$  crée une région hydrophobe dont les interactions avec le milieu aqueux sont énergétiquement défavorables. Ainsi, il devrait y avoir une auto-association des hélices amphipatiques via leurs régions hydrophobes (Thiaudiere *et al.*, 1991). Des niveaux élevés d'aggrégation de la  $\delta$ -toxine, de 21- à 100-mères, ont été caractérisés par centrifugation analytique (Kantor *et al.*, 1972; Kreger *et al.*, 1971) et filtration sur gel (Fitton, 1981). Considérant les propriétés hydrodynamiques (coefficient de sédimentation et mesures de dispersion de la lumière quasi-élastique (QELS)), la  $\delta$ -toxine est décrite comme un modèle tige fait de tétramères de 4 hélices parallèles ou antiparallèles avec leurs axes perpendiculaires au long axe du modèle tige (Thiaudiere *et al.*, 1991). L'association linéaire multimérique des tétramères de  $\delta$ -toxines implique des interactions entre les faces polaires des hélices  $\alpha$  des tétramères. Donc, en milieu aqueux, les  $\delta$ -toxines s'associent par interactions hydrophobes en tétramères et ceux-ci s'associent en polytétramères via des liaisons électrostatiques entre acides aminés acides et basiques (Raghunathan *et al.*, 1990).

## 4. Canaux membranaires

### 4.1 Généralités

Le cytoplasme d'une cellule est un environnement distinct de l'extérieur cellulaire (Tableau 2.). La membrane plasmique représente la barrière physique qui sépare ces deux milieux physiologiques. Les échanges ioniques entre ces milieux extra et intracellulaire permettent l'accomplissement de différentes tâches tel que le maintien de l'équilibre hydrodynamique dans l'intestin, la contraction musculaire, la sécrétion d'hormones et de

neurotransmetteurs ou la propagation d'influx électrique le long des neurones. Le transport d'ions au travers la membrane plasmique s'effectue à l'aide de canaux.

**Tableau 2.** Concentration en ions libres et potentiels d'équilibre pour le muscle squelettique de mammifère

Ion	Concentration extracellulaire (mM)	Concentration intracellulaire (mM)	Potentiel d'équilibre (mV)
Na <sup>+</sup>	145	12	+67
K <sup>+</sup>	4	155	-98
Ca <sup>2+</sup>	1.5	10 <sup>-4</sup>	+129
Cl <sup>-</sup>	123	4.2	-90

Il a déjà été démontré que certaines entérotoxines altéraient l'équilibre ionique intestinal. Notamment, la liaison de l'entérotoxine STa à son récepteur, la guanylate cyclase C (GC-C) transmembranaire, mène à l'ouverture de canaux CFTR responsables de la sécrétion d'ions Cl<sup>-</sup> (Goldstein *et al.*, 1994). De même, les entérotoxines CT du choléra et LT d'*E. coli* via leur sous-unité  $\alpha$  produisent une élévation du niveau d'AMPc menant à une sécrétion électrogénique d'ions Cl<sup>-</sup> (Hirst, 1999). Cependant, il ne semble pas exister d'entérotoxine formant directement des pores au niveau de la membrane épithéliale intestinale.

#### 4.1.1 Bicouche lipidique planaire (PLB)

Les bicouches lipidiques planaires (PLB) sont des portions thermodynamiquement stables de membrane lipidique artificielle. Elles sont préparées sur un orifice dans un septum en Teflon séparant deux solutions aqueuses. Les membranes sont faites de lipides purifiés et représentent un méthode très utile pour l'étude de canal protéique et de toxine formant des pores (PFT) (Hanke & Schlue, 1993; Kagan & Sokolov, 1997). Les avantages sont la facilité de contrôle des paramètres physico-chimiques et une résolution de courant permettant la détection de l'ouverture d'un seul canal. Les désavantages sont la sensibilité du système aux petites quantités d'impureté et la nécessité que le canal s'insère de lui-



même dans la membrane. En plus, la technique permet aussi de reconstituer le récepteur de la toxine dans la PLB (Gruber *et al.*, 1994; Lorence *et al.*, 1995; Schwartz *et al.*, 1997). Le courant de base d'une membrane intacte est très bas et lorsque on y ajoute une toxine formant des pores (PFT), on y observe une augmentation en palier du courant représentant l'ouverture d'un seul canal.

#### 4.1.2 Taille du pore

À partir de la conductance  $G$ , on estime la taille du pore selon l'équation 1:

$$G = \sigma \pi r^2 / l$$

où  $\sigma$  est la conductivité de la solution;  $r$  et  $l$  sont respectivement le rayon et la longueur du pore. On considère dans ce cas-ci que le pore prend la forme d'un cylindre régulier à l'intérieur duquel la mobilité des ions est similaire à celle retrouvée dans la solution extérieure. Il existe une méthode améliorée qui se base sur la mesure de  $G$  en présence de sucres de différentes tailles (Krasilnikov *et al.*, 1992; Parsegian *et al.*, 1995). Advenant que le sucre est capable de traverser le pore,  $G$  décroît, par contre s'il est trop gros,  $G$  demeure inchangé. De cette façon, on détermine la plus grosse molécule pouvant circuler par le canal et on peut estimer la taille du pore formé.

#### 4.1.3 Effets de la charge du pore

Très souvent l'augmentation de la conductance n'est pas directement proportionnelle à l'augmentation de la concentration en sel de la solution, on observe plutôt une relation sous-linéaire attribuable à une effet de saturation. De façon plus explicite, la présence de charges fixes à l'entrée du pore génère localement un champ qui attire et concentre les contre-ions de sorte que le courant sera plus élevé qu'attendu. Cet effet est maximum à faible force ionique et décroît lorsque cette dernière augmente. La dépendance

de la conductance par rapport à la concentration ionique équivaut approximativement à une relation racine carrée entre la conductance et la concentration ionique.

De plus, la présence de charges fixes au niveau du pore permet d'observer deux autres phénomènes: soit la sélectivité cation/anion et la non-linéarité de la courbe courant/voltage ( $I/V$ ). La sélectivité vient du fait que la présence de charges non-compensées à l'ouverture du canal attirera les contre-ions et repoussera les ions de même charge. Le flux plus important d'ions de même charge définit la sélectivité à ce type de charge. Donc, un pore possédant des acides aminés chargés positivement entraînerait une sélectivité envers les anions.

En regard d'une courbe  $I/V$  non-linéaire type, on observera une conductance plus élevée à des potentiels négatifs qu'à des potentiels positifs ou vice et versa. Ceci résulte d'une distribution asymétrique des charges aux deux embouchures du pore. Dans ce cas-ci, les effets de charges seront différents aux deux ouvertures du canal générant ainsi des courants différents.

#### 4.1.4 Barrière de canal

Plusieurs pores formés de toxines ne demeurent pas ouverts tout le temps, mais alternent plutôt entre un état ouvert à conductance élevée et un état fermé à faible conductance. Ce comportement typique pour les canaux endogènes est généralement désigné barrière de canal. Il peut y avoir un contrôle par le voltage d'où le terme « voltage-gated » ou chimique. L'état fermé ne signifie pas que le pore va être chassé de la membrane, mais simplement un état différent. La barrière peut provenir d'un changement conformationnel d'une région du pore ou d'un changement d'état d'ionisation des charges fixes des acides aminés chargés à l'embouchure du pore (Korchev *et al.*, 1997).

## 4.2 Canaux potassiques

Les canaux potassiques contribuent au contrôle du volume cellulaire, du potentiel membranaire et à la sécrétion de sels et d'hormones et autres fonctions. La caractérisation d'unité de canal potassique démontre plusieurs types de canaux hautement sélectifs au  $K^+$  avec une plage de conductance variant de 10 à 300 pS, soit le déplacement de  $6 \times 10^6$  à  $2 \times 10^8$  ions au travers un canal par seconde sous un champ électrique potentiel de 100 mV. Ce haut taux de transfert ionique n'a rien d'extraordinaire excepté le fait que seuls quelques cations inorganiques comme  $Tl^+$ ,  $Rb^+$ ,  $K^+$ ,  $NH_4^+$  et rarement  $Cs^+$  peuvent traverser ces canaux avec un courant détectable. Les cations plus imposants tel que  $CH_3NH_3^+$  ne peuvent traverser; la région transversale la plus étroite du pore a un diamètre ionique équivalent à celui du  $Cs^+$  ou environ 3.4 Å (Hille, 1973). Les canaux potassiques doivent aussi avoir un mécanisme efficace d'exclusion des cations alcalins de plus petite taille comme  $Li^+$  et  $Na^+$  lesquels ont des diamètres ioniques d'environ 1.2 Å et d'environ 1.9 Å, respectivement. Cette structure moléculaire spécialisée est connue comme un filtre de sélectivité (Hille, 1992) et réfère à une région étroite du pore. Le parcours de conduction doit être capable de lier plus d'un  $K^+$  simultanément et avoir au moins une région du tunnel où un seul ion puisse passer à la fois. Afin de surmonter le problème de transfert d'ion  $K^+$  hautement hydraté d'une solution aqueuse à constante diélectrique élevée au travers d'une membrane hydrophobe à faible constante diélectrique, la surface de la portion étroite du pore doit être tapissée de groupements appropriés (i.e.  $-OH$ ,  $-C=O$ ,  $-COO^-$ ). Ceci stabilise énergétiquement l'ion  $K^+$  déshydraté. Les ions alkylammonium tel que le tétraéthylammonium ( $TEA^+$ ) bloquent physiquement tous les canaux potassiques en se liant dans le même chemin utilisé par le  $K^+$  (Choi *et al.*, 1993; French & Shoukimas, 1981).

Le premier membre de la famille des canaux potassiques à être cloné fut un canal  $K^+$  à barrière au voltage ( $K_V$ ) (Papazian *et al.*, 1987). Cette protéine contient un seul motif S1-S6 correspondant à six segments transmembranaires avec la présence d'une boucle externe (région-P) entre les S5 et S6 (MacKinnon & Miller, 1989). Un canal  $K_V$  fonctionnel est formé d'un tétramère à symétrie radiale dont le canal ionique est situé à l'interface centrale des quatre monomères  $\alpha$  (MacKinnon, 1991). À ces quatre sous-unités  $\alpha$ , on retrouve parfois quatre sous-unités  $\beta$  additionnelles régulant certaines fonctions. Il existe 20

différents gènes codant pour des monomères  $K_V$  et ils sont classés par homologie en neuf sous-familles,  $K_{V1}$  à  $K_{V9}$  (Salinas *et al.*, 1997). Les canaux  $K_V$  contiennent tous un segment caractéristique S4 contenant 5 à 7 arginines ou lysines. Le S4 positivement chargé est la composante structurelle responsable du mécanisme de sensibilité au voltage.

Les études de clonage ont aussi mis en évidence des canaux activés par des ligands intracellulaires possédant aussi le motif S1-S6: le canal potassique à haute conductance activé par le  $Ca^{2+}$  (maxi  $K_{Ca}$ ) (Butler *et al.*, 1993) et le canal potassique activé par les nucléotides cycliques (CNG ou  $K_{ATP}$ ) (Yau, 1995). Ces deux protéines ont un domaine cytoplasmique unique situé du côté carboxy-terminale de S1-S6 contenant le site de liaison des ligands d'activation,  $Ca^{2+}$  et GMPc ou AMPc, respectivement. Structuellement, les canaux  $K_{Ca}$  peuvent être divisés en deux groupes: canaux à conductance faible ou intermédiaire (SK/IK) et avec une forte conductance (BK). Les canaux BK contiennent un segment transmembranaire additionnel (S0) en N-terminal.

Le membre dont la structure est la plus simple dans cette famille est le canal potassique  $K_{IR}$  (Inward Rectifier) (Kubo *et al.*, 1993). Ainsi nommé parce que leur comportement courant-voltage démontre davantage de transfert  $K^+$  dans la direction entrant que sortant. Ces canaux hautement sélectifs au  $K^+$  sont dépourvus de la portion S1-S4 du motif S1-S6 des canaux  $K_V$  ne peuvent donc pas répondre à l'ajustement au voltage. Il existe six sous-familles de canaux  $K_{IR}$  (Nichols & Lopatin, 1997). Il y a aussi TOK1 (Two-pore Outward rectifier  $K^+$  channel) chez la levure (Ketchum *et al.*, 1995) et chez l'humain le TWIK-1 (Two-pore Inward rectifier  $K^+$  channel) (Lesage *et al.*, 1996). Tous les canaux potassiques contiennent une séquence motif hautement conservée dans la région-P (TMTTVGYG) responsable de la sélectivité au  $K^+$  (Heginbotham *et al.*, 1994).

### 4.3 Canaux calciques

Les canaux calciques sont des complexes composés de multiples sous-unités dont une sous-unité centrale  $\alpha_1$ , conductrice d'ion, et de petites sous-unités accessoires  $\alpha_2$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Les sous-unités sont associées entre elles de façon non-covalente. La sous-unité  $\alpha_1$  (175

kDa) contient quatre domaines transmembranaires homologues semblables à ceux retrouvés pour la sous-unité  $\alpha$  du canal sodique chez le cerveau du rat. Chaque domaine transmembranaire d' $\alpha_1$  possède le motif S1-S6 retrouvé chez les canaux potassiques et sodiques. La sous-unité  $\beta$  n'interagit pas avec la membrane plasmique, mais s'associe plutôt avec le domaine intracellulaire de  $\alpha_1$ . La sous-unité  $\gamma$  (30 kDa) associée  $\alpha_1$  a au moins un segment transmembranaire (Catterall *et al.*, 1989). Il existe une diversité moléculaire de canaux calciques: environ six gènes codant  $\alpha_1$ , quatre  $\beta$ , un  $\alpha_2$  et un  $\gamma$ . Selon la classification des canaux calciques, ils sont soit de type-T (Transient) activé à faible voltage et inactivé rapidement, ou soit activé à fort voltage: type-L (Long-lasting) sensible au 1,4-dihydropyridine et type-N (Neuronal) sensible à la  $\omega$ -conotoxine GVIA. Le développement de nouvelles toxines a mené à une sous-classification des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  activés à fort voltage: type-P, bloqué par la  $\omega$ -agatoxine-IVa, type-Q, bloqué par la  $\omega$ -conotoxine-MVIIC et type-R résistant à la plupart des toxines (Wheeler *et al.*, 1994).

Il existe aussi les canaux calciques indépendant au voltage. Parmi ceux-ci, il y a les canaux-récepteurs ionotropiques (ROC), les SMOCs (Second Messengers Operated Channel) activés par des seconds messagers et les SOCCs activés en conséquence à une flux des citernes à calcium dans le cytoplasme.

#### 4.4 Canaux chloriques

Les canaux chloriques sont impliqués dans plusieurs fonctions cellulaires telles que, entre autres, la régulation du volume cellulaire, la sécrétion et la stabilisation du potentiel membranaire (Valverde *et al.*, 2000). Structurellement, on les classifie en I) récepteur-canal activé par un ligand, II) canal CFTR régulé par l'AMPc, III) canal activé au voltage (CLC) et IV) canal activé par le calcium. Les canaux CFTR, régulé par l'AMPc, sont détournés de leurs fonctions normales mentionnées ci-haut lors de la pathogénie à l'entérotoxine STa.

## 4.5 Toxines formant des pores membranaires (PFT)

La cellule est entourée d'une membrane qui la protège de son environnement extérieur. Un moyen que les toxines bactériennes ont développé pour déstabiliser les cellules, c'est d'interférer au niveau de l'intégrité de la membrane plasmique. Il existe deux principales classes soit les toxines de type A-B qui catalysent la translocation de la sous-unité active de la toxine à l'intérieur de la cellule ou soit les toxines formant des pores qui augmentent la perméabilité de la membrane cellulaire aux électrolytes. Dans les deux cas, il y a formation de canaux exogènes dans la membrane cellulaire.

### 4.5.1 L' $\alpha$ toxine de *Staphylococcus aureus*

L' $\alpha$ -toxine de *S. aureus* est sécrétée par la plupart des souches pathogènes comme un polypeptide soluble de 33 kDa. Après liaison spécifique ou non à différents types cellulaires (Bhakdi & Tranum-Jensen, 1991), l' $\alpha$ -toxine s'oligomérisse et forme un canal transmembranaire. Lors d'expérience PLB avec des membranes composées de phospholipides purifiés, l' $\alpha$ -toxine formait un canal voltage-dépendant sélectif aux anions avec une conductance uniforme d'environ 90 pS dans une solution 0.1 M KCl et linéairement proportionnel à la concentration en sel (Manestria, 1986). À l'aide de l'équation 1 déjà décrite à la page 27, on estime le rayon du pore à 0.6 nm. D'autres auteurs en utilisant la méthode du plus petit polymère de sucre incapable de traverser le canal ont estimé à 1.4 nm le rayon du pore (Krasilnikov *et al.*, 1992).

### 4.5.2 L'aérolysine d'*Aeromonas hydrophila*

L'aérolysine semble être le principal facteur de virulence des infections causées par *Aeromonas hydrophila* (Parker *et al.*, 1996). Le dimère de protoxine sécrétée est activé par protéolyse (Abrami *et al.*, 1998). Le dimère d'aérolysine est principalement organisé en

structure  $\beta$  et se réorganise dans la membrane en un canal heptamérique adoptant la forme d'un champignon (Parker *et al.*, 1994; Wilmsen *et al.*, 1992). En PLB, l'heptamère d'aérolysine s'insère dans la membrane pour former un pore voltage-dépendant légèrement sélectif aux anions (Wilmsen *et al.*, 1990). Les canaux ont une taille uniforme, une conductance de 145 pS dans 0.3 M NaCl et ils se referment rapidement à des voltages supérieurs à 70 mV. L'ion  $Zn^{2+}$  induit le blocage réversible des côtés *cis* et *trans* en raison de deux à trois liaisons possibles d'ion  $Zn^{2+}$  dans la lumière du pore. Considérant l'empêchement stérique et la viscosité, le rayon du canal est estimé entre 1.9-2.3 nm.

#### 4.5.3 L'endotoxine cristalline de *Bacillus thuringiensis*

Les  $\delta$ -endotoxines sont des protéines insecticides synthétisées par *Bacillus thuringiensis*. Elles cristallisent et forment des inclusions parasporales (Gill *et al.*, 1992). On regroupe les  $\delta$ -endotoxines en deux familles: celles qui forment des cristaux (Cry) et les cytolytiques (Cyt). Elles sont différentes tant par leur taille que dans la reconnaissance cellulaire. Les  $\delta$ -endotoxines Cry sont produites sous forme de protoxines lesquelles subissent une activation par une protéase présente dans l'intestin d'insecte. La forme active de Cry (66-67 kDa) se lie à un récepteur spécifique de l'épithélium au milieu de l'intestin d'insecte (Cannon, 1996).

Les structures obtenues en cristallographie de Cry IIIA et Cry IAa ont révélées la même structure pour trois domaines qui semble être communs à toutes les endotoxines Cry (Grochulski *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1991). Alors qu'il a été démontré que Cry forme des canaux dans des bicouches lipidiques en absence de récepteurs spécifiques (Schwartz *et al.*, 1993; Slatin *et al.*, 1990), on observe aussi une formation accélérée de canaux lorsqu'il y a reconstitution du récepteur aminopeptidase N (APN) en PLB (Lorence *et al.*, 1997; Schwartz *et al.*, 1997). Les canaux possèdent différentes propriétés selon la sous-classe particulière de Cry, la méthode d'activation et la présence du récepteur. De façon générale, les canaux sont sélectifs aux cations et dépendant du pH (un pH alcalin comme retrouvé

dans l'intestin d'insecte est nécessaire) et présentent plusieurs états de conductance avec de grandes plages de conductance.

**Tableau 3.** Propriétés des canaux formés par des toxines bactériennes dans des membranes lipidiques.

Sous-classe Cry	Sélectivité	Conductance (pS)	Tampon (mM)	pH	Référence
CryAa	Non déterminée	450	150 KCl	9.0	(Grochulski <i>et al.</i> , 1995)
CryIC	cation	100-200	150 KCl	9.5	(Schwartz <i>et al.</i> , 1993)
	anion	25-35		6.0	
CryIIA	aucune	25	300 KCl	9.7	(English <i>et al.</i> , 1994)

#### 4.5.4 Les toxines RTX

Les toxines RTX (répétitions dans les toxines) sont un groupe de toxines à structure et fonction apparentées et sont produites par les bactéries à coloration Gram négatif (Coote, 1992). Toutes possèdent plusieurs copies d'un nonapeptide caractéristique riche en glycine et aspartate impliqué dans l'activité dépendante du  $Ca^{2+}$  (Boehm *et al.*, 1990). Quoique la plupart sont hémolytiques, les toxines RTX ciblent les cellules de mammifères du système immunitaire et sont mieux définies en tant que leucotoxines. Après traduction, les toxines RTX sont acylées par une chaîne d'acide gras (Hardie *et al.*, 1991; Issartel *et al.*, 1991). Bien que certaines toxines RTX possèdent un récepteur protéique spécifique, elles utilisent les lipides membranaires comme accepteurs de faible affinité. Les RTX induisent une hémolyse via un choc osmotique suivant la formation de pores hydrophiles. La capacité des toxines RTX à former des pores a été démontrée dans des modèles membranaires tels qu'en vésicule et PLB.



L'hémolysine HlyA d'*Escherichia coli* se lie au modèle membranaire en PLB de façon dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  (Dobereiner *et al.*, 1996). La nécessité d'agrégation pour la formation de pores a été proposée (Ostolaza *et al.*, 1993) sans définir la taille des agrégats. Les canaux formés en PLB sont sélectifs aux cations avec une conductance dépendante du pH de 300 pS dans 0.1 M KCl à pH 7.0 (Benz *et al.*, 1989; Menestrina *et al.*, 1987; Ropele & Menestrina, 1989). Le rayon du pore de HlyA a été estimé à 0.6 nm. L'ouverture du canal est strictement dépendant du voltage (Menestrina & Ropele, 1989).

#### 4.5.5 La $\delta$ -toxine de *Staphylococcus aureus*

La  $\delta$ -toxine de *Staphylococcus aureus* est un polypeptide de 26 acides aminés qui lyse différents types de cellules et membranes artificielles (Lee *et al.*, 1987; Thiaudiere *et al.*, 1991). En bicouche orientée préparée après co-solubilisation de la  $\delta$ -toxine et de dodécylphosphocholine (DPPC) dans un solvant organique, la  $\delta$ -toxine n'a pas d'orientation préférée (Brauner *et al.*, 1987). La profondeur d'insertion de la  $\delta$ -toxine dans la bicouche dépend de l'état physique des lipides (gel ou fluide). En dessous de la température de transition, la  $\delta$ -toxine affecte seulement le groupement phosphate du phospholipide tel que démontré par  $^{31}\text{P}$ -NMR, tandis qu'en état fluide, les méthylènes des chaînes d'acyle ( $^2\text{H}$ -NMR) sont aussi perturbés (Dufourc *et al.*, 1990). Les régions hydrophiles hélicoïdales doivent être masquées de l'intérieur hydrophobe de la bicouche pour que la  $\delta$ -toxine puisse s'insérer. Ainsi, une agrégation des hélices exposant leurs faces apolaires aux lipides et formant un canal hydrophile au centre est attendue (Cornut *et al.*, 1993; Thiaudiere *et al.*, 1991).

Une minimisation d'entropie favorise la formation de canaux fait de six à huit hélices antiparallèles (Raghunathan *et al.*, 1990), ce qui est en accord avec la masse moléculaire relative des complexes de  $\delta$ -toxine observés en présence de Tween 80 (Freer & Birkbeck, 1982). Ainsi, par diffusion latérale, six à huit monomères forment un canal membranaire lequel en PLB est légèrement sélectif aux cations. On observe deux différents types de canaux, un petit et un gros avec des conductances respectives de 70-100 pS et 450 pS

(Mellor *et al.*, 1988). La conductance du canal est dépendante de la concentration en sel et du voltage appliqué. Tel qu'observé avec les toxines alaméthicine (Menestrina, 1988) et mélittine (Tosteson *et al.*, 1990), le canal formé par la  $\delta$ -toxine est aussi réglé par le voltage.

Le canal doit être formé à partir de  $\delta$ -toxines hélicoïdales pré-associées et couchées à l'interface de la bicouche, alors qu'il n'y a aucun canal formé à partir de monomères de  $\delta$ -toxine isolés en position transmembranaire (Biggin & Sansom, 1996). À concentration plus élevée, les  $\delta$ -toxines s'associent en longs radeaux d'hélices antiparallèles lesquels peuvent basculer vers l'intérieur et ainsi former un pore. Les hélices des  $\delta$ -toxines sont orientées dans des directions opposées, d'après le modèle de Raghunathan, cette disposition antiparallèle est favorisée énergétiquement (Raghunathan *et al.*, 1990).

# **MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS**

## **III**

Article 1 : Binding to sulfatide and enterotoxicity of various  
*Escherichia coli* STb mutants

V. Labrie, H.-E. Beausoleil, J. Harel & J.D. Dubreuil

Microbiology (2001, 147: 3141-3148)

Attachement to Sulfatide and enterotoxicity of different *Escherichia coli*  
STb mutants

Running title: Sulfatide binding site of STb toxin

Keywords: enterotoxin b, mutagenesis, binding, sulfatide and enterotoxicity

Subject category: Pathogenicity and Medical Microbiology

Authors: Vincent Labrie, Hans-Erick Beausoleil, Josée Harel, and J. Daniel Dubreuil\*

Affiliation:

Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, Département de pathologie et microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada

\* Corresponding author. Mailing address: Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, Département de pathologie et microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, 3200 sicotte, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6.

Phone: (450)-773-8521, ext. 8433.

Fax: (450)-778-8108

E-mail: daniel.dubreuil@umontreal.ca

## Summary

Binding of the heat-stable *E. coli* enterotoxin b, (STb) 48 amino acids to the functional receptor sulfatide constitutes the first step in inducing secretory diarrhea in intestinal lumen of animals. The nuclear magnetic resonance structure of this toxin dictated the choice of amino acids for site-directed mutagenesis to delineate the binding site of STb to sulfatide. Amino acids facing the solvent either in the loop or the hydrophobic  $\alpha$  helix were selected. Seventeen site-specific mutants of STb toxin were produced and purified by high pressure liquid chromatography. Enterotoxicity of the 17 mutants was determined using a rat loop assay and binding was evaluated using a microtiter plate binding assay. Both hydrophobic and electrostatic interactions are important for STb attachment. When mutations (F37K, I41S and M42S) were introduced into the hydrophobic  $\alpha$ -helix to lessen hydrophobicity, binding activity and enterotoxicity decreased by more than 6-fold. The loop defined by C21 and C36 also made specific contributions. Mutants generated at basic residues (K22, K23 and R29) within this region exhibited both reduced binding activities and reduced toxic activities. Significantly, when the negatively charged D-30 was substituted for either alanine or valine, the binding to sulfatide was about twice that of native STb whereas the enterotoxicity was reduced by half.

## Introduction

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) strains cause severe diarrheal diseases in humans and animals. Two classes of enterotoxins are responsible for the pathogenesis: heat-labile enterotoxins (LTI and LTII) which are structurally and functionally related to the cholera toxin (Kaper *et al.*, 1995; Spangler, 1992), and the heat-stable toxins (STs). Two subtypes, sharing no homology at the nucleotide or amino acid levels, are identified as heat-stable toxins, namely STa and STb (Dubreuil, 1997). These low molecular mass toxins are extracellular enterotoxins; STb is methanol-insoluble whereas STa is not. STa is an 18- or 19-amino acid acidic peptide that binds to particulate transmembrane guanylate cyclase C (GC-C). This binding leads to an increase in cGMP and eventually the opening of the cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) channel responsible for chloride secretion (Goldstein *et al.*, 1994).

In contrast to LT and STa toxins, there is no evidence that STb is associated with an intracellular elevation of cyclic nucleotide (Kennedy *et al.*, 1984; Peterson & Whipp, 1995; Weikel & Guerrant, 1985). Instead, *in vitro* studies have shown that the intestinal secretion pathway involves the activation of a GTP-binding regulatory protein ( $G_{\alpha 13}$  protein) sensitive to pertussis toxin. This action results in an intracellular calcium elevation through a receptor-dependent ligand-gated  $Ca^{2+}$  channel (Dreyfus *et al.*, 1993). The ensuing high level of intracellular  $Ca^{2+}$  is presumably involved in activation of a calmodulin-dependent protein kinase II (CaMK II) which could open an undetermined ionic channel (Fujii *et al.*, 1997). In addition, intracellular concentration of  $Ca^{2+}$  may regulate phospholipases A<sub>2</sub> and C which catalyze the release of arachidonic acid from the membrane phospholipids, and ultimately the formation of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) known as a secretory agent (Fujii *et al.*, 1995; Hitotsubashi *et al.*, 1992a; Peterson and Whipp, 1995). Recently, our laboratory demonstrated *in vivo* the functionality of sulfatide (SFT) as a receptor for STb (Rousset *et al.*, 1998). We determined its affinity constant ( $K_d$ ) between 2-6  $\mu$ M (Beausoleil & Dubreuil, 2001). Unsolved remain the steps between the attachment of STb to its receptor and the activation of the G protein presumably involved in signal transduction.

STb toxin synthesized as a 71-amino-acid precursor (Fig. 1) undergoes cleavage of the N-terminus signal sequence (residues 1-23) (Kupersztoch *et al.*, 1990). This process results in a 48-amino-acid polypeptide 5200 Da, pI, 9.6 (Handl *et al.*, 1993). Maturation also involves the formation of two disulfide bridges: between C10 and C48 and between C21 and C36. Both disulfide bridges are important for stabilization of the molecule tertiary structure (Sukumar *et al.*, 1995) and indispensable for enterotoxicity (Arriaga *et al.*, 1995; Okamoto *et al.*, 1995). Nuclear magnetic resonance studies of STb have established a structure having two antiparallel  $\alpha$ -helix motifs separated by a loop. An amphipathic helix between residues 10 to 22 exposes several polar side chains to the solvent. Facing this is a hydrophobic helix extending from residues 38 to 44. The glycine rich-loop presents some amino acids that previous mutagenesis studies have demonstrated as being important in enterotoxicity (Sukumar, et al., 1995).

Mutagenesis studies (Table 1.) (Dreyfus *et al.*, 1992; Fujii *et al.*, 1994) have reported the relative importance of some amino acids in enterotoxicity, but none have been conducted in order to evaluate their implication in the attachment to the sulfatide receptor. Consequently, nothing is known about the possible segregation between the binding domain and the domain responsible for enterotoxicity. Since it has been shown that the glycine-rich motif could participate in various functions in proteins, such as in the flexible arm of the monomeric  $\alpha$ -hemolysin of *Staphylococcus aureus* allowing its membrane insertion (Ward *et al.*, 1994), it was of interest to further investigate the glycine-rich loop of STb between C21 and C36. Likewise, the hydrophobic region of the STb  $\alpha$ -helix share some structural properties with the *S. aureus* pore-forming  $\alpha$ -toxin that also possesses amphipathic and hydrophobic  $\alpha$ -helices involved in pore formation (Lala & Raja, 1995; Ward, et al., 1994).

Although a small polypeptide, STb has primary and secondary structures possessing some features that could play important roles in binding to a receptor and either cell penetration or signal transduction involving a G protein. In this paper our objective was to confirm or refute the role of selected amino acids in enterotoxicity and also to delineate the amino acids involved in the interaction of STb with sulfatide.



## Methods

**Oligonucleotide-directed mutagenesis and DNA sequencing.** Oligonucleotide-directed site-specific mutagenesis was performed using the U.S.E. Mutagenesis Kit purchased from Pharmacia Biotech. The mutagenic primers (Table 2) used to generate point mutations were synthesized by Gibco BRL. The plasmid pMal-STb, already described (Bossé *et al.*, 1993), served as template for simple and double mutations. The mutated plasmid pMal-STb-R29A served for one double (K23A-R29A) mutation. All mutants were confirmed by automated sequencing with the *RmalE* primer 5'-GTAACGCCAGGGTTTTCC-3' at the DNA sequencing core facility (University of Maine, Orono, USA) by using an ABI model 373A stretch DNA sequencer.

**Purification.** In order to obtain pure STb mutants and native STb enterotoxin, the peptides were produced according to a previously described method (Handl, et al., 1993). Briefly, an *E. coli* strain HB101, harboring the plasmid pMal-STb with or without a selected mutation, highly expressed the fusion protein, MBP-STb or MBP-mutated STb, under the control of  $P_{tac}$ . Following the recovery from osmotic shock, the fusion protein was affinity purified by using an amylose resin (New England Biolabs Ltd, Mississauga, Ontario, Canada) and cleaved with the protease factor Xa. The cleaved material was loaded on a  $C_8$  reverse-phase microbore column (Applied Biosystems) and eluted with an acetonitrile gradient (Model 130A Separation System, Applied Biosystems). Purified peptides were lyophilized and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The purity of the toxin and mutants was routinely verified by N-terminal sequence analysis using Edman degradation (Applied Biosystems model 470A gas-phase sequencer) as described before (Handl, et al., 1993).

**Circular dichroism analysis.** Circular dichroism (CD) measurements carried out on a Jasco J-710 spectropolarimeter. Far UV (300 to 185 nm) runs were conducted in a 0.1-cm cell maintained at room temperature. Concentrations of STb and mutants were adjusted to

0.75 mg/ml in phosphate buffer 0.02 M (pH 7.2). The data collected were computer-averaged for ten scans, baseline subtracted, and smoothed.

**Microtiter Plate Binding Assay (MPBA).** U-bottom polystyrene microtiter plates (Serocluster, Costar) were coated by overnight evaporation of 50  $\mu$ l of methanol-diluted sulfatide (500ng)(Sigma). Free sites were blocked with 200  $\mu$ l per well of phosphate-buffer (PBS)-casein (0.3%, w/v) pH 7.4 for 2h at room temperature. Purified STb (500 ng) toxin or mutants in 50  $\mu$ l PBS (0.1 M phosphate containing 150 mM NaCl) pH 7.0 were added per well in triplicate for 1h at 37°C. After three washes with PBS-casein, each well was filled with 50  $\mu$ l of rabbit monospecific anti-STb antibodies diluted 1:1000 in PBS-casein for 1h at 37°C. The plates were washed three times with PBS-casein. Goat anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase (Jackson Immunoresearch) was diluted 1:3000 in PBS-casein and 50  $\mu$ l was applied to each well before incubation at 37°C for 1h. Following three washes with PBS-casein, 50  $\mu$ l of the chromogenic substrate ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)] (Sigma) (0.4mM) dissolved in citrate buffer pH 4.0 containing 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were added. The optical density was measured at 410 nm using an automatic enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) reader (model MR5000, Dynatech Laboratories).

Triplicates of methanol without sulfatide served as negative control. For analysis, the mean optical density obtained for these wells was subtracted from the mean optical density for STb or each mutants tested. The value for STb was considered as 100% binding and all the data were calculated relative to this value. The final value represents the mean of at least two assays.

**Ligated rat jejunal loop assay.** Enterotoxicity studies were conducted using a ligated rat jejunal loop assay as described previously (Dubreuil *et al.*, 1991). Briefly, 6- to 8-week-old white male rats (Sprag Dawley C.D.; Charles River Ltd) were fasted for 48 h and anesthetized. The small intestine was exteriorized following a midline abdominal incision and rinsed for 5 min with 8 ml of 0.85% saline solution containing 300  $\mu$ g of soybean trypsin inhibitor (Boehringer GmbH, Mannheim, Germany) per ml. A series of seven 5-cm-

long ligated segments (loops) was made in the jejunum. The posterior 30% of the small intestine starting at the caecum was not used. Each loop received 5  $\mu\text{g}$  of the test material in 500  $\mu\text{l}$  20mM Tris-HCl buffer (pH 6.8) containing 300  $\mu\text{g}$  of trypsin inhibitor per ml. Loops receiving only the buffer were considered as the negative controls. The abdominal incision was closed. Three hours later, the rats were euthanized and the amount of fluid in each loop was measured. Results are expressed as the ratio of milliliters of fluid accumulated per centimeter of ligated jejunal segment. Each mutant was tested twice in each rat varying the position among the loops, and at least six rats were used for each mutant. In order to minimize the effect of sample position, two mutants and two STb positive controls were alternated in each rat. Samples were always separated by buffer (negative control).

For analysis, the mean of three negative controls were subtracted from the values of two positive controls (STb alone) and from two samples of each mutant tested, in the same rat. Finally, from these results the mean and standard deviation were calculated, omitting the highest and the lowest values. The value for STb was considered as 100% biological activity and all the data were transformed relatively to this value.

## Results

### **Analysis of STb mutants by CD.**

Properly oxidized disulfide bonds have been shown to be important for full STb enterotoxicity (Arriaga, et al., 1995). In our study, we observed that STb attachment to sulfatide is also dependent on the presence of oxidized disulfide bonds. Upon  $\beta$ -mercaptoethanol treatment, the binding to SFT decreased to 10% (data not shown). Because important conformational changes induced by point mutations in STb could prevent the proper oxidation of cysteines in disulfide bridges, we have analyzed each mutant by measuring their CD spectra to confirm that all mutants retained their full structural integrity and in particular the presence of both disulfide bonds. Thus, the main chain structure of the STb enterotoxin, representing the  $\alpha$ -helix-loop- $\alpha$ -helix pattern, appears not likely to be greatly affected by our site-directed mutagenesis. The CD spectra were similar to native STb, with the exception of mutant M42S which seems slightly different (data not shown).

### **Hydrophobicity profiles of STb mutants.**

As shown in Fig. 2, STb mutants were purified to homogeneity as demonstrated by the single elution peak using a  $C_8$  reverse-phase column. These chromatograms represent the hydrophobicity profiles of the toxin mutants generated. As expected, mutations, changing a nonpolar residue for a polar one, introduced in the hydrophobic  $\alpha$ -helix (F37, I41 and M42) diminished their retention time ( $t_R$ ) compared to native STb toxin. Almost all toxin mutants in the loop ( $C^{21}$ - $C^{36}$ ) were produced using the alanine-scanning procedure (Cunningham & Wells, 1989). In this case, the  $t_R$  of the mutants was increased indicating, a predicted loss of polarity.

### **Relative importance of the STb loop in attachment to sulfatide.**

The microtiter plate binding assay, a technique derivated from ELISA allows a useful quantification of the affinity between a ligand and a receptor. In our study, we measured the interaction of different STb mutants for their known sulfatide receptor. This glycosphingolipid is a sulfated galactose residue joined to a ceramide moiety [Gal(3SO<sub>4</sub>) $\beta$ 1Cer]. The evaluation of binding was done using the optimal parameters as determined for wild-type STb toxin. All mutants and STb toxin reacted equally with the

polyclonal monospecific anti-STb serum (data not shown). We first examined the charged amino acids present in the loop of STb. As shown in Fig. 3., a double mutation introduced in the contiguous lysines (22-23) presented an average binding diminution of 91%. When these lysines were mutated independently, relative attachment was respectively 52% and 54% of native STb. Arginine 29 was also changed for alanine, alone or co-mutated with Lys 23. These modified toxins exhibited SFT-binding levels of 45% and 40%, respectively. The double mutation K23A-R29A, however, did not show any decrease in SFT-binding affinity over that obtained with the single mutations K23A or R29A.

To establish the implication of the loop flexibility or simply the role of glycines in sulfatide-binding, all glycines present in the loop (Gly-24, -27, -31, and -34) were subjected to site-directed mutagenesis. When tested for their binding relative to the wild type, values were reduced to 49, 29, 41, and 118%. The Asp-30, also present in the loop, was changed for either alanine or valine resulting in hyper-attachment of STb polypeptide to sulfatide. D30A was binding less to SFT (150%) than D30V (210%).

#### **Importance of the hydrophobic $\alpha$ -helix in attachment to sulfatide.**

In order to reduce the hydrophobicity features of the C-terminal  $\alpha$ -helix, some highly nonpolar residues pointing to the solvent (Phe-37, Ile-41, and Met-42) were targeted. None of them, even mutated in combination, changed for negatively charged, positively charged, or polar residues, have shown a binding activity greater than 10% of native STb, with the exception of mutant M42R which expressed the same attachment to sulfatide as STb. Among all mutants, the double mutation I41E-M42R displayed the lowest affinity for the receptor (3%).

#### **Relative biological activity.**

The rat loop assay is a standard method which was proven to be useful for evaluating the toxicity of STb toxin. Among the 12 single mutants depicted in the Fig. 3, the most important decrease in toxicity were noted with three residues (F37K, I41S, and M42R) located in the nonpolar helix and two located in the loop (G24A and G31A). The biological activity detected in rat loop assay for these five mutants averaged 11, 11, 6, 11, and 1%, respectively. For the double mutation I41E-M42R intestinal enterotoxicity (11%) was

similar to the single mutations. Inside the STb loop, diminution of the toxicity was observed with three single mutants assigned to basic residues of the loop (K22A, K23A, and R29A) for which the enterotoxicity decreased to about 65, 22, and 51%, respectively. The consequence of combining substitutions were also studied. The double mutants K22A-K23A and K23A-R29A showed secretory activities of about 17 and 7%, respectively. These values are lower than the corresponding single mutants. Small changes in toxicity were noted with D30A, for which the enterotoxicity was about 51%. For mutants G27P and G34A, the enterotoxicity was reduced to 20 and 13%, respectively.

## Discussion

In this study, we examined the role of specific amino acids of STb in recognition and binding to SFT and in the enterotoxicity determined in the rat loop assay. As the positively charged amino acids were previously shown to be important for toxicity, they were selected and tested in this study for binding to SFT. The loop region (C<sup>21</sup>-C<sup>36</sup>) and hydrophobic  $\alpha$ -helix were of special interest because they comprise respectively numerous charged and hydrophobic amino acids. As Sukumar *et al.* (1995) have determined the nuclear magnetic resonance solution structure for STb it was possible to make a critical choice about amino acids pointing into the solvent that could play a role in SFT binding and toxicity (Sukumar, *et al.*, 1995).

According to the highly basic *pI* (9.6) of STb and because of the anionic sulfate residue carried by SFT receptor, it is conceivable that some positively charged amino acid residues of STb could participate in bringing together and in binding to sulfatide. Previously, Fujii *et al.* (Fujii, *et al.*, 1994) demonstrated that the lysine residues at positions 22 and 23 were important in the expression of the enterotoxic activity of STb. Dreyfus *et al.* (Dreyfus, *et al.*, 1992) described the role of arginine 29 in toxicity. Therefore, these basic residues were tested for their affinity toward SFT using alanine replacement mutagenesis. The binding assay was done in a buffer containing 150 mM NaCl to more accurately mimic the physiologic state. The dissociating salt should also help to neutralize the surface charges found on STb toxin. Because a significant decrease was observed in binding activity with mutant K22A, K23A, and R29A, the individual amino acid residues K22, K23, and R29 have demonstrated an important and equivalent implication in the attachment to SFT. Yet, K22 and K23 seem to have an important role in binding as the double mutant K22A-K23A significantly exhibited less binding capacity to SFT than the double mutant K23A-R29A. Moreover, an additive effect in binding reduction was noted when K22 and K23 were comutated. The results obtained concerning the enterotoxicity correlate most of the time with the results obtained for the attachment to SFT. This was expected because the binding of a toxin to its receptor is the trigger step in pathogenesis leading to specific toxic consequences. Significantly, lysine residue at position 23 seems to have an additional role in enterotoxicity as inferred by the dissociation observed for mutants K23A, K22A-K23A

and K23A-R29A between the enterotoxic and binding activities. Discrepancies were noted between our results and those of Fujii *et al.* (Fujii, et al., 1994), notably about the enterotoxicity of Lys-22. K22L mutant was shown to be less enterotoxic (10%) than K22A mutant (70%) presented in this study. This divergence may be explained by the shorter side chain of the alanine of our K22A mutant compared to the longer leucine of Fujii's K22L mutant.

At position 30 inside the loop (C<sup>21</sup>-C<sup>36</sup>), substitution of the aspartate for either alanine or valine reduced the enterotoxicity while the attachment to SFT seemed to be favored. The suppression of the negative charge present on the aspartate side chain may eliminate a repulsive force that could occur in the vicinity of the SFT-binding site. Indeed, the sulfatide bears an anionic sulfate group. Moreover, the substantial difference observed in attachment between mutants D30A and D30V could result from the preferential presentation of SFT due to the larger size of valine versus alanine or to the more hydrophobic property of the valine compared to alanine. In contrast, this mutation appears to alter a subsequent step in enterotoxicity. As reported by Dreyfus *et al.* (Dreyfus, et al., 1992), mutant D30V showed the same enterotoxicity level (39%) as the mutant (49%) presented in this study.

Because of the flexibility conferred by four glycines in the loop (C<sup>21</sup>-C<sup>36</sup>) we hypothesized that they would play a role in binding. Toxins such as the  $\alpha$ -hemolysin of *S. aureus* are known to display this characteristic, which facilitates membrane insertion. To support this hypothesis, glycines at position 24, 27, 31, and 34 were selected for mutagenesis. The results showed a remarkable decrease both in attachment or enterotoxicity, except for mutant G34A which showed a binding of 118%. This reduction may be due either to the elimination of the flexibility or to the low space occupancy of the glycine residue. As observed for Lys-23, Gly-31 and Gly-34 seem to play an additional role in enterotoxicity other than simply the attachment. This conclusion is inferred by the dissociation observed for mutant G31A between the enterotoxic (1%) and the binding activities (41%), and mutant G34A (13%) and (118%), respectively.

Among sulfatide-binding protein, the FasG subunit of the 987P fimbriae was shown to bind to its sulfatide receptor. Specifically, residues R116, K117, and K118 in alanine-scanning



site specific mutagenesis experiment have been shown to play a role in attachment to sulfatide. Thus, for STb and FasG, closely gathered basic residues appeared to interact with sulfatide, involving a salt bridge interaction with the sulfate group of sulfatide (Choi & Schifferli, 1999). Similar observations were observed with properdin, another sulfatide-binding protein (Holt *et al.*, 1990). In contrast the flavonol 3-sulfotransferase (ST) displays some similarities with the STb toxin. ST is an enzyme using 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) as cosubstrate. Structurally, PAPS is closely related to sulfatide, both molecules having acidic sulfate group linked to a sugar ring. Marsolais and Varin (Marsolais & Varin, 1995) did site-specific mutagenesis on ST throughout an amino acid stretch known to bind the cosubstrate PAPS, <sup>276</sup>**RKGXXGDWK(N/T)XFT**<sup>288</sup>. In their paper, the authors have demonstrated that residues R276, K277, G281, and K284 were involved in cosubstrate binding by using mutants. Those residues could correspond to K22, K23, G27, and R29; they were found within STb loop, <sup>22</sup>**KKGFLGVRDGTAGA**<sup>35</sup>. Marsolais and Varin (Marsolais and Varin, 1995) also established that conservative replacements such as K284R have little effect on PAPS binding activity.

In order to test the hypothesis concerning the implication of the hydrophobic  $\alpha$ -helix in enterotoxicity according to the STb nuclear magnetic resonance structure, three major hydrophobic residues facing the solvent (F37, I41, and M42) were mutated (Sukumar, et al., 1995). These mutants demonstrated weak enterotoxicity in the rat loop assay providing compelling evidence for the role of selected nonpolar residues in pathogenesis. Chao *et al.* (1998) have shown that STb toxin promotes leakage of lipid vesicles indicating local disruption or membrane insertion (K.L. Chao and L.A. Dreyfus, Abstr. 98<sup>th</sup> General Meeting of ASM, abstr. B-268, 1998). Considering that amphipathic and hydrophobic helical structures are required for membrane insertion of the toxin, we postulated that F37, I41, and M42, belonging to the C-terminal hydrophobic  $\alpha$ -helix, could be involved in the internalization pathway inferred by Chao *et al.* (Chao & Dreyfus, 1997).

Mutants F37K, I41S, and M42S have shown the same reduction in binding to SFT compared to the reduction in enterotoxicity. However, these results were difficult to reconcile with other results obtained in our laboratory. In fact, Rousset *et al.* (Rousset, et al., 1998) have shown that the epitope recognized by STb is specifically a galactose residue

linked to a sulfated group at position 3. This structure displays no hydrophobic region enabling an interaction with STb. In fact, galactose is comprised of alcohol groups and one hemiacetal group conferring a polar environment. From these observations, theoretically no direct hydrophobic interaction could occur between STb and SFT. To explain the involvement of hydrophobic amino acids in binding to SFT, a model was developed implying an oligomerization process between STb molecules. As demonstrated recently, STb enterotoxin forms hexamers and heptamers through hydrophobic bonds between C-terminal hydrophobic  $\alpha$ -helix (residues F37, I41, and M42) (Labrie *et al.*, 2001). Full STb structure integrity is necessary for the oligomerization process to take place. We suggest that there is basic binding activity between STb and SFT with a STb-STb inter-binding process, in part via the hydrophobic  $\alpha$ -helix. In this case, the propensity of hydrophobic groups to associate due to their repulsion from the aqueous solvent compels STb molecules to interact. This could explain the decrease in attachment observed with polar mutants located in the hydrophobic  $\alpha$ -helix. Oligomerization is observed for the  $\alpha$ -toxin of *S. aureus* following a preliminary binding with either a high affinity protein receptor, or, more commonly, with ubiquitous low affinity acceptors (phosphatidylcholine and cholesterol). As for STb, the *S. aureus*  $\alpha$ -toxin contains a glycine-rich flexible motif (Menestrina & Ferreras, 1997).

The most prominent result of this study is the establishment of F37, I41, and M42 as important residues for binding and enterotoxicity activities. In addition, we have demonstrated the importance of charged amino acid residues present in the loop (K22, K23, R29, and D30) in the attachment to SFT and confirmed their role in enterotoxicity. Mutations of these residues have strongly inhibited binding and toxic activities. Moreover, these latter hydrophobic residues appear to be more important in both attachment to SFT and enterotoxicity than the previously identified charged amino acids situated in the loop. Taken together, hydrophobic amino acids are directly implicated in the oligomerization process that precedes the binding to SFT. Binding to SFT is due to interaction of SFT with the positively charged Lys and Arg residues of STb.

## **Acknowledgements**

This work was supported by grant OGP0139070 to J.D.D. from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and grant 93-ER-0214 from Fonds pour la Formation au Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR). V.L. is the recipient of a studentship from FCAR.

We thank M. Tousignant and C. Bérubé for their valuable collaboration with the rat loop assay; F. Dumas for the protein sequencing service and HPLC resourcefulness; and Dr Kornblatt for her helpful advices with CD measurements.

## References

- Arriaga, Y. L., Harville, B. A. & Dreyfus, L. A. (1995).** Contribution of individual disulfide bonds to biological action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B. *Infect Immun* **63**, 4715-20.
- Beausoleil, H.-E. & Dubreuil, J. D. (2001).** *In vitro* Binding Characteristics and Affinity for Sulfatide of *Escherichia coli* STb Enterotoxin. *Pathogenesis* In press.
- 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.
- Chao, K. L. & Dreyfus, L. A. (1997).** Interaction of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B with cultured human intestinal epithelial cells. *Infect Immun* **65**, 3209-3217.
- Choi, B.-K. & Schifferli, D. M. (1999).** Lysine residue 117 of the FasG adhesin of enterotoxigenic *Escherichia coli* is essential for binding of 987P fimbriae to sulfatide. *Infect Immun* **67**, 5755-5761.
- Cunningham, B. C. & Wells, J. A. (1989).** High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interaction by alanine-scanning mutagenesis. *science* **244**, 1081-5.
- Dreyfus, L. A., Harville, B., Howard, D. E., Shaban, R., Beatty, D. M. & Morris, S. J. (1993).** Calcium influx mediated by the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B (ST<sub>B</sub>). *Proc Natl Aca Sci USA* **90**, 3202-3206.
- Dreyfus, L. A., Urban, R. G., Whipp, S. C., Slaughter, C., Tachias, K. & Kupersztoch, Y. M. (1992).** Purification of the ST<sub>B</sub> enterotoxin of *Escherichia coli* and the role of selected amino acids on its secretion, stability and toxicity. *Mol Microbiol* **6**, 2397-2406.

**Dubreuil, J. D. (1997).** *Escherichia coli* STb enterotoxin. *Microbiol* **143**, 1783-1795.

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

**Fujii, Y., Kondo, Y. & Okamoto, K. (1995).** Involvement of prostaglandin E2 synthesis in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *FEMS Microbiol Lett* **130**, 259-265.

**Fujii, Y., Nomura, T., Yamanaka, H. & Okamoto, K. (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.

**Fujii, Y., Okamuro, Y., Hitotsubashi, S., Saito, A., Akashi, N. & Okamoto, K. (1994).** Effect of alterations of basic amino acid residues of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II on enterotoxicity. *Infect Immun* **62**, 2295-2301.

**Goldstein, J. L., Sahi, J., Bhuva, M., Layden, T. J. & Rao, M. C. (1994).** *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin-mediated colonic Cl<sup>-</sup> secretion is absent in cystic fibrosis. *Gastroenterology* **107**, 950-956.

**Handl, C. E., Harel, J., Flock, J. I. & Dubreuil, J. D. (1993).** High yield of active STb enterotoxin from a fusion protein (MBP-STb) expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expression Purif* **4**, 275-281.

**Hitotsubashi, S., Fujii, Y., Yamanaka, H. & Okamoto, K. (1992a).** Some properties of purified *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *Infect Immun* **60**, 4468-4474.

**Holt, G. D., Pangburn, M. K. & Ginsburg, V. (1990).** Properdin binds to sulfatide and has a sequence homology with other proteins that binds to sulfate glycoconjugates. *J Biol Chem* **265**, 2852-2855.

**Kaper, J. B., Morris, J. G., Jr. & Levine, M. M. (1995).** Cholera. *Clin Microbiol Rev* **8**, 48-86.

**Kennedy, D. J., Greenberg, R. N., Dunn, J. A., Abernathy, R., Ryerse, J. S. & Guerrant, R. L. (1984).** Effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin STb on intestines of mice, rats, rabbits, and piglets. *Infect Immun* **46**, 639-643.

**Kupersztoch, Y. M., Tachias, K., Moomaw, C. R., Dreyfus, L. A., Urban, R., Slaughter, C. & Whipp, S. (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. *J Bacteriol* **172**, 2427-32.

**Labrie, V., Harel, J. & Dubreuil, J. D. (2001).** Oligomerization of *Escherichia coli* enterotoxin b through its C-terminal hydrophobic alpha-helix. *Biochim Biophys Acta* **1535**, 128-133.

**Lala, A. K. & Raja, S. M. (1995).** Photolabeling of a pore-forming toxin with the hydrophobic probe 2-[<sup>3</sup>H]Diazofluorene. *J biol chem* **270**, 11348-11357.

**Marsolais, F. & Varin, L. (1995).** Identification of amino acid residues critical for catalysis and cosubstrate binding in the flavonol 3-sulfotransferase. *J biol chem* **270**, 30458-63.

**Menestrina, G. & Ferreras, M. (1997).** Alpha-Toxin (*Staphylococcus aureus*). In *Guidebook to protein toxins and their use in cell biology*, pp. 256. Edited by R. Rappuoli & C. Montecucco. New-York: Oxford University Press Inc.

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

**Peterson, J. W. & Whipp, S. C. (1995).** Comparison of the mechanisms of action of cholera toxin and the heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. *Infect Immun* **63**, 1452-1461.

**Rousset, É., Harel, J. & Dubreuil, J. D. (1998).** Sulfatide from the pig jejunum brush border epithelial cell surface is involved in binding of *Escherichia coli* enterotoxin b. *Infect Immun* **66**, 5650-5658.

**Spangler, B. D. (1992).** Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol Rev* **56**, 622-647.

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

**Ward, R. J., Palmer, M., Leonard, K. & Bhakdi, S. (1994).** Identification of a putative membrane-inserted segment in the alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry* **33**, 7477-7484.

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

**TABLE 1.** Biological activity of STb mutants as determined in previous studies.

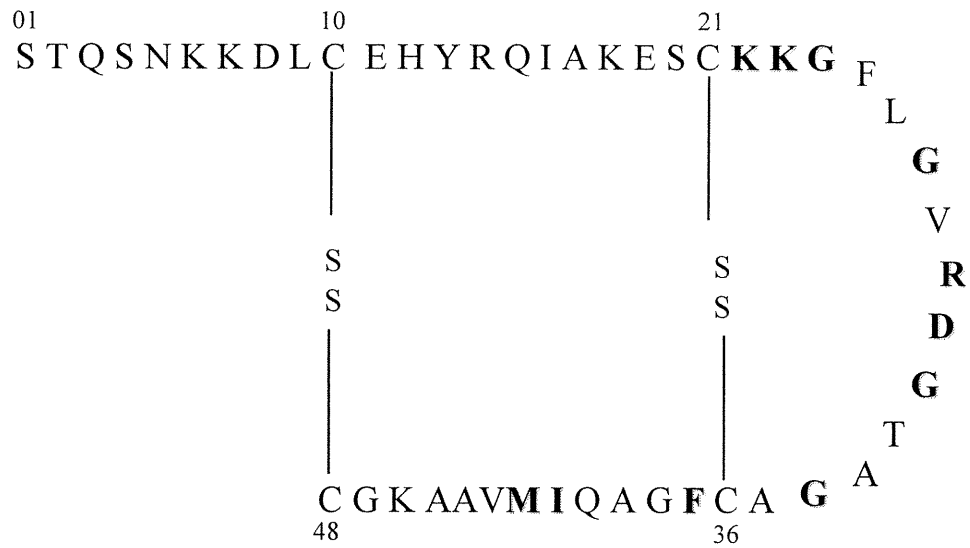
Mutations	Biological Activity (%)	References
STb	100.0	
K22L	10.0	Fujii <i>et al.</i> (1994)
K23T	10.0	Fujii <i>et al.</i> (1994)
K22I, K23N	2.5	Fujii <i>et al.</i> (1994)
R29I	50.0	Fujii <i>et al.</i> (1994)
R29S	12.7	Dreyfus <i>et al.</i> (1992)
D30V	39.0	Dreyfus <i>et al.</i> (1992)

**TABLE 2.** Synthetic mutagenic primers used in this study.

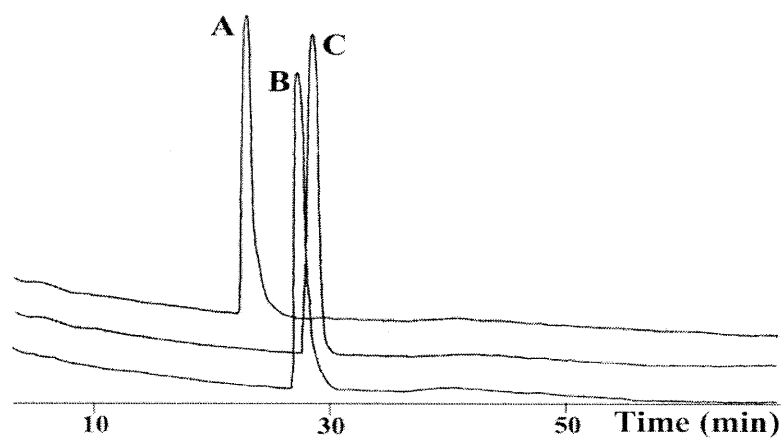
Mutations	Oligonucleotide sequence <sup>a</sup>
Lys22→Ala	CCCTAAAAAACCTTT <u>CG</u> CACAACCTTTCTTGGC
Lys23→Ala	CCCCTAAAAAACCTGCCTTACAACCTTTCC
Lys22→Ala, Lys23→Ala	CCCCTAAAAAACCTGCCGCACAACCTTTCTTGGC
Gly24→Ala	CCCCTAAAAAC <u>CG</u> CTTTCTTACAACCTTTCC
Gly27→Pro	CCATCTCTAACCGGTAAAAAACC
Arg29→Ala	GCAGTACCATCTGCAACCCCTAAAAAACC
Lys23→Ala, Arg29→Ala	CCCCTAAAAAACCTGCCTTACAACCTTTCC GCAGTACCATCTGCAACCCCTAAAAAACC
Asp30→Ala	CCAGCAGTACCAGCTCTAACCCC
Asp30→Val	CCAGCAGTACCA <u>A</u> CTCTAACCCC
Gly31→Ala	GCTCCAGCAGT <u>A</u> GCATCTCTAACCC
Gly34→Ala	CCAAAGCATGCTG <u>C</u> CAGCAGTACC
Phe37→Lys	CCATTATTTGGGCGCCTTT <u>A</u> CATGCTCCAGC
Phe37→Asp	CCATTATTTGGGCGCCAT <u>C</u> ACATGCTCCAGC
Ile41→Ser	GCTGCAACCAT <u>C</u> GATTGGGCGCCAAAGC
Met42→Ser	CCTTTTGCTGCAAC <u>G</u> CTTATTTGGGCGCC
Met42→Arg	CCTTTTGCTGCAAC <u>G</u> CGTATTTGGGCGCC
Ile41→Glu, Met42→Arg	CCTTTTGCTGCTGCAAC <u>G</u> CGT <u>T</u> CTTGGGCGCCAAAGC

<sup>a</sup> The changed bases on the antisense strand of the plasmid Pmal-STb are underlined.

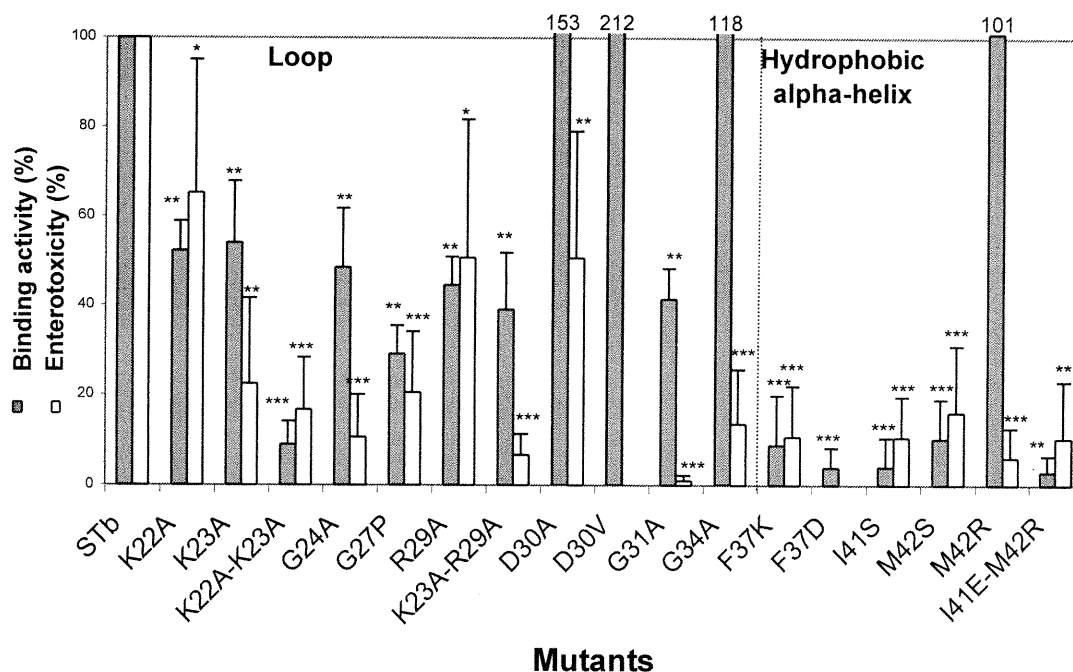




**FIG. 1.** Amino acid sequence of mature STb enterotoxin. Cys-10 to Lys-23 represents the stretch forming the amphipathic  $\alpha$ -helix and Gly-38 to Ala-44 represents the hydrophobic  $\alpha$ -helix. Bold letters represent amino acids targeted for mutagenesis.



**FIG. 2.** HPLC chromatograms at 220 nm of purified STb and selected mutants. **A**, mutant I41E-M42R representing the group losing hydrophobicity upon mutation. **B**, native STb. **C**, mutant K22A-K23A representing the group acquiring hydrophobicity upon mutation. Polypeptides were eluted with a gradient of acetonitrile containing 0.1% trifluoroacetic acid using a reverse-phase C<sub>8</sub> microbore column.



**Fig. 3.** Relative binding to sulfatide (grey box) and enterotoxigenicity (white box) of various STb mutants compared to STb native toxin. Left box shows the results obtained for substitutions in the loop. Right box, substitutions introduced in the C-terminal hydrophobic  $\alpha$ -helix. STb binding to sulfatide and enterotoxigenicity was taken as 100% and relative activity of the mutants calculated as a percentage. No experiments on biological activity was done for mutant D30V and F37D. The standard deviations are shown. Mutants significantly different from STb were determined using the statistical Student's *t* test. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

Article 2 : Oligomerization of *Escherichia coli* enterotoxin b  
through its C-terminal hydrophobic  $\alpha$ -helix

V. Labrie, J. Harel & J.D. Dubreuil

Biochemica et Biophysica Acta (2001, 1535: 128-133)

# Oligomerization of *Escherichia coli* Enterotoxin b through its C-terminal hydrophobic alpha-helix

Vincent Labrie, Josée Harel and J. Daniel Dubreuil\*

Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, département de pathologie et microbiologie, faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada

Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, département de pathologie et microbiologie, faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 sicotte, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6.

Phone: (450)-773-8521, ext. 8433.

Fax: (450)-778-8108

E-mail: daniel.dubreuil@umontreal.ca

Key words:

*E. coli*, heat-stable toxin b, oligomerization, hydrophobic  $\alpha$ -helix

## Summary

Using a chemical cross-linker and gel electrophoresis or a dot blot overlay assay, we studied protein-protein interaction of STb toxin, a 48-residue amphiphilic polypeptide causing intestinal disorders. For the first time, we report on the oligomerization property of STb. This enterotoxin forms hexamers and heptamers in a temperature independent fashion in presence or absence of its receptor (sulfatide) anchored in a 50 nm liposome or as a free molecule. Full STb structure integrity is necessary for its oligomerization as this process is not observed under reducing condition in presence of  $\beta$ -mercaptoethanol. STb treatment with tetramethylurea (TMU) and different detergents prevented oligomerization. Site-directed mutagenesis decreasing overall STb hydrophobicity in the hydrophobic  $\alpha$ -helix resulted in the incapacity to form oligomers. Taken together, these data suggest that the C-terminal hydrophobic  $\alpha$ -helix corresponds to the domain of STb-STb inter-binding where hydrophobic interaction is involved.

## Introduction

The heat-stable toxin b (STb) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) causes fluid and electrolyte intestinal secretions, leading to diarrhea. STb toxin is synthesized as a 71-amino-acid precursor which undergoes cleavage of the N-terminus signal sequence (residues 1-23) [1]. This processing results in a 48-amino-acid polypeptide of 5200 Da having a pI of 9.6 [2]. The maturation also involves the formation of disulfide bridges between Cys 10 and Cys 48 and between Cys 21 and Cys 36 which are important for the stabilization of the molecule tertiary structure [3]. In fact, these disulfide bridges were shown to be indispensable for enterotoxicity [4, 5]. Nuclear magnetic resonance (NMR) studies of STb have established a structure having two antiparallel  $\alpha$ -helix motifs separated by a loop. There is an amphipathic helicoidal stretch between residues 10 to 22, exposing several polar side chains to the solvent. Facing it, is an hydrophobic helix extending from residues 38 to 44. The glycine rich loop contains some amino acids (Lys 22, Lys 23, Arg 29, and Asp 30) that have been demonstrated to be important in enterotoxicity by mutagenesis studies [3]. Recently, the sulfatide [Gal(3-SO<sub>4</sub>) $\beta$ 1Cer], a glycosphingolipid, has been identified as a functional receptor for STb [6].

Numerous toxins need to form oligomers to act on target cells. For example, among pore forming protein toxins, most of them undergo an oligomerization step. In some cases, the oligomeric channels are formed prior to membranar insertion, as for the aerolysin toxin of *Aeromonas hydrophila* [7]. Alternatively, the  $\alpha$ -hemolysin of *Staphylococcus aureus* oligomerizes once its monomeric forms are inserted into the membrane [8]. Oligomerization also occurs for small bacterial peptides such as the 26-residue amphipatic polypeptide of *Staphylococcus aureus*  $\delta$ -toxin which forms at least tetramers in solution and 6- to 8-mer on lipid binding [9]. In the present study, we show evidences of STb peptide oligomer formation where the C-terminal hydrophobic  $\alpha$ -helix sequence, residues 36 to 48, plays a critical role in oligomerization of STb toxin.

## Materials and methods

### 2.1 Oligonucleotide-directed mutagenesis and DNA sequencing

Oligonucleotide-directed site-specific mutagenesis was performed using the U.S.E. Mutagenesis Kit purchased from Pharmacia Biotech. The mutagenic primers (table #1) used to generate point mutation were synthesized by Gibco BRL. The plasmid pMal-STb already described [10] served as template for production of simple and double mutations. All mutants were confirmed by automated sequencing with the *Rmale* primer 5'-GTAACGCCAGGGTTTTCC-3' at the DNA sequencing core facility (University of Maine, Orono, USA) by using an ABI model 373A stretch DNA sequencer.

### 2.2 Purification

In order to obtain pure STb mutants and native STb enterotoxin, the peptides were produced according to a previously described method [2]. Briefly, an *E. coli* strain HB101, harboring the plasmid pMal-STb or plasmids pMal-mutated STb, highly expressed the fusion protein, MBP-STb or -mutated STb, under the control of  $P_{tac}$ . Following the recovery from an osmotic shock, the fusion protein was affinity purified by using an amylose resin (New England Biolabs Ltd, Mississauga, Ontario, Canada) and cleaved with the protease factor Xa. The cleaved material was loaded on a  $C_8$  reverse-phase microbore column (Applied Biosystems) and eluted with an acetonitrile gradient (model 130A Separation System, Applied Biosystems). Purified peptides were lyophilized and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The purity of the toxins was routinely verified by N-terminal sequence analysis using Edman degradation (Applied Biosystems model 470A gas-phase sequencer) as described before [2].

### 2.3 Dot blot overlay assay

Various quantities of wild-type and mutated STb toxins were dotted on Immunodyne™ membrane (Pall Biosupport Division, Glen Cove, NY, USA). Affinity



purified aprotinin (Sigma) was used as a negative control to ascertain the specificity of the assay. After the blocking step with 0.3% (w/v) casein in PBS, the membranes were then incubated with STb-MBP fusion protein (67 µg/ml) in 2 ml PBS (0.15 M NaCl, 100 mM phosphate, pH 7.0) 2.5 h at room temperature. The dotblots were washed three times for 5 min followed by an incubation with anti-MBP rabbit antiserum diluted 1:10 000 in PBS for 2 h. Following a washing step with PBS, goat anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase 1:2000 in PBS was added and incubated for 1 h. After washing the membrane, color development was carried out with of the chromogenic substrate 4-chloro-1-naphthol and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> following the method of Hawkes [11].

#### *2.4 Liposome preparation*

Small unilamellar vesicles (SUV) composed of 10% sulfatide/90% DMPC (dimyristoyl phosphatidyl choline) (w/w) were prepared by mixing 1 mg of the lipid mixture, drying for 1 h under vacuum. The mix was suspended in 0.3 ml PBS (10 mM Sodium phosphate, 160 mM NaCl pH 7.0), and after vortex and a 20 sec sonication step, it was then extruded 19 times through 50 nm polycarbonate membranes (Avestin).

#### *2.5 Chemical cross-linking*

Wild-type and mutant STb toxins were cross-linked using Bis (Sulfosuccinimidyl) suberate (BS<sup>3</sup>). Six-micrograms aliquots (1.16 nmol) of STb toxin in PBS (20 mM sodium phosphate, 0.15 M NaCl, pH 7.5) were cross-linked using a 25- or 75-fold molar excess of BS<sup>3</sup> in a reaction volume of 8 µl, with or without 5% β-mercaptoethanol, 0.5 mg/ml sulfatide, 2 mg/ml sulfatide containing liposome 0.1, and 0.5 M tetramethylurea (TMU), 0.5 and 6 mM CHAPS, 0.05% and 0.5% triton X-100, or 20 mM n-octylglucoside (C<sub>8</sub>Glc). Cross-linking reaction mixes were incubated for 38 min at room temperature at 4, 37, and 56°C and then quenched for 15 min by the addition of 1 M Tris-HCl, pH 7.5, to a final concentration 30 mM. An equal volume of SDS-PAGE sample buffer was added and the solutions were boiled for 10 min prior to electrophoretic analysis.

## 2.6 Gel electrophoresis and immunoblotting

SDS-PAGE was carried out using 15% (w/v) resolving gels with a 4.13% (w/v) stacking gel. Proteins separated by SDS-PAGE were transferred for 80 min at 100 V onto 0.22  $\mu\text{m}$  nitrocellulose membranes. Transfer sheets were blocked for 1 h in blocking solution 0.3% (w/v) casein and then incubated for 2 h with a rabbit polyclonal anti-STb diluted 1:300. Subsequently, immunoblots were washed three times (5 min each wash) and incubated for 1 h with horseradish peroxidase-conjugated antibody (1:2000). After washing the membranes, the reactive bands were visualized using 4-chloro-1-naphthol and  $\text{H}_2\text{O}_2$  following the method of Hawkes [11].

## Results and discussion

### 3.1 Characterization of the STb oligomers using SDS-PAGE

Preliminary results from dot overlay assays indicated a possible interaction between immobilized STb and the fusion marker MBP-STb (data not shown). When STb was dotted on a casein blocked Immunodyne<sup>TM</sup> membrane and overlaid with MBP-STb, the STb-STb interaction was revealed with a monospecific antiserum raised against MBP. However, this reaction was not observed with purified aprotinin, a 6.5 kDa molecule with a pI of 10.5. Although not related to STb this molecule was used as a control as it share a similar molecular mass and a basic pI. In addition, casein used as a blocker neither reacted with the dotted STb confirming the specificity of our assay. To further characterize STb-STb interaction, cross-linking experiments were done. Addition of the cross-linker BS<sup>3</sup> to STb or STb mutants in solution was performed in order to reveal the STb-STb oligomerization, if present. Electrophoretic analysis of STb cross-linking reactions on SDS-PAGE revealed that a significant percentage of purified STb peptide in solution formed oligomers. On Fig.2 two major bands are observed with electrophoretic mobilities of approximately 28 and 32 kDa that could represent hexameric and heptameric molecularity, respectively, monomeric

STb being 5189 Da. On western-blot, these two major oligomeric forms appeared to have the same intensity and prevailed over the monomeric and other possible stoichiometry. These results are consistent with the literature as often toxin oligomer appears to be composed of seven units such as for *S. aureus*  $\alpha$ -toxin [12], aerolysin [13, 14], and the anthrax protective antigen [15, 16].

Assuming that the four glycines present in the loop of STb toxin confer some flexibility, we investigated if sulfatide, a STb receptor [6], could induce a conformational change of STb upon its binding and then modify the oligomerization profile. Sulfatide, the receptor, was added in a 4-fold molar excess to the cross-linking reaction. As observed on Fig.2, the migration pattern of the reaction was not affected by the presence of the receptor. The same result was observed using the dot blot overlay assay (data not shown). As mentioned, *S. aureus*  $\delta$ -toxin molecularity varies if the oligomerization takes place in solution or bound to a lipid. Therefore, to rule out the possibility that STb acts the same way, the cross-linking reaction was performed in presence of liposomes containing sulfatide. As observed on Fig. 2, no differences were seen compared to the reaction without liposomes.

Since, all the cross-linking experiments were done with 145  $\mu$ M STb, we attempted to find a minimal concentration of STb able to produce oligomers. Reactions were conducted with 46, 57, and 69  $\mu$ M of STb. All reactions showed the same profile of oligomerization (data not shown). Interestingly, less than 1  $\mu$ M of STb is needed to elicit a maximum fluid secretion in mouse and rat intestinal loops, and fluid secretion and the release of PGE<sub>2</sub> in pig requires as low as 5-10 nM [17, 18]. These concentrations of STb toxin could not be tested because of the limitation of the blotting detection method. The oligomerization process observed here could corroborate results obtained by Beausoleil et al. [19]. In their studies of STb binding kinetics, the curve representing the attachment of increasing amounts (0.3 to 39  $\mu$ M) of STb to sulfatide showed a sigmoidal shape with at least three plateaus. Usually, this feature indicates a ligand-ligand interaction that may be explained by the oligomerization process, we now report.

### 3.2 Formation of oligomers following chemical and physical treatments

Properly oxydized disulfide bonds have been shown to be important for full enterotoxicity [4, 5]. To assert the importance of STb structure integrity for oligomerization, the disulfide bonds were subjected to reduction. Upon  $\beta$ -mercaptoethanol treatment, we did not observe the oligomerization of STb (Fig.3). Thus, STb proper tertiary structure is required for this process to occur. These results could also be an indication that oligomerization is a necessary step in the pathogenesis process of STb enterotoxin since reduced STb toxin is not toxic possibly due to its incapacity to forms oligomers.

The effect of incubation temperature on the oligomerization of STb was also investigated. According to the migration profile obtained on Western blot (Fig.3), no difference was noted when incubation temperatures of 4, 21, 37 or 56°C were compared. Considering the pH sensitivity of the cross-linker used, no experiments were conducted on the effect of pH on oligomerization.

### *3.3 Effect of TMU and detergents on oligomerization*

To assess the role of hydrophobic bonds in oligomers formation, we studied the influence of the presence of the hydrophobic bond-breaking agent TMU and different detergents. TMU at a concentration of 100 mM did not inhibit oligomerization whereas at 500 mM TMU totally prevented the formation of oligomers (Fig.4). In presence of 0.5 mM CHAPS, a zwitterionic detergent, no effect was detected, but when the concentration was increased to 6 mM, STb-STb interaction was impeded. The same inhibition was obtained when STb was incubated with 0.05% of non-ionic detergent Triton X-100. There was no disruption of hydrophobic bonds upon treatment with 20 mM octylglucoside (C<sub>8</sub>Glc), a mild non-ionic detergent, but formation of 5-mer and 6-mer seem favored instead of 6-mer and 7-mer. Overall, when the hydrophobic bonds were altered, the oligomerization process was either prevented or the stoichiometry affected.

Altogether the results indicate that the phenomenon of self-association described for STb seems to involve an hydrophobic interaction. Usually, the oligomer-forming toxins, such as aerolysin oligomerize by polar interaction allowing a membranar insertion via their

remaining apolar segment [7]. However, our results suggest that STb behaves more like *S. aureus*  $\delta$ -toxin where oligomerization occurs through its hydrophobic regions. Moreover, in the eventuality that STb interacts with the membrane, it is not excluded that STb could oligomerize via polar bonds following membranar insertion.

### 3.4 Role of hydrophobic residues in oligomerization

Considering that the C-terminal  $\alpha$ -helix of STb displays the highest level of hydrophobicity, three major hydrophobic residues pointing the solvent (Phe-37, Ile-41 and Met-42) were mutated. In addition, Lys-22, -23, and Gly-31 located in the loop were changed for alanine. Chemical cross-linking reaction and dot blot overlay assay were used to assess a specific role of these amino acid residues and to confirm the hydrophobic contribution in oligomerization. In these experiments (Fig.5), mutants with decreasing hydrophobicity F37D, F37K, I41S, M42S, and M42R did not form oligomers while mutation of polar residues, K22A-K23A and G31A, did not alter the capacity to form oligomer. The single mutations K22A and K23A also abrogated the capacity to oligomerize (data not shown). These results provide another evidence that non-polar domain is important for oligomerization.

Overall, we have demonstrated the in vitro oligomerization of STb toxin. The oligomer formation appears to be equally distributed as hexamers and heptamers. Finally, the process relies on hydrophobic bonds through its C-terminal hydrophobic  $\alpha$ -helix, of which Phe-37, Ile-41, and Met-42 seem responsible. Further studies will be required to establish more precisely the number of STb units involved in the predominant oligomers and whether this arrangement adopts a ring shape or else.

## 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 au Chercheurs et l'Aide à la Recherche (93-ER-0214). V.L. is the recipient of a studentship from Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche.

## Reference

- [1] Kupersztoch, Y.M., Tachias, K., Moomaw, C.R., Dreyfus, L.A., Urban, R., Slaughter, C. and Whipp, S. (1990) *J. Bacteriol.* 172, 2427-32.
- [2] Handl, C.E., Harel, J., Flock, J.I. and Dubreuil, J.D. (1993) *Prot. Expres. Purif.* 4, 275-281.
- [3] Sukumar, M., Rizo, J., Wall, M., Dreyfus, L.A., Kupersztoch, Y.M. and Gierasch, L.M. (1995) *Prot. Sci.* 4, 1718-29.
- [4] Arriaga, Y.L., Harville, B.A. and Dreyfus, L.A. (1995) *Infect. Immun.* 63, 4715-20.
- [5] Okamoto, K., Baba, T., Yamanaka, H., Akashi, N. and Fujii, Y. (1995) *J. Bacteriol.* 177, 4579-86.
- [6] Rousset, É., Harel, J. and Dubreuil, J.D. (1998) *Infect. Immun.* 66, 5650-5658.
- [7] van der Goot, F.G., Lakey, J., Pattus, F., Kay, C.M., Sorokine, O., Van Dorsselaer, A. and Buckley, J.T. (1992) *Biochemistry* 31, 8566-8570.
- [8] Thelestam, M., Olofsson, A., Blomqvist, L. and Hebert, H. (1991) *Biochem. Biophys. Acta* 1062, 245-254.
- [9] Mellor, I.R., Thomas, D.H. and Sansom, M.S.P. (1988) *Biochem. Biophys. Acta* 942, 280-94.
- [10] Bossé, M., Handl, C.E., Lortie, L.A., Harel, J. and Dubreuil, J.D. (1993) *J.Gen. Microbiol.* 139, 631-638.
- [11] Hawkes, R. (1982) *Anal. Biochem.* 123, 143-146.
- [12] Song, L., Hobaugh, M.R., Shaustak, C., Cheley, S., Bayley, H. and Gonaux, J.E. (1996) *Science* 274, 1859-66.
- [13] Wilmsen, H.U., Leonard, K.R., Tichelaar, W., Buckley, J.T. and Pattus, F. (1992) *EMBO Journal* 11, 2457-63.
- [14] Moniatte, M., van der Goot, F.G., Buckley, J.T., Pattus, F. and van Dorsselaer, A. (1996) *FEBS Letters* 384, 269-72.
- [15] Milne, J.C., Furlong, D., Hanna, P.C., Wall, J.S. and Collier, R.J. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 20607-12.
- [16] Petosa, C., Collier, R.J., Klimpel, K.R., Leppla, S.H. and Liddington, R.C. (1997) *Nature* 385, 833-8.

- [17] Harville, B.A. and Dreyfus, L.A. (1995) *Infect. Immun.* 63, 745-50.
- [18] Peterson, J.W. and Whipp, S.C. (1995) *Infect. Immun.* 63, 1452-1461.
- [19] Beausoleil, H-E. and Dubreuil, J.D. Pathogenesis, in press.

**Table 1.** Synthetic *est B* mutagenic primers used in this study.

Mutations	Oligonucleotide sequence <sup>a</sup>
Lys22→Ala, Lys23→Ala	CCCCTAAAAAACCT <u>GCCGC</u> ACAACCTTTCCTTGGC
Gly31→Ala	GCTCCAGCAGT <u>AG</u> CATCTCTAACCC
Phe37→Lys	CCATTATTTGGGCGCCTTT <u>AC</u> ATGCTCCAGC
Phe37→Asp	CCATTATTTGGGCGCCAT <u>CAC</u> ATGCTCCAGC
Ile41→Ser	GCTGCAACCAT <u>CG</u> ATTGGGCGCCAAAGC
Met42→Ser	CCTTTTGCTGCAAC <u>GC</u> TTATTTGGGCGCC
Met42→Arg	CCTTTTGCTGCAAC <u>GCG</u> TATTTGGGCGCC

<sup>a</sup> Underlined are the changed bases on the antisense strand of the plasmid pMal-STb.



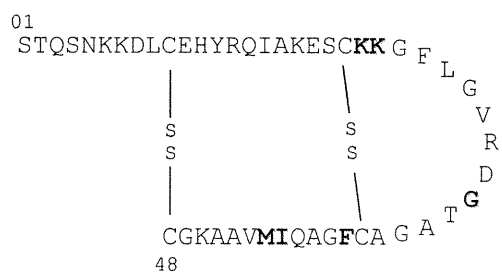


FIG. 1. Amino acid sequence of mature STb enterotoxin. Cys-10 to Lys-23 and Gly-38 to Ala-44 represent respectively the stretch forming the amphipathic  $\alpha$ -helix and the hydrophobic  $\alpha$ -helix. Bold letters represent amino acid residues targeted for mutagenesis.

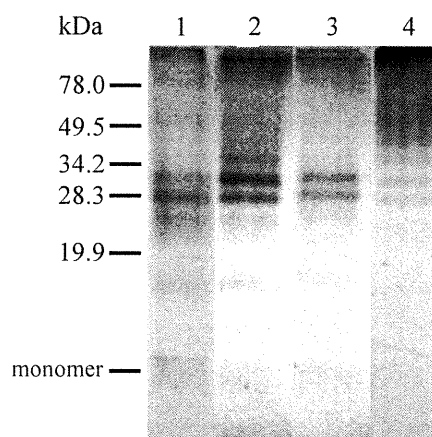


FIG.2. Oligomerisation of STb toxin. Samples were separated on 15% gel and visualized by Western-blot. STb cross-linked in the presence of a 75-fold molar excess of BS<sup>3</sup> (condition used in all experiments) (lane 1), a 25-fold molar excess of BS<sup>3</sup> (lane 2), 0.5 mg/ml sulfatide (lane 3), and 2 mg/ml sulfatide containing liposome (lane 4).

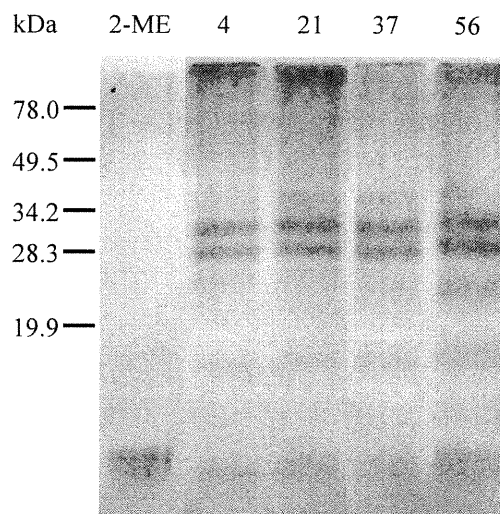


FIG.3. Chemical cross-linking reactions done in presence of 5%  $\beta$ -mercaptoethanol (21°C) or in absence of 5%  $\beta$ -mercaptoethanol at 4, 21, 37, and 56°C.

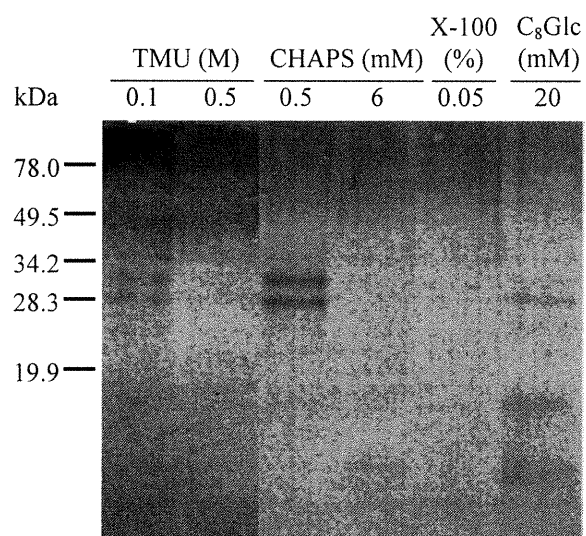


FIG.4. Effect of TMU and differents detergents on STb oligomerization.

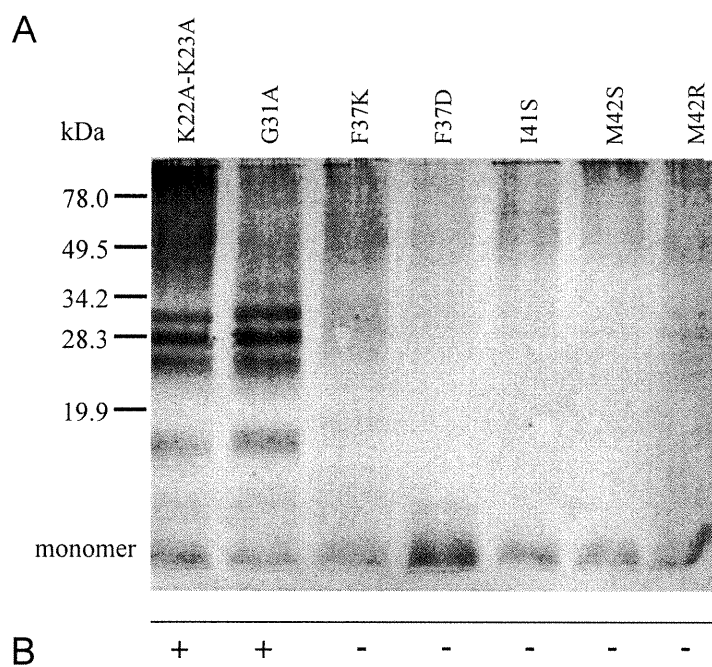


FIG.5. Oligomerization of different STb mutants using (A) chemical cross-linking reaction or using (B) the dot blot overlay assay. The presence of STb-STb interaction(+) or its absence(-) were noted.

Article 3 : *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b (STb)  
internalization within rat intestinal epithelial cells

V. Labrie, J. Harel & J.D. Dubreuil

Veterinary Research (*In press*)

*Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b (STb) in vivo  
internalization within rat intestinal epithelial cells

Short title: *E. coli* STb internalization

Vincent Labrie, Josée Harel and J. Daniel Dubreuil\*

Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc,  
Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine  
vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, C.P. 5000,  
Saint-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6.

\*Corresponding author address until September 2002:

Instituto Ricerche Immunobiologiche Siena

Chiron S.p.A.

Via Fiorentina 1

53100 Siena

Italia

Tel: (39) 0577 243063

Fax: (39) 0577 243564

E-mail: [daniel.dubreuil@umontreal.ca](mailto:daniel.dubreuil@umontreal.ca)

## Abstract

Heat-stable enterotoxin b (STb) is a low molecular weight toxin known to bind sulfatide, its receptor. The fate of STb bound to rat intestinal epithelium cells was followed using an anti-toxin gold labeled assay and transmission electron microscopy. The data suggest that STb toxin and the fusion protein MBP-STb were internalized whereas its mutant I41E-M42R with reduced hydrophobicity did not show internalization. There was a significant difference in the mean of gold particles per field between rat intestine incubated with STb or the fusion protein MBP-STb and the negative control consisting of intestine incubated with PBS alone. No subcellular compartment seems to be particularly aimed by the toxin as gold particles were randomly distributed within the cell.

Keywords: *Escherichia coli* / STb enterotoxin / internalization



## Résumé

### **Internalisation in vivo de l'entérotoxine b (STb) d'*Escherichia coli* dans les cellules épithéliales d'intestin de rat**

L'entérotoxine b thermostable (STb) est une toxine de faible masse moléculaire qui se lie au sulfatide, son récepteur. À l'aide d'un essai avec un anticorps anti-STb marqué à l'or suivi d'une visualisation en microscopie électronique, nous avons observé les événements suivant l'attachement de STb aux cellules épithéliales d'intestin de rat. La toxine STb et la protéine de fusion Maltose Binding Protein-STb (MBP-STb) ont été internalisées tandis que le mutant I41E-M42R avec une hydrophobicité réduite ne présentait pas d'internalisation. Nous avons observé une différence significative de la moyenne de particules d'or par champs entre l'intestin de rat incubé avec STb ou la protéine de fusion MBP-STb et le contrôle négatif, soit le tampon PBS seul. Aucun organelle cellulaire ne semble particulièrement visé par la toxine puisque les particules d'or étaient distribuées aléatoirement dans la cellule.

Mots clé: *Escherichia coli* / entérotoxine STb / internalisation

## 1. Introduction

Heat-stable enterotoxin b (STb) secreted by enterotoxigenic strains of *Escherichia coli* is a low molecular weight peptide that produces secretory diarrhea in animals by altering the intestinal electrolyte balance [4]. STb is a 48-amino-acid polypeptide with a molecular weight of 5.2 kDa. Nuclear magnetic resonance (NMR) studies of STb have established a structure having two antiparallel alpha-helices motifs separated by a loop. There is an amphipathic helicoidal stretch between residues 10 to 22, exposing several polar side chains to the solvent. Facing it, is an hydrophobic helix extending from residues 38 to 44 [17]. STb enterotoxin forms hexamers and heptamers through hydrophobic bonds between the C-terminal hydrophobic  $\alpha$ -helix [14]. Mutagenesis studies have demonstrated the importance of amino acid I41 and M42 in enterotoxicity and oligomerization [13].

STb binds to a functional sulfatide receptor located in brush border membranes [16]. In vitro studies have shown that the intestinal secretion pathway involves the activation of a GTP-binding regulatory protein ( $G_{\alpha_{i3}}$  protein) sensitive to pertussis toxin. This action results in an intracellular calcium elevation through a receptor-dependent ligand-gated  $Ca^{2+}$  channel [3]. The ensuing high level of intracellular  $Ca^{2+}$  is presumably involved in activation of a calmodulin-dependent protein kinase II (CaMK II) which could open an undetermined ionic channel [8]. In addition, intracellular concentration of  $Ca^{2+}$  may regulate phospholipases A<sub>2</sub> and C which catalyze the release of arachidonic acid from the membrane phospholipids, and ultimately the formation of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) known as a secretory agent [7,12,15]. The steps following the attachment of STb to its receptor remain unsolved. In addition to STb toxin, a fusion protein (MBP-STb) previously shown to be active in vivo [6] and a STb mutant (I41E-M42R) that could not form oligomers [14] were also evaluated in vivo for internalization. We hypothesize that after docking to sulfatide, STb has to cross the plasmic membrane to possibly activate a G protein and, in this study, experiments were conducted to prove or refute this point.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Ligated rat jejunum loop assay.

Enterotoxicity tests were conducted using a ligated rat jejunum loop assay as described previously [5].

### 2.2 STb toxin purification

In order to obtain pure STb mutant (I41E-M42R) and native STb enterotoxin, the peptides were produced and purified according to a previously described method [10]. The mutant was produced by oligonucleotide-directed site-specific mutagenesis using the USE Mutagenesis Kit from Pharmacia Biotech. as already described [13]. The fusion protein (MBP-STb) was purified by ionic chromatography following an already described method [6].

### 2.3 Anti-STb gold conjugate

Rabbit monospecific polyclonal antiserum against STb was produced according to the method of Handl *et al.* [11]. Colloidal gold particles approximately 18 nm in diameter were prepared according to the method of Frens [9]. The minimal dilution of anti-STb serum required to stabilize a fixed amount of colloidal gold adjusted to pH 6.9 was determined by construction of an adsorption isotherm. It was found that a ratio of 1:100 (antisera: colloidal gold) was just sufficient to prevent salt-induced flocculation. After centrifugation at 45 000 x g 30 min. at 4°C, the final pellet was resuspended in 1/10 of the original volume and stored at 4°C. The distribution of intracellular gold particles was quantitated by calculating the number of black dots per field at a magnification of 30 000X.

### 2.4 Electron microscopy

In brief, pieces of cut tissue were fixed in 1% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) for 2 h, and then washed 5 times with buffer alone. After dehydration in an alcohol series, the alcohol was progressively replaced by 100% Unicryl at 4 °C. After the change of Unicryl in 24 h, pieces of tissue were covered with Unicryl for polymerization under UV rays at 4 °C for 72 h.

Sections were cut using a diamond knife on a Reichert-Jung Ultracut ultramicrotome. After a blocking step with 1% ovalbumin in buffer A (0.1 M phosphate buffer pH 7.4, 150 mM NaCl and 0.05% Tween 20) for 1 h at room temperature, sections were then incubated with Anti-STb gold conjugate diluted 1/6 in buffer B (20 mM tris pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20 and 0.5% ovalbumin) overnight. Following washing steps, sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and viewed in a Phillips 201 electron microscope operated at an accelerating voltage of 80 kV.

### 3. Results

The distribution of toxin-anti-STb-gold particles complex on the surface and within the intestinal epithelial cells after STb incubation for 3 h in the rat loop model is shown in Fig. 1. Gold particles were mostly found intracellularly and were present in fewer number bound to the plasmic membrane. The toxin molecules at the surface of cells could be docked to the plasma membrane via its sulfatide receptor. As shown in Table 1., we observed for both proteins tested, STb and a fusion protein MBP-STb, a significant internalization process using the statistical test ANOVA, for  $F(2,174) = 51.5$ ,  $p < 0.0001$ . Moreover, the fusion protein MBP-STb seemed to behave like the STb toxin as the means of gold particles per field were not significantly different ( $p < 0.05$ ). Those assays were repeated twice and similar results were obtained.

In another experiment, internalization of mutant I41E-M42R was compared to native STb toxin. As observed in Table II, the mean number of gold particles per field for the mutant I41E-M42R was significantly different ( $p < 0.0005$ ) from STb toxin but not significantly different from the PBS negative control according to the statistical Student *t* test. The relative percentage of internalization for the STb mutant was 7.4 % compared to the native STb toxin. No subcellular compartment seems to be particularly aimed by the toxin as gold particles were randomly distributed within the cell.

## 4. Discussion

The present study presents direct evidence of STb internalization in an *in vivo* animal model. Using an anti-toxin gold labeled assay followed by visualization by transmission electron microscopy, we have demonstrated that STb entered intestinal epithelial cells within the 3 hr incubation period. This supports the fact that the maximum activity of STb occurred after 3 hrs of incubation [12]. A study by Chao and Dreyfus on the binding of  $^{125}\text{I}$ -STb toxin to rat intestinal epithelial cells indicated that following its interaction with epithelial cells, approximately 50-80% of the toxin remained stably associated with the cells [2]. This observation, according to the authors, could imply that the toxin was partitioned into the membrane or could also be internalized by the cells. In a previous study, the same authors had shown that after adding STb to T84 and HT29 cells in culture, a significant fraction of the added toxin was free in cytoplasm as indicated by a reaction involving anti-STb antibody and a goat anti-rabbit IgG-Rhodamine conjugate. From their results, they concluded that the bound toxin could probably directly traverse the plasmic membrane [1]. The staining of the cytoplasm was diffuse indicating that STb did not appear to preferentially associate with membrane vesicles or cellular organelles.

In our study, STb and MBP-STb, a fusion protein, were equally internalized within rat intestinal epithelial cells *in vivo*. This corroborates the results obtained in a previous study with those molecules as both were biologically active *in vivo* [6].

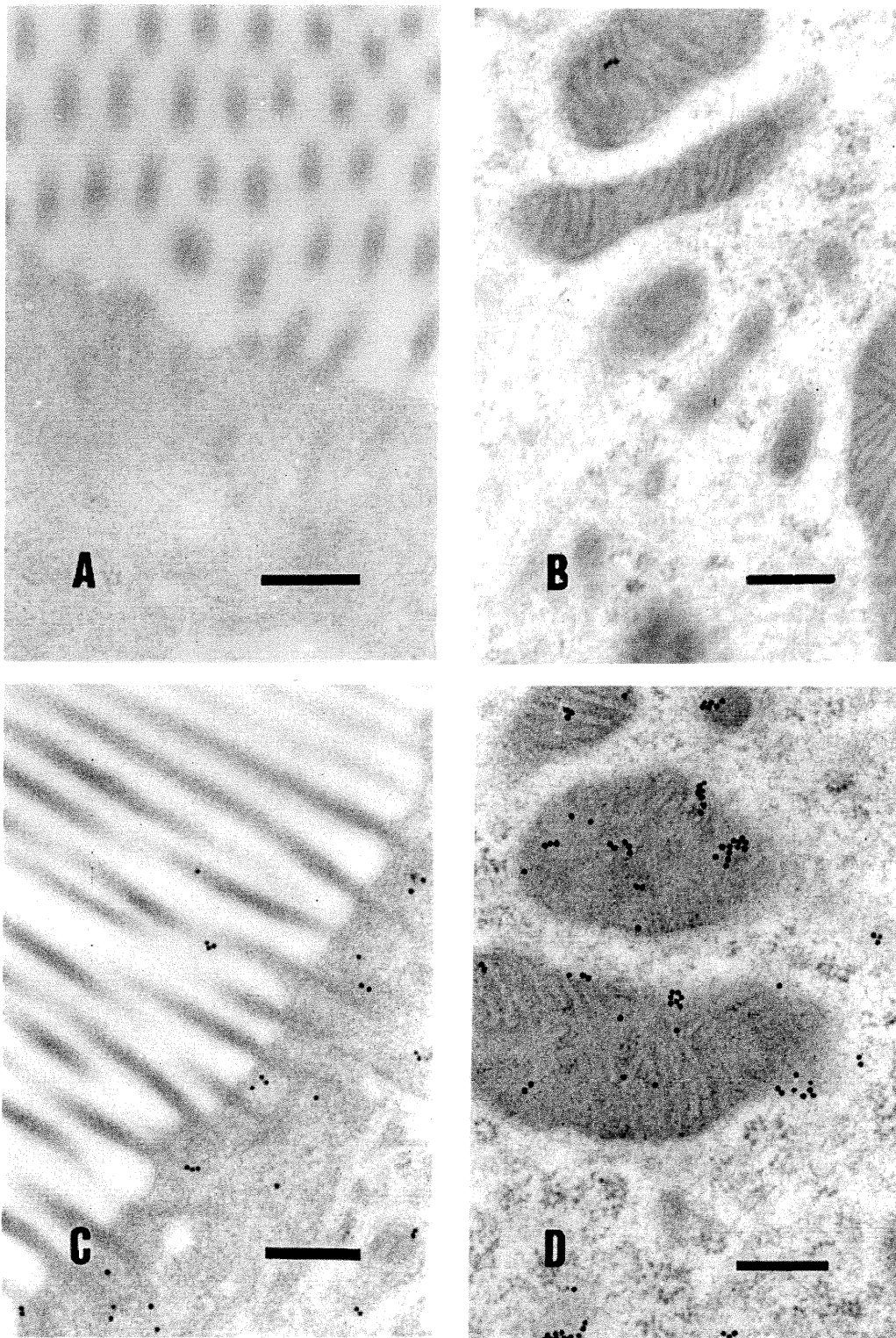
The results obtained for STb mutant I41E-M42R suggest that the hydrophobic  $\alpha$ -helix via the amino acids residues I41 and M42 could be involved in the internalization process. Knowing that these residues (I41 and M42) are necessary for oligomerization [14], the role of these residues could be either due to their direct implication in hydrophobic interaction during the passage through the plasmic membrane or the requirement for the oligomerization process before internalization could occur. Interestingly, since these residues (I41 and M42) have also been shown to be important for enterotoxicity [13], perhaps this may mean that internalization is crucial for enterotoxicity of STb. Many toxins that show internalization activity possess hydrophobic or amphipathic alpha helical structures as observed for STb toxin. Further studies with reporter proteins such as the

green fluorescent protein (GFP), for example, could be useful to detail the pathway taken by STb during the internalization process.

## Acknowledgements

This work was supported by grant OGP0139070 to J.D. Dubreuil from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and grant 93-ER-0214 from Fonds pour la Formation au Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR). V. Labrie is the recipient of a doctorate studentship from FCAR.

We thank C. Lussier for her valuable collaboration with the electronic microscope; G. Beauchamp for his helpful advices with statistical analysis; and H.-E. Beausoleil for his valuable help. The authors thank Dr M. Jacques for his help with the electron microscopy protocol used in this study.



**Figure 1.** Distribution within epithelial cells of rat intestine of STb toxin as detected by gold labeled anti-STb. A and B represent PBS negative controls whereas C and D are STb-treated rat intestine. In A and C, intestinal microvilli are shown whereas in B and D, we can observe intracellular compartments. Bars = 2.5  $\mu\text{m}$ .

**Table I.** Internalization of STb and MBP-STb within rat jejunum epithelial cell as revealed with anti-STb labeled with gold particles

Sample tested	<sup>a</sup> Mean of intracellular gold particles per field
Control (PBS)	7.7
STb	45.6
MBP-STb	46.7

<sup>a</sup> Average of 60 electron microscope fields. The values are the means of three experiments.

**Table II.** Internalization of STb and I41E-M42R mutant within rat jejunum epithelial cell as revealed with anti-STb labeled with gold particles

Sample tested	<sup>a</sup> Mean of intracellular gold particles per field
Control (PBS)	32.3
STb	44.2
I41E-M42R mutant	33.2

<sup>a</sup> Average of 60 electron microscope fields. The values are the means of two experiments.



## References

- [1] Chao K.L., Dreyfus L.A., Interaction of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B with cultured human intestinal epithelial cells, *Infect. Immun.* 65 (1997) 3209-3217.
- [2] Chao K.L., Dreyfus L.A., Interaction of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B with rat intestinal epithelial cells and membrane lipids, *FEMS Microbiol. Lett.* 172 (1999) 91-97.
- [3] Dreyfus L.A., Harville B., Howard D.E., Shaban R., Beatty D.M., Morris S.J., Calcium influx mediated by the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B (ST<sub>B</sub>), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 3202-3206.
- [4] Dubreuil J.D., *Escherichia coli* ST<sub>B</sub> enterotoxin, *Microbiology* 143 (1997) 1783-1795.
- [5] Dubreuil J.D., Fairbrother J.M., Lallier R., Larivière S., Production and purification of heat-stable enterotoxin b from a porcine *Escherichia coli* strain, *Infect. Immun.* 59 (1991) 198-203.
- [6] Dubreuil J.D., Letellier A., Harel J., A recombinant *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b (ST<sub>B</sub>) fusion protein eliciting neutralizing antibodies, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 13 (1996) 317-323.
- [7] Fujii Y., Kondo Y., Okamoto K., Involvement of prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II, *FEMS Microbiol. Lett.* 130 (1995) 259-265.
- [8] Fujii Y., Nomura T., Yamanaka H., Okamoto K., Involvement of Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent protein kinase II in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II, *Microbiol. Immunol.* 41 (1997) 633-636.
- [9] Frens G., Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspension, *Nature* 241 (1973) 20-22.
- [10] Handl C.E., Harel J., Flock J.I., Dubreuil J.D., High yield of active ST<sub>B</sub> enterotoxin from a fusion protein (MBP-ST<sub>B</sub>) expressed in *Escherichia coli*, *Protein Expr. Purif.* 4 (1993) 275-281.
- [11] Handl C., Ronnberg B., Nilsson B., Olsson E., Jonsson H., Flock J.I., Enzyme-linked immunosorbent assay for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin type II, *J. Clin. Microbiol.* 26 (1988) 1555-1560.

- [12] Hitotsubashi S., Fujii Y., Yamanaka H., Okamoto K., Some properties of purified *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II, *Infect. Immun.* 60 (1992) 4468-4474.
- [13] Labrie V., Beausoleil H.E., Harel J., Dubreuil J.D., Binding to sulfatide and enterotoxicity of various *Escherichia coli* STb mutants, *Microbiology* 147 (2001) 3141-3148.
- [14] Labrie V., Harel J., Dubreuil J.D., Oligomerization of *Escherichia coli* enterotoxin b through its C-terminal hydrophobic alpha-helix, *Biochem. Biophys. Acta* 1535 (2001) 128-133.
- [15] Peterson J.W., Whipp S.C., Comparison of the mechanisms of action of cholera toxin and the heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*, *Infect. Immun.* 63 (1995) 1452-1461.
- [16] Rousset É., Harel J., Dubreuil J.D., Sulfatide from the pig jejunum brush border epithelial cell surface is involved in binding of *Escherichia coli* enterotoxin b, *Infect. Immun.* 66 (1998) 5650-5658.
- [17] Sukumar M., Rizo J., Wall M., Dreyfus L.A., Kupersztoch Y.M., Gierasch L.M., The structure of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b by nuclear magnetic resonance and circular dichroism, *Protein Sci.* 4 (1995) 1718-1729.

## **DISCUSSION ET CONCLUSIONS**

# **IV**

La première étape du mécanisme d'action d'une toxine est son attachement à une cellule hôte. Le sulfatide (SFT) correspond à un récepteur fonctionnel de STb (Rousset *et al.*, 1998). Le sulfatide est aussi un récepteur pour la bactérie *Helicobacter pylori* (Ascencio *et al.*, 1993; Huesca *et al.*, 1996; Saitoh *et al.*, 1991) et la glycoprotéine gp120 du virus VIH (Bhat *et al.*, 1993; van den Berg *et al.*, 1992). L'épitope reconnu sur le SFT par STb est le galactose-3 sulfate et son affinité pour STb est de  $K_D$  2-6  $\mu$ M (Beausoleil & Dubreuil, 2001). Par opposition, on en sait très peu sur le paratope ou les acides aminés chez STb et les autres structures cités ci-haut liant le SFT. Ce premier contact qu'est l'attachement est une étape très importante pour une toxine, car cela déclenchera l'induction de signaux (Field *et al.*, 1978; Hughes *et al.*, 1978), la translocation de la toxine (Collier, 1999; Veithen *et al.*, 2000) ou autre évènement. Après la liaison de STb avec le SFT, on ne connaît pas la suite des évènements menant à l'ouverture du canal calcique et ni les régions ou acides aminés qui participent.

En premier lieu, 17 mutants ponctuels simple ou double de la toxine STb ont été produits, purifiés. L'intégrité struturelle de ces 17 mutants de STb a été vérifiée par dichroïsme circulaire (CD) pour vérifier que les toxines mutantes conservaient leur structure native. Puisqu'il est démontré que les acides aminés basiques (K22, K23 et R29) sont importants dans l'entérotoxicité, ils ont donc été sélectionnés afin d'étudier leur importance dans l'attachement au SFT. La boucle C21-C36 et l'hélice  $\alpha$  hydrophobe ont aussi été analysés à cause de la présence d'acides aminés chargés et hydrophobes, respectivement. La structure tridimensionnelle de STb obtenue par Sukumar *et al.* (1995) par résonance magnétique nucléaire a permis de faire un choix éclairé des acides aminés à muter (Sukumar *et al.*, 1995). Puisqu'une technique quantitative d'évaluation de l'attachement STb-SFT en microplaque 96-puits a été mise au point récemment (Beausoleil & Dubreuil, 2001), les mutants de STb ont donc tous été testés pour leur attachement au SFT. Parallèlement, l'entérotoxicité fut évaluée par la méthode éprouvée des anses ligaturées de jéjunum de rat (Dubreuil *et al.*, 1991).

En tenant compte du  $pI$  hautement basique de STb (9.6) et de la présence du groupement négatif sulfate porté par le SFT, il était tout à fait approprié de s'attendre à ce que certains acides aminés basiques puissent interagir avec le SFT. Notamment, les K22, K23 (Fujii *et*

*al.*, 1994) et R29 (Dreyfus *et al.*, 1992) furent démontrés importants dans l'activité sécrétoire de STb lors d'expérience par mutagenèse dirigée de la toxine STb. Nous avons donc muté ces mêmes acides aminés par des alanines (K22A, K23A et R29A) et obtenu une diminution significative de l'attachement de ces mutants au SFT. De plus, il semblait y avoir un effet additif de réduction de liaison au SFT tel qu'observé par le double mutant K22A-K23A. Bien qu'individuellement les acides aminés K22, K23 et R29 semblent avoir une implication équivalente dans l'activité d'attachement au SFT, la capacité de liaison du double mutant K22A-K23A était davantage réduite que K22A-R29A. Ceci suggérerait peut-être un rôle plus important pour K22 et K23 versus R29 dans la liaison au SFT.

Les résultats obtenus avec tous les mutants corroborent aussi l'idée que l'attachement au récepteur SFT est l'étape initiatrice du processus entérotoxique de STb: la baisse de toxicité était toujours plus grande ou égale à la baisse d'attachement au SFT. Quant à la lysine 23, la dissociation observée pour les mutants K23A, K22A-K23A et K23A-R29A au niveau des activités entérotoxiques et de liaison au SFT (entérotoxicité < activité de liaison) témoigne de la possibilité d'un rôle additionnel en ce qui concerne l'entérotoxicité.

À l'intérieur de la boucle C21-C36, la suppression de la charge négative de l'aspartate éliminerait une force répulsive entre le sulfate anionique du SFT et D30. C'est ce qui se traduirait par la forte augmentation d'affinité des mutants D30A et D30V pour le SFT. Par contre, on constate que ces mutations altèrent une étape suivante dans l'entérotoxicité tel qu'observé avec le mutant D30A ainsi que le mutant D30V créé par l'équipe de Dreyfus. On observe avec ces mutants des niveaux similaires d'entérotoxicité de 39 et 49%, respectivement (Dreyfus *et al.*, 1992). On retrouve aussi quatre glycines procurant une flexibilité à la boucle. La présence de G24, 27, 31 et 34 pourrait avoir une importance dans les activités de liaison et d'entérotoxicité. Par exemple, l' $\alpha$ -toxine de *S. aureus* possède aussi des régions riches en glycine lui facilitant son insertion membranaire. L'hypothèse fut vérifiée avec pour résultat une diminution des activités d'attachement et d'entérotoxicité pour G24A, G27P et G31A, alors que pour G34A seule la toxicité a diminué. Il est possible que l'élimination de la flexibilité ou de la petitesse spatiale des glycines soient responsables de ces effets. Tel qu'observé pour K23, les G31 et G34 semblent avoir un rôle supplémentaire dans l'entérotoxicité autre que simplement l'attachement.

Par comparaison avec la sous-unité FasG du fimbriae 987P laquelle se lie à un récepteur SFT. Il a été démontré pour cette dernière que ce sont les acides aminés basiques R116, K117 et K118 qui jouent le rôle d'attachement au SFT. Ainsi, chez STb et FasG, une concentration d'acides aminés basiques établirait un lien ionique avec le groupement sulfate du SFT (Choi & Schifferli, 1999). Un constat similaire fut observé avec la properdine (Holt *et al.*, 1990) et la laminine (Andac *et al.*, 1999), qui sont des protéines se liant le SFT. Par homologie de séquence, STb présente des similarités la flavonol 3-sulfotransférase (ST), une enzyme utilisant le PAPS (3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate) comme cosubstrat. Structurellement, PAPS ressemble au SFT, les deux molécules ont un sulfate acide fixé à un monosaccharide. En 1995, à l'aide de mutants ponctuels produits dans la séquence <sup>276</sup>**RKGXXGDWK(N/T)XFT**<sup>288</sup> de ST, Marsolais et Varin ont démontré l'importance des acides aminés R276, K277, G281 et K284 dans la liaison avec le co-substrat (Marsolais & Varin, 1995). Ces résidus pourraient correspondre à K22, K23, G27 et R29 retrouvés dans la boucle de STb, <sup>22</sup>**KKGFLGVRDGTAGA**<sup>35</sup>. Par ailleurs, ces séquences partagent une certaine homologie avec le motif de reconnaissance du GTP, Walker A [GXXXXGK(T/S)], une région riche en glycine avec un acide aminé basique (Bossemeyer, 1994; Saraste *et al.*, 1990; Traut, 1994; Vetter & Wittinghofer, 1999). Conjointement, PAPS et le SFT s'apparentent au GTP. Une comparaison de structure tridimensionnelle entre STb et un consensus de protéines liant le GTP démontre également une homologie, c'est-à-dire une boucle juxtaposée d'hélices  $\alpha$ .

Au niveau de l'hélice  $\alpha$  hydrophobe, les mutants F37K, I41S et M42S ont démontré une faible capacité de liaison au SFT. Toutefois, ces résultats contredisaient d'autres obtenus dans notre laboratoire. En effet, Rousset *et al.* (1998) ont déterminé le galactose sulfaté en 3' comme étant l'épitope spécifiquement reconnu par STb. Pourtant, cette structure composée d'un groupement hémiacétal et de groupements alcool offre peu possibilité d'interaction hydrophobe. Donc, théoriquement, aucune interaction hydrophobe directe pourrait avoir lieu entre STb et le SFT. L'explication plausible du rôle des acides aminés F37, I41 et M42 dans la liaison au SFT serait l'oligomérisation de STb. En effet, le rôle de ces acides aminés serait au niveau de la liaison protéine-protéine et non protéine-récepteur. La diminution du signal lors d'essai mutant-récepteur serait due à une quantité moindre de

mutant (mutant = monomère/1 SFT par opposition à STb = oligomère/1 SFT) révélé par l'anticorps.

Afin de prouver cette hypothèse, nous avons mis en évidence la formation d'hexamères et d'heptamères de STb. La présence du récepteur SFT n'était pas nécessaire à l'oligomérisation. Cependant, l'intégrité de la structure tridimensionnelle de STb était indispensable à la formation d'oligomères. C'est aussi le même constat qui a été fait avec l'entérotoxicité et l'attachement au SFT. La nécessité d'une bonne conformation de STb pour obtenir une activité entérotoxique provient peut-être du besoin d'arrangement en oligomère afin d'obtenir cette entérotoxicité. Dans le but de déterminer une concentration minimale d'oligomérisation, nous avons abaissé la concentration de STb jusqu'à 46  $\mu\text{M}$  de STb, à la limite de détection de l'expérimentation, et obtenu le même profil d'oligomérisation. Selon l'hypothèse assignant aux acides aminés F37, I41 et M42 un processus d'oligomérisation plutôt qu'une interaction directe avec le SFT, on a investigué la nature du lien maintenant les monomères STb en oligomère. Après divers traitements de détergents et l'utilisation de mutants, on a pu attester la présence d'un lien hydrophobe entre les monomères de STb impliquant les acides aminés F37, I41 et M42. Par conséquent, à la lumière des différents résultats lors d'essais d'attachement au SFT et d'essais d'oligomérisation, nous suggérons deux rôles à la liaison de STb au SFT. D'une part, un attachement basal entre la boucle de STb et le SFT et d'autre part, une activité de liaison STb-STb via les hélices  $\alpha$  hydrophobes. La somme de ces activités d'attachement représente un tout dont la constante d'affinité ( $k_D$ ) pour le SFT est de 2-6  $\mu\text{M}$  (Beausoleil & Dubreuil, 2001).

L'implication de l'hélice  $\alpha$  hydrophobe dans l'entérotoxicité a aussi été étudiée. À l'aide de mutants ayant une hydrophobicité réduite, on a pu établir que les acides aminés F37, I41 et M42 jouent un rôle dans entérotoxicité. Indirectement, ceci signifie peut-être un besoin d'oligomérisation dans l'entérotoxicité de STb.

Notre dernier objectif était de déterminer ce qui advenait de STb suivant son attachement au SFT. De par sa nature glycolipidique, le SFT ne peut transmettre de message à la cellule. Une hypothèse serait à l'effet que STb interagirait avec la membrane plasmique. On a donc

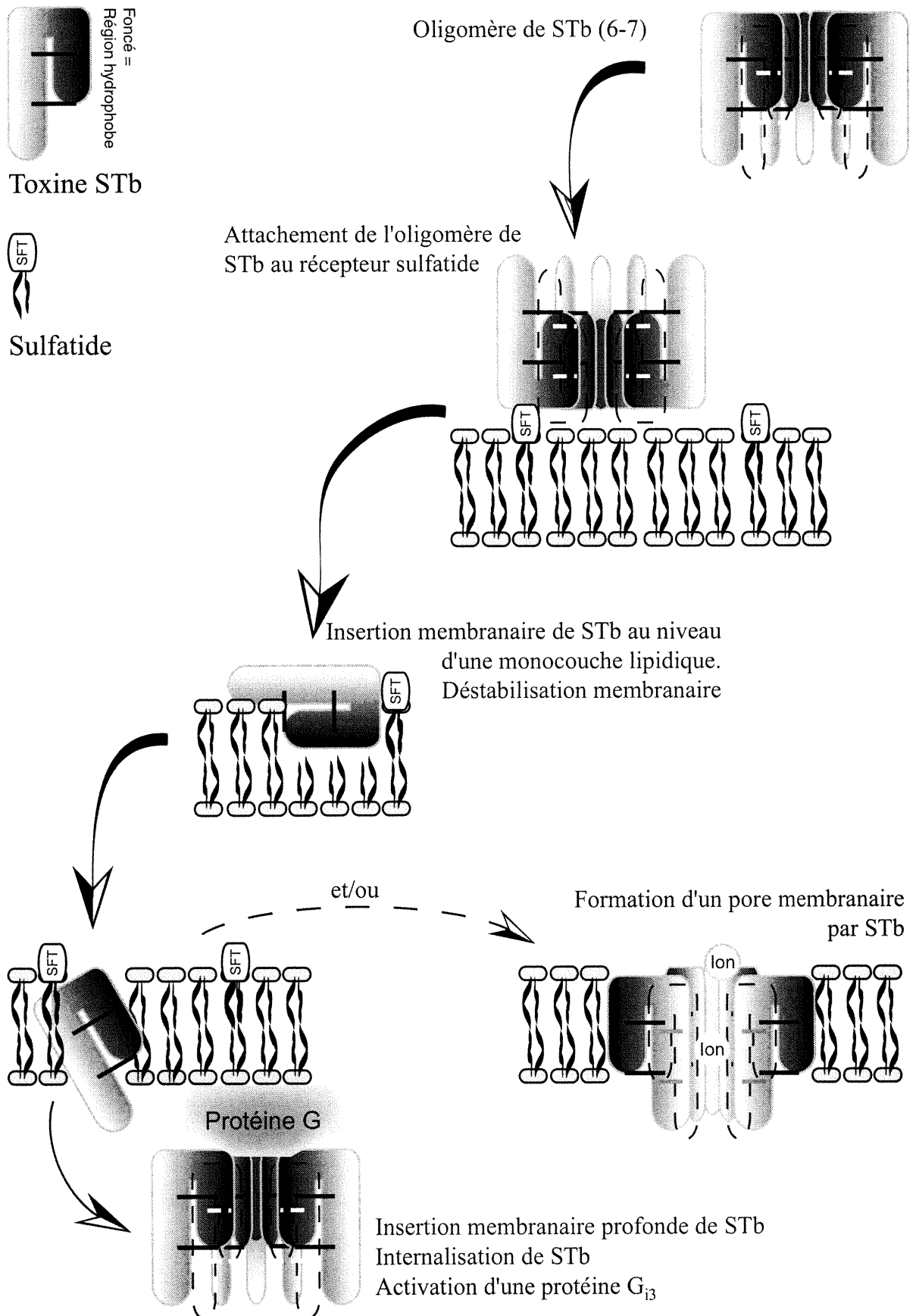
élaboré l'expérimentation sur deux volets: d'une part, l'étude de la déstabilisation et de la formation de pore membranaire par STb et d'autre part, l'étude de l'internalisation de STb. À l'aide de la technique en bicouche lipidique planaire (PLB), on a pu mettre en évidence la formation de canal par STb (Annexe 3). Par ailleurs, il n'est pas exclu que le pore membranaire formé par STb soit aussi un oligomère dont des liens électrostatiques maintiendraient les monomères de STb entre eux. Le canal produit avait une conductance d'environ 180 pS en condition symétrique de 1M KCl. En outre, on y a observé des multiples (X3) de sous-conductances. Comparativement, l' $\alpha$  toxine de *S. aureus* à une conductance de 90 pS en présence de 0.1M KCl (Menestrina, 1986).

Dans la seconde moitié expérimentale, on a démontré *in vivo* l'internalisation de la toxine STb et également de la protéine de fusion MBP-STb au niveau de l'épithélium intestinal de rat. Aucune organelle semblait préférentiellement ciblée. Fait intéressant, pour le mutant I41E-M42R, présentant une réduction d'hydrophobicité, nous n'avons pas observé d'internalisation. Donc, l'hélice  $\alpha$  hydrophobe de STb par l'entremise des acides aminés F37, I41 et M42 pourrait diriger ces interactions membranaires: formation de pore et internalisation de STb.

En considérant l'information rapportée dans cette thèse et celle déjà connue dans la littérature, cela nous a permis d'élaborer un modèle du mécanisme d'action (Schéma 1). Les résultats obtenus dans l'article 2 démontrent qu'en solution, la toxine STb adopte une conformation hexamérique ou heptamérique. Le milieu aqueux forcerait ainsi une oligomérisation via une interaction au niveau de l'hélice  $\alpha$  hydrophobe (Sur le schéma 1. la région hydrophobe de STb est représentée en foncé). Donc avant même de s'attacher à son récepteur SFT, STb serait sous forme d'oligomère. Ceci est d'autant plus plausible que l'oligomérisation est indépendante de la présence du récepteur libre ou inséré en liposome (Labrie *et al.*, 2001).

Ensuite, il y aurait attachement de l'oligomère de STb au récepteur SFT. Cette liaison spécifique entre une boucle (C21-C36) de la toxine STb et le galactose 3-sulfate, l'épitope chez le SFT serait une interaction de nature électrostatique. Par ailleurs, il n'est pas exclu que d'un même oligomère il y ait plus d'une molécule de STb de liée au SFT.





**Shéma 1.** Modèle proposé du mécanisme d'action de la toxine STb.

Le SFT semble se rassembler en amas par association galactose-galactose médiée par des cations divalents (Koshy *et al.*, 1999). Ce regroupement pourrait permettre à d'autres SFT de se trouver à proximité du SFT liant l'oligomère et ainsi de permettre de se lier aux boucles libres (C21-C36) de STb.

Suivant l'attachement au SFT, il y aurait insertion membranaire de STb au niveau du feuillet externe. La disposition de STb avec la membrane permettrait une interaction hydrophobe entre l'hélice  $\alpha$  (hydrophobe) et les chaînes acyle gras hydrophobes, alors que l'hélice  $\alpha$  amphipatique pointe ses chaînes latérales polaires vers le milieu aqueux externe. Cet arrangement hélicoïdal parallèle à la membrane n'est pas unique, les peptides antimicrobiens magainines 1 et 2 (Bechinger, 1997; Bechinger *et al.*, 1993; Matsuzaki *et al.*, 1994) et l' $\alpha$ -hémolysine d'*Escherichia coli* (Soloaga *et al.*, 1999) possèdent également des hélices  $\alpha$  amphipatiques leur permettant une insertion à la surface membranaire. La conséquence de cette incrustation est la fuite de composants cellulaires. L'insertion d'une ou plusieurs toxines STb dans la monocouche externe de la membrane induit une augmentation de la pression latérale de la monocouche lipidique jusqu'à un point de rupture transitoire (compensé par un transfert net de lipides vers la monocouche interne) entraînant une fuite du contenu cellulaire. Cette déstabilisation membranaire permettrait ainsi l'entrée du bleu Trypan dans la cellule tel que démontré lors d'expériences avec le modèle cellulaire (Annexe 2) sans pour autant tuer la cellule (Beausoleil *et al.*, 2002). D'autres expériences sont en chantier pour confirmer ce mécanisme ainsi la déstabilisation membranaire par STb est étudiée en mesurant la fuite liposomale de calcéïne, une sonde fluorescente. En outre, la nécessité du récepteur SFT pour que le processus se réalise sera étudiée. De fait, lors d'expériences d'entrée de bleu Trypan le SFT devait être présent pour permettre la coloration cellulaire (Beausoleil *et al.*, 2002). L'importance de ce mécanisme dans le processus sécrétoire de STb demeure cependant indéterminé.

Après un premier contact de STb au niveau de la monocouche, une pénétration membranaire plus profonde s'en suivrait. Des considérations énergétiques de la structure de STb dans un environnement non-polaire de lipide suggèrent que STb se trouverait alors déstabilisé dans la membrane. Selon les auteurs Engelman et Steitz (1981), un polypeptide en forme d'épingle (hélice-boucle-hélice) s'insère spontanément dans la bicouche sur la

base d'interaction hydrophobe. Si les deux hélices sont hydrophobes, le polypeptide restera positionné dans la membrane tandis que si l'une est polaire il y aura éviction du polypeptide hors de la membrane. On explique cela par le coût trop élevé en énergie libre pour maintenir enfouie une structure polaire en environnement hydrophobe (Engelman & Steitz, 1981). Donc, en transposant ces données à STb, il appert qu'un monomère de celui-ci ne peut persister en profondeur dans la bicouche à cause de son hélice  $\alpha$  amphipatique.

Par conséquent, STb sera vite internalisé dans la cellule hôte tel que démontré *in vivo* dans cet ouvrage. Alternativement, une autre issue serait la formation d'un canal par plusieurs monomères de STb. En ce sens, on a pu mettre en évidence la formation de pore membranaire par STb d'une conductance d'environ 180 pS en présence du récepteur sulfatide (Annexe 3). La difficulté à obtenir un canal en bicouche lipidique planaire (PLB) démontre peut-être, quoiqu'en conditions artificielles, la précarité d'un phénomène opportun qui pourrait jouer un rôle secondaire.

Un arrangement en oligomère inséré dans la membrane (non étudié dans cette thèse) permettrait de regrouper à l'intérieur du complexe oligomérique les hélices  $\alpha$  amphipatiques. Ainsi, les hélices  $\alpha$  hydrophobes disposés à l'extérieur du complexe interagiraient avec l'intérieur hydrophobe de la membrane alors que les chaînes latérales polaires des hélices  $\alpha$  amphipatiques constitueraient le canal ionique.

La sélectivité du pore produit par STb n'a pas encore été déterminée, elle pourrait cependant révéler l'importance de ce pore membranaire dans le mécanisme d'action de STb. On sait qu'il y a une entrée importante de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule par un canal calcique voltage indépendant indéterminé (Dreyfus *et al.*, 1993) lequel serait peut-être régulé par une protéine  $G_{13}$  sensible à la toxine pertussique (Dreyfus *et al.*, 1993). Donc, aucune étude n'a prouvé un lien entre la dite protéine G et le canal calcique et aucune étude n'a caractérisé ce canal. Le pore formé par STb pourrait être à l'origine de cette augmentation intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$ . En outre, aucune analyse portant sur les changements potassiques intra- et extracellulaires n'a été effectuée en présence de STb. Par contre, des études ont démontré l'importance d'ions négatifs dans le processus sécrétoire causé par STb, soit le  $\text{HCO}_3^-$  et le  $\text{Cl}^-$  (Argenzio *et al.*, 1984; Weikel & Guerrant, 1985; Weikel *et al.*, 1986b).

Considérant la théorie sur la sélectivité des pores (Partie II Section 4.1.3); un pore possédant des acides aminés chargés positivement entraînerait une sélectivité aux anions. On pourrait inférer une sélectivité aux anions au canal formé par la toxine STb puisqu'elle contient un nombre appréciable d'acides aminés basiques [1H, 2R, 6K. (*pI* 9.6)]. Le canal produit par STb pourrait être responsable de l'apport extracellulaire en  $\text{HCO}_3^-$  ou  $\text{Cl}^-$ .

En bref, l'instabilité de STb inséré en profondeur dans la membrane conduit rapidement soit à la formation d'un canal membranaire ou soit au passage complet de la toxine à travers la membrane. Immédiatement après internalisation, on ne connaît pas le destin de STb. On suggère cependant que STb activerait la protéine  $G_{i3}$  sensible à la toxine pertussique. On ne possède que peu d'information sur la nature de cette activation. Les auteurs rapportent généralement qu'il pourrait y avoir une activation directe impliquant une interaction entre la toxine STb et la protéine G. C'est d'ailleurs le cas du mastopaparan, une toxine peptidique du venin de guêpe, lequel active une protéine  $G_{i3}$  en C-terminal (Weingarten *et al.*, 1990).

## CONCLUSIONS

Les travaux décrits dans cette thèse ont amélioré nos connaissances sur la toxine STb quant à ses propriétés structurales d'oligomérisation, son interaction avec le récepteur SFT, l'étape d'internalisation et l'entérototoxicité. Les mutants de STb nous ont permis de déterminer que la boucle de STb se lie spécifiquement au SFT et que l'hélice  $\alpha$  hydrophobe est impliquée dans les processus d'oligomérisation et d'internalisation. L'intégrité de STb serait nécessaire à l'oligomérisation et l'attachement au SFT et conséquemment, aucune entérototoxicité n'a été observé en présence de STb réduit.

Nous suggérons qu'il existe une interaction électrostatique entre les acides aminés basiques (K22, K23 et R29) et le SFT. Également, les glycines 24, 27 et 31 semblent participer à la liaison au SFT. Par contre, l'aspartate 30 semble nuire à l'attachement au SFT. Il y aurait aussi une interaction hydrophobe entre les acides aminés F37, I41 et M42 de l'hélice  $\alpha$  hydrophobe permettant l'oligomérisation. Donc, l'étape d'attachement de STb au SFT serait composé d'une liaison basale entre la boucle de STb et SFT et aussi de liaisons oligomériques STb-STb. De plus, les acides aminés I41 et M42 joueraient aussi un rôle lors de l'internalisation de STb. Nous avons pu dissocier l'entérototoxicité de la fonction attachement au récepteur pour certains acides.

Ainsi, la caractérisation des mutants permettra de développer une approche prophylactique pour les élevages porcins et prévenir la toxicité causée par STb.

## **BIBLIOGRAPHIE**

**V**

**Abrami, L., Fivaz, M., Glauser, P. E., Parton, R. G. & van der Goot, F. G. (1998).** A pore-forming toxin interacts with a GPI-anchored protein and causes vacuolation of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **140**, 525-540.

**Akashi, N., Hitotsubashi, S., Yamanaka, H., Fujii, Y., Tsuji, T., Miyama, A., Joya, J. E. & Okamoto, K. (1993).** Production of heat-stable enterotoxin II by chicken clinical isolates of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **109**, 311-315.

**Alderete, J. F. & Robertson, D. C. (1977).** Repression of heat-stable enterotoxin synthesis in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **17**, 629-633.

**Andac, Z., Sasaki, T., Mann, K., Brancaccio, A., Deutzmann, R. & Timpl, R. (1999).** Analysis of heparin, alpha-dystroglycan and sulfatide binding to the G domain of the laminin alpha1 chain by site-directed mutagenesis. *J Mol Biol* **287**, 253-264.

**Argenzio, R. A., Liacos, J., Berschneider, H. M., Whipp, S. C. & Robertson, D. C. (1984).** Effect of heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli* and theophylline on ion transport in porcine small intestine. *Can J Comp Med* **48**, 14-22.

**Arriaga, Y. L., Harville, B. A. & Dreyfus, L. A. (1995).** Contribution of individual disulfide bonds to biological action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B. *Infect Immun* **63**, 4715-4720.

**Ascencio, F., Fransson, L. A. & Wadstrom, T. (1993).** Affinity of the gastric pathogen *Helicobacter pylori* for the N-sulphated glycosaminoglycan heparan sulphate. *J Med Microbiol* **38**, 240-244.

**Bardwell, J. C. (1994).** Building bridges: disulphide bond formation in the cell. *Mol Microbiol* **14**, 199-205.

**Bardwell, J. C., McGovern, K. & Beckwith, J. (1991).** Identification of a protein required for disulfide bond formation *in vivo*. *Cell* **67**, 581-589.

**Beausoleil, H. E., Labrie, V. & Dubreuil, J. D. (2002).** Trypan blue uptake by chinese hamster ovary cultured epithelial cells: a cellular model to study *Escherichia coli* STb enterotoxin. *Toxicon* **40**, 185-191.

**Beausoleil, H.-E. & Dubreuil, J. D. (2001).** *In vitro* Binding Characteristics and Affinity for Sulfatide of *Escherichia coli* STb Enterotoxin. *Recep Channels* **7**, 401-411.

**Bechinger, B. (1997).** Structure and functions of channel-forming peptides: magainins, cecropins, melittin and alamethicin. *J Membr Biol* **156**, 197-211.

**Bechinger, B., Zasloff, M. & Opella, S. J. (1993).** Structure and orientation of the antibiotic peptide magainin in membranes by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Protein Sci* **2**, 2077-2084.

**Benz, R., Maier, E. & Gentschev, I. (1993).** TolC of *Escherichia coli* functions as an outer membrane channel. *Zent bl Bakteriolog* **278**, 187-196.

**Benz, R., Schmid, A., Wagner, W. & Goebel, W. (1989).** Pore formation by the *Escherichia coli* hemolysin: evidence for an association-dissociation equilibrium of the pore-forming aggregates. *Infect Immun* **57**, 887-895.

**Bhakdi, S. & Tranum-Jensen, J. (1991).** Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Rev.* **55**, 733-751.

**Bhat, S., Mettus, R. V., Reddy, E. P., Ugen, K. E., Srikanthan, V., Williams, W. V. & Weiner, D. B. (1993).** The galactosyl ceramide/sulfatide receptor binding region of HIV-1 gp120 maps to amino acids 206-275. *AIDS Res Hum Retroviruses* **9**, 175-181.

**Biggin, P. C. & Sansom, M. S. (1996).** Simulation of voltage-dependent interactions of alpha-helical peptides with lipid bilayers. *Biophys Chem* **60**, 99-110.



**Blanco, M., Blanco, J. E., Gonzales, E. A., Mora, A., Jansen, W., Gomes, T. A. T., Zerbini, F., Yano, T., de Castro, A. F. P. & Blanco, J. (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.

**Boehm, D. F., Welch, R. A. & Snyder, I. S. (1990).** Domains of *Escherichia coli* haemolysin (HlyA) involved in binding of calcium and erythrocyte membranes. *infect immun* **58**, 1959-1964.

**Bossemeyer, D. (1994).** The glycine-rich sequence of protein kinases: a multifunctional element. *Trends Biochem Sci* **19**, 201-205.

**Brauner, J. W., Mendelsohn, R. & Prendergast, F. G. (1987).** Attenuated total reflectance Fourier transform infrared studies of the interaction of melittin, two fragments of melittin, and delta-hemolysin with phosphatidylcholines. *Biochemistry* **26**, 8151-8158.

**Brenner, D. J. (1984).** Enterobacteriaceae. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, pp. 408-422. Edited by N. R. Kreig & J. G. Holt. Baltimore: The Williams & Wilkins Co.

**Buckley, J. T., Wilmsen, H. U., Lesieur, C., Schulze, A., Pattus, F., Parker, M. W. & van der Goot, F. G. (1995).** Protonation of histidine-132 promotes oligomerization of the channel-forming toxin aerolysin. *Biochemistry* **34**, 16450-16455.

**Burgess, M. N., Bywater, R. J., Cowley, C. M., Mullan, N. A. & Newsome, P. M. (1978).** Biological evaluation of a methanol-soluble, heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits, and calves. *Infect Immun* **21**, 526-531.

**Busque, P., Letellier, A., Harel, J. & Dubreuil, J. D. (1995).** Production of *Escherichia coli* STb enterotoxin is subject to catabolite repression. *Microbiology* **141**, 1621-1627.

**Butler, A., Tsunoda, S., McCobb, D. P., Wei, A. & Salkoff, L. (1993).** mSlo, a complex mouse gene encoding "maxi" calcium-activated potassium channels. *Science* **261**, 221-224.

**Cannon, R. J. C. (1996).** *Bacillus thuringiensis* use in agriculture: a molecular perspective. *Biol. Rev.* **71**, 561-636.

**Caprioli, A., Donelli, G., Falbo, V., Passi, C., Pagano, A. & Mantovani, A. (1991).** Antimicrobial resistance and production of toxins in *Escherichia coli* strains from wild ruminants and the alpine marmot. *J Wildlife Dis* **27**, 324-327.

**Casey, T. A., Herring, C. J., Schneider, R. A., Bosworth, B. T. & Whipp, S. C. (1998).** Expression of heat-stable enterotoxin STb adherent *Escherichia coli* is not sufficient to cause severe diarrhea in neonatal pigs. *Infect Immun* **66**, 1270-1272.

**Catterall, W. A., Seagar, M. J., Takahashi, M. & Nunoki, K. (1989).** Molecular properties of dihydropyridine-sensitive calcium channels. In *Calcium channels: structure and function*, pp. 479. Edited by w.-w. Dennis, R. I. Norman & P. Hess. New-York: Annals of New York Academy of Sciences.

**Chao, K. L. & Dreyfus, L. A. (1997).** Interaction of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B with cultured human intestinal epithelial cells. *Infect Immun* **65**, 3209-3217.

**Choi, B.-K. & Schifferli, D. M. (1999).** Lysine residue 117 of the FasG adhesin of enterotoxigenic *Escherichia coli* is essential for binding of 987P fimbriae to sulfatide. *Infect Immun* **67**, 5755-5761.

**Choi, K. L., Mossman, C., Aube, J. & Yellen, G. (1993).** The internal quaternary ammonium receptor site of Shaker potassium channels. *Neuron* **10**, 533-541.

**Collier, R. J. (1982).** Structure and activity of diphtheria toxin. In *ADP-ribosylation reactions*, pp. 575. Edited by D. Hayashi & K. Ueda. New York: Academic Press.

**Collier, R. J. (1999).** Mechanism of membrane translocation by anthrax toxin: insertion and pore formation by protective antigen. *J Appl Microbiol* **87**, 283.

**Coote, J. G. (1992).** Structural and functional relationships among the RTX toxin determinants of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **88**, 137-162.

**Cornut, I., Thiaudière, E. & Dufourcq, J. (1993).** The amphipathic helix in cytotoxic peptides. In *The amphipathic helix*, pp. 173-219. Edited by R. M. Epand. Boca Raton, FL: CRC Press.

**De Castro, A. F., Gatti, M. S., Serafim, M. B., Brito, J. R. & de Barcellos, D. S. (1984).** Significance of thermostable enterotoxin produced by porcine enteropathogenic *Escherichia coli*. *Vet Rec* **115**, 518-519.

**Dobereiner, A., Schmid, A., Ludwig, A., Goebel, W. & Benz, R. (1996).** The effects of calcium and other polyvalent cations on channel formation by *Escherichia coli* alpha-hemolysin in red blood cells and lipid bilayer membranes. *Eur J Biochem* **240**, 454-460.

**Donnenberg, M. S., Kaper, J. B. & Finlay, B. B. (1997).** Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. *Trends Microbiol* **5**, 109-114.

**Dreyfus, L. A., Urban, R. G., Whipp, S. C., Slaughter, C., Tachias, K. & Kupersztoch, Y. M. (1992).** Purification of the ST<sub>B</sub> enterotoxin of *Escherichia coli* and the role of selected amino acids on its secretion, stability and toxicity. *Mol Microbiol* **6**, 2397-2406.

**Dreyfus, L. A., Harville, B., Howard, D. E., Shaban, R., Beatty, D. M. & Morris, S. J. (1993).** Calcium influx mediated by the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B (ST<sub>B</sub>). *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 3202-3206.

**Dubreuil, J. D. (1997).** *Escherichia coli* ST<sub>B</sub> enterotoxin. *Microbiology* **143**, 1783-1795.

**Dubreuil, J. D. (1999).** *Escherichia coli* ST<sub>B</sub> toxin and prostaglandin production. *Microbiology* **145**, 1507-1508.

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

**Dufourc, E. J., Dufourcq, J., Birkbeck, T. H. & Freer, J. H. (1990).** Delta-haemolysin from *Staphylococcus aureus* and model membranes. A solid-state <sup>2</sup>H-NMR and <sup>31</sup>P-NMR study. *Eur J Biochem* **187**, 581-587.

**Dunne, H. W. (1975).** In *Diseases of swine*, pp. 650-657. Edited by A. D. Leman. Ames, Iowa: State University Press.

**DuPont, H. L., Formal, S. B., Hornick, R. B., Snyder, M. J., Libonati, J. P., Sheahan, D. G., LaBrec, E. H. & Kalas, J. P. (1971).** Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. *N Engl J Med* **285**, 1-9.

**Echeverria, P., Seriwatana, J., Taylor, D. N., Tirapat, C. & Rowe, B. (1985b).** *Escherichia coli* contains plasmids coding for heat-stable b, other enterotoxins, and antibiotic resistance. *Infect Immun* **48**, 843-846.

**Echeverria, P., Seriwatana, J., Taylor, D. N., Tirapat, C., Chaicumpa, W. & Rowe, B. (1985a).** Identification by DNA hybridization of enterotoxigenic *Escherichia coli* in a longitudinal study of villages in Thailand. *J Infect Dis* **151**, 124-130.

**Engelman, D. M. & Steitz, T. A. (1981).** The spontaneous insertion of proteins into and across membranes: the helical hairpin hypothesis. *Cell* **23**, 411-422.

**English, L., Robbins, H. L. & Von, M. A. (1994).** Mode of action of CryIIA: a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. *Insect Biochem Mol Biol* **24**, 1025-1035.

**Ensminger, M. E. & Parker, R. O. (1984).** *Swine Science*, 5 edn. Danville, Illinois: Interstate.

**Fairbrother, J. M., Lariviere, S. & Johnson, W. M. (1988).** Prevalence of fimbrial antigens and enterotoxins in nonclassical serogroups of *Escherichia coli* isolated from newborn pigs with diarrhea. *Am J Vet Res* **49**, 1325-1328.

**Fairbrother, J. M., Broes, A., Jacques, M. & Lariviere, S. (1989).** Pathogenicity of *Escherichia coli* O115:K"V165" strains isolated from pigs with diarrhea. *Am J Vet Res* **50**, 1029-1036.

**Farmer, J. J. & Kelly, M. T. (1991).** Manual of Clinical Microbiology, pp. 360-383. Edited by A. Balows, W. J. Hausler, K. L. Herrmann, H. D. Isenberg & H. J. Shadomy. Washington D.C., USA: American Society for Microbiology.

**Field, M., Graf, L. H., Jr., Laird, W. J. & Smith, P. L. (1978).** Heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: in vitro effects on guanylate cyclase activity, cyclic GMP concentration, and ion transport in small intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 2800-2804.

**Findlay, G., Yu, J. & Hirst, T. R. (1993).** Analysis of enterotoxin synthesis in a *Vibrio cholerae* strain lacking DsbA, a periplasmic enzyme involved in disulphide bond formation. *Biochem Soc Trans* **21**, 212S.

**Fitton, J. E. (1981).** Physicochemical studies on delta-haemolysin, a staphylococcal cytolytic polypeptide. *FEBS lett* **130**, 257-260.

**Foreman, D. T., Martinez, Y., Coombs, G., Torres, A. & Kupersztoch, Y. M. (1995).** TolC and DsbA are needed for the secretion of STB, a heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **18**, 237-245.

**Freer, J. H. & Birkbeck, T. H. (1982).** Possible conformation of delta-lysin, a membrane-damaging peptide of *Staphylococcus aureus*. *J Theor Biol* **94**, 535-540.

**French, R. J. & Shoukimas, J. J. (1981).** Blockage of squid axon potassium conductance by internal tetra-N-alkylammonium ions of various sizes. *Biophys J* **34**, 271-291.

**Fujii, Y., Kondo, Y. & Okamoto, K. (1995).** Involvement of prostaglandin E2 synthesis in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *FEMS Microbiol Lett* **130**, 259-265.

**Fujii, Y., Nomura, T., Yamanaka, H. & Okamoto, K. (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.

**Fujii, Y., Hayashi, M., Hitotsubashi, S., Fuke, Y., Yamanaka, H. & Okamoto, K. (1991).** Purification and characterization of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *J Bacteriol* **173**, 5516-5522.

**Fujii, Y., Okamuro, Y., Hitotsubashi, S., Saito, A., Akashi, N. & Okamoto, K. (1994).** Effect of alterations of basic amino acid residues of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II on enterotoxicity. *Infect immun* **62**, 2295-2301.

**Germani, Y., Insisiengmay, S., Bouphe, P., Mixap, B., Khouan, T. & Le Gonidec, G. (1989).** [Characterization of the enterotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from children with diarrhea in Popular Democratic Republic Lao]. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* **82**, 465-475.

**Gill, S. S., Cowles, E. A. & Pietrantonio, P. V. (1992).** The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu Rev Entomol* **37**, 615-636.

**Gilson, L., Mahanty, H. K. & Kolter, R. (1990).** Genetic analysis of an MDR-like export system: the secretion of colicin V. *Embo J* **9**, 3875-3894.

**Goldstein, J. L., Sahi, J., Bhuvu, M., Layden, T. J. & Rao, M. C. (1994).** *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin-mediated colonic Cl<sup>-</sup> secretion is absent in cystic fibrosis. *Gastroenterology* **107**, 950-956.

**Gouaux, J. E., Braha, O., Hobaugh, M. R., Langzhou, S., Cheley, S., Shustak, C. & Bailey, H. (1994).** Subunit stoichiometry of staphylococcal alpha-toxine in crystals and on membranes: a heptameric transmembrane pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 12828-12831.

**Gray, L., Baker, K., Kenny, B., Mackman, N., Haigh, R. & Holland, I. B. (1989).** A novel C-terminal signal sequence targets *Escherichia coli* haemolysin directly to the medium. *J Cell Sci Suppl* **11**, 45-57.

**Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J. L., Brousseau, R. & Cygler, M. (1995).** *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J Mol Biol* **254**, 447-464.

**Gruber, H. J., Wilmsen, H. U., Cowell, S., Schindler, H. & Buckley, J. T. (1994).** Partial purification of the rat erythrocyte receptor for the channel-forming toxin aerolysin and reconstitution into planar lipid bilayers. *Mol Microbiol* **14**, 1093-1101.

**Guerrant, R. L. (1985).** Microbial toxins and diarrhoeal diseases: introduction and overview. *Ciba Found Symp* **112**, 1-13.

**Gyles, C. L. (1992).** *Escherichia coli* cytotoxins and enterotoxins. *Can J Microbiol* **38**, 734-746.

**Gyles, C. L. & Barnum, D. A. (1969).** A heat-labile enterotoxin from strains of *Escherichia coli* enteropathogenic for pigs. *J Infect Dis* **120**, 419-426.

**Hackett, J. & Reeves, P. (1983).** Primary structure of the *tolC* gene that codes for an outer membrane protein of *Escherichia coli* K12. *Nucleic Acids Res* **11**, 6487-6495.

**Hammermueller, J., Kruth, S., Prescott, J. & Gyles, C. (1995).** Detection of toxin genes in *Escherichia coli* isolated from normal dogs and dogs with diarrhea. *Can J Vet Res* **59**, 265-270.

**Handl, C. E. & Flock, J. I. (1992).** STb producing *Escherichia coli* are rarely associated with infantile diarrhoea. *J Diarrhoeal Dis Res* **10**, 37-38.

**Handl, C. E., Olsson, E. & Flock, J. I. (1992).** 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* **15**, 505-510.

**Handl, C. E., Harel, J., Flock, J. I. & Dubreuil, J. D. (1993).** High yield of active STb enterotoxin from a fusion protein (MBP-STb) expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **4**, 275-281.

**Hanke, W. & Schlue, W.-R. (1993).** *Planar lipid bilayers. Methods and applications.* London: Academic Press.

**Hardie, K. R., Issartel, J. P., Koronakis, E., Hughes, C. & Koronakis, V. (1991).** In vitro activation of *Escherichia coli* prohaemolysin to the mature membrane-targeted toxin requires HlyC and a low molecular-weight cytosolic polypeptide. *Mol Microbiol* **5**, 1669-1679.

**Harnett, N. M. & Gyles, C. L. (1985).** Linkage of genes for heat-stable enterotoxin, drug resistance, K99 antigen, and colicin in bovine and porcine strains of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Am J Vet Res* **46**, 428-433.

**Harville, B. A. & Dreyfus, L. A. (1995).** Involvement of 5-hydroxytryptamine and prostaglandin E2 in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B. *Infect immun* **63**, 745-750.

**Harville, B. A. & Dreyfus, L. A. (1996).** Release of serotonin from RBL-2H3 cells by the *Escherichia coli* peptide toxin STb. *Peptides* **17**, 363-366.



**Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T. & MacKinnon, R. (1994).** Mutations in the K<sup>+</sup> channel signature sequence. *Biophys J* **66**, 1061-1067.

**Hille, B. (1973).** Potassium channels in myelinated nerve. Selective permeability to small cations. *J Gen Physiol* **61**, 669-686.

**Hille, B. (1992).** *Ionic channels of excitable membranes*. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.

**Hirst, T. R. (1999).** Cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. In *The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins*, pp. 104-129. Edited by J. E. Alouf & J. H. Freer. London: Academic Press.

**Hitotsubashi, S., Fujii, Y., Yamanaka, H. & Okamoto, K. (1992a).** Some properties of purified *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *Infect immun* **60**, 4468-4474.

**Hitotsubashi, S., Akagi, M., Saitou, A., Yamanaka, H., Fujii, Y. & Okamoto, K. (1992b).** Action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II on isolated sections of mouse ileum. *FEMS Microbiol Lett* **69**, 249-252.

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

**Ho, M. W., Kaetzel, M. A., Armstrong, D. L. & Shears, S. B. (2001).** Regulation of a human chloride channel. a paradigm for integrating input from calcium, type ii calmodulin-dependent protein kinase, and inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate. *J Biol Chem* **276**, 18673-18680.

**Holmgren, J., Fredman, P., Lindblad, M., Svennerholm, A. M. & Svennerholm, L. (1982).** Rabbit intestinal glycoprotein receptor for *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin lacking affinity for cholera toxin. *Infect immun* **38**, 424-433.

**Holt, G. D., Pangburn, M. K. & Ginsburg, V. (1990).** Properdin binds to sulfatide and has a sequence homology with other proteins that binds to sulfate glycoconjugates. *J Biol Chem* **265**, 2852-2855.

**Hu, S. T. & Lee, C. H. (1988).** Characterization of the transposon carrying the STII gene of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **214**, 490-495.

**Hu, S. T., Yang, M. K., Spandau, D. F. & Lee, C. H. (1987).** Characterization of the terminal sequences flanking the transposon that carries the *Escherichia coli* enterotoxin STII gene. *Gene* **55**, 157-167.

**Huesca, M., Borgia, S., Hoffman, P. & Lingwood, C. A. (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. *Infect immun* **64**, 2643-2648.

**Hughes, J. M., Murad, F., Chang, B. & Guerrant, R. L. (1978).** Role of cyclic GMP in the action of heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. *Nature* **271**, 755-756.

**Issartel, J. P., Koronakis, V. & Hughes, C. (1991).** Activation of *Escherichia coli* prohaemolysin to the mature toxin by acyl carrier protein-dependent fatty acylation. *Nature* **351**, 759-761.

**Janzon, L., Löfdahk, S. & Arvidson, S. (1989).** Identification and nucleotide sequence of the delta-lysin gene, adjacent to the accessory gene regulator, agr, of *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet* **219**, 480-485.

**Johnson, W. M., Lior, H. & Bezanson, G. S. (1983).** Cytotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada. *Lancet* **1**, 76.

**Kagan, B. L. & Sokolov, Y. (1997).** Use of lipid bilayer membranes to detect pore formation by toxins. In *Bacterial pathogenesis, selected methods in enzymology*, pp. 395-409. San Diego: Academic Press.

**Kantor, H. V., Temples, B. & Shaw, W. V. (1972).** Delta-haemolysin: purification and characterization. *Arch Biochem Biophys* **151**, 142-156.

**Kaper, J. B., Morris, J. G., Jr. & Levine, M. M. (1995).** Cholera. *Clin Microbiol Rev* **8**, 48-86.

**Karmali, M. A. (1989).** Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **2**, 15-38.

**Kemp, B. E. & Pearson, R. B. (1990).** Protein kinase recognition motif. *Trends Biol Sci* **15**, 342-346.

**Kennedy, D. J., Greenberg, R. N., Dunn, J. A., Abernathy, R., Ryerse, J. S. & Guerrant, R. L. (1984).** Effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin STb on intestines of mice, rats, rabbits, and piglets. *Infect immun* **46**, 639-643.

**Ketchum, K. A., Joiner, W. J., Sellers, A. J., Kaczmarek, L. K. & Goldstein, S. A. (1995).** A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* **376**, 690-695.

**Knutton, S. (1994).** Attaching and effacing *Escherichia coli*. In *Escherichia coli in Domestic Animals and Humans*, pp. 567-591. Edited by C. L. Gyles. Guelph, Canada: CAB International.

**Korchev, Y. E., Bashford, C. L., Alder, G. M., Apel, P. Y., Edmonds, D. T., Lev, A. A., Nandi, K., Zima, A. V. & Pasternak, C. A. (1997).** A novel explanation for fluctuations of ion current through narrow pores. *Faseb J* **11**, 600-608.

**Koshy, K. M., Wang, J. & Boggs, J. M. (1999).** Divalent cation-mediated interaction between cerebroside sulfate and cerebroside: an investigation of the effect of structural variations of lipids by electrospray ionization mass spectrometry. *Biophys J* **77**, 306-318.

**Krasilnikov, O. V., Sabirov, R. Z., Ternovsky, O. V., Merzlyak, P. G. & Muratkhodjaev, J. N. (1992).** A simple method for the determination of the pore radius of channels in planar lipid bilayer membranes. *FEMS Microbiol Immunol* **105**, 93-100.

**Krasilnikov, O. V., Merzlyak, P. G., Yuldasheva, L. N., Rodrigues, C. G., Bhakdi, S. & Valeva, A. (2000).** Electrophysiological evidence for heptameric stoichiometry of ion channels formed by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin in planar lipid bilayers. *Mol Microbiol* **37**, 1372-1378.

**Kreger, A. S., Kim, K. S., Zaboretzky, F. & Bernheimer, A. W. (1971).** Purification and properties of delta haemolysin. *Infect immun* **3**, 449.

**Kubo, Y., Baldwin, T. J., Jan, Y. N. & Jan, L. Y. (1993).** Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* **362**, 127-133.

**Kupersztoch, Y. M., Tachias, K., Moomaw, C. R., Dreyfus, L. A., Urban, R., Slaughter, C. & Whipp, S. (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. *J Bacteriol* **172**, 2427-2432.

**Labrie, V., Harel, J. & Dubreuil, J. D. (2001).** Oligomerization of *Escherichia coli* enterotoxin b through its C-terminal hydrophobic alpha-helix. *Biochim Biophys Acta* **1535**, 128-133.

**Lee, C. H., Moseley, S. L., Moon, H. W., Whipp, S. C., Gyles, C. L. & So, M. (1983).** Characterization of the gene encoding heat-stable toxin II and preliminary molecular epidemiological studies of enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable toxin II producers. *Infect immun* **42**, 264-268.

**Lee, C. H., Hu, S. T., Swiatek, P. J., Moseley, S. L., Allen, S. D. & So, M. (1985).** Isolation of a novel transposon which carries the *Escherichia coli* enterotoxin STII gene. *J Bacteriol* **162**, 615-620.

**Lee, K. H., Fitton, J. E. & Wuthrich, K. (1987).** Nuclear magnetic resonance investigation of the conformation of delta- haemolysin bound to dodecylphosphocholine micelles. *Biochim Biophys Acta* **911**, 144-153.

**Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G. & Barhanin, J. (1996).** TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K<sup>+</sup> channel with a novel structure. *Embo J* **15**, 1004-1011.

**Leszczynski, J. F. & Rose, G. D. (1986).** Loops in globular proteins: a novel category of secondary structure. *Science* **234**, 849-855.

**Li, J. D., Carroll, J. & Ellar, D. J. (1991).** Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* **353**, 815-821.

**Lior, H. (1994).** Classification of *Escherichia coli*. In *Escherichia coli in Domestic Animals and Humans*, pp. 31-72. Edited by C. L. Gyles. Guelph, Canada: CAB International.

**Lorence, A., Darszon, A. & Bravo, A. (1997).** Aminopeptidase dependent pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin on *Trichoplusia ni* membranes. *FEBS Lett* **414**, 303-307.

**Lorence, A., Darszon, A., Diaz, C., Lievano, A., Quintero, R. & Bravo, A. (1995).** Delta-endotoxins induce cation channels in *Spodoptera frugiperda* brush border membranes in suspension and in planar lipid bilayers. *FEBS Lett* **360**, 217-222.

**Lortie, L. A., Dubreuil, J. D. & Harel, J. (1991).** Characterization of *Escherichia coli* strains producing heat-stable enterotoxin b (STb) isolated from humans with diarrhea. *J Clin Microbiol* **29**, 656-659.

**MacKinnon, R. (1991).** Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* **350**, 232-235.

**MacKinnon, R. & Miller, C. (1989).** Mutant potassium channels with altered binding of charybdotoxin, a pore- blocking peptide inhibitor. *Science* **245**, 1382-1385.

**Mainil, J. G., Moseley, S. L., Schneider, R. A., Sutch, K., Casey, T. A. & Moon, H. W. (1986).** Hybridization of bovine *Escherichia coli* isolates with gene probes for four enterotoxins (STaP, STaH, STb, LT) and one adhesion factor (K99). *Am J Vet Res* **47**, 1145-1148.

**Mainil, J. G., Bex, F., Jacquemin, E., Pohl, P., Couturier, M. & Kaeckenbeeck, A. (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. *Am J Vet Res* **51**, 187-190.

**Manestria, G. (1986).** Ionic channels formed by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin: voltage dependent inhibition by di- and trivalent cations. *J Memb Biol* **90**, 177-190.

**Marques, L., Moore, M. A., Wells, J. G., Wachsmuth, I. K. & O'Brien, A. D. (1986).** Production of Shiga-like toxin by *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **154**, 338-341.

**Marsolais, F. & Varin, L. (1995).** Identification of amino acid residues critical for catalysis and cosubstrate binding in the flavonol 3-sulfotransferase. *J Biol Chem* **270**, 30458-30463.

**Matsuzaki, K., Murase, O., Tokuda, H., Funakoshi, S., Fujii, N. & Miyajima, K. (1994).** Orientational and aggregational states of magainin 2 in phospholipid bilayers. *Biochemistry* **33**, 3342-3349.

**Mellor, I. R., Thomas, D. H. & Sansom, M. S. (1988).** Properties of ion channels formed by *Staphylococcus aureus* delta-toxin. *Biochim Biophys Acta* **942**, 280-294.

**Menestrina, G. (1986).** Ionic channels formed by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin: voltage- dependent inhibition by divalent and trivalent cations. *J Membr Biol* **90**, 177-190.

**Menestrina, G. (1988).** *Escherichia coli* hemolysin permeabilizes small unilamellar vesicles loaded with calcein by a single-hit mechanism. *FEBS Lett* **232**, 217-220.

**Menestrina, G. & Ropele, M. (1989).** Voltage-dependent gating properties of the channel formed by *E. coli* hemolysin in planar lipid membranes. *Biosci Rep* **9**, 465-473.

**Menestrina, G., Mackman, N., Holland, I. B. & Bhakdi, S. (1987).** *Escherichia coli* haemolysin forms voltage-dependent ion channels in lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* **905**, 109-117.

**Monckton, R. P. & Hasse, D. (1988).** Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in piggeries in Victoria by DNA hybridisation using K88, K99, LT, ST1 and ST2 probes. *Vet Microbiol* **16**, 273-281.

**Moniatte, M., van der Goot, F. G., Buckley, J. T., Pattus, F. & van Dorselaer, A. (1996).** Characterization of the heptameric pore-forming complex of the *Aeromonas* toxin aerolysin using MALDI-TOF mass spectrometry. *FEBS Lett* **384**, 269-272.

**Moon, H. W. & Bunn, T. O. (1993).** Vaccines for preventing enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in farm animals. *Vaccine* **11**, 213-200.

**Moon, H. W., Baetz, A. L. & Giannella, R. A. (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. *Infect immun* **39**, 990-992.

**Moon, H. W., Schneider, R. A. & Moseley, S. L. (1986).** Comparative prevalence of four enterotoxin genes among *Escherichia coli* isolated from swine. *Am J Vet Res* **47**, 210-212.

**Moseley, S. L., Samadpour-Motalebi, M. & Falkow, S. (1983).** Plasmid association and nucleotide sequence relationships of two genes encoding heat-stable enterotoxin production in *Escherichia coli* H-10407. *J Bacteriol* **156**, 441-443.

**Nagy, B., Casey, T. A. & Moon, H. W. (1990).** Phenotype and genotype of *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhea in Hungary. *J Clin Microbiol* **28**, 651-653.

**Nataro, J. P. & Kaper, J. B. (1998).** Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**, 142-201.

**Nichols, C. G. & Lopatin, A. N. (1997).** Inward rectifier potassium channels. *Annu Rev Physiol* **59**, 171-191.

**Niki, H., Imamura, R., Ogura, T. & Hiraga, S. (1990).** Nucleotide sequence of the *tolC* gene of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **18**, 5547.

**Okamoto, K., Yukitake, J., Kawamoto, Y. & Miyama, A. (1987).** Substitutions of cysteine residues of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin by oligonucleotide-directed mutagenesis. *Infect Immun* **55**, 2121-2125.

**Okamoto, K., Baba, T., Yamanaka, H., Akashi, N. & Fujii, Y. (1995).** Disulfide bond formation and secretion of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *J Bacteriol* **177**, 4579-4586.



**Okamoto, K., Fujii, Y., Akashi, N., Hitotsubashi, S., Kurazono, H., Karasawa, T. & Takeda, Y. (1993).** Identification and characterization of heat-stable enterotoxin II-producing *Escherichia coli* from patients with diarrhea. *Microbiol Immunol* **37**, 411-414.

**Osek, J. & Truszczynski, M. (1992).** Occurrence of fimbriae and enterotoxins in *Escherichia coli* strains isolated from piglets in Poland. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **15**, 285-292.

**Ostolaza, H., Bartolome, B., Ortiz de Zarate, I., de la Cruz, F. & Goni, F. M. (1993).** Release of lipid vesicle contents by the bacterial protein toxin alpha-haemolysin. *Biochim Biophys Acta* **1147**, 81-88.

**Papazian, D. M., Schwarz, T. L., Tempel, B. L., Jan, Y. N. & Jan, L. Y. (1987).** Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science* **237**, 749-753.

**Pappenheimer jr, A. M. (1977).** Diphtheria toxin. *Annu Rev Biochem* **46**, 69-94.

**Parker, M. W., Buckley, J. T., van der Goot, F. G. & Tsernoglou, D. (1996).** Structure and assembly of the channel-forming *Aeromonas* toxin aerolysin. In *Protein Toxin Structure*, pp. 79-95. Edited by M. W. Parker. Georgetown: R.G. Landes.

**Parker, M. W., Buckley, J. T., Postma, J. P., Tucker, A. D., Leonard, K., Pattus, F. & Tsernoglou, D. (1994).** Structure of the *Aeromonas* toxin proaerolysin in its water-soluble and membrane-channel states. *Nature* **367**, 292-295.

**Parsegian, V. A., Bezrukov, S. M. & Vodyanoy, I. (1995).** Watching small molecules move: interrogating ionic channels using neutral solutes. *Biosci Rep* **15**, 503-514.

**Perna, N. T., Plunkett, G. r., Burland, V., Mau, B., Glasner, J. D., Rose, D. J., Mayhew, G. F., Evans, P. S., Gregor, J., Kirkpatrick, H. A., Posfai, G., Hackett, J.,**

**Klink, S., Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grotbeck, E. J., Davis, N. W., Lim, A., Dimalanta, E. T., Potamouisis, K. D., Apodaca, J., Anantharaman, T. S., Lin, J., Yen, G., Schwartz, D. C., Welch, R. A. & Blattner, F. R. (2001).** Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* **409**, 529-533.

**Peterson, J. W. & Whipp, S. C. (1995).** Comparison of the mechanisms of action of cholera toxin and the heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. *Infect Immun* **63**, 1452-1461.

**Petosa, C., Collier, R. J., Klimpel, K. R., Leppla, S. H. & Liddington, R. C. (1997).** Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen. *Nature* **385**, 833-838.

**Picken, R. N., Mazaitis, A. J., Maas, W. K., Rey, M. & Heyneker, H. (1983).** Nucleotide sequence of the gene for heat-stable enterotoxin II of *Escherichia coli*. *Infect immun* **42**, 269-275.

**Raghunathan, G., Seetharamulu, P., Brooks, B. R. & Guy, H. R. (1990).** Models of delta haemolysin membrane channels and crystal structures. *Proteins* **8**, 213-225.

**Rasheed, J. K., Guzman-Verduzco, L. M. & Kupersztoch, Y. M. (1990).** Two precursors of the heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: evidence of extracellular processing. *Mol Microbiol* **4**, 265-273.

**Robertson, D. C., Dreyfus, L. A. & Frantz, J. C. (1983).** Chemical and immunological properties of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *Prog Food Nutr Sci* **7**, 147-156.

**Ropele, M. & Menestrina, G. (1989).** Electrical properties and molecular architecture of the channel formed by *Escherichia coli* hemolysin in planar lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* **985**, 9-18.

**Rousset, É., Harel, J. & Dubreuil, J. D. (1998).** Sulfatide from the pig jejunum brush border epithelial cell surface is involved in binding of *Escherichia coli* enterotoxin b. *Infect Immun* **66**, 5650-5658.

**Sack, R. B. (1990).** Travelers' diarrhea: microbiologic bases for prevention and treatment. *Rev Infect Dis* **12 Suppl 1**, S59-63.

**Saitoh, T., Natomi, H., Zhao, W. L., Okuzumi, K., Sugano, K., Iwamori, M. & Nagai, Y. (1991).** Identification of glycolipid receptors for *Helicobacter pylori* by TLC-immunostaining. *FEBS Letters* **282**, 385-387.

**Salinas, M., Duprat, F., Heurteaux, C., Hugnot, J. P. & Lazdunski, M. (1997).** New modulatory alpha subunits for mammalian Shab K<sup>+</sup> channels. *J Biol Chem* **272**, 24371-24379.

**Saraste, M., Sibbald, P. R. & Wittinghofer, A. (1990).** The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* **15**, 430-434.

**Schwartz, J. L., Garneau, L., Savaria, D., Masson, L., Brousseau, R. & Rousseau, E. (1993).** Lepidopteran-specific crystal toxins from *Bacillus thuringiensis* form cation- and anion-selective channels in planar lipid bilayers. *J Membr Biol* **132**, 53-62.

**Schwartz, J. L., Lu, Y. J., Sohnlein, P., Brousseau, R., Laprade, R., Masson, L. & Adang, M. J. (1997).** Ion channels formed in planar lipid bilayers by *Bacillus thuringiensis* toxins in the presence of *Manduca sexta* midgut receptors. *FEBS Lett* **412**, 270-276.

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

**Seidler, U., Blumenstein, I., Kretz, A., Viellard-Baron, D., Rossmann, H., Colledge, W. H., Evans, M., Ratcliff, R. & Gregor, M. (1997).** A functional CFTR protein is required

for mouse intestinal cAMP-, cGMP- and Ca(2+)-dependent HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion. *J Physiol* **505**, 411-423.

**Sekizaki, T., Akashi, H. & Terakado, N. (1985).** Nucleotide sequences of the genes for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin I of bovine, avian, and porcine origins. *Am J Vet Res* **46**, 909-912.

**Sharpe, J. C. & London, E. (1999).** Diphtheria toxin forms pores of different sizes depending on its concentration in membranes: probable relationship to oligomerization. *J Membr Biol* **171**, 209-221.

**Shin, S. J., Chang, Y. F., Timour, M., Lauderdale, T. L. & Lein, D. H. (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-I, SLT-II) and adhesion factors (K88, K99, F41, 987P). *Vet Microbiol* **38**, 217-225.

**Slatin, S. L., Abrams, C. K. & English, L. (1990).** Delta-endotoxins form cation-selective channels in planar lipid bilayers. *Biochem Biophys Res Commun* **169**, 765-772.

**Smith, H. W. & Halls, S. (1967).** Studies on *Escherichia coli* enterotoxin. *J Pathol Bacteriol* **93**, 531-543.

**Smyth, C. J., Marron, M. & Smith, S. G. J. (1994).** Fimbriae of *Escherichia coli*. In *Escherichia coli in Domestic Animals and Humans*, pp. 399-436. Edited by C. L. Gyles. Guelph, Canada: CAB International.

**So, M. & McCarthy, B. J. (1980).** Nucleotide sequence of the bacterial transposon Tn1681 encoding a heat-stable (ST) toxin and its identification in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 4011-4015.

**Söderlind, O., Thafvelin, B. & Mollby, R. (1988).** Virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from Swedish piglets with diarrhea. *J Clin Microbiol* **26**, 879-884.

**Soloaga, A., Veiga, M. P., Garcia-Segura, L. M., Ostolaza, H., Brasseur, R. & Goni, F. M. (1999).** Insertion of *Escherichia coli* alpha-haemolysin in lipid bilayers as a non-transmembrane integral protein: prediction and experiment. *Mol Microbiol* **31**, 1013-1024.

**Spandau, D. F. & Lee, C. H. (1987).** Determination of the promoter strength of the gene encoding *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *J Bacteriol* **169**, 1740-1744.

**Spangler, B. D. (1992).** Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol Rev* **56**, 622-647.

**Starr, M. P., Stolp, H., Trüper, H. G., Balows, A. & Schlegel, H. C. (1981).** *The Prokaryotes*. Berlin: Springer-Verlag KG.

**Stieglitz, H., Cervantes, L., Robledo, R., Fonseca, R., Covarrubias, L., Bolivar, F. & Kupersztoch, Y. M. (1988).** Cloning, sequencing, and expression in Ficoll-generated minicells of an *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin gene. *Plasmid* **20**, 42-53.

**Sukumar, M., Rizo, J., Wall, M., Dreyfus, L. A., Kupersztoch, Y. M. & Gierasch, L. M. (1995).** The structure of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b by nuclear magnetic resonance and circular dichroism. *Protein Sci* **4**, 1718-1729.

**Takeda, Y., Honda, T., Sima, H., Tsuji, T. & Miwatani, T. (1983).** Analysis of antigenic determinants in cholera enterotoxin and heat-labile enterotoxins from human and porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect immun* **41**, 50-53.

**Thiaudiere, E., Siffert, O., Talbot, J. C., Bolard, J., Alouf, J. E. & Dufourcq, J. (1991).** The amphiphilic alpha-helix concept. Consequences on the structure of staphylococcal delta-toxin in solution and bound to lipids. *Eur J Biochem* **195**, 203-213.

**TMD Microbial genomes:** TIGR Microbial Database. [www.tigr.org](http://www.tigr.org).

**Tosteson, M. T., Alvarez, O., Hubbell, W., Bieganski, R. M., Attenbach, C., Caporales, L. H., Levy, J. J., Nutt, R. F., Rosenblatt, M. & Tosteson, D. C. (1990).** Primary structure of peptides and ion channels. Role of amino acid side chains in voltage gating of melittin channels. *Biophys J* **58**, 1367-1375.

**Traut, T. W. (1994).** The functions and consensus motifs of nine types of peptide segments that form different types of nucleotide-binding sites. *Eur J Biochem* **222**, 9-19.

**Valverde, M. A., Vazquez, E., Munoz, F. J., Nobles, M., Delaney, S. J., Wainwright, B. J., Colledge, W. H. & Sheppard, D. N. (2000).** Murine CFTR channel and its role in regulatory volume decrease of small intestine crypts. *Cell Physiol Biochem* **10**, 321-328.

**van den Berg, L. H., Sadiq, S. A., Lederman, S. & Latov, N. (1992).** The gp120 glycoprotein of HIV-1 binds to sulfatide and to the myelin associated glycoprotein. *J Neurosci Res* **33**, 513-518.

**van der Goot, F. G., Pattus, F., Wong, K. R. & Buckley, J. T. (1993).** Oligomerization of the channel-forming toxin aerolysin precedes insertion into lipid bilayers. *Biochemistry* **32**, 2636-2642.

**Veithen, A., Raze, D. & Locht, C. (2000).** Intracellular trafficking and membrane translocation of pertussis toxin into host cells. *Int J Med Microbiol* **290**, 409-413.

**Vetter, I. R. & Wittinghofer, A. (1999).** Nucleoside triphosphate-binding proteins: different scaffolds to achieve phosphoryl transfer. *Q Rev Biophys* **32**, 1-56.

**Wandersman, C. & Delepelaire, P. (1990).** TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4776-4780.

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

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

**Weikel, C. S., Tiemens, K. M., Moseley, S. L., Huq, I. M. & Guerrant, R. L. (1986a).** Species specificity and lack of production of STb enterotoxin by *Escherichia coli* strains isolated from humans with diarrheal illness. *Infect Immun* **52**, 323-325.

**Weingarten, R., Ransnas, L., Mueller, H., Sklar, L. A. & Bokoch, G. M. (1990).** Mastoparan interacts with the carboxyl terminus of the alpha subunit of Gi. *J Biol Chem* **265**, 11044-11049.

**Wheeler, D. B., Randall, A. & Tsien, R. W. (1994).** Roles of N-type and Q-type Ca<sup>2+</sup> channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science* **264**, 107-111.

**Whipp, S. C. (1987b).** Protease degradation of *Escherichia coli* heat-stable, mouse-negative, pig-positive enterotoxin. *Infect immun* **55**, 2057-2060.

**Whipp, S. C. (1990).** Assay for enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable toxin b in rats and mice. *Infect immun* **58**, 930-934.

**Whipp, S. C., Kokue, E., Morgan, R. W., Rose, R. & Moon, H. W. (1987a).** Functional significance of histologic alterations induced by *Escherichia coli* pig-specific, mouse-negative, heat-stable enterotoxin (STb). *Vet Res Commun* **11**, 41-55.

**Williams-Smith, H. (1968).** Zoonoses in Britain: some present and potential hazards to man. Salmonella infection. *Vet Rec* **83**, Suppl 15:iv-v.

**Wilmsen, H. U., Pattus, F. & Buckley, J. T. (1990).** Aerolysin, a hemolysin from *Aeromonas hydrophila*, forms voltage-gated channels in planar lipid bilayers. *J Membr Biol* **115**, 71-81.

**Wilmsen, H. U., Leonard, K. R., Tichelaar, W., Buckley, J. T. & Pattus, F. (1992).** The aerolysin membrane channel is formed by heptamerization of the monomer. *EMBO J* **11**, 2457-2463.

**Wilson, R. A. & Francis, D. H. (1986).** Fimbriae and enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with colibacillosis. *Am J Vet Res* **47**, 213-217.

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

**Woodward, M. J., Kearsley, R., Wray, C. & Roeder, P. L. (1990).** DNA probes for the detection of toxin genes in *Escherichia coli* isolated from diarrhoeal disease in cattle and pigs. *Vet Microbiol* **22**, 277-290.

**Yamanaka, H., Kameyama, M., Baba, T., Fujii, Y. & Okamoto, K. (1994).** Maturation pathway of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin I: requirement of DsbA for disulfide bond formation. *J Bacteriol* **176**, 2906-2913.

**Yau, K.-W. (1995).** Cyclic nucleotide-gated channels. In *handbook of receptors and channels: ligand and voltage-gated ion channels*, pp. 307-335. Edited by R. A. North. Boca Raton, FL: CRC Press.

**Yu, J., Webb, H. & Hirst, T. R. (1992).** A homologue of the *Escherichia coli* DsbA protein involved in disulphide bond formation is required for enterotoxin biogenesis in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* **6**, 1949-1958.

**Zhu, C., Harel, J., Jacques, M., Desautels, C., Donnenberg, M. S., Beaudry, M. & Fairbrother, J. M. (1994).** Virulence properties and attaching-effacing activity of *Escherichia coli* O45 from swine postweaning diarrhea. *Infect Immun* **62**, 4153-4159.



**ANNEXES**

**VI**

**Annexe 1 :** Functional analysis of *Escherichia coli* STb enterotoxin binding to sulfatide using site-directed mutagenesis

V. Labrie, H.-E. Beausoleil, J. Harel and J. D. Dubreuil

Proceeding du 9<sup>ème</sup> congrès d'ETOX (European Workshop Conference on Bacterial Protein Toxin, 2000)

## Functional Analysis of *Escherichia coli* STb Enterotoxin Binding to Sulfatide Using Site-Directed Mutagenesis

Labrie, V., Beausoleil, H.-E., Harel, J. and Dubreuil, J.D.

GREMIP, Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6.

### INTRODUCTION

*Escherichia coli* STb toxin is a 48 amino acids, heat-stable, peptide. This enterotoxin is an important virulence factor contributing to diarrheal diseases in piglets and probably also in humans. The toxin is a highly basic protein (pI 9.6) (2). Structurally, STb comprises two antiparallel alpha-helices (residues 10 to 23 and 38 to 44) linked by two disulfide bonds (6). A loop region containing a cluster of hydrophobic residues joins those two helices (Fig.1). STb loses biological activity upon beta-mercaptoethanol treatment. At this time, some amino acids have been implicated in STb enterotoxicity. In particular, Lys-22, Lys-23 (3) as well as Arg-29 and Asp-30, in the loop region (1). We have recently shown that sulfatide (SFT, or 3-SO<sub>4</sub>-galactose-ceramide), present in the pig jejunum, represents a functional receptor for STb (5). In this study, we produced site-directed mutants in regions susceptible to play a role in binding to SFT as they are pointing to the solvent, a requirement for interaction with a receptor. These mutants were tested for binding to SFT.

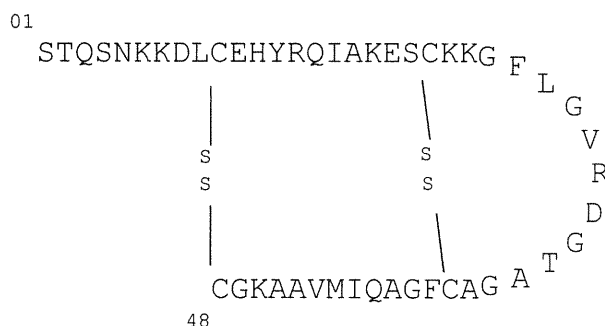


Figure 1. Amino acid sequence of mature STb toxin with disulfide bonds

### METHODS

Oligonucleotide-directed site-specific mutagenesis of STb was done using the U.S.E. mutagenesis kit from Pharmacia Biotech. The plasmid pMAL-STb served as template for STb mutant production and expression. All mutants were confirmed by automated DNA sequencing. The mutated toxins were HPLC-purified using a C<sub>8</sub> reverse-phase microbore column. Structural integrity of the mutants was evaluated using circular dichroism (CD) measurements on a Jasco J 170 spectropolarimeter. Binding to SFT was evaluated using a microtiter plate binding assay (4).

## RESULTS AND DISCUSSION

STb binding to SFT was taken as 100% and the relative binding of mutants determined according to this value. For all mutants discussed here, CD determination did not show structure disruption. In general, alanine scanning was the amino acid replacement method used. Single point mutation of the charged amino acids in the loop region (Lys-22 and Lys-23) resulted in 50% binding for each mutant. Simultaneously mutating these Lys resulted in additive reduction in binding. Thus, binding to SFT depends, at least in part, on Lys-22 and Lys-23. As the binding to the receptor is the event preceding toxicity expression, these results agree with a previous study showing the involvement of those residues in toxicity (3). On the other hand, in the loop region, replacement of Asp-30 by uncharged residues [(Ala (150%) or Val (225%)] permitted an increased binding to SFT. Most probably, the negative charge of Asp-30 participates in a repulsion process. Nevertheless, *in vivo*, these mutant toxins did not show an increased toxicity (Data not shown). The hydrophobic alpha-helix (residues 38 to 44) seems also implicated in the recognition and attachment process to SFT. In fact, Ile-41 appears as a key factor for binding as replacement with Ser abolished binding. On the other hand, Met-42, replaced by Arg showed the same binding. A double mutation comprising Ile-41 to Glu, in addition to Met-42 to Arg, prevented binding. Together, these observations indicate that STb binding to SFT does not strictly rely on charges of positively charged amino acids comprised in STb and the sulfate group of SFT. Most probably, binding occurs through a combination of electrostatic and hydrophobic forces that appear grouped in a tridimensional pocket.

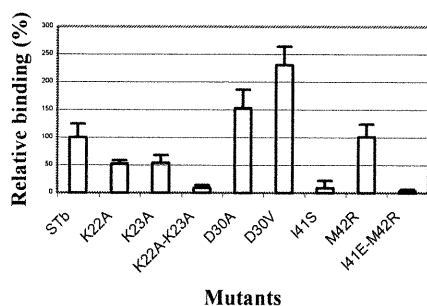


Figure 2. Relative binding to SFT of STb and mutants using MPBA. Mutants are indicated using the one-letter code for amino acids.

## REFERENCES

1. Dreyfus, L.A., Urban, R.G., Whipp, S.C., Slaughter, C., Tachias, K. and Kupersztoch, Y.M. (1992). *Mol. Microbiol.* **6**, 2397-2406.
2. Dubreuil, J.D. (1997). *Microbiology* **143**, 1783-1795.
3. Fujii, Y., Okamuro, Y., Hitotsubashi, S., Saito, A., Akashi, N. and Okamoto, K. (1994). *Infect. Immun.* **62**, 2295-2301.
4. Lindberg, A.A., Brown, J.E., Stromberg, N., Westling-Ryd, M., Schultz, J.E. and Karlsson, K.-A. (1987). *J. Biol. Chem.* **262**, 1779-1785.
5. Rousset, E., Harel J. and Dubreuil, J.D. (1998). *Infect. Immun.* **66**, 5650-5658.
6. Sukumar, M., Rizo, J., Wall, M., Dreyfus, L.A., Kupersztoch, Y.M. and Gierasch, L.M. (1995). *Protein Sci.* **4**, 1718-1729.

**Annexe 2 :** Trypan blue uptake by chinese hamster ovary cultured epiyhelial cells : a cellular model to study *Escherichia coli* STb enterotoxin

H.-E. Beausoleil, V. Labrie & J.D. Dubreuil

Toxicon (2002, 40: 185-191)

## TOXICON

**TITLE: Trypan blue uptake by chinese hamster ovary  
cultured epithelial cells: a cellular model to study  
*Escherichia coli* STb enterotoxin**

**AUTHORS:** Hans-Erick Beausoleil, Vincent Labrie and J. Daniel Dubreuil\*.

**AFFILIATION:** 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.

\*Corresponding author address: Groupe de recherche sur les maladies infectieuses du porc (GREMIP), Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, 3200 Sicotte, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada. J2S 7C6. Phone: (450) 773-8521 ext. 8433. Fax: (450) 778-8108.

E-mail: [daniel.dubreuil@umontreal.ca](mailto:daniel.dubreuil@umontreal.ca)

## Abstract

The thermostable enterotoxin b (STb) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* strains is responsible for diarrheal diseases mainly in weaning piglets. For now, the only available assay for biological activity of STb toxin was in the animal host (i.e. piglet) or in an animal model (i.e. rat, mouse). In this study, we developed a cellular model for the study of the biological activity of STb enterotoxin. Using a trypan blue vital stain method, we showed that STb-treated cells of three out of the five cell lines tested absorbed more vital stain than their controls. Of all the cell lines tested, the chinese hamster's ovary derived cells (CHO) were the most sensitive, absorbing 50% more trypan blue than their control. Maximal stain uptake was observed after two hours. We then evaluated the trypan blue uptake for 16 STb mutants, produced in a previous work, on the CHO cell lines in order to compare it with the *in vivo* rat loop assay data. Interestingly, we observed a good correlation between the two bioassays. In fact, the biological activity observed in the rat could be correlated with the trypan blue uptake by the CHO cells ( $R^2=0,78$ ) for STb toxin and the 16 mutants. Using the variance analysis statistical test, we determined that the correlation between the two bioassays is significant ( $F_c \geq F_{0,005}$ ). These results suggest that the trypan blue uptake bioassay could represent a new method to evaluate the biological activity and facilitate the elucidation of the mechanism of action of *E. coli* STb enterotoxin.

*Keywords:* *Escherichia coli*, heat-stable enterotoxin b, cultured cells, biological activity, dye uptake.

## 1. Introduction

Enterotoxigenic *Escherichia coli* may cause diarrhea by elaboration of two different groups of toxins, the LTs (heat-labile toxins) and the STs (thermostable toxins). There are two unrelated classes of STs (STa and STb), which differ in structure and mechanism of action (Dubreuil, 1999). The heat-stable enterotoxin b (STb) is synthesized as a 71 amino-acid precursor which undergoes a cleavage of the signal sequence constituted of 23 residues located at the N-terminus (Kupersztoch et al., 1990). The mature STb enterotoxin corresponds to a 48 amino acids peptide (5,2 kDa) composed of two antiparallel  $\alpha$ -helices stabilized by two disulfide bonds (Sukumar et al., 1995) that are essential for enterotoxicity (Arriaga et al., 1995; Okamoto et al., 1995). STb enterotoxin is mainly associated with strains isolated from piglets with diarrhea. Some human strains producing STb have also been isolated from travelers suffering from diarrheal diseases, but the causal relationship has not yet been established (Echeverria et al., 1984; Lortie et al., 1991; Okamoto et al., 1993).

Since its discovery, epidemiological, physicochemical and genetic aspects of STb have been well studied (Dubreuil, 1997). However, little is known about its mechanism of action resulting in secretion. STb induces a rapid fluid accumulation in the small intestine leading to diarrhea, as demonstrated by *in vivo* studies in ligated intestinal loop in a variety of animal models (Whipp 1987, 1990, 1991). Intestinal secretion caused by STb, unlike other *E. coli* enterotoxins (LTs and STa), is independent of intracellular cyclic nucleotide elevation (Hitotsubashi et al., 1992). *In vivo* studies with STb reported a dose-dependent increase of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) and 5-hydroxytryptamine (5-HT), two intestinal secretagogues (Harville and Dreyfus, 1995; Peterson and Whipp, 1995). *In vitro* studies indicated that STb activates a pertussis toxin-sensitive GTP-binding regulatory protein



(G<sub>αi3</sub>), resulting in Ca<sup>2+</sup> entry through a receptor-dependent ligand-gated Ca<sup>2+</sup> channel (Dreyfus et al., 1993). The subsequent high level of intracellular Ca<sup>2+</sup> is presumably involved in activation of a calmodulin-dependent protein kinase II (CaMK II) which could open an undetermined ionic channel (Fujii et al., 1997). In addition, intracellular concentration of Ca<sup>2+</sup> may regulate phospholipases A<sub>2</sub> and C level, which catalyze the release of arachidonic acid from the membranar phopholipids, and ultimately, the formation of PGE<sub>2</sub>. In contrast, a Ca<sup>2+</sup>-independent mechanism was shown to mediate the release of 5-HT, presumably from intestinal enterochromaffin cells, via a G-protein activation (Peterson and Whipp, 1995; Harville and Dreyfus, 1996). It has also been reported that STb may induce histological damage in the intestinal epithelium, consisting of loss of villus epithelial cells and partial villus atrophy (Rose et al., 1987; Whipp et al., 1987). Recently, sulfatide [Gal(3-SO<sub>4</sub>)β1Cer], a glycosphingolipid, has been identified as a functional receptor for STb (Rousset et al., 1998a; Rousset et al., 1998b). STb toxin binds specifically, but with low affinity (K<sub>d</sub>=2-6±1.5 μM) to sulfatide (Beausoleil and Dubreuil, In Press).

Until now, the only way to test the activity of the toxin was to use an *in vivo* bioassay which involve the injection and incubation of the toxin in intestinal loops of animals (Dubreuil, 1997). To further understand the mechanism of action of STb enterotoxin resulting in fluid secretion, a cellular model is needed. The objective of the work presented here was to study the interaction of STb with various cell lines in culture and to consider developing an *in vitro* bioassay for the study of STb.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Reagents and cell lines

The cell lines used [A-549 (CCL-185), Human lung; CHO, Chinese Hamster Ovary, IEC-18 (CRL-1589), Rat Ileum; HT-29 (HTB-38), Human colon; and PK-1 (CCL-33), Pig Kidney] were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC; University Boulevard, Manassas, Virginia, USA). Cell culture flasks (75 cm<sup>2</sup>) were obtained from Sarstedt (St-Léonard, Québec, Canada). Cell culture media and additives were purchased from Gibco BRL (Life Technologies LTD, Paisley, Renfrewshire, Scotland). Sulfatase (type VI) from *Aerobacter aerogenes* and all other chemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada).

### 2.2 Production and purification of *E. coli* heat-stable enterotoxin and its mutants

STb toxin was obtained from an *E. coli* strain HB101 bearing the plasmid construct pMAL-STb, described earlier by Bossé, et al., (1993). This construction is under the control of P<sub>tac</sub> and can be induced by IPTG. Briefly, from the recombinant strain, an osmotic shock fluid was obtained and the fusion protein MBP-STb was purified using affinity chromatography (amylose column) (Handl et al., 1993). The MBP-STb fusion protein was then cleaved with protease Xa (New England Biolabs). The cleaved material was loaded on a C<sub>8</sub> reverse-phase microbore column (Applied Biosystems) and eluted with an acetonitrile gradient (model 130A Separation System, Applied Biosystems). The purified STb toxin was lyophilized and kept at -20°C. The purity of the toxin was verified by N-terminal sequence analysis using Edman degradation (Applied Biosystems model 470A gas-phase sequencer) as described before (Handl et al., 1993). STb mutants used in this work (Table 1) were obtained by oligonucleotide-directed site-specific mutagenesis

using the U.S.E. Mutagenesis Kit from Pharmacia Biotech already described (Labrie et al., In press).

### 2.3 Cell culture

The animal cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 5 U/ml penicillin, 5 µg streptomycin and 10% (v/v) fetal bovine serum at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> / 95% air atmosphere. Cells were grown to confluence (usually 2 or 3 days) in 75-cm<sup>2</sup> tissue flasks and distributed in other tissue flask according to the standard procedure using 0.05% trypsin containing 0.53 mM EDTA dissolved in PBS. When ready, cells were centrifuged (350 g, 5 min) and resuspended in PBS to obtain a 10<sup>6</sup> cells/ml cell suspension. For the MTT assay, cells were grown to confluence in 96-well tissue culture plates.

### 2.4 Trypan blue assay

The viability of the different cell lines was evaluated by determining their ability to exclude trypan blue after exposure to STb toxin for various periods of time. Aliquots of 500µl of the cell suspension (10<sup>6</sup> cells/ml) were centrifuged (350 g, 5 min) and resuspended in 500 µl PBS (Phosphate buffered saline, 0.1M sodium phosphate containing 150mM NaCl, pH 7.0) in presence or absence (controls) of 2 µg STb toxin (or mutant). After various periods of time, samples (10µl) of the cell suspension were mixed with 10µl of 0.4% (wt/vol) trypan blue and mounted immediately in the counting chamber of a hemocytometer. Cells present in four squares were counted (at least 250 cells), using an inverted microscope at 100x. Cell viability percentage was evaluated [Total viable cells (unstained) / Total cells (stained and unstained) x 100] and the percentage of dye uptake was calculated as:  $\{[(\text{Cell viability of control} - \text{Cell viability of sample}) / \text{Cell viability of}$

control] x 100}. All experiments were done at least 3 times.

For sulfatase treatment, CHO cells ( $10^6$ ) were incubated with 2 U of sulfatase (type VI) from *Aerobacter aerogenes*, 10 min. prior to the addition of STb.

### 2.5 MTT (tetrazolium) assay

To verify if STb toxin altered the metabolic activity of the cells in culture, we used a MTT bioassay previously described by Hansen et al., (1989). Briefly, cells were grown to confluence in 96-well tissue culture plates, and washed two times with PBS (Phosphate buffered saline, 0.1M sodium phosphate containing 150mM NaCl, pH 7.0). Various concentrations of STb toxin were then mixed with the cells. Each well was washed two times with PBS. Then, 25 $\mu$ l of a 5 mg/ml stock solution of MTT (Sigma), dissolved in PBS, was added to each well. After 2 h of incubation at 37°C, 100 $\mu$ l of the extraction buffer (20% w/v of SDS dissolved in a solution of 50% *N,N*-dimethyl formamide / 50% water, pH 4.7) was added. After an overnight incubation at 37°C, the optical density at 570 nm was measured using an ELISA recorder (MR5000, Dynatech). We then compared the O.D. values obtained for the STb-containing wells with control wells to evaluate the metabolic activity.

### 2.6 Ligated rat jejunal loop assay

Enterotoxicity studies were conducted using a ligated rat jejunal loop assay as described previously (Dubreuil et al., 1991). Briefly, 6- to 8-week-old white male rats (Sprag Dawley C.D., Charles River Ltd) were fasted for 48 h and anesthetized. The small intestine was exteriorized following a midline abdominal incision and rinsed for 5 min with 8 ml of 0.85% saline solution containing 300  $\mu$ g of soybean trypsin inhibitor (Boehringer

GmbH, Mannheim, Germany) per ml. A series of seven 5-cm-long ligated segments (loops) was made in the jejunum. The posterior 30% of the small intestine starting at the caecum was not used. Each loop received 5  $\mu\text{g}$  of the test material in 500  $\mu\text{l}$  20mM Tris-HCl buffer (pH 6.8) containing 300  $\mu\text{g}$  of soybean trypsin inhibitor per ml. Loops receiving only the buffer were considered as the negative controls. The abdominal incision was closed. Three hours later, the rats were euthanized and the amount of fluid in each loop was measured. Results are expressed as the ratio of milliliters of fluid accumulated per centimeter of ligated jejunal segment. Each mutant was tested twice in each rat varying the position among the loops, and at least six rats were used for each mutant. In order to minimize the effect of sample position, two mutants and two STb positive controls were alternated in each rat. Samples were always separated by buffer (negative control).

For analysis, the mean of three negative controls was subtracted from the mean of three positive controls (STb alone) and two samples of each mutant were tested in the same rat. Finally, from these results the mean and standard deviation were calculated, omitting the highest and the lowest values. The value for STb was considered as 100% biological activity and all the data were calculated relative to this value.

### 3. Results

#### 3.1 *STb enterotoxin and trypan blue uptake*

The effect of STb on cell lines from various animal and tissue origins was tested using a trypan blue exclusion viability assay (Fig. 1a). As seen from those curves, the optimal trypan blue intake following STb treatment of cell lines was observed after 120 min. Among the five cell lines tested, the CHO cells were the most sensitive to STb reaching a dye intake level of 51% compared to controls after 120 min. of incubation, followed by the IEC-18 cell line, reaching 45% dye uptake. For HT-29 cells, the intake of trypan blue vital stain was 30%. In comparison, trypan blue uptake by PK-1 and A-549 cells was insignificant with dye uptake below 10%. A dose response of trypan blue uptake was observed for CHO cells with a maximal effect at 4  $\mu\text{g}$  (or 0.8 nM) of STb for  $10^6$  cells (Fig. 1b). At this concentration, doubling the amount of STb did not markedly increase the dye intake in CHO cells. Using the trypan blue uptake assay, we evaluated the biological activity of STb enterotoxin on CHO cells pre-treated with sulfatase. Pre-treatment of the CHO cells with sulfatase completely inhibited the trypan blue intake when STb toxin was added (data not shown).

#### 3.2 *STb enterotoxin and cell viability*

To evaluate if STb enterotoxin had an effect on the cellular metabolic activity, a MTT assay was used (Hansen et al., 1989). This bioassay is a quantitative colorimetric assay for cell survival and proliferation based on the ability of living cells to convert MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide,) in a blue formazan crystal via the mitochondrial succinate-tetrazolium reductase system. The formazan crystal can be extracted from cells to give a colored solution which can be measured spectrophotometrically. The optical density observed is proportional to the number of

viable cells. The different cell lines (50,000 cells) were incubated for 60 or 120 min. with increasing amount of STb enterotoxin (from 0 to 1 $\mu$ g or 0 to 0.2 nM). For all amounts of toxin tested, no evidence of altered metabolic activity was revealed, in the STb-treated cells (data not shown). This result indicated that the MTT assay did not reveal any cell mortality with either of the five cell lines tested. Furthermore, even if STb treated CHO cells were not able to exclude trypan blue, we observed that the cells could be cultured for another 24 h without loss of viability. No cell lysis or important morphological changes could be observed using an inverted light microscope (data not shown).

### *3.3 Comparison between the rat loop assay and the trypan blue uptake assay*

Since the trypan blue uptake assay could represent a useful and quantitative assay to test whether or not STb toxin is biologically active, a comparison was done between this test and the rat loop assay. A battery of mutants elaborated in a previous work (Labrie et al., In press) were tested on CHO cells, the most sensitive cell line toward STb toxin, in our study. The dye uptake percentages for the 16 mutants (at 4 $\mu$ g for 10<sup>6</sup> cells) tested were compared with the results for fluid secretion induced by STb in the rat loop assay (5 $\mu$ g of toxin in each loop). The comparative results obtained with the assays are shown in Fig. 2. To facilitate the comparison, all the values were adjusted on the basis of results obtained for native STb toxin, which was arbitrarily set to 100% for both assays. As shown in Fig. 2, the results for the dye uptake assay by the mutants were analogous to the ones obtained with the rat loop assay. For example, an active STb mutant in rat loop was also biologically active on CHO cells (e.g. K22A mutant showed 65% and 67% of biological activity in the rat loop assay and the trypan blue assay, respectively). The evidence of a linear relationship between the rat loop assay and the dye uptake assay data is demonstrated by the regression

curve shown in Fig. 3. Statistical analysis indicated that the two tests are highly correlated (Pearson correlation coefficient = 0.88). The association is strong with 78% ( $R^2=0.78$ ) of the events observed *in vivo* with the rat loop assay being similar to the trypan blue assay. There were no statistical difference between the slope of the theoretic curve and the slope of the calculated regression curve ( $p > 0,05$ ). Using the variance analysis statistical test, we determined that the correlation between the two bioassays is significant ( $F_c \geq F_{0,005}$ ).

#### 4. Discussion

The main object of this work was to develop a defined and reproducible *in vitro* assay for STb toxin to replace the time consuming, expensive mouse, rat or pig loop assays. This test would be useful in evaluating the biological activity of STb and mutants as well as representing a new and easier way than an animal model to elucidate the mechanism of action of this toxin.

The method developed, is based on a direct microscopic observation of toxin-induced trypan blue intake by cells in culture. The trypan blue assay has first been standardized as various parameters have been evaluated including cell line, toxin concentration and time of contact with the toxin. We tested five commercial cell lines that can be easily obtained and cultivated. They were all epithelial in nature, but from different tissue and animal origins. As this test was seen as an *in vitro* test to replace the *in vivo* animal biological activity evaluation loop assay, we did not focus on pig, rat, mouse or intestinal cell lines only.



The retained standard conditions for the trypan blue intake assay were: 4 µg of STb incubated for two hours with  $10^6$  CHO cells. This cell line was chosen because it is the most sensitive to STb and it is very simple to maintain. In order to make a good comparison between the *in vitro* trypan blue intake assay and the *in vivo* rat loop assay, we tested 16 mutants elaborated and tested for biological activity in the rat loop assay in a previous work (Labrie et al., In press). There was a correlation between the two bioassays ( $r = 0.88$ ), meaning that the results for the biological activity obtained were fairly similar. In addition, as demonstrated by the results obtained for sulfatase-treated CHO cells, sulfatide, the functional receptor for STb (Rousset et al., 1998), seem to be implicated in the mechanism by which the trypan blue enters the CHO cells following STb treatment.

As we could corroborate the fluid accumulation in the rat loop assay with the trypan blue uptake by the CHO cell line, we believe that this easy, rapid and reproducible test could be use in the different laboratories working on STb to replace the expensive and time-consuming test done in animals. In addition, as there is increasing opposition from the general public and also within the scientific community on the use of animals for routine toxicity testing, this test represents a significant advantage.

For now, the increase trypan blue intake by STb-treated cells is the only known and proposed *in vitro* assay to quantitatively estimate the biological activity of this enterotoxin. However, our study is not the first to use cell lines to monitor STb activity. In fact, a study by Dreyfus et al. (1993), indicated that STb affected the level of intracellular calcium concentration, a mediator of intestinal ion and fluid movement, in all cell types tested (i.e. Mardin-Darby Canine Kidney, HT-29/C1 intestinal epithelial cells and primary rat pituitary cells). In addition, a study by Harville and Dreyfus (1996) demonstrated the dose-

dependent release by rat basophilic leukemic cells (RBL-2H3, a mast cell line model used extensively to study 5-HT release) of 5-hydroxytryptamine after treatment with STb toxin. However, those assays were not tested and proposed as model to replace the animal loop assay to evaluate the toxic activity of STb.

It is interesting that in our study, one of the cell lines (with CHO) showing the most important sensitivity to STb was the IEC-18 (derived from rat ileum), as the intestine is the normal target for STb enterotoxin (Dubreuil, 1997). The human colon cell line, HT-29, showed an intermediary dye uptake response which may suggest, as already inferred from various studies (Echeverria et al., 1984; Lortie et al., 1991; Okamoto et al., 1993), that STb could represent a toxin active in humans.

In conclusion, the *in vitro* trypan blue dye uptake assay provide an attractive alternative to the *in vivo* bioassays done in animals. For now, the process by which the dye enters STb treated cells is not clear. However, we believe that although it does not seem to kill the cells (as indicated by the MTT test), it may permeabilize the eukaryotic cell membrane by disruption of the lipid bilayer integrity as already suggested by Chao and Dreyfus (1999). The recent observation that STb can oligomerize (Labrie et al., 2001) suggests that STb may allow formation of pores that can alter the cellular membrane, permitting trypan blue intake. Further studies are being done in our laboratory to understand the mechanism underlying the trypan blue intake in the cells.

**Acknowledgements**

This research work was supported by grants to J.D.D. from 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). V.L. is the recipient of a studentship from Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche. We also want to thank Guy Beauchamp for the statistical analysis and Marjolaine Lapointe for her valuable technical help.

## References

- Arriaga, Y.L., Harville, B.A., and Dreyfus, L.A. 1995. Contribution of individual disulfide bonds to biological action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B. *Infection and Immunity* 63, 4715-20.
- Beausoleil, H.E., and Dubreuil, J.D. *In Vitro* Binding Characteristics and Affinity for Sulfatide of *Escherichia coli* STb enterotoxin. *Journal of Pathogenesis: Mechanisms in Disease Processes* (In Press).
- Bossé, M., Handl, C.E., Lortie, L.-A., Harel, J., and 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. *Journal of General Microbiology* 139, 631-638.
- Chao, K.L., and Dreyfus, L.A. 1999. Interaction of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B with rat intestinal epithelial cells and membrane lipids. *FEMS Microbiology Letters* 172, 91-7.
- Dreyfus, L.A., Harville, B., Howard, D.E., Shaban, R., Beatty, D.M., and Morris, S.J. 1993. Calcium influx mediated by the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B (ST<sub>B</sub>). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 3202-3206.
- Dubreuil, J.D. 1997. *Escherichia coli* STb enterotoxin. *Microbiology* 143, 1783-1795.
- Dubreuil, J.D., 1999. Enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable toxins. In: Alouf, J.E. and Freer, J.H. (Eds.), *The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins*. Academic Press, London, pp. 525-544.
- 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. *Infection and Immunity* 59, 198-203.

- Echeverria, P., Seriwatana, J., Patamaroj, U., Moseley, S.L., A., M., Chityothin, O., and Chaicumpa, W. 1984. Prevalence of heat-stable II enterotoxigenic *Escherichia coli* in pigs, water, and people at farms in Thailand as determined by DNA hybridization. *Journal of Clinical Microbiology* 19, 489-491.
- Fujii, Y., Nomura, T., Yamanaka, H., and Okamoto, K. 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, 633-636.
- Handl, C.E., Harel, J., Flock, J.I., and Dubreuil, J.D. 1993. High yield of active STb enterotoxin from a fusion protein (MBP-STb) expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 4, 275-281.
- Hansen, M.B., Nielsen, S.E., and Berg, K. 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *Journal of Immunological Methods* 119, 203-210.
- Harville, B.A., and Dreyfus, L.A. 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 Dreyfus, L.A. 1996. Release of serotonin from RBL-2H3 cells by the *Escherichia coli* peptide toxin STb. *Peptides* 17, 363-366.
- Hitotsubashi, S., Fujii, Y., Yamanaka, H., and Okamoto, K. 1992. Some properties of purified *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *Infection and Immunity* 60, 4468-4474.
- Kupersztoch, Y.M., Tachias, K., Moomaw, C.R., Dreyfus, L.A., Urban, R., Slaughter, C., and Whipp, S. 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.

- Labrie, V., Beausoleil, H.-E., Harel, J., and Dubreuil, J.D. Charged and Hydrophobic Residues of *Escherichia coli* Enterotoxin b Bind to sulfatide. (In press).
- Labrie, V., Harel, J., and Dubreuil, J.D. 2001. Oligomerization of *Escherichia coli* enterotoxin b through its C-terminal hydrophobic alpha-helix. *Biochimica et Biophysica Acta* 1535, 128-133.
- Lortie, L.A., Dubreuil, J.D., and Harel, J. 1991. Characterization of *Escherichia coli* strains producing heat-stable enterotoxin b (STb) isolated from humans with diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology* 29, 656-9.
- Okamoto, K., Baba, T., Yamanaka, H., Akashi, N., and Fujii, Y. 1995. Disulfide bond formation and secretion of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *Journal of Bacteriology* 177, 4579-86.
- Okamoto, K., Fujii, Y., Akashi, N., Hitotsubashi, S., Kurazono, H., Karasawa, T., and Takeda, Y. 1993. Identification and characterization of heat-stable enterotoxin II-producing *Escherichia coli* from patients with diarrhea. *Microbiology and Immunology* 37, 411-4.
- Peterson, J.W., and Whipp, S.C. 1995. Comparison of the mechanisms of action of cholera toxin and the heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 63, 1452-1461.
- Rose, R., Whipp, S.C., and Moon, H.W. 1987. Effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b on small intestinal villi in pigs, rabbits, and lambs. *Veterinary Pathology* 24, 71-9.
- Rousset, E., Harel, J., and Dubreuil, J.D. 1998a. Binding characteristics of *Escherichia coli* enterotoxin b (STb) to the pig jejunum and partial characterization of the molecule involved. *Microbial Pathogenesis* 24, 277-288.

- Rousset, E., Harel, J., and Dubreuil, J.D. 1998b. Sulfatide from the pig jejunum brush border epithelial cell surface is involved in binding of *Escherichia coli* enterotoxin b. *Infection and Immunity* 66, 5650-5658.
- Sukumar, M., Rizo, J., Wall, M., Dreyfus, L.A., Kupersztoch, Y.M., and Gierasch, L.M. 1995. The structure of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b by nuclear magnetic resonance and circular dichroism. *Protein Science* 4, 1718-29.
- 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, 930-934.
- 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., Kokue, E., Morgan, R.W., Rose, R., and Moon, H.W. 1987. Functional significance of histologic alterations induced by *Escherichia coli* pig-specific, mouse-negative, heat-stable enterotoxin (STb). *Veterinary Research Communications* 11, 41-55.

## Tables

Table 1: STb mutants used in this study

Mutants	Original sequence and mutations done				
	1	12	24	36	48
Native STb	STQSNKKDLCEHYRQIAKESCKKGFLGV RDGTAGACFGAQIMVAAKGC				
K22A	Lys22→Ala				
K23A	Lys23→Ala				
K22A-K23A	Lys22→Ala, Lys23→Ala				
G24A	Gly24→Ala				
G27P	Gly27→Pro				
R29A	Arg29→Ala				
K23A-R29A	Lys23→Ala, Arg29→Ala				
D30A	Asp30→Ala				
D30V	Asp30→Val				
G31A	Gly31→Ala				
G34A	Gly34→Ala				
F37K	Phe37→Lys				
I41S	Ile41→Ser				
M42S	Met42→Ser				
M42R	Met42→Arg				
I41E-M42R	Ile41→Glu, Met42→Arg				



## FIGURE CAPTIONS

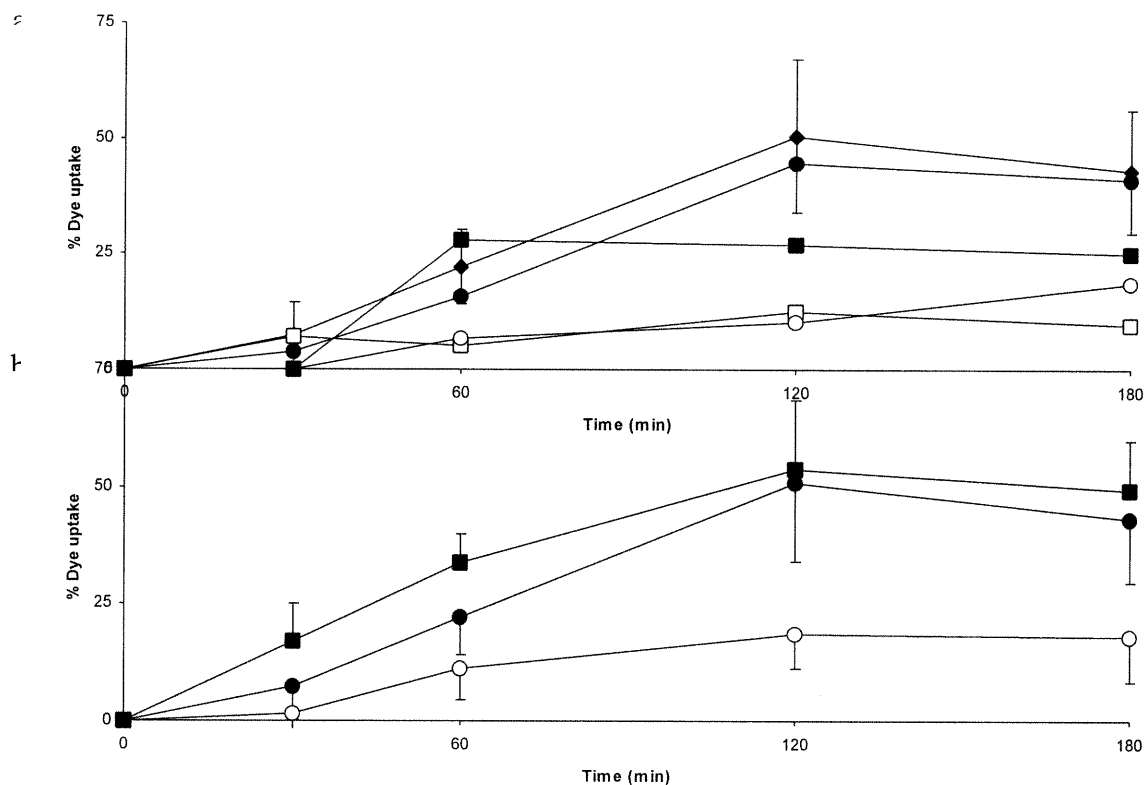


Figure 1 : a) Dye uptake for STb-treated cells line. Each cell lines : A-549 (□), CHO (◆), HT-29 (■), IEC-18 (●) and PK-1 (○) were treated with 4 µg of STb toxin for  $10^6$  cells. The trypan blue dye intake by cells was measured over time as described in Material and Methods. b) Effect of the concentration of STb on dye uptake by CHO cells (b). The trypan blue dye intake by CHO cells, incubated with different concentration of STb toxin (2 µg:○, 4 µg:● and 8 µg:■), was measured over time. Values represent averages of at least three experiments. Standard deviations for CHO cell line are indicated.

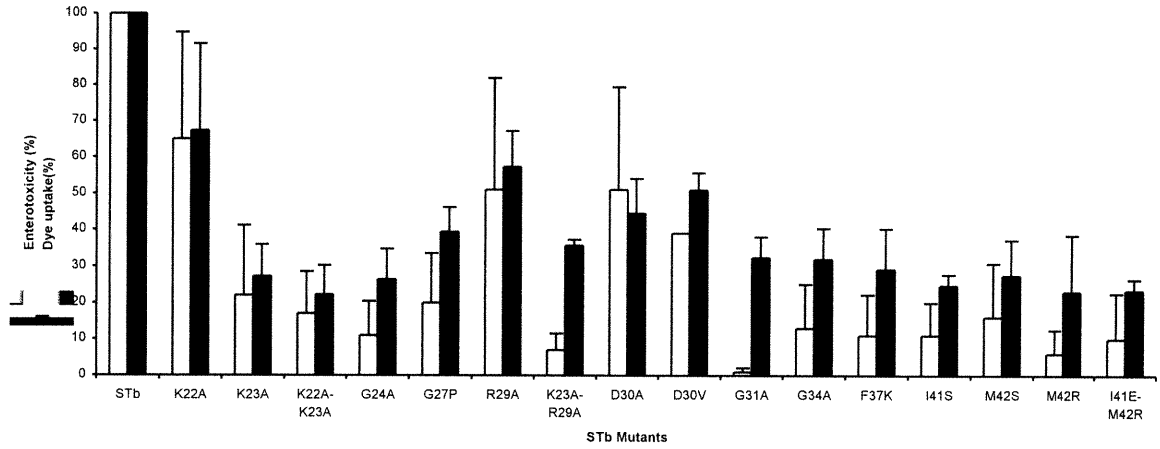


Figure 2 : Comparison between the percentage of enterotoxigenicity (black bar) in the rat loop assay and dye uptake (white bar) in the CHO cells for the 16 STb mutants tested (Table 1). All values were adjusted on the basis of results obtained for native STb toxin, which was arbitrarily set to 100% for both assays. Standard deviations from mean of at least three experiments is indicated.

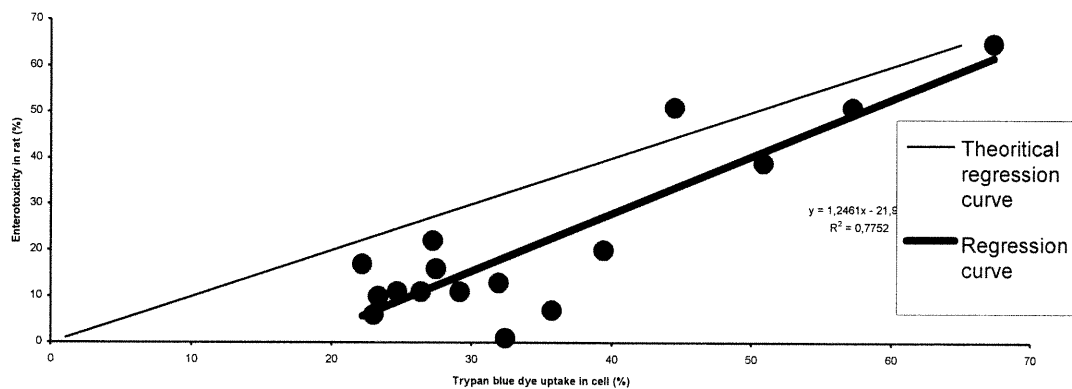


Figure 3 : Regression curve between the rat loop assay and the trypan blue dye uptake assay in CHO cells. Each dot represents a mutant. The bold line represent the experimental curve and the plain line represent the theoretical curve. The equation for the experimental curve and the  $R^2$  coefficient are shown.

**Annexe 3 : L'entérotoxine STb forme des canaux ioniques en bicouche lipidique plane (PLB)**

## Materials and methods

### *STb Purification*

STb was produced as a fusion protein comprising MBP and a site for Xa factor cleavage as already described and purified to homogeneity using C<sub>8</sub> reverse-phase microbore column (Applied Biosystems) (Handl *et al.* 1993).

### *Liposomes preparation*

A 60:1 (w/w) mixture of phosphatidylcholine (PC) and sulfatide (SFT) was dried under nitrogen and hydrated at a concentration of 6.1 g/l in a buffer solution containing 1 M KCl, 0.1 mM EDTA and 10 mM Pipes (pH 6.8). Following a 5 min. vortexing period, the mixture was freeze-thawed 5 times in dry ice/ethanol bath. Large unilamellar vesicles (LUV) were then produced by 19 extrusions through 100 nm polycarbonate membranes followed by a sonication step.

### *Planar lipid bilayers*

Phospholipid membranes were formed from a 7:2:1 (w/w) lipid mixture of phosphatidylethanolamine (PE), PC and cholesterol painted on a 250µm hole in a Delrin wall (Schwartz *et al.* 1993). After 20 min. following membrane formation, LUV were added to the *cis* chamber to a final concentration of about 61 µg/ml. Vesicle fusion to PLBs was promoted by the establishment of transbilayer osmotic gradient by addition of 160 mM urea and 10 mM CaCl<sub>2</sub> in the *cis* chamber. All experiments were performed at room temperature in buffer solution containing 1M KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub> and 10 mM PIPES (pH 6.8) under symmetrical conditions. Single channel currents following addition of 20 µg/ml STb toxins to both chambers were recorded with an AxioPatch-1D patch-clamp amplifier (Axon Instruments, Foster City, Ca). Analysis was performed on a personal computer using pClamp 6.0 and Axotape 1.2 softwares (Axon Instruments).

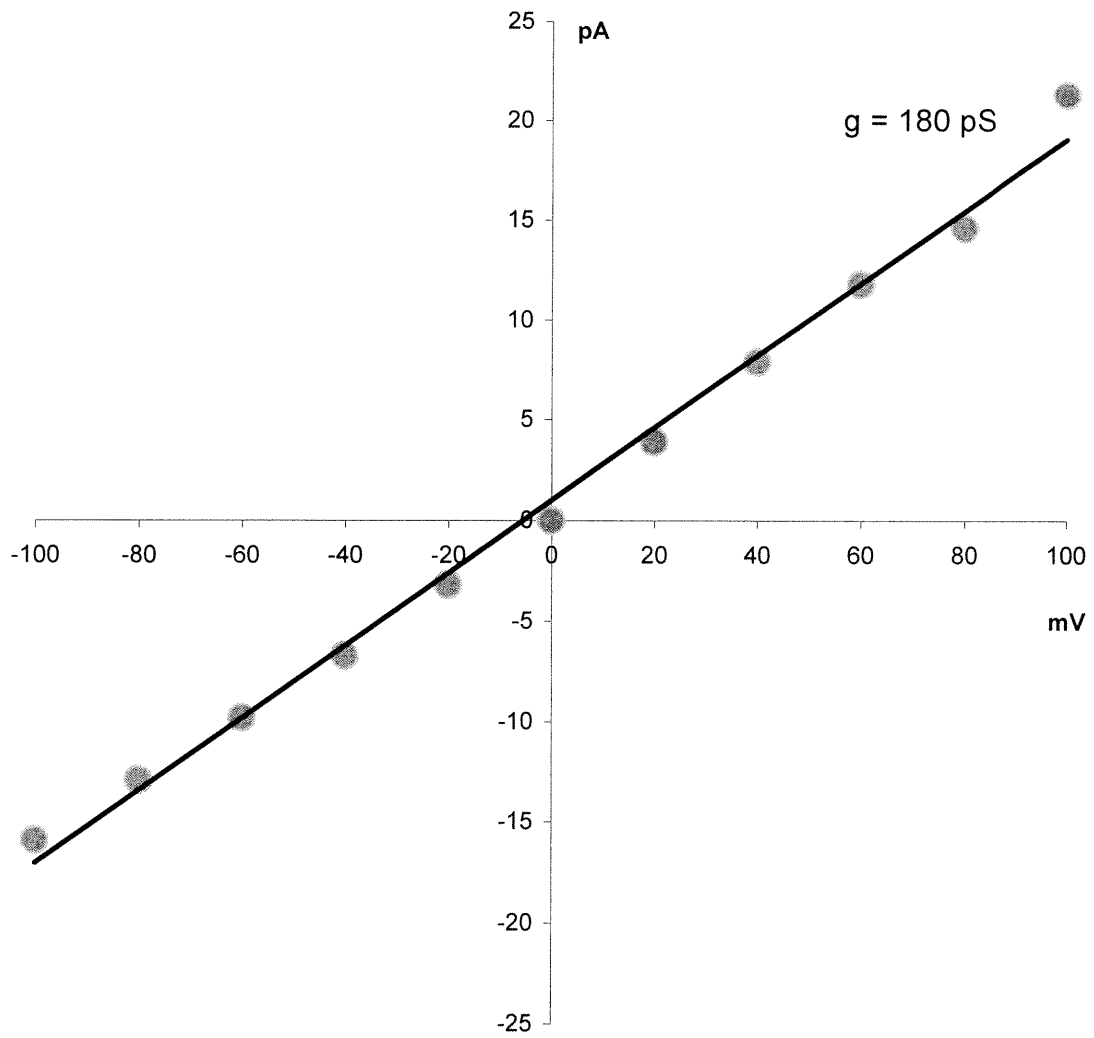


Figure 1. Current-voltage relation of STb toxin

## Results and discussion

Upon addition of 20  $\mu\text{g/ml}$  of toxin on both sides of the PLB, well resolved channel currents were observed when voltage was applied to the membrane. The formation of STb channels was observed in presence of its receptor SFT. Preliminary data indicate that, under 1 M KCl symmetrical conditions, the STb main conductance was around 180 pS as determined from the slope (conductance  $g = I/V$ ) of the curve shown in figure 1. Several subconducting states were also observed. Main conductance appears to be a multiple (X3) of the subconductance. STb channel activity appeared to be voltage-dependent: while the channels were mostly open at all voltages, their tendency to close for longer periods of time was markedly higher at negative voltages (less than  $-60\text{mV}$ ).