

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Caractérisation de l'activité biologique de l'entérotoxine
STb d'*Escherichia coli* à l'aide de membranes lipidiques
artificielles et de cellules en culture**

par

Carina Gonçalves

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade
Philosophiae Doctor (Ph.D)
en sciences vétérinaires
option microbiologie

Décembre, 2007



© Carina Gonçalves, 2007

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Caractérisation de l'activité biologique de l'entérotoxine STb d'*Escherichia coli* à l'aide de membranes lipidiques artificielles et de cellules en culture

présentée par :
Carina Gonçalves

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Josée Harel, présidente-rapporteuse
J. Daniel Dubreuil, directeur de recherche
Jean-Louis Schwartz, codirecteur
John M. Fairbrother, membre du jury
Michel Frenette, examinateur externe

Mario Jacques, représentant du doyen de la FESP

RÉSUMÉ

L'entérotoxine STb produite par les *Escherichia coli* entérotoxigènes provoque la diarrhée chez diverses espèces animales ainsi que chez l'homme. STb est un peptide de 48 acides aminés dont la structure tridimensionnelle présente deux hélices- α antiparallèles (l'hélice hydrophile de C10 à K22 et l'hélice hydrophobe de G38 à A44) reliées par une boucle riche en glycine. Deux ponts disulfures sont essentiels à la stabilité de la structure tertiaire et à l'activité entérotoxique. Le sulfatide, un glycosphingolipide présent à la surface des cellules épithéliales du jéjunum, a été identifié comme récepteur fonctionnel pour STb. Les premières étapes de l'interaction de STb avec la membrane et les implications dans l'apparition de la diarrhée sont encore peu connues.

Cette étude démontre, pour la première fois, la capacité de STb à perméabiliser la membrane cible et suggère la formation d'un pore non sélectif. STb dépolarise la membrane des vésicules de la bordure en brosse du jéjunum de porcelet. Ce phénomène est saturable et dépend de la concentration de la toxine ainsi que de l'intégrité des ponts disulfures.

L'interaction de STb avec différents glycosphingolipides a été étudiée en utilisant la technique de résonance plasmonique de surface. STb présente une plus grande affinité pour le sulfatide que pour le lactocéramide et le glucocéramide précédemment proposés comme récepteurs éventuels. L'affinité de STb pour le sulfatide a été estimée à $2,40 \pm 0,61$ nM. La liaison de STb au sulfatide est inhibée par des concentrations de l'ordre du picomolaire de λ -carragénine.

La capacité de STb à perméabiliser des membranes cellulaires a été observée sur les lignées cellulaires IPEC-J2 (cellules épithéliales de jéjunum de porcelet nouveau-né) et NIH-3T3 (cellules fibroblastiques d'embryon de souris Swiss). La λ -carragénine inhibe la perméabilisation des cellules IPEC-J2 par STb. De plus, STb s'internalise et s'accumule dans les cellules NIH-3T3. Certains sites d'accumulation se sont colocalisés avec le marquage mitochondrial. L'utilisation d'une sonde fluorescente sensible au potentiel de membrane mitochondrial (JC-1) a permis d'observer l'induction de l'hyperpolarisation des mitochondries par STb chez les cellules NIH-3T3 en cytométrie en flux. La toxine STb induit également des altérations morphologiques au niveau de la membrane cellulaire et du cytoplasme des cellules NIH-3T3.

L'ensemble de cette étude met en évidence la capacité de STb à perméabiliser la membrane, à altérer le potentiel membranaire et à endommager la cellule. Ces résultats contribuent à expliquer le mécanisme d'induction de la diarrhée par STb.

Mots-clés: entérotoxine STb, perméabilisation, sulfatide, mitochondrie

SUMMARY

Enterotoxigenic *Escherichia coli* produce STb enterotoxin that is responsible for the onset of diarrhea in various animal species including humans. STb is a 48-residue polypeptide whose tridimensionnal structure shows two anti-parallel alpha-helices (C10-K22, amphipathic, and G38-A44, hydrophobic) connected by a glycine-rich loop. Two disulfide bridges are essential for the stabilization of the STb tertiary structure and for enterotoxicity. Sulfatide, a glycosphingolipid present at the epithelial cells surface of the piglet jejunum, has been identified as a functional receptor for STb. The first steps of STb interaction with cell membranes and its involvement in the onset of diarrhea are still unknown.

This study demonstrates, for the first time, that STb permeabilizes target membrane and suggests that it does so by formation of non specific pores. STb depolarizes brush border membrane vesicles isolated from the jejunum of the pig. This process is dose-dependent and saturable. The integrity of the disulfide bridges of STb is essential for this activity.

Using surface plasmon resonance technology, the dissociation constant of the STb-sulfatide interaction was estimated to be 2.40 ± 0.61 nM. The data indicate that STb binds with greater affinity to sulfatide than lactoceramide and glucoceramide. This study also demonstrated the inhibition of STb binding to sulfatide by λ -carragenan at picomolar concentration.

STb permeabilization of cell membranes was observed in IPEC-J2 (porcine newborn jejunal epithelial cells) and NIH-3T3 cells (Swiss mouse embryo fibroblast cells). Moreover, permeabilization of IPEC-J2 cells by STb was inhibited by λ -carragenan.

STb was internalized and accumulated in the NIH-3T3 cells at sites that colocalized with mitochondria. Using a fluorescent mitochondrial potential sensor (JC-1 probe) and flow cytometry, we observed mitochondrial membrane hyperpolarization of NIH-3T3 cells in the presence of STb. Furthermore, STb induced morphological alterations of the cell membrane and the cytoplasm of NIH-3T3 cells.

Taken together, these results demonstrate that STb can permeabilize membranes, impair the membrane potential, and damage cells. This may contribute to our understanding of how STb causes diarrhea.

Keywords : STb enterotoxin, permeabilization, sulfatide, mitochondria

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
SUMMARY	vi
TABLE DES MATIÈRES	ix
Liste des abréviations.....	xvi
REMERCIEMENTS.....	xix
INTRODUCTION	1
RECENSION DE LA LITTÉRATURE	5
1. Généralités sur <i>Escherichia coli</i>	6
1.1. Caractéristiques.....	6
1.2. Les <i>E. coli</i> pathogènes	7
1.3. Les <i>E. coli</i> entérotoxigènes	12
2. Facteurs de virulence	14
2.1. Les facteurs de colonisation.....	14
2.2. Entérotoxines	19
2.2.1. Les entérotoxines thermolabiles (LT).....	19
2.2.2. Les entérotoxines thermostables (ST).....	22
3. L'entérotoxine thermostable STb.....	27
3.1. Généralités	27
3.2. Gène <i>estB</i>	29
3.3. Synthèse et régulation	30
3.4. Structure protéique.....	31
3.4.1. Structures primaire et secondaire.....	31
3.4.2. Propriétés physico-chimiques	32

3.4.3. Structure tertiaire.....	33
3.5. Biogenèse	35
3.6. Propriété des ponts disulfures	36
3.7. Activité intestinale	37
3.8. Le récepteur.....	39
3.8.1. Historique.....	39
3.8.2. Le sulfatide.....	42
3.9. Mécanismes d'action.....	47
3.9.1. Activité biologique.....	47
3.9.2. Oligomérisation.....	48
3.9.3. Perméabilisation cellulaire.....	49
3.9.4. Internalisation.....	52
3.9.5. Voie intracellulaire.....	53
4. Les toxines agissant sur l'intestin	59
4.1. Homéostasie intestinale.....	59
4.2. Toxines formant des pores	64
4.2.1. Toxines formant de larges pores	64
4.2.2. Toxines formant de petits pores	67
4.2.3. Les toxines RTX	70
4.2.4. Mécanismes d'internalisation des toxines bactériennes.....	72
4.2.5. Toxines agissant sur la mitochondrie.....	79
5. Objectifs de l'étude	85
 MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS	 87
ARTICLE 1	88
ARTICLE 2.....	118
ARTICLE 3.....	143

DISCUSSION	175
CONCLUSIONS.....	194
BIBLIOGRAPHIE	196
ANNEXES	xviii
ARTICLE 4.....	xxii
ARTICLE 5.....	xxvii

LISTE DES FIGURES

RECENSION DE LA LITTÉRATURE

Figure 1. Caractéristiques des six pathotypes d' <i>E. coli</i> induisant des infections gastro-intestinales.....	9
Figure 2. Systèmes de sécrétion de type I, II et III.....	10
Figure 3. Séquence primaire de la toxine STb avec les deux ponts disulfures situés entre C10-C48 et C21-C36.	32
Figure 4. Structure tridimensionnelle de la toxine STb obtenue par résonance magnétique nucléaire.	34
Figure 5. Structure du sulfatide.....	43
Figure 6. Mécanisme d'action simplifié de la toxine STb.	58
Figure 7. Récapitulatif des mécanismes d'absorption et de sécrétion des entérocytes.....	61
Figure 8. Modèle d'insertion et de formation du pore par la perfringolysine O.....	66
Figure 9. Structure tridimensionnelle de la toxine α de <i>Staphylococcus aureus</i>	69
Figure 10. Voie de sécrétion de HlyA.....	72
Figure 11. Voies simplifiées d'internalisation rapide des toxines bactériennes.	74
Figure 12. Transport rétrograde de la toxine Stx.	77
Figure 13. Structure simplifiée et fonctions générales de la mitochondrie.....	80
Figure 14. Mécanisme d'action de la toxine VacA d' <i>Helicobacter pylori</i>	84

ARTICLE 1

Figure 1. Effect of the potassium transmembrane gradient, valinomycin and STb on the membrane potential generated in brush border membrane vesicles isolated from piglet jejunum epithelial cells.	111
--	-----

Figure 2. Calibration of the fluorescence signal as a function of the transmembrane potassium concentration ratio.	112
Figure 3. Effect of STb on the membrane potential generated in the presence of various electrolyte solutions.	113
Figure 4. Effect of STb concentration on membrane potential.	115
Figure 5. Membrane permeabilizing ability of STb at various pH values.	116
Figure 6. Comparison of the permeabilizing ability of STb with that of its reduced and alkylated derivative (STb/AR) and of two of its mutants (M42S and K22A-K23A).	117

ARTICLE 2

Figure 1. Binding of STb to sulfatide, lactoceramide and glucoceramide immobilized on HPA chips.	137
Figure 2. SPR analyses of various concentrations of STb binding to sulfatide immobilized on HPA chips.	138
Figure 3. Saturation curve of STb binding to sulfatide. The plotted data are averages from 3 independent experiments.	139
Figure 4. Inhibitory assay using various concentrations of λ -carragenan.	141
Figure 5. Effect of λ -carragenan on STb permeabilization of IPEC-J2 cells.	142

ARTICLE 3

Figure 1. Permeabilization of NIH-3T3 cells by STb toxin.	167
Figure 2. Internalisation of FITC-labelled STb toxin.	168
Figure 3. Colocalization of FITC-STb with mitochondria.	170
Figure 4. Cell sub-populations result from STb treatment.	171
Figure 5. Effect of STb on the cell sub-populations distribution.	172
Figure 6. Effect of STb on mitochondrial membrane potential.	174

DISCUSSION

Figure 15. Formule chimique des polysaccharides lambda, iota et kappa carragénine. ...	178
Figure 16. Échanges ioniques lors de différents traitements des VMBB.....	180
Figure 17. Modèle proposé pour le mécanisme d'action de STb sur la membrane cellulaire et la mitochondrie.....	193

ANNEXES

ARTICLE 4

Figure 1. Effet de l'entérotoxine STb d' <i>E. coli</i> sur le potentiel de membrane des vésicules de la membrane de la bordure en brosse de jéjunum de porc.	xxv
Figure 2. Effet de l'entérotoxine STb d' <i>E. coli</i> sur le potentiel de membrane généré par un gradient de K ⁺ en présence de valinomycine.	xxv

ARTICLE 5

Figure 1. Nuclear magnetic resonance-derived three dimensional structure of STb toxin..	xl
Figure 2. Interaction of STb oligomers with cell membrane after interaction with sulfatide (SFT).	xlii
Figure 3. Using NIH-3T3 cell line, STb was endocytosed through two distinct pathways.	xliii

LISTE DES TABLEAUX

RECENSION DE LA LITTÉRATURE

Tableau 1 : Facteurs de colonisation d' <i>E. coli</i> isolés de l'homme.	15
Tableau 2 : Fimbriae exprimées d' <i>E. coli</i> isolés d'animaux.....	16
Tableau 3 : Toxines bactériennes agissant sur les mitochondries.	81

LISTE DES ABRÉVIATIONS

5-HT	5-hydroxytryptamine, sérotonine
AAF/I	AA fimbria I
A/E	Lésions d'attachement et effacement
AEEC	Attaching and effacing <i>E. coli</i>
AIDA-1	Adhesin involved in diffuse adhesion-I
ADP	Adénosine diphosphate
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BBMV	Brush border membrane vesicles
CaMK-II	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II
CHO	Chinese hamster ovary
CRP	Catabolic repression protein
CT	Toxine cholera
DAEC	Diffuse-adhering <i>E. coli</i>
DAG	Diacylglycérol
diS-C3(5)	3,3'-dipropylthiadicarbocyanine iodide
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DsbA, B, C, G	Disulfide bond A, B, C, G
eae	<i>E. coli</i> attaching and effacing gene
EAEC ou EAggEC	Enteroaggregative <i>E. coli</i>
EAST1	EAggEC heat-stable enterotoxin 1
EIEC	Enteroinvasive <i>E. coli</i>
EHEC	Enterohemorrhagic <i>E. coli</i>
EPEC	Enteropathogenic <i>E. coli</i>
ETEC	Enterotoxigenic <i>E. coli</i>
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
GC-C	Guanylate cyclase C

GMPC	Guanosine monophosphate cyclique
GSL	Glycosphingolipides
GTP	Guanosine triphosphate
IS	Séquence répétitive inversée
LEE	Locus of enterocyte effacement ou d'effacement des entérocytes
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Heat-labile enterotoxin
MDCK	Madin Darby canine kidney
MTT	Bromure 3, (4,5-diméthylthiazol-2-yl) 2, 5-diphényl tétrazolium
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NMDGCl	Chlorure de N-méthyl-D-glucamine
RFMA	Récepteur du facteur de motilité autocrine
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RTX	Repeat toxin X
SFT	Sulfatide
Paa	Porcine attaching and effacing associated
PC	Phosphatidyl choline
PE	Phosphatidyl éthanolamine
PGE ₂	Prostaglandine E ₂
PKA	Protéine kinase A
PLC, PLA ₂	Phospholipase C, phospholipase A ₂
SDS	Sodium dodécylsulfate
SFT	Sulfatide
SLT	Shiga-like toxins
STa	Heat-stable enterotoxin a
STb	Heat-stable enterotoxin b
STEC	Shiga toxin-producing <i>E. coli</i>
Stx	Toxines Shiga
TEACl	Chlorure de tétraéthylammonium
TMACl	Chlorure de tétraméthylammonium
Tir	Translocated intimin receptor
VMBB	Vésicules de la membrane de la bordure en brosse
VT	Vérotoxines

À mes parents,

*Ce n'est point dans l'objet que réside le sens
des choses, mais dans la démarche.*

Antoine de Saint-Exupéry

REMERCIEMENTS

Je remercie mon directeur, le Dr J. Daniel Dubreuil, ainsi que mon codirecteur, le Dr Jean-Louis Schwartz, de m'avoir accueillie dans leurs laboratoires respectifs.

Je tiens également à adresser tous mes remerciements au Dr Josée Harel, présidente-rapporteuse, au Dr John M. Fairbrother, membre du jury, et au Dr Michel Frenette, évaluateur externe, qui ont accepté d'évaluer ma thèse.

Ce travail n'existerait pas sans l'aide technique et le soutien quotidien de : Frédéric Berthiaume, qui m'a accordé un support technique efficace dans la réalisation de l'étude en résonance plasmonique de surface ; Louise Lessard, Annie Desrosiers et Patrick Vincent qui, chacun à leur tour, ont contribué à l'apprentissage, à la mise au point et à la réalisation des techniques en cytométrie en flux et en microscopie confocale ; Vincent Vachon qui m'a initiée aux subtilités du modèle des VMBB. Je remercie aussi les étudiants et techniciennes du Laboratoire EcL pour leur aide précieuse lors des euthanasies de porcelets.

Je suis particulièrement reconnaissante envers les Drs Marcelo Gottschalk et Mario Jacques qui m'ont offert leur soutien au cours de mon doctorat. Je tiens aussi à remercier le Dr Michaël Mourez pour les relectures de mes différents articles.

Au cours de ces cinq années de labeur, j'ai rencontré des étudiants d'ici et d'ailleurs qui m'ont réconfortée par un sourire, une gourmandise, un café, un thé... Merci aux étudiantes du laboratoire : Sophie Périgon, Stéphanie Penel, Sophie Veilleux, Christine Taillon, Marie-Astrid Albert et Nadja. Merci également à tous les étudiants et ex-étudiants du GREMIP, du CRRA, de la Faculté de médecine vétérinaire, et en particulier à Benjamin, Brïte (« ma bêtiseuse de bonne aventure »), Élodie, Francis, Frédéric, Julie, Karen, Lan, Lara, Magali, Marie-Cruz, Martin, Miriam, Moe, Nahuel, Pavine, Richard, Sébastien Leclerc...

Je tiens aussi à remercier mes familles adoptives : la Famille Champagne, la Famille Marin, la Famille Saint-Louis, la Famille Véroneau et la Famille Martin, avec un bec tout spécialement à François.

Je remercie chaleureusement mes parents, Manuel et Maria-Léonor Gonçalves qui, malgré la distance, m'ont encouragée dans ce projet.

INTRODUCTION

La toxine STb produite par les *Escherichia coli* entérotoxigènes est responsable de l'apparition de la diarrhée chez diverses espèces animales, ainsi que chez l'homme. Cette toxine déstabilise l'homéostasie intestinale par la sécrétion de fluides. Sa présence entraîne l'accumulation de Na^+ , de Cl^- et de bicarbonate dans la lumière des anses ligaturées de porcelet (Argenzio *et al.* 1984 ; Weikel et Guerrant 1985 ; Weikel *et al.* 1986b). De plus, après deux heures d'exposition, une atrophie partielle des villosités a été observée (Whipp *et al.* 1985, 1986). Ces altérations histologiques se marquent par une désquamation du sommet des microvillosités ainsi que par une rupture de l'intégrité des microvillosités associée à une réduction de l'absorption par les cellules épithéliales des porcelets (Whipp *et al.* 1986, 1987 ; Rose *et al.* 1987).

STb est un peptide de 48 acides aminés formant deux hélices α antiparallèles (l'hélice hydrophile de C10 à K22 et l'hélice hydrophobe de G38 à A44) reliées par une boucle riche en glycine (Sukumar *et al.* 1995). La structure est stabilisée par deux ponts disulfures (C10-C48 et C21-C36) essentiels à l'activité entérotoxique (Arriaga *et al.* 1995 ; Okamoto *et al.* 1995). La formation d'hexamères et d'heptamères a été observée en présence d'un agent pontant et l'intégrité structurale de la toxine est essentielle à la formation de ces oligomères (Labrie *et al.* 2001a). Le sulfatide (SFT), un glycosphingolipide présent à la surface des cellules épithéliales du jéjunum, a été identifié comme récepteur fonctionnel pour STb (Rousset *et al.* 1998a).

STb aurait la capacité de stimuler une protéine $G_{i\alpha 3}$ sensible à la toxine pertussique. Cette protéine $G_{i\alpha 3}$ serait impliquée dans l'induction de l'ouverture d'un canal calcique (non identifié) qui permet l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium

(Ca²⁺) (Dreyfus *et al.* 1993). L'élévation de la concentration de Ca²⁺ active les phospholipases A2 (PLA₂) et C (PLC) qui métabolisent les acides gras et produisent le diacylglycérol (DAG) et l'inositol 1, 4, 5-triphosphate à partir du phosphatidylinositol 4,5-diphosphate (Dubreuil 1999). Ces seconds messagers induisent la production de prostaglandine E₂ (PGE₂) qui favorise la sécrétion de fluide au niveau de la lumière intestinale (Hitotsubashi *et al.* 1992a).

De récentes études de notre laboratoire ont mis en évidence des étapes essentielles dans l'interaction de la toxine STb avec la membrane cellulaire. Tout d'abord, lors d'une étude préliminaire réalisée sur des bicouches lipidiques planes, la toxine STb en présence ou non de sulfatide (SFT), forme un canal ionique (Labrie *et al.* 2001c). De plus, il a été démontré que STb perméabilise certaines lignées cellulaires (CHO, IEC-18 et HT-29) au bleu de trypan (Beausoleil *et al.* 2002a). Une bonne corrélation a été observée entre les résultats obtenus avec le bleu de trypan et ceux obtenus avec les anses ligaturées d'intestin de rat, couramment utilisées pour observer l'activité toxique de STb (Beausoleil *et al.* 2002b). Enfin, l'internalisation de STb dans les cellules épithéliales de rat a été observée au microscope électronique à transmission grâce à un anticorps couplé à des billes d'or colloïdal (Labrie *et al.* 2002).

Nous avons orienté nos recherches sur les premières étapes de l'interaction de l'entérotoxine STb avec la membrane lipidique ainsi que sur sa cytotoxicité afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'apparition de la diarrhée. Différents modèles

ont été utilisés dans ce but : des vésicules de la bordure en brosse (VMBB) de l'épithélium de jéjunum porcin, des monocouches de glycosphingolipides en résonance plasmonique de surface et des cellules en culture (NIH-3T3, IPEC-J2) analysées par cytométrie en flux et observées en microscopie confocale.

Ces modèles ont été choisis afin de répondre aux objectifs suivants :

1. Étudier l'interaction de STb avec son récepteur, le sulfatide, comparer cette interaction avec d'autres glycosphingolipides, et identifier un inhibiteur efficace à une faible concentration;
2. Observer et caractériser la capacité de STb à perméabiliser des membranes artificielles et cellulaires ;
3. Étudier l'impact de l'activité entérotoxique de STb sur la cellule.

RECENSION DE LA LITTÉRATURE

1. Généralités sur *Escherichia coli*

1.1. Caractéristiques

Escherichia coli est le microorganisme le plus étudié et le plus couramment utilisé en recherche fondamentale. En 1885, Théodore Escherich a réalisé la première étude portant sur ce bacille et a mis en évidence sa présence dans la flore fécale commensale des nourrissons. *E. coli* est le bacille à Gram-négatif le plus répandu dans la flore commensale de l'homme et des animaux à sang chaud (les mammifères et les oiseaux) (Bettelheim *et al.* 1974 ; Gyles 1994). Dès la naissance, *E. coli* colonise rapidement la peau et les muqueuses de l'hôte sans pour autant lui nuire (Kaper *et al.* 2004). L'occupation de ces surfaces par *E. coli* empêche la colonisation par des bactéries pathogènes. L'hôte bénéficie également de la production de certaines enzymes nécessaires dans le métabolisme d'hormones ainsi que dans la synthèse de certaines vitamines (vitamines K, B5, B6 et la biotine) (Bentley et Meganathan 1982 ; Savage 1986).

Cependant, *E. coli* reste potentiellement un pathogène quand les défenses de l'hôte sont affaiblies par des infections (bactériennes ou virales) ou des traitements immunodépresseurs (traitements contre le rejet de greffe ou chimiothérapie). Le sevrage et les changements de régime alimentaire sont également des événements qui perturbent la flore intestinale et peuvent entraîner une colibacillose (Nagy et Fekete 2005).

Certaines souches d'*E. coli* ont acquis au cours de l'évolution une panoplie de gènes de virulence qui leur permettent de contourner les mécanismes de défense de l'hôte. Ces souches spécialisées expriment des gènes de virulence portés par des plasmides (surtout pour les ETEC) et souvent localisés en îlots de pathogénicité. L'expression de ces gènes conduit à la production de facteurs de virulence associés à des pathologies diverses (Nataro et Kaper 1998).

1.2. Les *E. coli* pathogènes

Les *E. coli* pathogènes sont classés selon deux catégories d'infections : les bactéries causant des maladies gastro-intestinales (diarrhée, gastro-entérite...), et celles causant des maladies extra-intestinales (méningite, septicémie, cystite, pyélonéphrite, syndrome hémolytique et urémique...) (Gyles et Fairbrother 2004 ; Kaper *et al.* 2004).

Les *E. coli* suivent en général les mêmes étapes clés dans le déroulement de l'infection. Tout d'abord, les bacilles colonisent la muqueuse et dans certains cas envahissent les cellules. Ils se multiplient au niveau extracellulaire ou intracellulaire et échappent aux défenses de l'hôte par diverses stratégies acquises grâce aux gènes de virulence. Pour finir, ils provoquent des lésions chez l'hôte conduisant à l'apparition de la maladie.

Les *E. coli* induisant des infections gastro-intestinales sont divisées en six classes : *E. coli* entéropathogènes (EPEC), *E. coli* produisant des toxines Shiga (STEC), *E. coli*

entéroaggrégatives (EAEC), *E. coli* entéroinvasives (EIEC), *E. coli* à adhérence diffuse (DAEC) et *E. coli* entérotoxigènes (ETEC). Chaque classe d'*E. coli* présente des caractéristiques qui lui sont propres (Figure 1) (Levine 1987 ; Kaper *et al.* 2004).

Les EPEC ont la propriété d'adhérer intimement aux entérocytes et de sécréter des protéines via un système de sécrétion de type III (Figure 2). Les protéines sécrétées induisent un réarrangement du cytosquelette au niveau des microvillosités et permettent la formation d'un piédestal. Cet attachement intime entraîne la destruction des microvillosités intestinales. La principale caractéristique des EPEC sont les lésions de type attachant effaçant (Frankel *et al.* 1998). Le phénotype de type attachant effaçant est hautement corrélé à un îlot de pathogénicité, le locus d'effacement des entérocytes (locus of enterocytes effacement, LEE) (McDaniel *et al.* 1995). Le LEE renferme de nombreux gènes, dont le gène *eae* codant pour l'intimine (une protéine de la membrane externe) et le gène *tir* codant pour le récepteur transloqué de l'intimine, ainsi que des gènes codants pour des protéines du système de sécrétion de type III (Figure 2) (gènes *sep*), des protéines chaperonnes (gènes *ces*), des protéines de translocation ou effectrices (famille de gènes *esp*). Il a été récemment démontré que la protéine Paa (porcine attaching and effacing-associated factor) est un facteur de virulence associé aux EPEC et aux ETEC (Batisson *et al.* 2003 ; Leclerc *et al.* 2007).

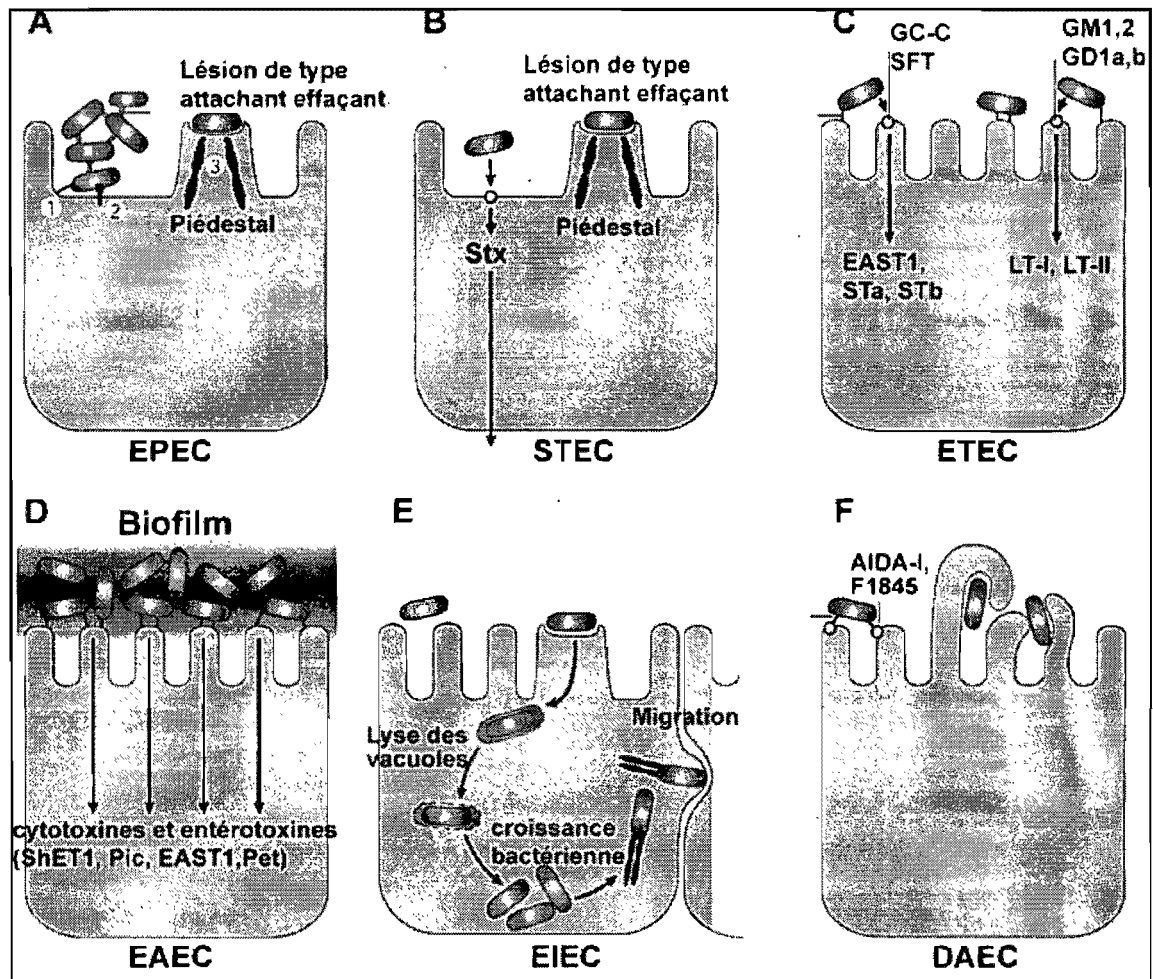


Figure 1. Caractéristiques des six pathotypes d'*E. coli* des infections gastro-intestinales. **A)** Les EPEC adhèrent à la surface des entérocytes(1), sécrètent des protéines dans la cellule hôte par le système de sécrétion de type III (2) et forment un piédestal (3). **B)** Les STEC produisent des toxines Shiga et induisent également des lésions de type attachant effaçant. **C)** Les ETEC produisent des entérotoxines ST (heat-stable) et LT (heat-labile) reconnues par des récepteurs spécifiques. **D)** Les EAEC forment un biofilm et produisent des cytotoxines et des entérotoxines. **E)** Les EIEC envahissent les cellules épithéliales, lysent les phagosomes et traversent le cytoplasme en utilisant le cytosquelette d'actine de l'hôte. **F)** En induisant l'élongation des microvillosités, les DAEC permettent ainsi leur internalisation et envahissent les cellules épithéliales. Adapté de Kaper *et al.* (2004).

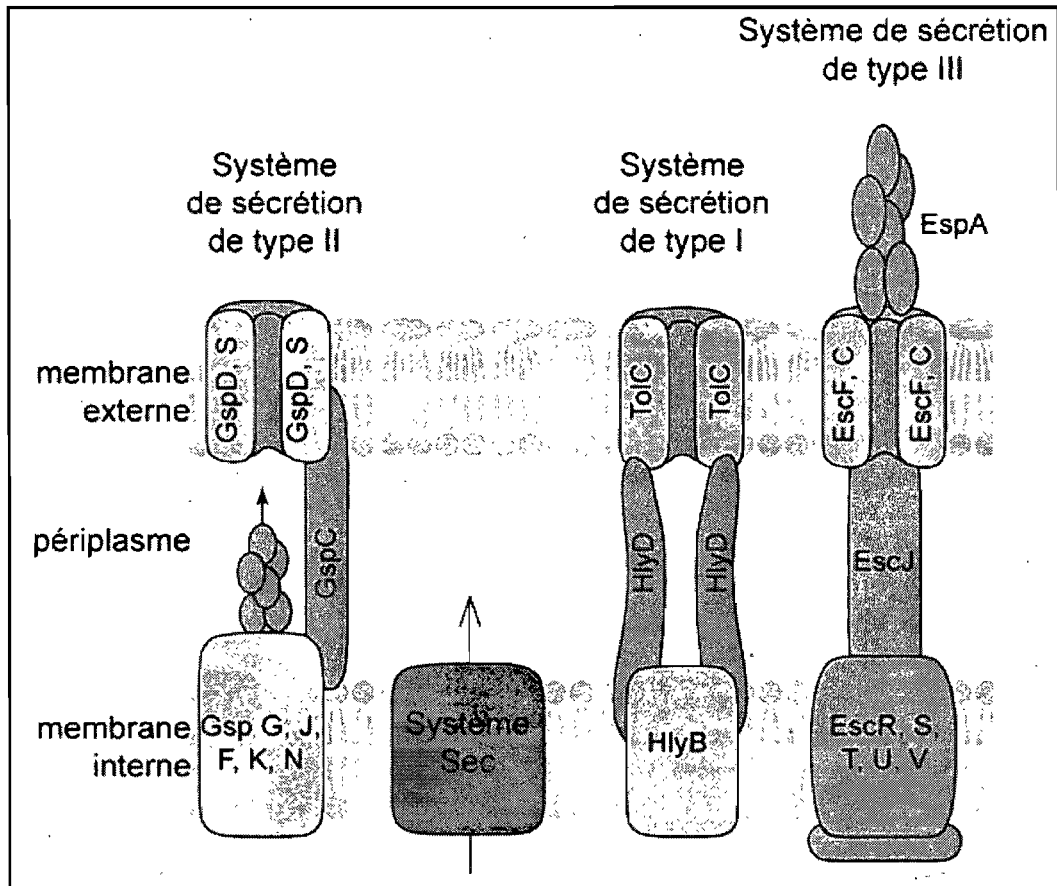


Figure 2. Systemes de secretion de type I, II et III. **(Type II)** Le transport des proteines est realise en deux etapes. Les proteines portant une sequence signal sont transportees du cytosol vers le periplasme par le systeme Sec. Apres le clivage de la sequence signal, les proteines repliees sont transportees a travers la membrane externe par une structure semblable a un pili (proteines GspG et J) qui agit comme un piston et pousse les proteines a travers le pore ancre dans la membrane externe (proteines GspD et S). **(Type I)** Dans la membrane interne, un transporteur ABC (proteine HlyB) hydrolyse l'ATP et fournit l'energie necessaire au passage des proteines du cytosol au milieu extracellulaire. Ces proteines empruntent un tunnel periplasmique (proteine HlyD) puis le canal TolC. **(Type III)** Le systeme comprend deux anneaux (famille de proteines Esc) ancre dans chaque membrane et une aiguille (proteine EspA) qui permet l'injection d'effecteurs directement dans le cytoplasme de la cellule hote. Adapté de Büttner et Bonas (2002).

La principale caractéristique des STEC est la propriété de produire des toxines Shiga (Stx, ou vérotoxines (VT), ou Shiga-like toxins (SLT)). Celle-ci est transportée à travers les cellules épithéliales vers la circulation sanguine. Elle est responsable de la maladie de l'œdème chez le porcelet. Certains STEC, dont le sérotype O157:H7, induisent également des lésions de type attachant effaçant comme les EPEC, mais au niveau du côlon chez l'homme. La capacité de certaines souches d'*E. coli* à induire des lésions de type attachant effaçant est due à la présence de l'îlot de pathogénicité LEE dont de nombreux gènes sont conservés entre les EPEC et les STEC. Les STEC sont aussi responsables des gastro-entérites et du syndrome urémique hémolytique (Frankel *et al.* 1998). Les STEC causent des colites hémorragiques, ce pourquoi ils sont également appelés *E. coli* entéro-hémorragiques (EHEC) (Gonzalez Garcia 2002).

Les EAEC (ou EAaggEC) adhèrent à la muqueuse intestinale et forment un biofilm dense (adhésion agrégative) où des entérotoxines et cytotoxines sont sécrétées. Ces souches provoquent des diarrhées chez les enfants des pays en voie de développement (Nataro et Kaper 1998). Les facteurs de virulence associés aux EAEC sont la toxine thermostable EAST1 (Ménard et Dubreuil 2002 ; Osek 2003 ; Ménard *et al.* 2004), le pilus AAF/1 (Nataro et Kaper 1998) ainsi que le gène *eae* codant pour l'intimine qui est aussi associée aux EPEC (Donnenberg et Whittam 2001).

Les EIEC sont responsables de diarrhées dysentériques. Ces *E. coli* suivent les mêmes étapes de l'infection que les *Shigella* : elles envahissent les cellules épithéliales au niveau du côlon, s'y multiplient, lysent les phagosomes, se déplacent dans la cellule en

utilisant les microfilaments d'actine et passent de cellule à cellule, se propageant tout le long de l'épithélium (Ebel *et al.* 1998). Elles causent la mort cellulaire, ce qui entraîne une intense réaction inflammatoire. Leurs principaux facteurs de virulence sont les invasines (Nataro *et al.* 1995 ; Nataro et Kaper 1998 ; Gyles 2007).

Les DAEC sont les *E. coli* les moins connues et dont le mécanisme de pathogénicité est le moins décrit dans la littérature. Elles envahissent les cellules épithéliales en induisant l'élongation des microvillosités qui englobent la bactérie et permettent ainsi son internalisation dans la cellule. Les DAEC provoquent la diarrhée chez l'homme et le porc (Ngeleka 2002). Les facteurs de virulence répertoriés sont AIDA-I (Ha *et al.* 2003), F1845, et CF16K (Kaper *et al.* 2004).

Les ETEC sont responsables de diarrhée chez l'homme et diverses espèces animales. Les ETEC produisent différents facteurs de colonisation permettant l'adhésion à la cellule cible et la prolifération des bactéries. Ces *E. coli* sécrètent deux familles d'entérotoxines (les LT et les ST) qui perturbent l'épithélium intestinal et induisent la diarrhée (Nagy et Fekete 2005 ; Turner *et al.* 2006). Les ETEC font l'objet d'une description plus complète dans la section suivante.

1.3. Les *E. coli* entérotoxigènes

Les ETEC sont le principal agent responsable de la diarrhée chez les enfants de pays en voie de développement, ainsi que de la diarrhée du voyageur (Gaastra et Svennerholm

1996 ; Bouckenooghe *et al.* 2002; Qadri *et al.* 2005). Chaque année, près de 650 millions de cas d'infections aux ETEC sont déclarés et 800 000 enfants de moins de cinq ans décèdent d'une infection aux ETEC dans les pays en voie de développement (Sack 1975 ; Qadri *et al.* 2005 ; Turner *et al.* 2006). L'environnement, les aliments et l'eau contaminés par les ETEC sont à l'origine d'épidémies de diarrhée chez les enfants en bas âge (Rowland 1986 ; Al-Gallas *et al.* 2007a; Al-Gallas *et al.* 2007b). D'après une étude réalisée au Bangladesh, 90% des cas de diarrhée rapportés dans les hôpitaux sont des enfants de 3 mois à 2 ans (Qadri *et al.* 2000).

Les ETEC sont aussi responsables de diarrhée chez les animaux d'élevage. Les porcelets et les veaux sont les plus touchés. Les cas de diarrhée chez les moutons, les lapins et les chevaux sont plus rare (Nagy et Fekete 1999). Les signes cliniques observés sont la diarrhée aqueuse aiguë, la perte de poids, le retard de croissance et la mort (Söderlind *et al.* 1988 ; Moon et Bunn 1993). Des taux élevés de morbidité et de mortalité sont associés à ces infections. Les infections dues aux ETEC provoquent des pertes économiques importantes dans les élevages du monde entier et tout particulièrement dans le cas de l'industrie du porc (Gaastra et Svennerholm 1996 ; Nagy et Fekete 1999 ; Nagy et Fekete 2005). Les infections apparaissent à deux étapes critiques de la croissance du porcelet, la diarrhée néonatale, dans les quelques jours après la naissance, et la diarrhée postsevrage qui apparaît à 3 à 4 semaines (Moon *et al.* 1977 ; Madec *et al.* 2000 ; Nagy et Fekete 2005).

Les ETEC qui contaminent l'environnement sont ingérées par les animaux et les hommes. Ces bactéries présentent des facteurs de colonisation (fimbriae et adhésines) qui permettent l'adhésion à des récepteurs spécifiques sur les cellules épithéliales de l'intestin. Une fois adhéree, la bactérie produit des entérotoxines (toxines LT et ST) (Berberov *et al.* 2004; Kaper *et al.* 2004 ; Nagy et Fekete 2005 ; Zhang *et al.* 2006). Celles-ci altèrent les fonctions d'absorption et de sécrétion des entérocytes, induisant ainsi la diarrhée.

2. Facteurs de virulence

Les ETEC se différencient des autres *E. coli* pathogènes par leur aptitude à produire deux types de facteurs de virulence spécifiques : les facteurs de colonisation (FC) et les entérotoxines.

2.1. Les facteurs de colonisation

La colonisation de l'épithélium intestinal de l'hôte est une étape essentielle dans la pathogénèse des ETEC. Cette adhérence est possible grâce aux facteurs de colonisation ou fimbriae. Les fimbriae sont des structures filamenteuses rigides ou flexibles de 2 à 7 nm de diamètre résultant de l'assemblage de sous-unités protéiques. Leur rôle est de permettre aux bactéries d'adhérer au mucus et à la surface des cellules épithéliales grâce à des récepteurs glycoprotéiques ou glycolipidiques (Erickson *et al.* 1992; Erickson *et al.* 1994; Smeds *et al.*

2003). Les facteurs de colonisation confèrent une spécificité d'espèce et d'âge à la souche. En effet, les ETEC exprimant la fimbria F4 (K88) sont associées aux diarrhées chez les porcelets alors que la fimbria F5 (K99) est associée aux souches ETEC isolés de porcs, de veaux et d'agneaux. Le CFA/I ne se rencontre que dans des souches isolées de cas de diarrhées humaines.

À ce jour, une vingtaine de facteurs de colonisation différents ont été identifiés chez les ETEC infectant l'homme (Wolf 1997 ; Pichel *et al.* 2000). Une classification des fimbriae a été établie selon leur séquence et leur structure (Tableau 1) (Gaastra et Svennerholm 1996).

Tableau 1 : Facteurs de colonisation d'*E. coli* isolés de l'homme.

Facteurs de colonisation humains	Caractéristiques
Groupe CFA/I CFA/I, CS1, CS2, CS4, CS14, CS17, CS19	- forte similarité de séquence, distinction antigénique - fimbriae composées d'une seule sous-unité
Groupe CS5 CS5, CS7, CS13, CS18, CS20	- homologie de séquence avec les fimbriae F4, F6, F7 exprimées chez les ETEC infectant les porcelets
Groupe « bundle-forming » CS8(CFA/III), CS21 (Longus)	- structures proches du pili de type IV - CS8 forme une structure de 5 à 10µm et CS21 de 20µm
Groupe CS15 CS15, CS22	- sont associés à la fimbria SEF14 de <i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis
Non-homologue CS3, CS6, CS10, CS11, CS12	- aucune homologie avec les autres fimbriae

Chez les animaux, d'autres facteurs de colonisations ont été identifiés (Tableau 2). Les fimbriae les plus répandues chez les souches porcines sont les fimbriae F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F7 (F41) et F18 (Nagy *et al.* 1990 ; Smyth *et al.* 1994 ; Nagy *et al.* 1997 ; Nagy et Fekete 1999). Les fimbriae F17 (Fy/Att25) et F41 sont exprimées chez des souches isolées de bovins et d'ovins (Girardeau *et al.* 1988; Blanco *et al.* 1991; Nagy et Fekete 1999).

Tableau 2 : Fimbriae exprimées d'*E. coli* isolés d'animaux.

Fimbriae/variants	Caractéristiques
F4 (K88)/ab, ac, ad	- F4 est fortement associé à la diarrhée chez le porcelet (Nagy et Fekete 1999) - Récepteur sialo-glycoprotéique (Van Den Broeck <i>et al.</i> 1999)
F5 (K99)	- Récepteur glycolipidique (NeuGC-GM3) au niveau de l'intestin (Smit <i>et al.</i> 1984)
F6 (987P)	- Récepteur glycoprotéique et sulfatide (Choi et Schifferli 1999 ; Choi et Schifferli 2001)
F17 (Fy)	- Récepteur glycoprotéique (Merckel <i>et al.</i> 2003)
F18/ab, ac	- F18ab et F18ac sont fortement associés à la maladie de l'œdème ou à la diarrhée chez le porcelet (Bertschinger <i>et al.</i> 1990 ; Rippinger <i>et al.</i> 1995 ; Nagy <i>et al.</i> 1997) - F18 est associé à AIDA chez des ETEC porcines (Mainil <i>et al.</i> 2002 ; Ngeleka <i>et al.</i> 2003) - Récepteur glycoprotéique (Francis <i>et al.</i> 1999 ; Jin et Zhao 2000)
F41	- Récepteur glycoprotéique
F42	- Souvent associé aux ETEC (Nagy et Fekete 1999) - Récepteur glycoprotéique
F165	- Souvent associé aux ETEC (Broes <i>et al.</i> 1988 ; Nagy et Fekete 1999) - Récepteur glycoprotéique

Selon l'âge de l'animal, certains récepteurs de fimbriae sont plus ou moins exprimés à la surface de l'épithélium intestinal. Les souches exprimant les fimbriae F5, F6 et F7 sont ainsi associées aux diarrhées néonatales des porcelets (Wilson et Francis 1986; Francis 2002) alors que les souches ETEC produisant les fimbriae F18 ou F4 sont associées à la diarrhée postsevrage des porcelets (Osek *et al.* 1999; Post *et al.* 2000 ; Francis 2002; Vu-Khac *et al.* 2004 ; Do *et al.* 2005).

Certaines fimbriae présentent des variants. Actuellement, les fimbriae les plus étudiées sont les fimbriae F4 et F18. La fimbria F4 existe sous la forme de trois variants antigéniques (F4ab, F4ac et F4ad) (Guinée et Jansen 1979) et la fimbria F18 sous la forme de deux variants antigéniques (F18ac et F18ab) (Rippinger *et al.* 1995 ; Nagy *et al.* 1997). La fimbria F18ac est associée aux ETEC isolées de porcelets souffrant de diarrhée de post-sevrage, alors que F18ab est associée aux VTEC isolées de porcelets souffrant de la maladie de l'œdème (Fekete *et al.* 2003). L'expression de la fimbria F4ac est souvent associée à la production des entérotoxines LT et STb (STa⁺ ou STa⁻) et les souches produisant la fimbria F18 expriment également STa et STb (Rippinger *et al.* 1995 ; Francis 2002).

L'adhésine AIDA (Adhesin Involved in Diffuse Adherence), associée le plus souvent aux DAEC, a été détectée parmi des souches ETEC F18⁺ isolées de porcelets souffrant de diarrhée de post-sevrage (Niewerth *et al.* 2001). Récemment, de nombreuses

études ont porté sur la prévalence du gène codant pour AIDA-I chez des porcelets souffrant de diarrhée (Ha *et al.* 2003, 2004 ; Ngeleka *et al.* 2003 ; Pritchard *et al.* 2004).

L'adhésine AIDA-I est fortement associée à la toxine STb (20,5%) (Ngeleka *et al.* 2003). Cette adhésine serait un nouveau facteur de virulence impliqué dans l'adhésion des ETEC porcins (Ngeleka *et al.* 2003 ; Pritchard *et al.* 2004 ; Ravi *et al.* 2007). *In vivo*, ces souches induisent de la diarrhée chez les porcelets 16 à 18 heures suivant l'inoculation (Ngeleka *et al.* 2003 ; Pritchard *et al.* 2004 ; Ravi *et al.* 2007). Récemment, une souche *E. coli* présentant le pathotype AIDA-I⁺/STb⁺ a été étudiée dans des modèles *in vivo* et *in vitro*. La souche adhère aux cellules HeLa de façon diffuse, s'aggrège et forme un biofilm. L'inoculation de la souche AIDA⁺/STb⁺ à des porcelets nouveau-nés a confirmé les observations *in vitro* et induit la diarrhée (Ravi *et al.* 2007).

Récemment, une étude sur la prévalence des gènes codant pour des facteurs de virulence chez les ETEC isolés de porcelets souffrant de diarrhée a démontré que 57% des souches possédaient des gènes de virulence, dont des gènes codants pour les fimbriae F4 (64,6%), F18 (34,3%), F7 (0,57%), F5 (0,57%) ainsi que l'adhésine AIDA-I (26,9%) (Zhang *et al.* 2007).

2.2. Entérotoxines

Les ETEC colonisent l'intestin et y sécrètent des deux types d'entérotoxines. La production des entérotoxines dans l'intestin mène la sécrétion de fluide et à un défaut d'absorption au niveau du jéjunum et de l'iléum, provoquant une importante perte de liquides dans la lumière intestinale (Banwell *et al.* 1971). Cette perte de liquide étant définie comme une diarrhée rapide non inflammatoire, ce qui mène à la déshydratation (Nagy et Fekete 1999 ; Rousset et Dubreuil 2000). Les entérotoxines se distinguent par leur sensibilité à une exposition de 30 minutes à 100°C : les toxines instables à la chaleur (LT) et les toxines stables à la chaleur (ST) (Germani 1986).

2.2.1. Les entérotoxines thermolabiles (LT)

Les toxines thermolabiles (LT) sont des holotoxines de type AB₅ classées en deux groupes selon leurs propriétés antigéniques: LT-I et LT-II (Green *et al.* 1983). La toxine LT-I présente une forte homologie de séquences avec la toxine du choléra (CT). La sous-unité A et la sous-unité B présentent respectivement 75% et 77% de similarité avec leurs homologues de la toxine CT. Il existe deux variants de LT-II : LT-IIa et LT-IIb (Pickett *et al.* 1987). La sous-unité A de la toxine LT-II présente 57% de similarité avec la sous-unité A de la toxine CT (Pickett *et al.* 1987, 1989). La sous-unité B de la toxine LT-II diffère complètement de celle de LT-I et de CT (Takeda *et al.* 1983 ; Spangler 1992 ; Kaper *et al.* 1995).

Les toxines LT sont codées par l'opéron *eltAB*. En plus des similitudes de structure, ces toxines présentent des similitudes de fonction et d'action avec la toxine CT (Takeda *et al.* 1983 ; Spangler 1992 ; Kaper *et al.* 1995).

Ces toxines sont des holotoxines de type AB₅ de 88 kDa (Hofstra et Witholt 1985). La sous-unité A de 28 kDa s'associe avec un anneau formé d'un pentamère de sous-unités B (5 fois 11,6 kDa). La sous-unité A est une chaîne polypeptidique qui est clivée en deux chaînes, A1 et A2, reliées par un pont disulfure (Robertson *et al.* 1983 ; Fukuta *et al.* 1988 ; Sixma *et al.* 1991 ; Spangler 1992). La chaîne A1 possède l'activité ADP ribosylase et NAD glycohydrolase. La chaîne A2 permet l'association avec le pentamère formé des sous-unités B (Spangler 1992).

Les sous-unités A et B traversent la membrane interne d'*E. coli* vers le périplasme par le système de sécrétion Sec. L'assemblage de la toxine sous la forme AB₅ a lieu dans le périplasme (Yu *et al.* 1992). D'après une étude récente, les toxines LT sont sécrétées à travers la membrane externe par le système de sécrétion de type II (Figure 2) (Tauschek *et al.* 2002). La toxine se lie aux lipopolysaccharides (LPS) de la surface bactérienne par l'intermédiaire de la sous-unité B (Horstman et Kuehn 2002 ; Horstman *et al.* 2004). L'activité de la toxine LT a été observée au niveau des vésicules de la membrane externe. La toxine est internalisée dans les cellules cibles (Fukuta *et al.* 1988 ; Horstman et Kuehn 2002 ; Horstman *et al.* 2004).

La liaison de la toxine à son récepteur cellulaire dépend de la sous-unité B. À chaque type de sous-unité B correspond un récepteur cellulaire distinct (Fukuta *et al.* 1988).

Dans le cas de la toxine LT-I, la sous-unité B permet l'attachement aux gangliosides GM1 ou GM2 à la surface des cellules épithéliales (Schengrund et Ringler 1989). Les toxines LT-IIa et LT-IIb se lient respectivement aux gangliosides GD1b et GD1a (Fukuta *et al.* 1988). De plus, les LT-IIa et LT-IIb interagissent avec le Toll-like receptor 2, ce qui entraîne la réponse cytokinaire (Hajishengallis *et al.* 2005).

Une fois la sous-unité B de la toxine liée à son récepteur, la sous-unité A est endocytée par la cellule et les vésicules du système trans-golgien permettent son transport (Lencer *et al.* 1995). La sous-unité A subit un clivage qui libère deux fragments A₁ et A₂ (Lencer *et al.* 1997). Le fragment A1 est transporté dans la cellule vers le réticulum endoplasmique (Fujinaga *et al.* 2003). La sous-unité A1 permet le transfert de l'ADP-ribose du NAD sur l'arginine 201 de la protéine G_{sα}. L'ADP-ribosylation inhibe l'activité GTPasique (Sears *et al.* 1996). L'adénylate cyclase associée à la protéine G_{sα} reste activée, ce qui conduit à l'augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc. L'AMPc active différentes enzymes comme la protéine kinase A (PKA) qui phosphoryle des canaux chlore tels que le CFTR (Cystic Fibrosis Transmembranaire Conductance Regulator – Régulateur de conductance transmembranaire de la fibrose kystique). Le canal CFTR permet la sécrétion de chlore et réduit l'absorption de sodium au niveau des cryptes intestinales (Spangler 1992). De plus, la sous-unité A induit la production de prostaglandine E₂, de sérotonine et de cytokines. Le déséquilibre ionique ainsi produit et la sécrétion des sécrétagogues provoquent la perte de liquide dans la lumière intestinale et conduisent à la diarrhée (Nataro et Kaper 1998).

2.2.2. Les entérotoxines thermostables (ST)

2.2.2.1. Généralités

Les entérotoxines thermostables sont des toxines monomériques de faible poids moléculaire. Elles ne présentent pas de similitudes structurales ou fonctionnelles avec les toxines LT. Les toxines thermostables sont classées en deux sous-types : la toxine STa ou STI (forme mature de 2,0 kDa), soluble dans le méthanol et active dans l'intestin de souriceau, et la toxine STb ou STII (forme mature de 5,2 kDa) insoluble dans le méthanol, inactive dans l'intestin du souriceau, mais active dans celui du porcelet (Burgess *et al.* 1978 ; Weikel *et al.* 1986b).

En 1995, Peterson et Whipp ont comparé l'activité sécrétrice des toxines STa et STb sur les anses ligaturés de porcelet. Ils ont observé que chaque entérotoxine induit une sécrétion de fluide après deux heures d'exposition, mais que la combinaison des toxines STa et STb montre un effet additif induisant une plus forte accumulation de fluide. L'effet additif a été suggéré par la mise en évidence de mécanismes intracellulaires distincts entre les toxines STa et STb (Peterson et Whipp 1995). Ces mécanismes seront décrits plus en détail dans les sections suivantes.

EAST1 est une autre entérotoxine thermostable récemment décrite. Elle a été observée pour la première fois chez la souche EAEC 17-2 (Savarino *et al.* 1993 ;

Yamamoto et Nakazawa 1997). La présence du gène codant pour EAST1 a été associée à des porcelets souffrant de diarrhée (Choi *et al.* 2001a, 2001b ; Osek 2003).

2.2.2.2. L'entérotoxine thermostable STa

STa est une toxine qui est isolée chez les porcelets au cours de la première semaine de vie et du sevrage (Katwa *et al.* 1991 ; Mezoff *et al.* 1991).

Le gène codant STa est localisé dans le transposon Tn1681 flanqué de séquences répétitives inversées (IS1) (So et McCarthy 1980 ; Sekizaki *et al.* 1985). Deux formes de toxines STa (STIa ou STp et STIb ou STh) sont connues. La toxine STh (19 acides aminés) a été isolée de souches d'*E. coli* humaines (Aimoto *et al.* 1982 ; Moseley *et al.* 1983a) alors que STp (18 acides aminés) a été isolé de souches d'*E. coli* d'origine porcine (Gyles 1992). Le variant STp a aussi été décrit chez l'homme et les bovins (Moseley *et al.* 1983b ; Takao *et al.* 1983 ; Sekizaki *et al.* 1985 ; Nair et Takeda 1998). Ces variants ont conservé les six cystéines permettant la formation de trois ponts disulfures essentiels à l'activité biologique (Robertson *et al.* 1983 ; Okamoto *et al.* 1987 ; Nair et Takeda 1998).

STa est soluble dans l'eau et dans les solvants organiques. Elle résiste à un traitement de 100°C pendant 15 minutes (Lazure *et al.* 1983), à diverses enzymes protéolytiques (pronase, trypsine, chymotrypsine...), et à un pH acide mais pas alcalin (Smith et Halls 1967 ; Alderete et Robertson 1978). Il est connu que le CRP (Catabolite Repression Protein) s'associe à l'AMPc et reconnaît spécifiquement une séquence d'ADN,

favorisant ainsi la transcription de certains gènes par l'ARN polymérase (Adhya et Garges 1982). Le D-glucose, le D-gluconate et le L-arabinose exercent une répression catabolique sur l'expression du gène *estA*. La répression de la synthèse de la toxine peut être contrecarrée en ajoutant de l'AMPc (Alderete et Robertson, 1977a, 1977b).

Les deux formes de STa subissent deux phases de maturation. Tout d'abord, la toxine est synthétisée dans le cytoplasme bactérien sous la forme d'un précurseur de 72 acides aminés (Sekizaki *et al.* 1985 ; Okamoto et Takahara 1990). Le précurseur subit une première digestion par une peptidase libérant un peptide signal de 18 acides aminés. La forme pro-STa est ensuite acheminée de la membrane interne vers le périplasme.

La famille des protéines Dsb intervient dans la formation des ponts disulfures dans le périplasme. Deux mécanismes complémentaires interviennent dans la formation des ponts disulfures. Les protéines DsbA et DsbB forment de nouveaux ponts disulfures lors du repliement de la protéine, alors que les protéines DsbC et DsbG permettent le réappariement des cystéines mal appariées. Dans le cas de STa, la protéine DsbA a été décrite comme étant essentielle à la formation des ponts disulfures sans lesquels une réduction de l'activité toxique était observée (Bardwell *et al.* 1991 ; Yamanaka *et al.* 1994, 1997). Cependant, d'autres études remettent en question l'implication de DsbA dans la formation des ponts disulfures (Rasheed *et al.* 1990 ; Yang *et al.* 1992 ; Batisson et Der Vartanian 2000). Aucune corrélation n'a été établie entre l'activité de DsbA et la sécrétion, le repliement et l'activité toxique de STh. Les ponts disulfures se formeraient au niveau extracellulaire (Batisson et Der Vartanian 2000).

Le principal récepteur de la toxine STa est une enzyme transmembranaire N-glycosylée localisée au niveau de la bordure en brosse de l'intestin : la guanylate cyclase C (GC-C) (Giannella 1983 ; Giannella *et al.* 1983 ; Dreyfus *et al.* 1984 ; Dreyfus et Robertson 1984 ; Frantz *et al.* 1984). Cohen et ses collaborateurs (1987) ont démontré que l'attachement de la toxine au récepteur était réversible et spontané (Cohen *et al.* 1987 ; Guarino *et al.* 1987).

La toxine STa active la GC-C, entraînant une augmentation intracellulaire de GMPc (Field *et al.* 1978 ; Hughes *et al.* 1978 ; Rao 1985 ; Vaandrager 2002). L'augmentation de GMPc mène à l'activation d'une phosphodiesterase qui entraîne la synthèse de diacylglycérol (DAG) et d'inositol 1, 4, 5- triphosphate à partir du phosphatidylinositol 4,5- diphosphate (Dreyfus *et al.* 1984 ; Knoop et Owens 1992). L'augmentation de l'inositol triphosphate permet la libération de calcium intracellulaire (Knoop et Owens 1992 ; Bhattacharya et Chakrabarti 1998). Cette hausse de calcium induit à son tour l'activation d'une protéine kinase C qui induit l'activation de guanylate cyclase et la production de GMPc (Khare *et al.* 1994 ; Ganguly *et al.* 2001 ; Gupta *et al.* 2005).

L'augmentation de GMPc provoque l'activation du canal CFTR par l'intermédiaire de la phosphorylation de la protéine kinase II. L'ouverture du CFTR mène à la sécrétion d'eau et de électrolytes, mais aussi à l'inhibition de l'absorption en ions Na^+ par l'intermédiaire de l'échangeur Na^+/H^+ au niveau apical (Goldstein *et al.* 1994 ; Tien *et al.* 1994 ; Vaandrager 2002 ; Golin-Bisello *et al.* 2005). De plus, STa induit la sécrétion de

prostaglandines, de leukotriènes et de thromboxanes qui favorisent le relâchement de fluide vers la lumière intestinale (Knoop et Owens 1992).

2.2.2.3. La toxine EAST1

L'entérotoxine EAST1 a été isolée, au Chili, d'une souche EAEC 17-2 provenant d'enfants souffrant de diarrhée (Savarino *et al.* 1991). Le gène *astA* codant pour cette toxine est associé aussi aux ETEC isolées de porcelets souffrant de diarrhée (Choi *et al.* 2001a, 2001b ; Nagy et Fekete 2005 ; Veilleux et Dubreuil 2006 ; Zhang *et al.* 2006, 2007).

Des tests *in vivo* chez le lapin et la souris ont démontré l'accumulation de liquide au niveau de la lumière intestinale en présence de la toxine EAST1. L'activité entérotoxique a aussi été observée dans les chambres d'Ussing (Savarino *et al.* 1991, 1993 ; Veilleux *et al.* 2008). Cependant, le rôle de l'entérotoxine EAST1 dans la diarrhée chez le porcelet est controversé. Les souches ETEC ayant comme seul facteur de virulence EAST1 ne sont pas capable d'induire la diarrhée chez des porcelets nouveau-nés même après 72 heures d'inoculation (Ngeleka *et al.* 2003).

EAST1 comprend 38 acides aminés (4,1 kDa) et quatre cystéines qui permettent la formation de deux ponts disulfures (Savarino *et al.* 1993). De nombreux variants ont été isolés et parmi eux le variant provenant de la souche EAEC O-42 (Savarino *et al.* 1991 ; Ménard et Dubreuil 2002). Ce variant présente une mutation de l'acide aminé T21 en A21 (Savarino *et al.* 1991) qui lui conférerait une activité toxique plus importante que la toxine

isolée de la souche EAEC 17-2 (Yamanaka *et al.* 1997). Cette toxine est différente des entérotoxines STa et STb mais présente 50% d'homologie avec le domaine entérotoxigénique de STa (Savarino *et al.* 1993). Tout comme STa, EAST1 induit la production de GMPc via l'activation de la GC-C. Le mécanisme d'action de la toxine EAST1 reste peu connu (Savarino *et al.* 1991, 1993 ; Ménard *et al.* 2004).

3. L'entérotoxine thermostable STb

3.1. Généralités

La toxine STb a été isolée pour la première fois d'une souche d'*E. coli* porcine en 1978 (Burgess *et al.* 1978), puis chez diverses espèces animales. Le gène codant pour STb a été détecté de souches d'*E. coli* isolées de bovins (buffle inclus) (Echeverria *et al.* 1985 ; Mainil *et al.* 1986, 1990 ; Shin *et al.* 1994), de poulet (Akashi *et al.* 1993), de chien (Drolet *et al.* 1994 ; Hammermueller *et al.* 1995 ; Beutin 1999), de chat (Beutin 1999), de furet (Bradley *et al.* 2001a), de chevreuil, de marmotte (Caprioli *et al.* 1991) ainsi que chez l'homme (Lortie *et al.* 1991 ; Dubreuil 1997 ; Beutin 1999 ; Bradley *et al.* 2001a). La production de STb est associée à l'apparition d'une colibacillose (Moon *et al.* 1983, 1986 ; De Castro *et al.* 1984 ; Monckton et Hasse 1988 ; Söderlind *et al.* 1988 ; Nagy *et al.* 1990 ; Blanco *et al.* 1997 ; Osek 1999 ; Kwon *et al.* 2002).

La prévalence de STb chez les ETEC porcines est très élevée (De Castro *et al.* 1984 ; Wilson et Francis 1986 ; Söderlind *et al.* 1988 ; Handl *et al.* 1992 ; Mainil *et al.* 1998 ; Beausoleil *et al.* 1999 ; Zhang *et al.* 2007). Récemment, la prévalence des gènes codants pour des toxines chez des souches isolées de porcelets souffrant de diarrhée aux Etats-Unis est de 72,6 % pour la toxine STb, 57,7% pour la toxine LT, 35% pour la toxine EAST1 et 27,4% pour la toxine STa (Zhang *et al.* 2007). La même étude a montré que les principaux pathotypes responsables de la diarrhée de postsevrage chez le porcelet étaient associés aux ETEC exprimant la fimbria F4 et les toxines LT/STb (42.5%) ou LT/STb/EAST1 (23.9%), ou encore à la fimbria F18 et les toxines STa/STb/Stx2e (31.7%) (Zhang *et al.* 2007).

La production de plusieurs entérotoxines par les souches ETEC causant la diarrhée chez le porc rend l'étude de la toxicité de STb plus difficile. La capacité de STb à induire la diarrhée a été pendant un temps sujet à controverse (Moon *et al.* 1986, Casey *et al.* 1998). Depuis, de nombreuses études ont démontré la capacité de STb à induire la diarrhée. Les souches ETEC O115:K"V165" isolées de porcs souffrant de diarrhée produisent uniquement la toxine STb (mais pas les toxines STa et LT). *In vivo*, après 24 heures d'inoculation, ces souches colonisent modérément l'iléon de porcelets nouveau-nés privés de colostrum et induisent une diarrhée aqueuse (Fairbrother *et al.* 1989). Plus récemment, deux études ont utilisés des souches isogéniques exprimant la fimbria F4 et les entérotoxines LT et STb. Ces études ont démontrées que l'inoculation de souches exprimant F4 et STb induit une sévère diarrhée chez des porcs gnotoxéniques (Berberov *et*

al. 2004 ; Zhang *et al.* 2006). Berberov et ses collaborateurs ont observé que 60% des porcelets traités avec une souche exprimant STb et EAST1 présentait une diarrhée deshydratante ainsi qu'une septicémie (Berberov *et al.* 2004). Des résultats similaires ont été observés par l'inoculation de souches exprimant AIDA-1 et STb chez des porcelets nouveau-nés (Ravi *et al.* 2007).

3.2. Gène *estB*

Le gène *estB* codant pour la toxine STb a été cloné et séquencé en 1983 (Lee *et al.* 1983 ; Picken *et al.* 1983). Aucune homologie de séquence n'a été observée entre les toxines STa et STb (Dreyfus *et al.* 1992). La séquence nucléotidique de STb est fortement conservée entre les souches. Récemment, un variant de la toxine STb a été décrit dans une souche ETEC isolée d'un porcelet souffrant de diarrhée post-sevrage (souche 2173) (Fekete *et al.* 2003). Ce variant présente une mutation au niveau de deux acides aminés : l'histidine 12 en asparagine et la lysine 23 en isoleucine. L'activité toxique de ce variant n'a pas été étudiée à ce jour.

Le gène *estB* est présent dans le transposon Tn4521 (9 kb) qui se trouve sur un plasmide (Lee *et al.* 1985 ; Hu *et al.* 1987 ; Hu et Lee 1988). Le transposon Tn4521 est encadré par des éléments d'insertion IS2 qui ont gardé l'aptitude de se transposer d'un plasmide à un autre (Lee *et al.* 1985 ; Hu et Lee 1988). Les séquences adjacentes au gène codant pour STb témoignent de nombreux remaniements, ce qui suggère que le gène *estB*

puisse se retrouver sur de nombreux transposons (Lee *et al.* 1985). Dans le cas du variant, le gène *tetB* (résistance à la tétracycline) ainsi que les gènes codants pour STa et STb sont localisés au niveau de l'îlot de pathogénicité (PAI₂₁₇₃) sur un fragment de 10 kpb appelé TSL (Toxin-Specific Locus) présent dans le plasmide pTC. Le séquençage du fragment a permis de démontrer que les transposons Tn1681 et Tn4521 ont fusionné et que le fragment est encadré par des éléments IS10 (Fekete *et al.* 2003).

La séquence *estB* est présente dans divers plasmides qui codent aussi pour d'autres toxines (LT, STa, VTs), des facteurs de colonisation, des facteurs de résistance aux antibiotiques et des facteurs de transfert (Gyles 1974 ; Echeverria *et al.* 1985 ; Harnett et Gyles 1974, 1985a, 1985b ; Blanco *et al.* 1991 ; Tsen *et al.* 1998).

3.3. Synthèse et régulation

Des quantités infimes de toxine STb sont obtenues à partir de souches sauvages. Ce phénomène s'explique par la présence d'un promoteur faible qui contrôle la transcription du gène *estB* (Spandau et Lee 1987). Le promoteur présente une mutation au niveau de la boîte de « Pribnow » (région -10 du gène *estB*) par rapport à la séquence consensus (TATAAT) des *E. coli* (Pribnow 1975 ; Lee *et al.* 1983). La thymine finale, nommée T invariable, est remplacée par une guanine. La région -35 du promoteur est conservée par rapport à la séquence consensus -35 (TTGACA) des *E. coli* (Lawrence *et al.* 1990). Le promoteur du gène *estB* est donc capable de reconnaître l'ARN polymérase au niveau de la

région -35, mais la mutation au niveau de la région -10 rend l'initiation de la transcription moins fréquente.

L'expression de STb est soumise à une répression catabolique (Busque *et al.* 1995), comme celle de STa (Alderete et Robertson 1977b ; Stieglitz *et al.* 1988). Elle est due à l'inactivation de l'adénylate cyclase lorsque le glucose est internalisé par la bactérie, ce qui conduit à la diminution de la concentration en ATP utilisé pour la formation d'AMPc. Une séquence de 22 pb d'ADN, à 26 nucléotides en amont de la région -35 du gène *estB*, présente 72% d'identité avec la séquence consensus liant le CRP. La répression de la production de STb par le glucose est abolie par l'ajout d'AMPc. Ce phénomène a été étudié à l'aide de souches mutantes *crp*⁻ et *cya*⁻ (codant pour la protéine réceptrice de l'AMPc) (Busque *et al.* 1995).

3.4. Structure protéique

3.4.1. Structures primaire et secondaire

La séquence en acides aminés de la toxine STb est connue (Picken *et al.* 1983 ; Lee *et al.* 1983). L'analyse de cette séquence a démontré l'absence d'homologie avec la toxine STa (Dreyfus *et al.* 1992). La toxine comprend 71 acides aminés (8100 Da) dont un peptide signal de 23 acides aminés en position N-terminale.

Lors de la sécrétion de la protéine, le peptide signal est clivé et la toxine est reconnue par SecA du système de sécrétion Sec (Kupersztoch *et al.* 1990 ; Fujii *et al.* 1991 ; Dreyfus *et al.* 1992). STb est alors exporté à travers la membrane interne vers le périplasma, ce qui requiert l'hydrolyse de l'ATP (Kupersztoch *et al.* 1990). À l'état mature, STb comprend 48 acides aminés (5200 Da) dont quatre cystéines permettant la formation de deux ponts disulfures : C10-C48 et C21-C36 (Fujii *et al.* 1991 ; Dreyfus *et al.* 1992 ; Okamoto *et al.* 1993, 1995) (Figure 3).

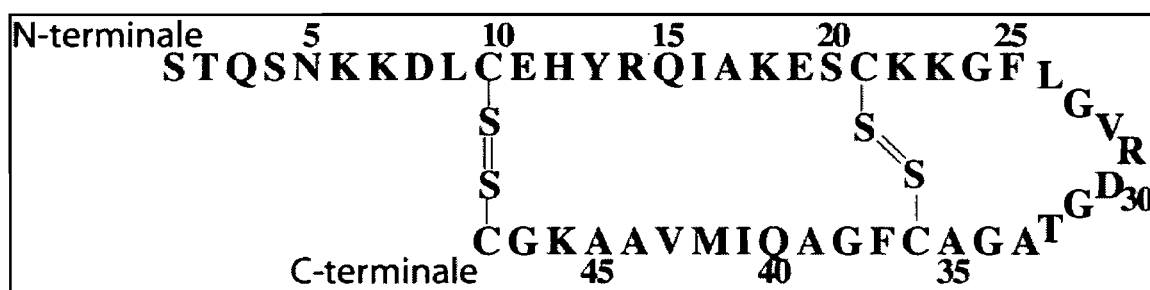


Figure 3. Séquence primaire de la toxine STb avec les deux ponts disulfures situés entre C10-C48 et C21-C36.

3.4.2. Propriétés physico-chimiques

La toxine STb présente une séquence riche en acides aminés basiques (une histidine, deux arginines et six lysines) ce qui lui donnent un point isoélectrique basique de 9,6 (Handl *et al.* 1993 ; Fujii *et al.* 1994). La séquence en acides aminés de STb comprend trois acides aminés aromatiques (une tyrosine et deux phénylalanines). L'absence de tryptophane et la faible quantité d'acides aminés aromatiques conduisent à une faible absorbance à

280 nm (Handl *et al.* 1993). L'absorbance est donc mesurée à 214 nm ce qui met en évidence les liaisons peptidiques.

La toxine STb résiste à une température de 60°C à 100°C pendant 30 minutes sans perte d'activité biologique (Burgess *et al.* 1978 ; Weikel *et al.* 1986b ; Dubreuil *et al.* 1991 ; Fujii *et al.* 1991) et elle n'est pas affectée par des variations de pH (pH 2 à 12) (Dubreuil *et al.* 1991 ; Sukumar *et al.* 1995). STb est insensible à des traitements tels que 60 à 93% de méthanol même après précipitation de la toxine (Burgess *et al.* 1978), 100% d'acétonitrile (Fujii *et al.* 1991), 50% d'acide formique, 8 M d'urée et 2,5% de SDS (Dubreuil *et al.* 1991).

Elle perd son activité entérotoxique après ajout de β -mercaptoéthanol, après un traitement par la trypsine (Dubreuil *et al.* 1991 ; Fujii *et al.* 1991) ou d'autres protéases de la même famille (Whipp 1987, 1991 ; Fujii *et al.* 1991 ; Dreyfus *et al.* 1992).

3.4.3. Structure tertiaire

La structure tridimensionnelle de STb a été déterminée par spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (RMN) (Sukumar *et al.* 1995). Cette analyse de la structure de STb montre que la toxine contient deux hélices α antiparallèles reliées par une boucle riche en glycine. La boucle ne comprend pas de proline, ce qui rend la structure flexible (Figure 4).

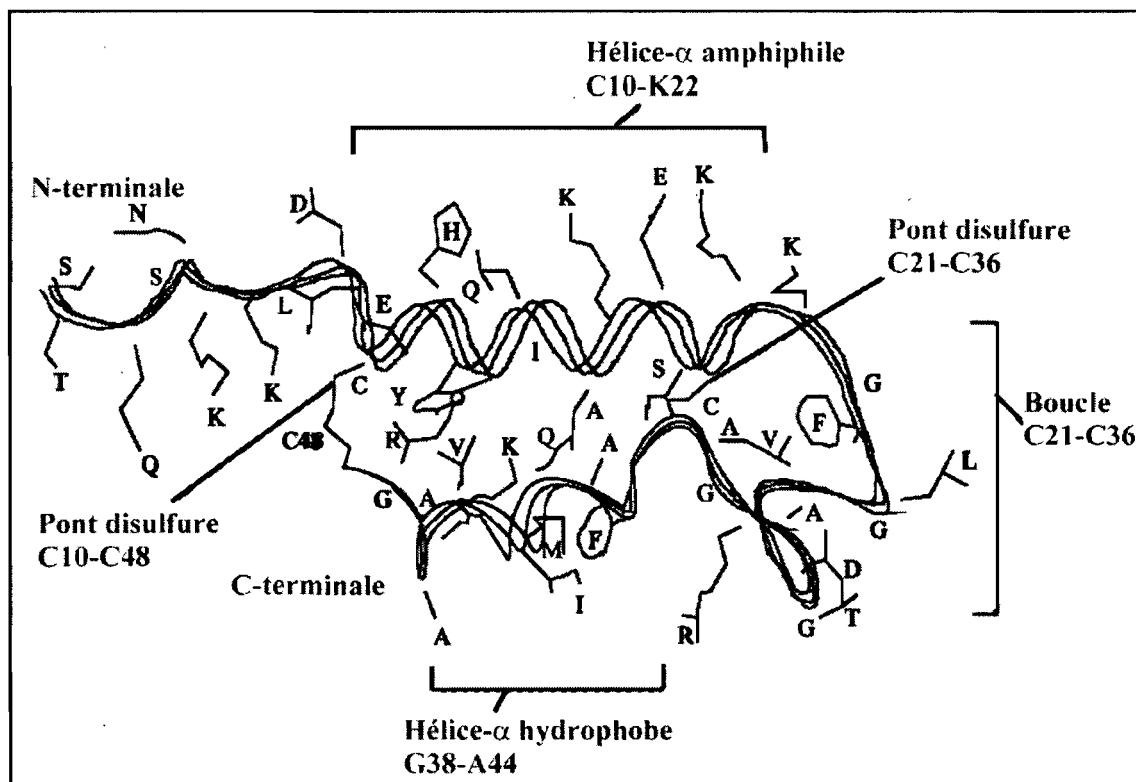


Figure 4. Structure tridimensionnelle de la toxine STb obtenue par résonance magnétique nucléaire. Adapté de Sukumar *et al.* (1995).

À l'extrémité N-terminale, l'hélice α s'étend des acides aminés C10 à K22. Elle comprend de nombreux résidus polaires (D8, H12, Q15, L18, E19, K22 et K23) exposés vers l'extérieur. Du côté C-terminal, l'hélice α couvre les acides aminés G38 à A44 et comprend des résidus hydrophobes (F37, I41 et M42). Les deux ponts disulfures (C21-C36 et C10-C48) et les interactions entre les deux hélices α rapprochent les chaînes peptidiques à une distance subatomique de 4,7 Å entre les carbones α des cystéines C21 et C36. Les hélices α interagissent entre elles par l'intermédiaire des chaînes latérales des acides

aminés hydrophobes qui ont des contacts lâches entre les résidus Y13 et R14 avec le résidu V43, et le résidu A17 avec les résidus A39 et Q40 (Sukumar *et al.* 1995). Ainsi, l'hélice α amphipatique et l'hélice hydrophobe sont stabilisées par les deux ponts disulfures et les interactions hydrophobes.

Le pont disulfure C21-C36 permet la formation d'une boucle dite Ω (Leszczynski et Rose 1986). La boucle délimitée par les cystéines C21 et C36 contient 14 acides aminés. Parmi ces 14 acides aminés, quatre glycines et quatre acides aminés chargés confèrent à la région une structure non organisée (appelée pelote statistique ou random-coil) (Dreyfus *et al.* 1992, Sukumar *et al.* 1995). La boucle comprend des acides aminés hydrophobes F25, V28, A33 et A35 et expose à ses extrémités deux résidus chargés vers l'environnement hydrophile (R29-D30 et K22-K23). La structure tridimensionnelle par cristallographie de la toxine STb n'a pas été déterminée.

3.5. Biogenèse

Peu d'informations sont disponibles au sujet du mécanisme de sécrétion de STb. Sur la base de la composition en acides aminés, il a été déduit que les 23 acides aminés en position N-terminale présentent des propriétés analogues à un peptide signal (Lee *et al.* 1983 ; Picken *et al.* 1983). Le peptide signal permet le transfert de la toxine au travers de la membrane interne vers le périplasme de la bactérie (Kupersztoch *et al.* 1990 ; Fujii *et al.*

1991 ; Dreyfus *et al.* 1992). La translocation du précurseur de STb (48 acides aminés) dans le périplasme dépend de SecA (Kupersztoch *et al.* 1990).

Le précurseur subit une deuxième étape de maturation au niveau du périplasme par la formation de deux ponts disulfures (entre C10 et C48, et entre C21 et C36). La protéine périplasmique DsbA intervient dans la formation des ponts disulfures de STb (Akiyama *et al.* 1992 ; Okamoto *et al.* 1995). La toxine STb est ensuite sécrétée par le système de sécrétion de type I (Figure 2) comprenant TolC (Foreman *et al.* 1995 ; Okamoto *et al.* 2001).

3.6. Propriété des ponts disulfures

Les ponts disulfures de STb ont fait l'objet de diverses études structure-fonction. La substitution des cystéines par des sérines rend la toxine sensible aux protéases périplasmiques (Dreyfus *et al.* 1992 ; Okamoto *et al.* 1993, 1995). La formation des ponts disulfures la protège de ces protéases.

L'absence d'un seul pont disulfure suffit à abolir l'activité de la toxine sur la sécrétion intestinale (Arriaga *et al.* 1995). L'observation de la toxine mature par dichroïsme circulaire a permis de mettre en évidence que la protéine comprend 73% d'hélices α , 4% de feuillets β et 22% de régions apériodiques. Dans le cas de STb réduit, on retrouve 20% d'hélices α , 29% de feuillets β et 51% de régions apériodiques. La réduction des ponts disulfures provoque donc un changement radical de la conformation tridimensionnelle de la

toxine (Sukumar *et al.* 1995). Le double mutant C21S-C36G présente une structure comparable à la toxine réduite. Les deux ponts disulfures sont donc essentiels à la stabilité et à l'activité entérotoxique de la toxine.

3.7. Activité intestinale

L'activité toxique a été démontrée en inoculant des souches productrices de STb chez différentes espèces animales (porcelets, agneaux, lapins, veaux, rats, souris...) (Dubreuil 1997, 2007).

Dans des conditions d'atrophie des villosités et d'hyperplasie des cryptes intestinales induites par un rotavirus, l'activité toxique de STb est réduite. La réponse de STb dépend donc de l'intégrité des villosités intestinales (Whipp *et al.* 1985). De plus, les anses intestinales ligaturées provenant de porcelets de trois semaines traitées pendant deux heures avec STb présentent une perte des microvillosités et une atrophie partielle des villosités intestinales. Ces altérations structurales dans la muqueuse intestinale conduisent à une perte de la capacité d'absorption des cellules épithéliales (Whipp *et al.* 1986). Ces résultats ont été observés sur du jéjunum porcin et ovin (Rose *et al.* 1987).

Afin de localiser plus précisément la section intestinale qui interagit avec la toxine STb, une comparaison de l'activité toxique a été réalisée entre la muqueuse de l'iléon humain et du jéjunum porcin par la technique des chambres d'Ussing (Weikel *et al.* 1986a).

Cette technique utilise des sections d'intestin collectées et montées sur un filtre entre deux demi-chambres reproduisant des milieux séreux et muqueux. Il est possible ainsi de mesurer la réponse électrique de la muqueuse à l'exposition à une toxine (ou autres stimuli). Dans le cadre de cette étude, l'activité toxique de STb n'a pas été observée sur la muqueuse d'iléon humain. En revanche, elle a été mesurée au niveau de la muqueuse du jéjunum porcin. L'activité toxique a donc tout d'abord été associée aux tissus du jéjunum porcin.

Des cellules d'origine épithéliale (HT-29/C1 et MDCK) ou provenant d'une culture primaire de cellules de l'hypophyse de rat ont été utilisées pour observer la toxicité de la toxine STb (Dreyfus *et al.* 1993). Les cellules traitées avec STb présentent une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire. Le récepteur de la toxine est donc présent sur différents types cellulaires.

Pour étudier la liaison de STb à la surface de l'épithélium, la toxine a été biotinylée et son activité a été vérifiée sur des anses ligaturées d'intestin de porcelet. Ce marquage a permis d'observer la liaison de STb au niveau des microvillosités du jéjunum ainsi que sur d'autres tissus: le duodénum, l'iléum, le caecum, le colon, le foie, le rein, la rate et le poumon (Rousset *et al.* 1998a).

3.8. Le récepteur

Le récepteur membranaire de la toxine STb est essentiel à sa liaison de la toxine à la cellule cible. Cette première interaction enclenche les mécanismes conduisant à l'apparition d'une activité toxique. Diverses études ont porté sur l'identification du récepteur fonctionnel de STb.

3.8.1. Historique

La première étude portant sur l'affinité de STb à son récepteur et sur l'isolement de celui-ci a été réalisée par Hitotsubashi et ses collaborateurs en 1994 (Hitotsubashi *et al.* 1994). À l'aide d'un agent pontant et d'un extrait de protéines de la muqueuse intestinale de souris, les chercheurs ont isolé une protéine de 25 kDa s'attachant à STb (Hitotsubashi *et al.* 1994). Cette protéine a été décrite comme le récepteur de STb. L'utilisation de STb marqué à l'iode I¹²⁵ et de STb non marqué dans une expérience d'inhibition compétitive de l'interaction au récepteur a confirmé ce résultat. STb interagissait avec son récepteur au niveau de l'intestin mais pas au niveau du foie, du rein, des poumons et de la rate de souris.

En revanche, lors d'une autre étude, Chao et Dreyfus (Chao et Dreyfus 1997) ont obtenus des résultats qui vont à l'encontre de ceux obtenus par l'équipe d'Hitotsubashi; (Hitotsubashi *et al.* 1994). Divers traitements enzymatiques réalisés sur les cellules en culture (trypsine, endoglycosidase F/peptide N-glycosidase F, neuraminidase de *Vibrio cholerae*, tunicamycine ou chlorate de sodium) ont permis de conclure que le récepteur de

STb n'est ni une protéine, ni un hydrate de carbone, ni un protéoglycane sulfaté présent à la surface des cellules. Ces résultats mettent en évidence une interaction toxine/lipide (Chao et Dreyfus 1997).

En 1999, les résultats précédents furent vérifiés sur des cellules épithéliales d'intestin de rat (Chao et Dreyfus 1999). STb se lie préférentiellement à certains lipides commerciaux purs comme le lactosylcéramide et l'acide arachidonique, plutôt qu'aux phospholipides, au cholestérol ou aux gangliosides. STb interagit avec des lipides purifiés à partir des cellules étudiées (Chao et Dreyfus 1999). En revanche, le lien entre l'interaction protéine/lipide et l'activité toxique n'a pas été mis en évidence.

Une autre étude a évalué l'affinité de la toxine radio-marquée. Celle-ci a été testée pour deux types de cellules épithéliales en culture dérivées du carcinome de côlon humain (T84 et HT29). Le nombre de sites de liaison à la bicouche lipidique est particulièrement élevé ($\geq 10^6$ par cellule). La toxine présente une faible affinité ($\leq 10^5 \text{ M}^{-1}$). L'équilibre est atteint au bout de 5 à 10 minutes aux températures de 4°C, 22°C et 37°C (Chao et Dreyfus 1997).

Une technique semi-quantitative a été développée afin de mesurer l'affinité de STb pour divers lipides et d'identifier ainsi le ou les récepteurs potentiels. La toxine a été biotinylée et son activité mesurée sur des anses ligaturées d'intestin de porcelet. La liaison aux microvillosités du jéjunum de porcelet est rapide et une saturation apparaît en 10 minutes. Le processus est indépendant de la température mais dépendant du pH (optimum pH 5.8) (Rousset *et al.* 1998a). Le pH 5.8 correspond à celui retrouvé au niveau

du jéjunum du porcelet (Snoeck *et al.* 2004). Afin de mieux caractériser le récepteur, divers traitements enzymatiques ont été réalisés. La liaison de STb au jéjunum porcin est diminuée par un traitement du tissu par les enzymes céramide glycanase et α -glucosidase. Elle est abolie par la neuraminidase. Le récepteur est donc un céramide qui présente à la surface cellulaire un acide neuraminique ou un à plusieurs résidus α -glucose (Rousset *et al.* 1998b).

Deux autres études montrent l'importance de l'interaction de STb avec un lipide en particulier (Rousset *et al.* 1998a, 1999). Tout d'abord, une migration d'extraits de lipides provenant de la muqueuse du jéjunum de porc a été réalisée par électrophorèse. Une bande de 2,5 à 6,5 kDa apparaît suite à la coloration au nitrate d'argent. Ce résultat a permis aux auteurs de conclure que le récepteur de STb n'était pas une protéine (Rousset *et al.* 1999).

Des extraits lipidiques de jéjunum de porcelet de huit semaines ont été séparés par chromatographie sur couche mince. Après migration, la bande reconnue par STb était à la même hauteur que le sulfatide commercial. Cette bande a été identifiée par spectrométrie de masse comme étant un sulfatide comprenant un céramide de 16 carbones (Beausoleil *et al.* 2002b).

Ce sulfatide a été identifié à l'aide d'un anticorps monoclonal comme étant le lipide interagissant avec STb. Une diminution de l'activité toxique de STb a été observée en traitant les anses ligaturées d'intestin de porcelets par l'ajout de laminine, d'anticorps monoclonaux anti-SFT ou encore par des sulfatases (Rousset *et al.* 1998a). Le sulfatide présent sur la muqueuse intestinale du jéjunum de porc est donc une cible naturelle pour

STb. L'affinité de STb a été testée pour un ensemble de glycolipides commerciaux. STb se lie plus fortement au sulfatide qu'aux autres glycolipides étudiés (Rousset *et al.* 1998a).

Tous ces résultats indiquent donc que le sulfatide est le récepteur fonctionnel de STb. La liaison de STb au sulfatide a été décrite comme étant de faible affinité. La constante de dissociation est de $2,0$ à $6,0 \pm 1,5 \mu\text{M}$. La liaison est saturable et dépend de la dose, du temps et de la température, mais est insensible au pH. Elle n'est pas inhibée par des sucres, des polymères sulfatés, des glycolipides et des ions en solution, mais elle l'est par des sucres chargés (Beausoleil et Dubreuil 2001).

3.8.2. Le sulfatide

Les glycosphingolipides (GSL) sont des composants ubiquitaires des membranes cellulaires eucaryotes et procaryotes. Ils sont composés d'un céramide formé à partir d'une sphingosine et d'un acide gras reliés à une chaîne oligosaccharidique. Les GSL forment une famille de lipides dont la chaîne oligosaccharidique est très variable. Parmi les GSL, les cérébrosides et les gangliosides sont les plus répandus. Les cérébrosides du cerveau contiennent un β galactose (galactocérébrosides) alors que ceux des autres organes portent plutôt un β glucose (glucocérébrosides). Les gangliosides sont plus complexes et présentent une grande variabilité. Ils ont un à plusieurs groupements d'acide sialique (ou acide neuraminique) chargeant le lipide négativement. Il existe également d'autres GSL classés selon les groupements glucidiques présents (globo-, ganglio-, lacto-, néolacto-, fucolipides)

et les GSL sulfatés dont les sulfatides font partie (Snook *et al.* 2006 ; Regina Todeschini et Hakomori 2007 ; Şillence 2007).

Les sulfatides (SFT) sont une famille de sulfosphingolipides comprenant un céramide et un galactose sulfaté en position 3 (925,35 poids moléculaire) (Figure 5). La chaîne de carbone formant le céramide peut varier en longueur et en saturation. Le SFT a été décrit pour la première fois par J. L. W. Thudichum en 1884 (Merrill *et al.* 1997). Il est synthétisé dans les cellules produisant la myéline, par les oligodendrocytes dans le système nerveux central et par les cellules de Schwann dans le système nerveux périphérique. Ce sphingolipide se trouve à la surface de toutes les cellules en quantité plus ou moins appréciable (Honke *et al.* 2004).

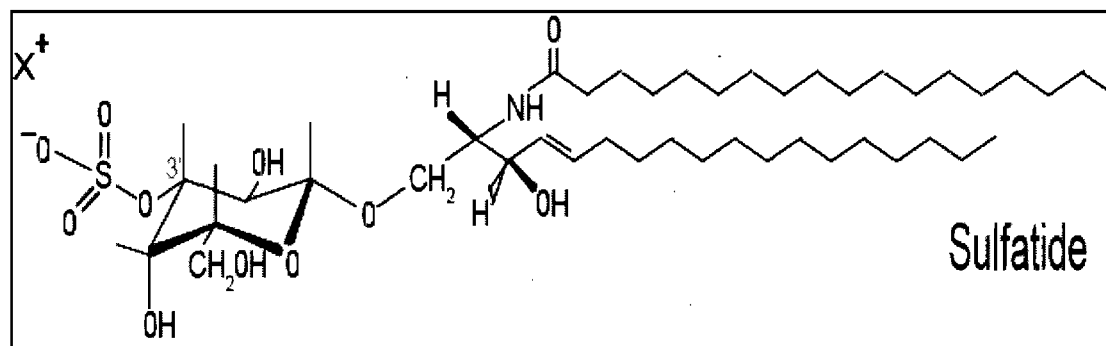


Figure 5. Structure du sulfatide.

Diverses publications ont montré le rôle du SFT dans de nombreux mécanismes physiologiques. Le SFT est impliqué dans le développement du système nerveux central et dans la cinétique de production de cytokines, ainsi que dans l'apparition du diabète de type 1. et de type 2 et dans la réponse inflammatoire auto-immune dans le système nerveux

central (Buschard *et al.* 2005). Des anomalies dans le métabolisme, le transport ou l'homéostasie du SFT sont des signes précurseurs de la maladie d'Alzheimer et sont également associés à la leucodystrophie métachromatique (Kawasaka *et al.* 2006).

Le SFT est reconnu par divers pathogènes et impliqué dans leurs mécanismes d'action. En effet, une action synergique a été décrite entre le SFT présent à la surface des cellules de souris et un lipide de la paroi cellulaire de *Mycobacterium tuberculosis* (Saito *et al.* 1976). Le SFT intervient également dans l'attachement de *Pseudomonas aeruginosa* sur les cellules épithéliales du pharynx (Yagci *et al.* 2007) et est impliqué dans le mécanisme d'action de la toxine du choléra (Kanfer *et al.* 1976).

La liaison de STb avec divers glycosphingolipides a été testée. STb interagit avec les galactosylcéramides, mais plus fortement encore avec le 3-sulfolactosylcéramide (environ 76% de la liaison au SFT). La toxine STb reconnaît d'autres glycocéramides tels que les glucocéramides (63%), les galactocéramides (27%) et les lactocéramides (24%) (Beausoleil et Dubreuil 2001). En effet, les glycocéramides présentant un résidu β -galactose interagissent plus fortement avec STb, et un groupement sulfaté en position 3 augmente aussi la liaison (Beausoleil et Dubreuil 2001). En conclusion, STb se lie plus fortement au SFT qu'aux autres glycolipides étudiés (Rousset *et al.* 1998a ; Rousset et Dubreuil 1999 ; Beausoleil et Dubreuil 2001). STb semble reconnaître tout particulièrement le groupement galactose sulfaté (Beausoleil et Dubreuil 2001).

La liaison entre le SFT et STb est saturable et dépend de la dose comme observé au cours de diverses études (Rousset *et al.* 1998a ; Rousset et Dubreuil 1999 ; Beausoleil et Dubreuil 2001). Comme la liaison n'a pas été inhibée par la tétraméthylurée, il ne s'agit pas uniquement d'une interaction hydrophobe. De même, l'utilisation du dextran sulfaté a montré qu'il ne s'agit pas uniquement d'une interaction ionique par le groupement sulfate (Rousset *et al.* 1998a).

Au cours d'une étude permettant d'observer l'effet de la toxine sur la perméabilité cellulaire, des cellules CHO ont été traitées avec de la sulfatase pour éliminer les groupements sulfatés présents à la surface des cellules. Le résultat a été une absence complète de perméabilité au bleu de trypan (un colorant de viabilité) par rapport au témoin. Donc, le groupement sulfaté est essentiel dans l'interaction de la toxine à la cellule (Beausoleil *et al.* 2002a).

Des mutations par substitution ont été réalisées au niveau de la boucle riche en glycine afin d'éliminer les charges des acides aminés R29 et D30 de STb. Les mutants R29S et D30S présentent une toxicité moindre par rapport à la toxine native (12,7% et 39%, respectivement). De plus, le traitement simultané d'anses ligaturées d'intestin de rat avec STb et l'un des deux mutants n'affecte pas la sécrétion de fluide au niveau de la lumière intestinale due à STb seul. Les mutants n'agissent pas comme des inhibiteurs compétitifs face à l'attachement de la toxine à son récepteur. Ainsi, d'après les auteurs les résidus R29 et D30 seraient impliqués dans l'interaction au récepteur (Dreyfus *et al.* 1992).

En 1994, Fujii et ses collaborateurs ont souligné l'importance de la présence des lysines dans l'activité entérotoxique de STb chez la souris (Fujii *et al.* 1994). En réalisant une mutagenèse dirigée sur les acides aminés basiques, ils ont démontré le rôle essentiel des lysines 18, 22, 23 et 46 dans l'activité entérotoxique mesurée sur des anses intestinales ligaturées. Les mutants simples (K22L et K23T) et le double mutant (K22I - K23N) ont affiché une chute de l'ordre de 90% de l'activité toxique (Fujii *et al.* 1994).

En se basant sur la structure de STb établie par RMN (Sukumar *et al.* 1995), une étude par mutagenèse dirigée a été réalisée pour déterminer la région responsable de l'interaction avec le récepteur (Labrie *et al.* 2001b). Les mutations ont été choisies pour affecter les acides aminés basiques et les acides aminés hydrophobes exposés au solvant. Dix-sept mutants simples et doubles ont ainsi été sélectionnés. Les mutations tant au niveau de l'hélice α hydrophobe (F37K, I41S et M42S) qu'au niveau des résidus basiques (K22A, K23A et R29A) provoquent une diminution de la liaison au sulfatide (Dreyfus *et al.* 1992 ; Fujii *et al.* 1994).

La mutation des glycines localisées au niveau de la boucle riche en glycine (G24A, G27P, G31A et G34A) conduit à une diminution de l'attachement au sulfatide. La présence des glycines rend la boucle flexible. La réduction de l'attachement au sulfatide peut s'expliquer par la perte de flexibilité apportée par les résidus de substitution. En conclusion, l'attachement de la toxine au sulfatide résulte d'interactions hydrophobes et électrostatiques.

Tous les mutants qui présentent une diminution de la capacité à se lier au sulfatide démontrent également une diminution de la toxicité. La liaison au récepteur est donc une étape *sine qua non* pour induire la sécrétion de fluides au niveau des anses ligaturées d'intestin de rat (Labrie *et al.* 2001b).

3.9. Mécanismes d'action

3.9.1. Activité biologique

L'activité toxique de STb a été mesurée dans différents modèles. Pour la première fois, en 1984, Kennedy et ses collaborateurs ont exposé des anses intestinales ligaturées de porcelet à du surnageant provenant de culture d'une souche ETEC produisant STb mais pas les entérotoxines STa et LT. La sécrétion de fluide observée n'a pas été accompagnée d'altérations histologiques (Kennedy *et al.* 1984).

Au niveau des anses ligaturées de jéjunum de porc, l'activité biologique de STb conduit à des altérations histologiques de la muqueuse intestinale qui s'accompagnent d'une perte des cellules au sommet des microvillosités de l'épithélium et d'une atrophie partielle des microvillosités (Whipp *et al.* 1986, 1987). Ces altérations réduisent la capacité d'absorption de la muqueuse. Les mêmes observations ont été faites chez le veau (Rose *et al.* 1987).

L'application de la toxine STb purifiée sur la séreuse de l'iléon de la souris provoque une accélération de la motilité et des contractions de la muqueuse (Hitotsubashi *et al.* 1992b). L'application de la toxine purifiée sur la muqueuse du jéjunum de souris induit, après trois heures d'incubation, la dilatation des capillaires, une atrophie de la lamina propria et une réduction de la motilité. Pourtant aucun dommage cellulaire ni signe d'inflammation n'a été observé (Hitotsubashi *et al.* 1992a). Toutes les études n'ont pas démontré des dommages au niveau de l'épithélium. L'utilisation de surnageants de culture au lieu d'une solution de toxine STb purifiée et même l'utilisation d'inhibiteurs de protéases pourrait expliquer ces observations contradictoires.

De nombreuses études ont permis d'approfondir les connaissances sur certaines étapes menant à l'activité toxique de STb. Les sections suivantes traiteront de l'oligomérisation de la toxine, de la perméabilisation de la membrane cellulaire, de l'internalisation et de l'activation de cascades intracellulaires.

3.9.2. Oligomérisation

Des purifications de filtrat bactérien contiennent des agrégats de la toxine STb. Ces agrégats sont actifs sur les anses ligaturées d'intestin de rat et provoquent la sécrétion de fluide au niveau de la lumière intestinale (Dubreuil *et al.* 1991). L'hypothèse selon laquelle STb peut s'oligomériser a été confirmée par l'utilisation d'un agent pontant (Labrie *et al.* 2001a). Des hexamères d'environ 28 kDa et des heptamères de 32 kDa ont été observés.

Ces oligomères se forment indépendamment de la température (4°C, 21°C, 37°C et 56°C). La présence de sulfatide libre ou inséré dans des liposomes n'interfère pas avec l'observation des oligomères. Le traitement par un agent réducteur, du tétraméthylurée ou divers détergents empêche l'oligomérisation. Les ponts disulfures sont donc essentiels à la formation des oligomères de STb et des forces hydrophobes sont en cause.

Les mutants F37K, I41S et M42S, précédemment étudiés (Labrie *et al.* 2001b), ne forment pas d'oligomères (Labrie *et al.* 2001a). L'hélice α hydrophobe de l'extrémité C-terminale est donc une région impliquée dans la formation d'oligomères. Le phénomène de répulsion des résidus hydrophobes vis-à-vis de l'environnement aqueux, dans lequel la toxine est sécrétée, peut conduire à la formation d'oligomères de STb. Ces mêmes mutants ont perdu la capacité de se lier au sulfatide et sont moins toxiques dans le modèle des anses intestinales ligaturées de rat (Labrie *et al.* 2001b). L'oligomérisation est donc une étape indispensable à l'activité toxique de STb.

3.9.3. Perméabilisation cellulaire

Comme décrit précédemment, la toxine STb induit la sécrétion de fluide dans les anses intestinales ligaturées de porcelet (Kennedy *et al.* 1984 ; Whipp *et al.* 1985 ; Peterson et Whipp 1995), de souris (Whipp *et al.* 1985 ; Fujii *et al.* 1994), de rats (Urban *et al.* 1990 ; Whipp 1990 ; Hitotsubashi *et al.* 1992b) et même de cobaye (Choudhry *et al.* 1991). En 1985, Weikel et Guerrant ont montré que STb induisait la sécrétion de Na^+ , de Cl^- ainsi

de bicarbonate (HCO_3^-) dans la lumière intestinale (Weikel et Guarrant 1985). Ces données ont été confirmées par la suite (Argenzio *et al.* 1984 ; Weikel *et al.* 1986a).

L'étude par RMN de la structure de STb confirme la théorie selon laquelle STb s'ancre dans la membrane de l'hôte et la perméabilise (Sukumar *et al.* 1995). L'hélice α C-terminale a des propriétés hydrophobes, ce qui permettrait l'insertion de la toxine dans la bicouche lipidique de la membrane. Cette région hydrophobe présente des similarités avec des séquences en acides aminés décrites dans d'autres peptides et permettant leur insertion dans la bicouche lipidique (Segrest *et al.* 1990).

La perméabilisation de la membrane cellulaire par STb a été observée par l'utilisation du bleu de trypan (Beausoleil *et al.* 2002a). Cinq lignées cellulaires ont été testées : A549 dérivé de poumon humain, CHO dérivé d'ovaire de hamster, IEC-18 dérivé d'iléum de rat, HT-29 dérivé de côlon humain et PK-1 dérivé de rein de porc. L'entrée du bleu de trypan dans ces lignées a été observée suite au traitement avec STb. Les lignées CHO et IEC-18 sont les plus sensibles. Après deux heures d'incubation, environ 50% des cellules traitées sont chargées de colorant. Cette réponse dépend de la concentration de STb utilisée. Les mutants testés dans les anses ligaturées d'intestin de rat (Labrie *et al.* 2001b) ont été utilisés dans ce modèle cellulaire. L'activité biologique mesurée dans le modèle des anses ligaturées présente une corrélation significative avec celle mesurée par l'entrée du bleu de trypan dans les cellules CHO (Beausoleil *et al.* 2002a).

Le bleu de trypan est normalement utilisé pour évaluer la viabilité cellulaire. Dans le cadre d'études sur la viabilité cellulaire, de nombreux tests sont basés sur la perméabilité

de la membrane cellulaire car il s'agit d'un des premiers signes de mort cellulaire. En revanche, ces tests ne prennent pas forcément en compte les traitements qui pourraient eux même affecter la perméabilité de la membrane. Ainsi dans le cas de l'étude de l'activité toxique de STb, un autre test basé sur l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale, a été réalisé. Le test MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) est un indicateur de l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes. Le tétrazolium (jaune) est réduit en cristaux de formazan (bleu-violacé). Ainsi, le traitement de STb n'affecte pas l'activité métabolique mitochondriale. Le bleu de trypan est un indicateur de l'intégrité de la membrane cellulaire mais pas forcément un marqueur de viabilité cellulaire. La conclusion de cette étude est que STb perméabilise la membrane cellulaire sans pour autant affecter l'activité de la chaîne respiratoire et la viabilité cellulaire (Beausoleil *et al.* 2002a).

En parallèle, une étude préliminaire a été réalisée sur des bicouches lipidiques planes. Le sulfatide a été inséré dans des vésicules obtenues à partir d'un mélange de PE:PC:cholestérol (7:2:1). Ces vésicules sont fusionnées à la bicouche lipidique plane séparant deux compartiments contenant une solution de KCl (1M). En présence de STb et en appliquant un voltage, une conductance de 180 pS et plusieurs états de sous-conductance ont été observés. L'obtention d'une conductance met en évidence la formation d'un canal ionique liée à la présence de STb. L'activité de ce canal semble dépendre du voltage. Il s'ouvre à tous les voltages testés et se ferme pendant de longues périodes à un voltage

négatif (au moins -60mV). De plus, STb est capable de former un canal dans une membrane artificielle contenant ou non du sulfatide (Labrie *et al.* 2001c).

En se basant sur toutes les données accumulées, la toxine STb s'oligomérisé en heptamères ou d'hexamères (Labrie *et al.* 2001a) puis interagit avec la membrane cytoplasmique (Rousset *et al.* 1998a) pour s'y ancrer et y former un pore (Labrie *et al.* 2001c) qui perméabilise la membrane cellulaire (Beausoleil *et al.* 2002a).

3.9.4. Internalisation

L'internalisation de STb a été observée dans des cellules épithéliales humaines (HT29 et T84) de façon indépendante de la température (4°C , 22°C et 37°C) (Chao et Dreyfus 1997). Le traitement avec diverses enzymes inhibant le réarrangement du cytosquelette (cytochalasine, colchicine), avec de fortes concentrations de sucrose ($0,45\text{ mM}$) ou avec une solution d'azide de sodium (5 mM , un inhibiteur de la chaîne respiratoire) n'inhibe pas l'internalisation. D'après ces résultats, la toxine utilise une voie d'internalisation indépendante des ressources énergétiques de la cellule. La toxine STb ne suit pas les voies d'endocytose dépendantes ou indépendantes de la clathrine, par caveolae ou par micropinocytose (Chao et Dreyfus 1997). Environ 50% à 80% de STb- I^{125} restent associés aux cellules intestinales de rat. Ainsi, les auteurs suggèrent que la toxine s'associe à la membrane ou s'internalise dans les cellules intestinales, ou les deux (Chao et Dreyfus 1999). Une autre hypothèse proposée est que la toxine STb serait ancrée dans la membrane

sous la forme d'un pore, ce qui expliquerait l'effet observé sur la perméabilité membranaire (voir section 3.9.3).

Plus récemment, l'internalisation de STb a été observée par microscopie électronique à transmission (Labrie *et al.* 2002). Dans des anses intestinales ligaturées de rat, STb a été marqué avec un anticorps anti-STb couplé à des billes d'or colloïdal. STb et la protéine de fusion STb-MBP (Maltose Binding Protein) sont internalisées dans les entérocytes. En revanche, le mutant I41E-M42R ne s'internalise pas. Ceci peut s'expliquer par le faible niveau d'hydrophobicité du double mutant qui perd ainsi sa capacité à interagir avec la membrane lipidique (Labrie *et al.* 2001b). Aucun organite n'a été identifié comme étant la cible de la toxine.

3.9.5. Voie intracellulaire

Le traitement des cellules en culture (MDCK, HT-29) avec STb provoque l'augmentation transitoire (1 à 5 minutes selon la dose de STb utilisée) de la concentration en calcium intracellulaire (Dreyfus *et al.* 1993). Différents antagonistes des canaux calciques dépendants du voltage ont été testés pour inhiber l'augmentation de calcium (le nitrendipine et le vérapamil (inhibiteur de canaux de type L), le ω -conotoxine E (canaux de type N) et l'ion nickel (canaux de type T)). Ces inhibiteurs n'empêchent pas l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire induite par STb. La thapsigargine et l'acide cyclopiazonique, des agents supprimant et bloquant les réserves de Ca^{2+} internes, n'affectent pas l'effet de STb.

Donc STb n'agit pas sur les réserves internes de Ca^{2+} , mais provoque l'ouverture d'un canal calcique non sensible aux inhibiteurs habituels présents dans la membrane cytoplasmique (Dreyfus *et al.* 1993).

En revanche, l'utilisation de la toxine pertussique inhibe l'augmentation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire induite par STb. Donc, STb permet l'activation de la protéine G sensible à la toxine pertussique. Cette protéine G est impliquée dans l'induction de l'ouverture d'un canal calcique présent à la surface de la membrane plasmique (Dreyfus *et al.* 1993). La protéine de 25 kDa, décrite précédemment comme un récepteur de STb par Hitosubashi et ses collaborateurs (1994) serait une protéine G_{i3} impliquée dans les mécanismes intracellulaires (Hitotsubashi *et al.* 1994 ; Chao et Dreyfus 1997).

L'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire permet également l'activation des phospholipases A_2 et C (Harville et Dreyfus 1995 ; Dubreuil 2007). STb induirait la production d'acide arachidonique par l'activation des phospholipases A_2 (Harville et Dreyfus 1995; Dubreuil 1999, 2007).

STb entraîne la production de PGE_2 dans la lumière intestinale. L'aspirine et l'indométhacine, des inhibiteurs de la cyclooxygénase impliquée dans la synthèse des prostaglandines à partir d'acide arachidonique, réduisent la réponse induite par STb (Fujii *et al.* 1995).

De même, l'augmentation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire active la production de la prostaglandine endoperoxydase synthétase (Dreyfus *et al.* 1993) et permet

la libération de PGE₂ dans les anses intestinales ligaturées de souris (Hitotsubashi *et al.* 1992a). La production de PGE₂ est proportionnelle à la concentration de STb utilisée (Fujii *et al.* 1995).

Les anses ligaturées d'intestin de rats traitées avec de la kétansérine (un antagoniste du récepteur de la sérotonine) présentent une sécrétion réduite par rapport aux anses de rats traitées uniquement avec STb (Harville et Dreyfus 1995). La sécrétion de sérotonine (5-hydroxytryptamine ou 5-HT) a été observée sur des cellules RBL-2H3 (cellules basophiles leucémiques de rat) et inhibée par la présence de toxine pertussique (Harville et Dreyfus 1996 ; Lundgren 1998).

L'utilisation de la kétansérine sur des anses ligaturées de rat réduit également le niveau de sécrétion de PGE₂ induite par STb. Une partie de la production de PGE₂ est stimulée par la sérotonine. En revanche, l'indométhacine ne réduit pas la production de la sérotonine. Donc, STb induit la production de sérotonine et de PGE₂ laquelle peut être stimulée par la sérotonine (Harville et Dreyfus 1995 ; Peterson et Whipp 1995).

Une comparaison des niveaux de production de l'AMPc, du GMPc, de la PGE₂ et de la 5-HT a été réalisée sur des cellules entérochromaffines intestinales après traitement avec les toxines CT, STa et STb (Hitotsubashi *et al.* 1992b, Peterson et Whipp 1995). Chaque toxine induit des niveaux de production différents d'AMPc, de GMPc, de PGE₂ et de 5-HT. STb n'induit pas la production de GMPc et d'AMPc. Un traitement simultané de STa et STb ou de CT et STb entraîne un effet synergique sur la sécrétion de fluide, ce qui indique que les mécanismes d'action des toxines CT et STa diffèrent de ceux de STb. La

sécrétion de fluide est maximale après 2h, 3h et 8h pour les toxines STa, STb et CT, respectivement (Hitotsubashi *et al.* 1992a).

Le mode d'action de STb pourrait être similaire à celui de la toxine CT, puisque STb stimule la sécrétion de PGE₂ et de 5-HT, ainsi STb pourrait agir sur le système nerveux autonome entérique. En utilisant des souches d'*E. coli* productrices de STa et de STb, il a été démontré que ces toxines provoquent la sécrétion de fluide, en partie via l'activation du système nerveux entérique. Ces toxines influencent l'activité du système nerveux et diminuent la réponse sécrétoire (Eklund *et al.* 1985). STb peut directement augmenter la motilité des cellules musculaires lisses de l'iléum de souris (Hitotsubashi *et al.* 1992b). Mais ces contractions n'apparaissent pas quand le traitement par STb seulement est réalisé sur la muqueuse. La motilité n'a pas été inhibée par l'atropine, indiquant que les nerfs cholinergiques ne sont pas stimulés. En revanche, la papaverine, un agent myorelaxant, a un effet inhibiteur sur l'activité de STb.

Une étude suggère que la protéine kinase II, dont l'activation dépend du complexe calcium/calmoduline (CaMK-II), est impliquée dans le mécanisme de sécrétion intestinale induit par STb (Fujii *et al.* 1997). Le traitement de l'intestin de souris par des antagonistes de la calmoduline (W-5 et W-7) a permis de mettre en évidence l'implication de la CaMK-II dans le mécanisme d'action de STb. Ce résultat a été confirmé par l'utilisation d'un inhibiteur de la CaMK-II, le KN-93. D'après ces auteurs, l'augmentation de la concentration en Ca²⁺ intracellulaire permet l'activation de la CaMK-II, ce qui conduit à l'ouverture d'un canal chlore et à la sécrétion de fluide provoquant ainsi l'apparition de la

diarrhée (Fujii *et al.* 1997). Une étude a précédemment démontré que la sécrétion d'ions chlore est induite par la CaMK-II dans la lignée cellulaire T84 (Worrel et Frizzell 1991). La voie calcique active la voie CaMK-II, ce qui conduit à la phosphorylation et à l'ouverture d'un canal chlore (Worrel et Frizzell 1991 ; Kidd et Thorn 2000). Le canal chlore stimulé par la CaMK-II n'a pas été identifié.

Le canal CFTR est impliqué dans le mécanisme d'action de STa et la sécrétion de HCO_3^- dans l'iléon de souris (Wagner *et al.* 1991 ; Seidler *et al.* 1997). Par contre CFTR ne semble pas intervenir dans le mécanisme d'action de STb. Trois voies de transduction intracellulaire sont connues pour activer la sécrétion de HCO_3^- : la voie AMPc, la voie GMPc et la voie Ca^{2+} . STb induit la sécrétion de HCO_3^- . La sécrétion de bicarbonate serait reliée à la hausse de la concentration en calcium au cours des premières étapes du mécanisme d'action intracellulaire de STb.

En activant la protéine G_{i3} , STb permettrait donc l'ouverture d'un canal calcique dans la membrane cytoplasmique et l'augmentation de calcium intracellulaire. La concentration élevée en calcium intracellulaire active des phospholipases qui libèrent de l'acide arachidonique provenant de la membrane lipidique. Par la suite, la synthèse de la PGE_2 et d'autres sécrétagogues est stimulée, ce qui conduit à la diarrhée (Figure 6).

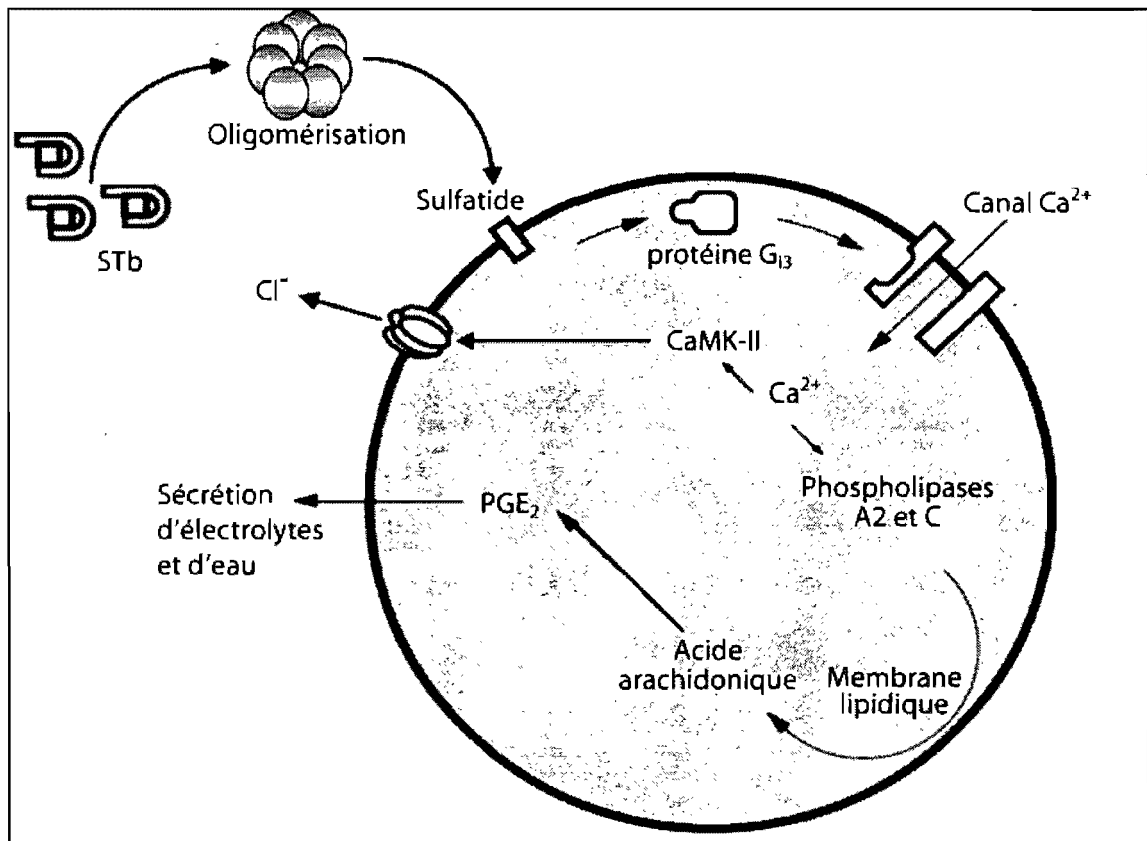


Figure 6. Mécanisme d'action simplifié de la toxine STb. STb s'oligomérisse et interagit avec son récepteur le sulfatide. La protéine G₁₃ est activée et permet l'ouverture d'un canal calcique au niveau de la membrane cellulaire. L'augmentation de Ca_i²⁺ provoque l'activation des PLA₂ et PLC ainsi que l'activation de la CaMK-II. L'hydrolyse des phospholipides membranaires libère de l'acide arachidonique, ce qui permet la synthèse de PGE₂. La PGE₂ induit la sécrétion d'électrolytes et d'eau. Le complexe CaMK-II est activé par l'augmentation de Ca_i²⁺ et permet l'ouverture d'un canal Cl⁻. Adapté de Dubreuil (1997).

4. Les toxines agissant sur l'intestin

4.1. Homéostasie intestinale

Le tractus gastro-intestinal est le siège de la digestion des aliments et de leur transformation en nutriments utilisables par l'organisme. Ces substances sont entre autres des protéines, des glucides et des lipides. Le tractus gastro-intestinal comprend l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle (duodénum, jéjunum, iléum), le côlon, le caecum et le rectum.

La majorité des phénomènes d'absorption d'eau et de nutriments ont lieu dans l'intestin grêle. La muqueuse intestinale est constituée principalement d'une couche monostratifiée de cellules épithéliales en colonne, les entérocytes. Ces cellules sont responsables de la sécrétion et de l'absorption de l'eau, des électrolytes et des nutriments. Les villosités, replis de la muqueuse sur la paroi interne de l'intestin, et les microvillosités présentes à la surface apicale des entérocytes augmentent la surface d'absorption. Dans l'intestin grêle et le côlon, la sécrétion semble se produire essentiellement au fond des cryptes alors que l'absorption est la plus importante aux extrémités des microvillosités. L'absorption et la sécrétion dépendent de différents mécanismes de transport impliquant, entre autre, l'eau et les électrolytes prédominants que sont le sodium et le chlore. Le moindre dysfonctionnement conduit à des symptômes de constipation ou de diarrhée (Fondacaro 1986 ; Field 2003 ; Moeser et Blikslager 2007).

L'homéostasie ionique de l'intestin est maintenue grâce à de nombreux canaux ioniques, pompes et transporteurs présents dans la membrane des entérocytes. Les entérocytes sont des cellules polarisées. La région apicale est séparée de la région basolatérale par les jonctions serrées. Cette polarité permet d'établir un gradient électrochimique grâce aux divers systèmes de transports ioniques spécifiques à chacun des pôles. Le gradient ainsi généré favorise l'absorption ou la sécrétion des électrolytes (Massey-Harroche 2000 ; Banks et Farthing 2002 ; Field 2003 ; Kapus et Szászi 2006 ; Moeser et Blikslager 2007).

La pompe à sodium ($\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$) est située dans la membrane basolatérale des entérocytes. Elle maintient une concentration intracellulaire faible en Na^+ (15 mM) et élevée en K^+ (150 mM) ce qui génère un potentiel de membrane.

Le gradient électrochimique formé par la concentration en Na^+ de part et d'autre de la membrane favorise l'entrée de Na^+ (Dyer *et al.* 2003 ; Kapus et Szászi 2006). La famille des transporteurs NHE (Na^+/H^+ échangeur) permet l'absorption de sodium au niveau apical. Ces transporteurs NHE échangent un ion Na^+ pour un proton (H^+) (Zachos *et al.* 2005 ; Kiela *et al.* 2006) (Figure 7). Le Na^+ est ensuite expulsé au niveau basolatéral par la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ (Field 2003 ; Kapus et Szászi 2006 ; Moeser et Blikslager 2007). Les transporteurs NHE sont régulés en partie par le pH intracellulaire. L'augmentation du métabolisme provoque une acidification du cytoplasme et entraîne l'activation des transporteurs NHE. Les échangeurs sont également régulés par l'AMPc et le Ca^{2+} . L'AMPc active la PKA laquelle inactive les NHE par phosphorylation. À l'inverse d'un pH acide,

l'augmentation de la concentration d'AMPc provoque une réduction de l'absorption de Na^+ .

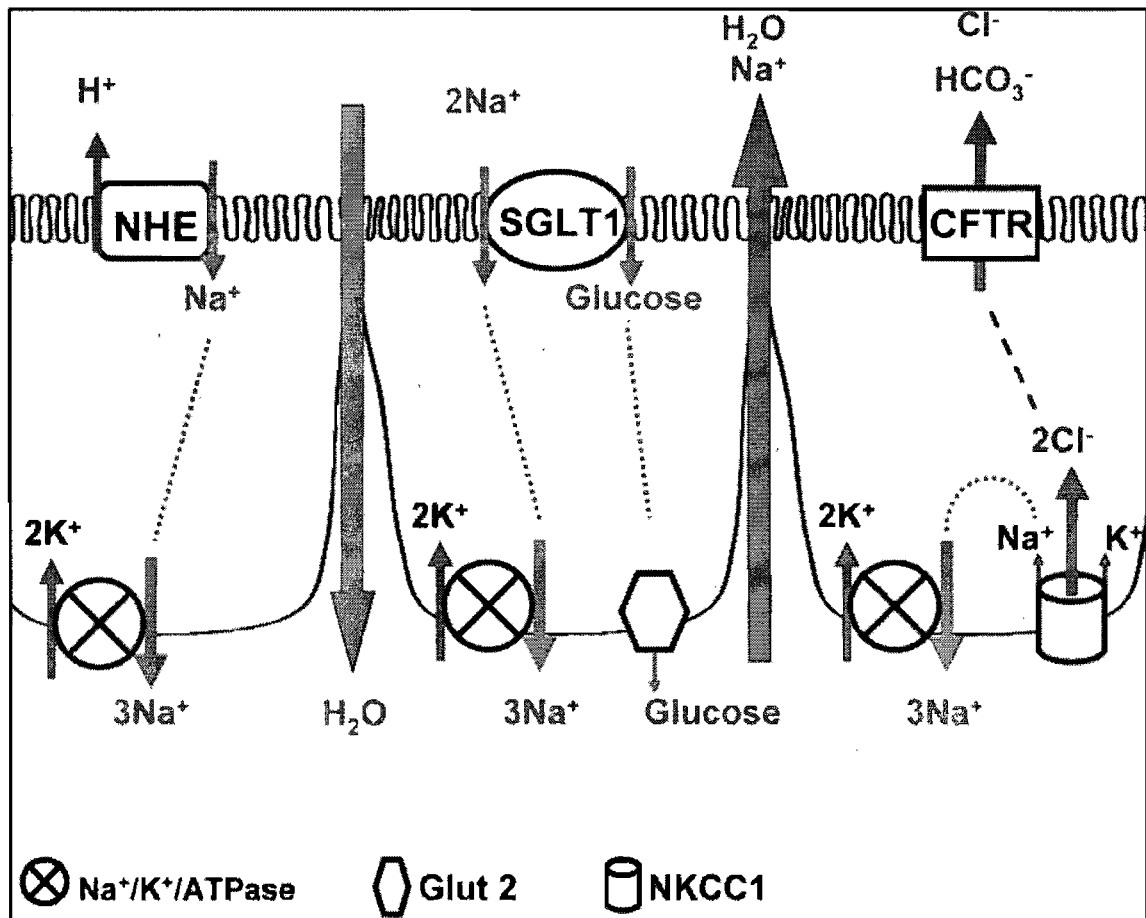


Figure 7. Récapitulatif des mécanismes d'absorption et de sécrétion des entérocytes. Au niveau apical, le transporteur NHE permet l'absorption d'un ion Na^+ pour un proton alors que deux ions Na^+ sont absorbés avec une molécule de glucose par le cotransporteur SGLT1. Le sodium absorbé traverse la membrane basolatérale par la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ alors que le glucose absorbé est transporté par Glut2. Au niveau basolatéral, le co-transporteur NKCC1 permet le passage du Cl^- qui est ensuite sécrété dans la lumière intestinale par le canal CFTR.

L'absorption du Na^+ est associée au transport du glucose, des acides aminés et des vitamines. Le transporteur SGLT-1 (Sodium Glucose Linked transporter 1) localisé dans la membrane apicale permet l'entrée de 2 ions Na^+ pour une molécule de glucose (Duggan *et al.* 2004). Le Na^+ est ensuite sécrété au niveau de la membrane basolatérale par la pompe Na^+/K^+ ATPase et le glucose par le transporteur GLUT 2. L'absorption du glucose conduit à la formation d'un gradient osmotique qui permet le passage de l'eau entre les cellules (Figure 5B) (Wright et Loo 2000 ; Dyer *et al.* 2003) (Figure 7).

Le chlore est l'ion le plus sécrété dans la lumière intestinale. En réponse au gradient électrique et osmotique, la sécrétion de Cl^- est suivie par la sécrétion de Na^+ et d'eau. La sécrétion du Cl^- produit une différence de potentiel électrique positif ainsi générée assure le gradient électrochimique nécessaire à la sécrétion de Na^+ . Le canal CFTR est le principal canal chlore au niveau apical (Thiagarajah et Verkman 2003). Il est activé par les protéines kinases A ou C qui sont activées respectivement par l'AMPc ou le GMPc (Sheppard et Welsh 1999). L'ouverture des canaux chlore est aussi stimulée par des hormones ou des neurotransmetteurs (Haas et Forbush 2000 ; Field 2003). Le canal CFTR sécrète également des ions HCO_3^- (Clarke *et al.* 2001). Du côté basolatéral, l'entrée du Cl^- est jumelée à celle du Na^+ et du K^+ et assurée par le co-transporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ (NKCC1) grâce au gradient électrochimique formé par la Na^+/K^+ ATPase (Haas et Forbush 2000 ; Petri *et al.* 2008) (Figure 7). Le Cl^- est également réabsorbé par un échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ dans la membrane apicale (Jacob *et al.* 2002) stimulé par un pH alcalin. Le pH de la cellule est régulé par

l'échangeur Na^+/H^+ (NHE) qui augmente le pH cellulaire. L'augmentation du pH active l'échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ lequel permet l'entrée d'un ion Cl^- et la sortie d'un ion HCO_3^- (Schultheis *et al.* 1998 ; Jacob *et al.* 2002).

Les entérotoxines produites par les ETEC stimulent la sécrétion de fluide au niveau de la lumière intestinale, ce qui entraîne une sévère déshydratation. Elles déstabilisent l'homéostasie intestinale en augmentant les concentrations intracellulaires d'AMPc, de GMPc ou de Ca^{2+} (Field 2003 ; Moeser et Blikslager 2007). La toxine LT stimule la production d'AMPc qui active la PKA. D'une part, la PKA phosphoryle et inactive l'échangeur NHE, ce qui réduit l'absorption de Na^+ . D'autre part, cette même PKA phosphoryle et active le canal CFTR, ce qui augmente la sécrétion de Cl^- et de HCO_3^- . Les toxines STa et EAST1, quant à elles, stimulent la production de GMPc. Cela conduit à une forte sécrétion de Na^+ et à une inhibition de son absorption. La toxine STb augmente la concentration en Ca^+ intracellulaire et stimule l'ouverture de canaux Cl^- . Ces différents mécanismes de sécrétion conduisent à l'apparition de la diarrhée (Moon 1978 ; Morris et Estes 2001 ; Laohachai *et al.* 2003 ; Field 2003).

Les entérotoxines (LT, STa, STb) induisent la production et la sécrétion de PGE_2 et de 5-HT. Ces sécrétagogues activent le système nerveux entérique, lequel stimule une forte sécrétion au niveau des cryptes de l'épithélium (Peterson et Whipp 1995). La toxine STb endommage la muqueuse intestinale et entraîne l'atrophie des microvillosités. La

perméabilité du tissu est donc altérée et peut augmenter le degré de sévérité de la diarrhée (Rose *et al.* 1987 ; Whipp *et al.* 1987).

4.2. Toxines formant des pores

L'altération de la sécrétion des électrolytes est due en partie à des toxines formant des pores dans la membrane cytoplasmique de la cellule cible (Morris et Estes 2001). Les toxines formant des pores sont classées en trois principaux groupes : les toxines formant de larges pores, les toxines formant de petits pores et les toxines RTX.

4.2.1. Toxines formant de larges pores

Les toxines de cette famille ont une taille de 50 à 60 kDa. Leur extrémité C-terminale porte un motif conservé essentiel à l'interaction avec leur récepteur cellulaire, le cholestérol, particulièrement concentré au niveau des radeaux lipidiques. La présence du cholestérol est nécessaire à leur activité toxique (Heuck *et al.* 2003). Ces toxines forment des oligomères qui s'insèrent dans la membrane lipidique en pores de diamètre d'environ 30 nm. Les pores provoquent la libération de macromolécules et de solutés. Les toxines les plus connues de cette famille sont la streptolysine de *Streptococcus pyogenes*, la perfringolysine de *Clostridium perfringens*, la listériolysine de *Listeria monocytogenes* et la pneumolysine de *Streptococcus pneumoniae*.

La perfringolysine (PFO) est responsable d'intoxications alimentaires et de diarrhée chez l'homme et l'animal (Hardy *et al.* 2001 ; Songer et Uzal 2005 ; Geny et Popoff 2006a). C'est une protéine hydrophile de 472 acides aminés, riche en feuillets β . La PFO comprend 4 domaines. Le quatrième domaine porte une séquence hautement conservée de 11 acides aminés (Rossjohn *et al.* 1997). A l'état de monomère, la perfringolysine reconnaît le cholestérol par l'intermédiaire de cette séquence de 11 acides aminés (ECT-GLAWEWWR) (Ramachandran *et al.* 2002). Les monomères liés au cholestérol s'assemblent pour former une structure en anneau de 40 à 50 monomères qui s'insère dans la bicouche lipidique. Le pore ainsi formé perméabilise les cellules Caco-2 aux cations (Hardy *et al.* 2001).

Selon un modèle proposé par Heuck et ses collaborateurs, la PFO change de conformation lors de son insertion dans la membrane (Figure 8) (Heuck *et al.* 2000 , 2003, 2007). En premier lieu, le domaine 4 interagit avec le cholestérol (Figure 8 – Etape i), change de conformation et s'insère dans la membrane (Figure 8 – Etape ii). Les domaines 2 et 3 subissent aussi des changements conformationnels. Suite à l'étape ii, les monomères de PFO s'oligomérisent et forment un complexe, le pré-pore. La dernière étape de la formation du pore est l'insertion de deux structures en épingle à cheveux (TMH 1 et 2 – Transmembrane β Hairpin 1 et 2) dans la membrane (Figure 8 – Etape iii). A ce stade, le pore a un diamètre de 250 à 300 Å (Heuck *et al.* 2003).

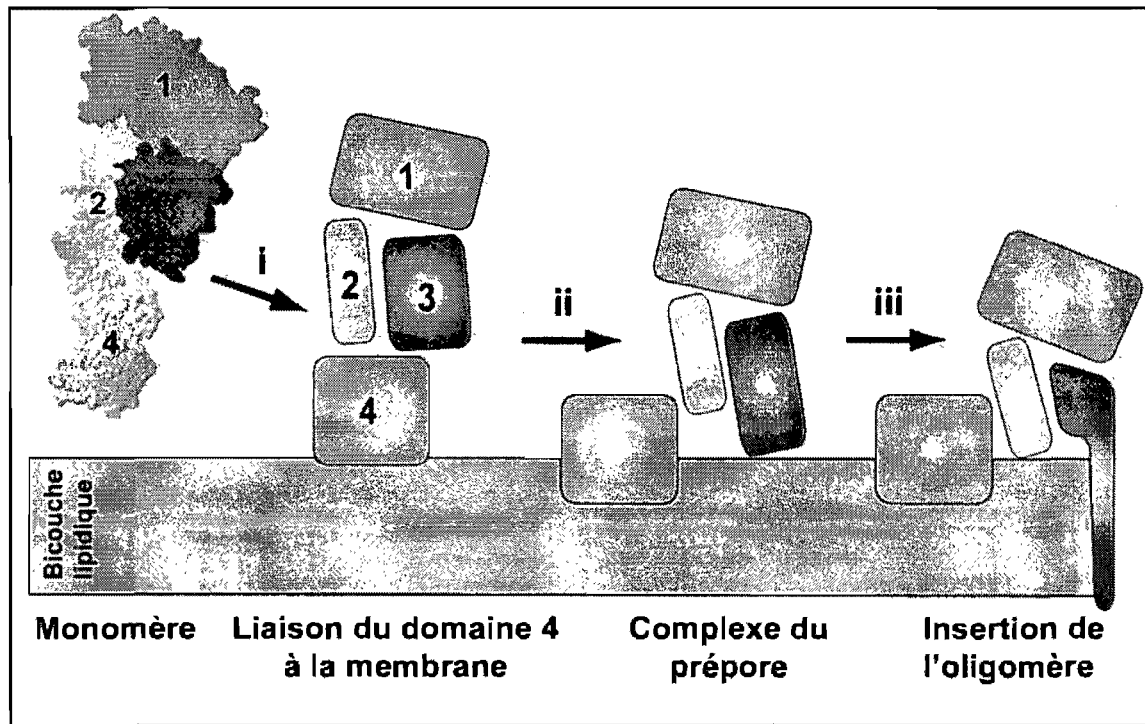


Figure 8. Modèle d'insertion et de formation du pore par la perfringolysine O. Adapté de Heuck *et al.* (2000).

La listériolysine (LLO) est une protéine de 56 kDa produite par *L. monocytogenes*. La bactérie est phagocytée dans la cellule où elle est protégée du système immunitaire. La LLO sécrétée est activée par le pH acide du phagosome (Beauregard *et al.* 1997). Grâce à cette toxine, la bactérie lyse le phagosome et se retrouve libre dans le cytoplasme. La listériolysine forme de larges pores qui permettent le passage des PLC bactériennes dans la membrane du phagosome. Celles-ci interviennent dans la lyse de la membrane lipidique du phagosome et dans la production de DAG (Schnupf et Portnoy 2007). Elle affecte aussi la

concentration en Ca^{2+} intracellulaire (Repp *et al.* 2002) et provoque la chute du potentiel de membrane des mitochondries des lymphocytes (Carrero *et al.* 2004).

En se basant sur l'étude par cristallographie de la toxine PFO (Rossjohn *et al.* 1997), une structure tridimensionnelle de la toxine LLO a été suggérée (Schuerch *et al.* 2005 ; Hamon *et al.* 2006). Comme la toxine PFO, la toxine LLO aurait quatre domaines riches en feuillets β qui changeraient de conformation au cours de l'insertion dans la membrane lipidique. LLO suivrait le modèle de la toxine PFO. Ce modèle a été également suggéré pour la famille des toxines formant de larges pores de 250 à 300 Å de diamètre (Tweten 2005 ; Vázquez-Boland *et al.* 2006).

4.2.2. Toxines formant de petits pores

Ces toxines s'oligomérisent en heptamères, conduisant à la formation de pores d'environ 2 nm de diamètre qui perméabilisent la membrane cellulaire aux ions et aux nucléotides. L'aérolysine d'*Aeromonas hydrophila* et l' α -toxine de *Staphylococcus aureus* sont des exemples de toxines formant de petits pores.

A. hydrophila est responsable de septicémie et de gastro-entérite aiguë chez l'enfant et l'adulte ainsi que d'intoxication alimentaire et de la diarrhée du voyageur (Albert *et al.* 2000). L'aérolysine (52 kDa) est la principale toxine étudiée chez *A. hydrophila*. Elle comprend quatre domaines distincts. Les domaines 1 et 2 ont des acides aminés

aromatiques essentiels à l'interaction avec le récepteur cellulaire. Le domaine 3, avec le domaine 2, est impliqué dans l'oligomérisation, alors que le domaine 4 porte la séquence C-terminale permettant l'activation de la toxine. La proaérollysine est activée par le clivage du peptide à son extrémité C-terminale par les protéases (trypsine, chymotrypsine et furine) présentes à la surface cellulaire des entérocytes (Abrami *et al.* 1998). La proaérollysine reconnaît avec une forte affinité les protéines transmembranaires exposant un glycosylphosphatidylinositol principalement localisées au niveau des radeaux lipidiques de la face apicale des entérocytes (Hong *et al.* 2002). La toxine s'insère sous la forme d'heptamère à ce niveau formant ainsi un pore de 1,7 nm de diamètre (Wilmsen *et al.* 1992). Le pore perméabilise la membrane au calcium et au potassium (Abrami *et al.* 2000). L'aérollysine provoque la libération du calcium des compartiments intracellulaires par l'activation d'une protéine G et la production d'inositol (1,4,5)-triphosphate. La proaérollysine induit une dépolarisation et un flux de potassium au travers du pore formé. La proaérollysine et l'aérollysine augmentent la concentration intracellulaire en calcium. L'aérollysine induit l'apoptose chez les lymphocytes T (Nelson *et al.* 1999).

L' α -toxine (ou α -hémolysine) de *S. aureus* est un peptide hydrosoluble de 33 kDa qui forme également de petits pores de 1,4 nm de diamètre (Song *et al.* 1996 ; Schiavo et Van der Goot 2001 ; Menestrina *et al.* 2003). La structure tridimensionnelle de la toxine α et de son pore a été déterminée par cristallographie (Song *et al.* 1996). Le pore est formé de trois domaines : le domaine « Cap » pour le chapeau, le domaine « Rim » pour la couronne,

le domaine « Stem » pour le pied. Le « Cap » est composé d'un sandwich de deux feuillets β antiparallèles et le « Stem » d'une structure en épingle à cheveux (transmembrane β hairpin) (Figure 9).

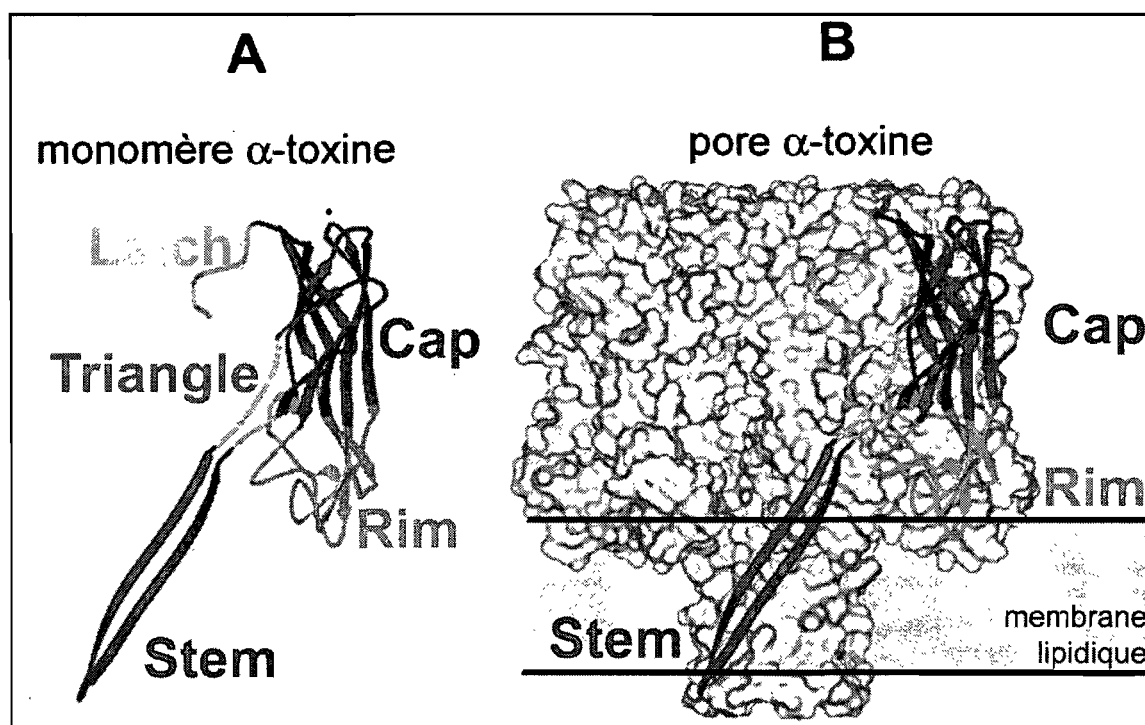


Figure 9. Structure tridimensionnelle de la toxine α de *Staphylococcus aureus*. A. Monomère de la toxine α B. Héptamère formant un pore. Adapté de Menestrina *et al.* (2003).

Le monomère reconnaît la phosphatidylcholine et le cholestérol à la surface de la membrane par l'intermédiaire du « Rim » (Song *et al.* 1996 ; Meunier *et al.* 1997 ; Ferreras *et al.* 1998). Le monomère expose entre le « Stem » et le core de la protéine les régions « Triangle » et « Latch ». Les régions « Latch » et « Triangle » permettent l'interaction

entre les monomères et la formation de l'heptamère (Song *et al.* 1996 ; Menestina *et al.* 2003). Les deux brins β de la structure en épingle à cheveux du domaine « Stem » change de conformation et permet l'insertion de la toxine dans la membrane. Le brin β hydrophobe interagit avec la bicouche lipidique et le brin hydrophile forme la lumière du pore. Ce changement de conformation fait apparaître une structure en tonneau de feuillets β , laquelle forme le canal transmembranaire du pore (Menestrina *et al.* 2003 ; Geny et Popoff 2006b).

L' α -toxine perméabilise la membrane cellulaire au potassium et au sodium, elle agit également au niveau des mitochondries où elle libère le cytochrome C et induit l'apoptose des cellules en culture (Bantel *et al.* 2001).

4.2.3. Les toxines RTX

Les toxines RTX portent ce nom en raison d'un motif répété de neuf acides aminés riches en glycine et en asparagine (UXGGXG(N/D)DX) à leur extrémité C-terminale, le U représentant un acide aminé hydrophobe. Ce motif est indispensable pour l'activité cytolytique, la fixation du calcium et l'attachement à la membrane cellulaire. Les toxines RTX ont trois domaines fonctionnels : 1) un domaine N-terminal hydrophobe indispensable à l'interaction avec la membrane et à la formation du pore ; 2) une région permettant la fixation d'acides gras également nécessaire à la formation du pore, et 3) le domaine C-terminal portant le motif répété qui permet la liaison du calcium et facilite la fixation aux acides gras (Geny et Popoff 2006a, 2006b). Les hémolysines produites par *E. coli*, *Proteus*

vulgaris, *Bordetella pertussis*, et les leukotoxines de *Pasteurella haemolytica* sont des exemples de toxines RTX.

L'alpha-hémolysine d'*E. coli* (HlyA) est la toxine RTX la plus connue. Le gène *hlyA* codant pour la toxine HlyA (110kDa) appartient à un opéron comprenant trois autres gènes (*hlyC*, *hlyB*, *hlyD*) codant pour des protéines impliquées dans la maturation et l'activation de la toxine. La toxine HlyA est sécrétée par un transporteur ABC composé des protéines HlyB (80 kDa), HlyD (55 kDa) et TolC (51,5 kDa) (Figure 10). HlyB et HlyD forment un complexe stable dans la membrane interne de la bactérie et permettent la sécrétion de la toxine. HlyB reconnaît une région C-terminale de 50-60 acides aminés de HlyA et hydrolyse l'ATP, ce qui permet le transfert de la toxine vers le périplasme. HlyD permet l'interaction de HlyA avec TolC et la sécrétion dans le milieu externe (Ludwig et Goebel 2006). HlyC est une enzyme qui active la toxine HlyA par le transfert d'un groupement acyle sur deux lysines (K564 et K690). L'acylation de la toxine augmente l'hydrophobicité requise pour la liaison du calcium à la région répétée et pour l'activité hémolytique (Stanley *et al.* 1998). La liaison au calcium provoque des changements de structure, permettant l'interaction plus intime de la protéine à la membrane et la formation du pore de 1 à 1,5 nm de diamètre (Geny et Popoff 2006a).

Les premières étapes de l'interaction de HlyA à la cellule ne sont pas bien connues. Cependant, de récentes études ont démontré que la région C-terminale de HlyA permettrait

la liaison à la glycophorine, une glycoprotéine transmembranaire des globules rouges (Cortajarena *et al.* 2001, 2003).

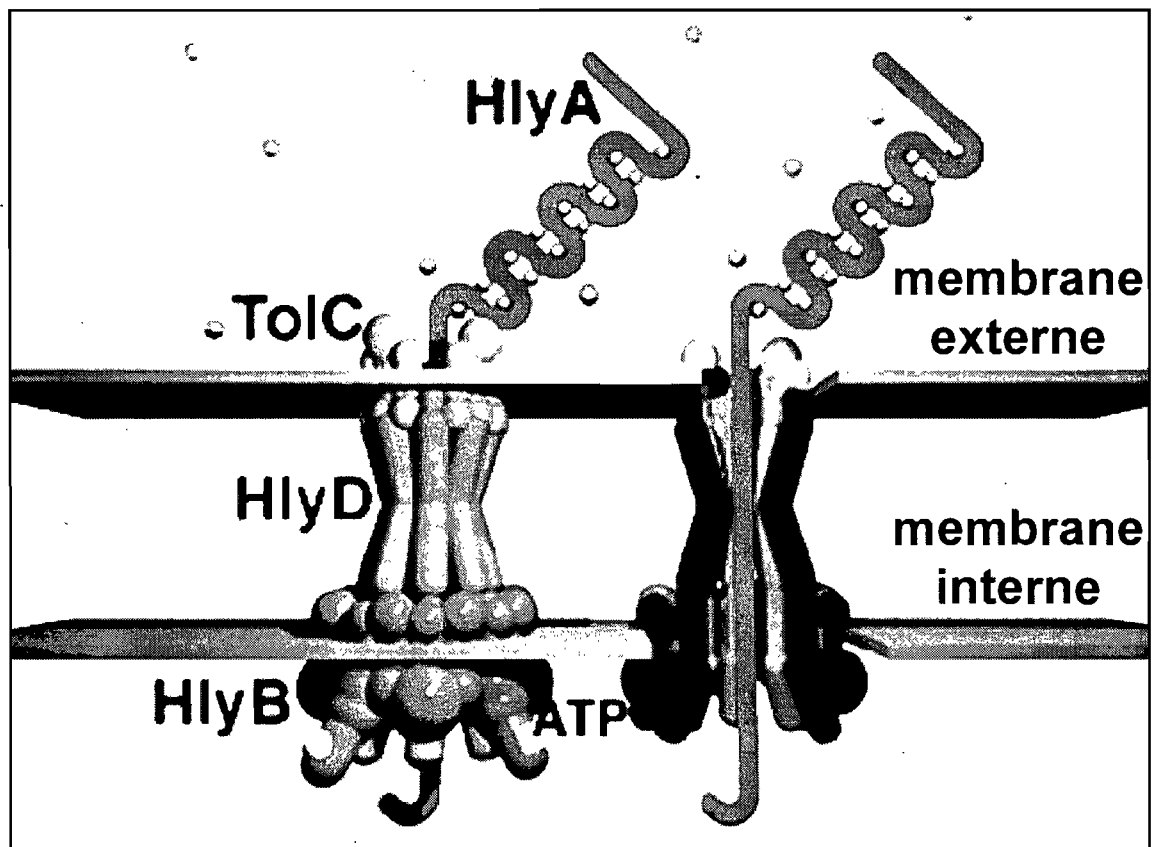


Figure 10. Voie de sécrétion de HlyA. Adapté de Zaitseva *et al.* (2005).

4.2.4. Mécanismes d'internalisation des toxines bactériennes

Différentes voies d'internalisation des toxines bactériennes ont été décrites. Les toxines suivent des mécanismes d'internalisation plus ou moins complexes. Lors de

l'internalisation rapide, les toxines sont endocytées puis, selon le pH des endosomes, le domaine enzymatique est activé et libéré dans le cytoplasme (Figure 11). Les toxines à plusieurs sous-unités suivent une voie d'internalisation plus longue. Elles sont internalisées vers l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique (Figure 12) (Schiavo et van der Goot 2001 ; Geny et Popoff 2006a ; Reig et van der Goot 2006).

Bacillus anthracis est responsable de la maladie du charbon. Sa virulence est le résultat de la production de deux toxines composées de trois protéines distinctes : l'antigène protecteur (PA, 83 kDa), le facteur oedématogène (EF, 89 kDa) et le facteur létal (LF, 83 kDa). La toxine oedématogène (TxEd) est composée de PA et EF et la toxine létale (TxLe) de PA et LF. Ces deux toxines sont des exemples de la voie d'internalisation rapide (Figure 11). La protéine PA permet le transport de LF et EF dans le cytoplasme. La protéine PA aurait pour récepteur les protéines TEM8 (Tumor Endothelium Marker 8) ou CMG2 (Capillary Morphogenesis Gene 2) (Bradley *et al.* 2001b ; Scobie *et al.* 2003). La protéine PA subit une protéolyse limitée par la furine qui libère un fragment de 20kDa (Klimpel *et al.* 1992). Les fragments de 63kDa (PA63) restent associés au récepteur et forment un heptamère. Celui-ci est reconnu par les protéines EF ou LF (Lacy *et al.* 2004 ; Santelli *et al.* 2004). Ce complexe est internalisé dans des vésicules recouvertes de clathrines et transportés vers les endosomes précoces (Abrami *et al.* 2004) (Figure 11). L'heptamère de PA63 libère la protéine LF dans le cytosol. La protéine LF est une métalloprotéase à zinc responsable de l'inactivation des MAPKK (Mitogen-Activated Protein

Kinases Kinases) (Duesbery *et al.* 1998 ; Vitale *et al.* 1998 ; Pellizzari *et al.* 1999). En revanche, la protéine EF reste associée à la membrane de la vésicule. EF a une activité adénylate cyclase activée par la calmoduline. Une fois dans le cytoplasme, elle permet la production d'AMPc (Leppla 1982, 1984).

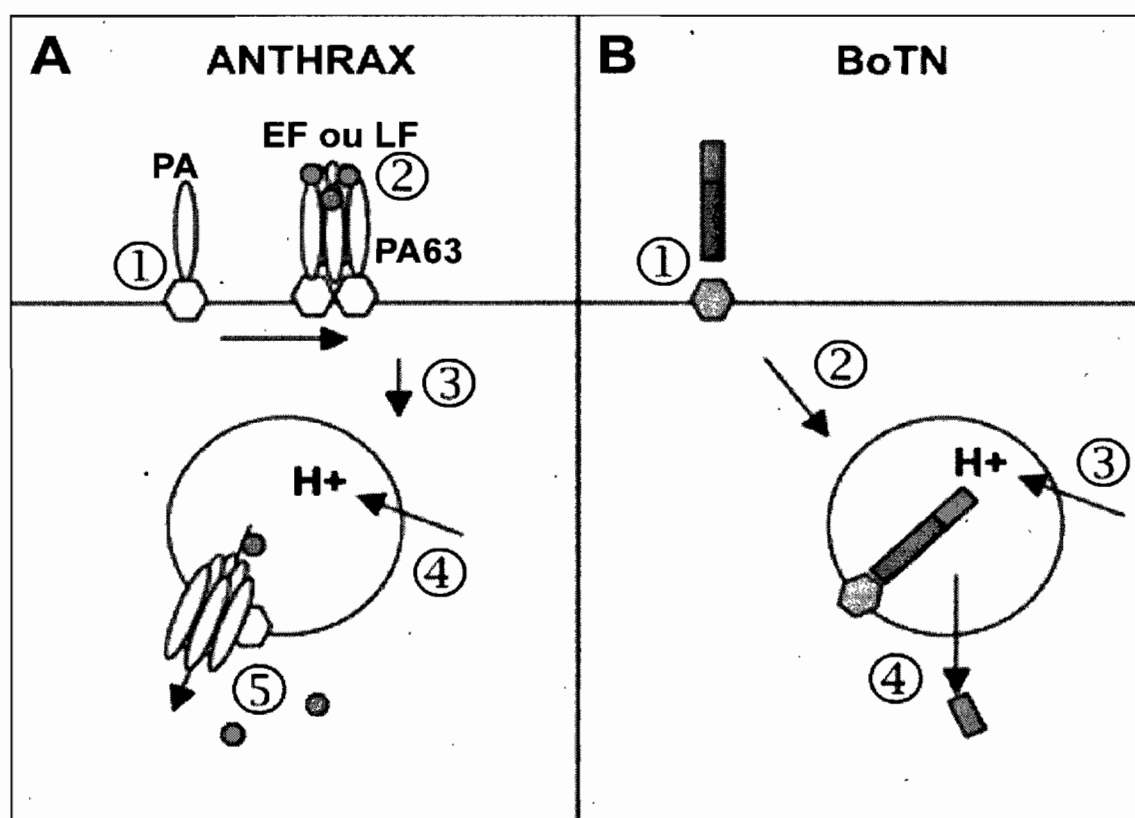


Figure 11. Voies simplifiées d'internalisation rapide des toxines bactériennes. A. Anthrax : (1) la protéine PA reconnaît le récepteur membranaire et (2) forme un oligomère reconnu par les protéines LF et EF. Le complexe est internalisé dans un endosome précoce (3) dont l'acidification (4) mène à libération de LF, la métallo-protéase à zinc (5). B. Toxine botulique : (1) Elle interagit avec des récepteurs lipidiques et protéiques puis est endocytée (2). L'acidification de l'endosome (3) conduit à l'oligomérisation et à la sécrétion du fragment porteur de l'activité métallo-protéasique à zinc (4). Adapté de Geny et Popoff (2006b).

Les neurotoxines clostridiales du botulisme sont un autre exemple d'internalisation rapide (Figure 11). La neurotoxine botulique de type C1 (BoNT/C1) est produite par *Clostridium botulinum* de sérotype C. Cette protéine (150 kDa) est clivée en deux fragments, L (50 kDa) et H (100 kDa), qui restent liés par un pont disulfure (Kriegelstein *et al.* 1994). Le fragment L porte l'activité métallo-protéasique à zinc, alors que le fragment H permet la liaison au récepteur (Lacy *et al.* 1998 ; Swaminathan et Eswaramoorthy 2000). Le fragment H comprend le domaine Hc qui permet la liaison à la membrane cellulaire, et le domaine Hn qui intervient dans la formation d'un canal ionique et la translocation du fragment L dans le cytoplasme (Donovan et Middlebrook 1986).

Lors d'une infection intestinale à *C. botulinum*, les toxines BoNTs sont sécrétées dans la lumière intestinale et sont endocytées rapidement. Ces toxines reconnaissent des gangliosides de la membrane apicale des entérocytes par l'intermédiaire du domaine Hc (Swaminathan et Eswaramoorthy 2000). Le complexe BoNT-récepteur est endocyté et transporté vers la membrane basolatérale des entérocytes. La toxine est sécrétée dans le milieu extracellulaire par exocytose et disséminée dans l'organisme par la circulation sanguine et le système lymphatique. Les toxines botuliques ont pour cibles les jonctions neuromusculaires où elles sont à nouveau endocytées (Marvaud *et al.* 2002 ; Poulain *et al.* 2006 ; Bohnert *et al.* 2006). Le domaine Hc interagit avec un ganglioside (Swaminathan et Eswaramoorthy 2000) et la synaptotagmine (Li et Singh 1998). La toxine internalisée subit des changements de conformation lors de l'acidification de l'endosome précoce. Le fragment H s'oligomérisse en tétramère, s'insère dans la bicouche lipidique et forme un

canal ionique. Le canal permet la translocation du fragment L dans le cytosol où il clive des protéines du complexe SNARE (Soluble NSF (N-ethyl-maleimide Sensitive Factor) Attachment Receptors) (Turton *et al.* 2002). Le complexe SNARE intervient dans l'exocytose des vésicules synaptiques contenant les neurotransmetteurs (Bajjalieh 1999). Le fragment L inhibe la libération de l'acétylcholine, ce qui se traduit par une paralysie musculaire (Maksymowych et Simpson 1998 ; Herreros et Schiavo 2001 ; Schiavo et van der Goot 2001).

Les toxines Shiga, la toxine CT de *V. cholerae* et les toxines LT d'*E. coli* présentent une structure de type AB₅ et une voie d'internalisation plus longue, appelée le transport rétrograde (Lencer *et al.* 1995 ; Sandvig et van Deurs 2002). La toxine Shiga (Stx) est le premier exemple décrit de toxine faisant appel au transport rétrograde (Sandvig *et al.* 1992). La toxine Shiga produite par *Shigella dysenteriae* et les toxines Shiga de type 1 et 2 produites par *E. coli* appartiennent à la même famille de « shigatoxines ». La toxine Shiga comprend la sous-unité StxA (32 kDa) et la sous-unité StxB (7,7 kDa) (O'Brien et Holmes 1987). StxB forme le pentamère qui permet l'interaction au glycosphingolipide Gb3 présent dans la membrane cellulaire. La toxine Stx est endocytée dans des vésicules recouvertes de clathrines. Le transport de Stx dans la cellule se poursuit des endosomes précoces vers le réseau trans-golgien, l'appareil de Golgi et finalement dans le réticulum endoplasmique où l'activité toxique est observée. StxB est recyclée à la surface de la cellule, alors que la sous-unité StxA est scindée en deux fragments : A1 et A2. Le fragment A1, portant l'activité N-glycosidase, est transféré dans le cytoplasme. Il clive spécifiquement l'ARN ribosomique

28S ce qui inhibe la synthèse protéique (Figure 12) et entraîne la mort cellulaire (Lea *et al.* 1999). Stx induit également l'apoptose en causant des dommages au niveau de la membrane mitochondriale, en libérant le cytochrome C et en réduisant le potentiel de membrane mitochondriale (Fujii *et al.* 2003).

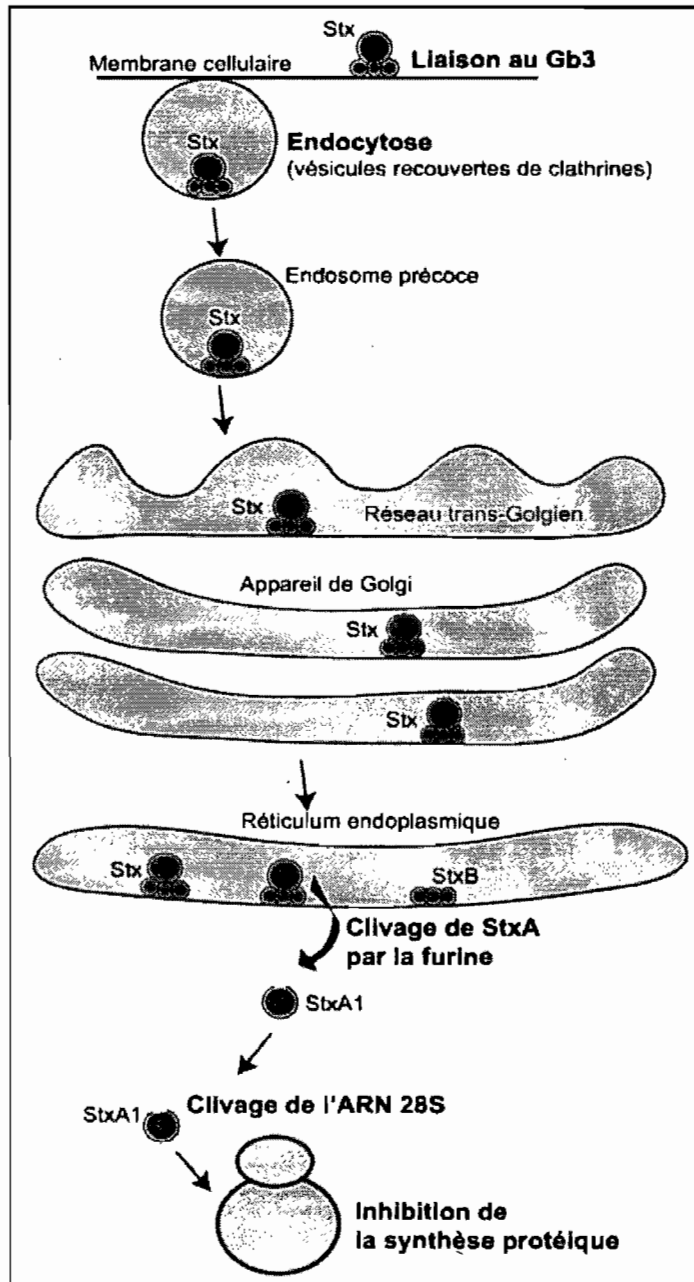


Figure 12. Transport rétrograde de la toxine Stx. Adapté de Paton *et al.* (2006).

Dans le cas de la CT, le pentamère (B₅) interagit avec le ganglioside GM1 à la surface des cellules épithéliales (Lauer *et al.* 2002 ; De Haan et Hirst 2004). La toxine CT est internalisée au niveau des radeaux lipidiques (Nichols et Lippincott-Scwartz 2001 ; Fujinaga *et al.* 2003). La toxine CT utilise différentes voies d'internalisation (voies dépendante et indépendante de la clathrine, voie des caveolae, voie indépendante de la dynamine et de la clathrine). Le transport de la toxine CT vers l'appareil de Golgi est principalement dû aux endosomes à cavéoline-1 et est indépendant de la clathrine (Lencer *et al.* 1995 ; Lencer et Tsai 2003 ; Reig et van der Goot 2006). La sous-unité A subit une protéolyse et la réduction du pont disulfure qui maintient les domaines A1 et A2 ensemble (Lai *et al.* 1981). Le domaine A1 ADP-ribosyle les protéines G au niveau de la sous-unité G_{sα} (De Haan et Hirst 2004). La présence du motif KDEL à l'extrémité C-terminale du domaine A2 permet le transport de la toxine CT du Golgi vers le réticulum endoplasmique (Lencer *et al.* 1995 ; Lord et Roberts 1998). Une cascade d'événements intracellulaires conduit à l'ouverture du canal CFTR puis à une sécrétion d'eau et de chlore (Van den Broeck *et al.* 2007).

L'adénylate cyclase (CyaA, 177 kDa) de *Bordetella pertussis* ne s'internalise pas comme les précédents exemples. Cette toxine est capable de traverser directement la membrane cellulaire. La CyaA appartient à la famille des toxines RTX. Elle est sécrétée selon le modèle de l'hémolysine HlyA déjà décrit (Koronakis *et al.* 2004). La toxine CyaA est organisée en deux domaines : le domaine enzymatique (400 acides aminés) et le domaine hémolytique (1 300 acides aminés) (Glaser *et al.* 1988). Le domaine hémolytique

se lie au récepteur de l'intégrine CD11b/CD18 (El-Azami-El-Idrissi *et al.* 2003) et forme un pore de 0,6 à 0,8 nm de diamètre. Ce pore permet le transport du domaine enzymatique dans le cytosol (Benz *et al.* 1994 ; Iwaki *et al.* 1995). La fonction adénylate cyclase est activée par la calmoduline et entraîne l'accumulation d'AMPc dans le cytoplasme de la cellule cible (Masin *et al.* 2006 ; Geny et Popoff 2006a).

4.2.5. Toxines agissant sur la mitochondrie

La mitochondrie est un organe essentiel dans l'homéostasie cellulaire (Figure 13). Elle possède une deux membranes dont la composition et la fonction diffère. La membrane externe renferme la porine VDAC (Voltage Dependent Anion Channel) et la famille des translocases TOM (Translocases of the Outer Membrane) qui permettent les transports ioniques et protéiques entre le cytosol et l'espace intermembranaire (Wiedemann *et al.* 2004 ; Shoshan-Barmatz *et al.* 2006). La translocase ANT (Adenine Nucleotide Translocase) et la famille de protéines TIM (translocases of the inner membrane) de la membrane interne permettent les échanges entre l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale (Wiedemann *et al.* 2004 ; Tsujimoto et Shimizu 2007). Ancrée dans la membrane interne, la chaîne respiratoire permet la synthèse de l'ATP. La mitochondrie intervient aussi dans le stockage et la régulation de la concentration en calcium intracellulaire (Duszyński *et al.* 2006).

La mitochondrie joue un rôle clé dans le contrôle de l'apoptose. L'ouverture de pores perméabilisent les membranes mitochondriales et provoquent une transition de la

perméabilité des membranes qui se caractérise par la libération du calcium dans le cytosol, la chute de potentiel transmembranaire et l'arrêt de la phosphorylation oxydative. La libération de protéines apoptogènes (cytochrome C, caspases 3 et 9, facteur AIF) est sous le contrôle de protéines anti-apoptotiques (famille des protéines bcl2) (Mignotte et Vayssiere 1998 ; Kroemer et Reed 2000 ; Chalah et Khosravi-Far 2008).

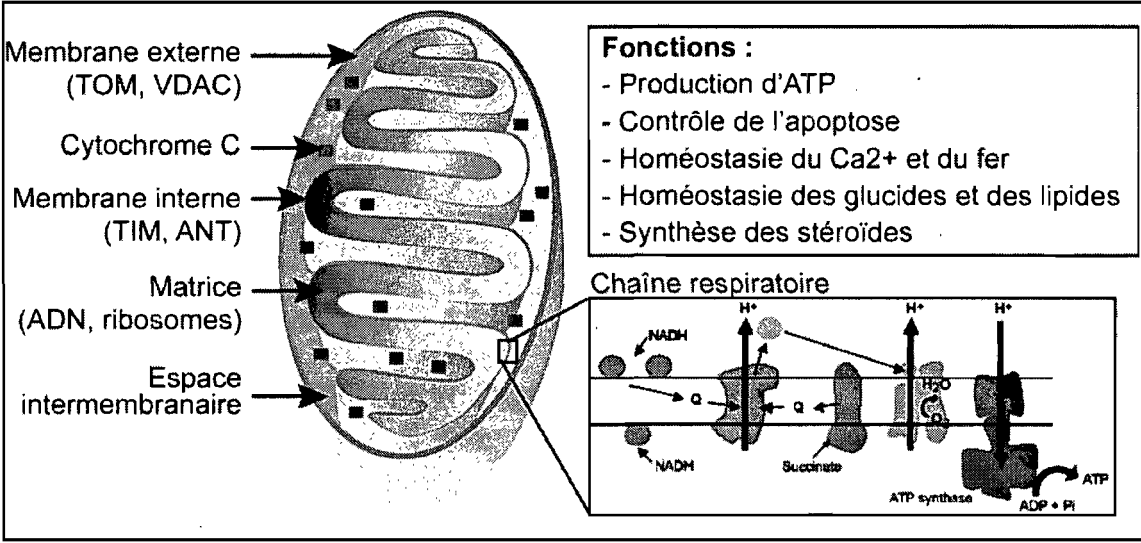


Figure 13. Structure simplifiée et fonctions générales de la mitochondrie. La membrane externe renferme la porine VDAC (Voltage Dependent Anion Channel) et la famille des translocases TOM (Translocases of the Outer Membrane). La translocase ANT (Adenine Nucleotide Translocase), la famille de protéines TIM (translocases of the inner membrane) et la chaîne respiratoire sont quant à elles ancrées dans la membrane interne.

Certaines toxines bactériennes ont pour cible la mitochondrie (Tableau 3). Ces toxines affectent la mitochondrie selon des mécanismes qui ne sont pas toujours bien caractérisés. Elles provoquent, entre autres, la chute du potentiel membranaire, la déplétion de l'ATP, la libération du cytochrome c et l'activation des caspases. Ces événements sont à

l'origine de la mort cellulaire programmée, l'apoptose. Cette section décrit les toxines affectant l'activité mitochondriale.

Tableau 3 : Toxines bactériennes agissant sur les mitochondries. (Adapté de Galmiche et Boquet 2006).

Toxines bactériennes agissant sur les mitochondries		
Toxines	Bactéries	Références
PorB	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Müller <i>et al.</i> 2000 ; Müller <i>et al.</i> 2002
	<i>Neisseria meningitidis</i>	Massari <i>et al.</i> 2000 ; Massari <i>et al.</i> 2003a ; Massari <i>et al.</i> 2003b
Toxine α	<i>Staphylococcus aureus</i>	Bantel <i>et al.</i> 2001
Toxine A	<i>Clostridium difficile</i>	He <i>et al.</i> 2000 ; He <i>et al.</i> 2002
Toxine B	<i>Clostridium difficile</i>	Fiorentini <i>et al.</i> 1998 ; Matarrese <i>et al.</i> 2007
Toxine létale	<i>Clostridium sordellii</i>	Petit <i>et al.</i> 2003
VacA	<i>Helicobacter pylori</i>	Galmiche <i>et al.</i> 2000 ; Whillhite et Blanke 2004
Céréulide	<i>Bacillus cereus</i>	Hughes <i>et al.</i> 1998 ; Kotiranta <i>et al.</i> 2000 ; Andersson <i>et al.</i> 2007

Les porines PorB produites par *Neisseria gonorrhoeae* et *Neisseria meningitidis* présentent 70% d'homologie de séquence. PorB produite par *N. gonorrhoeae* induit l'apoptose des cellules épithéliales en culture (Müller *et al.* 1999). La porine PorB est le résultat de l'assemblage de trois monomères de 37 kDa. La porine forme une structure en tonneau β qui présente des propriétés similaires à la porine VDAC (Rudel *et al.* 1996). PorB perméabilise la membrane cellulaire (Derrick *et al.* 1999) mais sa cible principale est la mitochondrie. La porine PorB reconnaît TOM20, s'insère dans la membrane externe et interagit avec ANT. Ce point de contact entre les deux membranes provoque une transition de la perméabilité mitochondriale. Cette transition est responsable du changement de

polarité de la membrane interne et du gonflement de la matrice mitochondriale (Müller *et al.* 2000, 2002). PorB induit également l'apoptose en libérant le cytochrome c dans le cytosol (Müller *et al.* 1999, 2000).

À l'opposé de la porine de *N. gonorrhoeae*, la porine PorB produite par *N. meningitidis* n'induit pas l'apoptose, même si elle a pour cible la mitochondrie (Massari *et al.* 2000, 2003a). Elle reconnaît la porine VDAC à la surface de la membrane externe (Massari *et al.* 2000) et agit comme un agent anti-apoptotique qui favorise la survie de la cellule (Massari *et al.* 2000, 2003b).

Les cytotoxines produites par *C. difficile* et *C. sordellii* font partie d'une même famille de toxines (Just et Gerhard 2004). Elles ont une activité glucosyltransférase et modifient les petites GTPases de la famille Rho (Boquet et Lemichez 2003). Elles ont également pour cible la mitochondrie et induisent l'apoptose. La cytotoxine CDTa sécrétée par *C. difficile* diminue la production d'ATP et libère le cytochrome c (He *et al.* 2000, He *et al.* 2002). La toxine CDTb de *C. difficile* agit sur la membrane interne et provoque une hyperpolarisation de la membrane (Fiorentini *et al.* 1998 ; Matarrese *et al.* 2007). La toxine létale de *C. sordellii* libère aussi du cytochrome c dans le cytoplasme mais provoque aussi une transition de la perméabilité mitochondriale (Petit *et al.* 2003).

Bacillus cereus produit la céréulide, une toxine responsable du syndrome émétique. La contamination du riz, des nouilles, des pâtes et des pâtisseries par *B. cereus* provoque

des intoxications alimentaires (Ehling-Schulz *et al.* 2004). La toxine émétique est un peptide (1,2 kDa) particulièrement stable qui est insensible aux traitements à la trypsine et la pepsine, aux pH de 2 à 11 et à un traitement de 121°C pendant 90 minutes (Kotiranta *et al.* 2000). Sa structure et son activité sont proches de celle de la valinomycine, un ionophore du potassium (Agata *et al.* 1995 ; Mikkola *et al.* 1999). La toxine émétique provoque une perte de mobilité des spermatozoïdes de verrats (Andersson *et al.* 2004 ; Rajkovic *et al.* 2006), des modifications morphologiques et à la vacuolisation des cellules HEP-2 (Hughes *et al.* 1998 ; Andersson *et al.* 2007). Ces vacuoles correspondent à un gonflement des mitochondries. La toxine émétique provoque la formation d'un canal ionophore au travers de la membrane mitochondriales, ce qui bloque la phosphorylation oxydative (Kotiranta *et al.* 2000).

La toxine vacuolisante VacA (95 kDa) est sécrétée par *Helicobacter pylori* dans l'estomac (Cover et Blanke 2005). Elle contribue au développement des ulcères et à l'adénocarcinome gastrique associé à *H. pylori* (Telford *et al.* 1994). Après sécrétion, VacA est protéolysée en deux sous-unités de 34 kDa (p34 – N-terminal) et 58 kDa (p58 – C-terminal) (Papini *et al.* 2001). Son récepteur est le récepteur tyrosine phosphatase α (RTP α). Il permet l'insertion de la toxine au niveau des radeaux lipidiques (Patel *et al.* 2002 ; Yahiro *et al.* 2003 ; Gauthier *et al.* 2004). VacA forme un hexamère et perméabilise la bicouche lipidique par la formation d'un pore. Celui-ci est sélectif aux anions et en particulier au chlore (Szako *et al.* 1999 ; Papini *et al.* 2001). La toxine est endocytée et

induit la formation de vacuoles aux dépens des compartiments endosomiques tardifs (Leunk *et al.* 1988 ; Papini *et al.* 1994 ; Gauthier *et al.* 2004) (Figure 14).

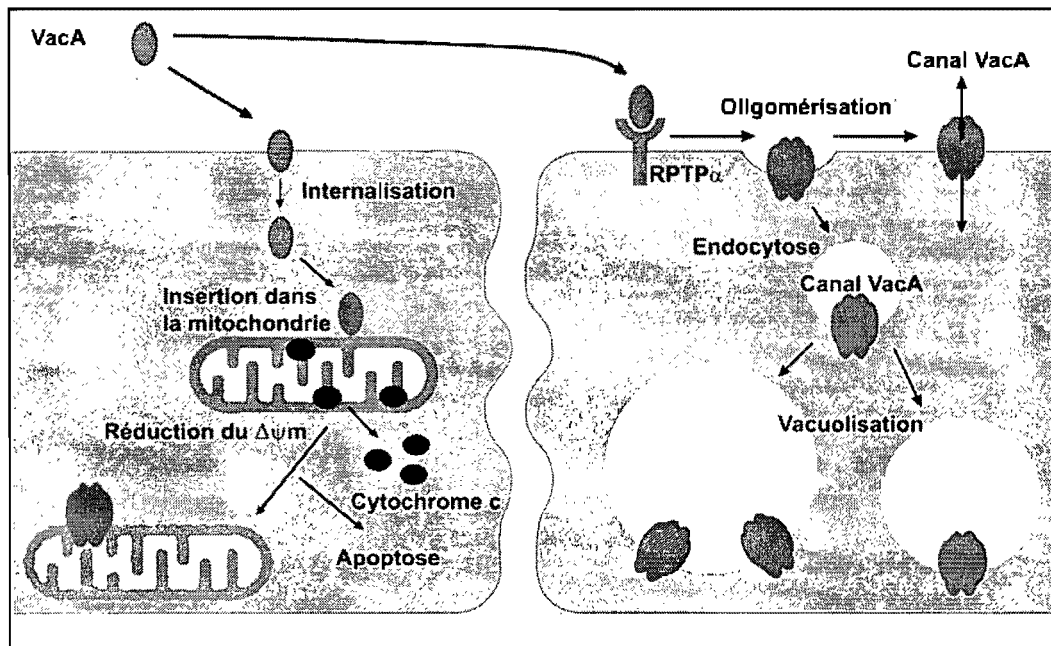


Figure 14. Mécanisme d'action de la toxine VacA d'*Helicobacter pylori*. VacA réduit le potentiel membranaire ($\Delta\Psi_m$) et libère le cytochrome C qui sont à l'origine de l'apoptose. VacA interagit avec RPTP, perméabilise la membrane cellulaire et forme des vacuoles. Adapté de Cover et Blanke (2005).

Introduit dans les cellules HeLa par transfection, le domaine p34 entre dans les mitochondries et induit l'apoptose (Galmiche *et al.* 2000). VacA est importée dans la membrane interne ou la matrice mitochondriale (Galmiche *et al.* 2000). Le canal anionique VacA endommage la mitochondrie, ce qui entraîne la chute du potentiel membranaire et celle de la production d'ATP (Kimura *et al.* 1999). VacA provoque aussi la libération du cytochrome c dans le cytosol et l'activation des caspases 3 (Willhite *et al.* 2003 ; Nakayama

et al. 2004). Ces événements sont à l'origine de l'apoptose (Kuck *et al.* 2001 ; Cover *et al.* 2003) (Figure 14).

Ces toxines bactériennes affectent la perméabilité de la membrane cytoplasmique et des membranes mitochondriales, conduisant à diverses perturbations de l'activité mitochondriale et à la mort cellulaire.

5. Objectifs de l'étude

Comme décrit en détail dans les sections précédentes, l'entérotoxine STb provoque la sécrétion de fluide dans la lumière intestinale et entraîne des altérations histologiques de la muqueuse intestinale.

L'interaction de STb à la membrane des cellules des entérocytes est une étape cruciale dans la pathogénèse de STb. Le sulfatide, un glycosphingolipide présent à la surface des cellules épithéliales, est reconnu comme le récepteur fonctionnel de STb (Rousset *et al.* 1998a). Les études qui ont comparé l'affinité de STb pour des glycosphingolipides autres que le sulfatide n'ont pas permis de rejeter une éventuelle interaction de la toxine avec différents récepteurs (Beausoleil *et al.* 2002b). En effet, STb se lie aux galactoses et aux glucoses sulfatés exposés à la surface cellulaire par les lactocéramides et les glucocéramides (Beausoleil et Dubreuil 2001). De plus, l'étape de liaison au sulfatide semble essentielle à son activité toxique (Rousset *et al.* 1998b). L'inhibition de cette liaison annihile l'activité de la toxine STb. Le premier objectif de cette

étude est d'élucider les interactions entre STb et certains glycosphingolipides présents dans la membrane cellulaire.

La capacité de STb à s'oligomériser (Labrie *et al.* 2001a) ainsi que les propriétés hydrophobes de la toxine (Sukumar 1995) laissent à penser que celle-ci pourrait s'insérer dans la membrane cellulaire. De plus, STb perméabilise la membrane de cellules en culture (Beausoleil *et al.* 2002a) et semble affecter la perméabilité des membranes lipidiques artificielles (Labrie *et al.* 2001c). Ces données permettent d'émettre l'hypothèse que STb formerait un pore dans la membrane lipidique des cellules épithéliales. Le second objectif de cette étude est donc de caractériser la capacité de STb à perméabiliser la membrane des cellules épithéliales du jéjunum porcin.

Le mécanisme d'action de STb comprend une voie intracellulaire complexe qui induit entre autres la production de différents sécrétagogues (PGE₂ et 5-HT) et l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire. L'internalisation de STb a été décrite dans deux modèles d'études, soit dans des cellules en culture (Chao et Dreyfus 1997, 1999) et des anses intestinales ligaturées de rat (Labrie *et al.* 2002). Cependant, ces études n'ont pas permis d'établir les conséquences de l'internalisation dans le mécanisme d'action intracellulaire. Notre dernier objectif est donc de déterminer les implications de l'internalisation de STb au niveau de la cascade intracellulaire.

Cette étude porte principalement sur deux étapes du mécanisme d'action de l'entérotoxine STb : son interaction à la membrane cellulaire et l'impact de son activité toxique au niveau intracellulaire.

MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS

ARTICLE 1

**The *Escherichia coli* Enterotoxin STb Permeabilizes Piglet
Jejunal Brush Border Membrane Vesicles**

Carina Gonçalves, Vincent Vachon, Jean-Louis Schwartz et J. Daniel Dubreuil

Publié dans :

2007, *Infection and Immunity* **75**: 2208–2213

Introduction

STb reconnaît un glycosphingolipide, le sulfatide, à la surface de la membrane des entérocytes de jéjunum porcine (Rousset et al. 1998a). Les propriétés hydrophobes de STb contribuent à la formation d'heptamères et d'hexamères (Labrie et al. 2001a). De plus, STb perméabilise la membrane des cellules en culture au bleu de trypan (Beausoleil et al. 2001) ainsi que des bicouches lipidiques artificielles. L'objectif de cet article est de caractériser la capacité de STb à perméabiliser la membrane des cellules épithéliales du jéjunum porcine.

Nous avons choisi le modèle des vésicules de membrane à bordure en brosse (VMBB) préparées à partir du tissu épithélial de jéjunum de porcelet. Ces VMBB sont enrichies en lipides et protéines de la membrane apicale des entérocytes. Ce modèle permet de contrôler de nombreux paramètres tels que la composition ionique de part et d'autre de la membrane mais aussi de stimuler un potentiel de membrane. Les échanges ioniques à travers la membrane vésiculaire ont été observés et mesurés au moyen d'une sonde sensible au potentiel de membrane, l'iodure de 3,3'-dipropylthiadicarbocyanine. Le potentiel de membrane a été engendré par un efflux d'ions potassium en présence de valinomycine, un ionophore du potassium. Nous avons ainsi étudié l'effet de STb sur le potentiel de membrane des vésicules en présence de différentes solutions ioniques et à différents pH. Deux mutants précédemment décrits comme peu actifs (M42S et K22A-K23A) ainsi que la toxine réduite/alkylée ont été également utilisés comme témoins dans cette étude.

The *Escherichia coli* Enterotoxin STb Permeabilizes Piglet Jejunal Brush

Border Membrane Vesicles

Carina Gonçalves,¹ Vincent Vachon,² Jean-Louis Schwartz,² and J. Daniel Dubreuil^{1*}

Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Quebec, J2S 7C6,¹ and Groupe d'Étude des Protéines Membranaires, Université de Montréal, Montreal, Quebec, H3C 3J7,² Canada

Running title: Membrane permeabilizing ability of STb

*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 Street, Saint-Hyacinthe, Quebec, J2S 7C6, Canada. Phone: (450) 773-8521 ext. 18433. Fax: (450) 778-8108. E-mail:

████████████████████

The membrane permeabilizing ability of the *Escherichia coli* enterotoxin STb was evaluated using brush border membrane vesicles isolated from piglet jejunum and a membrane potential-sensitive fluorescent probe, 3,3'-dipropylthiadicarbocyanine iodide. A strong membrane potential was generated by the efflux of K^+ ions from the vesicles in the presence of the potassium ionophore valinomycin. Under these conditions, pre-incubation of the vesicles with STb efficiently depolarized the membrane in a dose-dependent and saturable manner. This activity was independent of pH, however, at least between pH 5.5 and 8.0. On the other hand, in the absence of valinomycin, STb had no significant influence on the measured fluorescence levels, indicating that it was unable to modify the ionic selectivity of the intact membrane. In agreement with the fact that the integrity of the disulfide bridges of STb is known to be essential for its biological activity, a reduced and alkylated form of the toxin was unable to depolarize the membrane, in the presence of valinomycin. Furthermore, two previously described poorly active STb mutants, M42S and K22A-K23A, showed no membrane permeabilizing capacity. These results demonstrate for the first time that STb can permeabilize its target membrane and suggest that it does so by forming non-specific pores.

Enterotoxigenic *Escherichia coli* strains cause severe diarrhea in humans and animals. In large-scale farms, this disease brings about significant losses in pig herds mainly in newborn and recently weaned animals (29). Diarrhea depends on the production of a variety of toxins belonging to two different groups, the heat-labile toxins (LT I and LT II) and the heat-stable toxins (STa and STb). The heat-stable enterotoxins share no homology and appear to differ in their mechanisms of action (11, 12). STb is synthesized as a 71-amino acid precursor which undergoes cleavage of its signal sequence of 23 residues (24). A nuclear magnetic resonance study revealed that STb is composed of two anti-parallel α -helices connected by a glycine-rich loop (39). Its tertiary structure is stabilized by two disulfide bridges (Cys10-Cys48 and Cys21-Cys36) (9) and both bridges are necessary for secretion and toxicity (2, 9, 30).

Until now, the interaction of STb with the intestinal epithelium has not been studied in detail. An acidic glycosphingolipid, sulfatide [Gal(3-SO₄) β 1Cer], has nevertheless been identified as a functional receptor for STb at the level of the luminal surface of pig jejunal epithelial cells (34). The fact that this toxin is composed of an amphipathic (Cys10-Lys22) and a hydrophobic (Gly38-Ala44) α -helix suggests it could possibly insert into the cell membrane and form a pore. This possibility is further suggested by our recent demonstration that STb undergoes oligomerization in vitro (26), a process which constitutes a well-documented characteristic of many pore-forming bacterial toxins (1) and antimicrobial peptides (44).

In the present study, the ability of STb to permeabilize brush border membrane vesicles isolated from piglet jejunum was demonstrated using a fluorescent membrane potential-

sensitive probe, 3,3'-dipropylthiadicarbocyanine iodide (diS-C₃(5)), and a procedure which was recently developed to study the properties of bacterial pore-forming toxins in membrane vesicles (23).

MATERIALS AND METHODS

Purification of STb. Unless specified otherwise, all chemicals were from the Sigma Chemical Co. (Oakville, Ont.). The method used to prepare wild-type and mutated (M42S and K22A-K23A (25)) STb toxins was modified from a previously described protocol (7). An *E. coli* HB101 strain harbouring the plasmid pMal-STb, responsible for the expression of a maltose-binding protein-mature STb fusion protein, with or without the selected mutation, was grown in Luria broth containing 50 µg/ml ampicillin until the OD₆₀₀ reached 0.5. Then, 0.3 mM isopropylthiogalactoside was added to induce the synthesis of the fusion protein. Three hours after induction, cells were harvested by centrifugation at 4 000 x g for 10 min at 4°C. The pellet was gently re-suspended in 500 ml of 30 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 20% (w/v) sucrose and 1 mM EDTA. After centrifugation at 8 000 x g for 10 min at 4°C, the cells were re-suspended in 500 ml of 5 mM MgSO₄ and incubated at 4°C for 10 min. Following centrifugation at 8 000 x g for 10 min at 4°C, the fusion protein was affinity-purified, from the supernatant representing the osmotic shock fluid, using an amylose resin (New England Biolabs, Pickering, Ont.). The amylose-purified fusion protein was dialyzed against Xa buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5)–100mM NaCl–1mM CaCl₂) and

then cleaved with protease factor Xa (GE Healthcare, Baie d'Urfé, Que.). The cleaved material was loaded on a C₈ reverse phase microbore column (Applied Biosystems, Foster City, CA) using an Äkta Purifier10 system (GE Healthcare) and eluted with a linear gradient of acetonitrile (5-100%) in a water solution containing 0.1% trifluoroacetic acid. Wild-type and mutant STb preparations were quantified at 214 nm using aprotinin as the reference. The purified STb toxin was lyophilized and kept at -20°C until use. The identity and purity of the toxin was verified by N-terminal sequence analysis using Edman degradation (Model 494 CLC Procise Sequencer, Applied Biosystems) as described earlier (28).

Preparation of reduced and alkylated STb. Purified STb toxin was modified by reduction and alkylation with the method described by William et al. (42). Briefly, STb was reduced with 45 mM dithiothreitol in 100 mM NH₄HCO₃ at 60°C for 30 min and alkylated with 100 mM iodoacetamide in 100 mM NH₄HCO₃ for 30 min at room temperature in the dark. The reduced and alkylated STb toxin was dialyzed (membrane cut-off of 3.5 kDa) against 50 mM NH₄HCO₃ (pH 8.5) for 2 hours and against water for another 2 hours.

Preparation of brush border membrane vesicles. Four-week-old weaned piglets from a conventional herd were obtained from a local producer. The animals were killed the same day as they arrived at the university. In the meantime, they were cared for in accordance with the Guidelines of the Canadian Council for Animal Care. They were sedated by intramuscular injection of a mixture of 10 mg per kg body weight of ketamine hydrochloride (Biomed-MTC, Cambridge, Ont.) and 20 mg per kg body weight of xylazine (Bayer, Toronto, Ont.). Euthanasia was carried out by an intracardiac injection of

540 mg/ml of sodium pentobarbital (Pharmacy, Faculté de médecine vétérinaire, Saint-Hyacinthe) and 30 cm of jejunum were recovered, rinsed thoroughly with ice-cold physiological buffer, and stored at -80°C until use.

Brush border membrane vesicles were prepared with a modification of the MgCl_2 -precipitation method (18). All manipulations were carried out on ice or in a centrifuge refrigerated at 4°C . Frozen jejunum segments were thawed and scraped using a spatula, weighed and homogenized in 50 mM mannitol–5 mM EGTA–2 mM Tris-HCl (pH 7.0) (20 ml for each g of tissue). The mixture was stirred for 10 min after addition of MgCl_2 to a final concentration of 10 mM and centrifuged at $7\,700 \times g$ for 15 min. The supernatant was centrifuged for 30 min at $20\,000 \times g$. The pellet was re-suspended in 250 mM KCl–125 mM mannitol–0.1 mM MgSO_4 –50 mM Tris-HEPES (pH 7.5). The preparation was then centrifuged for 15 min at $1\,900 \times g$ and the resulting supernatant was centrifuged for 15 min at $30\,900 \times g$. The final membrane preparation was re-suspended in 250 mM KCl–0.1 mM MgSO_4 –50 mM MES (morpholineethanesulfonic acid)-Tris (pH 5.8) and stored at -80°C until use. In preparation for the experiments, the vesicles were diluted to 2.0 mg protein/ml with this same solution.

Protein concentrations were estimated with the BCA^{TM} protein assay kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) and bovine serum albumin as the standard. Leucine aminopeptidase activity, assayed with L-leucine *p*-nitroanilide as the substrate (16), was enriched 10-fold ± 1 (average of 7 independent preparations) relative to the epithelium homogenate.

Fluorescence measurements. The membrane permeabilizing effects of STb were monitored with a membrane potential-sensitive fluorescent probe, diS-C₃(5) (Molecular Probes, Eugene, OR) (23). Experiments were carried out at room temperature in polystyrene cuvettes containing 1.5 μM of diS-C₃(5), from a 1 mM stock solution in dimethyl sulfoxide, in 2 ml of the appropriate buffer solution, using a Spex Fluorolog CM-3 spectrofluorometer (Jobin Yvon Horiba, Edison, NJ) at a frequency of 10 Hz, an excitation wavelength of 620 nm and an emission wavelength of 670 nm. Before each experiment, the mixture was stirred for 10 min in the dark to allow fluorescence to reach a steady level (22, 36). Vesicles were pre-incubated 15 min in the presence or absence of STb at room temperature. A few seconds after the beginning of the recording, vesicles were injected into the cuvette at a final concentration of 5 μg protein/ml. In some experiments, 7.5 μM of valinomycin was added to the cuvette from a 5 mM stock solution in ethanol. Fluorescence values were normalized relative to the level measured before addition of the vesicles. For each experimental condition tested, the fluorescence level was measured in the absence of a membrane potential by injecting vesicles into the same solution as that with which they were loaded.

Statistical analyses. Unless specified otherwise, values presented in the text and figures are means \pm standard error of the mean (S.E.M.). Statistical analyses were carried out using the linear model of the SAS package (Version 9.0, SAS Institute, Cary, NC). We also performed a priori contrasts to examine differences between levels of the different factors.

RESULTS AND DISCUSSION

Generation and reduction of a membrane potential in piglet jejunal brush border membrane vesicles. The membrane permeabilizing ability of STb was analyzed with a fluorescence assay (23) using diS-C₃(5), a membrane potential-sensitive probe (40). In this assay, vesicles loaded with 250 mM KCl and pre-incubated with or without STb were first injected in the presence of the fluorescent probe and the potassium ionophore valinomycin into cuvettes containing the same solution as that with which they were loaded (Fig. 1). This procedure allowed the measurement of the fluorescence level in the absence of ionic gradients and therefore in the absence of a membrane potential. The slight decrease in fluorescence was due to the association of some of the fluorescent probe with the membrane vesicles. Under these conditions, STb had no influence on the fluorescence level attained after the injection, an indication that the toxin does not interact directly with the probe. When vesicles were injected into cuvettes in which the KCl solution was replaced by an isotonic solution of N-methyl-D-glucamine hydrochloride, fluorescence decreased to a much greater extent, indicative of the presence of an inside-negative membrane potential generated by the preferential efflux of potassium ions induced by valinomycin. The resulting concentration and aggregation of the positively charged probe within the vesicles and their membranes caused a strong quenching of the fluorescence (33, 36, 41). The fact that a strong membrane potential can be generated under these conditions in the presence of valinomycin demonstrates that the vesicles used in the present study were tightly sealed. In

the presence of STb, less quenching of the fluorescence signal, indicative of a lower membrane potential, demonstrated an increased permeability of the membrane to at least one of the other ions present, N-methyl-D-glucamine and chloride.

Calibration of the fluorescence signal. Relative fluorescence measured in the presence of valinomycin varied as a sigmoid-like function of the logarithm of the intravesicular and extravesicular potassium concentration ratio (Fig. 2). This result deviates from the linear relationship predicted by the Nernst equation, although a straight line can be fitted reasonably well to the data for ratios of 1 to approximately 10. At higher concentration ratios, however, the slope of the curve increases sharply before starting to level off gradually as predicted by the Goldman-Hodgkin-Katz equation which, in contrast with the Nernst equation, takes into account the permeability of the membrane to each of the ionic species present (19). The fact that the calibration curve is not linear indicates a complex relationship between fluorescence, membrane permeability and membrane potential. Non-linear relationships have nevertheless been reported for experiments performed with diS-C₃(5) and other cyanine dyes with lepidopteran insect larval midgut brush border membrane vesicles (23, 31) and various cell types (8, 13, 22). Interestingly, linear relationships were reported for experiments performed with rabbit renal brush border membrane vesicles but, in these studies, the potassium concentration ratio was only varied from 1 to 10 (6, 43).

Membrane-permeabilizing ability of STb. The membrane potential generated by the diffusion of potassium ion was analyzed in the presence of a variety of salt solutions (Fig. 3). In the absence of valinomycin (Fig. 3A), similar fluorescence levels were measured

irrespective of the salt solution used. This observation indicates the absence of a strong preferential permeability of the vesicles for any of the ions tested. In contrast, when a preferential permeability for potassium ions was introduced by the addition of valinomycin, a strong membrane potential was generated in the presence of every salt solution, except KCl and potassium gluconate (Fig. 3B). The latter two solutions served as negative controls designed to allow fluorescence levels to be measured in the absence of a potassium gradient. Taken together, these results suggest that the vesicles were largely impermeable to the ions tested as should be expected from the fact that the intestinal brush border membrane plays a critical role in the absorption of various nutrients, a process which is mediated by a variety of sodium gradient-dependent co-transporters (38).

Pre-incubating the vesicles with STb had little effect on the fluorescence signal measured in the absence of valinomycin (Fig. 3A). However, this signal was quenched to a significantly lesser extent when measured in the presence of both valinomycin and a potassium ion gradient (Fig. 3B). Taken together, these results indicate that STb permeabilizes efficiently the membrane for other ions than potassium and thus reduces the potential generated by the efflux of this ion. This depolarizing effect of STb was observed for a variety of chloride salts of monovalent cations, including sodium, N-methyl-D-glucamine, lithium, tetramethylammonium and tetraethylammonium, suggesting that, in the presence of the toxin, the membrane discriminates poorly between different cations. The fact that STb has little effect on the membrane potential generated in the absence of valinomycin also suggests that its effects on the membrane are poorly selective. The possibility remains, however, that the lack of apparent selectivity for cations could result

from a strong selectivity for chloride ions. This appears nevertheless unlikely since, according to this hypothesis, an inside-positive membrane potential would have been generated when KCl-loaded vesicles were diluted in a solution of potassium gluconate, in the absence of valinomycin. This situation, which could have been detected as an increased fluorescence level (6, 43), over that measured in the absence of STb, was not observed in the experiments illustrated in Fig. 3A. These results therefore appear to be best explained by the fact that STb permeabilizes the membrane in a non-selective manner, possibly by the formation of poorly selective pores. This conclusion is consistent with our recent observation that STb increases the uptake of trypan blue by susceptible cells (4).

Evidence for pore formation by STb. To test the possibility that STb forms pores, its permeabilizing effect was measured in vesicles pre-incubated with various concentrations of the toxin and diluted in a solution of N-methyl-D-glucamine hydrochloride in the presence of valinomycin (Fig. 4). Fluorescence levels increased rapidly at the lower STb concentrations, but soon leveled off as the toxin concentration was further increased. The data presented in Fig. 4 were well fitted with the Michaelis-Menten equation with relative fluorescence levels reaching a plateau at 0.81 ± 0.01 and an apparent half-saturation constant of 1.8 ± 0.4 nmol STb/mg membrane protein (corresponding to 1.1 ± 0.2 μ M). This value matches reasonably well the earlier published estimates of 2–6 μ M for the dissociation constant of STb binding to its receptor, sulfatide, obtained with an enzyme-linked immunosorbent assay (3).

The fact that a maximum level of fluorescence was reached as the concentration of STb was increased indicates that its permeabilizing effect is probably not attributable to a

membrane-destabilizing detergent-like effect, but depends on its interaction with its receptor. These considerations suggest that the permeabilizing activity of STb could result from the formation of a pore-like structure within the membrane (5). This conclusion is supported by the results of a preliminary study suggesting that STb can form ion channels in planar lipid bilayers (V. Labrie, L. Potvin, J. Harel, J. D. Dubreuil and J.-L. Schwartz, unpublished data). The receptor appears to act by facilitating the insertion of STb and the formation of pores within the membrane, thus increasing its permeability. However, because the experiments performed in the present study measure the permeability resulting from the accumulation of new pores during the 15-min incubation period rather than the rate of pore formation, the observation of a plateau in the fluorescence levels suggests that sulfatide does not simply catalyze the insertion of toxin molecules in the membrane, but remains associated in some way with STb molecules rather than becoming available for binding new toxin molecules once the insertion has been completed.

Lack of effect of pH on the membrane permeabilizing ability of STb. Because somewhat contrasting results have been published regarding the effect of pH on the binding of STb to the piglet jejunal luminal membrane (35) and to its receptor (3), vesicles incubated in the presence or absence of toxin were injected in solutions of KCl or N-methyl-D-glucamine hydrochloride at various pH values ranging from 5.5 to 8.0 in the presence of valinomycin (Fig. 5). This range comprises the pH values reported for the jejunal contents of piglets, two weeks after weaning (pH 5.5–7.0) (37). Fluorescence levels were not affected significantly by pH in the absence of a membrane potential. However, in the N-methyl-D-glucamine hydrochloride solution, both in the presence and absence of

STb, fluorescence levels decreased gradually as pH was increased. This result is consistent with earlier studies indicating that, although the fluorescence of diS-C₃(5) is independent of pH in solution, it is strongly pH-dependent in the presence of cells or cell membranes (13, 21, 23, 41). The pattern illustrated in Fig. 5 can be simply explained by the fact that, as pH is increased, an increasing number of amino groups belonging to membrane proteins lose their charge, thus rendering the membrane more negatively charged and causing an increase in the number of positively charged probe molecules interacting with the vesicles.

For all pH values tested, fluorescence levels were higher in the presence of STb than in its absence (Fig. 5). However, the difference between the levels measured, at each pH value, in the presence of the toxin and in its absence was not significantly altered. The absence of an apparent effect of pH on membrane permeabilization by STb is consistent with the results of a previous study in which binding of STb to its sulfatide receptor was observed to be pH-independent (3). On the other hand, it is difficult to reconcile our data with the results of another study in which a sharp peak in the ability of STb to bind to piglet jejunal epithelial tissue was observed between pH 5.0 and 7.0 (35). It should be pointed out, however, that the three techniques used for this comparison differ substantially, a situation which may contribute to the observed differences.

Only functional STb displays a membrane permeabilizing ability. The membrane depolarizing capacity of STb was compared with those of three inactive forms of the toxin (Fig. 6). STb in which disulfide bonds have been chemically removed by reduction and alkylation has long been shown to be non-active (9). Similarly, the single mutant M42S and the double mutant K22A-K23A have been shown to bind poorly to sulfatide and to be

poorly active in the ligated rat jejunal loop assay (25). In contrast with intact STb, none of the three inactive forms of the toxin was able to increase the fluorescence level above that measured in the absence of toxin, even when they were added at twice the concentration used for STb (Fig. 6). The ability of STb to depolarize the brush border membrane therefore correlates well with its enterotoxicity.

Role of membrane permeabilization in the toxicity of STb. The results of the present study clearly demonstrate the ability of STb to increase the permeability of its target membrane. On the other hand, STb has recently been shown to be internalized within rat intestinal epithelial cells (27). The demonstration of this increase in membrane permeability may therefore have been facilitated by the fact that the endocytotic machinery of the cell is absent from the isolated membrane vesicles used in the present study. This finding raises the question, however, of the role of membrane permeabilization in diarrhea and of its relation with a number of cellular events that have been identified as resulting directly from the interaction of STb with the cell membrane. For instance, STb has been reported to open GTP-binding protein-dependent calcium channels in the plasma membrane (10). The resulting increase in the cytosolic calcium level may regulate phospholipases A₂ and C, which catalyze the release of arachidonic acid from membrane phospholipids, and finally the formation of a secretory agent, prostaglandin E₂ (14, 17, 20, 32). Elevated intracellular calcium levels also appear to be involved in the activation of a calmodulin-dependent protein kinase II (15). Among other things, it remains to be understood how the signal constituted by the binding of STb to its sulfatide receptor, a membrane lipid, can be transmitted to the intracellular metabolic machinery. Formation of pores within the plasma

membrane, or the membrane disturbance caused by their presence, may possibly constitute a signaling event contributing to trigger the induction of the mechanisms of fluid secretion associated with diarrhea.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge the contribution of the following colleagues from the Faculté de Médecine Vétérinaire, Saint-Hyacinthe: Dr. John M. Fairbrother and Dr. Francis Girard for providing piglet jejunal tissue and Mr. Guy Beauchamp for his help with the statistical analyses.

This work was supported by a Natural Sciences and Engineering Research Council research grant to J. D. Dubreuil (# 139070-01) and by a Fonds de la Recherche en Santé du Québec research group grant to J.-L. Schwartz and the Groupe d'Étude des Protéines Membranaires (# 5252).

REFERENCES

1. **Alouf, J. E.** 2001. Pore-forming bacterial protein toxins: an overview. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **257**:1–14.
2. **Arriaga, Y. L., B. A. Harville, and L. A. Dreyfus.** 1995. Contribution of individual disulfide bonds to biological action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B. *Infect. Immun.* **63**:4715–4720.

3. **Beausoleil, H.-E., and J. D. Dubreuil.** 2001. In vitro binding characteristics and affinity for sulfatide of *Escherichia coli* STb enterotoxin. *Receptors Channels* **7**:401–411.
4. **Beausoleil, H.-E., V. Labrie, and J. D. Dubreuil.** 2002. Trypan blue uptake by Chinese hamster ovary cultured cells: a cellular model to study *Escherichia coli* STb enterotoxin. *Toxicon* **40**:185–191.
5. **Bechinger, B.** 1997. Structure and functions of channel-forming peptides: magainins, cecropins, melittin and alamethicin. *J. Membr. Biol.* **156**:197–211.
6. **Beck J. C., and B. Sacktor.** 1978. Membrane potential-sensitive fluorescence changes during Na⁺-dependent D-glucose transport in renal brush border membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* **253**:7158–7162.
7. **Bossé, M., C. E. Handl, L.-A. Lortie, J. Harel, and J. D. Dubreuil.** 1993. Fusion of the genes encoding *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b (STb) and the maltose-binding protein to obtain mature STb enterotoxin. *J. Gen. Microbiol.* **139**:631–638.
8. **Burckhardt, G.** 1977. Non-linear relationship between fluorescence and membrane potential. *Biochim. Biophys. Acta* **468**:227–237.
9. **Dreyfus, L. A., R. G. Urban, S. C. Whipp, C. Slaughter, K. Tachias, and Y. M. Kupersztoch.** 1992. Purification of the ST_B enterotoxin of *Escherichia coli* and the role of selected amino acids on its secretion, stability and toxicity. *Mol. Microbiol.* **6**:2397–2406.

10. **Dreyfus, L. A., B. Harville, D. E. Howard, R. Shaban, D. M. Beatty, and S. J. Morris.** 1993. Calcium influx mediated by the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B (ST_B). Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**:3202–3206.
11. **Dubreuil, J. D.** 1997. *Escherichia coli* ST_B enterotoxin. Microbiology **143**:1783–1795.
12. **Dubreuil, J. D.** 2006. *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b, Chapter 25, p. 491–503. In J. E. Alouf and M. R. Popoff (ed.), The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins, 3rd ed. Academic Press, Oxford, U.K.
13. **Freedman, J. C., and J. F. Hoffman.** 1979. The relation between dicarbocyanine dye fluorescence and the membrane potential of human red blood cells set at varying Donnan equilibria. J. Gen. Physiol. **74**:187–212.
14. **Fujii, Y., Y. Kondo, and K. Okamoto.** 1995. Involvement of prostaglandin E₂ synthesis in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. FEMS Microbiol. Lett. **130**:259–265.
15. **Fujii, Y., T. Nomura, H. Yamanaka, and K. Okamoto.** 1997. Involvement of Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. Microbiol. Immunol. **41**:633–636.
16. **Hafkenschied, J. C. M.** 1984. Aminopeptidases and amino acid arylamidases, p. 2–34. In J. Bergemayer (ed.), Methods of enzymatic analysis, Vol. V, Enzymes 3; Peptidases, proteinases and their inhibitors. Verlag Chemie, Weinheim.
17. **Harville, B. A., and L. A. Dreyfus.** 1995. Involvement of 5-hydroxytryptamine and prostaglandin E₂ in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B. Infect. Immun. **63**:745–750.

18. **Hauser, H., K. Howell, R. M. C. Dawson, and D. E. Bowyer.** 1980. Rabbit small intestinal brush border membrane preparation and lipid composition. *Biochim. Biophys. Acta* **602**:567–577.
19. **Hille, B.** 1992. Ionic channels of excitable membranes, 2nd ed., p. 1–20. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
20. **Hitotsubashi, S., Y. Fujii, H. Yamanaka, and K. Okamoto.** 1992. Some properties of purified *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *Infect. Immun.* **60**:4468–4474.
21. **Hladky, S. B., and T. J. Rink.** 1976. Potential difference and the distribution of ions across the human red blood cell membrane: a study of the mechanism by which the fluorescent cation, diS-C₃(5) reports membrane potential. *J. Physiol.* **263**:287–319.
22. **Hoffman, J. F., and P. C. Laris.** 1974. Determination of membrane potentials in human and *Amphiuma* red blood cells by means of a fluorescent probe. *J. Physiol.* **239**:519–552.
23. **Kirouac, M., V. Vachon, S. Rivest, J.-L. Schwartz, and R. Laprade.** 2003. Analysis of the properties of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins using a potential-sensitive probe. *J. Membr. Biol.* **196**:51–59.
24. **Kupersztoch, Y. M., K. Tachias, C. R. Moomaw, L. A. Dreyfus, R. Urban, C. Slaughter, and S. Whipp.** 1990. Secretion of methanol-insoluble heat-stable enterotoxin (ST_B): energy- and *secA*-dependent conversion of pre-ST_B to an intermediate indistinguishable from the extracellular toxin. *J. Bacteriol.* **172**:2427–2432.

25. **Labrie, V., H.-E. Beausoleil, J. Harel, and J. D. Dubreuil.** 2001. Binding to sulfatide and enterotoxicity of various *Escherichia coli* STb mutants. *Microbiology* **147**:3141–3148.
26. **Labrie, V., J. Harel, and J. D. Dubreuil.** 2001. Oligomerization of *Escherichia coli* enterotoxin b through its C-terminal hydrophobic α -helix. *Biochim. Biophys. Acta* **1535**:128–133.
27. **Labrie, V., J. Harel, and J. D. Dubreuil.** 2002. *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b (STb) in vivo internalization within rat intestinal epithelial cells. *Vet. Res.* **33**:223–228.
28. **Ménard, L.-P., J. G. Lussier, F. Lépine, C. Paiva de Sousa, and J. D. Dubreuil.** 2004. Expression, purification, and biochemical characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin I. *Protein Expr. Purif.* **33**:223–231.
29. **Nagy, B., and P. Z. Fekete.** 1999. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Vet. Res.* **30**:259–284.
30. **Okamoto, K., T. Baba, H. Yamanaka, N. Akashi, and Y. Fujii.** 1995. Disulfide bond formation and secretion of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *J. Bacteriol.* **177**:4579–4586.
31. **Parthasarathy, R., and W. R. Harvey.** 1994. Potential differences influence amino acid/ Na^+ symport rates in larval *Manduca sexta* midgut brush-border membrane vesicles. *J. Exp. Biol.* **189**:55–67.

32. **Peterson, J. W., and S. C. Whipp.** 1995. Comparison of the mechanisms of action of cholera toxin and the heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **63**:1452–1461.
33. **Plášek, J., and K. Sigler.** 1996. Slow fluorescent indicators of membrane potential: a survey of different approaches to probe response analysis. *J. Photochem. Photobiol. B* **33**:101–124.
34. **Rousset, E., J. Harel, and J. D. Dubreuil.** 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.
35. **Rousset, E., J. Harel, and J. D. Dubreuil.** 1998. Binding characteristics of *Escherichia coli* enterotoxin b (STb) to pig jejunum and partial characterization of the molecule involved. *Microb. Pathog.* **24**:277–288.
36. **Sims, P. J., A. S. Waggoner, C.-H. Wang, and J. F. Hoffman.** 1974. Studies on the mechanism by which cyanine dyes measure membrane potential in red blood cells and phosphatidylcholine vesicles. *Biochemistry* **13**:3315–3330.
37. **Snoeck, V., E. Cox, F. Verdonck, J. J. Joensuu, and B. M. Goddeeris.** 2004. Influence of porcine intestinal pH and gastric digestion on antigenicity of F4 fimbriae for oral immunisation. *Vet. Microbiol.* **98**:45–53.
38. **Stevens, B. R., J. D. Kaunitz, and E. M. Wright.** 1984. Intestinal transport of amino acids and sugars: advances using membrane vesicles. *Annu. Rev. Physiol.* **46**:417–433.

39. **Sukumar, M., J. Rizo, M. Wall, L. A. Dreyfus, Y. M. Kupersztoch, and L. M. Gierasch.** 1995. The structure of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b by nuclear magnetic resonance and circular dichroism. *Protein Sci.* **4**:1718–1729.
40. **Tsien, R. Y., and S. B. Hladky.** 1978. A quantitative resolution of the spectra of a membrane potential indicator, diS-C₃-(5), bound to cell components and to red blood cells. *J. Membr. Biol.* **38**:73–97.
41. **Waggoner, A. S.** 1979. Dye indicators of membrane potential. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **8**:47–68.
42. **William, K., M. LoPresti, and K. Stone.** 1997. Internal protein sequencing of SDS-PAGE-separated proteins: optimization of an in gel digest protocol, p. 79–90. *In* D. Marshak (ed.), *Techniques VIII*. Academic Press, San Diego, CA.
43. **Wright, S. H., S. Krasne, I. Kippen, and E. M. Wright.** 1981. Na⁺-dependent transport of tricarboxylic acid cycle intermediates by renal brush border membranes. Effects on fluorescence of a potential-sensitive cyanine dye. *Biochim. Biophys. Acta* **640**:767–778.
44. **Zasloff, M.** 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**:389–395.

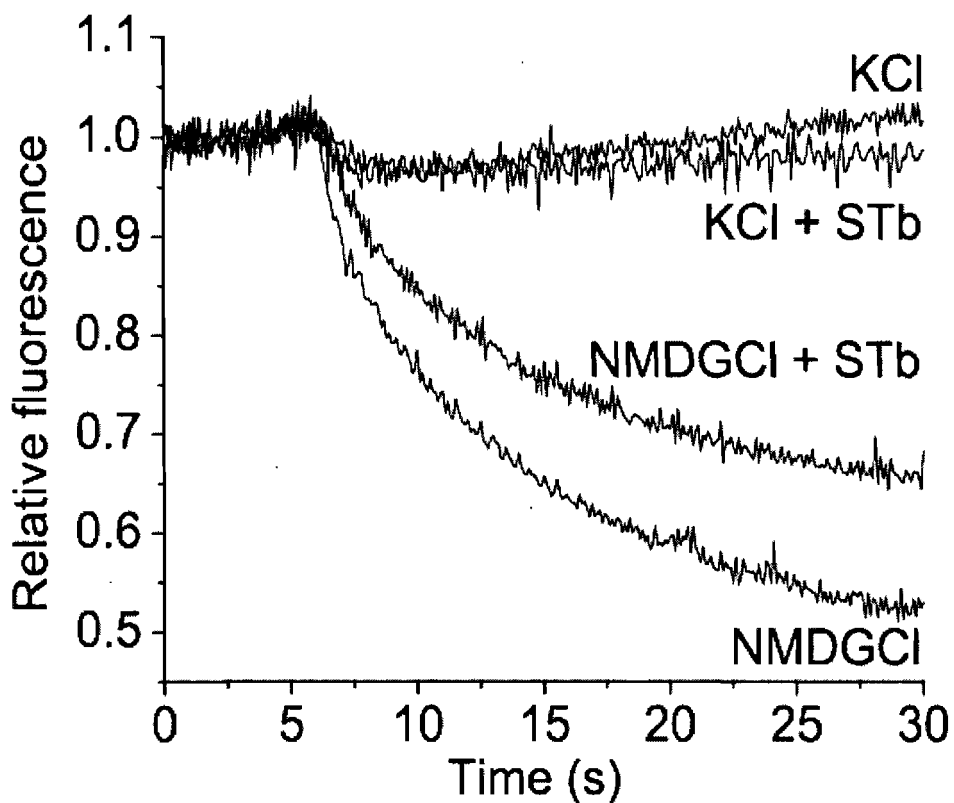


FIG 1. Effect of the potassium transmembrane gradient, valinomycin and STb on the membrane potential generated in brush border membrane vesicles isolated from piglet jejunum epithelial cells. Vesicles loaded with 250 mM KCl–0.1 mM MgSO₄–50 mM MES-Tris (pH 5.8) were incubated for 15 min with or without 12.5 nmol STb/mg membrane protein. Fluorescence was monitored in a Spex Fluorolog spectrofluorometer as described under Materials and Methods. Five seconds after the beginning of the recording, vesicles were injected into cuvettes containing 1.5 μM diS-C₃(5), 7.5 μM valinomycin, and either the same solution as that with which they were loaded (KCl) or a solution of similar composition in which KCl was replaced by N-methyl-D-glucamine hydrochloride (NMDGCl). Each curve corresponds to a representative experimental record.

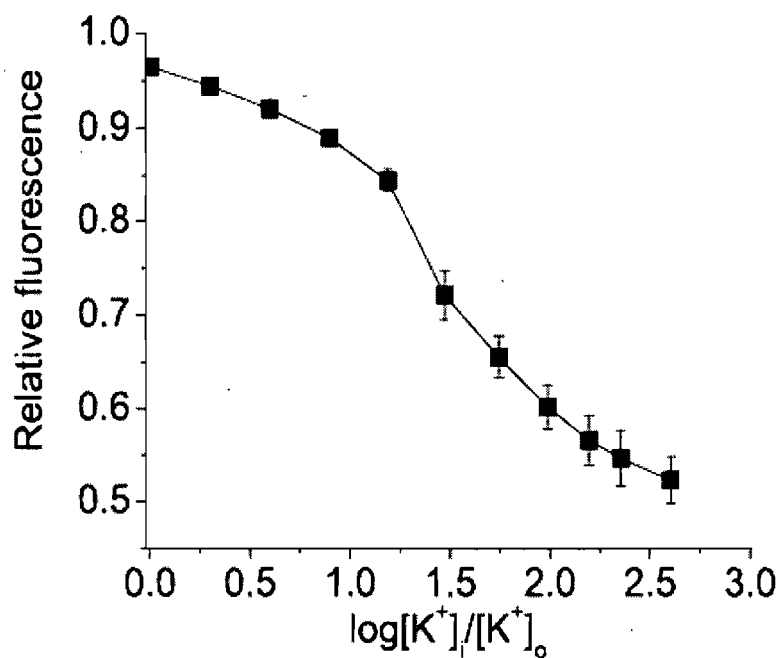


FIG 2. Calibration of the fluorescence signal as a function of the transmembrane potassium concentration ratio. Fluorescence was monitored using a protocol similar to that illustrated in Fig. 1. Vesicles loaded with 250 mM KCl–0.1 mM MgSO₄–50 mM MES-Tris (pH 5.8) were injected into cuvettes containing the appropriate concentration of KCl, enough N-methyl-D-glucamine hydrochloride to maintain osmolarity and ionic strength constant, 0.1 mM MgSO₄, 50 mM MES-Tris (pH 5.8), 1.5 μM diS-C₃(5) and 7.5 μM valinomycin. Values are means ± S.E.M. for 9 experiments, each performed with a different membrane preparation.

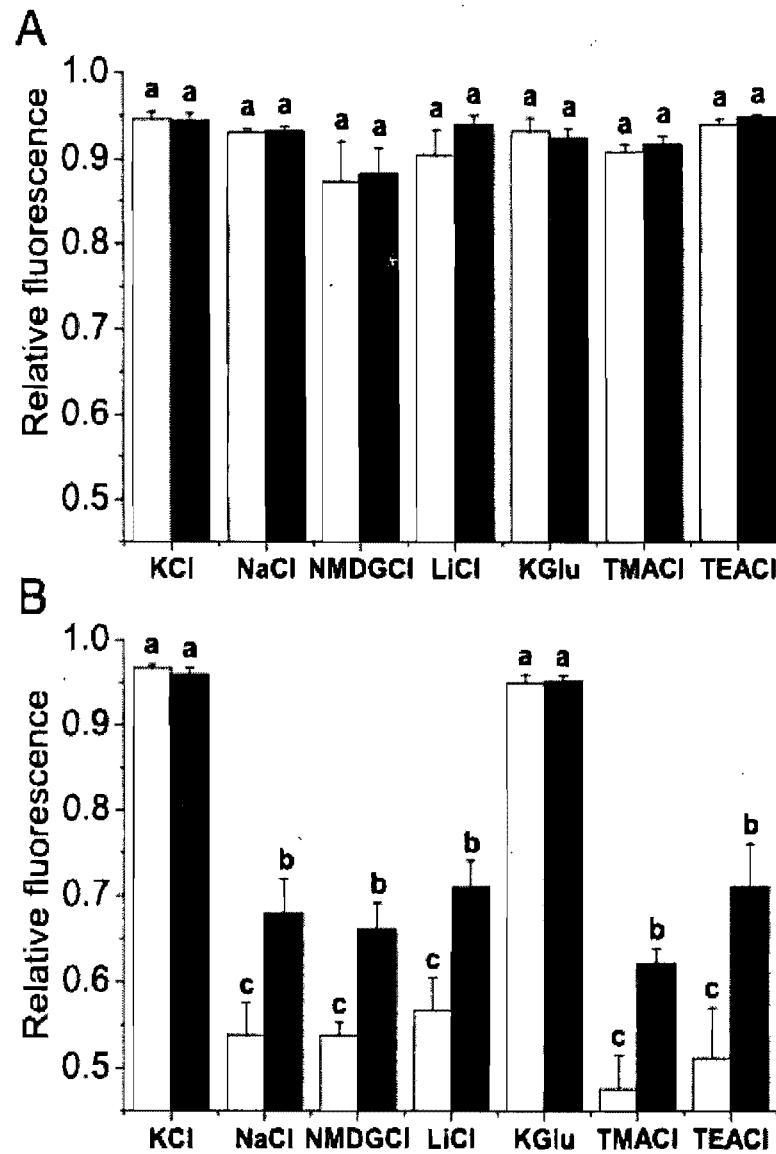


FIG. 3. Effect of STb on the membrane potential generated in the presence of various electrolyte solutions. Vesicles loaded with 250 mM KCl–0.1 mM MgSO₄–50 mM MES-Tris (pH 5.8) were incubated for 15 min in the presence (black bars) or absence (white bars) of 12.5 nmol STb/mg membrane protein. Fluorescence was monitored using a

protocol similar to that illustrated in Fig. 1. The vesicles were injected in cuvettes containing 1.5 μM diS-C₃(5) and either the same solution as that with they were loaded (KCl) or a solution of similar composition in which 250 mM KCl was replaced by the same concentration of either NaCl, N-methyl-D-glucamine hydrochloride (NMDGCl), LiCl, potassium gluconate (KGlu), tetramethylammonium chloride (TMACl) or tetraethylammonium chloride (TEACl), in the absence (A) or presence (B) of 7.5 μM valinomycin. Values are means \pm S.E.M. for 5 experiments, each performed with a different membrane preparation. Means labeled with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

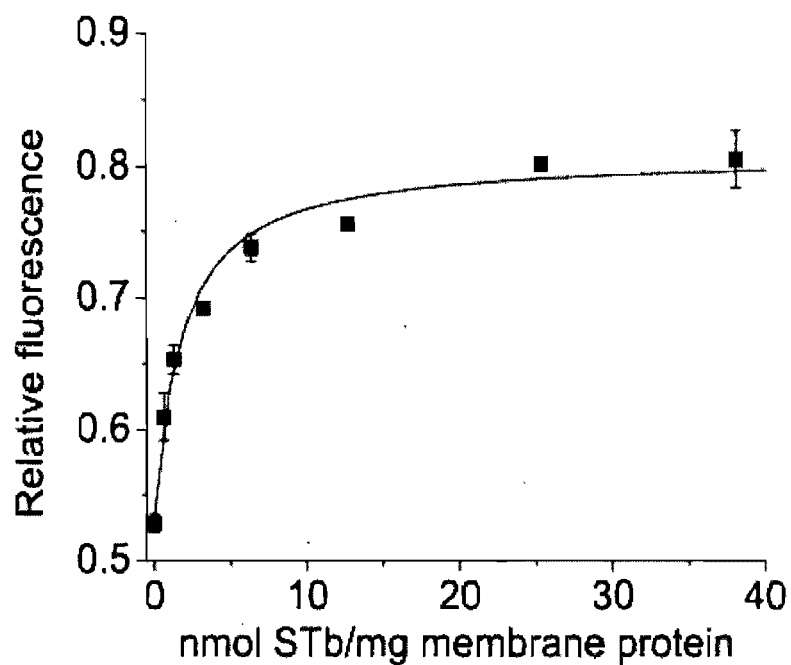


FIG. 4. Effect of STb concentration on membrane potential. Experiments were carried out by injecting KCl-loaded vesicles, previously incubated with the indicated concentrations of STb, in an isotonic solution of N-methyl-D-glucamine hydrochloride as described in the legend of Fig. 1. The fluorescence level measured in the absence of a membrane potential was 0.963 ± 0.008 . Values are means \pm S.E.M. for 4 experiments, each performed with a different membrane preparation. Data points were fitted with the Michaelis-Menten equation using the software Origin (version 7.5, OriginLab Corporation, Northampton, MA).

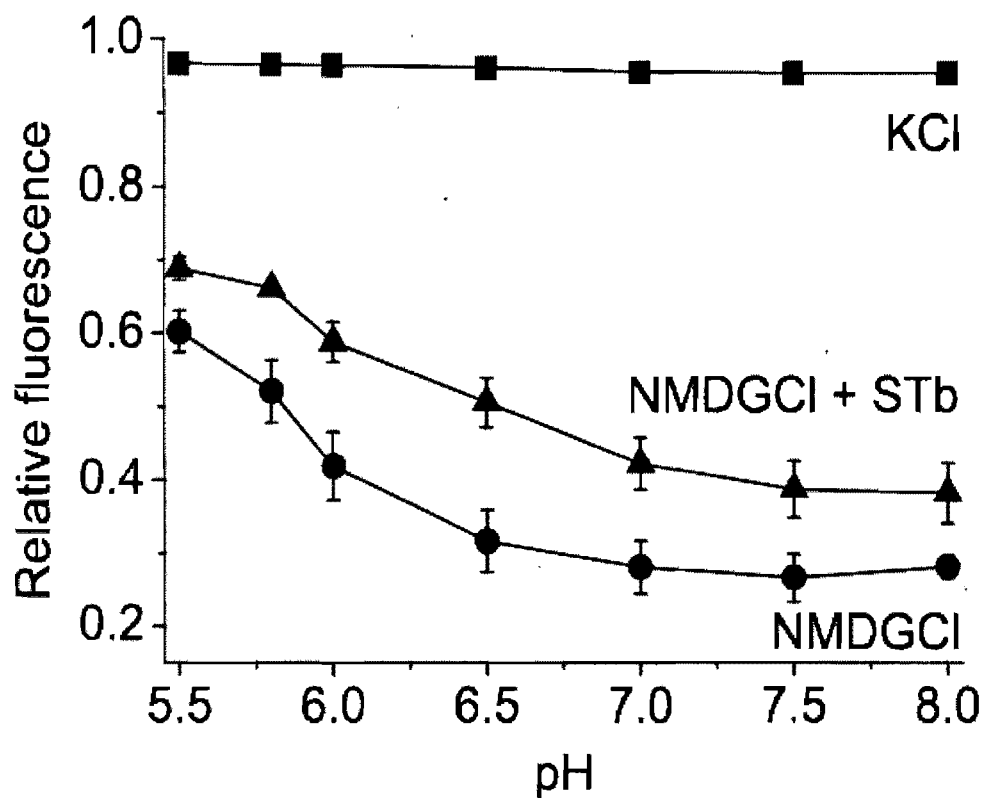


FIG. 5. Membrane permeabilizing ability of STb at various pH values. Experiments were carried out as described in the legend of Fig. 1 except that the KCl solutions were buffered with 50 mM of either MES-Tris, between pH 5.5 and 6.5, HEPES-Tris, at pH 7.0 and 7.5, or Tris-HCl, at pH 8.0. Values are means \pm S.E.M. for 4 experiments, each performed with a different membrane preparation.

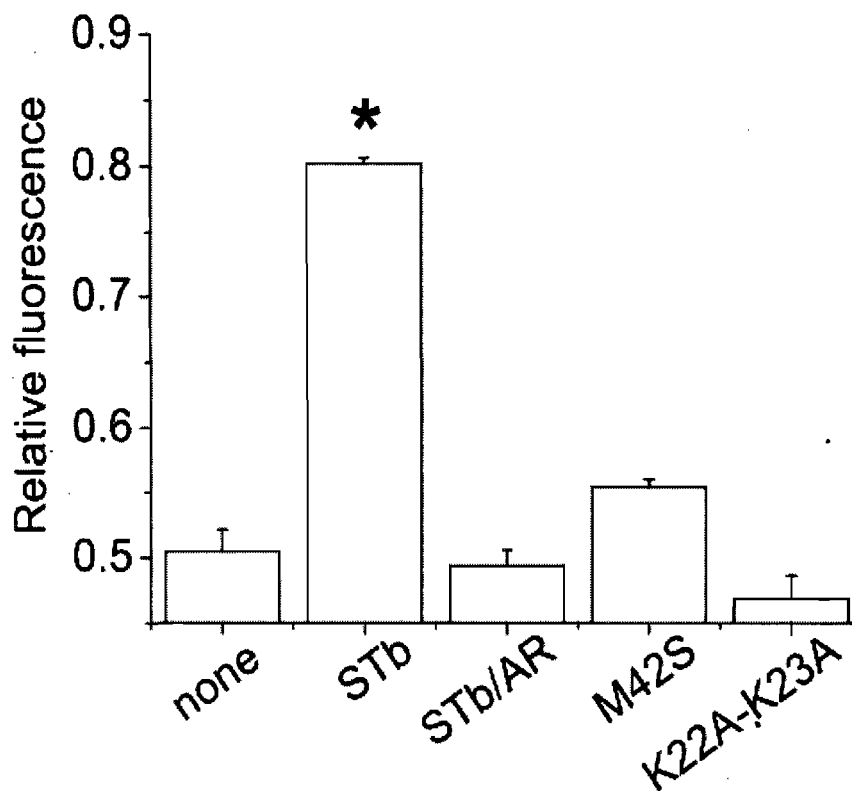


FIG. 6. Comparison of the permeabilizing ability of STb with that of its reduced and alkylated derivative (STb/AR) and of two of its mutants (M42S and K22A-K23A). Experiments were carried out by injecting KCl-loaded vesicles, previously incubated with either 12.5 nmol/mg membrane protein of STb or 25 nmol/mg membrane protein of either one of the other toxins, in an isotonic solution of N-methyl-D-glucamine hydrochloride (NMDGCl) as described in the legend of Fig. 1. The fluorescence level measured in the absence of a membrane potential was 0.948 ± 0.008 . Values are means \pm S.E.M. for 3 experiments each performed with a different membrane preparation. The asterisk indicates a significant difference with the corresponding value measured in the absence of toxin ($P < 0.05$).

ARTICLE 2

***Escherichia coli* STB toxin binding to sulfatide and its inhibition
by carragenan**

Carina Gonçalves, Frédéric Berthiaume, Michael Mourez and J. Daniel Dubreuil

Publié dans :

2008, FEMS Microbiology Letters **281**:30-5

Introduction

Les études portant sur l'affinité de STb pour différents glycosphingolipides n'ont pas permis de rejeter une éventuelle interaction de la toxine avec différents récepteurs (Beausoleil et Dubreuil 2001 ; Beausoleil *et al.* 2002b). En effet, STb se lie en particulier aux galactoses et aux glucoses sulfatés exposés à la surface cellulaire par différents glycosphingolipides. L'étape de la liaison au sulfatide semble essentielle à son activité toxique. L'inhibition de cette liaison annihile l'activité de la toxine STb (Rousset *et al.* 1998b). L'objectif de cet article est de décrire les différences entre les interactions de STb avec différents glycosphingolipides.

La résonance plasmonique de surface (surface plasmon resonance - SPR) est une méthode d'analyse permettant de mesurer la constante d'affinité entre le ligand (STb) et le récepteur (glycosphingolipide). Cette méthode permet également de tester des inhibiteurs de la liaison protéine/lipide. Nous avons ainsi comparé la liaison de STb/sulfatide à d'autres glycolipides (lactocéramide et glucocéramide). Des tests d'inhibition compétitive ont été réalisés sur une membrane de sulfatide, en présence de galactose sulfaté et de λ -carragénine en solution (polymère de galactoses sulfatés). L'inhibition compétitive a été également testée sur des cellules IPEC-J2 (cellules de jéjunum porcin) traitées avec STb.

Escherichia coli STb toxin binding to sulfatide and its inhibition by carragenan


Carina Gonçalves, Frédéric Berthiaume, Michaël Mourez 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.

Running title: STb toxin inhibition by carragenan

Keywords: *Escherichia coli*, STb toxin, receptor, glycosphingolipid, toxin inhibition.

*Correspondence : 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, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada. J2S 7C6
Phone: (450) 773-8521 #18433. Fax: (450) 778-8108.

E-mail: 

Abstract

Escherichia coli heat-stable toxin b (STb) is an important cause of diarrhea in piglets. STb was shown to interact specifically with sulfatide (3'-sulfogalactosyl-ceramide) present on the surface of epithelial cells of piglet jejunum. Basic data are lacking on STb binding to sulfatide in solution and more precisely on the possible inhibition of this interaction. Using surface plasmon resonance technology, we compare binding of STb to sulfatide and other glycolipids previously shown, with a multiplate binding assay, to also interact to various degrees with the enterotoxin. In addition, inhibition of STb-sulfatide binding was studied using free galactose, galactose-sulfate residues and a polymer of sulfated galactans known as carragenan. We determined a dissociation constant of 2.4 ± 0.6 nM for the STb-sulfatide interaction. This data indicated that STb was binding to sulfatide with greater affinity than previously determined using radio-labeled toxin. Much lower affinities were observed for lactoceramide and glucoceramide. The binding of STb to sulfatide was clearly inhibited by λ -carragenan but not by galactose, 4-SO₄-galactose or 6-SO₄-galactose. Inhibition of STb binding to its receptor was achieved using λ -carragenan at picomolar concentrations. Then, using IPEC-J2 cells in culture and flow cytometry, we showed that λ -carragenan was able to inhibit the permeabilization process associated with STb.

STb (heat-stable toxin b) is produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. This enterotoxin is responsible for diarrhea in piglets and the toxin has been detected in *E. coli* isolated from human (Lortie *et al.*, 1991; Handl & Flock, 1992). STb is a cytotoxic toxin that was shown to bind to sulfatide, a glycosphingolipid, found on the epithelial cells of the pig jejunum (Rousset *et al.*, 1998a). Binding was observed for glycolipids containing terminal β -galactose with a significant preference for a galactose with a sulfate group in position 3. Additionally, STb was shown to bind significantly to glucoceramide (Beausoleil & Dubreuil, 2001). Using I^{125} -radiolabelled STb and a microtiter plate binding assay (MPBA), a K_d of $2.6 \pm 1.5 \mu\text{M}$ was determined for the STb-sulfatide interaction. Lipidic extracts of pig jejunum, when examined by high-performance thin-layer chromatography, confirmed the presence of sulfatides. Hydroxylated sulfatides with fatty acid chains of 16, 22 and 24 carbons and a sulfatide with saturated fatty acid chains of 16 carbons were present in the extract. The major sulfatide found corresponded to a hydroxylated molecule harbouring a ceramide comprising 16 carbons (Beausoleil *et al.*, 2002b). We recently showed, using brush border membrane vesicles from pig jejunum, that STb could permeabilize the vesicles (Gonçalves *et al.*, 2007). The toxin was also shown to allow the entry of trypan blue into cells in culture of various origins (Beausoleil *et al.*, 2002b). The dye uptake was dose-dependent but when cytotoxicity was tested the cells were still alive.

Carragenans are sulfated galactans extracted from marine red algae (seaweed). These polysaccharides possess linear structure alternating 3-linked β -D-galactopyranose

and 4-linked α -D-galactopyranose units. These compounds represent highly charged anionic polymers. They possess 3 sulfate groups per repeat unit of disaccharide, as one galactopyranose 2-sulfate and one galactopyranose 2, 6-disulfate (Michel *et al.*, 2006). Compared to other type of carragenans, λ -carragenan is a non-gelling compound.

This study was conducted in order to quantitatively evaluate, using Surface Plasmon Resonance technology (SPR), the interaction between STb and its receptor, as well as other glycolipids on which galactose and /or glucose are present. Free galactose, sulfated galactoses and sulfated galactans (carragenan) were tested for their possible binding inhibition potential. Then, λ -carragenan was tested, using IPEC-J2 cells in culture, for its efficacy to inhibit the permeabilization process described for STb.

Materials and methods

Materials

Sulfatide, lactoceramide and glucoceramide, galactose, 4-SO₄-galactose, 6-SO₄-galactose, λ -carragenan, N-octyl- β -D-glucopyranoside and bovine serum albumin were purchased from Sigma Chemical (Oakville, ON). Carboxyfluorescein diacetate and propidium iodine were purchased from Invitrogen Life Technologies (Burlington, ON, Canada).

Production and purification of STb

STb toxin was produced according to a previously described method [8]. The purified STb toxin was lyophilized and kept at -20°C , until used. The identity and purity of the toxin was verified by N-terminal sequence analysis using Edman degradation (Model 494 CLC Procise Sequencer, Applied Biosystems) as described (Ménard *et al.*, 2004). STb was quantified spectrophotometrically at 214 nm using aprotinin as the reference protein.

Surface plasmon resonance experiments

Biosensor experiments were carried out on a BIAcore 3000 system (GE Healthcare, Baie D'Urfé, QC) using HPA sensor chips (Biacore AB, Uppsala, Sweden) with the protocol described by Mozsolits *et al.* (Mozsolits *et al.*, 2001).

Sulfatide, lactoceramide or glucoceramide in 10mM NaHPO_4 , 10mM Na_2HPO_4 , pH 5.8 (PB) (100 μL , 0.1mM) was applied to the chip surface at a flow rate of 2 $\mu\text{l}/\text{min}$. To remove any multilamellar structures from the lipid surface, NaOH (50 μl , 10mM) was injected at a flow rate of 50 $\mu\text{l}/\text{min}$. Bovine serum albumin (BSA) was used (25 μl , 0.1mg/ml in PB) to block all free sites on the chip, preventing non-specific binding. Excess BSA was removed from the chip surface by injection of NaCl (25 μl , 1M) at a flow rate of 50 $\mu\text{l}/\text{min}$. The glycolipidic monolayer linked to the chip surface was then used as a model cell membrane surface to study toxin binding.

Various concentrations of the analyte (a volume of 30 μ l STb in PB; concentrations ranging between 20 and 100 ng/ml) were injected at 5 μ l/min at 25°C over the glycolipid-covered sensor chip followed by PB for 10 min to allow dissociation. The alkanethiol surface on the HPA chip was cleaned by injection of 40 mM N-octyl- β -D-glucopyranoside (25 μ l) at a flow rate of 5 μ l/min. Regeneration of the chip surface was done using 10mM NaOH/10mM DTT at 50 μ l/min. Sensorgrams were obtained by plotting the SPR angle against time. STb-lipid binding events were analyzed from a series of sensorgrams collected for 6 different toxin concentrations. All experiments were performed at least 3 times.

Data analysis

Sensorgram data were analyzed during the binding and dissociation processes using BIAevaluation 4.1 software (Biacore, GE Healthcare). Concerning the saturation curve, the average of the maximal response (RU_{max}) for each toxin concentration was plotted as a function of STb concentration. Using nonlinear regression (one binding site equation), the curve was fitted and residuals were concomitantly calculated.). Analyses were performed using GraphPad Prism version 4.03 for windows (GraphPad software, San Diego, CA). For the carragenan inhibition, averages of the RU_{max} for each carragenan concentration expressed as function of carragenan concentration.

IPEC-J2 cell line

IPEC-J2 cells were derived from porcine jejunal epithelial cells and were kindly supplied by Dr. A. Blikslager (North Carolina State University, Raleigh, USA). The cells were grown and maintained in 50% Dulbecco's Modified Eagle Medium and 50% Nutrient Mixture F12 (Ham) (DMEM-F12) supplemented with 5% fetal bovine serum and penicillin/streptomycin (1%). Cells were maintained by serial passages in 75 cm² flasks at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Medium and supplements for cell culture were from Invitrogen Life Technologies (Burlington, ON, Canada).

Permeabilization assay

To conduct the permeabilization experiments, six-well plates were seeded at a density of 100,000 cells by well and grown for 2 days. Cells were washed with DMEM-100mM HEPES (pH 7.4) and then incubated in presence or absence of STb (10µg) and/or λ-carragenan (5 and 10 µg/ml) at 37°C. Carragenan was added first and left for 10 min before STb was added. After 1 hour of incubation, the treatment solution was substituted by complete DMEM-F12 medium and the cells were grown for 24 h at 37°C. Cells were trypsinized using a 0.05% trypsin-EDTA solution (Invitrogen) collected at a concentration of 10⁶cell/ml and treated with carboxyfluorescein diacetate (CFDA) at a final concentration of 0.4 µg/ml and propidium iodine (PI) at 2 µg/ml.

Samples were analyzed on a FACS Vantage SE (Becton Dickinson, Oakville, ON, Canada). The instrument is equipped with an argon laser for excitation of the fluorescent dye at 488 nm. CFDA fluorescent emission was detected in the FL1 channel ($530 \pm 20\text{nm}$) while PI was detected in the FL3 channel ($630 \pm 22 \text{ nm}$). Analysis was done on, at least, 10,000 cells. Data was collected with CELL Quest Pro program (Becton Dickinson) and further analyzed with WinMDI program (version 2.8; Joseph Trotter, Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, CA, USA). At least three independent experiments were conducted for each cell treatments. A student t-test was done on the final normalized data.

Results and discussion

SPR analyses of STb binding to glycosphingolipids

Sulfatide was shown by Rousset et al. (Rousset *et al.*, 1998a) to represent a functional receptor for STb toxin. Beausoleil and Dubreuil (Beausoleil & Dubreuil, 2001), using a MPBA assay, have quantitatively shown that STb toxin has a high specificity for sulfatide. The binding was dose-dependent and saturable. In the present study, STb toxin binding to various glycosphingolipids was assessed, on a lipid monolayer, using SPR technology. As Rousset *et al.* (1998b) suggested, using pig jejunum treated with specific glycosidases, that a glucose and/or galactose containing molecule could probably also act as a receptor, glucoceramide and lactoceramide were included in this study.

Immobilization of the various glycosphingolipids on the HPA chips were the following: sulfatide (2000 RU), glucoceramide (525 RU) and lactoceramide (1225 RU). Under these conditions, STb toxin (80 ng/ μ l) binding to sulfatide and other glycosphingolipids selected indicated important differences in their affinities (Figure 1). A marked lower response was noted for glucoceramide (RU_{max} of 10.5) and lactoceramide (RU_{max} of 53.5) compared to sulfatide (RU_{max} of 985), than expected from a previous study. In fact, using MPBA and pure glycosphingolipids, Beausoleil and Dubreuil (Beausoleil & Dubreuil, 2001) had confirmed the observation of Rousset *et al.*(1998a) and had shown that STb was binding to galactosyl ceramide (27% compared to sulfatide) and lactosyl ceramide (24%), two molecules sharing terminal β -galactose in their structure. Interestingly, binding to glucoceramide was more important than to glycosphingolipids with terminal galactose: 63% compared to sulfatide (Beausoleil & Dubreuil, 2001). This molecule containing a terminal glucose residue was included in the study to dispute or confirm previous data. As the data obtained using SPR did not correlate with the MPBA assay, it probably indicates that in the MPBA assay the immobilized glycosphingolipid molecules present the sugar(s) differently than on a lipid monolayer as it is the case for SPR. Thus, data obtained using SPR technology is most probably more indicative of the situation encountered in nature.

STb binding to sulfatide

Kinetic experiments with various concentrations of STb toxin (0 to 100 ng/ μ l) were realized. A typical sensorgrams of STb binding to sulfatide (RU_{max} for 3 independent experiments plotted against time) (Figure 2), shows that the binding is dependent of the amount of toxin (0 to 100 ng/ml) added to the system. The binding is rapid and saturation is reached rapidly. Saturation of the reaction was observed at approximately 40 ng/ml. If we consider only one binding site per STb molecule, maximum binding at equilibrium was plotted as RU_{max} in function of the concentration of STb. From the saturation curve, data transformation indicated a K_d of 2.4 ± 0.6 nM (Figure 3). Using MPBA technology, a K_d of $2\text{-}6 \pm 1.5$ μ M was previously determined (Beausoleil & Dubreuil, 2001). This value is 1000x higher than what is observed with SPR technology. Such discrepancy is difficult to explain but could be due to incomplete radio-labeling of STb with I¹²⁵ and/or because the radio-labeling of STb toxin affected the binding to its receptor. Thus, addition of unlabeled or inactive STb toxin would have affected the K_d deduced from the previous data or the iodination of a small molecule like STb could result in binding interference with its receptor. The K_d determined for STb and sulfatide with SPR indicates a greater affinity between these molecules than previously determined. In fact, it compares well with other known interactions between a toxin and a receptor of glycolipidic nature. For example, the affinities of *E. coli* LT (heat-labile) toxin and *Vibrio cholerae* CT for GM₁ are 0.57 nM and 0.73 nM, respectively (MacKenzie *et al.*, 1997). Binding of *E. coli* STa toxin to guanylate

cyclase type C, a proteic receptor, is also in the order of the nanomolar (nM) (Guarino *et al.*, 1987). Thus, it appears that, at least for a small toxin like STb, determination of the affinity for a receptor is probably more rigorous when done on a lipid monolayer using SPR technology compared with monitoring of the binding of I¹²⁵-labelled toxin.

Inhibitory effect of simple sugar, sulfated sugars and carragenan

Potential inhibitory molecules were pre-incubated with STb toxin, in an attempt to observe the effect on STb binding to the sulfatide immobilized on the HPA chip. Galactose (up to 0.1 mg/ml) could not inhibit the binding of STb to sulfatide. Similarly, free 4-SO₄-galactose and 6-SO₄-galactose, at the same concentration, did not result in any observable inhibition (Data not shown). Since inhibition of approximately 50% of binding was noted in a previous study with high concentrations (1 mg/ml) of glucose sulfate (position 3) and of galactose sulfate (position 4 or 6) (Beausoleil & Dubreuil, 2001), polymeric molecules containing sulfated sugars but most specifically galactose were considered. As λ-carragenan is a polymer molecule containing sulfated galactose and does not form a gel compared to other types of carragenans, it was investigated with the intent of blocking the recognition process of STb with its receptor.

When tested, λ-carragenan was capable of effectively prevent binding of STb to sulfatide. This phenomenon was observed at picomolar concentrations (Figure 4A). In fact,

a complete inhibition was observed for this molecule at a concentration of approximately 10 $\mu\text{g/ml}$ (Figure 4B).

Cell permeabilization inhibition by λ -carragenan.

Previous studies had shown that STb toxin could permeabilize brush border membrane vesicles from pig jejunum (Gonçalves *et al.*, 2007) and cells of various origins (Beausoleil *et al.*, 2002). In the case of animal cell, trypan blue was used to observe the dose-response uptake of this vital dye, due to STb. However, it was determined that STb did not have a lethal effect on the stained cells. Here, to track cell permeabilization, we used PI, usually used to evaluate cell death. This dye, binding to double-stranded DNA, can only be taken by cells if the cell membrane is affected. On the other side, CFDA, a lipophylic substrate, is readily taken up by cells. Intracellular esterases, in living cells, cleave the diacetate from the molecule that result in a fluorescent carbofluorescein molecule. In our experiments, a CFDA and PI-positive result indicates STb permeabilization a process that allows PI to be internalized, without killing of the cells.

Using IPEC-J2 cells a study was conducted to evaluate the capacity of λ -carragenan to prevent cell permeabilization. As seen in Figure 5, addition of 5 or 10 $\mu\text{g/ml}$ of λ -carragenan to cell treated with STb resulted in an appreciable inhibition of the permeabilization process observed for STB alone. In fact, inhibition of 72% and 80% were

observed, respectively for 5 and 10 $\mu\text{g/ml}$ of λ -carragenan. However, there was no significant difference between the two quantities of λ -carragenan tested.

Thus, it seems that although λ -carragenan does not possess the 3-SO₄-galactose residue, known to be responsible for attachment of STb toxin to sulfatide (Beausoleil & Dubreuil, 2001), the multivalent galactose sulfate groups (2-sulfate and 2, 6-disulfate) could be responsible for the inhibition observed. Galactose 6-sulfate at 1 mg/ml had been shown to inhibit binding of STb to sulfatide (Beausoleil & Dubreuil, 2001). Overall, multivalent compounds compared to univalent ones are known to inhibit the binding of various bacterial toxins (Rousset & Dubreuil, 2000; Bovin *et al.*, 2004) and this could explain the inhibition observed for λ -carragenan using SPR technology and cell in culture.

Carragenans are used in the food industry, in important quantities, as a thickener but we also found in many products ranging from lubricants to infant feeding formulas. In this study, we demonstrated that added in picomolar amount to the running buffer it can block completely the recognition process of STb with its receptor. Carragenan has been shown to block viral infectivity of herpes simplex virus and HIV (Konlee, 1998; Carlucci *et al.*, 2004; Talarico *et al.*, 2004). Sulfated polysaccharides are thought to block viral infection by chemical mimicking of heparin sulfate, thereby competing against initial virion attachment to cell surface. Recently, carragenan was also shown to be a potent inhibitor of papillomavirus infection (Buck *et al.*, 2006).

The present study cannot explain at the molecular level the discrepancies observed for STb binding to various glycolipids using two distinct technologies. However, it clearly revealed a strong affinity of STb for sulfatide that is comparable to other bacterial toxins sharing or not a receptor of glycolipidic nature. On the other hand, the inhibition observed with λ -carragenan cannot be explained by the presence of 3SO₄-galactose residue, as found on sulfatide but perhaps by 2- 6 SO₄-galactose residues. Nevertheless, this study indicated that SPR technology represent an interesting way to screen rapidly for inhibitory molecules. In fact, IPEC-J2 cells when used as a cellular model confirmed the inhibitory potential of this compound on STb permeabilization process. The selected inhibitors could then be tested using intestinal cells in culture and then in the more fastidious animal models to ascertain their efficacy.

For now, no commercial vaccine is available for STb toxin. It is thus tempting to suggest that λ -carragenan could be used as a prophylactic agent to control STb diarrhea in pigs. For example, λ -carragenan could be added to the feed of animals, in relatively small amounts, during weaning, the period for which the intoxication with STb is most noted, and for some weeks thereafter (Fairbrother *et al.*, 2005). This polysaccharide, readily available, will have to be tested in animals before a conclusion can be drawn as its utility in preventing STb diarrhea in the field.

Acknowledgements

This work was supported by grants to J.D.Dubreuil (# 139070-01) from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and by the Fonds Québécois de la recherche sur la nature et les technologies (# 2007-PR-114426). The authors thanks P. Vincent from the Centre de recherche en reproduction animale de l'Université de Montréal for the flow cytometry analyses.

References

- Beausoleil HE & Dubreuil JD (2001) *In vitro* binding characteristics and affinity for sulfatide of *Escherichia coli* STb enterotoxin. *Receptors Channels* **7**: 401-411.
- Beausoleil H E, Labrie V & Dubreuil J D (2002a) 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, Lepine F & Dubreuil J D (2002b) LC-MS analysis of pig intestine sulfatides: interaction with *Escherichia coli* STb enterotoxin and characterization of molecular species present. *FEMS Microbiol Lett* **209**: 183-188.
- Bovin N V, Tuzikov A B, Chinarev A A & Gambaryan A S (2004) Multimeric glycotherapeutics: new paradigm. *Glycoconj J* **21**: 471-478.
- Buck C B, Thompson C D, Roberts J N, Muller M, Lowy D R & Schiller J T (2006) Carrageenan is a potent inhibitor of papillomavirus infection. *PLoS Pathog* **2**: e69.
- Carlucci M J, Scolaro L A., Nosedà M D, Cerezo A S & Damonte, E B (2004) Protective effect of a natural carrageenan on genital herpes simplex virus infection in mice. *Antiviral Res* **64**: 137-141.

- Fairbrother J M, Nadeau & E, Gyles C L (2005) *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim Health Res Rev* **6**: 17-39.
- Gonçalves C, Vachon V, Schwartz J L & Dubreuil J D (2007) The *Escherichia coli* enterotoxin STb permeabilizes piglet jejunal brush border membrane vesicles. *Infect Immun* **75**: 2208-2213.
- Guarino A, Cohen M, Thompson M, Dharmasathaphorn K & Giannella R (1987) T84 cell receptor binding and guanyl cyclase activation by *Escherichia coli* heat-stable toxin. *Am J Physiol* **253**: G775-780.
- Handl C E & Flock J I (1992) STb producing *Escherichia coli* are rarely associated with infantile diarrhoea. *J Diarrhoeal Dis Res* **10**: 37-38.
- Konlee M (1998) Sulfated polysaccharides (chondroitin sulfate and carrageenan) plus glucosamine sulfate are potent inhibitors of HIV. *Posit Health News* 4-7.
- 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.
- MacKenzie C R, Hiramata T, Lee K K, Altman E & Young N M (1997) Quantitative analysis of bacterial toxin affinity and specificity for glycolipid receptors by surface plasmon resonance. *J Biol Chem* **272**: 5533-5538.
- Ménard L P, Lussier J G, Lépine F, Paiva de Sousa C & Dubreuil J D (2004) Expression, purification, and biochemical characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1. *Protein Expr Purif* **33**: 223-231.
- Michel G, Nyval-Collen P, Barbeyron T, Czjzek M & Helbert W (2006) Bioconversion of red seaweed galactans: a focus on bacterial agarases and carrageenases. *Appl Microbiol Biotechnol* **71**: 23-33.
- Mozsolits H, Wirth H J, Werkmeister J & Aguilar M I (2001) Analysis of antimicrobial peptide interactions with hybrid bilayer membrane systems using surface plasmon resonance. *Biochim Biophys Acta* **1512**: 64-76.

- Rousset E & Dubreuil J D (2000) Les récepteurs des entérotoxines bactériennes. *Vet Res* **31**: 413-435.
- Rousset E, Harel J & Dubreuil J D (1998a) Sulfatide from the pig jejunum brush border epithelial cell surface is involved in binding of *Escherichia coli* enterotoxin b. *Infect Immun* **66**: 5650-5658.
- Rousset E, Harel J & Dubreuil J D (1998b) Binding characteristics of *Escherichia coli* enterotoxin b (STb) to the pig jejunum and partial characterization of the molecule involved. *Microb Pathog* **24**: 277-288.
- Talarico L B, Zibetti R G, Faria P C, Scolaro L A, Duarte M E, Nosedá M D, Pujol C A & Damonte E B (2004) Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactans from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia cremulata*. *Int J Biol Macromol* **34**: 63-71.

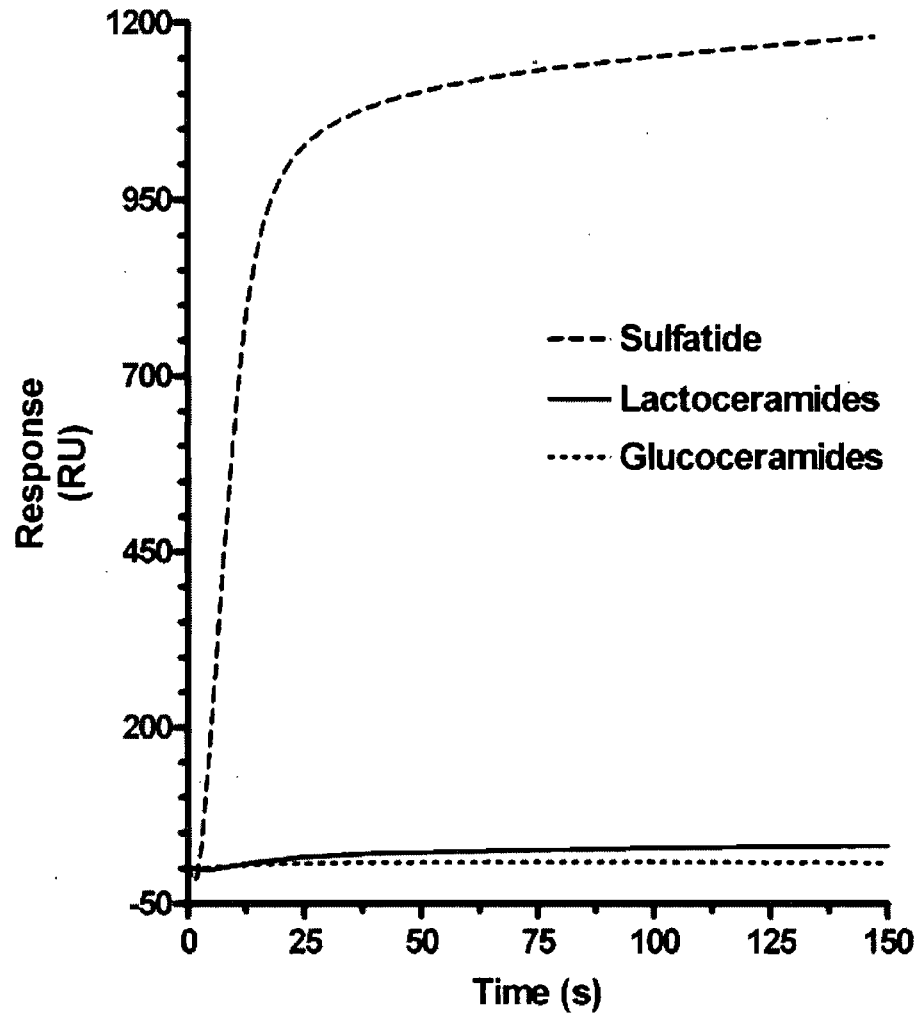


Figure 1: Binding of STb to sulfatide, lactoceramide and glucoceramide immobilized on HPA chips. Thirty μl of STb toxin (80 ng/ml) was injected at 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ over the glycolipid-covered sensor chip. These experiments were repeated 3 times. A representative sensorgram is shown. The dissociation phase is not shown.

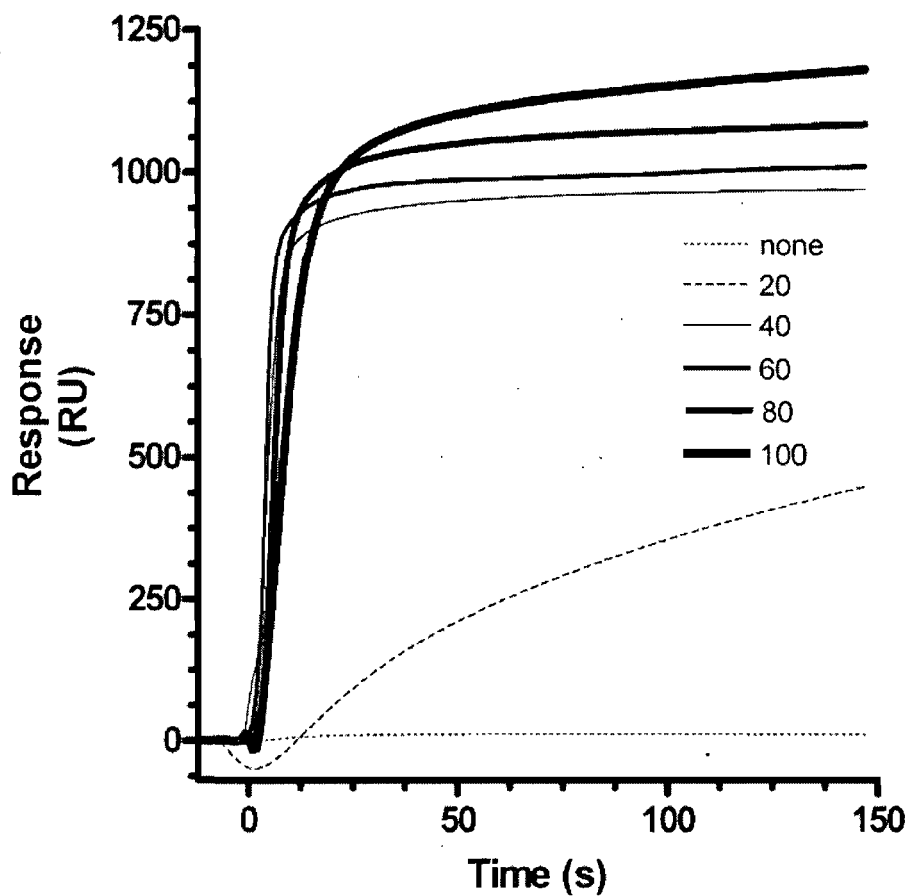


Figure 2: SPR analyses of various concentrations of STb binding to sulfatide immobilized on HPA chips. The figure is a representative sensorgram. Three independent experiments were done. Saturation of binding was observed at a concentration of approximately 40 ng/ml.

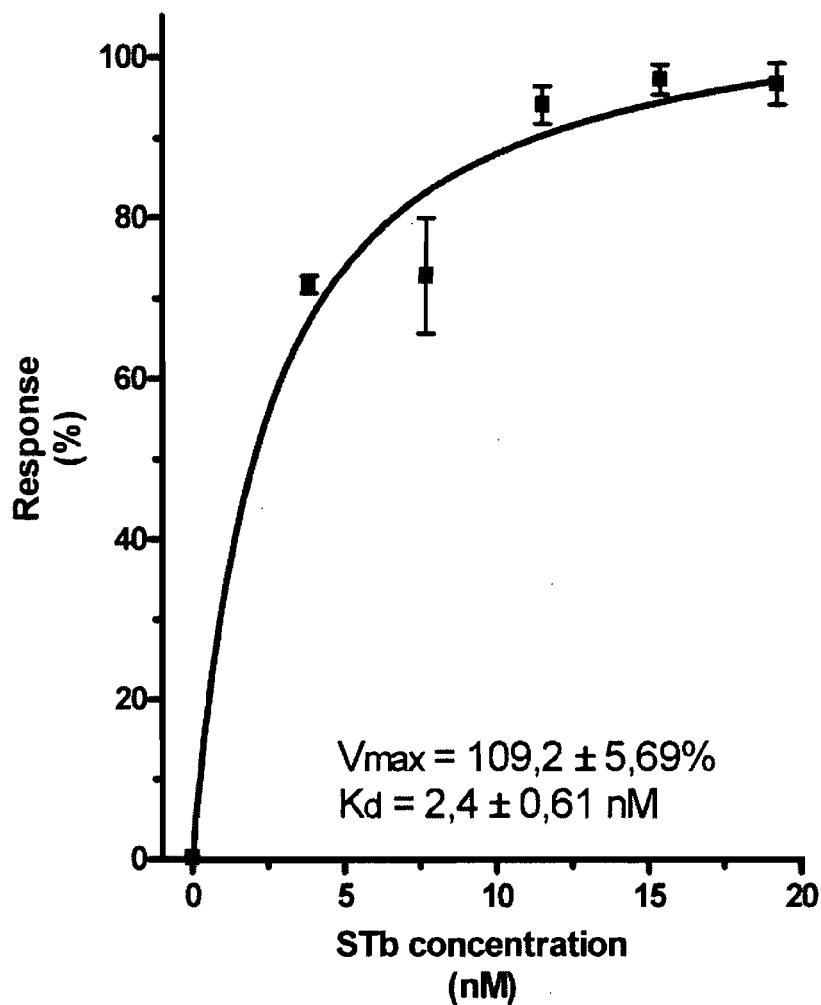


Figure 3: Saturation curve of STb binding to sulfatide. The plotted data are averages from 3 independent experiments. Insert shows the calculated residuals for various STb concentrations taking into account one binding site for STb. The curve was obtained using nonlinear regression. The K_d was determined from the fitted curve.

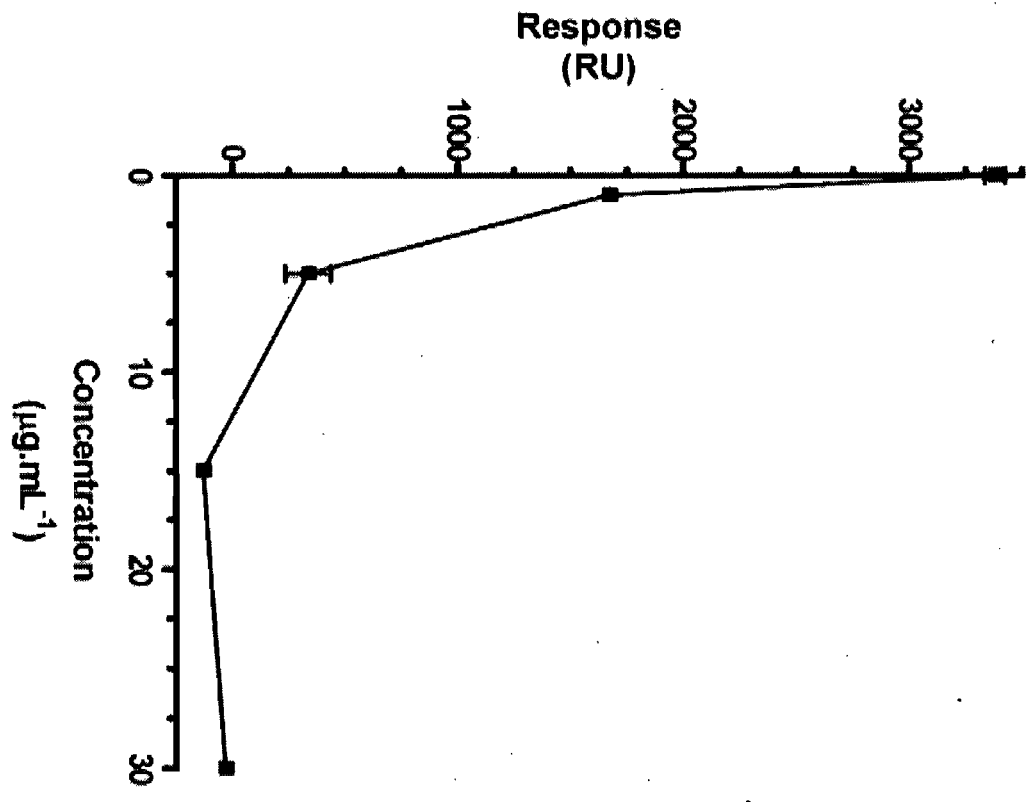
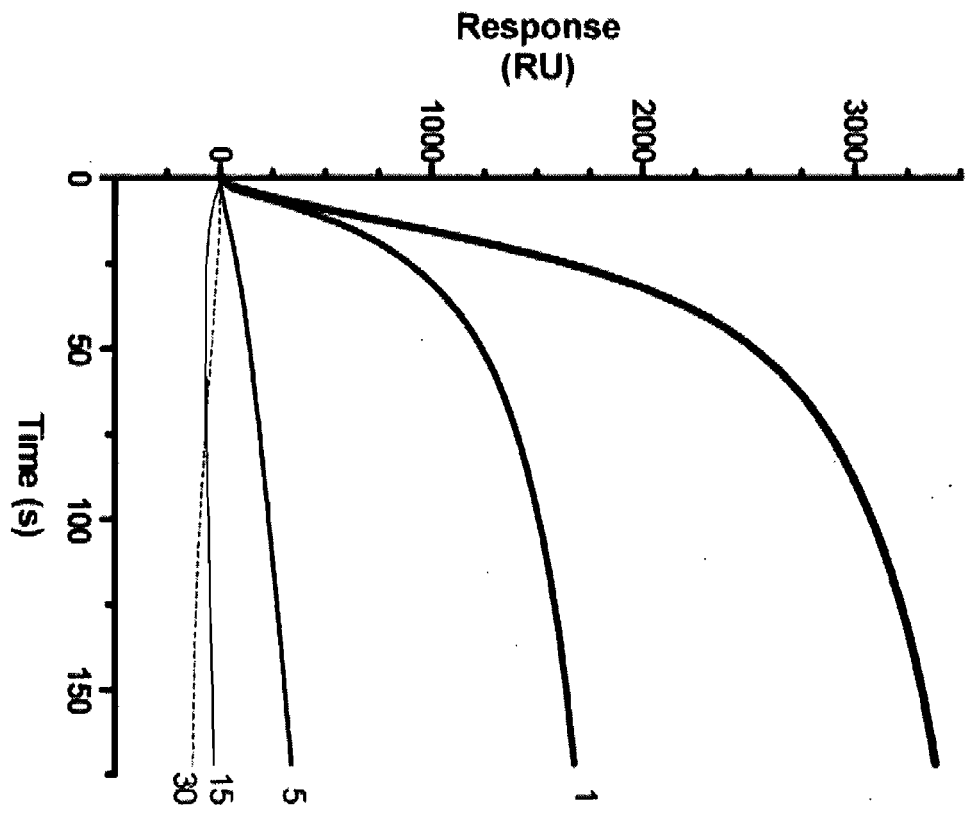


Figure 4: Inhibitory assay using various concentrations of λ -carragenan. STb was pre-incubated for 15 min with λ -carragenan added to the running buffer before the experiment was carried out. A) Sensorgram data average obtained with 0, 5, 15 and 30 $\mu\text{g/ml}$ of λ -carragenan B) Inhibition curve for the corresponding amount of λ -carragenan added. RU_{max} for each sensorgram is expressed as RU in function of the concentration in λ -carragenan. Total inhibition of the reaction is observed around 10 $\mu\text{g/ml}$.

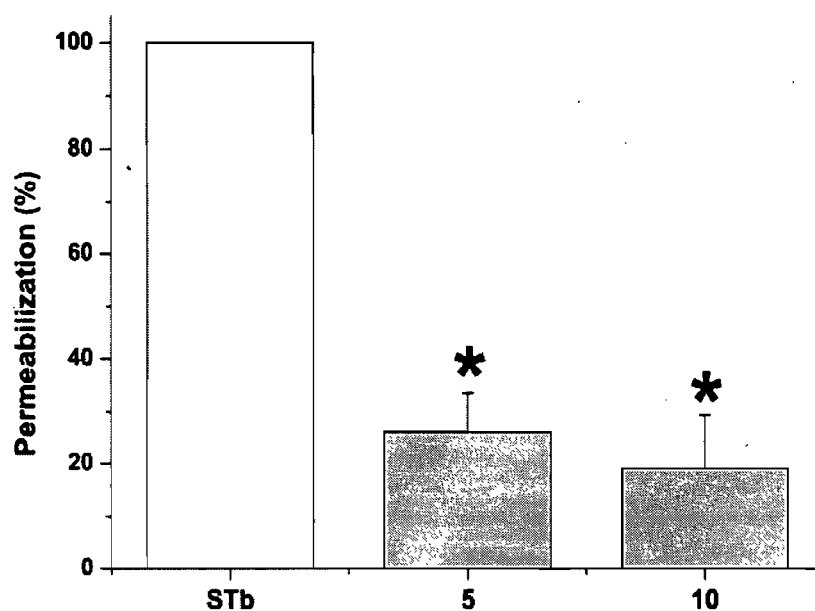


Figure 5: Effect of λ -carragenan on STb permeabilization of IPEC-J2 cells. STb and λ -carragenan was added at 5 and 10 $\mu\text{g/ml}$ to IPEC-J2 cells after pre-incubated for 30 min. After treatments of the cells for 1h, they were transferred into fresh medium and grown for 24h at 37°C. Then, PI and CFDA fluorophores were added. Fluorescence was evaluated in a FACS Vantage SE (Becton, Dickinson) on, at least, 10,000 cells. Permeabilization percentages are shown with the standard deviation. A Student t-test was performed on the data (* $p < 0.05$).

ARTICLE 3

Effect of *Escherichia coli* STb toxin on the mitochondrial membrane potential and cell viability of NIH-3T3 cells

Carina Gonçalves and J. Daniel Dubreuil*

À soumettre

Introduction

La toxine STb provoque de la desquamation, de l'atrophie partielle des microvillosités des cellules épithéliales et de la diarrhée chez le porcelet (Rose *et al.* 1987 ; Whipp *et al.* 1987). STb s'internalise dans des cellules épithéliales humaines en culture et des entérocytes de rat (Chao et Dreyfus 1997 ; Labrie *et al.* 2002). STb active une cascade intracellulaire qui comprend l'augmentation de calcium intracellulaire, l'activation de PLA₂, PLC, CaMK-II et la production de sécrétagogues (5-HT et PGE₂) qui induisent la sécrétion d'électrolytes et d'eau. Cependant, les conséquences de l'internalisation de STb dans le mécanisme d'action intracellulaire restent inconnues. L'objectif de cet article est de déterminer les implications de l'internalisation de STb au niveau de la cascade intracellulaire.

Nous avons étudié l'activité de STb sur les cellules NIH-3T3 par cytométrie en flux et par microscopie confocale. Le traitement des cellules NIH-3T3 marquées avec l'iodure de propidium (PI) et le 5-(and 6) carboxyfluorescéine diacétate (CFDA) a permis d'observer l'effet de STb sur la perméabilité de la membrane cellulaire. STb a été couplé au FITC afin de suivre son internalisation dans les cellules en culture marquées au DAPI (sonde nucléaire) et au Mitotracker® Red CMXRos (sonde mitochondriale). En utilisant la sonde JC-1 (5,5',6,6'-tétrachloro-1,1',3,3' tétraéthylbenzimidazolocarbo-cyanine iodide), un fluorochrome sensible au potentiel mitochondrial, nous avons également observé les variations de potentiel de membrane mitochondrial.

**Effect of *Escherichia coli* STb toxin on the mitochondrial
membrane potential of NIH-3T3 cells**

Carina Gonçalves and J. Daniel Dubreuil*

*Groupe de recherche sur les maladies infectieuses du porc (GREMIP), Département de
pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal,
Saint-Hyacinthe, Canada*

Running title: STb activity on mitochondrial membrane potential

*Corresponding author.

Mailing address: 3200 rue Sicotte, Faculté de médecine vétérinaire, Université de
Montréal, Québec, Canada, J2S 7C6. Phone: (450) 773-8521 ext.18433.

Fax: (450) 778-8108. E-mail [REDACTED]

ABSTRACT

Escherichia coli STb enterotoxin induces rapid fluid accumulation in the small intestine of various animal species but is principally associated with swine diarrhea. Previous studies have shown that STb could cause microscopic histological alterations in animal intestinal models. The occurrence of disrupted intestinal epithelium at the villous tips could be the result of cell death induced by the toxin. To study the effects of STb toxin, we used as a cellular model NIH-3T3 cells, a mouse fibroblast cell line. Using various probes specific for cell organelles or the cellular physiological state, we tried to understand STb activity using flow cytometry and confocal microscopy. In NIH-3T3 cells labeled with propidium iodine and carboxyfluorescein diacetate, STb permeabilized the plasma membrane and that cellular esterases remained active. Confocal microscopy showed that FITC-labelled STb toxin molecules were internalized. They were found scattered in the cytoplasm and observed inside compartments resembling vesicles. Moreover, important clusters of FITC-STb were observed after 6 hours in the cells and these clusters matched with mitochondria labelling using Mitotracker® Red CMXRos. The cell population treated with STb showed histological alterations such as membrane budding, granular cytoplasm and enlarged nucleus. As a result of cell treatment, an apoptotic cell population was observed and it increased linearly with the STb dose. Using JC-1 probe, a fluorescent mitochondrial potential sensor, we observed mitochondria hyperpolarization due to STb. The STb colocalization observed could explain the mitochondria hyperpolarization, the histological alterations as well as the altered cell state observed. Altogether, these results

provide new information, at the cellular level, on the role of STb toxin in the development of diarrhea.

INTRODUCTION

STb is one of the heat-stable enterotoxins produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). This toxin is responsible for a reversible alteration in intestinal secretion and contributes to diarrhea in various animal species including humans (Dubreuil *et al.*, 2008). STb is synthesized as a 71 amino acids precursor which undergoes a 23 residues signal sequence cleavage (Lee *et al.*, 1983; Kupersztoch *et al.*, 1990). Mature STb toxin corresponds to a 48 amino acids peptide with a molecular weight of 5.2 kDa and a basic isoelectric point (pI = 9.6) (Handl *et al.*, 1993). STb tridimensional structure shows two anti-parallel alpha-helices (Cys10-Lys22, amphipathic, and Gly38-Ala44, hydrophobic) connected by a glycine-rich loop (Sukumar *et al.*, 1995). Two disulfide bridges (Cys10-Cys48 and Cys21-Cys36) stabilize the structure (Sukumar *et al.*, 1995) and both bridges are necessary for enterotoxicity (Arriaga *et al.*, 1995; Okamoto *et al.*, 1995). Moreover, *in vitro* STb oligomerization, as hexamers and heptamers, seems to be important for toxicity expression (Labrie *et al.*, 2001b).

In vitro studies on different cell types, including Madin-Darby canine kidney, HT-29/C1 intestinal epithelial cells and primary rat pituitary cells, demonstrated that the intestinal secretion pathway involves the activation of a pertussis toxin sensitive $G_{\alpha_{i3}}$ protein (Dreyfus *et al.*, 1993). This activation results in the increase of intracellular calcium

concentration by a receptor-dependent ligand-gated Ca^{2+} channel. The high intracellular Ca^{2+} level is presumably involved in the activation of a calmodulin-dependent protein kinase II (CaMK II) which could open an undetermined ionic channel (Fujii *et al.*, 1997). Furthermore, CaMK II also activates protein kinase C and consequently the cystic fibrosis trans-membrane receptor (CFTR). The elevated intracellular Ca^{2+} concentration may also induce the activation of phospholipase A_2 and C which catalyze the release of arachidonic acid from the membranar phospholipids. Finally, the production of prostaglandin E_2 and serotonin were demonstrated (Hitotsubashi *et al.*, 1992; Peterson & Whipp, 1995; Fujii *et al.*, 1997). Those secretion agents release H_2O , HCO_3^- , Na^+ and Cl^- in the intestinal lumen (Dubreuil, 2008). This activation cascade explains the fluid accumulation observed in the intestinal loop assay (Harel *et al.*, 1991; Hitotsubashi *et al.*, 1992; Labrie *et al.*, 2001a).

Sulfatide (SFT) is a glycosphingolipid which has been identified as a functional receptor for STb and is present on the intestinal cell membrane (Rousset *et al.*, 1998; Beausoleil & Dubreuil, 2001). Our laboratory determined a dissociation constant of 2.4 ± 0.6 nM for the STb-sulfatide interaction (Gonçalves *et al.*, 2008). Recently, experiments on pig jejunal brush border membrane vesicles demonstrated that STb is able to form ionic pores (Gonçalves *et al.*, 2007). These experiments showed the ability of STb's to affect epithelial cell permeability. Moreover, STb had been shown using trypan blue to permit adsorption of this stain by various cell lines. A good correlation was observed between the trypan blue uptake and the rat loop assay (Labrie *et al.*, 2001a; Beausoleil *et al.*, 2002). STb internalization was observed in rat intestinal loops by transmission electron microscopy

(Labrie *et al.*, 2002). Still, the intracellular target(s) for STb toxin remains unknown for now.

In animal intestinal models, microscopic alterations were observed in the jejunal mucosa following incubation of STb-containing supernatants. The toxin provokes the loss of villous absorptive cells and partial atrophy of villi (Whipp *et al.*, 1986; Whipp *et al.*, 1987; Rose *et al.*, 1987). In this study, we were interested in understanding the effect of STb on NIH-3T3 cell membrane permeability as previous studies had shown formation of transitory pores in pig brush border membrane vesicles (Gonçalves *et al.*, 2007). NIH-3T3 cells were selected as we showed readily internalization of the toxin in preliminary studies (S. Penel and J.D. Dubreuil, unpublished).

MATERIALS AND METHODS

NIH-3T3 cell line. The Swiss mouse embryonic fibroblast cell line (NIH-3T3) was kindly supplied by Dr. Robert Ivan Nabi (University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada). Cells were grown in DMEM supplemented with 10% newborn calf serum, non-essential amino acids (1%), vitamins (1%), glutamine (1%) and penicillin/streptomycin antibiotics (1%) (complete medium) (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Cells were grown in 75-cm² tissue culture flasks at 37°C, 5% CO₂ and routinely trypsinized before 80% of confluence was reached.

STb production and purification. STb toxin was produced according to a previously described method (Gonçalves *et al.*, 2007). STb was quantified spectrophotometrically at 214 nm using aprotinin as the reference protein. EZ-Label FITC protein labeling kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) was used to prepare FITC-labeled STb toxin.

Cell treatment conditions. Cells were grown for 2 days in 6-well plates at a density of 50,000 cells per well. Cells were washed with DMEM-100 mM HEPES (pH 7.4) and incubated in 1ml of the same buffer in presence or absence of STb (5 to 20 µg/ml). After 1 h, the medium was removed and substituted with complete medium and cells were grown for 24 h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. As a positive apoptosis control, 10 µM camptothecin (Sigma Aldrich, Oakville, ON, Canada) in complete medium, was used in which the cells were placed for 24 h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere.

Membrane integrity evaluation. The combined fluorochromes 5-(6) carboxyfluorescein diacetate (CFDA) and propidium iodide (PI) were used as a vital stain to evaluate cell membrane permeabilization. Cells were collected using a 0.05% trypsin-EDTA solution (Invitrogen) and 10⁶ cells/ml were simultaneously treated with 0.4 µg/ml CFDA and 2 µg/ml PI. Cells were analyzed using a fluorescence-activated cell sorting (FACS) Vantage SE instrument (Becton Dickinson Biosciences, Mississauga, ON, Canada). The instrument is equipped with an argon ion laser for the excitation of the fluorescent dye at 488 nm. CFDA fluorescent emission was detected in the FL1 channel (530±20 nm), whereas PI was detected in the FL3 channel (630±22 nm).

Confocal microscopy. An Olympus IX81 microscope which is part of a FV1000 confocal scanning system (Olympus, Melville, NY) equipped with a krypton-argon laser and the appropriate excitation and emission filters for JC-1, MitoTracker® Red CMXRos (Invitrogen) and FITC was used. For DAPI (4, 6-diamidino-2-phenylindole, Invitrogen), a laser at 405 nm was used. Sorted cells were centrifuged at x 600g. Each cell pellet was resuspended in 50 µL of PB (10mM NaHPO₄, 10mM Na₂HPO₄, pH 7.4), mounted onto glass slides and immediately observed. For labeling with DAPI (a nuclear dye), MitoTracker® Red CMXRos and FITC-STb, cells were grown 24 h on glass slides at a density of 100,000 cells. The MitoTracker® Red CMXRos probe passively diffuses across the plasma membrane and accumulates in active mitochondria. MitoTracker® probe contains a thiol-reactive chloromethyl moiety that reacts with thiols on proteins and peptides to form an aldehyde-fixative conjugate, inhibiting the release of the dye from mitochondria. Fixed cells were washed with DMEM-100mM HEPES (pH 7,4) and then incubated in 1ml of DMEM-100 mM HEPES (pH 7,4) with FITC-STb (10 µg). After 1 h, the medium was removed and was substituted with complete medium and slides were incubated at 37°C in a 5%CO₂ atmosphere for 2 h, 4 h, 6 h or 12 h. Slides were treated with MitoTracker® Red CMXRos at 1nM in DMEM-100mM HEPES (pH 7,4) for 15 min at 37°C. Cells were washed with PB and incubated with 200 µL of DAPI (0,32 µg/ml) for 5 min at room temperature. After washing twice with PB, the glass slides were mounted in 90 % glycerol-PB. Phase-contrast and fluorescence pictures were acquired with built-in

FluoView 1000 software (Olympus, Melville, NY). Representative cells from three independent experiments were observed.

Cell sorting. Cells treated with STb (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 h and subsequently with JC-1 were sorted using the FACS Vantage SE instrument. FACS was operated using a 190 mW water-cooled argon ion laser at 488 nm and a 100 μm sort sense flow cell running at 9 psi sheath pressure and a droplet frequency of 20 kHz. Signals were discriminated according to their peak forward scatter signal and were sorted based on a region of interest around their light scatter cluster together with both red and green, green alone and low green fluorescence. Samples of sorted cells were observed with an Olympus SV1000 confocal microscope.

Evaluation of the mitochondrial membrane potential. The mitochondrial membrane potential was measured using the JC-1 probe (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolocarboyanine iodide) (Invitrogen). JC-1 is a fluorescence mitochondrial potential sensor probe used for detection of membrane potential alterations. JC-1 is a cationic dye exhibiting potential-dependent accumulation in mitochondria, indicated by a fluorescence emission shift from green (~ 525 nm) to red (~ 590 nm). Membrane depolarization is identified by a change in JC-1 properties from J-aggregates (red) to a monomeric form (green). The ratio between green and red fluorescence depends only on the membrane potential and not on other factors such as mitochondrial size, shape or density which may influence single-component fluorescence signals (Cossarizza & Salvioloi, 2001; Reers *et al.*, 1995; Smiley *et al.*, 1991). Cells were collected as described for membrane integrity evaluation. One milliliter of suspended cell (1×10^6 cells) was

treated with JC-1 probe at 0.25 μ g/ml for 15 min at 37°C. Cells were treated with a final concentration of 0.1 μ mol/ml valinomycin (Sigma Aldrich, Oakville, ON, Canada) for 15 min or 5 μ L of H₂O₂ for 5 min at room temperature as a control. J-aggregates from JC-1 are formed as a linear function of voltage. When excited at 488 nm, these J-aggregates have a maximum emission at 590 nm. As voltage declines, JC-1 reverts to its monomeric form, with a maximum emission at 530 nm. JC-1 fluorescence was measured by FACS (FL-1 channel 530 \pm 20 nm, and FL-2 channel 585 \pm 42 nm).

Data analysis. At least 10,000 cells were acquired for each FACS analysis. Data were collected with the CELL Quest Pro program (Becton Dickinson) and further analyzed with WinMDI program (version 2.8; Joseph Trotter, Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, CA, USA). At least three independent experiments were conducted for each cell treatment. Statistical comparisons were made with the Student's t-test.

RESULTS

STb permeabilizes NIH-3T3 cell membranes without affecting viability

Propidium iodide is commonly used as a cell death marker as it is excluded by intact plasma membranes of live cells. The fluorescence conferred by PI is associated with cells that have lost membrane integrity. Moreover another marker, CFDA, penetrates readily the cells and is hydrolyzed by non-specific esterases. The hydrolyzed, negatively charged, product retained by cells with intact membranes presents a green fluorescence. Retention of

CFDA by cells confirms enzyme activity as well as membrane integrity, indicative together of cell viability.

In this study, we observed two sub-populations for STb-treated cells when labeled with CFDA and PI, a CFDA-labeled and a PI-CFDA-labeled population. A clear separation between the two sub-populations was observed with the various amounts of STb toxin tested (data not shown). Figure 1 shows the percentage of cells stained by both probes in presence of various concentrations of STb. The amount of PI-CFDA positive cells is in direct relation with the amount of STb added ($p < 0.05$). PI-CFDA-labeled cells indicate that STb permeabilizes cells and allows PI to penetrate but the esterases activity remains intact, corroborating cell viability.

STb toxin is internalized and colocalizes with mitochondria

Cells grown on glass slides and treated with FITC-STb toxin, for 2, 4, 6 or 12 h, indicate toxin internalization (Fig. 2). After 2 h, FITC-STb toxin was present on the plasma membrane and inside the cells (Fig. 2). Clusters of FITC-STb became visible in the cytoplasm after 6h and more clearly after 12 h. Moreover, cells were stained with two specific probes: DAPI and MitoTracker[®] Red CMXRos (Fig. 3). The pictures show cells treated with FITC-STb for 1 h and incubated 6 or 12 h. No colocalization was observed between DAPI and FITC-STb labelling (Fig. 3 D). On the other hand, colocalization between MitoTracker[®] Red CMXRos and FITC-STb was observed as yellow clusters (Fig. 3 E, merged images, indicated by arrow) inside and outside the cells indicating STb

colocalization with mitochondria. As colocalization was also observed outside the cells, we infer that mitochondria leaked or were released from the damaged cells explaining the double staining. In addition, mitochondria clusters were seen close to the nucleus (Fig. 3 E). During mitoptosis, fragmentation of mitochondria is followed by clustering of mitoptotic bodies in the perinuclear region ((Lyamzaev et al., 2008).

Cell sub-populations result from STb treatment

After obliteration of cells debris using the FACS R1 gate, cells treated with 20 µg/ml of STb and stained with PI and JC-1 were sorted in three sub-populations (Fig. 4A). The first sub-population is stained both in red and green (R2, Fig 3B); the second sub-population is strongly stained in green (R3, Fig 4D) and the third sub-population is faintly staining in green (R4, Fig 4C). Samples of sorted cells were observed under a phase contrast microscope. The R3 sub-population showed the typical morphology of live cell: round shape without apparent membrane alteration. R2 and R4 sub-populations displayed morphological changes, associated respectively, with apoptosis (enlarged nucleus and membrane budding) and with necrosis (granular cytoplasm and plasma membrane alterations). Figure 5 shows cell percentages associated with the three sub-populations identified. R3 (normal cells) sub-population is more important than the R4 (necrotic cells) sub-population. A decrease of R3 and R4 sub-populations seems related to an increase in R2 sub-population (apoptotic cells). The percentage of apoptotic cells increases linearly with the STb dose ($p < 0.05$). At 20 µg/ml of STb more than 30% of the cells were in an

apoptotic state. This is comparable to what is observed with 10 μM camptothecin, the positive control for apoptosis.

STb toxin affects the mitochondrial membrane potential

Characterization of NIH-3T3 STb-treated cells with JC-1 allowed identification of two sub-populations (Fig. 6). Untreated cells show only green fluorescence (Fig. 6A). Cells treated with valinomycin (0.1 $\mu\text{mol/L}$) for 10 min, (data not shown, but identical to H_2O_2) or 5 μL H_2O_2 for 5 min, two depolarizing compounds (Fig. 6B) allowed discrimination between depolarized (low green fluorescence) and hyperpolarized cell populations (red fluorescence).

The percentage of cells staining in red is attributable to hyperpolarization of the mitochondria. This percentage is similar for treatment with 10 μM of camptothecin or with 3.8 μM (or 20 $\mu\text{g/ml}$) of STb toxin (Fig. 6 C and D), respectively $27,5 \pm 9,5 \%$ and $31,5 \pm 6,9 \%$ (Fig. 6E). This result suggests that STb activity on mitochondrial membrane potential is similar to the effect of camptothecin that affects the activity of topoisomerase I leading to cell apoptosis. Figure 6E shows that hyperpolarization of cells treated with STb is a dose-dependent phenomenon as revealed by a linear increase in the red to green ratio ($p < 0.05$) (Fig. 2F).

DISCUSSION

This study was performed to evaluate the effect of *E. coli* STb enterotoxin on NIH-3T3 cell permeability. STb was previously described as an enterotoxin permeabilizing several cell lines (Beausoleil *et al.*, 2002). Moreover, this toxin has been shown to permeabilize brush border membrane vesicles from piglet jejunum by forming nonspecific pores (Gonçalves *et al.*, 2007). In the present study, we demonstrate that STb provokes a loss of membrane integrity permitting PI uptake in NIH-3T3 cells. The small percentage of PI-CFDA stained cells could be explained by transient membrane permeability and the R1 gate use to obliterate cell debris. This gating was done on a cell sample not treated with STb but nevertheless where cell integrity was affected. PI-only positive cells corresponded to dead cells and the quantity was the same for STb-treated than untreated cells (data not shown). As PI-positive cells were also stained by CFDA, it demonstrated esterase activity, indicating that STb allows PI to enter without inducing cell mortality. Beausoleil *et al.* (2002) using a trypan blue uptake bioassay observed no cell mortality of trypan blue-positive cells using a MTT assay. In this assay, MTT (3-(4,5 dimethylthiazol-2,5 diphentyltetrazolium bromide is reduced to formazan in the mitochondria of living cells. Our results confirm the ability of STb to permeabilize cells without disturbing mitochondrial metabolism, at least, on a short period of time (1h). Some studies have shown that STb could induce microscopic alterations of the intestinal mucosa, as loss of villous absorptive cells and partial atrophy of villi (Rose *et al.*, 1987, Whipp *et al.*, 1986; Whipp *et al.*, 1987). Internalization of STb toxin had been observed in

rat intestinal loops using anti-STb colloidal gold-labelled antibodies and transmission electron microscopy (Labrie *et al.*, 2002). No clear explanation of STb internalization into rat intestinal jejunal cells was given. Here, we clearly observe STb internalization into the NIH-3T3 cells. First, STb toxin appears to be associated with the plasma membrane and after 2h it enters the cell cytoplasm into compartments that resemble vesicles. Clusters of FITC-STb become visible in the cell cytoplasm. Cell sub-populations resulting from STb treatment indicated an apoptotic and a necrotic state corroborating the inferred cellular death observed in previous studies. However, apoptosis was the main effect associated with STb toxin activity as the apoptotic cell percentage increased linearly with the amount of STb. In spite of the fact that results obtained with the JC-1 probe indicated a connection between STb and mitochondria the reason for this colocalization is not obvious. In fact, STb binds to sulfatide, a glycosphingolipid present on the cell membrane and internalization follows as previously demonstrated in the rat loop assay model (Labrie *et al.*, 2001a). JC-1, is frequently used for detection of mitochondrial hyperpolarization (earlier events) and depolarization (later events) occurring during apoptosis (Santos *et al.*, 2003, Lugli *et al.*, 2005). Mitochondria are key organelles for cell survival, their role in programmed cell death is well known and mitochondrial alterations during cell death have been well described (Thress *et al.*, 1999; Gogvadze & Orrenius 2006; Schwarz *et al.*, 2007). Alteration of mitochondrial membrane potential can be independent of cytochrome C release, caspase activation and subsequent DNA degradation which are classical known indicators of apoptosis. Cell treated with STb for 24 h showed mitochondrial

hyperpolarization. STb activity on the mitochondrial membrane potential is similar to that of camptothecin, a known inducer of cell apoptosis. In addition, STb treatment induces morphological alterations associated with apoptosis, such as enlarged nucleus and membrane budding. It was reported that other toxins induce apoptosis by a mitochondrial-dependent mechanism. For example, *Helicobacter pylori* VacA toxin is responsible for progressive cell vacuolization as well as gastric epithelium injury. VacA enters HeLa cells and colocalizes with the mitochondria where it provokes a reduction in mitochondrial membrane potential (Whilhite & Blanke, 2004; Blanke, 2005; Cover & Blanke, 2005). *Clostridium difficile* toxin B also causes apoptosis in epithelial cells by provoking an early hyperpolarization of mitochondria that follows a calcium-associated signalling pathway and precedes the final execution step of apoptosis (depolarization) (Matarrese *et al.* 2007).

Mitochondrial membranes represent a target within the cells for many bacterial toxins. Our findings suggest that damage to the mitochondrial membrane integrity through pore formation is the basis for STb mitochondria toxicity. The pore-forming toxin PorB of *Neisseria gonorrhoea* was also shown to transfer to mitochondria and induce apoptosis in Jurkat T cells (Müller *et al.*, 2000).

Although the exact mechanism of mitochondrial targeting of STb is unknown, the effect of STb is probably transitory (open and close state) explaining the mitochondria hyperpolarization observed. Colocalization observed outside the cell could be due to

mitochondria released from cells as described recently by Lyamzaev et al., (2008). Indeed, after gathering of mitochondria near the nucleus, separation of the formed mitochondrial clusters from the cytosol by membranes (mitoptotic bodies), they are released from the cells. Recently, a relationship between apoptosis, necrosis and mitochondria hyperpolarization was suggested (Skulachev, 2006; Lyamzaev *et al.*, 2008). Mitochondrial alterations can lead to necrosis, apoptosis and mitoptosis. Mitoptosis is used to describe the “suicide” related to mitochondrial disturbances, such as hyperpolarization of mitochondrial membrane as we observed in this study.

In conclusion, we demonstrated for the first time that STb permeabilizes NIH-3T3 cell membrane without affecting the esterase activity but inducing mitochondria hyperpolarization. Overall, in NIH-3T3 cells we observed a progressive alteration of cell morphology suggesting the induction of an apoptotic/mitoptotic process.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants to J.D. Dubreuil (#139070-01) from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and from the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (#2007-PR-114426). The authors wish to thank P. Vincent from the Centre de Recherche en Reproduction Animale de l'Université de Montréal for the flow cytometry analysis and his technical assistance with confocal microscopy.

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**, 4715-4720.
- Beausoleil, H. E. & Dubreuil, J. D. (2001).** *In vitro* binding characteristics and affinity for sulfatide of *Escherichia coli* STb enterotoxin. *Receptors Channels* **7**, 401-411.
- 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.
- Blanke, S. R. (2005).** Micro-managing the executioner: pathogen targeting of mitochondria. *Trends Microbiol* **13**, 64-71.
- Cossarizza, A. & Salvioi, S. (2001).** Analysis of mitochondria during cell death. *Methods Cell Biol* **63**, 467-486.
- Cover, T. L. & Blanke, S. R. (2005).** *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat Rev* **3**, 320-332.
- 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 (STB). *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **90**, 3202-3206.

- Dubreuil, J. D. (1997).** *Escherichia coli* STb enterotoxin. *Microbiology* **143**, 1783-1795.
- Dubreuil, J. D. (2008).** *Escherichia coli* STb toxin and colibacillosis: knowing is half the battle. *FEMS Microbiol Lett* **278**, 137-145.
- 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.
- Gogvadze, V. & Orrenius, S. (2006).** Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Chem Biol Interact* **163**, 4-14.
- Gonçalves, C., Vachon, V., Schwartz, J. L. & Dubreuil, J. D. (2007).** The *Escherichia coli* enterotoxin STb permeabilizes piglet jejunal brush border membrane vesicles. *Infect Immun* **75**, 2208-2213.
- Gonçalves, C., Berthiaume, F., Mourez, M. & Dubreuil, J. D. (2008).** *Escherichia coli* STb toxin binding to sulfatide and its inhibition by carragenan. *FEMS Microbiol Lett* (In press).
- 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.

- Harel, J., Lapointe, H., Fallara, A., Lortie, L. A., Bigras-Poulin, M., Lariviere, S. & Fairbrother, J. M. (1991).** Detection of genes for fimbrial antigens and enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with diarrhea. *J Clin Microbiol* **29**, 745-752.
- Hitotsubashi, S., Fujii, Y., Yamanaka, H. & Okamoto, K. (1992).** Some properties of purified *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *Infect Immun* **60**, 4468-4474.
- 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., Beausoleil, H. E., Harel, J. & Dubreuil, J. D. (2001a).** Binding to sulfatide and enterotoxicity of various *Escherichia coli* STb mutants. *Microbiology* **147**, 3141-3148.
- Labrie, V., Harel, J. & Dubreuil, J. D. (2001b).** Oligomerization of *Escherichia coli* enterotoxin b through its C-terminal hydrophobic alpha-helix. *Biochim Biophys Acta* **1535**, 128-133.
- Labrie, V., Harel, J. & Dubreuil, J. D. (2002).** *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b (STb) in vivo internalization within rat intestinal epithelial cells. *Vet Res* **33**, 223-228.
- 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.

Lugli, E., Troiano, L., Ferraresi, R., Roat, E., Prada, N., Nasi, M., Pinti, M., Cooper, E. L. & Cossarizza, A. (2005). Characterization of cells with different mitochondrial membrane potential during apoptosis. *Cytometry A* **68**, 28-35.

Lyamzaev, K.G., Nepryakhina, O.K., Saprunova, V.B., Bakeeva, L.E., Pletjushkina, O.Y., Chernyak, B.V. & Skulachev, V.P. (2008). Novel mechanism of elimination of malfunctioning mitochondria (mitopsis): Formulation of mitoptic bodies and extrusion of mitochondrial material from the cell. *Biochim Biophys Acta* Article in Press

Matarrese, P., Falzano, L., Fabbri, A., Gambardella, L., Frank, C., Geny, B., Popoff, M.R., Malorni, W. & Fiorentini, C. (2007). *Clostridium difficile* toxin B causes apoptosis in epithelial cells thriving mitochondria. *J Biol Chem* **282**, 9029-9041.

Müller, A., Gunther, D., Brinkmann, V., Hurwitz, R., Meyer, T.F. & Rudel, T. (2000) Targeting of the pro-apoptotic VDAC-like porin (PorB) of *Neisseria gonorrhoeae* to mitochondria of infected cells. *EMBO J* **19**, 5332–5343.

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.

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.

- Reers, M., Smiley, S. T., Mottola-Hartshorn, C., Chen, A., Lin, M. & Chen, L. B. (1995).** Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye. *Methods Enzymol* **260**, 406-417.
- Rose, R., Whipp, S. C. & Moon, H. W. (1987).** Effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b on small intestinal villi in pigs, rabbits, and lambs. *Vet Pathol* **24**, 71-79.
- Rousset, E., 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.
- Santos, J. H., Hunakova, L., Chen, Y., Bortner, C. & Van Houten, B. (2003).** Cell sorting experiments link persistent mitochondrial DNA damage with loss of mitochondrial membrane potential and apoptotic cell death. *J Biol Chem* **278**, 1728-1734.
- Schwarz, M., Andrade-Navarro, M. A. & Gross, A. (2007).** Mitochondrial carriers and pores: key regulators of the mitochondrial apoptotic program? *Apoptosis* **12**, 869-876.
- Skulachev, V. P. (2006).** Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. *Apoptosis* **11**, 473-485.
- Smiley, S. T., Reers, M., Mottola-Hartshorn, C., Lin, M., Chen, A., Smith, T. W., Steele, G. D. Jr. & Chen, L. B. (1991).** Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**, 3671-3675.

Sukumar, M., Rizo, J., Wall, M., Dreyfus, L. A., Kupersztuch, 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**:1718-1729.

Thress, K., Kornbluth, S. & Smith, J. J. (1999). Mitochondria at the crossroad of apoptotic cell death. *J Bioenerg Biomembr* **31**, 321-326.

Whipp, S. C., Moseley, S. L. & Moon, H. W. (1986). Microscopic alterations in jejunal epithelium of 3-week-old pigs induced by pig-specific, mouse-negative, heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin. *Am J Vet Res* **47**, 615-618.

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

Willhite, D. C. & Blanke, S. R. (2004). *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin enters cells, localizes to the mitochondria, and induces mitochondrial membrane permeability changes correlated to toxin channel activity. *Cell Microbiol* **6**, 143-154.

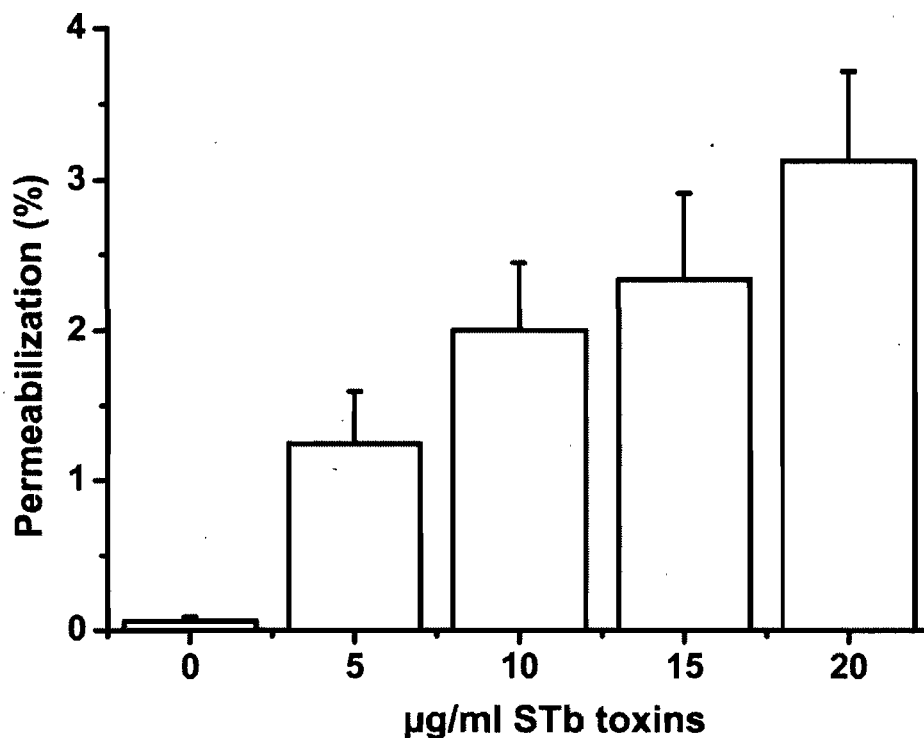


Fig. 1. Permeabilization of NIH-3T3 cells by STb toxin. Cells were treated for 1 h with 0 to 20µg/ml of STb toxin and then incubated in fresh medium for 24h at 37°C, in a 5% CO₂ atmosphere. Then, PI and CFDA probes were added. Fluorescence was evaluated on 10,000 cells using FACS. Statistical significance was determined using a Student's t-test. Results indicate a dose-dependent relationship between the quantity of STb added and the percentage of permeabilized cells (PI-CFDA positive) ($p < 0.05$) (*). No statistical difference was observed between treatment with 15 and 20µg/ml of STb.

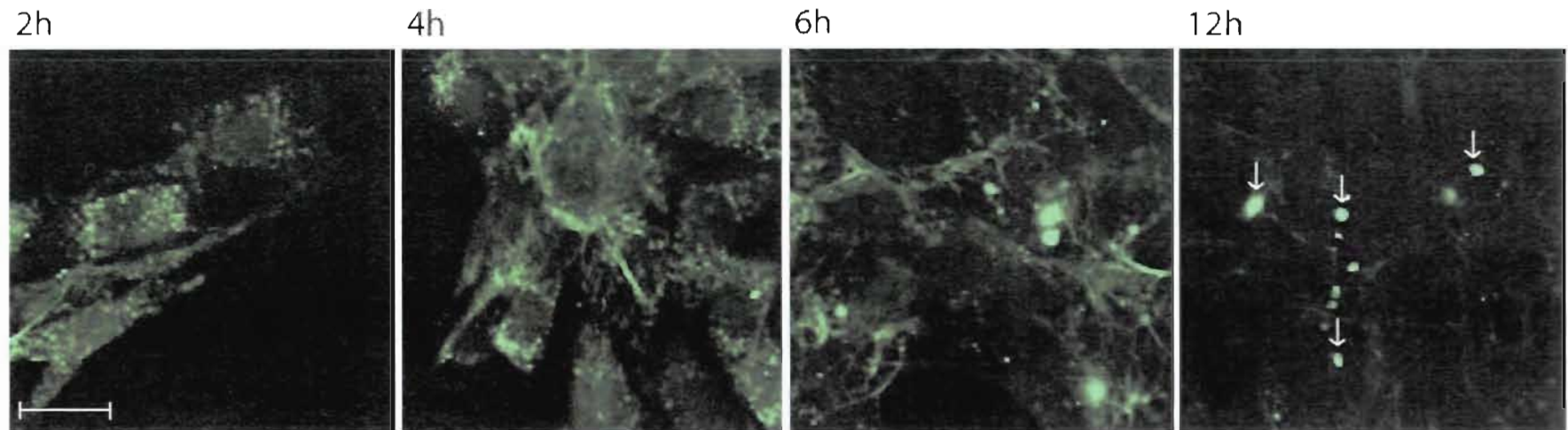


Fig. 2. Internalization of FITC-labelled STb toxin. Cells were grown on glass slides and treated with 20mg/ml FITC-STb for 2, 4, 6 and 12h. Images were taken at a magnification of x1440. Confocal microscopy pictures presented are representative of three independent experiments. FITC-STb appears on the plasma membrane and inside vesicles after 2h and can be seen as clusters in the cytoplasm after 12h (arrows). The bar corresponds to 20 μ m.

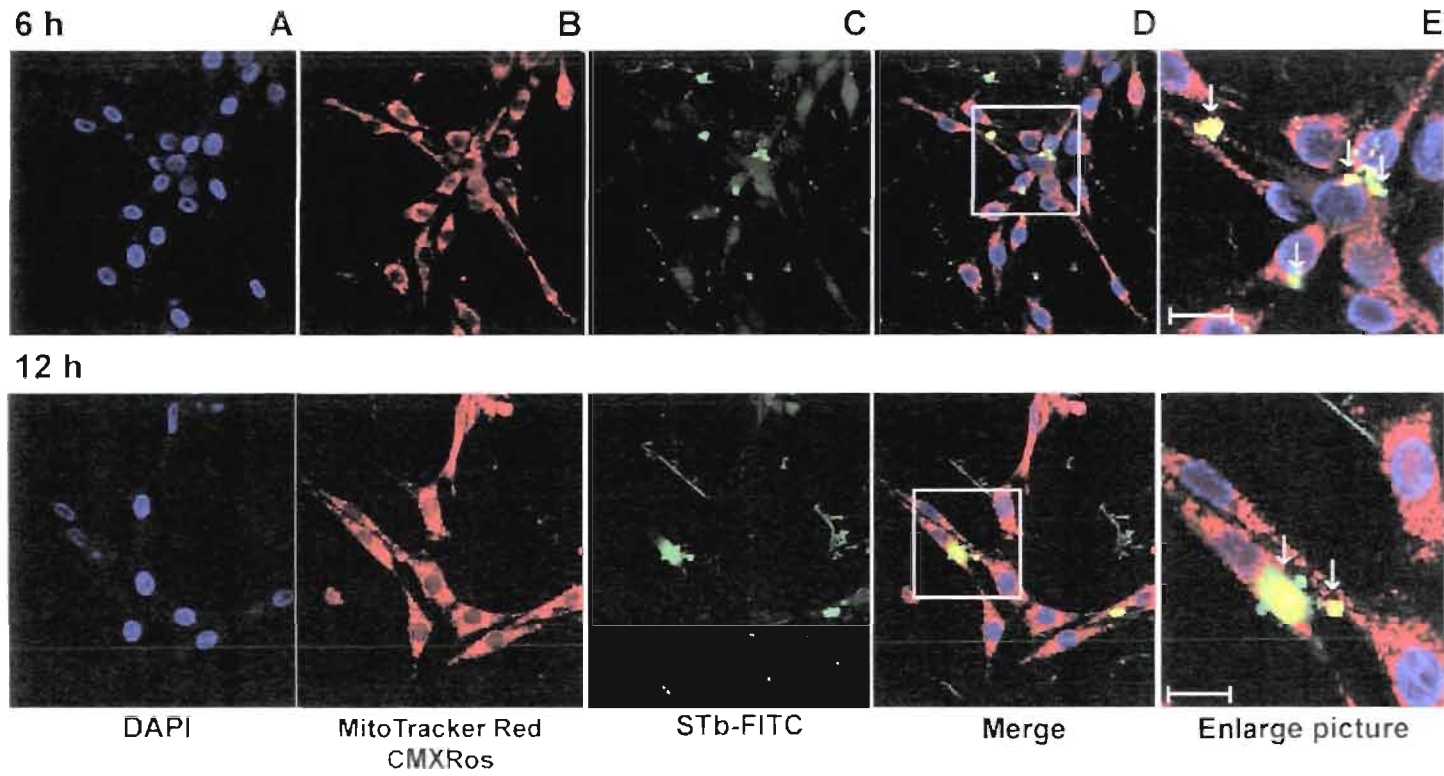


Fig. 3. Colocalization of FITC-STb with mitochondria. Cells were stained with three fluorescent dyes; FITC-STb, DAPI and MitoTracker[®] Red CMXRos. confocal microscopy images were taken at a magnification of x600 (A to D, inclusively) and the picture at right at x1440 (E). Cells were incubated for 6 or 12h with 20µg/ml FITC-STb. Panel D shows merging of the three probes. Arrows indicates colocalization of FITC-STb with the MitoTracker[®]. Confocal microscopy pictures are representative of three independent experiments. The bar corresponds to 20 µm.

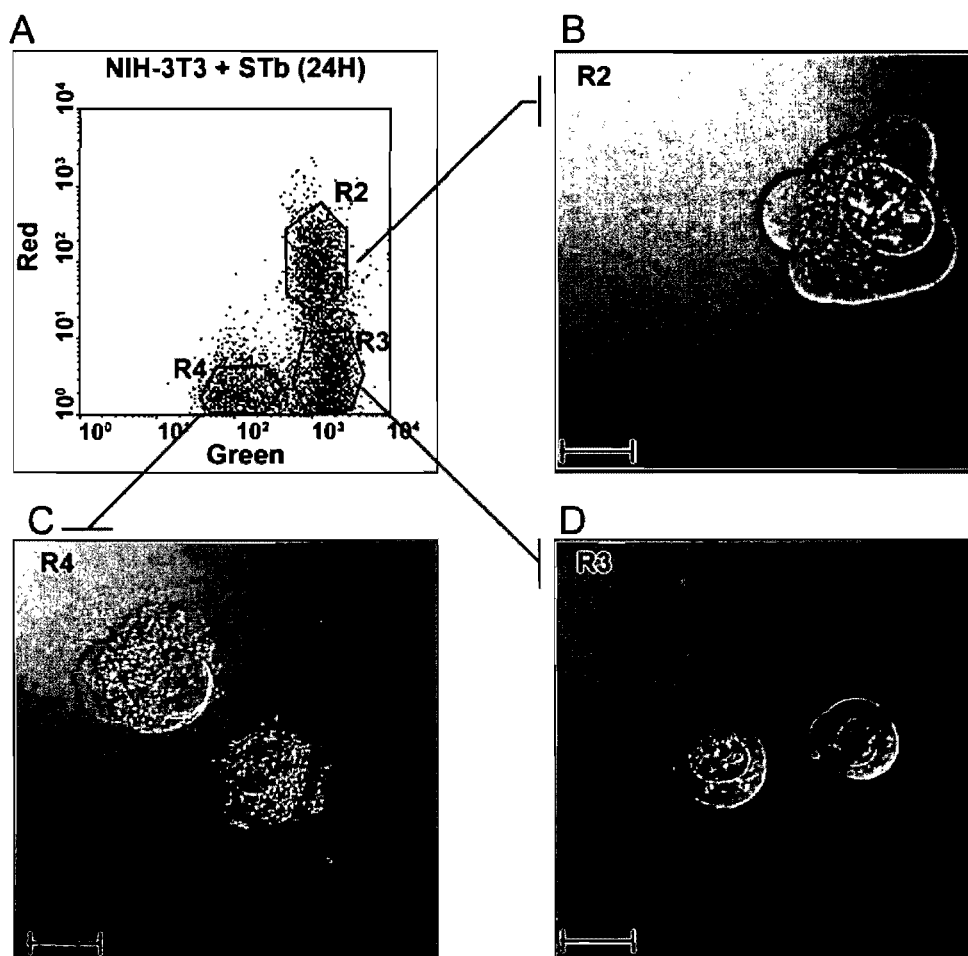


Fig. 4. Cell sub-populations result from STb treatment. Cells were sorted after treatment with 20 μ g/ml STb toxin. Panel A represents FL1 versus FL2 dot plot of cells stained with JC-1 after STb treatment. Pictures of sorted cells were obtained using phase contrast microscopy. Cells in pictures B, C, and D are from R2, R4, and R3 cluster gates, respectively (A). R2 sub-population shows enlarged nucleus and membrane budding (apoptotic cells). R4 sub-population displays granular cytoplasm and plasma membrane alterations (necrotic cells). R3 sub-population shows round shape cells without apparent membrane alteration (normal cells). Images were taken at a magnification of x1320. The bars correspond to 20 μ m.

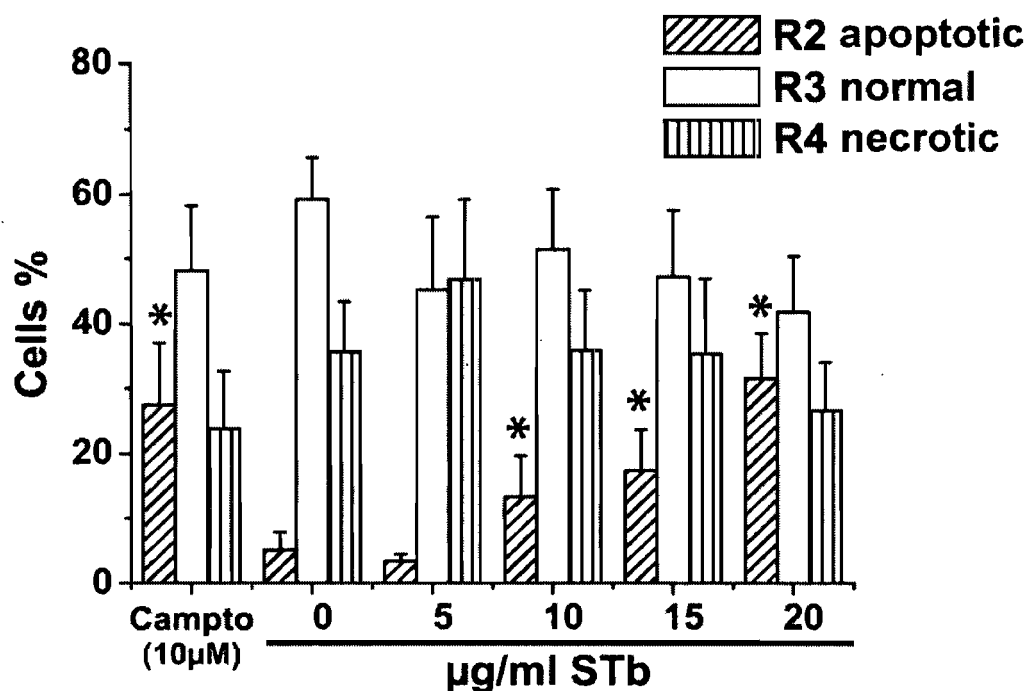


Fig. 5. Effect of STb on the cell sub-populations distribution. Cells treated with camptothecin (10µM) or STb (0 to 20µg/ml) were stained with JC-1. Graph presents percentages (mean \pm standard deviation of four independent experiments) of three cell sub-populations as identified by their fluorescence staining patterns. A decrease of the R3 and R4 sub-populations is closely associated with an increase of the R2 sub-population (apoptotic cells). No statistical difference were observed for these results ($p > 0.05$). (The apoptotic cell population increases linearly with the STb dose ($p < 0.05$) (*). Significant difference was observed between control and doses of STb, except for 5 µg/ml of STb.

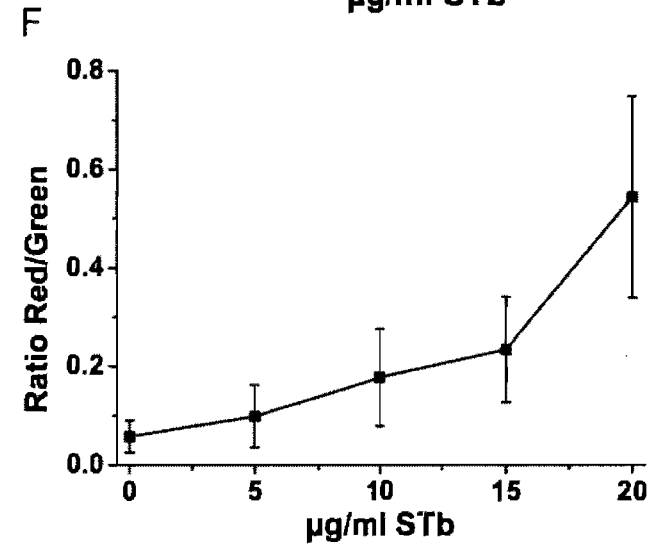
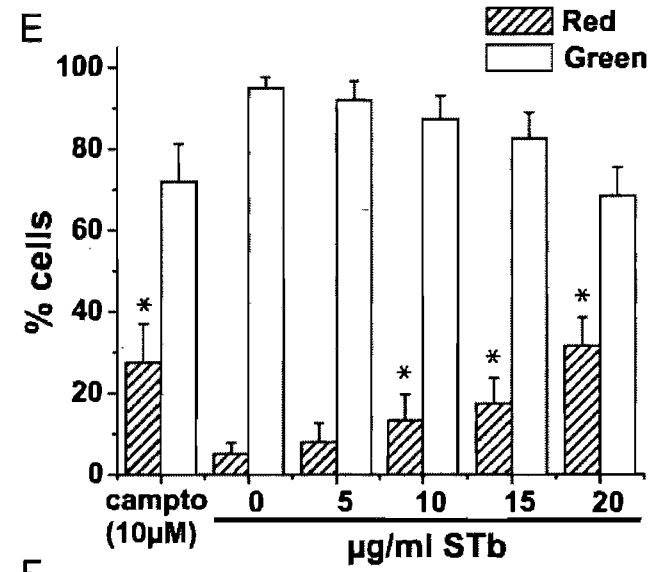
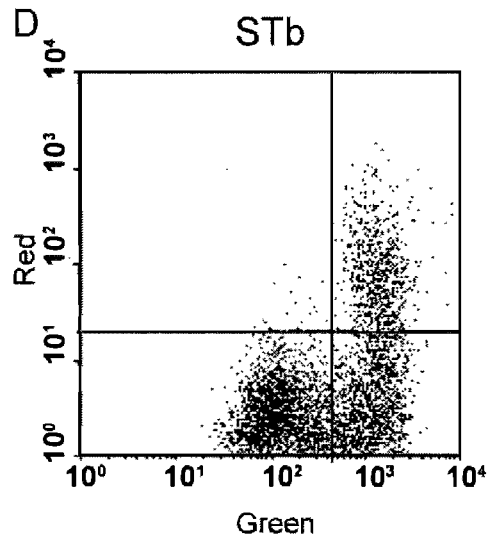
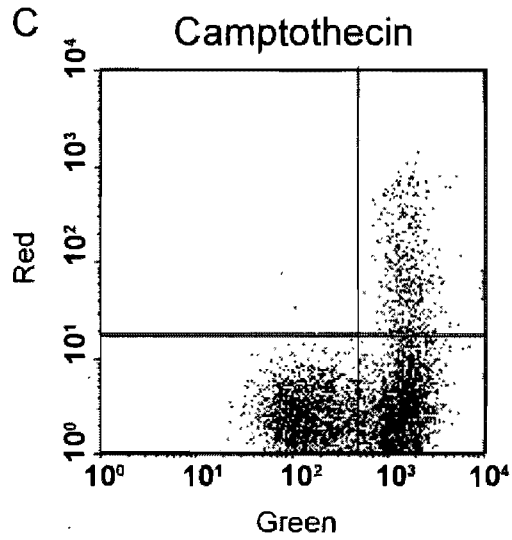
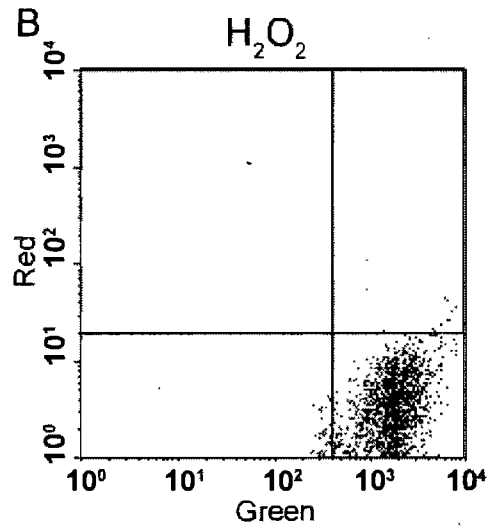
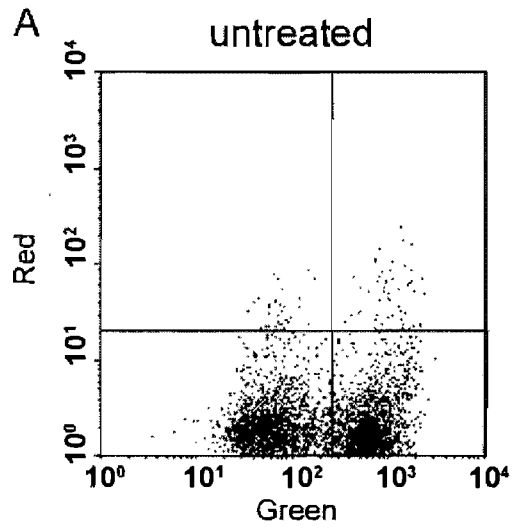


Fig. 6. Effect of STb on mitochondrial membrane potential. Cells were treated with camptothecin (10 μ M) or STb (0 to 20 μ g/ml) and stained with JC-1. Alteration of membrane potential was observed as a change in JC-1 properties from aggregated (red) to monomeric form (green). Dot plots shows untreated NIH-3T3 cells (A), cells treated with H₂O₂, a depolarizing agent (B), cells treated with 10 μ M of camptothecin for 24h (C) and with 20 μ g/ml of STb for 24h (D). Histogram (E) presents percentages (mean \pm standard deviation of four independent experiments) of two cell subpopulations separated according to their fluorescence patterns for cells treated with camptothecin (10 μ M) and STb (0 to 20 μ g/ml). Significant differences were observed between doses of STb compared to control ($p < 0.05$) (*) but not between 0 and 5 μ g/ml STb. Cells treated with camptothecin were also significantly different from untreated cells. Graph F presents ratio of red/green fluorescence for the STb-treated cells. STb toxin treatment increased the red to green fluorescence intensity ratio and indicated mitochondria hyperpolarization.

DISCUSSION

Les *E. coli* entérotoxigènes sont la principale cause de diarrhée chez les mammifères, dont l'homme. Elles ont une forte incidence économique sur l'élevage en étant l'agent responsable de diarrhée chez le bétail et les porcelets (Nagy et Fekete 1999). Les ETEC colonisent l'intestin et y sécrètent différentes entérotoxines (LT, STa, STb, EAST1). La production de ces entérotoxines mène à une réduction de l'absorption et à une augmentation de la sécrétion de fluide dans la lumière intestinale (Banwell *et al.* 1971). Les signes cliniques observés sont la diarrhée aqueuse aiguë, la déshydratation, la perte de poids, le retard de croissance et la mort (Söderlind *et al.* 1988 ; Moon et Bunn 1993 ; Nagy et Fekete 1999 ; Rousset et Dubreuil 2000). Cette thèse est orientée tout particulièrement sur l'étude du mécanisme d'action de l'entérotoxine STb.

Les ETEC colonisent la surface de l'épithélium intestinal grâce à la présence de fimbriae à leur surface. L'association des fimbriae F4 et F18 avec STb est fortement corrélée à la diarrhée chez les porcelets (Nagy et Fekete 1999 ; Francis 2002 ; Zhang *et al.* 2007). Une fois adhérees aux entérocytes, les ETEC sécrètent les entérotoxines qui sont reconnues par leurs récepteurs respectifs à la surface de la cellule.

L'entérotoxine STb est le plus souvent exprimée avec d'autres entérotoxines telles que LT, STa et EAST1. Celles-ci ne présentent pas le même mécanisme d'action, ce qui apporte un effet additif à la virulence des souches (Peterson et Whipp 1995). Comme nous l'avons décrit précédemment, l'entérotoxine STb est fortement associée aux souches ETEC isolées de porcelets souffrant de diarrhée (Zhang *et al.* 2007) et sa capacité à induire la diarrhée a été démontrée par inoculation chez des porcelets (Berberov *et al.* 2004 ; Zhang *et al.* 2006 ; Ravi *et al.* 2007).

STb reconnaît le sulfatide (SFT), un glycosphingolipide présent dans la membrane plasmique des entérocytes. Le SFT est considéré comme étant le récepteur fonctionnel de la toxine STb. Cependant diverses études font soupçonner l'existence d'autres récepteurs potentiels. STb interagit avec les groupements galactoses et glucoses sulfatés présentés par les lactocéramides et galactocéramides (Rousset *et al* 1998a, 1998b ; Beausoleil et Dubreuil 2001). Comme d'autres toxines, STb a pour récepteur un sphingolipide. La toxine CT produite par *Vibrio cholerae* et la toxine LT produite par *E. coli* interagissent avec le ganglioside GM₁ (monosialoganglioside GM1) (MacKenzie *et al.* 1997) (voir section 4).

Dans notre étude, en utilisant la technique de résonance plasmonique de surface (RPS), nous avons démontré que la toxine STb présente une meilleure affinité pour le SFT que pour les autres sphingolipides testés (voir Article 2). STb reconnaît le galactose portant un résidu sulfate en position 3 du sulfatide. Des tests d'inhibition compétitive sur des microplaques de titration ont démontré que l'interaction entre la toxine STb et le SFT est inhibée par le galactose 6-sulfate (Beausoleil *et al.* 2002b). Cependant, il n'inhibe pas la perméabilisation des cellules au bleu de trypan (Beausoleil et Dubreuil 2001). En se basant sur ces données, la lambda carragénine (λ -carragénine ou λ -carraghénine), un polymère de galactose sulfaté, a été testée à de faibles concentrations comme inhibiteur compétitif de la liaison STb/SFT. Une inhibition complète de l'interaction STb/SFT a été observée à une concentration de 10 μ g/ml de λ -carragénine. Bien que ne portant pas de galactose 3-sulfate,

la λ -carragénine comprend un grand nombre de galactoses sulfatés (en position 2 et 6, Figure 15) ce qui expliquerait l'inhibition de l'interaction de STb avec le sulfatide.

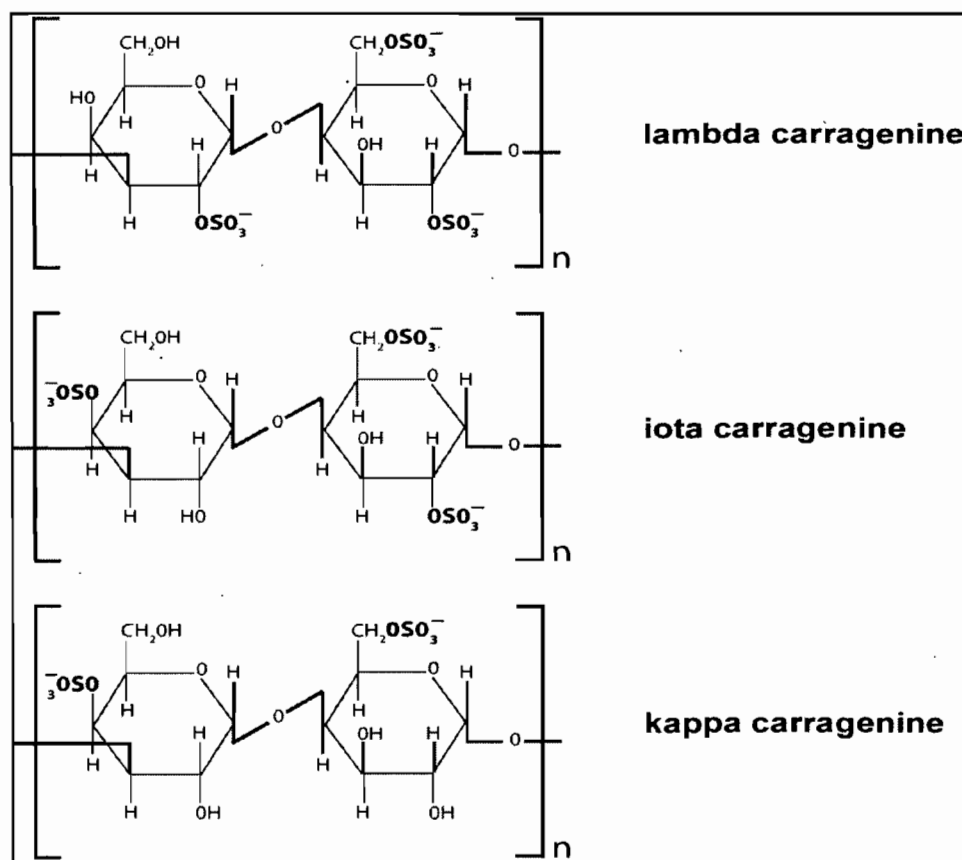


Figure 15. Formule chimique des polysaccharides lambda, iota et kappa carragénine.

La λ -carragénine est un polysaccharide sulfaté extrait d'algues rouges de diverses espèces (*Kappaphycus alvarezii*, *Eucheuma denticulatum*) (Dawes *et al.* 1993). Trois classes de polymères sont utilisées dans l'industrie alimentaire : la kappa carragénine (κ -carragénine), la iota carragénine (ι -carragénine) et la lambda carragénine

(λ -carragénine) (Figure 15) (Knutsen *et al.* 1994 ; Craigie et Wong 1979). Nous avons choisi la λ -carragénine car, à l'inverse des autres carragénines, elle n'a pas de pouvoir gélifiant et possède un taux élevé de galactoses sulfatés (Van de Velde *et al.* 2001 ; Trius et Sebranek 1996).

L'interaction de STb au SFT a lieu au niveau des microvillosités de l'épithélium intestinal porcin (duodénum, iléum, jéjunum, caecum, colon) (Rousset *et al.* 1998a). Le jéjunum de porcelet a été le modèle le plus utilisé lors d'études portant sur l'entérototoxicité de STb (Rousset *et al.* 1998a, 1998b, 1999 ; Beausoleil *et al.* 2002b). En revanche, peu d'études ont porté sur les mécanismes d'interaction de la toxine STb avec la membrane.

Dans notre étude, nous avons utilisé le modèle des vésicules de la membrane de la bordure en brosse du jéjunum porcin (voir Article 1). Les VMBB sont enrichies en lipides et protéines de la membrane apicale des entérocytes. Ce modèle permet de contrôler la composition en ions de part et d'autre de la membrane vésiculaire ainsi que d'engendrer un potentiel de membrane par un traitement à la valinomycine, un ionophore du potassium. Le potentiel de membrane généré par le flux de potassium est mesuré à l'aide de la sonde diS-C₃(5). Dès la formation d'un potentiel de membrane, cette sonde s'associe aux lipides intravésiculaires et perd ses propriétés fluorescentes (phénomène de « quenching »).

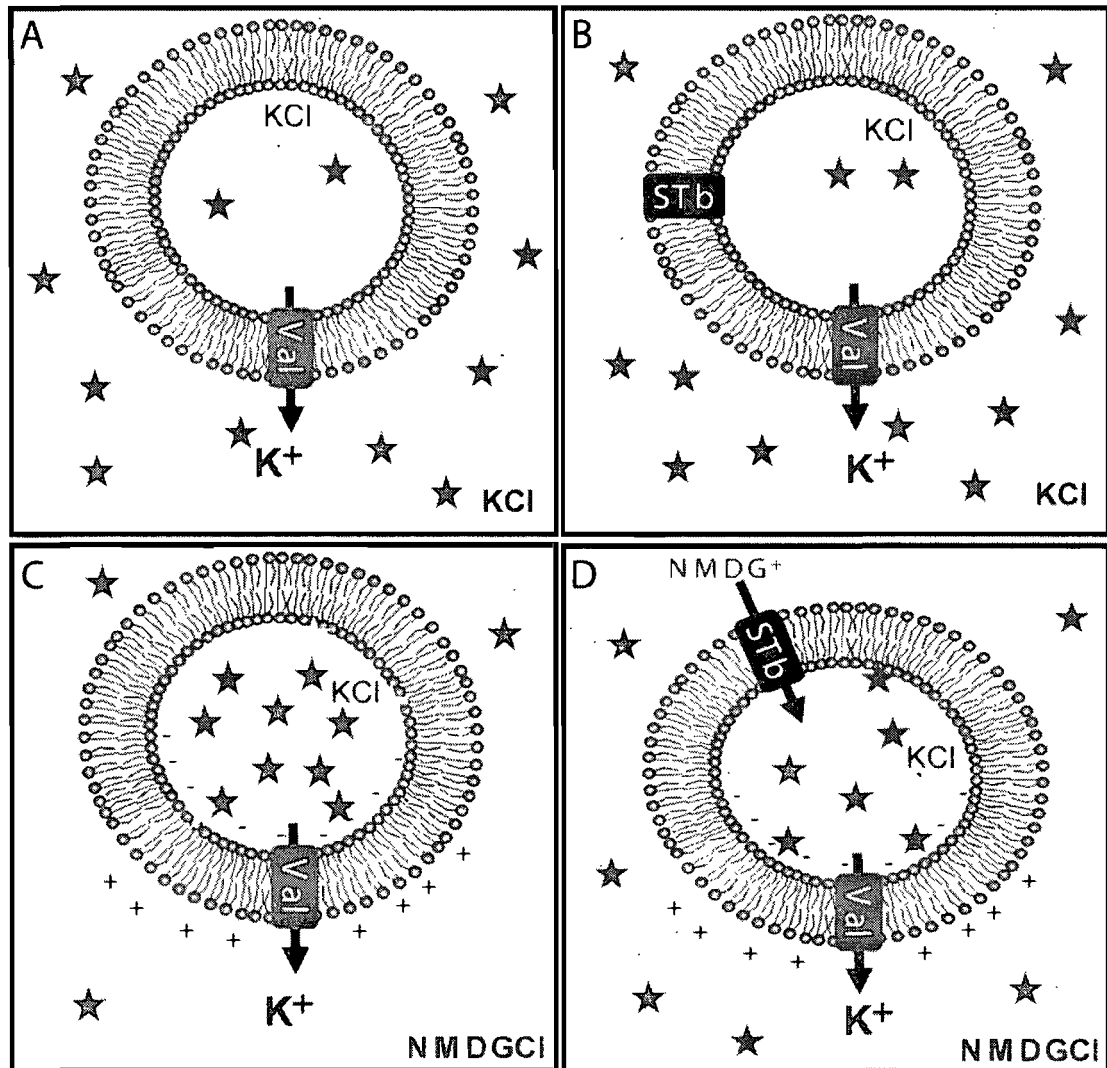


Figure 16. Échanges ioniques lors de différents traitements des VMBB. Vésicules chargées en KCl dans une solution en KCl (**A**, **B**) ou dans une solution de NMDGCl (**C**, **D**). Les traitements à la valinomycine (**A**) ou à STb (**B**) n'ont pas d'effet sur les VMBB chargées au KCl. **C**. La valinomycine permet un flux de K^+ qui génère un potentiel de membrane et provoque l'entrée de la sonde DiSC₃(5). STb atténue l'effet de la valinomycine sur le potentiel de membrane en permettant l'entrée de NMDG⁺. Les étoiles représentent la sonde DiSC₃(5) (**D**).

Dans un premier temps, nous avons observé que l'absence de gradient ionique ne permet pas de générer de potentiel de membrane par un traitement à la valinomycine

(Figure 16A) ou par STb (Figure 16B). À l'inverse, un potentiel de membrane est généré en présence d'un gradient ionique (Figure 16C, Figure 16D). Le potentiel de membrane a pu être observé dans différentes conditions expérimentales : vésicules chargées en KCl et traitées à la valinomycine dans différentes solutions (NMDGCl, NaCl, LiCl, TEACl et TMACl).

Dans un second temps, nous avons démontré que STb perméabilise efficacement la membrane pour d'autres ions que le potassium et réduit le potentiel de membrane engendré par la valinomycine (Figure 16D). Le traitement des vésicules par STb provoque une réduction du potentiel de membrane causée par l'entrée de cations dans les VMBB. STb dépolarise la membrane en permettant l'entrée de cations tels que le sodium (Na^+), le N-méthyl-D-glucamine (NMDG^+), le lithium (Li^+), le tétraméthylammonium (TMA^+) et le tétraéthylammonium (TEA^+).

Les données publiées sur une éventuelle implication du pH dans l'interaction de STb à son récepteur sont contradictoires et difficilement comparables compte tenu de la différence entre les méthodologies utilisées. D'une part, une plus grande affinité de STb biotinylé a été démontrée entre les pH 5,5 et 7 sur des sections de jéjunum de porcelet (Rousset *et al.* 1998b).

D'autre part, l'attachement de STb au SFT n'est pas affecté de façon quantitative par le pH, que ce soit sur plaques de titration (Beausoleil *et al.* 2001) ou dans le modèle des VMBB. Ces deux derniers modèles, *in vitro*, s'éloignent cependant des conditions de la

première étude, plus proches de conditions *in vivo*, ce qui peut expliquer les différences observées dans l'interaction de STb à la membrane. Il ne faut donc pas exclure la possibilité d'un effet du pH sur l'attachement de STb à la membrane.

STb perméabilise les VMBB très rapidement et à de faibles concentrations. Le niveau de fluorescence atteint un plateau qui correspond à une concentration en STb de l'ordre de $1,1 \pm 0,2 \mu\text{M}$. Cette valeur est proche de celle déterminée précédemment dans une étude quantitative portant sur l'attachement de STb au sulfatide sur des microplaques de titration (Beausoleil *et al.* 2001). Lors de cette étude, le K_d a été estimé entre 2 et 6 μM . Cette étude confirme les données précédemment publiées sur la capacité de STb à perméabiliser des cellules au bleu de trypan (CHO, IEC-18 et HT-29) (Beausoleil *et al.* 2002a) ainsi que des bicouches lipidiques planes (Labrie *et al.* 2001c).

Dans notre étude, nous avons calculé une constante de dissociation (K_d) de l'ordre de $2,4 \pm 0,6 \text{ nM}$ en utilisant la technique de RPS. En utilisant également la technique du RPS, des K_d du même ordre de grandeur ont été calculés entre la toxine CT et le récepteur GM1 ($K_d(\text{CT/GM1}) = 0,73 \pm 0,19 \text{ nM}$) ainsi qu'entre la toxine LT et le même récepteur ($K_d(\text{LT/GM1}) = 0,57 \pm 0,35 \text{ nM}$). La technique du RPS est particulièrement sensible, ce qui peut expliquer l'écart entre le K_d ($\sim 2 \mu\text{M}$) estimée par Beausoleil et ses collaborateurs (Beausoleil et Dubreuil 2001) et celui de notre étude. Le marquage incomplet de STb à l' I^{125} ou encore le fait que le marquage à l' I^{125} interfère avec la liaison de STb au SFT sont deux phénomènes qui peuvent aussi expliquer l'écart entre les valeurs obtenues.

Les mécanismes impliqués dans la perméabilisation d'une membrane lipidique sont souvent très complexes à élucider. Deux hypothèses sont proposées afin d'expliquer ce phénomène. La première est que la toxine agit comme un détergent : la toxine s'agrège aux lipides, désorganise la bicouche lipidique, rompt la membrane et entraîne la lyse de la cellule. La seconde est que la toxine permet la formation d'un pore : la toxine s'oligomérisse, reconnaît un récepteur, s'insère dans la membrane et la perméabilise mais sans nécessairement la rompre (Bechinger et Lohner, 2006 ; Butko 2003 ; Bechinger 1999).

Comme les peptides antimicrobiens, STb possède la propriété de perméabiliser la membrane lipidique. La distinction entre une action de type détergent et la formation d'un pore est très complexe à déterminer. Deux exemples de cette difficulté sont la mélittine et les magainines. La mélittine est un peptide de 26 acides aminés extrait du venin d'abeilles (Habermann 1972) et les magainines forment une famille de petites toxines de 15 à 23 acides aminés extraites du mucus de la peau des grenouilles xénopes (Zasloff 1987). Les premières études sur ces peptides les présentaient comme des protéines formant des pores (Ludtke *et al.* 1996 ; Matsuzaki *et al.* 1997 ; Lee *et al.* 2004). Cependant, les recherches les plus récentes ont démontré que leur mécanisme est plus complexe. En fonction des conditions utilisées pour étudier l'interaction du peptide à la membrane lipidique, une activité de type détergent ou la formation d'un pore sont favorisées (Bechinger et Lohner 2006 ; Huang 2006). Un autre exemple de petites toxines sont les conotoxines. Ce sont des peptides neurotoxiques de 10 à 40 acides aminés provenant de venin de certains gastéropodes marins appartenant au genre *Conus*. Contrairement aux exemples précédents,

elles s'insèrent dans la membrane cellulaire et modulent spécifiquement l'ouverture de canaux sodium, calcium ou potassium (Craik et Adams 2007 ; Ekberg *et al.* 2007). Les thionines, quant à elles, sont des peptides basiques de 45 à 47 acides aminés comprenant 2 à 4 ponts disulfures. Ces peptides antimicrobiens et antifongiques sont synthétisés par les plantes. Leur mécanisme d'action est encore peu connu. Cependant, comme STb, ces peptides reconnaissent le plus souvent des glycosphingolipides à la surface de la membrane. Les thionines formeraient un pore permettant le passage du potassium ou du calcium (Florack et Stiekema 1994 ; Pelegrini et Franco 2005).

Dans le cas de STb, la toxine reconnaît un récepteur spécifique, le sulfatide. Lors de l'étude réalisée avec le modèle des VMBB, le niveau de fluorescence augmente selon la concentration en STb utilisée. Le phénomène de saturation montre que le sulfatide permet l'insertion de STb dans la membrane, mais aussi qu'il reste associé à la toxine le temps de l'ancrage, se rendant ainsi indisponible pour une autre molécule de STb. Le sulfatide facilite donc l'insertion de STb dans la membrane des vésicules, et par extension dans la membrane apicale des entérocytes.

La structure tridimensionnelle de STb montre que la toxine contient deux hélice α antiparallèles reliées par une boucle riche en glycine. Ces hélices α confèrent à la toxine un caractère amphipatique (Sukumar *et al.* 1995). Cette propriété est souvent le signe distinctif des protéines transmembranaires et des toxines formant des pores. Compte tenu que STb possède une chaîne d'acides aminés suffisamment longue (chaîne N-terminale de 21 acides aminés et chaîne C-terminale de 12 acides aminés), nous pouvons concevoir qu'elle puisse

traverser la membrane lipidique. La toxine STb s'agrège de façon organisée en heptamères et en hexamères (Labrie *et al.* 2001a). D'après notre étude réalisée sur les VMBB, STb ne rompt pas la membrane des vésicules mais la perméabilise aux cations. L'ensemble de ces informations est en faveur de l'hypothèse selon laquelle STb s'insère dans la membrane pour former un pore et la perméabilise. Compte tenu de ces données, STb semble agir comme une toxine formant un pore et non comme un détergent.

Lors d'une étude structure-fonction de notre laboratoire, une collection de mutants a été générée par mutagenèse dirigée (Labrie *et al.* 2001a, 2001b). Deux de ces mutants, M42S et K22A-K23A, ont été testés pour leur capacité à perméabiliser les VMBB. La mutation de la méthionine 42 en sérine conduit à une baisse de l'hydrophobicité. Cette mutation interfère dans l'oligomérisation et dans la liaison de la toxine au sulfatide. Le mutant présente également une réduction d'activité biologique. Le double mutant K22A-K23A se lie faiblement au SFT et est peu actif dans les anses intestinales ligaturées de rat (Labrie *et al.* 2001b). Ces résultats montrent que ces mutations annihilent aussi la capacité de STb à dépolariser les VMBB. Ces trois acides aminés, présents à l'extrémité C-terminale (M42) et dans la boucle riche en glycine (K22 et K23), sont essentiels dans la formation du pore dans la membrane.

Nos récentes études mettent l'accent sur la formation d'un pore de la toxine STb à la surface des entérocytes. De ce fait, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'insertion d'un heptamère ou d'un hexamère de STb dans la membrane des entérocytes permettrait la

formation d'un pore sélectif aux cations et que le flux ionique lié à ce pore engendre un déséquilibre ionique conduisant à la diarrhée.

Comme décrit dans la revue de littérature, les toxines bactériennes ont des mécanismes d'actions complexes. Cependant, les toxines bactériennes induisant la diarrhée suivent une même cascade d'événements.

La toxine sécrétée est reconnue par un récepteur à la surface cellulaire. Elle est insérée dans la membrane ou internalisée dans la cellule, voire même les deux à la fois. Elle provoque la sécrétion de fluide au niveau de la lumière intestinale en formant des pores ou en ouvrant des canaux ioniques. La production de sécrétagogues stimule également la sécrétion et l'accumulation de fluide dans la lumière intestinale. D'autres mécanismes plus complexes ont été décrits pour certaines toxines bactériennes induisant la diarrhée (voir section 4.2).

Dans le cas de STb, la toxine est sécrétée et reconnue à la surface de la cellule cible par le sulfatide. Elle perméabilise la membrane et provoque également l'ouverture d'un canal calcique par l'intermédiaire d'une protéine G sensible à la toxine pertussique sur des cellules en culture. L'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire déclenche différentes cascades d'événements permettant la production de PGE₂ et de 5-HT. Ces sécrétagogues entraînent la sécrétion de fluide au niveau de la lumière intestinale.

Au cours de cette étude, nous nous sommes efforcés de compléter ce modèle en essayant d'intégrer la capacité de STb à perméabiliser la membrane cellulaire et à s'internaliser. Pour répondre à cet objectif, le choix s'est porté sur l'utilisation de différents modèles de cellules en culture.

L'inhibition compétitive de la λ -carragénine initialement observée en utilisant la technique de RPS a été confirmée dans le modèle des cellules en cultures IPEC-J2 (cellules épithéliales de jéjunum de porcelet nouveau-né) traitées avec STb (voir Article 2). La λ -carragénine inhibe la perméabilisation de la membrane cellulaire par la toxine STb.

D'autres études ont utilisé la λ -carragénine comme inhibiteur compétitif. La λ -carragénine affecte également l'efficacité de l'infection du virus *Herpes simplex* (VHS), du virus d'immunodéficience humaine (VIH) et du virus du papillome humain (VPH) (Konlee 1998 ; Carlucci *et al.* 2004 ; Talarico *et al.* 2004 ; Buck *et al.* 2006).

La carragénine est couramment utilisée dans l'industrie agroalimentaire comme agent d'épaississement et de stabilisation (Trius et Sebranek 1996). La κ -carragénine est utilisée dans la préparation des aliments d'animaux de compagnie (chien et chat) (Bixler 1996). Il serait intéressant d'étudier les effets de la λ -carragénine dans un modèle *in vivo*, en l'ajoutant à l'alimentation des porcelets afin de mettre au point un traitement préventif de la diarrhée de post-sevrage. La λ -carragénine ou les algues rouges pourraient être de nouveaux compléments alimentaires proposés dans la prévention des infections gastro-

intestinales comme la canneberge l'est pour les infections urinaires (Sobota 1984 ; Gupta *et al.* 2007 ; Lavigne *et al.* 2008).

Après les résultats obtenus sur la lignée cellulaire IPEC-J2, nous nous sommes intéressés à la capacité de STb à perméabiliser d'autres types cellulaires. Nous avons observé une perméabilisation des cellules rénales de chien (MDCK) ainsi que des cellules fibroblastiques de souris (NIH-3T3). Tout comme pour la lignée IPEC-J2, ces cellules, une fois traitées avec STb, présentent un double marquage PI et CFDA, ce qui indique que la membrane cytoplasmique est perméable mais que l'activité estérase est encore présente dans le cytoplasme cellulaire (voir Article 3). Ces résultats confirment ceux obtenus précédemment avec le bleu de trypan (Beausoleil *et al.* 2002a).

STb perméabilise la membrane cellulaire puis est internalisé. L'internalisation de STb a été observée dans des sections de jéjunum de rat (Labrie *et al.* 2002) ainsi que dans un modèle de cellules en culture, les cellules NIH-3T3 (Dubreuil *et al.* 2007 – voir annexe). STb s'est colocalisé avec le récepteur du facteur de motilité autocrine (RFMA), marqueur du réticulum endoplasmique, et avec HSP 70, un marqueur mitochondrial. Lors du traitement des cellules avec la méthyl- β -cyclodextrine (inhibiteur de la formation des caveolae), STb s'internalise mais ne se colocalise pas avec le RFMA. L'acidification du milieu de culture n'affecte pas l'internalisation de STb, ce qui suggère que la toxine utilise la voie clathrine et la voie caveolae. L'endocytose de STb semble aussi utiliser les fibres de

fibronectine. Toutes ces données tendent à mettre en évidence un mécanisme complexe par lequel STb peut suivre différentes voies d'endocytose et se diriger vers différents organites. Comme décrit dans la section 4.2.4, l'endocytose des toxines bactériennes peut être plus ou moins complexe. La toxine CT en est un exemple car elle utilise plusieurs voies d'endocytose dépendantes ou non des caveolae et des clathrines.

Dans notre étude, nous avons observé au microscope confocal l'entrée graduelle de STb-FITC dans les cellules NIH-3T3 (voir Article 3). Tout d'abord, la toxine est présente à la surface cellulaire et, après deux heures, elle est localisée dans ce qui s'apparente à des vésicules. STb ne se colocalise pas avec le noyau. En revanche, STb-FITC se colocalise avec la mitochondrie.

Comme décrit dans la section 4.2.5 (Tableau 3), la mitochondrie est souvent affectée par des toxines bactériennes induisant la diarrhée (Kotiranta et al. 2000 ; Galmiche et al. 2000 ; Fujii et al. 2003 ; Carrero et al. 2004). Afin de mieux cerner l'effet de la toxine sur les mécanismes intracellulaires impliqués dans la viabilité cellulaire, nous avons étudié l'activité de STb à l'aide de la sonde JC-1. Cette sonde est fréquemment utilisée pour la détection d'une variation du potentiel de membrane mitochondrial apparaissant lors des premières étapes de l'apoptose (Santos *et al.* 2003 ; Lugli *et al.* 2005).

Des études réalisées sur le jéjunum de porcelet ont démontré que STb induit des altérations microscopiques de la muqueuse intestinale, une perte de la capacité d'absorption

et une atrophie partielle des microvillosités (Whipp *et al.* 1987 ; Rose *et al.* 1987). Les résultats précédemment obtenus dans le modèle des VMBB indiquent que STb a la capacité d'affecter la perméabilité des membranes lipidiques en général ce qui peut inclure les membranes des mitochondries et d'autres organites. Nous avons donc émis l'hypothèse que STb pourrait perméabiliser les membranes mitochondriales.

Nous avons observé une hyperpolarisation des mitochondries des cellules NIH-3T3 traitées avec STb (voir Article 3). Le même phénomène a été observé après le traitement à la camptothécine, un inducteur apoptotique. Les cellules hyperpolarisées ont été triées par cytométrie en flux puis observées au microscope confocal. Elles présentaient certains caractères morphologiques des cellules en cours d'apoptose (bourgeoisements membranaires, présence de vacuoles dans le cytoplasme, gros noyau). Vingt-quatre heures de traitement avec STb induisent l'apoptose. L'induction de la mort cellulaire par STb corrobore les observations d'altérations de la muqueuse intestinale précédemment décrites dans d'autres études (Rose *et al.* 1987 ; Whipp *et al.* 1987). La destruction de l'épithélium peut contribuer à l'augmentation de la sécrétion et à la réduction de l'absorption au niveau des microvillosités, mécanismes impliqués dans la diarrhée.

Nous avons ainsi démontré que STb internalisé se colocalise avec les mitochondries. L'altération du potentiel de membrane mitochondrial chez les cellules traitées par STb nous permet de proposer une nouvelle cascade d'évènements dans son mécanisme d'action. En effet, STb pourrait affecter la perméabilité des membranes

mitochondriales, perturber le potentiel de membrane mitochondrial et engendrer une cascade d'événements (libération du cytochrome C puis activation des caspases) conduisant à un phénomène s'apparentant à l'apoptose ou à la mitoptose.

Il existe une relation étroite entre les mécanismes énergétiques de la cellule et les phénomènes d'apoptose, de nécrose et de « mitoptose ». La mitoptose est un terme utilisé pour décrire le « suicide de la mitochondrie » comme l'apoptose l'est pour le « suicide de la cellule » (Skulachev 2006). Au cours de la mitoptose, la fragmentation de la mitochondrie est suivie par la formation de corps mitoptotiques (Lyamzaev *et al.* 2008). Lors de nos observations au microscope confocal, nous avons observé que STb s'est colocalisé avec des structures assimilables à ces corps mitoptotiques (voir Article 3). Il serait intéressant de poursuivre l'étude de l'effet toxique de STb sur les mitochondries en vérifiant tout d'abord s'il y a libération de cytochrome C dans le cytoplasme. En utilisant des extraits de mitochondries, l'étude de l'interaction de la toxine avec des protéines ou des lipides des membranes mitochondriales serait également à envisager. Cependant, il ne faut pas oublier que STb se colocalise avec le réticulum endoplasmique (Dubreuil *et al.* 2007 – voir annexe). Il serait donc important de vérifier si d'autres organites pourraient également être des cibles potentielles pour STb et, le cas échéant, déterminer comment STb affecte les fonctions de ces organites.

Le mécanisme d'action de STb dans l'induction de la diarrhée semble complexe et affecte autant l'intégrité de la membrane cellulaire que l'induction de cascades d'événements au niveau intracellulaire. STb interagit avec son récepteur, le sulfatide, et perméabilise la membrane cellulaire. La toxine provoque également l'augmentation de calcium intracellulaire par un mécanisme d'action qui demande encore à être précisé. L'augmentation de calcium active la PLA₂ et la PLC et entraîne la synthèse de PGE₂. La PGE₂ induit la sécrétion d'électrolytes et d'eau, alors que le complexe CaMK-II activé par l'augmentation de calcium intracellulaire permet l'ouverture d'un canal Cl⁻. La sécrétion d'électrolytes perturbe l'homéostasie intestinale et engendre la diarrhée.

Au vu des résultats présentés dans notre étude, il est possible de suggérer que, tout comme de nombreuses toxines bactériennes causant la diarrhée, STb forme un pore qui perméabilise la membrane des cellules à bordure en brosse. La toxine perméabilise la membrane de façon non spécifique aux cations. La toxine STb est également internalisée et affecte les mitochondries. Elle entraîne leur hyperpolarisation et déclenche un phénomène s'apparentant à l'apoptose ou à la mitoptose (Figure 17).

L'ensemble de ces résultats s'intègre dans le modèle proposé par les précédentes études et apporte de nouveaux éléments permettant une meilleure compréhension du mécanisme d'action de STb dans l'induction de la diarrhée.

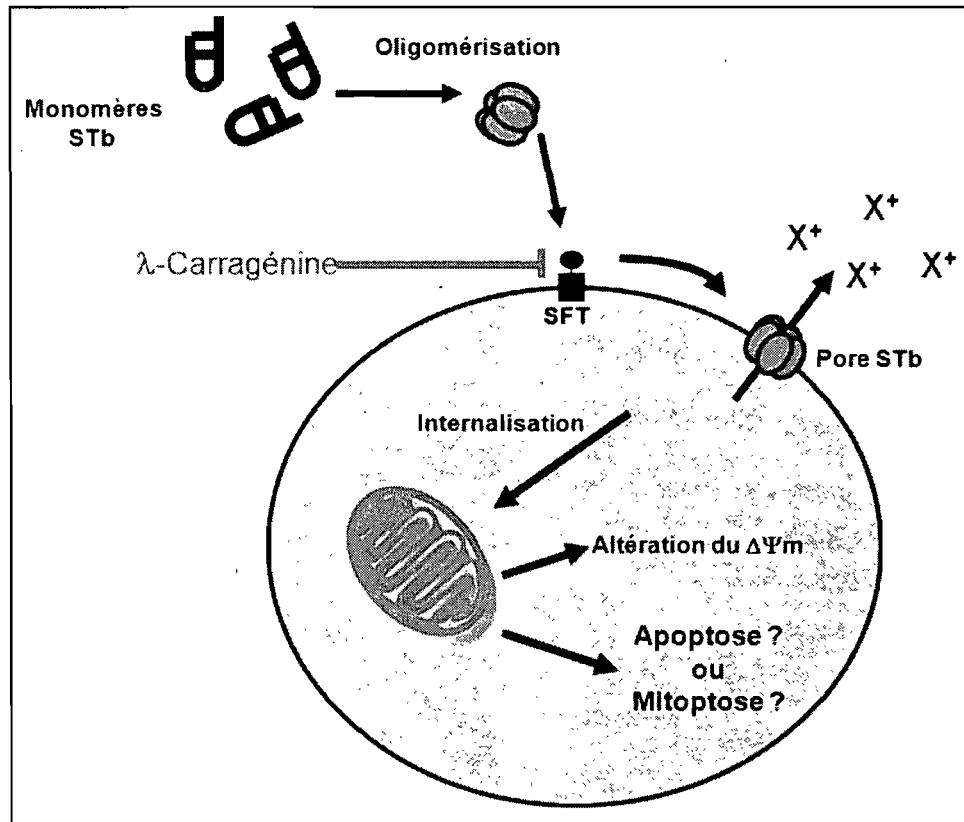


Figure 17. Modèle proposé pour le mécanisme d'action de STb sur la membrane cellulaire et la mitochondrie. STb s'oligomérisse et interagit avec le sulfatide à la surface de la membrane cellulaire. L'interaction au sulfatide est inhibée par la λ -carragénine. STb forme un pore qui perméabilise la membrane aux cations. La perméabilisation de la membrane est suivie de l'internalisation de la toxine. STb affecte le potentiel de membrane ($\Delta\Psi_m$) des mitochondries et déclenche un phénomène s'apparentant à l'apoptose ou à la mitoptose.

CONCLUSIONS

Les travaux décrits dans cette étude ont permis de mieux comprendre les premières étapes de l'interaction de STb avec la membrane des cellules cibles. Nos travaux ont démontré que STb perméabilise la bicouche lipidique des cellules à bordure en brosse de l'épithélium de porcelet. Cette perméabilisation est observable sur des cellules en culture d'origine diverse (IPEC-J2, NIH-3T3). D'après les résultats obtenus dans le modèle des VMBB, cette perméabilisation membranaire semble être le résultat de la formation d'un pore sélectif aux cations.

Les résultats obtenus mettent également en évidence un mécanisme d'action complexe où STb affecte le potentiel de membrane de la mitochondrie et induit un mécanisme qui semble proche de la mitoptose. STb semble affecter les membranes en formant un pore au niveau de la membrane cytoplasmique et peut-être même au niveau de la membrane de certains organites, en particulier celles de la mitochondrie. Fragilisée, la mitochondrie enclencherait les différentes voies d'induction de l'apoptose (libération de cytochrome C, voie des caspases...). Il serait intéressant de déterminer quelles sont les étapes permettant à STb d'induire l'apoptose et d'établir la cascade d'événements provoquant l'hyperpolarisation de la membrane mitochondriale ainsi que l'induction de la mitoptose. Cette thèse nous ouvre de nouvelles perspectives de recherche sur le mécanisme d'action de STb qui n'avaient jamais été évoquées auparavant.

De plus, la λ -carragénine a été identifiée comme étant un inhibiteur compétitif de la liaison de STb à son récepteur. La perméabilisation des cellules par STb est également inhibée par la λ -carragénine. En tenant compte de ces résultats, il pourrait être envisageable de mettre au point un traitement prophylactique basé sur l'ajout de la λ -carragénine dans la moulée des porcelets au cours du sevrage.

Cette étude apporte un avancement important dans la compréhension du mécanisme d'action de l'entérotoxine STb et offre de nouvelles perspectives de recherche.

BIBLIOGRAPHIE

Abrami, L., M. Fivaz, E. Decroly, N. G. Seidah, F. Jean, G. Thomas, S. H. Leppla, J. T. Buckley, and F. G. van der Goot. 1998. The pore-forming toxin proaerolysin is activated by furin. *J Biol Chem* **273**:32656-32661.

Abrami, L., M. Fivaz, and F. G. van der Goot. 2000. Adventures of a pore-forming toxin at the target cell surface. *Trends Microbiol* **8**:168-172.

Abrami, L., M. Lindsay, R. G. Parton, S. H. Leppla, F. G. van der Goot. 2004. Membrane insertion of anthrax protective antigen and cytoplasmic delivery of lethal factor occur at different stages of the endocytic pathway. *J Cell Biol* **166**:645-651

Adhya, S., and S. Garges. 1982. How cyclic AMP and its receptor protein act in *Escherichia coli*. *Cell* **29**:287-289.

Agata, N., M. Ohta, M. Mori, and M. Isobe. 1995. A novel dodecadeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett* **129**:17-20.

Aimoto, S., T. Takao, Y. Shimonishi, S. Hara, T. Takeda, Y. Takeda, and T. Miwatani. 1982. Amino-acid sequence of heat-stable enterotoxin produced by human enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **129**:257-263.

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

Akiyama, Y., S. Kamitani, N. Kusukawa, and K. Ito. 1992. *In vitro* catalysis of oxidative folding of disulfide-bonded proteins by the *Escherichia coli dsbA (ppfA)* gene product. J Biol Chem **267**:22440-22445.

Albert, M. J., M. Ansaruzzaman, K. A. Talukder, A. K. Chopra, I. Kuhn, M. Rahman, A. S. Faruque, M. S. Islam, R. B. Sack, and R. Mollby. 2000. Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas spp.* isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. J Clin Microbiol **38**:3785-3790.

Alderete, J. F., and D. C. Robertson. 1977a. Nutrition and enterotoxin synthesis by enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*: defined medium for production of heat-stable enterotoxin. Infect Immun **15**:781-788.

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

Alderete, J. F., and D. C. Robertson. 1978. Purification and chemical characterization of the heat-stable enterotoxin produced by porcine strains of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **19**:1021-1030.

Al-Gallas, N., S. M. Abbassi, A. B. Hassan, and R. B. Aissa. 2007a. Genotypic and phenotypic profiles of enterotoxigenic *Escherichia coli* associated with acute diarrhea in Tunis, Tunisia. *Curr Microbiol* **55**:47-55.

Al-Gallas, N., O. Bahri, A. Bouratbeen, A. Ben Haasen, and R. Ben Aissa. 2007b. Etiology of acute diarrhea in children and adults in Tunis, Tunisia, with emphasis on diarrheagenic *Escherichia coli*: prevalence, phenotyping, and molecular epidemiology. *Am J Trop Med Hyg* **77**:571-582.

Andersson, M. A., E. J. Jääskeläinen, R. Shaheen, T. Pirhonen, L. M. Wijnands, and M. S. Salkinoja-Salonen. 2004. Sperm bioassay for rapid detection of cereulide producing *Bacillus cereus* in food and related environments. *Int J Food Microbiol* **94**:175-183.

Andersson, M. A., P. Hakulinen, U. Honkalampi-Hämäläinen, D. Hoornstra, J.-C. Lhuguenot, J. Mäki-Paakkanen, M. Savolainen, I. Severin, A.-L. Stamatii, L. Turco, A. Weber, A. von Wright, F. Zucco, and M. Salkinoja-Salonen. 2007. Toxicological

profile of cereulide, the *Bacillus cereus* emetic toxin, in functional assays with human, animal and bacterial cells. *Toxicon* **49**:351-367.

Argenzio, R. A., J. Liacos, H. M. Berschneider, S. C. Whipp, and D. C. Robertson. 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., B. A. Harville, and L. A. Dreyfus. 1995. Contribution of individual disulfide bonds to biological action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B. *Infect Immun* **63**:4715-4720.

Bajjalieh, S. M. 1999. Synaptic vesicle docking and fusion. *Curr Opin Neurobiol* **9**:321-328.

Banks, M. R., and M. J. Farthing. 2002. Fluid and electrolyte transport in the small intestine. *Curr Opin Gastroenterol* **18**:176-181.

Bantel, H., B. Sinha, W. Domschke, G. Peters, K. Schulze-Osthoff, and R. U. Jänicke. 2001. alpha-Toxin is a mediator of *Staphylococcus aureus*-induced cell death and activates caspases via the intrinsic death pathway independently of death receptor signaling. *J Cell Biol* **155**:637-648.

Banwell, J. G., S. L. Gorbach, N. F. Pierce, R. Mitra, and A. Mondal. 1971. Acute undifferentiated human diarrhea in the tropics. II. Alterations in intestinal fluid and electrolyte movements. *J Clin Invest* **50**:890-900.

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

Batisson, I., and M. der Vartanian. 2000. Extracellular DsbA-insensitive folding of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin STa *in vitro*. *J Biol Chem* **275**:10582-10589.

Batisson, I., M. P. Guimond, F. Girard, H. An, C. Zhu, E. Oswald, J. M. Fairbrother, M. Jacques, and J. Harel. 2003. Characterization of the novel factor paa involved in the early steps of the adhesion mechanism of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infect Immun* **71**:4516-4525.

Beauregard, K. E., K. D. Lee, R. J. Collier, and J. A. Swanson. 1997. pH-dependent perforation of macrophage phagosomes by listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *J Exp Med* **186**:1159-1163.

Beausoleil, H. E., V. Labrie, and J. D. Dubreuil. 1999. Is *Escherichia coli* STb enterotoxin sufficient to cause pig diarrhea? *Vet Microbiol* **70**:281-285.

Beausoleil, H. E., and J. D. Dubreuil. 2001. *In vitro* binding characteristics and affinity for sulfatide of *Escherichia coli* STb enterotoxin. *Receptors Channels* **7**:401-411.

Beausoleil, H. E., V. Labrie, and J. D. Dubreuil. 2002a. 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., F. Lepine, and J. D. Dubreuil. 2002b. LC-MS analysis of pig intestine sulfatides: interaction with *Escherichia coli* STb enterotoxin and characterization of molecular species present. *FEMS Microbiol Lett* **209**:183-188.

Bechinger, B. 1999. The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* **1462**:157-183.

Bechinger, B., and K. Lohner. 2006. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* **1758**:1529-1539.

Bentley, R., and R. Meganathan. 1982. Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. *Microbiol Rev* **46**:241-280.

Benz, R., E. Maier, D. Ladant, A. Ullmann, and P. Sebo. 1994. Adenylate cyclase toxin (CyaA) of *Bordetella pertussis*. Evidence for formation of small ion-permeable channels and comparison with HlyA of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **269**:27231-27239.

Berberov, E. M., Y. Zhou, D. H. Francis, M. A. Scott, S. D. Kachman, and R. A. Moxley. 2004. Relative importance of heat-labile enterotoxin in the causation of severe diarrheal disease in the gnotobiotic piglet model by a strain of enterotoxigenic *Escherichia coli* that produces multiple enterotoxins. *Infect Immun* **72**:3914-3924.

Bertschinger, H. U., M. Bachmann, C. Mettler, A. Pospischil, E. M. Schraner, M. Stamm, T. Sydler, and P. Wild. 1990. Adhesive fimbriae produced *in vivo* by *Escherichia coli* O139:K12 (B):H1 associated with enterotoxaemia in pigs. *Vet Microbiol* **25**:267-281.

Bettelheim, K. A., A. Breadon, M. C. Faiers, S. M. O'Farrell, and R. A. Shooter. 1974. The origin of O serotypes of *Escherichia coli* in babies after normal delivery. *J Hyg* **72**:67-70.

Beutin, L. 1999. *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. *Vet Res* **30**:285-298.

Bhattacharya, J., and M. K. Chakrabarti. 1998. Rise of intracellular free calcium levels with activation of inositol triphosphate in a human colonic carcinoma cell line (COLO 205) by heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **1403**:1-4.

Bixler, H. J. 1996. Recent developments in manufacturing and marketing carrageenan. *Hydrobiologia* **326-327**:35-57.

Blanco, J., M. Blanco, J. I. Garabal, and E. A. Gonzalez. 1991. Enterotoxins, colonization factors and serotypes of enterotoxigenic *Escherichia coli* from humans and animals. *Microbiologia* **7**:57-73.

Blanco, M., J. E. Blanco, E. A. Gonzalez, A. Mora, W. Jansen, T. A. Gomes, L. F. Zerbini, T. Yano, A. F. de Castro, and J. Blanco. 1997. Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different O:K:H serotypes: relationship with toxic phenotypes. *J Clin Microbiol* **35**:2958-2963.

Bohnert, S., K. Deinhardt, S. Salinas, and G. Schiavo. 2006. Uptake and transport of clostridium neurotoxins, Chapter 20, pp. 390-408. *In* J. E. Alouf and M. R. Popoff (eds.), *The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins*, 3rd ed. Academic Press-Elsevier, Amsterdam, Boston.

Boquet, P., and E. Lemichez. 2003. Bacterial virulence factors targeting Rho GTPases: parasitism or symbiosis? *Trends Cell Biol* **13**:238-246.

Bouckenooghe, A. R., Z. R. Jiang, F. J. De la Cabada, C. D. Ericsson, and H. L. Dupond. 2002. Enterotoxigenic *Escherichia coli* as cause of diarrhea among Mexican adults and US travelers in Mexico. *J Travel Med* **9**:137-140.

Bradley, G. A., K. Orr, C. Reggiardo, and R. D. Glock. 2001a. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in captive black-footed ferrets. *J Wildl Dis* **37**:617-620.

Bradley, K. A., J. Mogridge, M. Mourez, R. J. Collier, and J. A. Young. 2001b. Identification of the cellular receptor for anthrax toxin. *Nature* **414**:225-229.

Broes, A., J. M. Fairbrother, S. Larivière, M. Jacques, and W. M. Johnson. 1988. Virulence properties of enterotoxigenic *Escherichia coli* O8: KX105 strains isolated from diarrheic piglets. *Infect Immun* **56**:241-246.

Buck, C. B., C. D. Thompson, J. N. Roberts, M. Muller, D. R. Lowy, and J. T. Schiller. 2006. Carrageenan is a potent inhibitor of papillomavirus infection. *PLoS Pathogens* **2**:671-680.

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

Buschard, K., M. Blomqvist, T. Osterbye, and P. Fredman. 2005. Involvement of sulfatide in beta cells and type 1 and type 2 diabetes. *Diabetologia* **48**:1957-1962.

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

Butko, P. 2003. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. *Appl Environ Microbiol* **69**:2415-2422.

Büttner, D., and U. Bonas. 2002. Port of entry--the type III secretion translocon. *Trends Microbiol* **10**:186-192.

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

Carlucci, M. J., L. A. Scolaro, M. D. Nosedá, A. S. Cerezo, and E. B. Damonte. 2004. Protective effect of a natural carrageenan on genital herpes simplex virus infection in mice. *Antiviral Research* **64**:137-141.

Carrero, J. A., B. Calderon, and E. R. Unanue. 2004. Listeriolysin O from *Listeria monocytogenes* is a lymphocyte apoptogenic molecule. *J Immunol* **172**:4866-4874.

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

Chalah, A., and R. Khosravi-Far. 2008. The mitochondrial death pathway. *Adv Exp Med Biol* **615**:25-45.

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

Chao, K. L., and L. A. Dreyfus. 1999. Interaction of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B with rat intestinal epithelial cells and membrane lipids. *FEMS Microbiol Lett* **172**:91-97.

Choi, B. K., and D. M. Schifferli. 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, B. K., and D. M. Schifferli. 2001. Characterization of FasG segments required for 987P fimbria-mediated binding to piglet glycoprotein receptors. *Infect Immun* **69**:6625-6632.

Choi, C., D. Kwon, and C. Chae. 2001a. Prevalence of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene and its relationship with fimbrial and enterotoxin genes in *E. coli* isolated from diarrheic piglets. *J Vet Diagn Invest* **13**:26-29.

Choi, C., W. Cho, H. Chung, T. Jung, J. Kim, and C. Chae. 2001b. Prevalence of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1) gene in isolates in weaned pigs with diarrhea and/or edema disease. *Vet Microbiol* **81**:65-71.

Choudhry, M. A., S. Gupta, and J. N. Yadava. 1991. Guinea-pig ileal loop assay: a better replacement of the suckling mouse assay for detection of heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. *J Trop Med Hyg* **94**:234-240.

Clarke, L. L., X. Stien, and N. M. Walker. 2001. Intestinal bicarbonate secretion in cystic fibrosis mice. *J Pancreas* **2**:263-267.

Cohen, M. B., M. R. Thompson, G. J. Overmann, and R. A. Giannella. 1987. Association and dissociation of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin from rat brush border membrane receptors. *Infect Immun* **55**:329-334.

Cortajarena, A. L., F. M. Goñi, and H. Ostolaza. 2001. Glycophorin as a receptor for *Escherichia coli* α -Hemolysin in erythrocytes. *J Biol Chem* **276**:12513-12519.

Cortajarena, A. L., F. M. Goñi, and H. Ostolaza. 2003. A receptor-binding region in *Escherichia coli* α -Haemolysin. *J Biol Chem* **278**:19159-19163.

Cover, T. L., U. S. Krishna, D. A. Israel, and R. M. Jr. Peek. 2003. Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Cancer Res* **63**:951-957.

Cover, T. L., and S. R. Blanke. 2005. *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat Rev Microbiol* **3**:320-332.

Craigie, J. S., and K. F. Wong. 1979. Carrageenan biosynthesis. *Proc Int Seaweed Symp* **9**:369-377.

Craik, D. J., and D. J. Adams. 2007. Chemical modification of conotoxins to improve stability and activity. *ACS Chem Biol* **2**:457-468.

Dawes, C. J., G. C. Trono Jr, and A. O. Lluisma. 1993. Clonal propagation of *Eucheuma denticulatum* and *Kappaphycus alvarezii* for Philippine seaweed farms. *Hydrobiologia* **261**:379-383.

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

De Haan, L., and T. R. Hirst. 2004. Cholera toxin: a paradigm for multi-functional engagement of cellular mechanisms. *Mol Membr Biol* **21**:77-92.

Derrick, J. P., R. Urwin, J. Suker, I. M. Feavers, and M. C. Maiden. 1999. Structural and evolutionary inference from molecular variation in neisseria porins. *Infect Immun* **67**:2406-2413.

Do, T., C. Stephens, K. Townsend, K. Wu, T. Chapmen, J. Chin, M. Bara, and D. J. Trot. 2005. Rapid identification of virulence genes in enterotoxigenic *E. coli* isolated with diarrhoea in Queensland piggeries. *Aust Vet J* **83**:293-299.

Donnenberg, M. S., and T. S. Whittam. 2001. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Clin Invest* **107**:539-548.

Donovan, J. J., and J. L. Middlebrook. 1986. Ion-conducting channels produced by botulinum toxin in planar lipid membranes. *Biochemistry* **25**:2872-2876.

Dreyfus, L. A., and D. C. Robertson. 1984. Solubilization and partial characterization of the intestinal receptor for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *Infect Immun* **46**:537-543.

Dreyfus, L. A., L. Jaso-Friedmann, and D. C. Robertson. 1984. Characterization of the mechanism of action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *Infect Immun* **44**:493-501.

Dreyfus, L. A., R. G. Urban, S. C. Whipp, C. Slaughter, K. Tachias, and Y. M. Kupersztoch. 1992. Purification of the STB 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., B. Harville, D. E. Howard, R. Shaban, D. M. Beatty, and S. J. Morris. 1993. Calcium influx mediated by the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B (STB). Proc Natl Acad Sci USA **90**:3202-3206.

Drolet, R., J. M. Fairbrother, J. Harel, and P. Helie. 1994. Attaching and effacing and enterotoxigenic *Escherichia coli* associated with enteric colibacillosis in the dog. Can J Vet Res **58**:87-92.

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

Dubreuil, J. D. 1997. *Escherichia coli* STb enterotoxin. Microbiology **143**:1783-1795.

Dubreuil, J. D. 1999. *Escherichia coli* STb toxin and prostaglandin production. Microbiology **145**:1507-1508.

Dubreuil, J. D. 2007. *Escherichia coli* STb toxin and colibacillosis: knowing is half the battle. FEMS Microbiol Lett **278**:1-9.

Dubreuil, J. D., S. Penel and C. Gonçalves. 2007. Escherichia coli STb enterotoxin: in vivo toxicity and internalization investigations using membranar and cellular models. *Res J Microbiol* **2**:209-215.

Duesbery, N. S., C. P. Webb, S. H. Leppla, V. M. Gordon, K. R. Klimpel, T. D. Copeland, N. G. Ahn, M. K. Oskarsson, K. Fukasawa, K. D. Paull, and G. F. Van de Woude. 1998. Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor. *Science* **280**:734-737.

Duggan, C., O. Fontaine, N. F. Pierce, R. I. Glass, D. Mahalanabis, N. H. Alam, M. K. Bhan, and M. Santosham. 2004. Scientific rationale for a change in the composition of oral rehydration solution. *J Am Med Ass* **291**:2628-2631.

Duszyński, J., R. Koziel, W. Brutkowski, J. Szczepanowska, and K. Zabłocki. 2006. The regulatory role of mitochondria in capacitative calcium entry. *Biochim Biophys Acta* **1757**:380-387.

Dyer, J., S. Vayro, and S. P. Shirazi-Beechey. 2003. Mechanism of glucose sensing in the small intestine. *Biochem Soc Trans* **31**:1140-1142.

Ebel, F., T. Podzadel, M. Rohde, A. U. Kresse, S. Kramer, C. Deibel, C. A. Guzman, and T. Chakraborty. 1998. Initial binding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* to host cells and subsequent induction of actin rearrangements depend on filamentous EspA-containing surface appendages. *Mol Microbiol* **30**:147-161.

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

Ehling-Schulz, M., M. Fricker, and S. Scherer. 2004. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. *Mol Nutr Food Res* **48**:479-487.

Ekberg, J., D. J. Craik, and D. J. Adams. 2007. Conotoxin modulation of voltage-gated sodium channels. *Int J Biochem Cell Biol*, in press.

Eklund, S., M. Jodal, and O. Lundgren. 1985. The enteric nervous system participates in the secretory response to the heat stable enterotoxins of *Escherichia coli* in rats and cats. *Neuroscience* **14**:673-681.

El-Azami-El-Idrissi, M., C. Bauche, J. Loucka, R. Osicka, P. Sebo, D. Ladant, and C. Leclerc. 2003. Interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase with CD11b/CD18:

Role of toxin acylation and identification of the main integrin interaction domain. *J Biol Chem* **278**:38514-38521.

Erickson, A. K., J. A. Willgohe, S. Y. McFarland, D. A. Benfield, and D. H. Francis. 1992. Identification of two porcine brush border glycoproteins that bind the K88ac adhesin of *Escherichia coli* and correlation of these glycoproteins with the adhesive phenotype. *Infect Immun* **60**:983-988.

Erickson, A. K., D. R. Baker, B. T. Bosworth, T. A. Casey, D. A. Benfield, and D. H. Francis. 1994. Characterization of porcine intestinal receptors for the K88ac fimbrial adhesin of *Escherichia coli* as mucin-type sialoglycoproteins. *Infect Immun* **62**:5404-5410.

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

Fekete, P. Z., G. Schneider, F. Olsz, G. Blum-Oehler, J. H. Hacker, and B. Nagy. 2003. Detection of a plasmid-encoded pathogenicity island in F18+ enterotoxigenic and verotoxigenic *Escherichia coli* from weaned pigs. *Int J Med Microbiol* **293**:287-298.

Ferreras, M., F. Höper, M. Dalla Serra, D. A. Colin, G. Prévost, and G. Menestrina.

1998. The interaction of *Staphylococcus aureus* bi-component gamma-hemolysins and leucocidins with cells and lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* **1414**:108-126.

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

Field, M. 2003. Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea. *J Clin Invest* **111**:931-943.

Fiorentini, C., A. Fabbri, L. Falzano, A. Fattorossi, P. Matarrese, R. Rivabene, and G. Donelli. 1998. *Clostridium difficile* toxin B induces apoptosis in intestinal cultured cells. *Infect Immun* **66**:2660-2665.

Florack, D. E. A., and W. J. Stiekema. 1994. Thionins: properties, possible biological roles and mechanisms of action. *Plant Mol Biol* **26**:25-37.

Fondacaro, J. D. 1986. Intestinal ion transport and diarrheal disease. *Am J Physiol* **250**:1-8.

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

Francis, D. H., A. K. Erickson, and P. A. Grange. 1999. K88 adhesins of enterotoxigenic *Escherichia coli* and their porcine enterocyte receptors. *Adv Exp Med Biol* **473**:147-154.

Francis, D. H. 2002. Enterotoxigenic *E. coli* infection in pigs and its diagnosis. *J Swine Health Prod* **10**:171-175.

Frankel, G., A. D. Phillips, I. Rosenshine, G. Dougan, J. B. Kaper, and S. Knutton. 1998. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Mol Microbiol* **30**:911-921.

Frantz, J. C., L. Jaso-Friedman, and D. C. Robertson. 1984. Binding of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin to rat intestinal cells and brush border membranes. *Infect Immun* **43**:622-630.

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

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

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

Fujii, Y., T. Nomura, H. Yamanaka, and K. Okamoto. 1997. Involvement of Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase II in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *Microbiol Immunol* **41**:633-636.

Fujii, J., T. Matsui, D. P. Heatherly, K. H. Schlegel, P. I. Lobo, T. Yutsudo, G. M. Ciraolo, R. E. Morris, and T. Obrig. 2003. Rapid apoptosis induced by Shiga toxin in HeLa cells. *Infect Immun* **71**:2724-2735.

Fujinaga, Y., A. A. Wolf, C. Rodighiero, H. Wheeler, B. Tsai, L. Allen, M. G. Jobling, T. Rapoport, R. K. Holmes, and W. I. Lencer. 2003. Gangliosides that associate with lipid rafts mediate transport of cholera and related toxins from the plasma membrane to endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* **14**:4783-4793.

Fukuta, S., J. L. Magnani, E. M. Twiddy, R. K. Holmes, and V. Ginsburg. 1988. Comparison of the carbohydrate-binding specificities of cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins LTh-I, LT-IIa, and LT-IIb. *Infect Immun* **56**:1748-1753.

Gaastra, W., and A. M. Svennerholm. 1996. Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Trends Microbiol* **4**:444-452.

Galmiche, A., J. Rassow, A. Doye, S. Cagnol, J. C. Chambard, S. Contamin, V. de Thillot, I. Just, V. Ricci, E. Solcia, E. Van Obberghen, and P. Boquet. 2000. The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. *EMBO J* **19**:6361-6370.

Galmiche, A., and P. Boquet. 2006. Bacterial toxins and mitochondria, Chapter 10, pp. 188-201. *In* J. E. Alouf and M. R. Popoff (eds.), *The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins*, 3rd ed. Academic Press-Elsevier, Amsterdam, Boston.

Ganguly, U., A. G. Chaudhury, A. Basu, and P. C. Sen. 2001. STa-induced translocation of protein kinase C from cytosol to membrane in rat enterocytes. *FEMS Microbiol Lett* **204**:65-69.

Gauthier, N. C., V. Ricci, P. Gounon, A. Doye, M. Tauc, P. Poujeol, and P. Boquet. 2004. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and actin cytoskeleton modulate chloride transport by channels formed by the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin VacA in HeLa cells. *J Biol Chem* **279**:9481-9489.

Geny, B., and M. R. Popoff. 2006a. Bacterial protein toxins and lipids: role in toxin targeting and activity. *Biol Cell* **98**:633-651.

Geny, B., and M. R. Popoff. 2006b. Bacterial protein toxins and lipids: pore formation or toxin entry into cells. *Biol Cell* **98**:667-678.

Germani, Y. 1986. Identification and assay methods for *Escherichia coli* enterotoxins. *Bulletins de l'Institut Pasteur* **84**:365-387.

Giannella, R. A. 1983. *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin: biochemical and physiological effects on the intestine. *Prog Food Nutr Sci* **7**:157-165.

Giannella, R. A., M. Luttrell, and M. Thompson. 1983. Binding of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin to receptors on rat intestinal cells. *Am J Physiol* **245**:492-498.

Girardeau, J. P., M. Der Vartanian, J. L. Ollier, and M. Contrepolis. 1988. CS31A, a new K88-related fimbrial antigen on bovine enterotoxigenic and septicemic *Escherichia coli* strains. *Infect Immun* **56**:2180-2188.

Glaser, P., D. Ladant, O. Sezer, F. Pichot, A. Ullmann, and A. Danchin. 1988. The calmoduline-sensitive adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*: cloning and expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **2**:19-30.

Goldstein, J. L., J. Sahi, M. Bhuva, T. J. Layden, and M. C. Rao. 1994. *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin-mediated colonic Cl⁻ secretion is absent in cystic fibrosis. *Gastroenterology* **107**:950-956.

Golin-Bisello, F., N. Bradbury, and N. Ameen. 2005. STa and cGMP stimulate CFTR translocation to the surface of villus enterocytes in rat jejunum and is regulated by protein kinase G. *Am J Physiol Cell Physiol* **289**:708-716.

Gonzalez Garcia, E. A. 2002. Animal health and foodborne pathogens: enterohaemorrhagic O157:H7 strains and other pathogenic *Escherichia coli* virotypes (EPEC, ETEC, EIEC, EHEC). *Pol J Vet Sci* **5**:103-115.

Green, B. A., R. J. Neill, W. T. Ruyechan, and R. K. Holmes. 1983. Evidence that a new enterotoxin of *Escherichia coli* which activates adenylate cyclase in eucaryotic target cells is not plasmid mediated. *Infect Immun* **41**:383-390.

Guarino, A., M. Cohen, M. Thompson, K. Dharmasathaphorn, and R. Giannella. 1987. T84 cell receptor binding and guanyl cyclase activation by *Escherichia coli* heat-stable toxin. *Am J Physiol* **253**:775-780.

Guinée, P. A. M., and W. H. Jansen. 1979. Behavior of *Escherichia coli* K antigens K88ab, K88ac, and K88ad in immuno-electrophoresis, double diffusion, and hemagglutination. *Infect Immun* **23**:700-705.

Gupta, D. D., S. Saha, and M. K. Chakrabarti. 2005. Involvement of protein kinase C in the mechanism of action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin (STa) in a human colonic carcinoma cell line, COLO-205. *Toxicol Appl Pharmacol* **206**:9-16.

Gupta, K., M. Y. Chou, A. Howell, R. Wobbe, R. Grady, and A. E. Stapleton. 2007. Cranberry products inhibit adherence of P-fimbriated *Escherichia coli* to primary cultured bladder and vaginal epithelial cells. *J Urol* **177**:2357-2360.

Gyles, C. L. 1974. Immunological study of the heat-labile enterotoxins of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* **9**:564-570.

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

Gyles, C. L. 1994. *Escherichia coli* enterotoxins, pp. 337-367. *In* C. L. Gyles (Ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans, CAB International, Guelph, Canada.

Gyles, C. L., and J. M. Fairbrother. 2004. *Escherichia coli*. Chapter 16, pp. 193-223. *In* C. L. Gyles, J. F. Prescott, J. G. Songer, and C. O. Thoen (eds.), *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*, Blackwell Publishing Ltd, Ames, Iowa, USA.

Gyles, C. L. 2007. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J Anim Sci* **85**:45-62.

Ha, S. K., C. Choi, and C. Chae. 2003. Prevalence of a gene encoding adhesin involved in diffuse adherence among *Escherichia coli* isolates in pigs with postweaning diarrhea or edema disease. *J Vet Diagn Invest* **15**:378-381.

Ha, S. K., C. Choi, K. Jung, J. Kim, D. U. Han, Y. Ha, S. D. Lee, S. H. Kim, and C. Chae. 2004. Genotypic prevalence of the adhesin involved in diffuse adherence in *Escherichia coli* isolates in pre-weaned pigs with diarrhoea in Korea. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **51**:166-168.

Haas, M., and B. Forbush. 2000. The Na-K-Cl cotransporter of secretory epithelia. *Ann Rev Physiol* **62**:515-534.

Habermann, E. 1972. Bee and wasp venoms. *Science* **177**:314-322.

Hajishengallis, G., R. I. Tapping, M. H. Martin, H. Nawar, E. A. Lyle, M. W. Russell, and T. D. Connell. 2005. Toll-like receptor 2 mediates cellular activation by the B subunits of type II heat-labile enterotoxins. *Infect Immun* **73**:1343-1349.

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

Hamon, M., H. Bierne, and P. Cossard. 2006. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nat Rev Microbiol* **4**:423-434.

Handl, C. E., E. Olson, and J. I. Flock. 1992. Evaluation of three different STb assays and comparison of enterotoxin pattern over a five-year period in Swedish porcine *Escherichia coli*. *Diagn Microbiol Infect Dis* **15**:505-510.

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

Hardy, S. P., C. Ritchie, M. C. Allen, R. H. Ashley, and P. E. Granum. 2001. *Clostridium perfringens* type A enterotoxin forms mepacrine-sensitive pores in pure phospholipid bilayers in the absence of putative receptor proteins. *Biochim Biophys Acta* **1515**:38-43.

Harnett, N. M., and C. L. Gyles. 1985a. Enterotoxin plasmids in bovine and porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* of O groups 9, 20, 64 and 101. *Can J Comp Med* **49**:79-87.

Harnett, N. M., and C. L. Gyles. 1985b. 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., and L. A. Dreyfus. 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., and L. A. Dreyfus. 1996. Release of serotonin from RBL-2H3 cells by the *Escherichia coli* peptide toxin STb. *Peptides* **17**:363-366.

He, D., S. J. Hagen, C. Pothoulakis, M. Chen, N. D. Medina, M. Warny, and J. T. LaMont. 2000. *Clostridium difficile* toxin A causes early damage to mitochondria in cultured cells. *Gastroenterology* **119**:139-150.

He, D., S. Sougioultzis, S. Hagen, J. Liu, S. Keates, A. C. Keates, C. Pothoulakis, and J.T. Lamont. 2002. *Clostridium difficile* toxin A triggers human colonocyte IL-8 release via mitochondrial oxygen radical generation. *Gastroenterology* **122**:1048-1057.

Herreros, J., T. Ng, and G. Schiavo. 2001. Lipid rafts act as specialized domains for tetanus toxin binding and internalization into neurons. *Mol Biol Cell* **12**:2947-2960.

Heuck, A. P., E. M. Hotze, R. K. Tweten, and A. E. Johnson. 2000. Mechanism of membrane insertion of a multimeric β -barrel protein: perfringolysin O creates a pore using ordered and coupled conformational changes. *Mol cell* **6**:1233-1242.

Heuck, A. P., R. K. Tweten, and A. E. Johnson. 2003. Assembly and topography of the prepore complex in cholesterol-dependent cytolysins. *J Biol Chem* **15**:31218-31225.

Heuck, A. P., C. G. Savva, A. Holzenburg, and A. E. Johnson. 2007. Conformational changes that effect oligomerization and initiate pore formation are triggered throughout perfringolysin O upon binding to cholesterol. *J Biol Chem* **3**:22629-22637.

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

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

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

Hofstra, H., and B. Witholt. 1985. Heat-labile enterotoxin in *Escherichia coli*. Kinetics of association of subunits into periplasmic holotoxin. *J Biol Chem* **260**:16037-16044.

Hong, Y., K. Ohishi, N. Inoue, J. Y. Kang, H. Shime, Y. Horiguchi, F. G. van der Goot, N. Sugimoto, and T. Kinoshita. 2002. Requirement of N-glycan on GPI-anchored proteins for efficient binding of aerolysin but not *Clostridium septicum* alpha-toxin. *EMBO J* **21**:5047-5056.

Honke, K., Y. Zhang, X. Cheng, N. Kotani, and N. Taniguchi. 2004. Biological roles of sulfoglycolipids and pathophysiology of their deficiency. *Glycoconj J* **21**:59-62.

Horstman, A. L., and M. J. Kuehn. 2002. Bacterial surface association of heat-labile enterotoxin through lipopolysaccharide after secretion via the general secretory pathway. *J Biol Chem* **277**: 32538-32545.

Horstman, A. L., S. J. Bauman, and M. J. Kuehn. 2004. Lipopolysaccharide 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid (Kdo) core determines bacterial association of secreted toxins. *J Biol Chem* **279**:8070-8075.

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

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

Huang, HW. 2006. Molecular mechanism of antimicrobial peptides: the origin of cooperativity. *Biochim Biophys Acta* **1758**:1292-1302.

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

Hughes, S., J. C. Bartholomew, J. C. Hardy, and J. M. Kramer. 1998. Potential application of a Hep-2 cell assay in the investigation of *Bacillus cereus* emetic syndrome food poisoning. *FEMS Microbiol Lett* **52**:7-12.

Iwaki, M., A. Ullmann, and P. Sebo. 1995. Identification by *in vitro* complementation of regions required for cell-invasive activity of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *Mol Microbiol* **17**:1015-1024.

Jacob, P., H. Rossmann, G. Lamprecht, A. Kretz, C. Neff, E. Lin-Wu, M. Gregor, D. A. Groneberg, J. Kere, and U. Seidler. 2002. Down-regulated in adenoma mediates apical Cl⁻/HCO₃⁻ exchange in rabbit, rat, and human duodenum. *Gastroenterology* **122**:709-724.

Jin, L. Z., and X. Zhao. 2000. Intestinal receptors for adhesive fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) K88 in swine: a review. *App Microbiol Biotechnol* **54**:311-318.

Just, I., and R. Gerhard. 2004. Large clostridial cytotoxins. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **152**:23-47.

Kanfer, J. N., T. P. Carter, and H. M. Katzen. 1976. Lipolytic action of cholera toxin on fat cells. Re-examination of the concept implicating GM1 ganglioside as the native membrane receptor. *J Biol Chem* **251**:7610-7619.

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

Kaper, J. B., J. P. Nataro, and H. L. Mobley. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* **2**:123-140.

Kapus, A., and K. Szászi. 2006. Coupling between and paracellular transport processes. *Biochem Cell Biol* **84**:870-880.

Katwa, L. C., C. D. Parker, and A. A. White. 1991. Age-dependent changes in affinity-labeled receptors for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin in the swine intestine. *Infect Immun* **59**:4318-4323.

Kawasaka, T., M. Shimodozono, A. Ogata, and K. Kawahira. 2006. The effects of gum-chewing therapy on salivation in stroke patients. *J Am Geriatr Soc* **54**:867-869.

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

Khare, S., D. M. Wilson, X. Y. Tien, R. K. Wali, M. Bissonnette, and T. A. Brasitus. 1994. Protein kinase C mediates the calcium-induced activation of rat colonic particulate guanylate cyclase. *Arch Biochem Biophys* **314**:200-204.

Kidd, J. F., and P. Thorn. 2000. Intracellular Ca²⁺ and Cl⁻ channel activation in secretory cells. *Ann Rev Physiol* **62**:493-513.

Kiela, P. R., H. Xu, and F. K. Ghishan. 2006. Apical Na⁺/H⁺ exchangers in the mammalian gastrointestinal tract. *J Physiol Pharmacol* **57**:51-79.

Kimura, M., S. Goto, A. Wada, K. Yahiro, T. Niidome, T. Hatakeyama, H. Aoyagi, T. Hirayama, and T. Kondo. 1999. Vacuolating cytotoxin purified from *Helicobacter pylori* causes mitochondrial damage in human gastric cells. *Microb Pathog* **26**:45-52.

Klimpel, K. R., S. S. Molloy, G. Thomas, and S. H. Leppla. 1992. Anthrax toxin protective antigen is activated by a cell surface protease with the sequence specificity and catalytic properties of furin. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**:10277-10281.

Knoop, F. C., and M. Owens. 1992. Pharmacologic action of *Escherichia coli* heat-stable (STa) enterotoxin. *J Pharmacol Toxicol Methods* **28**:67-72.

Knutsen, S. H., D. E. Myslabodski, B. Larsen, and A. I. Usov. 1994. A modified system of nomenclature for red algal galactans. *Botanica Marina* **37**:163-169.

Konlee, M. 1998. Sulfated polysaccharides (chondroitin sulfate and carrageenan) plus glucosamine sulfate are potent inhibitors of HIV. *Posit health news* 4-7.

Koronakis, V., J. Eswaran, and C. Hughes. 2004. Structure and function of TolC: the bacterial exit duct for proteins and drugs. *Ann Rev Biochem* **73**:467-489.

Kotiranta, A., K. Lounatmaa, and M. Haapasalo. 2000. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes Infect* **2**:189-198.

Krieglstein, K. G., B. R. DasGupta, and A. H. Henschen. 1994. Covalent structure of botulinum neurotoxin type A: location of sulfhydryl groups, and disulfide bridges and identification of C-termini of light and heavy chains. *J Protein Chem* **13**:49-57.

Kroemer, G., and J. C. Reed. 2000. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* **6**:513-519.

Kuck, D., B. Kolmerer, C. Iking-Konert, P. H. Krammer, W. Stremmel, and J. Rudi. 2001. Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* induces apoptosis in the human gastric epithelial cell line AGS. *Infect Immun* **69**:5080-5087.

Kupersztoch, Y. M., K. Tachias, C. R. Moomaw, L. A. Dreyfus, R. Urban, C. Slaughter, and S. Whipp. 1990. Secretion of methanol-insoluble heat-stable enterotoxin (STB): energy- and secA-dependent conversion of pre-STB to an intermediate indistinguishable from the extracellular toxin. *J Bacteriol* **172**:2427-2432.

Kwon, D., C. Choi, T. Jung, H. K. Chung, J. P. Kim, S. S. Bae, W. S. Cho, J. Kim, and C. Chae. 2002. Genotypic prevalence of the fimbrial adhesins (F4, F5, F6, F41 and F18)

and toxins (LT, STa, STb and STx2e) in *Escherichia coli* isolated from postweaning pigs with diarrhoea or oedema disease in Korea. *Vet Rec* **150**:35-37.

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

Labrie, V., H. E. Beausoleil, J. Harel, and J. D. Dubreuil. 2001b. Binding to sulfatide and enterotoxicity of various *Escherichia coli* STb mutants. *Microbiology* **147**:3141-3148.

Labrie, V., L. Potvin, J. Harel, J. D. Dubreuil, and J.-L. Schwartz. 2001c. Enterotoxin b of *Escherichia coli* (STb) forms ion channels in planar lipid bilayers. 10th European Workshop Conference on Bacterial Protein Toxins, Bohon, Belgium, A54.

Labrie, V., J. Harel, and J. D. Dubreuil. 2002. *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b (STb) *in vivo* internalization within rat intestinal epithelial cells. *Vet Res* **33**:223-228.

Lacy, D. B., W. Tepp, A. C. Cohen, B. R. DasGupta, and R. C. Stevens. 1998. Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity. *Nat Struct Biol* **5**:898-902.

Lacy, D. B., D. J. Wigelsworth, R. A. Melnyk, S. C. Harrison, and R. J. Collier. 2004. Structure of heptameric protective antigen bound to an anthrax toxin receptor: a role for receptor in pH-dependent pore formation. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**:13147-13151.

Lai, C. Y., F. Cancedda, and L. K. Duffy. 1981. ADP-ribosyl transferase activity of cholera toxin polypeptide A1 and the effect of limited trypsinolysis. *Biochem Biophys Res Commun* **102**:1021-1027.

Laohachai, K. N., R. Bahadi, M. B. Hardo, P. G. Hardo, and J. I. Kourie. 2003. The role of bacterial and non-bacterial toxins in the induction of changes in membrane transport: implications for diarrhea. *Toxicon* **42**:687-707.

Lauer, S., B. Goldstein, R. L. Nolan, and J. P. Nolan. 2002. Analysis of cholera toxin-ganglioside interactions by flow cytometry. *Biochemistry* **41**:1742-1751.

Lavigne, J.-P., G. Bourg, C. Combescure, H. Botto, and A. Sotto. 2008. *In vitro* and *in vivo* evidence of dose-dependent decrease of uropathogenic *Escherichia coli* virulence after consumption of commercial *vaccinium macrocarpon* (cranberry) capsules. *Clin Microbiol Infect* **14**:350-355.

Lawrence, R. M., P. T. Huang, J. Glick, J. D. Oppenheim, and W. K. Maas. 1990. Expression of the cloned gene for enterotoxin STb of *Escherichia coli*. *Infect Immun* **58**:970-977.

Lazure, C., N. G. Seidah, M. Chretien, R. Lallier, and S. St-Pierre. 1983. Primary structure determination of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin of porcine origin. *Can J Biochem Cell Biol* **61**:287-292.

Lea, N., J. M. Lord, and L. M. Roberts. 1999. Proteolytic cleavage of the A subunit is essential for maximal cytotoxicity of *Escherichia coli* O157:H7 Shiga-like toxin-1. *Microbiology* **145**:999-1004.

Leclerc, S., P. Boerlin, C. Gyles, J. D. Dubreuil, M. Mourez, J. M. Fairbrother, and J. Harel. 2007. *paa*, originally identified in attaching and effacing *Escherichia coli*, is also associated with enterotoxigenic *E. coli*. *Res Microbiol* **158**:97-104.

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

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

Lee, M. T., F. Y. Chen, and H. W. Huang. 2004. Energetics of pore formation induced by membrane active peptides. *Biochemistry* **43**:3590-3599.

Lencer, W. I., C. Constable, S. Moe, M. G. Jobling, H. M. Webb, S. Ruston, J. L. Madara, T. R. Hirst, and R. K. Holmes. 1995. Targeting of cholera toxin and *Escherichia coli* heat labile toxin in polarized epithelia: role of COOH-terminal KDEL. *J Cell Biol* **131**:951-962.

Lencer, W. I., C. Constable, S. Moe, P. A. Rufo, A. Wolf, M. G. Jobling, S. Ruston, J. L. Madara, R. K. Holmes, and T. R. Hirst. 1997. Proteolytic activation of cholera toxin and *Escherichia coli* labile toxin by entry into host epithelial cells. Signal transduction by protease-resistant toxin variant. *J Biol Chem* **272**:15562-15568.

Lencer, W. I., and B. Tsai. 2003. The intracellular voyage of cholera toxin: going retro. *Trends Biochem Sci* **28**:639-645.

Leppla, S. H. 1982. Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentrations of eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**:3162-3166.

Leppla, S. H. 1984. *Bacillus anthracis* calmodulin-dependent adenylate cyclase: chemical and enzymatic properties and interactions with eucaryotic cells. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res* **17**:189-198.

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

Leunk, R. D., P. T. Johnson, B. C. David, W. G. Kraft, and D. R. Morgan. 1988. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J Med Microbiol* **26**:93-99.

Levine, M. M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis* **155**:377-389.

Li, L., and B. R. Singh. 1998. Isolation of synaptotagmin as a receptor for types A and E botulinum neurotoxin and analysis of their comparative binding using a new microtiter plate assay. *J Nat Toxins* **7**:215-226.

Lord, J. M., and L. M. Roberts. 1998. Toxin entry: retrograde transport through the secretory pathway. *J Cell Biol* **140**:733-736.

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

Ludtke, S. J., K. He, W. T. Heller, T. A. Harroun, L. Yang, and H. W. Huang. 1996. Membrane pores induced by magainin. *Biochemistry* **35**:13723-13728.

Ludwig, A., and W. Goebel. 2006. Structure and mode of action of RTX toxins, Chapter 29, pp. 547-569. *In* J. E. Alouf and M. R. Popoff (eds.), *The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins*, 3rd ed. Academic Press-Elsevier, Amsterdam, Boston.

Lugli, E., L. Troiano, R. Ferraresi, E. Roat, N. Prada, M. Nasi, M. Pinti, E. L. Cooper, and A. Cossarizza. 2005. Characterization of cells with different mitochondrial membrane potential during apoptosis. *Cytometry A* **68**:28-35.

Lundgren, O. 1998. 5-Hydroxytryptamine, enterotoxins, and intestinal fluid secretion. *Gastroenterology* **115**:1009-1012.

Lyamzaev, K. G., O. K. Nepryakhina, V. B. Saprunova, L. E. Bakeeva, O. Y. Pletjushkina, B. V. Chernyak, and V. P. Skulachev. 2008. Novel mechanism of elimination of malfunctioning mitochondria (mitoptosis): formation of mitoptotic bodies and extrusion of mitochondrial material from the cell. *Biochim Biophys Acta* **1777**:817-825.

MacKenzie, C. R., T. Hiram, K. K. Lee, E. Altman, and N. M. Young. 1997. Quantitative analysis of bacterial toxin affinity and specificity for glycolipid receptors by surface plasmon resonance. *J Biol Chem* **272**:5533-5538.

Madec, F., N. Bridoux, S. Bounaix, R. Cariolet, Y. Duval-Iflah, D. J. Hampson, and A. Jestin. 2000. Experimental models of porcine post-weaning colibacillosis and their relationship to post-weaning diarrhoea and digestive disorders as encountered in the field. *Vet Microbiol* **72**:295-310.

Mainil, J. G., S. L. Moseley, R. A. Schneider, K. Sutch, T. A. Casey, and H. W. Moon.

1986. Hybridization of bovine *Escherichia coli* isolates with gene probes for four enterotoxins (STaP, STaH, STb, LT) and one adhesion factor (K99). *Am J Vet Res* **47**:1145-1148.

Mainil, J. G., F. Bex, E. Jacquemin, P. Pohl, M. Couturier, and A. Kaeckenbeeck.

1990. Prevalence of four enterotoxin (STaP, STaH, STb, and LT) and four adhesin subunit (K99, K88, 987P, and F41) genes among *Escherichia coli* isolates from cattle. *Am J Vet Res* **51**:187-190.

Mainil, J. G., G. Daube, E. Jacquemin, P. Pohl, and A. Kaeckenbeeck. 1998. Virulence

plasmids of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates from piglets. *Vet Microbiol* **62**:291-301.

Mainil, J. G., E. Jacquemin, P. Pohl, A. Kaeckenbeeck, and I. Benz. 2002. DNA

sequences coding for the F18 fimbriae and AIDA adhesin are localised on the same plasmid in *Escherichia coli* isolates from piglets. *Vet Microbiol* **86**:303-311.

Maksymowych, A. B., and L. L. Simpson. 1998. Binding and transcytosis of botulinum

neurotoxin by polarized human colon carcinoma cells. *J Biol Chem* **273**:21950-21957.

Marvaud, J. C., S. Raffestin, and M. R. Popoff. 2002. Botulism: the agent, mode of action of the botulinum neurotoxins, forms of acquisition, treatment and prevention. *C R Biol* **325**:863-878.

Masin, J., P. Sebo, and C. Locht. 2006. *Bodetella* protein toxins, Chapter 16, pp. 291-309. *In* J. E. Alouf and M. R. Popoff (eds.), The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins, 3rd ed. Academic Press-Elsevier, Amsterdam, Boston.

Massari, P., Y. Ho, and L. M. Wetzler. 2000. *Neisseria meningitidis* porin PorB interacts with mitochondria and protects cells from apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:9070-9075.

Massari, P., C. A. King, A. Y. Ho, and L. M. Wetzler. 2003a. Neisserial PorB is translocated to the mitochondria of HeLa cells infected with *Neisseria meningitidis* and protects cells from apoptosis. *Cell Microbiol* **5**:99-109.

Massari, P., S. Ram, H. Macleod, and L. M. Wetzler. 2003b. The role of porins in neisserial pathogenesis and immunity. *Trends Microbiol* **11**:87-93.

Massey-Harroche, D. 2000. Epithelial cell polarity as reflected in enterocytes. *Microsc Res Tech* **15**:353-362.

Matarrese, P., L. Falzano, A. Fabbri, L. Gambardella, C. Frank, B. Geny, M. R. Popoff, W. Malorni, and C. Fiorentini. 2007. *Clostridium difficile* toxin B causes apoptosis in epithelial cells by thrilling mitochondria. Involvement of ATP-sensitive mitochondrial potassium channels. *J Biol Chem* **282**:9029-9041.

Matsuzaki, K., S. Yoneyama, and K. Miyajima. 1997. Pore formation and translocation of melittin. *Biophys J* **73**:831-838.

McDaniel, T. K., K. G. Jarvis, M. S. Sonnenberg, and J. B. Kaper. 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:1664-1668.

Ménard, L. P., and J. D. Dubreuil. 2002. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist. *Crit Rev Microbiol* **28**:43-60.

Ménard, L. P., J. G. Lussier, F. Lepine, C. Paiva de Sousa, and J. D. Dubreuil. 2004. Expression, purification, and biochemical characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1. *Protein Expr Purif* **33**:223-231.

Menestrina, G., M. Dalla Serra, M. Comai, M. Coraiola, G. Viero, S. Werner, D. A. Colin, H. Monteil, and G. Prevost. 2003. Ion channels and bacterial infection: the case of beta-barrel pore-forming protein toxins of *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett* **552**:54-60.

Merckel, M. C., J. Tanskanen, S. Edelman, B. Westerlund-Wikström, T. K. Korhonen, and A. Goldman. 2003. The structural basis of receptor-binding by *Escherichia coli* associated with diarrhea and septicemia. *J Mol Biol* **331**:897-905.

Merrill, A. H., Jr., E. M. Schmelz, D. L. Dillehay, S. Spiegel, J. A. Shayman, J. J. Schroeder, R. T. Riley, K. A. Voss, and E. Wang. 1997. Sphingolipids--the enigmatic lipid class: biochemistry, physiology, and pathophysiology. *Toxicol Appl Pharmacol* **142**:208-225.

Meunier, O., M. Ferreras, G. Supersac, F. Hoeper, L. Baba-Moussa, H. Monteil, D. A. Colin, G. Menestrina, and G. Prévost. 1997. A predicted beta-sheet from class S components of staphylococcal gamma-hemolysin is essential for the secondary interaction of the class F component. *Biochim Biophys Acta* **1326**:275-286.

Mezoff, A. G., N. J. Jensen, and M. B. Cohen. 1991. Mechanisms of increased susceptibility of immature and weaned pigs to *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *Pediatr Res* **29**:424-428.

Mignotte, B., and J. L. Vayssiere. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Eur J Biochem* **252**:1-15.

Mikkola, R., N. E. Saris, P. A. Grigoriev, M. A. Andersson, and M. S. Salkinoja-Salonen. 1999. Ionophoretic properties and mitochondrial effects of cereulide: the emetic toxin of *B. cereus*. *FEBS* **263**:112-117.

Moeser, A. J., and A. T. Blikslager. 2007. Mechanisms of porcine diarrheal disease. *J Am Vet Med Ass* **231**:56-67.

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

Moon, H. W., B. Nagy, and R. E. Isaacson. 1977. Intestinal colonization and adhesion by enterotoxigenic *Escherichia coli*: ultrastructural observations on adherence to ileal epithelium of the pig. *J Infect Dis* **136**:124-129.

Moon, H. W. 1978. Mechanisms in the pathogenesis of diarrhea: a review. *J Am Vet Med Ass* **172**:443-448.

Moon, H. W., A. L. Baetz, and R. A. Giannella. 1983. Immunization of swine with heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin coupled to a carrier protein does not protect suckling pigs against an *Escherichia coli* strain that produces heat-stable enterotoxin. *Infect Immun* **39**:990-992.

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

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

Morris, A. P., and M. K. Estes. 2001. Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions. VIII. Pathological consequences of rotavirus infection and its enterotoxin. *Am J Physiol* **281**:303-310.

Moseley, S. L., M. Smadpaer-Motalebi, and S. Falkow. 1983a. Plasmid association and nucleotide sequence relationships of two genes encoding a heat-stable enterotoxin production in *Escherichia coli* H-10407. *J Bact* **156**:441-443.

Moseley, S. L., J. M. Hardy, M. I. Huq, P. Echevarria, and S. Falkow. 1983b. Isolation and nucleotide sequence determination of a gene encoding a heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun* **39**:1167-1174.

Müller, A., D. Günther, F. Düx, M. Naumann, T. F. Meyer, and T. Rudel. 1999. Neisserial porin (PorB) causes rapid calcium influx in target cells and induces apoptosis by the activation of cysteine proteases. *EMBO J* **18**:339-352.

Müller, A., D. Günther, V. Brinkmann, R. Hurwitz, T. F. Meyer, and T. Rudel. 2000. Targeting of the pro-apoptotic VDAC-like porin (PorB) of *Neisseria gonorrhoeae* to mitochondria of infected cells. *EMBO J* **19**:5332-5343.

Müller, A., J. Rassow, J. Grimm, N. Machuy, T. F. Meyer, and T. Rudel. 2002. VDAC and the bacterial porin PorB of *Neisseria gonorrhoeae* share mitochondrial import pathways. *EMBO J* **21**:1916-1929.

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

Nagy, B., S. C. Whipp, H. Imberechts, H. U. Bertschinger, E. A. Dean-Nystrom, T. A. Casey, and E. Salajka. 1997. Biological relationship between F18ab and F18ac fimbriae of enterotoxigenic and verotoxigenic *Escherichia coli* from weaned pigs with oedema disease or diarrhoea. *Microb Pathog* **22**:1-11.

Nagy, B., and P. Z. Fekete. 1999. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Vet Res* **30**:259-284.

Nagy, B., and P. Z. Fekete. 2005. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol* **295**:443-454.

Nair, G. B., and Y. Takeda. 1998. The heat-stable enterotoxins. *Microb Pathog* **24**:123-131.

Nakayama, M., M. Kimura, A. Wada, K. Yahiro, K. Ogushi, T. Niidome, A. Fujikawa, D. Shirasaka, N. Aoyama, H. Kurazono, M. Noda, J. Moss, and T.

Hirayama. 2004. *Helicobacter pylori* VacA activates the p38/activating transcription factor 2-mediated signal pathway in AZ-521 cells. *J Biol Chem* **279**:7024-7028.

Nataro, J. P., J. Seriwatana, A. Fasano, D. R. Maneval, L. D. Guers, F. Noriega, F. Dubovsky, M. M. Levine, and J. G. Morris Jr. 1995. Identification and cloning of a novel plasmid-encoded enterotoxin of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains. *Infect Immun* **63**:4721-4728.

Nataro, J. P., and J. B. Kaper. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**:142-201.

Nelson, K. L., R. A. Brodsky, and J. T. Buckley. 1999. Channels formed by subnanomolar concentrations of the toxin aerolysin trigger apoptosis of T lymphomas. *Cell Microbiol* **1**:69-74.

Ngeleka, M. 2002. Isolation of a new *Escherichia coli* pathotype associated with diarrhea in piglets. *Can Vet J* **43**:623-624.

Ngeleka, M., J. Pritchard, G. Appleyard, D. M. Middleton, and J. M. Fairbrother. 2003. Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1

pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. *J Vet Diagn Invest* **15**:242-252.

Nichols, B. J., and J. Lippincott-Schwartz. 2001. Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol* **11**:406-412.

Niewerth, U., A. Frey, T. Voss, C. Le Bouguéneq, G. Baljer, S. Franke, and M. A. Schmidt. 2001. The AIDA autotransporter system is associated with F18 and stx2e in *Escherichia coli* isolates from pigs diagnosed with edema disease and postweaning diarrhea. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**:143-149.

O'Brien, A. D., and R. K. Holmes. 1987. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol Rev* **51**:206-220.

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

Okamoto, K., and M. Takahara. 1990. Synthesis of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin STp as a pre-pro form and role of the pro sequence in secretion. *J Bacteriol* **172**:5260-5265.

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

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

Okamoto, K., H. Yamanaka, M. Takeji, and Y. Fuji. 2001. Region of heat-stable enterotoxin II of *Escherichia coli* involved in translocation across the outer membrane. *Microbiol Immunol* **45**:349-355.

Osek, J. 1999. Prevalence of virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy piglets after weaning. *Vet Microbiol* **68**:209-217.

Osek, J., P. Gallien, M. Truszczynski, and D. Protz. 1999. The use of polymerase chain reaction for detection of virulence factors of *E. coli* strains isolated from pigs in Poland. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* **22**:163-174.

Osek, J. 2003. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1) gene and its relationship with fimbrial and enterotoxin markers in *E. coli* isolates from pigs with diarrhoea. *Vet Microbiol* **91**:65-72.

Papini, E., M. de Bernard, E. Milia, M. Bugnoli, M. Zerial, R. Rappuoli, and C. Montecucco. 1994. Cellular vacuoles induced by *Helicobacter pylori* originate from late endosomal compartments. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:9720-9724.

Papini, E., M. Zoratti, and T. L. Cover. 2001. In search of the *Helicobacter pylori* VacA mechanism of action. *Toxicon* **39**:1757-1767.

Patel, H. K., D. C. Willhite, R. M. Patel, D. Ye, C. L. Williams, E. M. Torres, K. B. Marty, R. A. MacDonald, and S. R. Blanke. 2002. Plasma membrane cholesterol modulates cellular vacuolation induced by the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Infect Immun* **70**:4112-4123.

Paton, J. C., and A. W. Paton. 2006. Shiga toxin 'goes retro' in human primary kidney cells. *Kidney Int* **70**:2049-2051.

Pellizzari, R., C. Guidi-Rontani, G. Vitale, M. Mock, and C. Montecucco. 1999. Anthrax lethal factor cleaves MKK3 in macrophages and inhibits the LPS/IFN γ -induced release of NO and TNF α . *FEBS Lett* **462**:199-204.

Pelegri, P. B., and O. L. Franco. 2005. Plant γ -thionins: Novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. *Int J Biochem Cell Biol* **37**:2239-2253

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

Petit, P., J. Bréard, V. Montalescot, N. B. El Hadj, T. Levade, M. Popoff, and B. Geny. 2003. Lethal toxin from *Clostridium sordellii* induces apoptotic cell death by disruption of mitochondrial homeostasis in HL-60 cells. *Cell Microbiol* **5**:761-771.

Petri Jr., W. A., M. Miller, H. J. Binder, M. M. Levine, R. Dillingham, and R. L. Guerrant. 2008. Enteric infections, diarrhea, and their impact on function and development. *J Clin Invest* **118**:1277-1290.

Pichel, M., N. Binsztein, and G. I. Viboud. 2000. CS22, a novel human enterotoxigenic *Escherichia coli* adhesin, is related to CS15. *Infect Immun* **68**:3280-3285.

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

Pickett, C. L., D. L. Weinstein, and R. K. Holmes. 1987. Genetics of type IIa heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*: operon fusions, nucleotide sequence, and hybridization studies. *J Bacteriol* **169**:5180-5187.

Pickett, C. L., E. M. Twiddy, C. Coker, and R. K. Holmes. 1989. Cloning, nucleotide sequence, and hybridization studies of the type IIb heat-labile enterotoxin gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **171**:4945-4952.

Poulain, B., B. G. Stiles, M. R. Popoff, and J. Molgo. 2006. Attack of the nervous system by clostridial toxins: physical findings, cellular and molecular actions. Chapter 19, pp. 348-389. *In* J. E. Alouf and M. R. Popoff (eds.), *The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins*, 3rd ed., Academic Press-Elsevier, Amsterdam, Boston.

Post, K. W., B. T. Bosworth, and J. L. Knot. 2000. Frequency of virulence factors in *E. coli* isolated from pigs with postweaning diarrhea and edema disease in North Carolina. *Swine Health Prod* **8**:119-120.

Pribnow, D. 1975. Nucleotide sequence of an RNA polymerase binding site at an early T7 promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* **72**:784-788.

Pritchard, J., M. Ngeleka, and D. M. Middleton. 2004. *In vivo* and *in vitro* colonization patterns of AIDA-I-positive *Escherichia coli* isolates from piglets with diarrhea. *J Vet Diagn Invest* **16**:108-115.

Qadri, F., S. K. Das, A. S. Faruque, G. J. Fuchs, M. J. Albert, R. B. Sack, and A. M. Svennerholm. 2000. Prevalence of toxin types and colonization factors in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated during a 2-year period from diarrheal patients in Bangladesh. *J Clin Microbiol* **38**:27-31.

Qadri, F., A. M. Svennerholm, A. S. Faruque, and R. B. Sack. 2005. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Rev* **18**:465-483.

Rajkovic, A., M. Uyttendaele, W. Deley, A. Van Soom, T. Rijsselaere, and J. Debevere. 2006. Dynamics of boar semen motility inhibition as a semi-quantitative measurement of *Bacillus cereus* emetic toxin (Cereulide). *J Microbiol Meth* **65**:525-534.

Ramachandran, R., A. P. Heuck, R. K. Tweten, and A. E. Johnson. 2002. Structural insights into the membrane-anchoring mechanism of a cholesterol-dependent cytolysin. *Nat Struct Biol* **9**:823-827.

Rao, M. C. 1985. Toxins which activate guanylate cyclase: heat-stable enterotoxins. *Ciba Found Symp* **112**:74-93.

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

Ravi, M., M. Ngeleka, S. H. Kim, C. Gyles, F. Berthiaume, M. Mourez, D. Middleton, and E. Simko. 2007. Contribution of AIDA-I to the pathogenicity of a porcine diarrheagenic *Escherichia coli* and to intestinal colonization through biofilm formation in pigs. *Vet Microbiol* **120**:308-319.

Regina Todeschini, A., and S. I. Hakomori. 2008. Functional role of glycosphingolipids and gangliosides in control of cell adhesion, motility, and growth, through glycosynaptic microdomains. *Biochim Biophys Acta* **1780**:421-433.

Reig, N., and F. G. van der Goot. 2006. About lipids and toxins. *FEBS Lett* **580**:5572-5579.

Repp, H., Z. Pamukci, A. Koschinski, E. Domann, A. Darji, J. Birringer, D. Brockmeier, T. Chakraborty, and F. Dreyer. 2002. Listeriolysin of *Listeria monocytogenes* forms Ca²⁺-permeable pores leading to intracellular Ca²⁺ oscillations. *Cell Microbiol* **4**:483-491.

Rippinger, P., H. Bertschinger, H. Imberechts, B. Nagy, I. Sorg, M. Stamm, P. Wild, and G. Wittig. 1995. Designations F18ab and F18ac for the related fimbrial types F107, 2134p and 8813 of *E. coli* isolated from porcine postweaning diarrhoea and from oedema disease. *Vet Microbiol* **45**:281-295.

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

Rose, R., S. C. Whipp, and H. W. Moon. 1987. Effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b on small intestinal villi in pigs, rabbits, and lambs. *Vet Pathol* **24**:71-79.

Rossjohn, J., S. C. Feil, W. J. McKinstry, R. K. Tweten, and M. W. Parker. 1997. Structure of a cholesterol-binding, thiol-activated cytolysin and a model of its membrane form. *Cell* **89**:685-692.

Rousset, E., J. Harel, and J. D. Dubreuil. 1998a. Binding characteristics of *Escherichia coli* enterotoxin b (STb) to the pig jejunum and partial characterization of the molecule involved. *Microb Pathog* **24**:277-288.

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

Rousset, E., and J. D. Dubreuil. 1999. Evidence that *Escherichia coli* STb enterotoxin binds to lipidic components extracted from the pig jejunal mucosa. *Toxicon* **37**:1529-1537.

Rousset, E., and J. D. Dubreuil. 2000. Les récepteurs des entérotoxines bactériennes. *Vet Res* **31**:413-435.

Rowland M.G. 1986. The Gambia and Bangladesh: the seasons and diarrhoea. *Dialogue Diarrhoea* **26**:3.

Rudel, T., A. Schmid, R. Benz, H. A. Kolb, F. Lang, T. F. Meyer. 1996. Modulation of *Neisseria* porin (PorB) by cytosolic ATP/GTP of target cells: parallels between pathogen accommodation and mitochondrial endosymbiosis. *Cell* **85**:391-402.

Sack, R. B. 1975. Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol* **29**:333-353.

Saito, R., A. Tanaka, K. Sugiyama, I. Azuma, and Y. Yamamura. 1976. Adjuvant effect of cord factor, a mycobacterial lipid. *Infect Immun* **13**:776-781.

Sandvig, K., O. Garred, K. Prydz, J. V. Kozlov, S. H. Hansen, and B. van Deurs. 1992. Retrograde transport of endocytosed Shiga toxin to the endoplasmic reticulum. *Nature* **358**:510-512.

Sandvig, K., and B. van Deurs. 2002. Transport of protein toxins into cells: pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin. *FEBS Lett* **529**:49-53.

Santos, J. H., L. Hunakova, Y. Chen, C. Bortner, and B. Van Houten. 2003. Cell sorting experiments link persistent mitochondrial DNA damage with loss of mitochondrial membrane potential and apoptotic cell death. *J Biol Chem* **278**:1728-1734.

Santelli, E., L. A. Bankston, S. H. Leppla, and R. C. Liddington. 2004. Crystal structure of a complex between anthrax toxin and its host cell receptor. *Nature* **430**:843-844.

Savage, D. C. 1986. Gastrointestinal microflora in mammalian nutrition. *Ann Rev Nutr* **6**:155-178.

Savarino, S. J., A. Fasano, D. C. Robertson, and M. M. Levine. 1991. Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an *in vitro* rabbit intestinal model. *J Clin Invest* **87**:1450-1455.

Savarino, S. J., A. Fasano, J. Watson, B. M. Martin, M. M. Levine, S. Guandalini, and P. Guerry. 1993. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:3093-3097.

Schengrund, C. L., and N. J. Ringler. 1989. Binding of *Vibrio cholera* toxin and the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* to GM1, derivatives of GM1, and nonlipid oligosaccharide polyvalent ligands. *J Biol Chem* **264**:13233-13237.

Schiavo, G., and F. G. van der Goot. 2001. The bacterial toxin toolkit. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**:530-537.

Schuerch, D. W., E. M. Wilson-Kubalek, and R. K. Tweten. 2005. Molecular basis of listeriolysin O pH dependence. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**:12537-12542.

Schnupf, P., and D. A. Portnoy. 2007. Listeriolysin O: a phagosome-specific lysin. *Microbes Infect* **9**:1176-1187.

Schultheis, P. J., L. L. Clarke, P. Meneton, M. L. Miller, M. Soleimani, L. R. Gawenis, T. M. Riddle, J. J. Duffy, T. Doetschman, T. Wang, G. Giebisch, P. S. Aronson, J. N. Lorenz, and G. E. Shull. 1998. Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger. *Nat Genet* **19**:282-285.

Scobie, H. M., G. T. A. Rainey, K. A. Bradley, and J. A. T. Young. 2003. Human capillary morphogenesis protein 2 functions as an anthrax toxin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:5170-5174.

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

Segrest, J. P., H. De Loof, J. G. Dohlman, C. G. Brouillette, and G. M. Anantharamaiah. 1990. Amphipathic helix motif: classes and properties. *Proteins* **8**:103-117.

Seidler, U., I. Blumenstein, A. Kretz, D. Viellard-Baron, H. Rossmann, W. H. Colledge, M. Evans, R. Ratcliff, and M. Gregor. 1997. A functional CFTR protein is required for mouse intestinal cAMP-, cGMP- and Ca(2+)-dependent HCO₃⁻ secretion. *J Physiol* **505**:411-423.

Sekizaki, T., H. Akashi, and N. Terakado. 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.

Sheppard, D. N., and M. J. Welsh. 1999. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev* **79**:23-45.

Shin, S. J., Y. F. Chang, M. Timour, T. L. Lauderdale, and D. H. Lein. 1994. Hybridization of clinical *Escherichia coli* isolates from calves and piglets in New York State with gene probes for enterotoxins (STaP, STb, LT), Shiga-like toxins (SLT-I, SLT-II) and adhesion factors (K88, K99, F41, 987P). *Vet Microbiol* **38**:217-225.

Shoshan-Barmatz, V., A. Israelson, D. Brdiczka, and S. S. Sheu. 2006. The voltage-dependent anion channel (VDAC): function in intracellular signalling, cell life and cell death. *Curr Pharm Des* **12**:2249-2270.

Sillence, D. J. 2007. New insights into glycosphingolipid functions--storage, lipid rafts, and translocators. *Int Rev Cytol* **262**:151-189.

Sixma, T. K., S. E. Pronk, K. H. Kalk, E. S. Wartna, B. A. van Zanten, B. Witholt, and W. G. Hol. 1991. Crystal structure of a cholera toxin-related heat-labile enterotoxin from *E. coli*. *Nature* **351**:371-377.

Skulachev, V. P. 2006. Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. *Apoptosis* **11**:473-485.

Smeds, A., M. Pertovaara, T. Timonen, T. Pohjanvirta, S. Pelkonen, and A. Palva. 2003. Mapping the binding domain of the F18 fimbrial adhesin. *Infect Immun* **71**:2163-2172.

Smit, H., W. Gaastra, J. P. Kamerling, J. F. Vliegthart, and F. K. de Graaf. 1984. Isolation and structural characterization of the equine erythrocyte receptor for enterotoxigenic *Escherichia coli* K99 fimbrial adhesin. *Infect Immun* **46**:578-584.

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

Smyth C. J., M. Maroon, and S. G. J. Smith. 1994. Fimbriae of *Escherichia coli*. pp. 3999-3436. *In* C. L. Gyles (Ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans, CAB international, Guelph, Canada.

Snoeck, V., E. Cox, F. Verdonck, J. J. Joensuu, and B. M. Goddeeris. 2004. Influence of porcine intestinal pH and gastric digestion on antigenicity of F4 fimbriae for oral immunisation. *Vet Microbiol* **98**:45-53.

Snook, C. F., J. A. Jones, and Y. A. Hannun. 2006. Sphingolipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* **1761**:927-946.

So, M., and B. J. McCarthy. 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 USA* **77**:4011-4015.

Sobota, A. E. 1984. Inhibition of bacterial adherence by cranberry juice: potential use for the treatment of urinary tract infections. *J Urol* **131**:1013-1016.

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

Song, L., M. R. Hobaugh, C. Shustak, S. Cheley, H. Bayley, and J. E. Gouaux. 1996. Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* **274**:1859-1866.

Songer, J. G., and F. A. Uzal. 2005. Clostridial enteric infections in pigs. *J Vet Diagn Invest* **17**:528-536.

Spandau, D. F., and C. H. Lee. 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.

Stanley, P., V. Koronakis, and C. Hughes. 1998. Acylation of *Escherichia coli* hemolysin: a unique protein lipidation mechanism underlying toxin function. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:309-333.

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

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

Swaminathan, S., and S. Eswaramoorthy. 2000. Structural analysis of the catalytic and binding sites of *Clostridium botulinum* neurotoxin B. *Nat Struct Biol* **7**:693-699.

Szako, I., S. Brutsche, F. Tombola, M. Moschioni, B. Satin, J. L. Telford, R. Rappuoli, C. Montecucco, E. Papini, and M. Zoratti. 1999. Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity. *EMBO J* **18**: 5517-5527.

Takao, T., T. Hitouji, S. Aimoto, Y. Shimonishi, S. Hara, T. Takeda, Y. Takeda, and T. Miwatani. 1983. Amino acid sequence of a heat-stable enterotoxin isolated from enterotoxigenic *Escherichia coli* strain 18D. FEBS Lett **152**:1-5.

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

Talarico, L. B., R. G. Zibetti, P. C. Faria, L. A. Scolaro, M. E. Duarte, M. D. Nosedo, C. A. Pujol, and E. B. Damonte. 2004. Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactans from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata*. Int J Biol Macromol **34**:63-71.

Tauschek, M., R. J. Gorrell, R. A. Strugnell, and R. M. Robins-Browne. 2002. Identification of a protein secretory pathway for the secretion of heat-labile enterotoxin by an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA **99**:7066-7071.

Telford, J. L., P. Ghiara, M. Dell'Orco, M. Comanducci, D. Burrioni, M. Bugnoli, M. F. Tecce, S. Censini, A. Covacci, and Z. Xiang. 1994. Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. J Exp Med **179**:1653-1658.

Thiagarajah, J. R., and A. S. Verkman. 2003. CFTR pharmacology and its role in intestinal fluid secretion. *Curr Opin Pharmacol* **3**:594-599.

Tien, X. Y., T. A. Brasitus, M. A. Kaetzel, J. R. Dedman, and D. J. Nelson. 1994. Activation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by cGMP in the human colonic cancer cell line, Caco-2. *J Biol Chem* **269**:51-54.

Trius, A., and J. G. Sebranek. 1996. Carrageenans and their use in meat products. *Crit Rev Food Sci Nutr* **36**:69-85.

Tsen, H. Y., and L. Z. Jian. 1998. Development and use of a multiplex PCR system for the rapid screening of heat labile toxin I, heat stable toxin II and shiga-like toxin I and II genes of *Escherichia coli* in water. *J Appl Microbiol* **84**:585-592.

Tsujimoto, Y., and S. Shimizu. 2007. Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. *Apoptosis* **12**:835-840.

Turner, S. M., A. Scott-Tucker, L. M. Cooper, and I. R. Henderson. 2006. Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **263**:10-20.

Turton, K., J. A. Chaddock, and K. R. Acharya. 2002. Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility. *Trends Biochem Sci* **27**:552-558.

Tweten, R. K. 2005. Cholesterol-dependent cytolysins, a family of versatile pore-forming toxins. *Infect Immun* **73**:6199-6209.

Urban, R. G., L. A. Dreyfus, and S. C. Whipp. 1990. Construction of a bifunctional *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin (STb)-alkaline phosphatase fusion protein. *Infect Immun* **58**:3645-3652.

Vaandrager, A. B. 2002. Structure and function of the heat-stable enterotoxin receptor/guanylyl cyclase C. *Mol Cell Biochem* **230**:73-83.

Van den Broeck, W., E. Cox, and B. M. Goddeeris. 1999. Receptor-specific binding of purified F4 to isolated villi. *Vet Microbiol* **68**:255-263.

Van den Broeck, W., C. Horvath, and M. J. S. De Wolf. 2007. Pathogens in focus *Vibrio cholerae*: Cholera toxin. *Int J Biochem Cell Biol* **39**:1771-1775

Van de Velde, F., H. A. Peppelman, H. S. Rollema, and R. H. Tromp. 2001. On the structure of kappa/iota-hybrid carrageenans. *Carbohydrate Research* **331**: 271-283.

Vázquez-Boland, J. A., R. Stachowiak, L. Lacharme, and M. Scotti. 2006. Listeriolysin, Chapter 40, p. 700-716. *In* J. E. Alouf and M. R. Popoff (Eds.), The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins, 3rd ed. Academic Press-Elsevier, Amsterdam, Boston.

Vitale, G., R. Pellizzari, C. Recchi, G. Napolitani, M. Mock, C. Montecucco. 1998. Anthrax lethal factor cleaves the N-terminus of MAPKKs and induces tyrosine/threonine phosphorylation of MAPKs in cultured macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* **248**:706-711.

Veilleux, S., and J. D. Dubreuil. 2006. Presence of *Escherichia coli* carrying the EAST1 toxin gene in farm animals. *Vet Res* **37**:3-13.

Veilleux, S., N. Holt, B. D. Schultz, and J. D. Dubreuil. 2008. *Escherichia coli* EAST1 toxin toxicity of variants 17-2 and O 42. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* In press.

Vu-Khac, H., E. Holoda, and E. Pilipcinec. 2004. Distribution of virulence genes in *E. coli* strains isolated from diarrhoeic piglets in the Slovak Republic. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **51**:343-347.

Wagner, J. A., A. L. Cozens, H. Schulman, D. C. Gruenert, L. Stryer, and P. Gardner. 1991. Activation of chloride channels in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells by multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Nature* **349**:793-796.

Weikel, C. S., and R. L. Guerrant. 1985. STb enterotoxin of *Escherichia coli*: cyclic nucleotide-independent secretion. *Ciba Found Symp* **112**:94-115.

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

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

Whipp, S. C., H. W. Moon, L. J. Kemeny, and R. A. Argenzio. 1985. Effect of virus-induced destruction of villous epithelium on intestinal secretion induced by heat-stable *Escherichia coli* enterotoxins and prostaglandin E1 in swine. *Am J Vet Res* **46**:637-642.

Whipp, S. C., S. L. Moseley, and H. W. Moon. 1986. Microscopic alterations in jejunal epithelium of 3-week-old pigs induced by pig-specific, mouse-negative, heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin. *Am J Vet Res* **47**:615-618.

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

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

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. 1991. Intestinal responses to enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable toxin b in non-porcine species. *Am J Vet Res* **52**:734-737.

Wiedemann, N., A. E. Frazier, and N. Pfanner. 2004. The protein import machinery of mitochondria. *J Biol Chem* **279**:14473-14476.

Willhite, D. C., T. L. Cover, and S. R. Blanke. 2003. Cellular vacuolation and mitochondrial cytochrome c release are independent outcomes of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin activity that are each dependent on membrane channel formation. *J Biol Chem* **278**:48204-48209.

Willhite, D. C., and S. R. Blanke. 2004. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin enters cells, localizes to the mitochondria, and induces mitochondrial membrane permeability changes correlated to toxin channel activity. *Cell Microbiol* **6**:143-154.

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

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

Wolf, M. K. 1997. Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **10**:569-584.

Worrell, R. T., and R. A. Frizzell. 1991. CaMKII mediates stimulation of chloride conductance by calcium in T84 cells. *Am J Physiol* **260**:877-882.

Wright, E.M., and D. D. Loo. 2000. Coupling between Na⁺, sugar, and water transport across the intestine. *Ann N Y Acad Sci* **915**:54-66.

Yagci, A., T. Yagci, B. Sener, Y. Suziki, and K. Ahmed. 2007. Sulfatide mediates attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to human pharyngeal epithelial cells. *New Microbiol* **30**:167-171.

Yahiro, K., A. Wada, M. Nakayama, T. Kimura, K. Ogushi, T. Niidome, H. Aoyagi, K. Yoshino, K. Yonezawa, J. Moss, and T. Hirayama. 2003. Protein-tyrosine phosphatase alpha, RPTP alpha, is a *Helicobacter pylori* VacA receptor. *J Biol Chem* **278**:19183-19189.

Yamamoto, T., and M. Nakazawa. 1997. Detection and sequences of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene in enterotoxigenic *E. coli* strains isolated from piglets and calves with diarrhea. *J Clin Microbiol* **35**:223-227.

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

Yamanaka, H., T. Nomura, Y. Fujii, and K. Okamoto. 1997. Extracellular secretion of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin I across the outer membrane. *J Bacteriol* **179**:3383-3390.

Yang, Y., Z. Gao, L. M. Guzmán-Verduzco, K. Tachias, and Y. M. Kupersztoch. 1992. Secretion of the STA3 heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: extracellular delivery of Pro-STA is accomplished by either Pro or STA. *Mol Microbiol* **6**:3521-3529.

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

Zachos, N. C., M. Tse, and M. Donowitz. 2005. Molecular physiology of intestinal Na⁺/H⁺ exchange. *Ann Rev Physiol* **67**:411-443.

Zaitseva, J., S. Jenewein, C. Oswald, T. Jumpertz, I. B. Holland, and L. Schmitt. 2005. A molecular understanding of the catalytic cycle of the nucleotide-binding domain of the ABC transporter HlyB. *Biochem Soc Trans* **33**:990-995.

Zasloff, M. 1987. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**:5449-5453.

Zhang, W., E. Berberov, J. Freeling, D. He, R. Moxley, and D. H. Francis. 2006. Significance of heat stable and heat-labile enterotoxins in porcine colibacillosis in an additive model for pathogenicity study. *Infect Immun* **76**:3107-3114.

Zhang, W., M. Zhao, L. Ruesch, A. Omot, and D. Francis. 2007. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. *Vet Microbiol* **123**:145-152.

ANNEXES

ARTICLE 4

**L'entérotoxine STb d'Escherichia coli perméabilise les vésicules
de membrane à bordure en brosse (VMBB) des cellules de
l'épithélium du jéjunum de porc**

Carina Gonçalves, Vincent Vachon, Jean-Louis Schwartz et J. Daniel Dubreuil

Publié dans :

SFET collection Rencontres en toxicologie, Envenimations, intoxications, Ed. Lavoisier

Goudey-Perrière, F., E. Benoit, S. Puisseux-Dao, C. Bon

12^{èmes} Rencontres en toxicologie (Paris, 2 et 3 décembre 2004) pp. 27-30

L'entérotoxine STb d'*Escherichia coli* perméabilise les vésicules de membrane à bordure en brosse (VMBB) des cellules de l'épithélium du jéjunum de porc

Carina GONÇALVES¹, Vincent VACHON², Jean-Louis SCHWARTZ² et J. Daniel DUBREUIL¹

¹Groupe de recherche sur les maladies infectieuses du porc (GREMIP), Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6 et ²Groupe d'étude des protéines membranaires (GÉPROM) et Réseau Biocontrôle, Université de Montréal, C. P. 6128, succ. Centre-ville, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada
Tél : (450) 773-8521 poste 8376 ou 8433 Fax : (450) 778-8108

Courriel : XXXXXXXXXX

***Escherichia coli* STb enterotoxin permeabilises pig jejunum brush border membrane vesicles**

Summary

STb enterotoxin produced by *Escherichia coli* is causing diarrhea in various animals including humans. *STb* is a 48-residue polypeptide which structure shows two anti-parallel alpha-helices (Cys10-lys22, amphipathic, and gly38-ala44, hydrophobic) connected by a glycine-rich loop. Sulfatide, a glycosphingolipid, has been identified as a functional receptor for *STb*. Recently, we have demonstrated the oligomerisation of *STb* and formation of ion channels in planar lipid bilayers (PLBs) in the presence of sulfatide. The mechanism of action of *STb* is not well understood.

Using brush border membrane vesicles (BBMVs) obtained from pig jejunum we have observed permeabilisation of the vesicles in presence of *STb*. Pore formation by *E. coli* *STb* enterotoxin in BBMVs have been characterised using a membrane potential-sensitive probe, 3,3'-dipropylthiadicarbocyanine iodide (diS-C₃(5)). Fluorescence measurement showed that *STb* reduces the membrane potential generated by a K⁺ gradient in the presence of valinomycin. This process is dose-dependent, saturable and influenced by the solution's composition.

Introduction

La toxine STb est produite par certaines souches d'*Escherichia coli* entérotoxigènes conduisant à une altération réversible de l'homéostasie intestinale avec une sécrétion importante résultant en une diarrhée chez l'homme et l'animal (bovins, porcins, aviaires) [1]. La toxine STb mature est un peptide de 48 acides aminés avec un poids moléculaire de 5200 Da et présente un point isoélectrique basique (pI = 9,6). Une étude par résonance magnétique nucléaire a révélé la structure tertiaire de la toxine. STb forme deux hélices α antiparallèles (une hélice hydrophile, Cys10 à Lys22, et une hélice hydrophobe, Gly38 à Ala44) reliées par une boucle riche en glycines [2]. La structure tertiaire est stabilisée par deux ponts disulfure (Cys10-Cys48 et Cys21-Cys36) essentiels à l'activité entérotoxique [3, 4]. Le sulfatide (SFT), un glycosphingolipide présent à la surface des cellules intestinales du jéjunum, joue le rôle de récepteur pour STb [5]. Récemment, nous avons pu mettre en évidence, *in vitro*, un processus d'oligomérisation de STb en présence d'agent pontant. L'intégrité structurale de STb est essentielle à la formation de ces oligomères [6]. Lors d'une étude exploratoire effectuée en bicouches lipidiques planes, l'activité électrophysiologique de pores ioniques créés par STb a été observée en présence de SFT [7]. Les effets de STb sur les cellules intestinales, en particulier au

niveau de leur perméabilisation, restent cependant mal connus. Nous avons donc entrepris d'étudier l'interaction de STb avec la paroi luminale intestinale au moyen de vésicules de membrane à bordure en brosse (VMBB) préparées à partir du tissu épithélial de jéjunum de porc. Ce tissu est la cible de la toxine et le SFT est présent à sa surface luminale [5].

Les VMBB sont préparées à partir de jéjunum de porc selon la méthode de Zhang *et al.* [8] et chargées avec une solution de KCl (250 mM). Un dosage de protéines (réaction de Biuret) est réalisé, et la préparation de VMBB utilisée est ajustée à une concentration de 2 mg de protéines/mL. Les vésicules sont ensuite incubées en présence ou non de toxine STb pendant 15 minutes. La perméabilisation des VMBB est observée à l'aide d'une sonde fluorescente sensible au potentiel membranaire, le 3,3'-dipropylthiadicarbocyanine iodide (diS-C₃(5)) [9]. La sonde s'associe à la membrane des VMBB en réaction à la formation d'un potentiel de membrane. La sonde est utilisée à une concentration finale de 1,5 μ M dans une solution isotonique appropriée (Figures 1, 2). Les vésicules sont injectées à une concentration finale de 10 μ g de protéines/mL dans une cuvette de polystyrène contenant une solution isotonique appropriée, la sonde fluorescente et avec ou sans valinomycine à une concentration finale de 7,5 μ M. Le niveau de fluorescence est mesuré avec un spectrofluoromètre (Spex Fluorolog CM-3). Les valeurs expérimentales obtenues ont été normalisées par rapport au niveau de fluorescence observé avant l'injection des VMBB. Chaque injection a été réalisée en quadruplicate pour deux préparations de VMBB et de toxine STb purifiée. Les résultats représentent les moyennes de ces expérimentations (\pm l'écart type).

Résultats

Les VMBB chargées en KCl (250 mM) ont été injectées dans des solutions isotoniques de KCl, NaCl et gluconate de potassium (GlucK) (Figure 1). Le niveau de fluorescence est environ de 1,0 dans le cas d'une injection de VMBB dans une solution isotonique de KCl ou de GlucK. Par contre, le niveau de fluorescence est plus faible dans le cas d'une injection dans une solution isotonique de NaCl ce qui s'explique par le fait que les VMBB présentent une perméabilité pour les ions Na⁺, propriété qui est connue pour être intrinsèque aux tissus d'origine (Figure 1, barres blanches). Aucune variation du niveau de fluorescence n'a été observée entre les vésicules incubées en présence ou non de la toxine STb dans les trois solutions (Figure 1, barres blanches et barres grises).

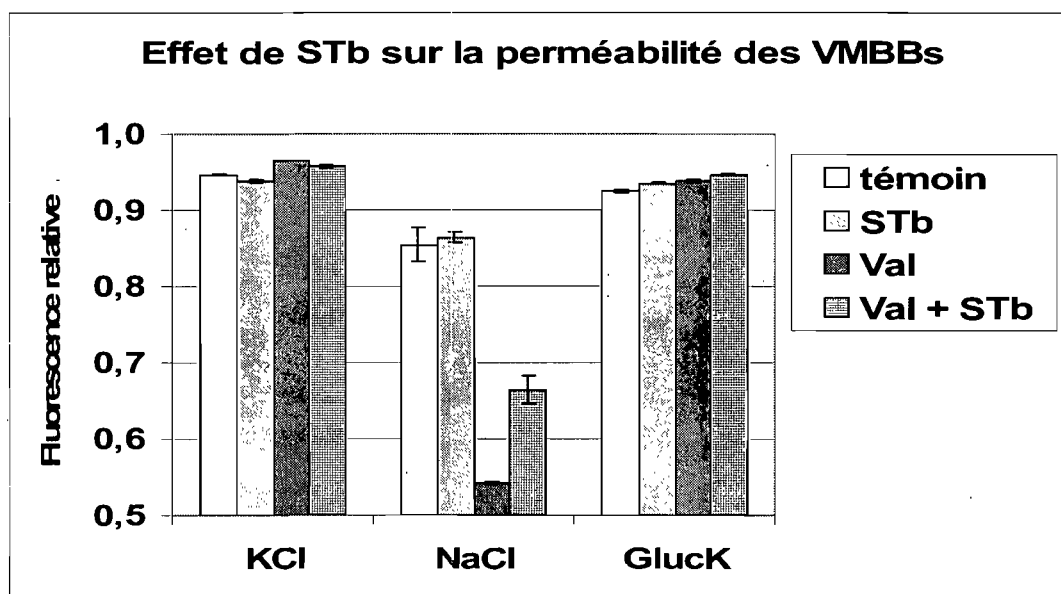


Figure 1. Effet de l'entérotoxine STb d'*E. coli* sur le potentiel de membrane des vésicules de la membrane de la bordure en brosse de

jéjunum de porc. Les VMBB ont été préincubées avec ou sans toxine (0,5 µg/µL). Les VMBB sont chargées en KCl (250 mM) et injectées dans des cuvettes contenant une solution isotonique de KCl, NaCl ou GlucK avec ou sans valinomycine.

Figure 1. Effect of *E. coli* STb enterotoxin on the membrane potential of brush border membrane vesicles from pig jejunum. BBMV's were preincubated with or without toxin (0,5 µg/µL). BBMV's were loaded with 250mM KCl and injected into cuvettes containing isotonic solutions of KCl, NaCl or GlucK with or without valinomycin.

En revanche, l'ajout de valinomycine, un ionophore du potassium, sur des VMBB incubées en absence de toxine provoque une chute de la fluorescence dans la solution isotonique de NaCl. Cette observation s'explique par l'apparition d'un gradient de K^+ dirigé vers l'extérieur des vésicules provoquant l'accumulation de la sonde fluorescente chargée positivement dans les VMBB (Figure 1, barres noires). En présence de valinomycine, les vésicules incubées avec la toxine STb et injectées dans une solution isotonique de NaCl font apparaître un niveau de fluorescence plus élevé que celui observé avec des vésicules en absence de STb. La toxine STb provoque la dissipation du potentiel de membrane généré par la valinomycine. Cette dissipation de potentiel est observée uniquement avec la solution de NaCl mais pas dans les deux autres solutions puisqu'il n'y a pas de gradient de potassium (Figure 1, barres quadrillées).

La dissipation du potentiel de membrane généré par la valinomycine dans le cas d'une injection des VMBB traitées avec la toxine STb dans une solution isotonique de NaCl peut s'expliquer par une entrée de Na^+ ou une sortie de Cl^- des vésicules. Mais les résultats obtenus avec les solutions de KCl et de gluconate de potassium montrent que les pores formés par STb présentent une sélectivité vis à vis des cations.

Une étude dose-réponse de STb a été réalisée dans les mêmes conditions mais l'injection des VMBB est faite dans une solution isotonique de NMDGCl (Chlorure de N-méthyl D-glucamine). Ainsi, on observe la formation d'un plateau de saturation du niveau de fluorescence avec 6 µg de la toxine (12,7 nmol de toxine STb/mg de protéines de VMBB) (Figure 2).

Courbe de dose-réponse de STb

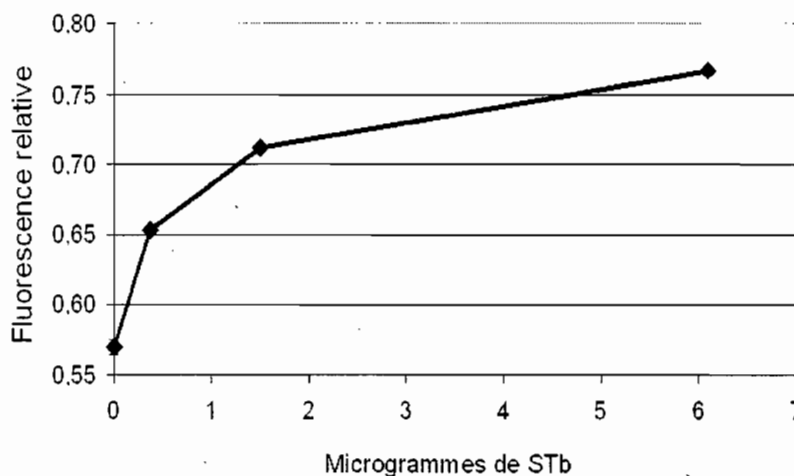


Figure 2. Effet de l'entérotoxine STb d'*E. coli* sur le potentiel de membrane généré par un gradient de K^+ en présence de valinomycine. Les VMBB sont chargées avec KCl (250 mM) et préincubées pendant 10 minutes avec ou sans STb.

Figure 2. Effect of *E. coli* STb enterotoxin on the membrane potential generated by a K^+ gradient in the presence of valinomycin. BBMV's loaded with 250 mM KCl were preincubated for 10 minutes with or without STb.

Conclusions

Nos résultats montrent que STb perméabilise efficacement la membrane apicale du jéjunum de porcelet. Cette réponse est dose dépendante et saturable. De plus, le niveau de fluorescence observé est fortement influencé par la composition ionique du milieu.

Références bibliographiques

- [1] Dubreuil J. D., *Escherichia coli* STb enterotoxin, *Microbiology* **143** (1997) 1783-1795.
- [2] Sukumar M., Rizo J., Wall M., Dreyfus L. A., Kuperstoch Y. M., Gierasch L. M., The structure of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin by nuclear magnetic resonance and circular dichroism, *Protein Sci.* **4** (1995) 1718-1729.
- [3] Arriaga Y. L., Harville B., Dreyfus L. A., Contribution of individual disulfide bonds to biological action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B, *Infect. Immun.* **63** (1995) 4715-4720.
- [4] Okamoto K., Baba H., Yamanaka H., Akashi N., Fujii Y., Disulfide bond formation and secretion of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II, *J. Bacteriol.* **177** (1995) 4579-4586.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] Labrie V., Potvin L., Harel J., Dubreuil J. D., Schwartz J.-L., Enterotoxin b of *Escherichia coli* (STb) forms ion channels in planar lipid bilayers. *10th European Workshop conference on Bacterial Protein Toxins*. Bohon, Belgique, 2001, pA54.
- [8] Zhang H., Malo C., Buddington R. K., Suckling induces rapid intestinal growth and changes in brush border digestive functions of newborn-pigs, *J. Nutr.* **127** (1997) 418-426.
- [9] Kirouac M., Vachon V., Rivest S., Schwartz J.-L., Laprade R., Analysis of the properties of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins using a potential-sensitive fluorescent probe, *J. Membr. Biol.* **196** (2003) 51-59.

ARTICLE 5

***Escherichia coli* STb enterotoxin: in vivo toxicity and
internalization investigations using membranar and cellular
models**

J. Daniel Dubreuil, Stéphanie Penel and Carina Gonçalves

Publié dans:

2007, Research Journal of Microbiology **2**: 209-215

Résumé

L'activité toxique de STb a fait l'objet de nombreuses études dans notre laboratoire. Cette "mini-revue" porte sur les dernières études réalisées sur les mécanismes impliqués dans l'interaction de la toxine STb à la cellule.

En se basant sur une collection de mutants, une étude structure fonction a été réalisée. La toxicité de ces mutants sur des anses ligaturées de rat et leur attachement au sulfatide ont été testées. Cette étude a permis de mettre en évidence l'importance d'interactions électrostatiques et hydrophobiques dans l'activité de la toxine STb. De plus, la mise au point de modèles cellulaires et membranaires ont permis d'identifier des mécanismes impliqués dans l'internalisation et l'endocytose de STb. La formation d'un canal ionique a été observée sur des bicouches lipidiques planes ainsi que la perméabilisation des vésicules de VMBB. Par microscopie électronique nous avons observé l'internalisation de STb dans des anses ligaturées de rat. L'endocytose de STb dans les cellules NIH-3T3 ont permis de mettre en évidence une voie d'endocytose dépendante de la clathrine et l'autre des caveolae.

***Escherichia coli* STb enterotoxin: *in vivo* toxicity and internalization investigations using membranar and cellular models**

J. Daniel Dubreuil*, Stéphanie Penel and Carina Gonçalves

Département de Pathologie et Microbiologie,

Faculté de Médecine Vétérinaire,


3200 Rue Sicotte

Université de Montréal,

Saint-Hyacinthe, Québec, Canada J2S-7C6

Tel: (450) 773-8521 ext. 8433

Fax: (450) 778-8108

E-mail 

* : Corresponding author

Short title: *E. coli* STb toxicity and internalization studies

Summary

STb toxin is produced by strains of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from various animals including humans. The molecule comprises 48 amino acids (M.W. of 5200 Da and a pI of 9.6) with 4 cysteines involved in the formation of 2 disulfide bridges. Researches on STb toxin have resulted in the elucidation of sulfatide as the receptor. This molecule was confirmed as a functional receptor as alteration or blocking strategies reduced or abrogated the toxicity as determined in the rat ligated loop assay. A study using a chemical cross-linker indicated that hexamers and heptamers of STb were formed. Oligomer formation could be observed with intact toxin but was abrogated in presence of β -mercaptoethanol. A structure-function study of STb using point mutations on residues, as determined by a NMR study, known to point to the solvent indicated that, overall, electrostatic and hydrophobic interactions are important for enterotoxicity and binding to sulfatide, respectively. Mutants unable to form oligomer also showed an important reduction in toxicity. An electrophysiological study using planar lipid bilayers technology indicated that ions channels were formed when STb was added. Recently, we conducted experiments on pig jejunal brush border membrane vesicles and observed permeabilization of this vesicular model. With electron microscopy techniques, we could observe internalization of STb toxin after administration into rat intestinal loops. Using a cellular model (NIH-3T3 fibroblasts) confocal microscopy and cell markers, we observed endocytosis of STb. Contrarily to native toxin, reduced and alkylated STb toxin was not internalized. Overall, using the NIH-3T3 fibroblasts cell model, STb endocytosis was shown to be mediated by two endocytic pathways, one clathrin-dependent and the other caveolae-dependent. These data together indicate that STb, after recognition of its receptor, is internalized into susceptible cells.

Keywords: *Escherichia coli*, STb enterotoxin, toxicity, internalization, endocytosis, cellular and membranar models.

Introduction

Escherichia coli STb enterotoxin is found in association with bacterial isolates from various animals including humans (Dubreuil, 1997). This heat-stable toxin (30 min at 100°C) acts in the small intestine of these animals and result in secretory diarrhea. Water, Na⁺, Cl⁻ and HCO₃⁻ are the electrolytes that have been found to be involved in the secretion process. This toxin stimulates a cyclic nucleotide-independent secretion, not altering cGMP or cAMP levels, in intestinal mucosal cells. For now, although numerous signaling molecules were related to the toxic action of STb, the precise secretory mechanism involved is not clear (Dubreuil, 1997). To better understand the effects of STb toxin on the intestinal mucosa, in vivo structure-function studies were conducted in rat ligated intestinal loops using purified STb mutant molecules (Labrie et al., 2001a). In addition, cellular and membranar models were set up and used to focus on the internalization and endocytic processes of STb toxin.

1. STb toxin and receptor

STb toxin has been observed in *E. coli* strains from swine, cattle, horses, dogs, cats, chickens, ferrets and humans. The mature toxin comprises 48 amino acids including four cysteines residues involved in the formation of two disulfides bridges (Figure 1). The two bridges are necessary for the toxicity and one mutation of any of the cysteine residues result in an atoxic molecule (Arriga et al., 1995; Okamoto et al., 1995). STb has a molecular weight of 5200 Da and a pI of 9.6. The first 7 amino acids at the NH₂-terminus are not involved either in the toxicity or the structure of the toxin (Sukumar et al., 1995). Only one

antigenic type of STb was observed although recently Fekete et al. (2003) observed a STb molecule where two amino acids differed (His12-Asn and Lys23-Ile) from the already described toxin. The biological activity of this molecule was not determined. Nuclear magnetic resonance (NMR) studies have established a structure with two anti-parallel α -helices separated by a loop rich in glycines (Sukumar et al., 1995). An amphipathic helix between residues 10 and 23, exposes several polar side chains. Facing it is a hydrophobic helix extending from residues 38 to 44 (Figure 1). The synthesized mature toxin is secreted in the culture supernatant and is not associated with the cellular fraction (Kupersztoch et al., 1990).

Rousset et al. (1998a) using a semi-quantitative assay based on fluorescent microscopy determined the chemical nature of STb receptor on pig jejunum as being a glycosphingolipid. This result was obtained by treating the jejunum with various enzymes and chemical treatments and reacting the treated tissue with FITC-labelled STb to observe the binding or absence of binding. In another study, the same authors tested commercially available molecules of lipidic nature after immobilization in ELISA plates for binding to STb (Rousset et al., 1998b). Sulfatide (3'SO₄-galactosyl-ceramide) was the molecule that showed the highest binding to STb toxin. The reaction was dose-dependent and saturable (Rousset et al., 1998b). Sulfatide was then extracted from pig jejunum brush border and its chemical nature confirmed by thin layer chromatography (TLC) following the observed R_f compare to reference sulfatide and reaction with a monoclonal antibody. The functionality of this molecule was determined in vivo using the rat loop assay. Following treatments with

laminin (a compound known to bind specifically to sulfated glycolipids) and a sulfatase decreased markedly the biological activity observed. A scatchard analysis of STb binding to sulfatide indicated a K_d in the μM range (Beausoleil and Dubreuil, 2001). A mass spectrometry analysis of the extracted sulfatide recuperated from TLC plates showed that it was composed of hydroxylated molecules comprising 16, 22 and 24 carbons and molecules saturated with 16 carbons. The hydroxylated sulfatide with a ceramide of 16 carbons was the main molecule in the extract (Beausoleil et al., 2002b).

2. Structure-function studies in relation to receptor binding and toxicity

Numerous mutants of STb toxin (in one or two amino acids) were realized on exposed residues based on the result of an NMR study using mainly the alanine scanning technique (Labrie et al., 2001a). Residues pointing to the solvent, found in the α -helices and in the loop, were targeted. Using HPLC-purified toxins, the attachment to sulfatide in ELISA and toxicity in vivo were tested. Overall, when a mutant had a decreased binding to sulfatide in ELISA a corresponding or higher decrease in toxicity was observed. This indicated that binding to sulfatide is a pre-requisite for toxicity. Residues Lys22, Lys23 and Arg29 were directly implicated in the binding to sulfatide and the subsequent toxicity expression.

Labrie et al. (2001b) using a cross-linker (bis (sulfosuccinimidyl) suberate) observed, in solution, the formation of STb oligomers. Hexamers and heptamers were seen in SDS-Page and their formation was prevented by addition of β -mercaptoethanol. Using mutagenesis, it was determined that the hydrophobic α -helix is responsible for the oligomerization of STb

molecules. Interfering with oligomerization prevented the expression of toxicity in the rat loop assay as oligomer formation is probably required for interaction with susceptible cells. In particular, Phe-37, Ile-41 and Met-42 were directly involved in the formation of oligomers (Labrie et al., 2001a: 2001b).

3. Artificial membrane model experiments including planar lipid bilayers and brush border membrane vesicles

An electrophysiological study using planar lipid bilayers demonstrated the capacity of STb to form ionic pores in artificial lipid membranes constituted of phosphatidylethanolamine, phosphatidylcholine and cholesterol in a 7:2:1 ratio. This was observed in presence or absence of sulfatide in the membrane. The observed ionic pores were voltage-dependent (Labrie et al., 2001c).

Brush border membrane vesicles (BBMVs) were produced from pig jejunal tissue and these were incubated with STb toxin (Zhang et al., 1997). The BBMVs were loaded in KCl and a membrane potential sensitive fluorescent probe was used (3,3'-dipropylthiadicarbocyanine iodine) to reveal pore formation (Kirouac et al., 2003). Valinomycin, a potassium ionophore, was used to create a membrane potential. Using this system, STb was observed to produce pores as revealed in different ionic solutions and the pores created were cations specific. The formation of pores was pH-dependent with an optimum around 6.0-6.5 that is relevant to the pH observed in pig jejunum.

4. STb internalization and endocytosis

Using Chinese Hamster Ovary cells (CHO) it was previously shown that STb could allow the adsorption of Trypan blue stain revealing a certain degree of cellular membrane alteration produced by the toxin (Beausoleil et al., 2002a). An electron microscopy study was done by injecting and incubating STb for 3 hours in intestinal rat loops. The intestinal tissue was fixed and dehydrated and thin sections were done and incubated with anti-STb gold conjugate. In transmission electron microscopy, STb toxin was internalized into rat intestinal epithelial cells (Labrie et al., 2002). For comparison, a STb double mutant molecule (I41E-M42R) that was shown not to oligomerize was not observed inside the cells. This mutant when tested in vivo was not toxic indicating that internalization of STb is necessary for expression of the biological activity.

Endocytosis of STb was studied in a cellular model (NIH-3T3 mouse fibroblasts). STb toxin was directly labelled with FITC and various markers of cell compartments and known endocytic pathways were used. STb toxin was, on the cellular model used, rapidly endocytosed (within a few minutes) and the toxin was associated with many cellular structures. Under the same conditions, reduced and alkylated toxin that is inactive in vivo was not endocytosed but the altered toxin was associated with the cell surface. Confocal microscopy revealed colocalization between STb and AMFR (autocrine motility factor receptor) a marker for the smooth endoplasmic reticulum. Treatment with methyl- β -cyclodextrin, a cholesterol extracting reagent, disrupting caveolae expression, prevented the colocalization of STb with AMFR but STb was still endocytosed under this condition.

Internalization of STb through caveolae was found to colocalize with smooth endoplasmic reticulum and associated with mitochondria (observed using a mitochondrial heat-shock protein 70 marker). When an acid treatment of the cells was done to block the clathrin-dependent pathway, internalization was still observed. Endocytosis was also observed to occur through vesicular structures and found colocalized with fibronectin fibers. Sulfatide, as the STb receptor, colocalized intracellularly with STb and also with the tubules of the smooth ER. Overall, using this cellular model, STb endocytosis was observed to proceed through two distinct pathways, one clathrin-dependent and one caveolae-dependent.

Conclusions

The results from the presented studies shed new light on the way STb act on susceptible cells. The observation that STb is internalized put this toxin in another category from *E. coli* STa toxin a surface acting molecule that acts via signal transduction. We can now propose a model for the interaction of STb with the cellular surface (Figure 2). STb toxin, in solution, can adopt an oligomeric conformation with hexamers and/or heptamers as the final structure. These oligomers would bind to sulfatide present at the surface of the intestinal epithelial cells. Then, as observed in EM on rat intestine and also with NIH-3T3 cells, STb can cross the eukaryotic cell membrane. On the other hand, as observed with membranar models (PLB and BBMV), STb is able to form ionic pores. The internalized toxin could then act on the intracellular target that remains, for now, unknown. The endocytosis study indicated that STb is endocytosed through two distinct pathways. One

pathway is clathrin-dependent and STb is internalized into vesicular structures and is then found associated with fibronectin. The other pathway is caveolae-dependent and the toxin colocalizes with the smooth endoplasmic reticulum and is associated with mitochondria (Figure 3).

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the contribution of the following collaborators: J. Harel, R.-I. Nabi, P.U. Le, V. Vachon and J.-L. Schwartz. The work is supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada.

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. *Infect. Immun.* **63**: 4715-4720.
- Beausoleil, H.E., and Dubreuil, J.D. (2001) *In vitro* binding characteristics and affinity for sulfatide of *Escherichia coli* STb enterotoxin. *Receptors Channels* **7**: 401-411.
- Beausoleil, H.E., Labrie, V., and Dubreuil, J.D. (2002a) 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., Lepine, F., and Dubreuil, J.D. (2002b) LC-MS analysis of pig intestine sulfatides: interaction with *Escherichia coli* STb enterotoxin and

- characterization of molecular species present. *FEMS Microbiol. Lett.* **209**: 183-188.
- Dubreuil, J.D. (1997) *Escherichia coli* STb enterotoxin. *Microbiology* **143**: 1783-1795.
- Fekete, P.Z., Schneider, G., Olasz, F., Blum-Oehler, G., Hacker, J.H., and Nagy, B. (2003) Detection of a plasmid-encoded pathogenicity island in F18+ enterotoxigenic and verotoxigenic *Escherichia coli* from weaned pigs. *Int. J. Med. Microbiol.* **293**: 287-298.
- Kirouac, M., Vachon, V., Rivest, S., Schwartz, J.L., and Laprade, R. (2003) Analysis of the properties of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins using a potential-sensitive fluorescent probe. *J. Membr. Biol.* **196**: 51-59.
- 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. *J. Bacteriol.* **172**: 2427-2432.
- Labrie, V., Beausoleil, H.E., Harel, J., and Dubreuil, J.D. (2001a) Binding to sulfatide and enterotoxicity of various *Escherichia coli* STb mutants. *Microbiology* **147**: 3141-3148.
- Labrie, V., Harel, J., and Dubreuil, J.D. (2001b) Oligomerization of *Escherichia coli* enterotoxin b through its C-terminal hydrophobic alpha-helix. *Biochim. Biophys. Acta* **1535**: 128-133.
- Labrie, V., Harel, J., and Dubreuil, J.D. (2002) *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b (STb) *in vivo* internalization within rat intestinal epithelial cells. *Vet. Res.* **33**: 223-228.

- Labrie, V., Potvin, L., Harel, J., Dubreuil, J.D., Schwartz, J.-L.: (2001c) Enterotoxin b of *Escherichia coli* (STb) forms ion channels in planar lipid bilayers. In *10th European Workshop Conference on Bacterial Protein Toxins* Bohon, Belgium, pp. A54.
- Okamoto, K., Baba, T., Yamanaka, H., Akashi, N., and Fujii, Y. (1995) Disulfide bond formation and secretion of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *J. Bacteriol.* **177**: 4579-4586.
- 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. *Microb. Pathog.* **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. *Infect. Immun.* **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 Sci.* **4**: 1718-1729.
- Zhang, H., Malo, C., and Buddington, R.K. (1997) Suckling induces rapid intestinal growth and changes in brush border digestive functions of newborn pigs. *J. Nutr.* **127**: 418-426.

Legends to illustrations

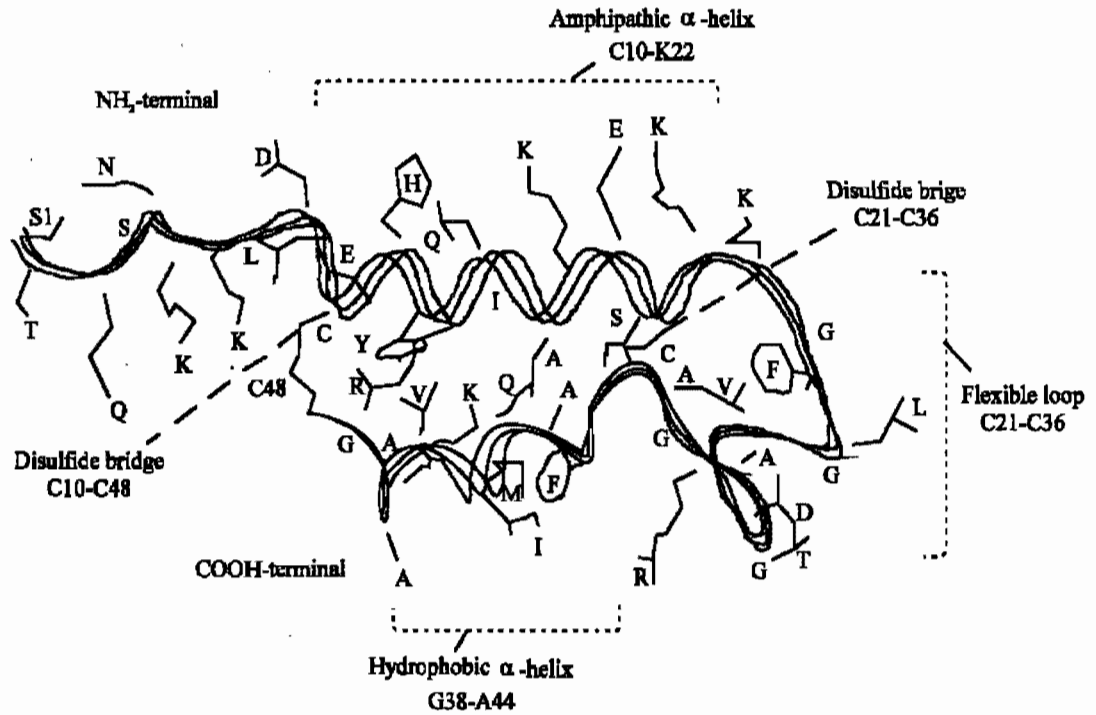
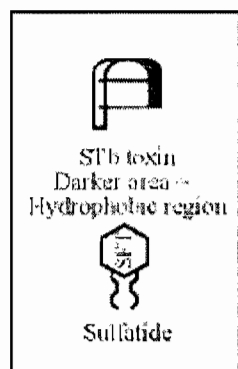


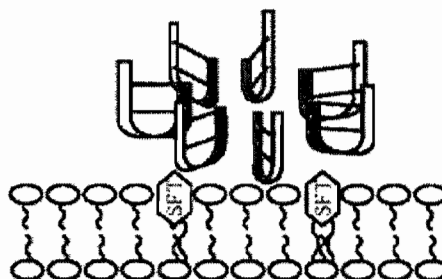
Figure 1. Nuclear magnetic resonance-derived three dimensional structure of STb toxin adapted from Sukumar et al., (1995).



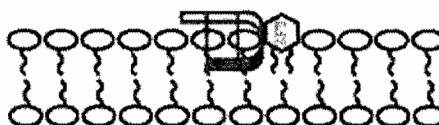
STb oligomer (6-7 mer)



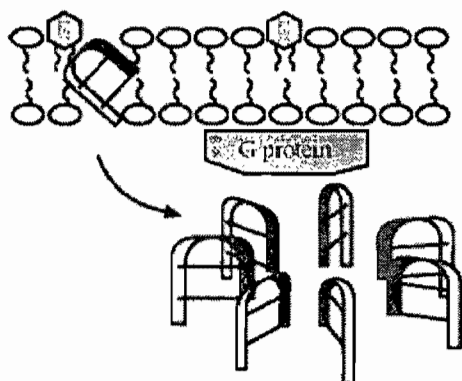
Oligomer binding to sulfatide



Cell membrane destabilization (outer leaflet)



STb internalization/G protein activation



Pore formation

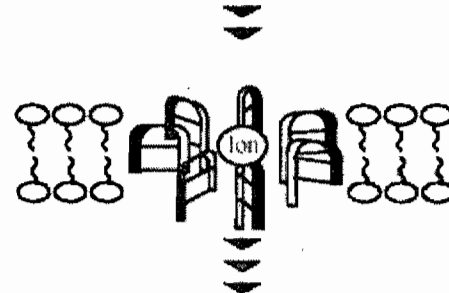


Figure 2. Interaction of STb oligomers with cell membrane after interaction with sulfatide (SFT). STb was shown to be internalized using the intestinal rat loop intestinal assay and the NIH-3T3 cellular model (Left panel). On artificial membrane models (PLB and BBMV) STb was also observed to form ionic pores (Right panel).

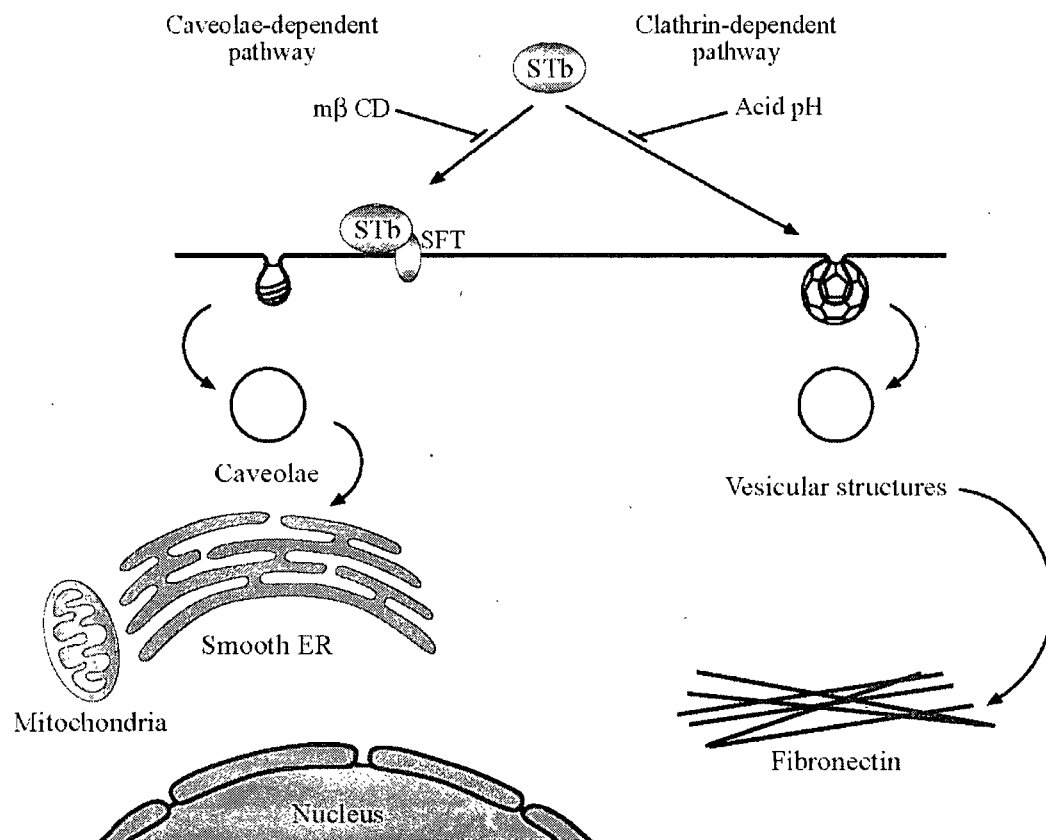


Figure 3. Using NIH-3T3 cell line, STb was endocytosed through two distinct pathways. One caveolae-dependent that is directed to the smooth endoplasmic reticulum (smooth ER) and colocalizes with mitochondria. The other pathway is clathrin-dependent and STb is internalized through vesicular structures and colocalizes with fibronectin filaments. ($m\beta$ CD: methyl β -cyclodextrin; SFT: sulfatide).