

Université de Montréal

L'entérotoxine STb d'*Escherichia coli* déloge la claudine-1 des jonctions serrées

par

Hassan Nassour

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire

en vue de l'obtention du grade de

maître ès sciences (M. Sc.)

en sciences vétérinaires

option microbiologie

© Hassan Nassour, 2014

Université de Montréal

Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

L'entérotoxine STb d'*Escherichia coli* déluge la claudine-1 des jonctions serrées

Présenté par

Hassan Nassour

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Mario Jacques, président-rapporteur

J. Daniel Dubreuil, directeur de recherche

Marie Archambault, membre du jury

RÉSUMÉ

Escherichia coli produit diverses entérotoxines thermolabiles et thermostables. STb est une toxine de faible poids moléculaire résistant à la chaleur chargée de la diarrhée chez les animaux de la ferme. Une étude antérieure a montré que les cellules ayant internalisé la toxine STb provoquent un dysfonctionnement de la barrière épithéliale par des changements dans les protéines des jonctions serrées (TJ). Ces modifications contribuent probablement à la diarrhée observée. Pour mieux comprendre le mécanisme de l'augmentation de la perméabilité intestinale, nous avons traité les cellules du côlon humain (T84) avec la toxine purifiée STb une fois que les cellules ont été récoltées et les protéines extraites. Après l'utilisation d'une solution contenant 1 % de Nonidet P-40 (un détergent non dénaturant, non ionique), nous avons étudié la distribution de la claudine -1, une protéine majeure des TJs, responsable de l'imperméabilité de l'épithélium, entre la membrane (NP40-insoluble) et le cytoplasme (NP40-soluble). En utilisant l'immunoblot et la microscopie confocale, nous avons observé que le traitement des monocouches de cellules T84 avec STb induit la redistribution de la claudine-1. Après 24h, les cellules cultivées en milieu faible en Ca^+ (5 μM) et traitées par STb, ont montré qu'environ 40 % de plus de la claudine-1 se sont délogées dans le cytoplasme par comparaison au contrôle. En passant d'un milieu faible à un milieu contenant des quantités physiologiques de Ca^{++} (1,8 mM) nous avons observé une augmentation du taux de claudine-1 délogé, comme la délocalisation comparable et ce, après 6h. Un milieu supplémenté avec la même concentration de Mg^{++} ou Zn^{++} n'a pas affecté le taux de délogement comparé au milieu contenant une faible teneur en Ca^{++} . En utilisant des anticorps anti-phosphosérine et anti-phosphothréonine, nous avons observé que la perte des claudines-1 de la membrane a été accompagnée par une déphosphorylation de cette protéine des TJs. Dans l'ensemble, nos résultats ont montré une importante redistribution de la claudine-1 dans les cellules traitées par la toxine STb. La perte de la claudine-1 phosphorylée de la membrane est susceptible d'être impliquée dans la perméabilité accrue observée. Les mécanismes par lesquels ces changements sont provoqués restent à élucider.

Mots-clés : Jonctions serrées, claudine-1, soluble, insoluble, diarrhée, phosphorylation/déphosphorylation, *Escherichia coli*, sécrétion, toxine STb.

ABSTRACT

Enterotoxigenic *Escherichia coli* produce various heat-labile and heat-stable enterotoxins. STb is a low molecular weight heat-resistant toxin responsible for diarrhea in farm animals. A previous study demonstrated that cells having internalized STb toxin induce epithelial barrier dysfunction through changes in tight junction (TJ) proteins. These modifications contribute probably to the diarrhea observed. To gain insight into the mechanism of increased intestinal permeability we treated human colon cells (T84) with purified STb toxin after which cells were harvested and proteins extracted. Using a 1% Nonidet P-40 (a non-ionic, non-denaturing detergent)-containing solution we investigated the distribution of claudin-1, a major TJ protein responsible for the epithelium impermeability, between membrane (NP40-insoluble) and the cytoplasmic (NP40-soluble) location. Using immunoblot and confocal microscopy, we observed that treatment of T84 cell monolayers with STb induced redistribution of claudin-1. After 24h, cells grown in low Ca^{++} -containing medium (5 μM) treated with STb, showed about 40% more claudin-1 in the cytoplasm compare to the control. Switching from low to physiological Ca^{++} -containing medium (1,8 mM) increased the dislodgement rate of claudin-1, as comparable delocalization was observed after 6h. Medium supplemented with the same concentration of Mg^{++} or Zn^{++} did not affect the dislodgement rate compare to the low Ca^{++} -containing medium. Using anti-phosphoserine and anti-phosphothreonine antibodies we observed that the loss of membrane claudin-1 was accompanied by dephosphorylation of this TJ protein. Overall, our findings showed an important redistribution of claudin-1 in cells treated with STb toxin. The loss of phosphorylated TJ membrane claudin-1 is likely to be involved in the increased permeability observed. The mechanisms by which these changes are brought about remain to be elucidated.

Keywords: Tight junction, claudine-1, soluble, insoluble, diarrhea, phosphorylation/dephosphorylation, *Escherichia coli*, secretion, STb toxin.

TABLE DES MATIÈRES

| | Pages |
|--|--------------|
| RÉSUMÉ | i |
| ABSTRACT | ii |
| TABLE DES MATIÈRES | iii |
| LISTE DES FIGURES | v |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS | vii |
| REMERCIEMENTS | xi |
| INTRODUCTION | 1 |
| REVUE DE LITTÉRATURE | 3 |
| 1. Escherichia coli | 3 |
| 1.1 Généralités | 3 |
| 2. Pathogenèse | 4 |
| 2.1 Facteurs de colonisation | 4 |
| 2.1.1 Fimbraie | 4 |
| 2.1.2 Adhésines afimbriaires | 5 |
| 2.1.3 Les récepteurs des facteurs de colonisations | 5 |
| 2.1.4 Les entérotoxines | 6 |
| 2.1.4.1 LT | 6 |
| 2.1.4.1.1 Généralités | 6 |
| 2.1.4.1.2 LT-I | 8 |
| 2.1.4.1.3 LT-II | 8 |
| 2.1.4.2 ST | 10 |
| 2.1.4.2.1 Généralités | 11 |
| 2.1.4.2.2 STa | 12 |
| 3. L'entérotoxine STb | 14 |
| 3.1 Généralités | 14 |
| 3.2 Génétique | 15 |
| 3.3 Biogenèse | 15 |
| 3.4 Relation structure-fonction | 17 |

| | |
|--|----|
| 3.5 Mécanisme d'action | 18 |
| 3.5.1 Oligomérisation | 18 |
| 3.5.2 Récepteur | 19 |
| 3.5.3 Pores membranaires et internalisation | 20 |
| 3.5.4 Effets cytoplasmiques : modèle proposé du mécanisme d'action de STb | 21 |
| 3.6 Manifestations cliniques | 23 |
| 3.7 Jonctions intercellulaires | 24 |
| 3.7.1 Généralités | 24 |
| 3.7.2 Les jonctions serrées | 25 |
| 3.7.2.1 Structure moléculaire des jonctions serrées | 27 |
| 3.7.2.2 Les protéines kinases et les jonctions serrées | 27 |
| 3.7.2.3 Les occludines | 28 |
| 3.7.2.4 Les claudines | 31 |
| 3.7.2.5 Les jonctions adhérentes (JAM) | 32 |
| 3.7.2.6 Les protéines cytoplasmiques | 34 |
| 3.7.3 Les pathogènes affectant les jonctions serrées | 34 |
| 3.7.3.1 <i>Vibrio cholera</i> et la toxine ZOT (<i>Zonula Occludens Toxin</i>) | 34 |
| 3.7.3.2 EHEC | 35 |
| 3.7.3.3 EPEC | 36 |
| 3.7.3.4 <i>Clostridium perfringens</i> | 36 |
| | |
| Article | 39 |
| | |
| Discussion générale et conclusion | 70 |
| | |
| BIBLIOGRAPHIE | 79 |

LISTE DE FIGURES

| Revue de la littérature | Pages |
|---|--------------|
| Figure 1 : Mécanisme de pathogenèse des <i>E.coli</i> entérotoxinogènes chez le porc | 3 |
| Figure 2 : Mécanisme d'action de la toxine labile à la chaleur LT | 7 |
| Figure 3 : Mécanisme d'action de la toxine labile à la chaleur LT | 9 |
| Figure 4 : Structure 3D de la toxine LT | 9 |
| Figure 5 : Toxine stable à la chaleur ST | 11 |
| Figure 6 : Effets de cellulaires de l'entérotoxine STa et du peptide endogène guanyline | 12 |
| Figure 7 : Séquence primaire de la toxine STb | 13 |
| Figure 8 : Modèle schématique de la sécrétion de la toxine STb | 15 |
| Figure 9 : Relation structure-fonction de la toxine STb | 17 |
| Figure 10 : Structure du sulfatide | 19 |
| Figure 11 : Mécanisme d'action proposé pour la toxine STb | 22 |
| Figure 12 : Voies paracellulaires et transcellulaires | 24 |
| Figure 13 : Organisation d'un épithélium simple cylindrique | 25 |
| Figure 14 : Représentation schématique de l'occludine et la claudine | 29 |
| Figure 15 : Interaction homophile des molécules JAM | 32 |

Article

| |
|---|
| Figure 1: Distribution of claudin-1 found in Nonidet P-40-soluble and -insoluble fractions in T84 cell monolayers in response to STb toxin |
| Figure 2: Effect of STb on claudin-1 and F-actin arrangements |
| Figure 3: Distribution of claudin-1 in NP-40-soluble and -insoluble fractions in T84 cell monolayers in response to STb toxin after Ca ⁺⁺ enrichment |
| Figure 4: Effect of calcium on the rate of STb toxin activity |
| Figure 5: Effect of Mg ⁺⁺ -enrichment on claudin-1 displacement rate |
| Figure 6: Effect of Zn ⁺⁺ -enrichment on claudin-1 displacement rate |
| Figure 7: Effect of magnesium on the rate of STb toxin activity |
| Figure 8: Effect of zinc on the rate of STb toxin activity |

Figure 9: Phosphorylation state of claudin-1 as found in the membrane and cytoplasmic locations

LISTE DES ABRÉVIATIONS

| | |
|----------------|--|
| 5-HT | 5-hydroxytryptamine |
| A (Ala) | Alanine |
| aa | amino acids |
| AAF | Aggregative Adherence Fimbriae |
| AC | Adenylate Cyclase |
| AIDA-I | Adhesin Involved in Diffuse Adherence |
| AMPc | Adénosine monophosphate cyclique |
| ASIP | Atypical PKC Isotype-Specific interacting Protein |
| BFT | <i>Bacteriodes fragilis</i> Toxin |
| BSA | Bovine Serum Albumin |
| CaMKII | Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II |
| Cdc 42 | Cell division control 42 |
| CFA-I | Colonization Factor A-1 |
| CFAs | Facteurs Antigéniques de Colonisation |
| CFs | Colonization Factors |
| CFTR | Cystic Fibrosis Transmembrane conductanc Regulator |
| CFU | Colony Forming Units |
| CNF | Facteur Cytotoxique Nécrosant |
| CPE | <i>Clostridium perfringens</i> Enterotoxin |
| CPE-R | <i>Clostridium perfringens</i> Enterotoxin- Receptor |
| Crb | Crumb |
| CRIB | Cdc42/ Rac Interactive Binding |
| CT | Cholera toxin |
| D (Asp) | Aspartate |
| DA | Diffuse Adherence |
| DABCO | 1, 4-diazabicyclo [2.2.2] octane |
| DAEC | Diffusely Adherent <i>Escherichia coli</i> |
| DAF | Decay Accelerating Factor |
| DAG | DiAcylGlycerol |

| | |
|----------------|---|
| DAPI | 4', 6-diamidino-2-phenylindole |
| Dig | Disc large |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| EAEC | Enteraggregative <i>Escherichia coli</i> |
| EAST-1 | Enteraggregative heat-stable toxin 1 |
| EDTA | Ethylene diamine tetraacetic acid |
| EHEC | Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> |
| EIEC | Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> |
| EPEC | Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> |
| ETEC | Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> |
| FBS | Fetal Bovine Serum |
| FITC | Fluorescein isothiocyanate |
| GC-C | Guanylate cyclase type C |
| GK | Guanylate Kinase |
| GM2 | Monosialotetrahexosylganglioside |
| GMPc | Guanosine monophosphate cyclique |
| GTP | Guanosine triphosphate |
| HA/P | HaemAgglutinin Protease |
| HPLC | High performance liquid chromatography |
| HuASH1 | Absent Smaller homeotic discs 1 |
| IP3 | Inositol 1, 4, 5 Triphosphate |
| IPTG | Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside |
| JAMs | Junctional Adhesion Molecules |
| K (Lys) | Lysine |
| LA | Localized Adherence |
| LEE | Locus d'Effacement d'Entérocytes |
| LT | Heat-labile toxine |
| MAGI | Membrane Associated Guanylate kinase with Inverted domain |
| MAK | Mitogen Activated Kinase |
| MAPK | Mitogen Activated Protein Kinase |
| MARCKS | Myristoylated Alanine-Rich C Kinase Substrate |

| | |
|----------------|---|
| MBP-STb | Maltose-binding protein – Heat stable enterotoxin b |
| MLCK | Myosin Light Chain Kinase |
| MUPP1 | Multi-PDZ domain Protein-1 |
| Mv | Microvillosités |
| NSP4 | No Structural Protein 4 |
| PAA | Porcine Attaching and effacing Associated Factor |
| Pals | Protein associated with lin-7 |
| Par-3 | Partitioning defective-3 |
| PATJ | Protein Associated with Tight Junctions |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| PDS | Post Synaptic Density |
| PGE2 | ProstaGlandin E2 |
| PKA | Protein Kinase AMPc-dependant |
| PKCa | Protein Kinase C atypique |
| PMSF | Phenylmethylsulfonyl fluoride |
| PP2A | Protein Phosphatase 2A |
| R (Arg) | Arginine |
| RTX | Repeats in Toxin |
| SAF-B | Scaffold Attachment Factor -B |
| SAT | Secreted Autotransporter Toxin |
| SH-3 | Sequency Homology-3 |
| ShET1 | Shigella Enterotoxin-1 |
| ST | Heat-stable |
| STa | Heat-stable enterotoxin a |
| STb | Heat-stable enterotoxin b |
| Stx | Shiga-like toxin |
| TFA | TriFluoroacetic Acid |
| TGF-B | Transforming Growth Factor- β |
| TJs | Tight Junctions |
| TolC | Outer membrane channel protein |
| TPA | 12-O-TetradecanoylPhorbol-13-Acetate |

| | |
|-------------------|---|
| TSL | Toxin Specific Locu |
| UDP | Uridine diphosphate |
| V(Val) | Valine |
| VT | Vérocytotoxine |
| ZO-1 | Zonula Occludens-1 |
| ZO-2 | Zonula Occludens-2 |
| ZO-3 | Zonula Occludens-3 |
| ZO | Zonula Occludens |
| ZONAB ZO-1 | associated Nucleic Acid Binding protein |
| ZOT | Zonula Occludens Toxin |

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le professeur Daniel Dubreuil, pour m'avoir confié ce projet de recherche intéressant et d'une grande pertinence. Je le remercie également pour son support, ses bons conseils et ses suggestions judicieuses pour orienter le développement du projet. Je dois aussi remercier la directrice, Josée Harel ainsi que le CRIPA pour l'aide financière dont j'ai bénéficié et sans laquelle je n'aurais eu la chance de poursuivre mes études aux cycles supérieures.

Je remercie au passage les professeurs Mario Jacques et Mariela Segura d'avoir apporté un soutien au sein de mon comité conseil.

Je remercie bien sincèrement les professeurs Mario Jacques, Marie Archambault d'avoir accepté de siéger sur le jury d'examen de ce mémoire de maîtrise.

Merci infiniment à mes parents pour m'avoir donné le goût de me surpasser, d'avoir insisté sur l'importance de mon éducation et de m'avoir encouragé toutes ces années et pour leur grande aide financière.

Merci à Clément Mukiza, Skander Hathroubi, Maroc Lacroix, Jacinbthe, Rashine et son mari et toutes personnes ayant contribué de près ou de loin à ce mémoire de maîtrise.

Je remercie le labo de Mario Jacques et surtout Josée Labrie de m'avoir aidé et me dépanner tout au long de mes études supérieures.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La majorité des souches d'*Escherichia coli* sont des commensales de la flore intestinale des mammifères. Quelques souches sont pathogènes telles que: les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC), les *E. coli* entérotoxigènes (EPEC), les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC), les *E. coli* entéroaggrégatives (EAEC), les *E. coli* entéroinvasives (EIEC) et les *E. coli* médiant l'adhérence diffuse (DAEC). Ces pathogènes peuvent causer des infections intestinales (infections urinaires, diarrhée, etc...) (Kaper 2005). Les ETEC constituent notre sujet d'étude.

Les manifestations cliniques de ces infections sont associées de plusieurs gènes de virulence, appelés virotypes. Ces virotypes se traduisent par la présence de facteurs de virulence dont les adhésines et les toxines (Kaper 2005).

Les adhésines sont des facteurs de colonisation (CFs) qui permettent aux ETEC d'adhérer à l'épithélium intestinal et de sécréter des entérotoxines qui agissent localement au niveau des entérocytes (Ghai et al., 1980).

Dans tous les tissus, des jonctions cellulaires spécialisées se forment au niveau des points de contact cellule-cellule ou cellule-matrice, et sont particulièrement nombreuses dans les épithéliums. Ces jonctions peuvent être classées en trois groupes fonctionnels : les jonctions communicantes, les jonctions d'ancrage et les jonctions occlusives:

- Les jonctions communicantes permettent le passage des substances chimiques et signaux entre cellules.
- .. Les jonctions d'ancrages attachent mécaniquement les cellules à la matrice.
- Les jonctions occlusives scellent les cellules pour former un épithélium. Cet épithélium empêche le passage de molécules, mêmes petites, d'un côté d'un feuillet à l'autre. Les jonctions serrées jouent ce rôle de barrière chez les vertébrés. Elles agissent comme des barrières, qui empêchent la diffusion de certaines protéines et lipides entre les domaines apical et basolatéral de la membrane plasmique.

Chaque jonction serrée est composée d'une longue chaîne de protéines d'adhésion transmembraires enchâssées dans chacune des deux membranes plasmiques qui interagissent entre elles. Les domaines extracellulaires de ces protéines s'unissent directement les uns avec les autres pour fermer l'espace intercellulaire. Les principales protéines transmembranaires des jonctions serrées sont les claudines et les occludines qui

sont associées à des protéines membranaires périphériques intracellulaires, les protéines Zonula Occludens (ZO1, ZO2 et ZO3).

La phosphorylation des protéines des jonctions serrées par une kinase régule la liaison des domaines intra-transmembranaires des occludines et des claudines et la liaison de chacune de ces protéines aux protéines ZO. Récemment, notre laboratoire a évalué l'effet de la toxine STb sur les jonctions serrées. Cette évaluation a montré que la toxine STb induit une perte d'intégrité structurale au niveau des jonctions serrées et donc une perméabilité plus élevée des jonctions serrées. Basée sur ces résultats, l'hypothèse à vérifier est que ces protéines des jonctions serrées sont directement affectées par la toxine STb. L'hypothèse est que le niveau de phosphorylation de ces protéines est modifié suite à l'activité de STb sur les cellules. Ainsi, l'implication de kinases, dans ce processus, sera donc étudiée.

REVUE DE LITTÉRATURE

1. *Escherichia coli* entérotoxigènes :

1.1 Généralités :

Les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC) sont un groupe d'agents pathogènes qui ont en commun la capacité de coloniser l'intestin grêle, où ils produisent les toxines LT et ST. Coopérativement, ces organismes sont responsables de centaines de millions de cas de maladies diarrhéiques chaque année, en particulier dans les pays en développement. Les ETEC sont responsables d'environ 300 000 - 500 000 décès par an chez les enfants de moins de cinq ans (WHO 2006).

Ces microorganismes sont la cause principale de la diarrhée du voyageur. Ils contribuent substantiellement à la croissance retardée et la malnutrition qui accompagnent des épisodes répétés de diarrhée d'origine infectieuse et, inversement, les enfants souffrant de malnutrition semblent être plus à risque de contracter des infections à ETEC (Qadri et al., 2007).

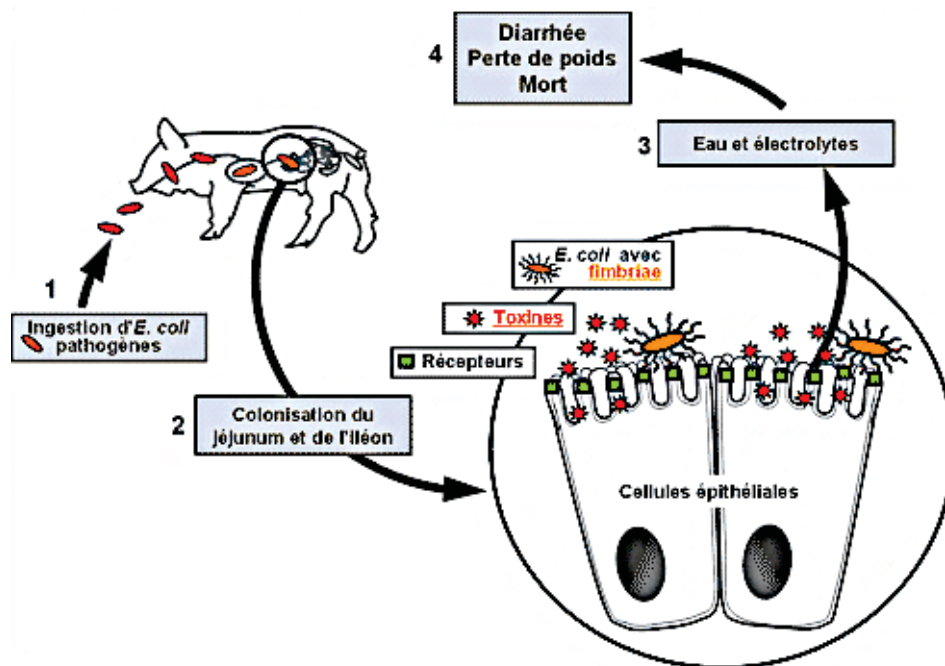


Figure 1. Mécanisme de pathogenèse des *E. coli* entérotoxigènes. Source : (www.ecl-lab.com).

2. Pathogénèse

2.1 Facteurs de colonisation

Un groupe hétérogène de structures de surface protéinique appelé facteurs de colonisation (CF) constituent un des facteurs de virulence identifiés chez les ETEC (Evans et al., 1975) et qui sont des cibles importantes pour le développement de vaccins (Walker et al., 2007). Au moins 25 différents types de CF ont été décrits à ce jour chez l'animal et la plupart sont sous contrôle plasmidique. Les fimbriaes sont parmi les structures le plus intensivement étudiées, mais plusieurs adhésines afimbriaires ont aussi été décrites.

Les récepteurs précis pour beaucoup des CFs n'ont pas été identifiés. Cependant, nombreux sont ceux qui se lient à des conjugués glycoprotéiques sur la surface de cellules hôtes (Jansson et al., 2006).

2.1.1. Fimbraie:

La première étape, dans le processus pathogénique des ETEC, est l'interaction adhésine-ligand sur les microvillosités de l'intestin grêle, ce qui entraîne un attachement morphologiquement non destructif des bactéries aux microvillosités. La plupart des antigènes communs de surface d'adhérence de souches ETEC sont les fimbriaes, qui ont d'abord été désignés comme des antigènes K ou ont reçu l'indication de leur souche représentative. Une classification internationale a été établie (Orskov et Orskov 1990) dans laquelle les fimbriaes des ETEC étaient classés avec ceux de *E. coli* uropathogènes (UPEC). Sur cette base, nous distinguons F1 (type I ou fimbriae commun), F2 et F3 (CFAI et CFAII d'ETEC humains). Les fimbriaes des ETEC des animaux sont F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F17 (Fy/Att25), F41, et F18 retrouvés chez les porcs et les veaux (Nagy et Fekete 1999). Ces fimbriaes protéiques ont des poids moléculaires qui varient entre 15 KDa et 25 kDa.

Parmi les fimbraies des ETEC des animaux étudiés, la famille des fimbriaes F4 (K88) existent dans au moins trois variantes: ab, ac, ad. Leur production est régie par des mécanismes différents

reflétant les changements de l'environnement, assurant ainsi une adaptation à l'environnement (Nagy et Fekete 1999). Ces fimbriaies sont liés à CS31A des ETEC bovins (Adams et al. 1997). Les fimbriaies F18, avec leurs variantes ab et ac, sont liées principalement à la diarrhée des porcelets sevrés.

2.1.2. Adhésines afimbriaires :

Récemment, l'adhésine impliquée dans l'adhérence diffuse (AIDA) des souches humaines EPEC (Benz et Schmidt 1989) a été détectée comme une adhésine supplémentaire qui se retrouve sur les souches ETEC et VTEC F18 + d'origine porcine après le sevrage (Mainil et al., 2002).

2.1.3 Les récepteurs des facteurs de colonisation :

L'adhérence et la colonisation ultérieure du petit intestin par les ETEC sont facilitées par l'interaction fimbriae-récepteur. L'existence et la fonction des gènes des récepteurs d'adhésion déterminent en grande partie la sensibilité des jeunes animaux aux infections par les ETEC. Le fimbriae F5 (K99) des ETEC chez un porc nouveau-né se lie spécifiquement au ganglioside (glycolipide) de l'intestin grêle (NeuGc-GM3) (Smit et al., 1984). Le fimbriae F6 (987P) se lie à une glycoprotéine et au sulfatide (Choi et Schifferli 1999). En cas de diarrhée post-sevrage des porcs, les deux fimbriaies principaux F4 (K88) et F18 ont différentes spécificités de récepteurs: F4 (F4ab, ac, ad) et F18 (F18 ab, ac), pour les petites glycoprotéines intestinales sur les microvillosités et/ou dans le mucus (Francis et al., 1999).

La présence et/ou l'absence des gènes des récepteurs d'adhésine est également responsable de la spécificité d'hôte des souches ETEC chez différentes espèces animales. D'autre part, le degré d'expression des gènes des récepteurs peut être lié à l'âge (résistance / sensibilité à l'adhésion par l'ETEC). Par exemple, le glycolipide (Smit et al., 1984) F5 (K99) diminue avec l'âge (Runnels et al., 1980). Par opposition, les récepteurs libres pour F6 (987P) sont surexprimés avec l'âge (Choi et Schifferli 1999), ce qui conduit à des récepteurs libres dans la lumière intestinale qui couvrent les fimbriaies F6 (987P), bloquant ainsi l'adhérence (Dean et al., 1989). Dans les deux cas, le résultat sera une diminution avec l'âge de l'adhérence à la surface des muqueuses intestinales par

les souches F5 (K99) ou F6 (987P). D'autre part, les récepteurs pour F18 ne seront pas produits chez les porcs nouveau-nés, mais ils seront de plus en plus exprimés jusqu'à l'âge de 4 semaines (Nagy et al., 1992), ce qui entraînera, chez les porcs, une sensibilité au moment du sevrage. En dépit de ces faits, la nature de beaucoup de récepteurs demeure encore inconnue.

2.1.4 Les entérotoxines :

Les entérotoxines sont des protéines extracellulaires ou des peptides (exotoxines) qui exercent leur action sur l'épithélium intestinal. Les ETEC sont caractérisées par la production de l'une ou plusieurs entérotoxines, qui sont régulées par des plasmides:

- Les entérotoxines labiles à la chaleur LT de poids moléculaire élevé (86 kDa).
- Les toxines peptidiques : 1) stables à la chaleur (ST) et résistantes à 100°C pendant au moins 15 minutes, 2) de faibles poids moléculaires (11 – 48 acides aminés).

Les entérotoxines LT sont produites principalement par les ETEC humains et porcins, tandis que les entérotoxines ST sont produites par les ETEC d'origine humaine, porcine et bovine.

La caractéristique commune dans les mécanismes d'action des entérotoxines LT et ST est qu'elles ne produisent pas de lésions pathologiques ou des altérations morphologiques de la muqueuse. Elles produisent des changements fonctionnels tels qu'une augmentation de la sécrétion d'eau, Na⁺ et Cl⁻ et une diminution concomitante de l'absorption de liquide. En conséquence, le fluide et les électrolytes sont perdus par le corps, conduisant à une déshydratation, à une acidose et une diarrhée.

2.1.4.1 LT :

2.1.4.1.1 Généralités :

Les entérotoxines LT d'*E. coli* (figure 4) sont des toxines oligomériques qui sont étroitement liées structurellement et fonctionnellement à l'entérotoxine cholérique (CT) exprimée par *Vibrio cholerae* (Sixma et al., 1991). LT et CT partagent de nombreuses caractéristiques dont la

structure d'holotoxine, la séquence protéique (environ 80% d'identité), l'identité du récepteur principal, l'activité enzymatique et l'activité biologique chez les animaux ainsi que dans des essais de culture cellulaires. Cependant, quelques différences existent dans la sécrétion de toxines et dans la réponse lymphocytaires aux cellules T auxiliaires (Dickinson et Clements 1995).

Les toxines LT ont une bonne antigénicité alors que les toxines ST sont peu immunogènes. Les toxines LT peuvent être divisées en deux groupes antigéniques et biologiques distincts mais structurellement similaires: LTI et LTII. Dans LTI, les souches LTh-I (origine humaine) et LTp-I (origine porcine). Pour LTII, deux variantes antigéniques (LTIIa et LTIIb) peuvent être distinguées.

LT-II se retrouve principalement dans les isolats d'origine animale d'*E. coli* et rarement dans les isolats humains. Par contre, LT-II n'a pas été associée à la maladie ni chez les animaux, ni chez les humains.

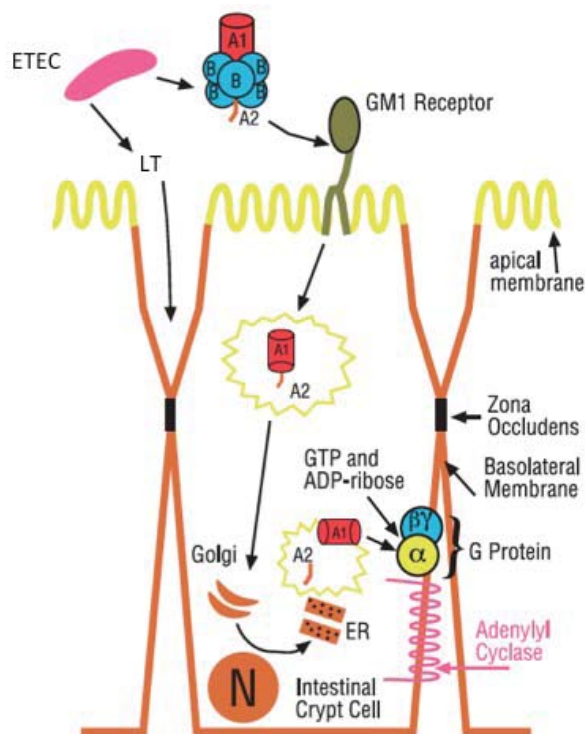


Figure 2. La toxine LT est libérée des ETEC. LT se lie à des récepteurs GM1 ganglioside sur la surface apicale. GM1 est ancrée dans la membrane plasmique apicale par sa parAcéramide. La sousBunité de la toxine qui se lie au récepteur GM1 entrent dans la cellule à travers des endosomes. LT est transloquée des endosomes jusqu'à la transB Golgi et le r é Aculum endoplasmique (ER) pour ensuite agir au niveau du complexe protéique : l'adénylateBcyclase situé sur la membrane basolatérale. La sousBunité A1 de la toxine LT catalyse la ribosylaAon de la sousBunité A de la protéine sAmulatrice des nucléoA des guanine (G).

2.1.4.1.2 LT-I

La toxine LT-I est un oligomère de 86 kDa composé d'une sous-unité A de 28 kDa et cinq sous-unités B identiques de 11,5 kDa (Fig. 2) (Streatfield et al., 1992). Les sous-unités B sont disposées en anneau et se lient fortement au ganglioside GM1 et faiblement à GD1b et aux glycoprotéines intestinales (Teneberg et al., 1994). La sous-unité A est responsable de l'activité autocatalytique de la toxine et du clivage protéolytique pour donner des peptides A1 et A2 reliés par un pont disulfure. Les gènes codant pour LT (*elt* ou *etx*) se trouvent sur des plasmides qui peuvent également contenir des gènes codant pour ST et / ou des antigènes de facteurs de colonisation (CFA) et résistante aux antibiotiques.

Après sa liaison à la membrane de la cellule hôte, la toxine est endocytée et transportée à travers la cellule dans un processus impliquant le trans-Golgi vésiculaire (Lencer et al., 1995). La cible cellulaire de LT est l'adénylate cyclase située sur la membrane basolatérale des cellules épithéliales polarisées (figure 3).

2.1.4.1.3 LT-II

LT-II présente 55 à 57 % d'identités avec LT-I et CT pour la sous-unité A, mais il n'y a pas d'homologie avec LT-I ou CT pour les sous-unités B (Fukuta et al., 1988). Il existe deux variantes antigéniques, LT-IIa et IIb, qui partagent 66 % d'homologie dans les sous-unités A et B. LT-II augmente les taux d'AMPC intracellulaires par des mécanismes de toxicité similaires à ceux qui sont impliqués chez LT-I, mais LT-II utilise le GD1 comme récepteur plutôt que GM1 (Fukuta et al., 1988).

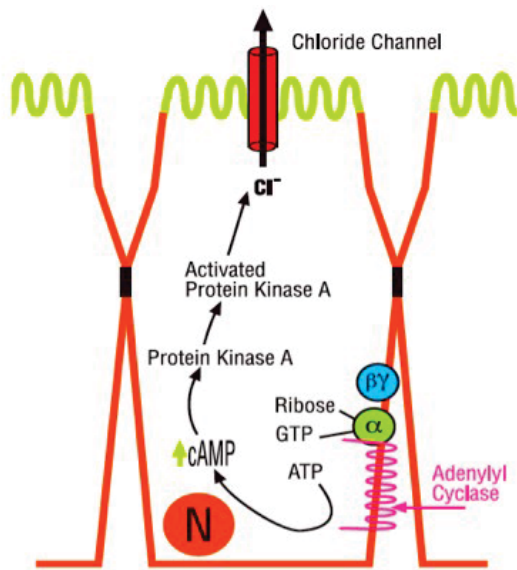
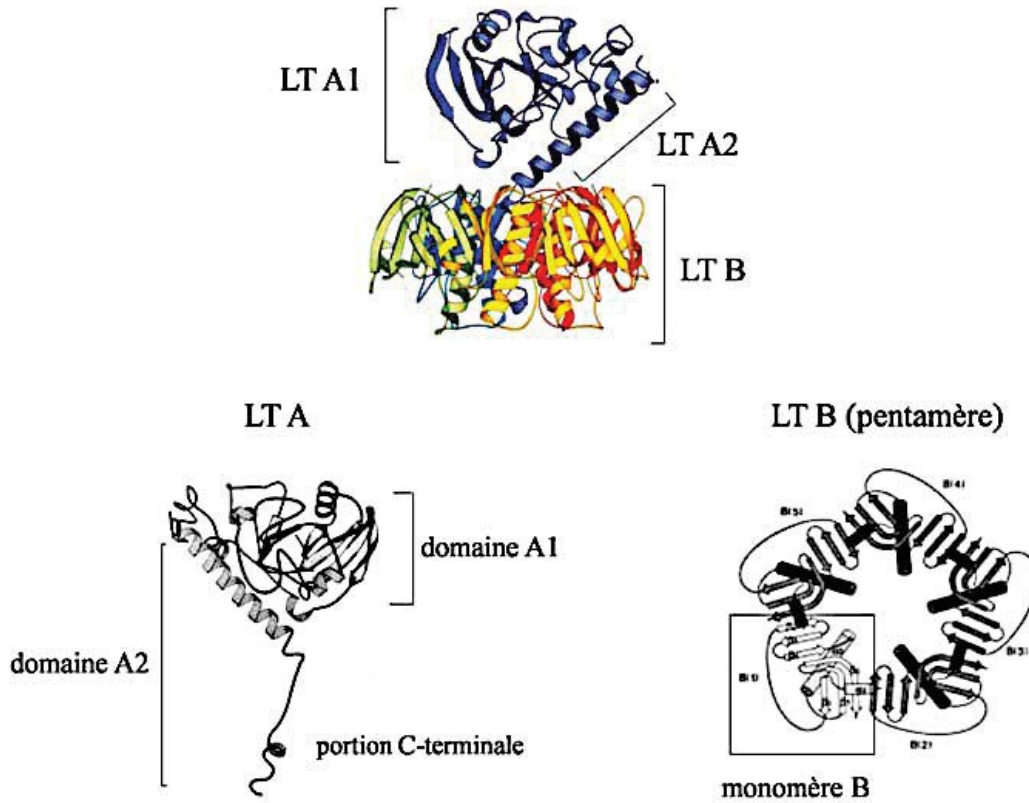


Figure 3. La toxine LT induit l'activation de l'adénylate cyclase par ribosylation et par conséquent, une augmentation en monophosphate cyclique (AMPc). L'AMPc active la protéine kinase A, qui phosphoryle et active ensuite le canal chlorure apical.

a.



b.

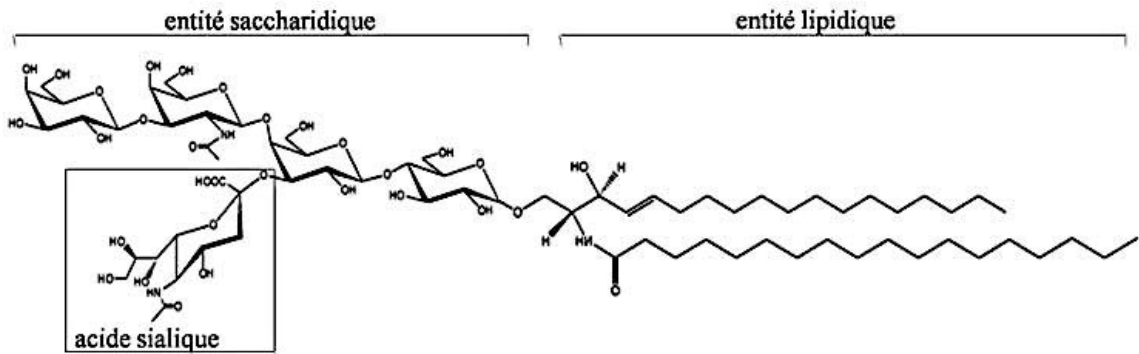


Figure 4. Structure 3D de la toxine LT. **(a)** structure cristallographique de l'holotoxine (complexe A:B5) et structure secondaire des sous-unités A et B. La portion C-terminale du domaine A2 de la sous-unité A pénètre dans le pore central formé par le pentamère B, lui-même composé des monomères de sous-unités B. **(b)** structure du récepteur, le monosialoganglioside GM1. Tiré des références (Sixma et al., 1991, Spangler, 1992, Sixma et al., 1993, De Haan & Hirst, 2004).

2.1.4.2. ST

2.1.4.2.1 Généralités

Contrairement aux larges oligomères LT, les ST sont des petits monomères qui contiennent des résidus multiples de cystéines dont les ponts disulfures assurent la stabilité thermique. Il existe deux catégories indépendantes de ST qui diffèrent dans leur structure et dans leur mécanisme d'action (figure 5). Les gènes, pour les deux classes, se trouvent principalement sur des plasmides et certains gènes de ST se trouvent sur des transposons. STa (également appelé ST-I) est une toxine produite par les ETEC et plusieurs autres bactéries gram-négatifs, dont *Yersinia enterocolitica* et *V. cholerae*. ST a présenté environ 50 % de similarité avec la toxine EAST1 des EAEC. Il a été rapporté récemment que certaines souches des ETEC peuvent également exprimer EAST1, en plus de STa et STb (Yamamoto et Echeverria 1996), ce qui rend difficile de déterminer l'effet réel des ST, ce qui suppose que les toxines ST jouent un rôle complémentaire aux autres toxines.

Dans un processus d'examen de 89 enfants de différents groupes d'âge, souffrant de maladies diarrhéiques causées par des bactéries de la famille des Enterobacteriaceae, 89 micro-organismes ont été isolés, notamment *Klebsiella spp.* (37 isolats), *Citrobacter spp.* (9 isolats), *Enterobacter spp.* (17 isolats), *Hafnia alvei* (1 isolat), *Morganella morganii* (11 isolats), *Proteus spp.* (14 isolats). La présence de gènes associés à des îlots de pathogénicité (PAIS): *hlyA*, *hlyB* (hémolysine), *cnf1* (cytotoxique facteur nécrosant 1), *estb* (stable à la chaleur entérotoxine B) ont été déterminés par PCR. Il a été constaté que 3 isolats (3,4%) avaient *estb*.

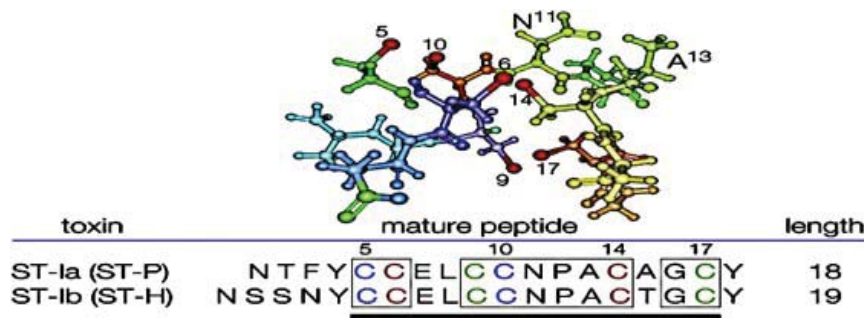


Figure 5. Toxine stable à la chaleur ST. La structure du domaine toxique active de la molécule ST-P (C5 - C17) telle que déterminée par Ozaki et 1991. Les atomes de soufre sur les résidus cystéine qui sont impliqués dans la formation de ponts disulfures sont indiqués en rouge (structure a été générée à partir de la Protein Data Bank). Les séquences peptidiques matures des peptides ST-P et ST-H sont représentées (les résidus hautement conservés, et le domaine de noyau toxique est souligné (E.A. merritt, et al. 1994).

2.1.4.2.2 STa :

La toxine mature STa est un peptide de 18 ou 19 d'acides aminés avec une masse moléculaire d'environ 2 kDa (figure 5). Il existe deux variantes, désignées par STP (ST porcine ou STIA) et STh (ST humaine ou STIB), après leur découverte dans les souches isolées chez les porcs ou les humains, respectivement. Les deux variantes peuvent être trouvées dans les souches ETEC humaines. Ces deux variantes sont presque identiques pour 13 résidus, qui sont nécessaires et suffisants pour l'activité entérotoxique. De ces 13 résidus, 6 sont des cystéines qui forment trois ponts disulfures intramoléculaires (figure 5). STa est d'abord produit comme un précurseur de 72-amino-acide qui est clivé par le peptidase signal 1 à un peptide de 53 acides aminés (Rasheed et al., 1990). Cette forme est transportée vers le périplasme, où les ponts disulfures seront formés (Yamanaka et al., 1994). Une protéase non définie agit sur le précurseur et génère une toxine mature de 18 ou 19 résidus qui sont libérés par diffusion à travers la membrane extérieure.

Le récepteur principal de STa est une enzyme transmembranaire appelée guanylate cyclase C (GC-C) qui appartient à la famille de récepteurs cyclases (Vaandrager et al., 1994).

La liaison de STa à GC-C stimule l'activité GC, qui conduit à une augmentation de GMPc intracellulaires (Sears et Kaper 1996) (Figure 6). Cette activité conduit finalement à une stimulation de la sécrétion du chlorure et/ou l'inhibition de l'absorption du chlorure de sodium, ce qui entraîne la sécrétion nette de fluide intestinal (figure 6).

Contrairement à la toxine LT, ST a agit beaucoup plus rapidement en raison de la localisation apicale de son récepteur cyclase (figure 6).

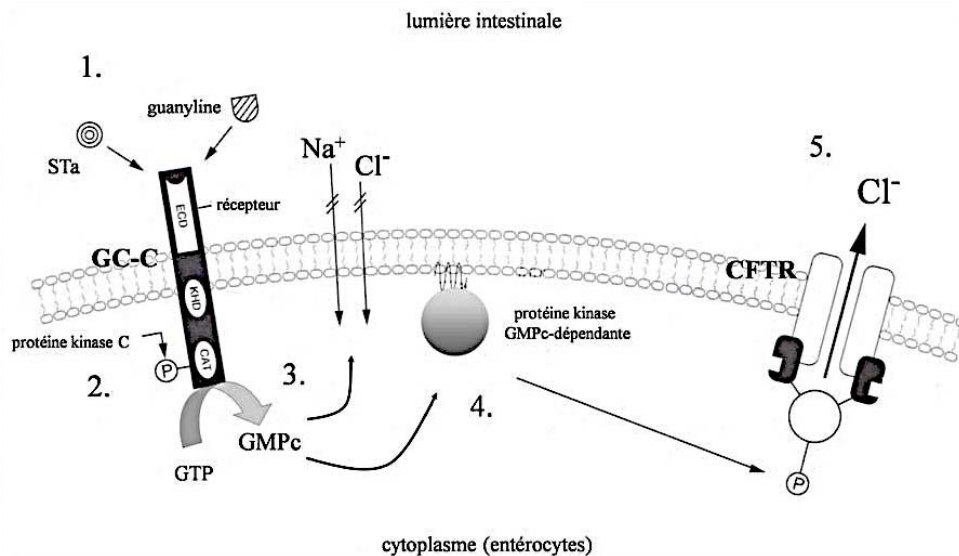


Figure 6. Effets cellulaires de l'entérotoxine STa et du peptide endogène guanyline. (1) interaction de STa ou de la guanyline avec le domaine extracellulaire (ECD) de la guanylate cyclase C ; (2) activation du domaine de la protéine kinase C et phosphorylation du domaine catalytique (CAT) ; (3) production de GMPc et diminution de l'influx de Na^+ et Cl^- ; (4) activation d'une protéine kinase GMPc-dépendante et phosphorylation intracellulaire du canal CFTR ; (5) sécrétion accrue d'ions Cl^- dans la lumière intestinale, menant à la diarrhée. Adapté de Dubreuil, 2006.

3 L'entérotoxine STb :

3.1 Généralités

Les entérotoxines ST ont été découvertes par Smith et Halls (Smith et Halls 1967) et étaient produites par les souches ETEC d'origine porcines. D'autres études ont révélé que deux sortes de toxines ST complètement indépendantes sont produites par les ETEC d'origine porcine soit STA (également appelé STI) et STb (également nommé STII) (figure 7).

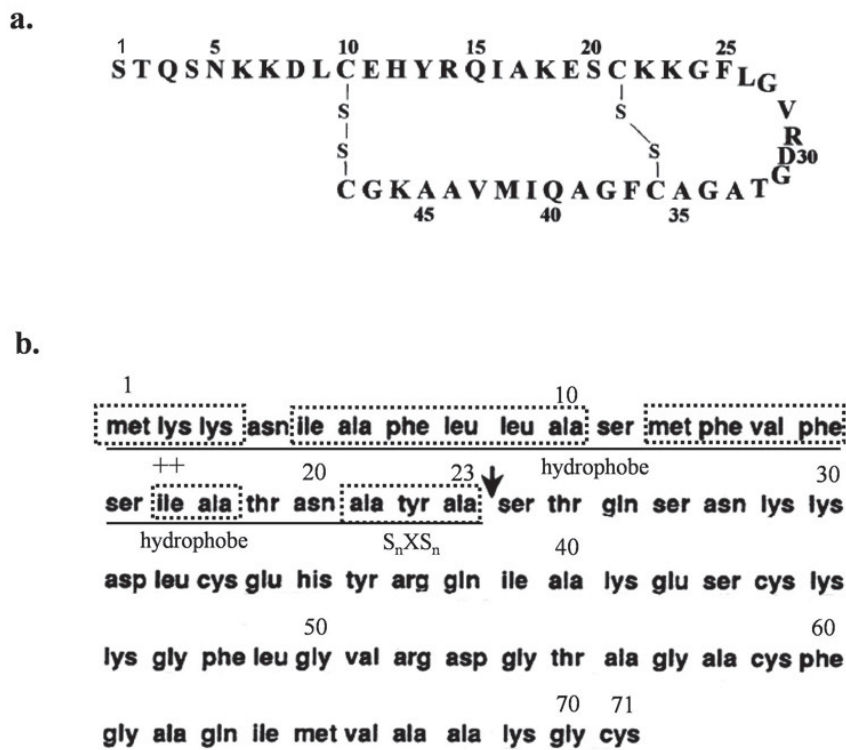


Figure 7. Séquence primaire de la toxine STb. (a) Les ponts disulfures sont indiqués. La numérotation des résidus se réfère à la protéine mature, après le clivage de la séquence signal. (b) séquence du précurseur de 71 a.a. Les 23 a.a. correspondant à la séquence signal N-terminale sont soulignés (partie N-terminale : charge nette négative; segment central : a.a. hydrophobes; partie C-terminale), suivis du site de clivage lors de la conversion du précurseur en la forme mature du peptide, indiqué par une flèche. Adapté des références (Sukumar et al., 1995).

3.2 Génétique

Le gène codant pour STb se trouve sur des plasmides hétérogènes qui peuvent également porter d'autres gènes, y compris pour d'autres entérotoxines (LT, STa), des facteurs de colonisation, la résistance aux antibiotiques, la production de colicine et les fonctions de transfert. Le gène *estB* fait partie d'un transposon d'environ 9 kb désignés Tn4521. Ce transposon est flanqué par des éléments incomplets IS2, mais est néanmoins fonctionnel car le gène STb peut se transposer d'un plasmide à un autre. Le gène de structure de STb, tel que déterminé à partir de différents isolats cliniques semble être uniforme dans la taille, mais les séquences flanquantes sont hétérogènes.

3.3 Biogenèse

Le polypeptide STb est synthétisé comme un précurseur de 71 acides aminés (Lee et al., 1983). La section N-terminale de pro-STB (résidus 1-23) présente les caractéristiques d'une séquence signal qui est clivée, par une peptidase signal, lors de l'exportation du pro-STb dans le périplasma. STb mature est un peptide de 48 acides aminés contenant quatre résidus de cystéine qui établissent des ponts disulfures entre eux. Ces ponts disulfures sont formés dans le périplasma par la protéine périplasmique DsbA. STb périplasmique est ensuite transporté vers le milieu extracellulaire (Kupersztoch et al., 1990) (figure 8).

Pour la conversion en STb actif, les ponts disulfures intramoléculaires doivent être formés correctement étant donné que la formation des ponts disulfures est essentielle pour la sécrétion de la toxine. Les mutants STb déficient au niveau de la formation des ponts disulfures ont été transportés mais ont subi la protéolyse périplasmique (Dreyfus et al., 1992).

L'entérotoxine STb est finalement transloquée à travers la membrane externe *via* le tunnel TolC (figure 8). TolC est un canal important de la membrane externe chez *E. coli* et joue un rôle important dans l'excrétion d'un large éventail de molécules, y compris les antibiotiques (Nishino et al., 2003), des sels biliaires (Rosenberg et al., 2003), les solvants organiques (Aono et al., 1998), l'entérobactine (Bleuel et al., 2005), plusieurs peptides antibactériens tels que colicine V (Guo et al., 2006), et aussi d'une grande toxine protéique, l'alpha-hémolysine (Vakharia et al.,

2001).

Plusieurs transporteurs dans la membrane intérieure et leurs protéines accessoires périplasmiques sont connus pour se combiner avec TolC et former un système de transport tripartite. On s'attend donc à ce que ces transporteurs agissent également comme un partenaire de TolC et exportent STb, à partir du périplasma vers l'extérieur. Yamanaka et al. (1994) ont effectué des expériences de pulse-chase en utilisant *E. coli* BL21 (DE3) dans laquelle différents gènes transporteurs (AcrAB, ACREF, emrAB, emrKY, mdtEF, Macab et yojHI) avaient été mutés et analysés pour leur implication dans la sécrétion de STb. Les résultats ont montré que la sécrétion extracellulaire de STb, a été largement diminuée chez le mutant *macAB*, et la toxine a été accumulée dans le cytoplasme. La stagnation périplasmique de STb chez le mutant *macAB* a été restaurée par l'introduction de pACYC184, contenant le gène *macAB*, dans la cellule. Ces résultats indiquent que MacAB participe à la translocation de STb du cytoplasme vers l'extérieur de la cellule. Comme il a été rapporté que MacAB coopère avec TolC, Yamanaka et al. (2008) ont proposé que le système MacAB-TolC capte les molécules périplasmiques de STb et les exporte vers l'extérieur.

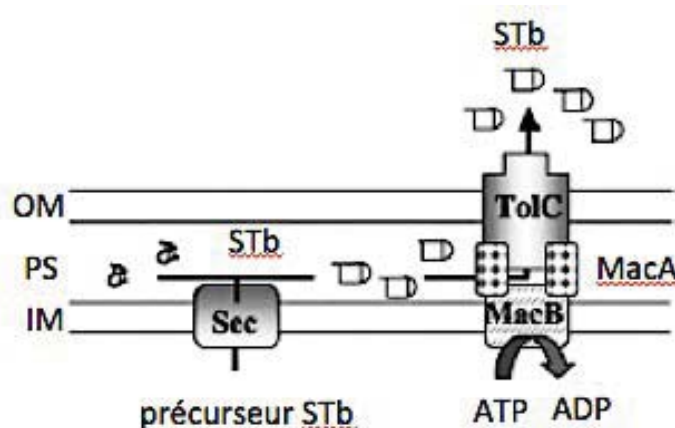


Figure 8. Modèle schématique de la sécrétion de la toxine STb. Les ponts disulfures sont formés dans le périplasma et STb périplasmique est transporté vers le milieu extracellulaire *via* le complexe TolC/MacA (Yamanaka et al., 2008).

3.4 Relation structure-fonction :

La toxine STb est un peptide de 48 acides-aminés contenant deux ponts disulfures, entre les résidus 10 et 48 et les résidus 21 et 36, qui sont nécessaires à l'activité biologique (figure 7).

La structure de STb a été déterminée par la méthode de résonance magnétique nucléaire (NMR) (Sukumar et al., 1995). La structure dérivée de la NMR montre que la toxine est hélicoïdale entre les résidus 10 et 22 et les résidus 38 et 44. La structure hélicoïdale dans la région 10-22 est amphiphile et expose plusieurs résidus polaires au solvant, dont certains se sont révélés être importants pour la toxicité de STb. Les deux hélices sont connectées par une boucle de glycines qui confère une flexibilité à la toxine. Les résidus hydrophobes sur la face opposée à cette hélice établissent des contacts avec les résidus hydrophobes du côté C-terminale de l'hélice. La région de la boucle entre les résidus 21 et 36 a un autre groupe de résidus hydrophobes et exposent les résidus Arg 29 et Asp 30 au solvant, qui ont été montrés pour être important, pour l'activité de la sécrétion intestinale, car la substitution de D30 par l'alanine ou la valine diminue l'activité biologique de STb (figure 9) (Labrie et al., 2001a). Des études de dichroïsme circulaire ont montré que la réduction des ponts disulfures entraîne une perte importante de la structure, qui est en corrélation avec la perte de la fonction. STb réduit adopte une conformation essentiellement aléatoire. Des mesures en présence d'urée (8 M) suggère que la structure secondaire native stabilise considérablement les liaisons disulfures.

a.

b.

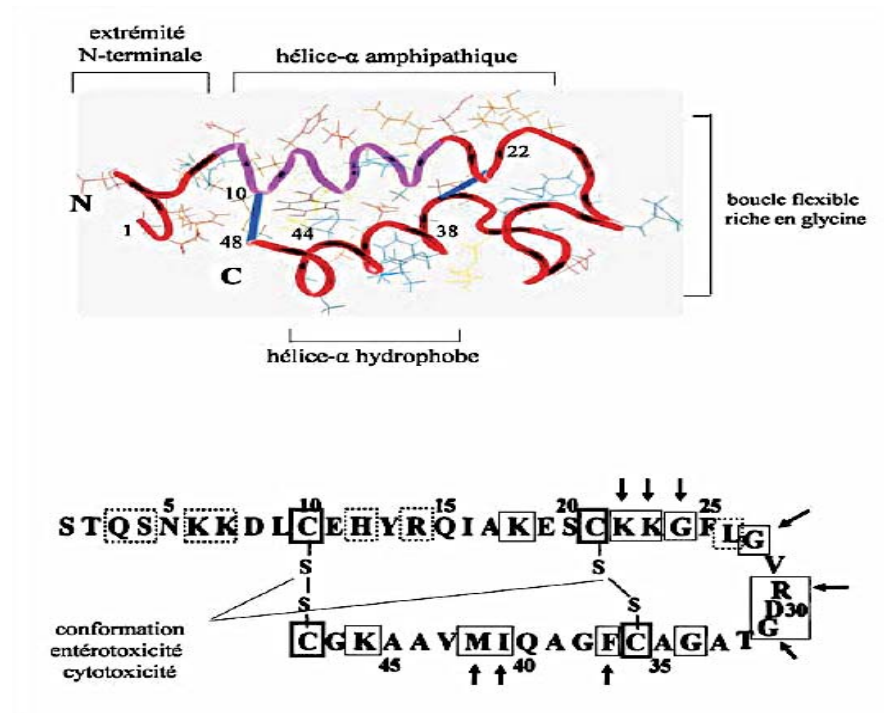


Figure 9. Relation structure-fonction de l'entérotoxine STb. (a) Structure tridimensionnelle de la toxine STb (Sukumar et al., 1995). (b) Structure secondaire de la toxine STb où on marque par \square les acides aminés qui ont déjà été mutés pour étudier leur rôle dans la cytotoxicité de la toxine STb.

3.5 Mécanisme d'action

3.5.1 Oligomérisation :

La toxine STb peut s'associer en hexamères de 28 KDa et en heptamères de 32 KDa en solution (Labrie et al., 2001b). L'intégrité de la structure de STb est nécessaire pour le processus d'oligomérisation. Ces hexamères et heptamères sont formés par l'interaction des hélices- α

hydrophobes C-terminales de monomères de STb, comme l'a prouvé l'étude de mutations de cette région (Labrie et al., 2001a). L'internalisation de la toxine à des cellules épithéliales est essentielle pour induire la sécrétion d'eau et d'électrolytes dans la lumière intestinale des animaux (Labrie et al., 2001b). Les mutants affectés dans leur oligomérisation présentent une liaison diminuée au récepteur *in vitro*, ce qui prouve que l'oligomérisation est nécessaire pour la fixation au récepteur et à la toxicité induite par STb.

3.5.2 Récepteur :

La surface de la membrane des cellules épithéliales intestinales peut exposer des sites de fixation spécifiques de la toxine STb. *In vitro*, la fixation de la toxine STb aux cellules épithéliales intestinales a été étudiée. Chao et Dreyfus (1997) ont déterminé que STb ne se lie pas aux protéines, aux glycoprotéines, aux protéoglycanes à la surface des cellules épithéliales humaines en culture mais plutôt se lie directement aux lipides membranaires. Hitotsubashi et al. (1994) ont montré que STb se lie spécifiquement à une molécule de 25 kDa dans les extraits protéiques de cellules épithéliales de l'intestin de souris. D'autres données ont nettement indiqué qu'un glycosphingolipide présent à la surface des cellules épithéliales du jéjunum de porc, le tissu de l'hôte naturel pour STb, pourrait être responsable pour la fixation de la toxine. Ce glycosphingolipide est situé sur la surface des cellules épithéliales et représente le récepteur fonctionnel de cette toxine (Rousset et al., 1998a). De plus, Rousset et al. (1998) ont montré que les résidus d'acide sialique étaient présumés être impliqués dans la liaison au jéjunum de porc, vu qu'un prétraitement avec la neuraminidase de *Clostridium perfringens* empêche la liaison de STb à la surface.

La liaison du STb à différents glycolipides a été étudiée pour examiner la structure oligosaccharidique reconnue par la toxine STb. Une forte liaison de la toxine STb au sulfatide (SO₃- 3-galactosyl- β -1céramide) et des plus faibles liaisons aux résidus d'acide sialique trouvés dans plusieurs gangliosides ont été reportés (Rousset et al., 1998b). Le sulfatide est situé sur les cellules du tube gastro-intestinal, du rein et de la rate (Beausoleil et al., 2002b).

Le sulfatide est un glycosphingolipide acide constitué d'une partie saccharidique polaire, le galactose sulfaté en position 3, et d'une partie lipidique, un céramide (figure 10) (Eckhardt 2008). L'extrait lipidique total de la muqueuse du jéjunum était lié par STb. Le sulfatide apparut comme récepteur fonctionnel, après que le traitement avec la laminine, une protéine de liaison aux glycolipides sulfatés, où un prétraitement des anses intestinales de rat ligaturées à la sulfatase ont inhibé significativement l'action *in vivo* de STb. Ensemble, ces données indiquent que le sulfatide représente un récepteur fonctionnel du STb (Rousset et al., 1998b).

Une forte affinité entre STb et le sulfatide a été confirmée par la constante de dissociation de 2.4 ± 0.61 nM qui a été déterminée par résonance plasmonique de surface (Goncalves et al., 2008).

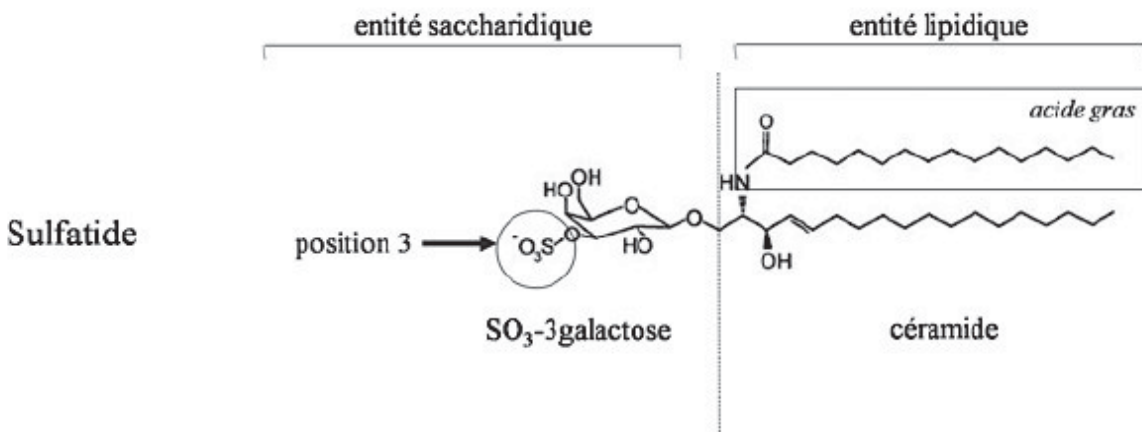


Figure 10. Structure du sulfatide. Le galactose porte un groupement sulfate en position 3 et est lié à une céramide. La chaîne d'acide gras de la céramide est de longueur variable selon le type cellulaire et peut être hydroxylée ou non (Eckhardt, 2008).

3.5.3 Pores membranaires et internalisation

La capacité de perméabilisation de la membrane de cellules porcines par STb a été évaluée en utilisant des membranes de bordures en brosse de vésicules isolées du jéjunum de porcelets et une

sonde fluorescente sensible au potentiel membranaire, le 3,3-iodure dipropylthiadicarbocyanine (figure 11).

Un potentiel de membrane a été généré par l'efflux des ions K^+ à partir des vésicules en présence de l'ionophore de potassium valinomycine. Dans ces conditions, la pré-incubation des vésicules avec STb dépolarise efficacement la membrane d'une manière dose-dépendante et saturable. Cette activité est indépendante du pH, du moins comme démontrée entre pH 5,5 et 8,0 (Goncalves et al., 2007). STb permet également la pénétration des colorants vitaux tel que le bleu de tryptan dans les différentes lignées cellulaires dépendamment de la dose, sans toutefois affecter leur viabilité (Beausoleil et al., 2002a).

D'autre part, l'interaction de STb avec les lignées épithéliales intestinales humaines T-84 et HT-29 et avec des cellules T-84 polarisées a été étudiée afin de comprendre l'interaction initiale de cette toxine peptidique avec des cellules cibles. Le traitement des cellules T84 et HT-29 avec une solution saline acide, pour éliminer la toxine liée à la surface, a révélé que seulement 55 % de la toxine pouvaient être éliminé par ce traitement à 4 °C, ce qui suggère qu'environ la moitié de la toxine STb liée a été associée d'une façon stable avec la membrane plasmique et/ou internalisée dans le cytoplasme. L'analyse par immunofluorescence a confirmé la présence de la toxine au niveau de la membrane et dans le cytoplasme (Chao et Dreyfus 1997). D'autres essais avec un anticorps anti-STb marqué à l'or suivi d'une analyse en microscopie électronique démontre l'internalisation de STb dans les cellules épithéliales de l'intestin de rat. La protéine de fusion MBP-STb et STb ont été internalisées (Labrie et al., 2002).

3.5.4 Effets cytoplasmiques : modèle proposé du mécanisme d'action de STb

Contrairement aux toxines LT et STa, Hitotsubashi et al. (1992) ont confirmé que STb n'induit pas d'augmentation d'AMPc et GMPc dans les cellules. Ainsi, lors d'une interaction entre STb et des cellules intestinales, la toxine s'oligomérisse en heptamères et hexamères qui se lient au sulfatide qui se trouve dans la membrane des cellules épithéliales de l'intestin. La boucle flexible (STb 24-31) de la toxine est responsable de la liaison avec le groupement sulfate en position 3 du sulfatide. Ces oligomères induisent l'ouverture des canaux calciques membranaires et donc un

influx de calcium extracellulaire dans le cytoplasme a été observé *in vitro* chez les lignées HT29 et MDCK (Dreyfus et al., 1993). À l'intérieur des cellules, STb déstabilise le potentiel mitochondrial et active la protéine Gai3 couplée à un canal calcique membranaire mitochondrial (Dreyfus et al., 1993).

L'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium cytoplasmique active une protéine kinase II Ca²⁺-calmoduline-dépendante (CaMKII) dans les cellules intestinales de souris (Fujii et al., 1997). En même temps, les phospholipases A2 et C libèrent l'acide arachidonique des phospholipides membranaires. Cet acide arachidonique est la cause principale de la formation de PGE2 et 5-HT aboutissant à l'ouverture de plusieurs canaux ioniques (Na⁺, CL⁻, et HCO3⁻). L'ouverture des canaux ioniques mène à la perte d'eau par osmose et donc à la diarrhée.

Notre laboratoire a montré la localisation intracellulaire de la toxine au niveau des mitochondries de lignées NIH-3T3 après 6h d'incubation en utilisant la microscopie à fluorescence (Goncalves et Dubreuil 2009). Cette colocalisation était associée à une hyperpolarisation mitochondriale dose-dépendante démontrée à l'aide d'une sonde fluorescente en cytométrie en flux, suggérant un effet de la toxine sur le fonctionnement des mitochondries. D'autres effets, comme le bourgeonnement des cellules et l'élargissement des noyaux, ont aussi été observés.

Ces évènements suggéraient l'induction d'une apoptose. D'ailleurs, le laboratoire a pu montrer l'induction de l'apoptose par activation des voies de caspase-3 intrinsèque qui, à son tour, mène à la dégradation de l'ADN (Syed et al., 2012).

Récemment, notre laboratoire a montré (Mukiza et al. 2013) que STb affecte aussi les jonctions serrées. Les occludines, claudines et protéines ZO étaient altérés et délocalisés tels que déterminés par microscopie confocale. Une diminution de la résistance transépithéliales (TER) des ces jonctions était observée en présence de la toxine et d'un octapeptide présent dans la séquence de STb et ayant une homologie avec la toxine Zot de *V. cholera*.

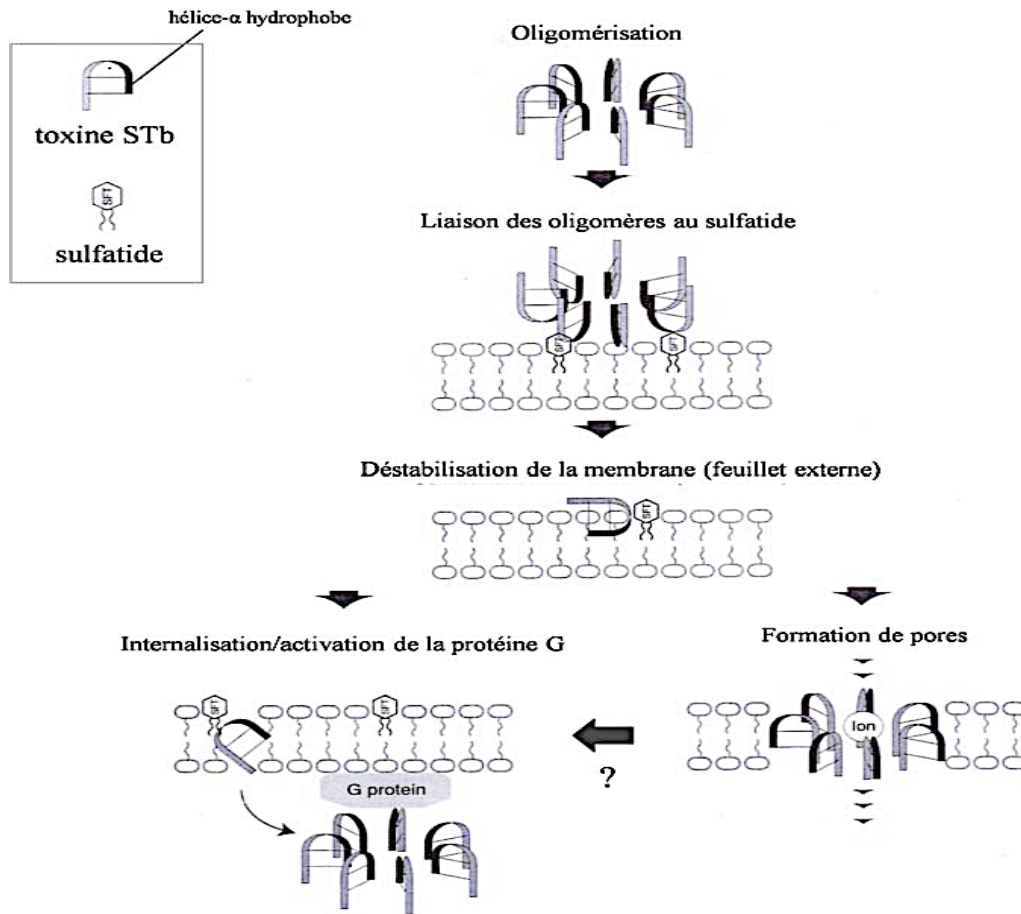


Figure 11. Mécanisme d'action proposé pour la toxine STb. Oligimérisation de la toxine et liaison au sulfatide membranaire *via* son hélice alpha hydrophobe. Cette interaction permet à la toxine de former des oligomères et de s'insérer dans la membrane pour être transloquée vers le cytoplasme. La formation des pores non spécifiques en résultant et l'activation des cascades d'évènements cellulaires menant à la diarrhée. (Dubreuil, 2006).

3.6 Manifestations cliniques :

Les infections à *Escherichia coli* entérotoxigènes sont généralement reliées à une diarrhée aqueuse aigue. Comme le choléra clinique, ces infections peuvent aller de symptômes bénins à une grave diarrhée aqueuse (Sack et al., 1971) conduisant à une déshydratation rapide et la prostration en quelques heures (Finkelstein et al., 1976). Cela dit, les premiers isolats des ETEC producteurs d'entérotoxines ont été identifiés dans des cas s'apparentant au choléra où aucun

Vibrio n'a pu être isolé (Evans et Evans 1973). En effet, l'action des ETEC ne peut être distinguées du choléra sur des bases cliniques (Yoder et al., 2006).

3.7 Jonctions intercellulaires

3.7.1 Généralités

L'épithélium gastro-intestinal constitue la plus grande interface de l'organisme en contact avec le milieu extérieur. L'épithélium permet l'absorption des nutriments, tout en offrant une barrière physique à la pénétration de molécules pro-inflammatoires, tels que des agents pathogènes, les toxines, les antigènes, de l'environnement luminal dans les muqueuses et le système circulatoire. Les cellules épithéliales créent cette perméabilité sélective par deux voies : la voie transcellulaire et la voie paracellulaire (figure 12). La voie transcellulaire est impliquée dans l'absorption et le transport des nutriments, notamment les sucres, les acides aminés, les peptides, les acides gras, les minéraux et les vitamines. Comme la membrane cellulaire est imperméable, ce procédé est principalement régi par des transporteurs ou des canaux spécifiques situés sur la partie apicale et la membrane basolatérale (Kiela et Ghishan 2009) . La voie paracellulaire est associée au transport dans l'espace intercellulaire entre les cellules épithéliales adjacentes. Elle est régie par un complexe de jonction apicale, qui est composé des jonctions serrées (TJ) et les jonctions adhérentes (AJ) (Baum et Georgiou 2011).

Les jonctions adhérentes, desmosomes, fournissent des liens d'adhérence solides entre les cellules épithéliales et aident également la communication intercellulaire, mais ne permet pas de moduler la perméabilité paracellulaire (Oda et Takeichi 2011).

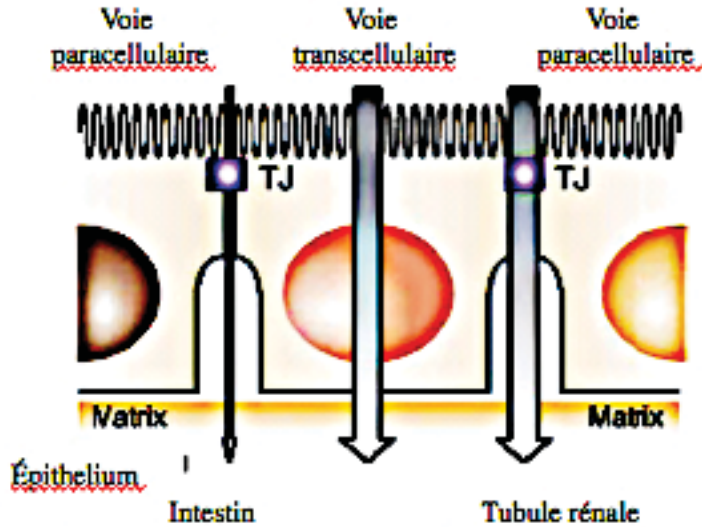


Figure 12. Voies paracellulaires et transcellulaires à travers les feuillettes épithéliales. Deux voies pour le fluide transepithelial et le mouvement des solutés entre la lumière de l'épithélium et les tissus interstitiels.

3.7.2. Les jonctions serrées

Les jonctions serrées entourent les extrémités apicales des membranes latérales des cellules épithéliales et déterminent la perméabilité sélective paracellulaire aux solutés (figure 13) (Van Itallie et Anderson 2006). À cet égard, les jonctions serrées fournissent à la fois une barrière aux molécules nocives et un pore pour la perméabilité des ions, des solutés et d'eau, le cas échéant. Les jonctions serrées sont des multiples complexes de protéines composées de protéines transmembranaires, comme les claudines et les occludines, et un large spectre de protéines cytosoliques (ZO). La modification de la fonction de la barrière intestinale et de la perméabilité paracellulaire est dynamiquement régulée par divers stimuli extracellulaires et est étroitement liée à notre santé (Turner 2009). La rupture de la barrière au niveau des jonctions serrées et l'augmentation de la perméabilité paracellulaire, suivie par la pénétration de molécules pro-inflammatoires luminal, peuvent induire l'activation du système immunitaire des muqueuses, entraînant une inflammation soutenue et des lésions tissulaires. Les études cliniques indiquent que la barrière intestinale des jonctions serrées a un rôle critique dans la pathogenèse des maladies intestinales et systémiques (Turner 2009).

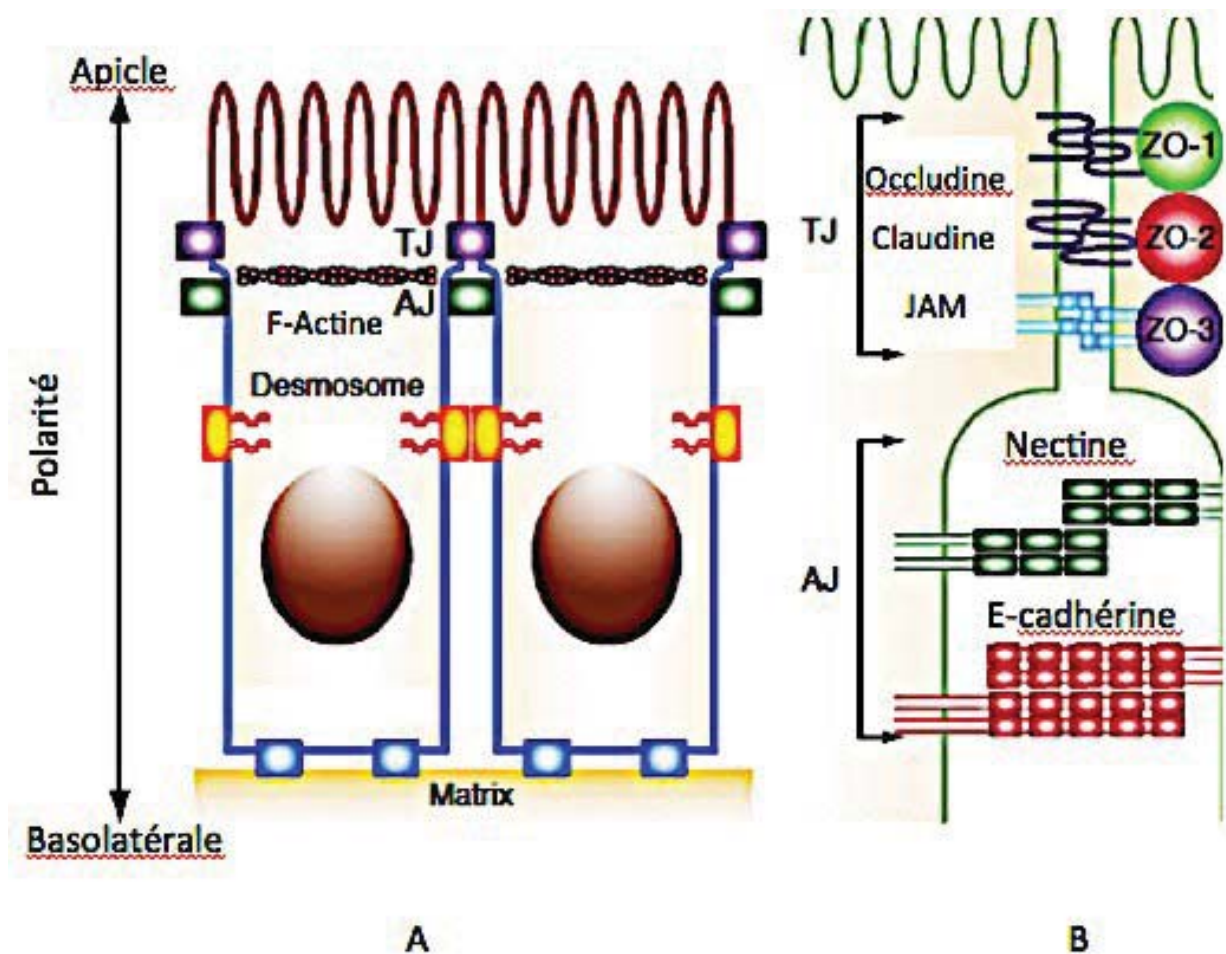


Figure 13. Organisation d'un épithélium simple cylindrique. (A) Les cellules épithéliales se fixent aux : 1) cellules adjacentes par les TJs (rectangles violets), AJs (rectangles verts), et les desmosomes (orange/rectangles jaunes), et 2) à la membrane basale par les contacts focaux (rectangles bleus). Les TJs contribuent au maintien de la polarité apicale (lignes rouges)-et basolatérale (lignes bleues). (B) La composition des TJs et des AJs. Les TJs sont composées de protéines transmembranaires (occludine, claudines, et JAM) liées au cytosquelette d'actine via les protéines cytoplasmiques ZO. Les AJs sont composées d'un système de nectine-afadin et d'un système caténine-E-cadhérine. (Miyoshi et al., 2005).

Expérimentalement, l'intégrité de la barrière intestinale des jonctions serrées et la perméabilité dans les tissus et les cellules intestinales sont évaluées par la mesure de la résistance électrique transépithélial (TER) et le passage paracellulaire de petites molécules, tels que le mannitol, le dextran (Ngendahayo Mukiza et Dubreuil 2013).

3.7.2.1 Structure moléculaire des jonctions serrées :

Les jonctions serrées sont des complexes de protéines situés aux extrémités apicales des membranes latérales des cellules épithéliales de l'intestin (figure 13). Elles régulent le passage paracellulaire des ions, des solutés et d'eau, et sont aussi connues pour agir comme une barrière pour maintenir la polarité des cellules en bloquant la libre diffusion des protéines et des lipides entre les domaines apical et basolatéral de la membrane plasmique (Turner 2009) . Quatre protéines transmembranaires intégrales, occludine (Furuse et al., 1993), claudine (Furuse et al., 1998a), jonction d'adhésion (JAM) (Martin-Padura et al., 1998), et tricellulin (Ikenouchi et al., 2005), ont été identifiées, avec la famille des claudines composée d'au moins 24 membres de poids moléculaire entre 20 KDa et 27 KDa.

Les domaines extracellulaires des protéines transmembranaires forment la barrière sélective par des interactions avec les cellules adjacentes. Les domaines intracellulaires de ces protéines transmembranaires interagissent avec des protéines cytosoliques d'échafaudage, tels que les protéines ZO, qui, à leur tour, ancrent les protéines transmembranaires au réseau d'actine du cytosquelette. L'interaction des protéines des jonctions serrées avec le réseau d'actine du cytosquelette est essentielle au maintien de la structure et de la fonction de ces jonctions. Par ailleurs, l'interaction du complexe de protéines de ces jonctions avec l'anneau d'actomyosine permet la régulation du cytosquelette et ainsi l'intégrité de la barrière.

3.7.2.2. Les protéines kinases et les jonctions serrées :

De nombreuses protéines de signalisation cellulaire, y compris la protéine kinase A (PKA) et divers isotopes de protéines kinases C (PKC) (Balda et al, 1993; Denisenko et al, 1994), sont impliqués dans les activités des TJ. L'implication de la PKC, dans la formation et la maintenance des TJs, a été étudiée en utilisant des esters de phorbol et des activateurs de PKC, qui induisent le démontage des TJ dans différentes lignées cellulaires. Plusieurs isoformes de la PKC ont été localisés au niveau des TJ, mais seulement le rôle de la PKC (aPKC) isoformes atypiques, en particulier celle de PKCzeta a été élucidée dans la régulation, et l'assemblage des TJ. aPKC est associé avec le complexe Par6-Par3, qui est recruté au niveau des jonctions des TJ, probablement

en se liant aux protéines des jonctions d'adhésion ou à la protéine Crb. Chez la drosophile, aPKC lie la protéine PALS1 associée aux TJs et Crb (Sotillos et al, 2004.).

L'interaction entre Par6 et PALS1 est régie par Cdc42 (Hurd et al, 2003; Lemmers et al, 2004). Par6 interagit également avec GTP-binding-Cdc42, un modulateur clé du cytosquelette d'actine, ce qui entraîne l'activation de aPKC sur les sites de jonctions cellule-cellule (Joberty et al, 2000; Lin et al, 2000). Fait intéressant, la petite GTPase-Cdc42 peut réguler différentes étapes du trafic membranaire polarisée, comme la transcytose et l'endocytose apicale (Rojas et al., 2001). Il est possible que la liaison de Cdc42 à Par6 lie Par3-Par6-aPKC et le complexe CRB-PALS1-PATJ à une voie de signalisation impliquée dans la régulation du cytosquelette d'actine, dans le transport et l'assemblage des TJs polarisée au niveau de la membrane.

Dans le cas de la protéine kinase A (PKA), la stimulation de la PKA empêche le démontage de TJ après une neutralisation, à base d'anticorps, de la E-cadhérine (Behrens et al., 1985). Des niveaux élevés d'AMPc intracellulaire améliorent la fonction de barrière, et l'inhibition de la PKA diminue la récupération de la barrière intestinale des cellules épithéliales T84 (Laurent et al., 2002). Les données récentes montrent également le rôle de la PKA dans l'assemblage des TJs. Tout d'abord, l'inhibition de la PKA diminue la phosphorylation de la protéine de liaison à l'actine et inhibe son recrutement au niveau des jonctions dans les cellules MDCK. En outre, l'activité du PKA est également nécessaire pour recruter la claudin-1 et ZO-1 au niveau des TJs, ce qui indique que la signalisation par PKA est importante pour l'ensemble des TJs fonctionnels (Kohler et al., 2004).

3.7.2.3 Les occludines :

En 1993, l'occludine (65 kDa) a été la première protéine membranaire intégrale des jonctions serrées identifiée (figure 14) (Furuse et al., 1993). Des études microscopie électronique ont visualisé spécifiquement les occludines dans les jonctions serrées de l'épithélium. L'occludine est une protéine membranaire tétraspanine à 4 domaines transmembranaires, deux boucles extracellulaires, et une boucle intracellulaire: une courte séquence N-terminale et une longue séquence C-terminale projetée dans le cytoplasme (figure 14). L'interaction des boucles

extracellulaires des occludines avec les cellules adjacentes semble créer une barrière contre les macromolécules, mais pas contre les petits ions (Al-Sadi et al., 2011). Le long domaine C-terminal interagit avec plusieurs protéines intracellulaires des jonctions serrées, comme les protéines ZO, qui sont nécessaires pour relier les occludines au cytosquelette d'actine (Furuse et al., 1994).

La fonction des occludines n'est pas encore entièrement comprise, mais de nombreuses études sur des animaux et des cultures cellulaires indiquent qu'elles ont un rôle crucial dans la structure et la perméabilité des jonctions serrées dans l'épithélium intestinal (Al-Sadi et al., 2011). Des souris, ayant subi une mutation au niveau du gène codant pour l'occludine, ont montré une densité et une organisation de jonctions serrées dans l'épithélium intestinal équivalentes à celles observées chez les souris de type sauvage (Saitou et al., 1998). En outre, la fonction de la barrière intestinale et le transport des ions chez les souris mutées sont apparus électrophysiologiquement normaux (Schulzke et al., 2005). Ces études ont soulevé la question à savoir si l'occludine est nécessaire pour l'assemblage et l'intégrité de la barrière. Cependant, une étude récente a démontré que les anomalies histologiques et fonctionnelles sont présentes dans différents tissus chez la souris mutée au niveau de l'occludine (Saitou et al., 2000). Par exemple, ces souris mutées ont montré une inflammation chronique et une hyperplasie de l'épithélium gastrique, ce qui suggère que la fonction des occludines est complexe (Saitou et al., 2000). Dans une étude plus récente utilisant des cellules intestinales Caco-2, la souris mutée au niveau des occludines a induit une augmentation de la perméabilité paracellulaire (Al-Sadi et al., 2011). Ces données indiquent systématiquement que l'occludine joue un rôle dans le maintien et l'assemblage des jonctions serrées.

Des études *in vitro* ont montré que la phosphorylation des occludines régule leur localisation et la perméabilité des jonctions serrées. Cette phosphorylation est régie par l'équilibre entre les kinases et les phosphatases responsables des sites de phosphorylation. Dans l'épithélium intact, l'occludine est fortement phosphorylée sur les sérine et thréonine (Sakakibara et al., 1997), et cette phosphorylation joue un rôle dans le maintien et l'assemblage de la structure des jonctions serrées (Rao 2009). Certaines kinases, telles que la protéine kinase C (PKC) et la caséine kinase I et II ont été identifiées comme des kinases responsables de la phosphorylation (Jain et al., 2011).

Les boucles extracellulaires de l'occludine sont quasiment de la même taille: elles ne possèdent pas de résidus chargés et sont très riches en tyrosine (Y). Plus de la moitié des résidus de la première boucle sont des tyrosines et glycines (G). Quant aux claudines, la première boucle extracellulaire est plus longue que la deuxième. Les deux boucles des claudines démontrent des résidus chargés qui pourraient influencer le passage des ions à travers l'espace paracellulaire.

3.7.2.4 Les claudines :

Les claudines (20-27 kDa) sont des protéines membranaires tétraspanines à boucles 1 intracellulaires et deux boucles extracellulaires et des domaines C-terminale ainsi que N-terminal cytoplasmiques (figure 14) (Furuse et al., 1998a). Les claudines n'ont pas de similarité de séquence avec les occludines. Les boucles extracellulaires des claudines font interactions homophiles et hétérophiles avec les cellules adjacentes, et ces interactions créent soit des barrières soit des pores pour le passage sélectif des molécules dans les voies paracellulaires (Van Itallie et Anderson 2006). Les domaines C-terminaux des claudines interagissent avec les protéines intracellulaires ZO qui, à leur tour, ancre les claudines au cytosquelette d'actine. De nombreuses études ont démontré que les claudines sont des éléments clés des jonctions serrées. Quand les claudines sont exprimées dans les fibroblastes, ils seront incorporés dans les jonctions serrées et forment des brins appariés au niveau des contacts entre cellules (Furuse et al., 1998a). Des études récentes utilisant des souris mutées au niveau des gènes codant pour les claudines ont montré que les claudines ont un rôle essentiel dans la formation de la barrière et de la sélectivité paracellulaire dans divers tissus (Furuse et al., 2002). Comme exemple, les souris mutées au niveau des claudine-1 meurent dans les 24h qui suivent la naissance en raison d'une perte dramatique de liquide et d'électrolytes à travers la barrière épidermique altérée (Furuse et al., 2002).

Les claudines sont une famille multigénique avec au moins 24 membres chez l'homme et la souris, et chaque isoforme montre un profil d'expression unique dans les tissus et de lignées cellulaires. Dans l'intestin de la souris, les claudines 1, -2, -3, -4, -5, -7, -8, -10, -12, -13, -14, -15, -17, et -18 sont exprimées, mais l'expression relative de chaque isoforme varie tout au long des

segments de l'intestin (Holmes et al., 2006). Contrairement à leurs similarités structurelles, les claudines ont des fonctions différentes et peuvent être divisées en deux types : ceux qui sont impliqués dans la formation de barrière (diminuant la perméabilité paracellulaire) et ceux qui jouent un rôle dans les pores des canaux (augmentation de la perméabilité paracellulaire) (Van Itallie et Anderson 2006). À notre connaissance, les claudines-1, -3, -4, -5, -8, -9, -11, -14 sont exprimées dans les intestins et peuvent être classées comme claudines formant une barrière, tandis que les claudines 2, -7, -12, et -15 sont des claudines porophores (Van Itallie et Anderson 2006). Surtout, les propriétés fonctionnelles de chaque claudine dépendent du nombre et de la position des acides aminés chargés dans la 1ère boucle extracellulaire (Krause et al., 2009). Par exemple, l'isoforme de les claudines-2 et 12, ont 3 (53, 65 et 75) et 4 (62, 66, 71 et 74) positions des acides aminés chargés négativement, respectivement, qui forment des pores de cations sélective (Fujita et al., 2006).

Comme c'est le cas avec l'occludine, certaines isoformes de claudine sont phosphorylées dans les cellules, et cette phosphorylation est associée à la localisation et la perméabilité paracellulaire. La phosphorylation de la claudine sur les résidus sérines est régulée par une protéine phosphatase, PP2A, et une protéine kinase, PKCzeta (Nunbhakdi-Craig et al., 2002). L'inhibition pharmacologique de PP2A favorise le recrutement de ZO-1 et d'occludine ainsi que la claudine-1 au niveau des jonctions serrées après une saturation de calcium. De même, la phosphorylation de la claudine-1 au niveau de la thréonine 203 augmente son insolubilité et son intégrité dans les cellules endothéliales des poumons du rat (Fujita et al., 2006). La protéine kinase A (PKA), dépendante de l'AMPc, phosphoryle la claudine-3 au niveau de son thréonine 192, et cette phosphorylation conduit à la rupture des jonctions serrées dans les cellules cancéreuse de l'ovaire (D'Souza et al., 2005). Un récepteur de tyrosine kinase, l'éphrine, qui est largement exprimé dans diverses cellules tumorales, phosphoryle la claudine-4 sur son tyrosine 208, conduisant à une augmentation de la perméabilité paracellulaire (Tanaka et al., 2005).

3.7.2.5 Les jonctions adhérentes (JAM):

Les protéines d'adhérence jonctionnelles (JAM) appartiennent à la superfamille des immunoglobulines, et ont un poids moléculaire d'environ 40 kDa (Ballabh et al., 2004). JAM

comprend trois domaines structuraux : un domaine extracellulaire avec deux boucles de type immunoglobuline, un seul domaine transmembranaire et une courte queue intracellulaire (figure 15) (Ballabh et al., 2004). JAM peut être classé dans JAM-A, JAM-B et JAM-C. Toutes les JAMs (A, B et C) se trouvent dans les cellules endothéliales (Sandoval et Witt 2008). Les deux JAM-A et JAM-C maintiennent la stabilité du TJ, et JAM-B maintient la stabilité en interagissant avec JAM-C (Bradfield et al., 2007). Des anticorps monoclonaux contre JAM empêchent le rétablissement de la fonction du barrière, mais n'ont pas d'effet sur la formation des TJs en monocouches confluentes, ce qui suggère que JAM participe à la formation des TJs (Mandell et Parkos 2005). JAM a été montré pour se lier au domaine PDZ des protéines cytoplasmiques AF6 et ZO-1 avec son extrémité C-terminale dans les boucles intracellulaires et extracellulaires et forment des interactions homophiles avec les cellules voisines (Mandell et Parkos 2005).

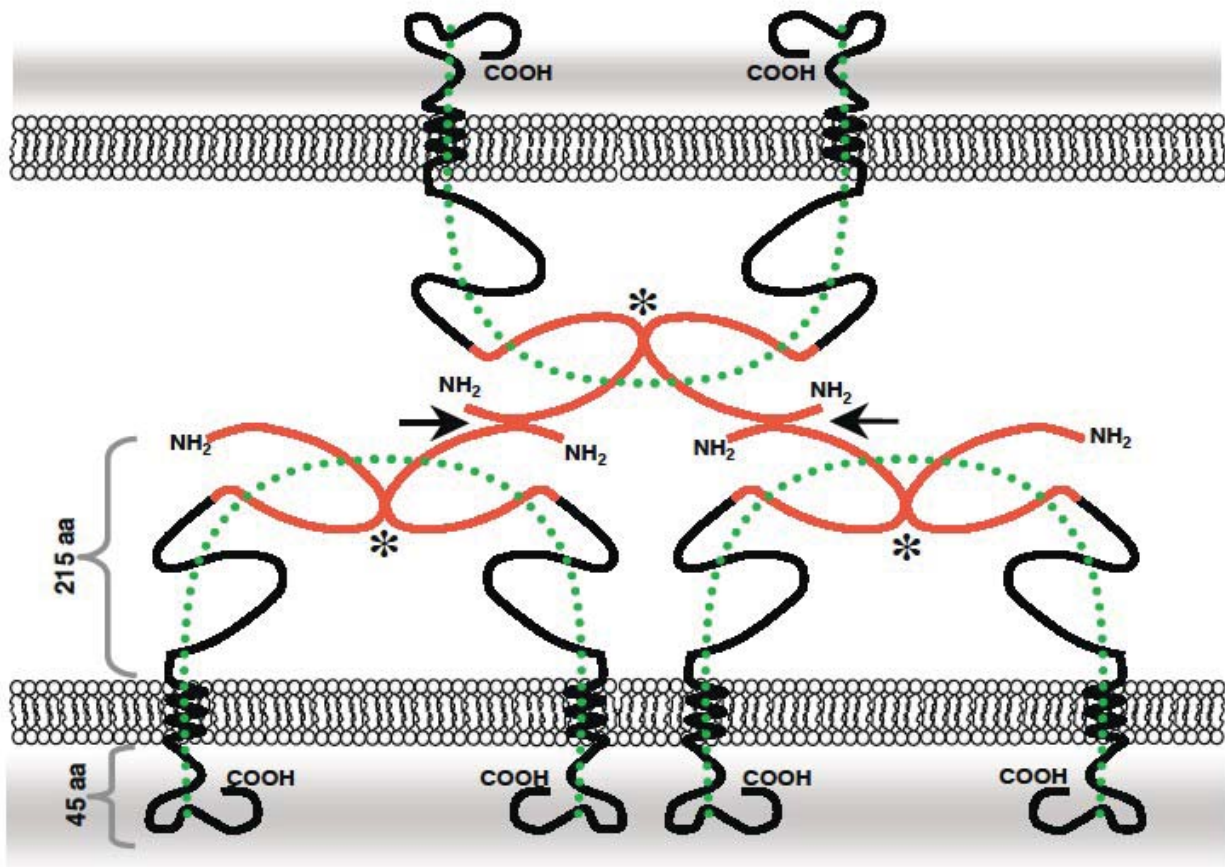


Figure 15. Interaction homophile des molécules JAM.

Les dimères JAM en forme U (représenté par une ligne verte discontinue) sont quasiment perpendiculaires à la surface cellulaire tandis que leurs premières boucles amino-terminales

(rouge) sont presque parallèles à la surface cellulaire et entre en contact dans un plan commun (astérisques). Les interactions paracellulaire de JAM ont lieu entre les premières boucles des molécules JAM situées sur des membranes cellulaires apposées l'une sur l'autre (flèches). Les réseaux JAM est donc construit par la répétition du motif structural des dimères en forme de U sur des cellules avoisinantes (Gonzalez Mariscal et al., 2003).

3.7.2.6 Les protéines cytoplasmiques:

Les protéines ZO (*Zonula Occludens*) appartiennent à la famille de la guanylate kinase associée à la membrane, et se composent de trois domaines PDZ, un domaine SH3 et un domaine guanylyl-kinase (Shin et al., 2006). Ces protéines jouent un rôle dans la liaison des protéines transmembranaires au cytosquelette d'actine et interagissent directement avec la plupart des protéines transmembranaires comme les occludines, les claudines et les protéines JAM. Dans le même temps, les protéines ZO sont impliquées dans la transduction de signal et la modulation de la transcription (Bauer et al., 2010). ZO-1 est une phosphoprotéine de 220 kDa d'abord trouvé dans les TJs, et est associée à l'extrémité C-terminale de claudines par son domaine PDZ-1, au JAM par son domaine PDZ-2 et 3, et par l'occludine par son domaine GK (Cardoso et al., 2010). ZO-1 se lie au cytosquelette d'actine par son extrémité C-terminale, servant de pont entre les protéines transmembranaires et les protéines du cytosquelette. Cette interaction est importante pour la stabilité et la fonction de TJ : la dissociation de ZO-1 du complexe de jonctions serrées conduit souvent à une augmentation de la perméabilité paracellulaire (Cardoso et al., 2010). Une fois liée aux complexes des protéines transmembranaires, ZO-1 devient insoluble dans les détergents non ioniques, montrant ainsi une forte association avec le cytosquelette d'actine (Bazzoni et Dejana 2004).

ZO-2 est une phosphoprotéine de 160 kDa qui partage une homologie de séquence avec ZO-1. Sa fonction est redondante avec la fonction de ZO-1, donc il peut remplacer ZO-1 et faciliter la formation d'une jonction serrée morphologiquement compétente (Umeda et al., 2004). Plus récemment, une enquête a révélé que des souris déficientes au niveau du gène codant pour ZO-2 a subi une létalité embryonnaire précoce. Cette constatation suggère que ZO-2 est nécessaire pour

le développement embryonnaire de souris, et ne peut pas être compensée par ZO-1 et ZO-3 (Xu et al., 2008).

ZO-3 est une phosphoprotéine de 130 kDa qui partage une homologie de séquence et d'organisation de domaine avec ZO-1, et pourrait être co-immunoprécipiter avec le complexe ZO-1/ZO-2 (Gonzalez-Mariscal et al., 2003).

3.7.3 Pathogènes affectant les jonctions serrées :

3.7.3.1. *Vibrio cholerae* et la toxine ZOT (*Zonula Occludens Toxin*)

Une infection entérique par *V. cholerae*, une bactérie gram-négatif pathogène, induit la diarrhée menant à la déshydratation. Des études ont suggéré que la déficience de la barrière intestinale contribue en partie à la pathogénèse provoquée par certains agents pathogènes. Les principaux réservoirs de *V. cholerae* sont les sources aquatiques, et les infections sont souvent associées à des copépodes, crustacés et plantes aquatiques. *V. cholerae* produit plusieurs toxines, comme la toxine cholérique, hémagglutinines/protéase (HA/P), Zonula occludens toxin (ZOT), et l'entérotoxine cholérique. ZOT et HA/P perturbent la fonction de la barrière intestinale. ZOT a été trouvé en tant que deuxième entérotoxine produite chez *V. cholerae* (Fasano et al., 1991). Il diminue la TER dans l'intestin grêle des rats, des lapins et des cellules intestinales Caco-2 en culture (Fasano et al., 1991). ZOT est synthétisé dans la membrane externe de *V. cholerae* et a une masse moléculaire de 45 kDa (399 aa), et le fragment C-terminal de 12 kDa (288-399 aa) est excrété dans le milieu intestinal de l'hôte. Le fragment C-terminal semble être responsable de l'effet perturbateur sur les TJs, comme la réduction des TER causée par un mutant tronqué nommé DG-ZOT, qui conserve aa 264-399, est à peu près comparable à celle de ZOT pleine longueur dans les cellules intestinales Caco-2 (Di Pierro et al., 2001). Le ZOT et le mutant induisent la redistribution des protéines (occludine et ZO-1) et le réarrangement du cytosquelette, ce qui entraîne une perturbation de la barrière intestinale (Goldblum et al., 2011). Ce processus nécessite l'activation de la PKC. En outre, l'analyse structure-fonction a identifié un hexapeptide (FCIGRL, 288-293 aa) comme l'un des domaines biologiquement actifs du mutant ZOT (Di Pierro et al., 2001). Cet hexapeptide, FCIGRL, est structurellement similaire à un motif

(SLIGRL) contenue dans le ligand du récepteur de la protéinase (PAR) 2, qui a un rôle dans la régulation des TJs. Les effets perturbateurs de FCIGRL sur les TJs ne sont pas observés dans l'intestin grêle de souris mutées au niveau du PAR2, ce qui indique que PAR2 est l'un des récepteurs du mutant et que l'hexapeptide contribue partiellement du moins à la perturbation induite par ZOT sur les TJs (Goldblum et al., 2011).

HA/P produite par *V. cholerae* est une métalloprotéase de liaison au zinc qui perturbe la barrière intestinale par la dégradation d'occludine. Le HA/P a été identifié à partir des résultats montrant que le surnageant de culture des souches vaccinales atténuées par la toxine présentent encore un effet perturbateur sur les TJs intestinaux (Mel et al., 2000). L'activité HA/P clive le domaine extracellulaire de l'occludine, ce qui entraîne la dissociation de ZO-1 du domaine intracellulaire d'occludine (Wu et al., 2000). Cette dissociation résulte finalement en réarrangement du cytosquelette d'actine et d'une hyperperméabilité.

3.7.3.2 : EHEC

EHEC, aussi appelée vérotoxine ou *E. coli* producteur de shiga toxine, est une bactérie pathogène. L'infection entérique provoque des diarrhées et colites hémorragiques, et peut conduire à des effets systémiques mortels, y compris le syndrome hémolytique et urémique et le purpura thrombocytopénique thrombotique. Bien que les organismes EHEC produisent des toxines Shiga ou vérotoxines, qui inhibent la synthèse des protéines de la cellule, ces toxines ne semblent pas jouer un rôle dans la maladie diarrhéique provoquée par EHEC (Philpott et al., 1998). Dans les cellules intestinales T84 vivent EHEC, mais les cellules ne sont pas tuées dans un milieu conditionné, perturbent ainsi la barrière des TJs avec redistribution des protéines (ZO-1 et occludine), ce qui suggère que l'interaction directe des bactéries avec les cellules intestinales déclenchent une rupture de la barrière intestinales (Philpott et al., 1998). La translocation du PKC à la jonction intercellulaire, induite par les EHEC, comme c'est le cas des EPEC, ne semble pas être impliqué dans la rupture de la barrière induite par EHEC (Tomson et al., 2004).

3.7.3.3. EPEC :

EPEC, représente un agent pathogène entérique non invasif, provoque une diarrhée aqueuse aigue et est d'une grande importance médicale dans les pays en développement. Ce pathogène perturbe la barrière à travers l'attachement aux cellules épithéliales intestinales. Les infections à EPEC induit une hyperperméabilité paracellulaire dans les intestins de souris (iléon et du colon) et des cellules intestinales T84, comme indiqué par une diminution TER (Muza-Moons et al., 2004). Dans les cellules T84 infectées par EPEC, un réarrangement du cytosquelette et la distribution de protéines aberrantes TJ (ZO-1, occludine et claudine-1) sont observés (Muza-Moons et al., 2004). Il a été démontré que la perturbation de la barrière EPEC est atténuée par l'inhibition pharmacologique de chaque PKC (Savkovic et al., 2003; Tomson et al., 2004). (Miyake et al., 2005) ont révélé que la rupture de la barrière est médiée par deux molécules effectrices des EPEC, *E. coli* protéine sécrétée F (ESPF) et la protéine mitochondriale associée (Map), et une protéine de surface bactérienne, l'intimine. ESPF est nécessaire pour la rupture de la barrière intestinale à un point de contrôle avancé après l'infection par les EPEC chez la souris (Shifflett et al., 2005), mais les rôles précis des 3 autres protéines sont encore peu clairs.

3.7.3.4. *Clostridium perfringens*:

Clostridium perfringens est une bactérie à Gram positif, anaérobies formant des spores du genre *Clostridium*. *C. perfringens* est toujours présent dans la nature et peut être trouvé comme une composante normale de la végétation en décomposition, les sédiments marins, le tractus intestinal des humains et d'autres vertébrés et d'insectes, et le sol. Par conséquent, cet agent pathogène est la troisième cause la plus fréquente d'intoxication alimentaire au Royaume-Uni et aux États-Unis (Brynstad et Granum 2002). *C. perfringens* induit la diarrhée par la sécrétion de l'entérotoxine CPE (35 kDa) (McClane et al., 1988). CPE consiste en deux domaines fonctionnels, un domaine pour la cytotoxicité en région N-terminale (N-CPE) et une région de liaison au récepteur en région C-terminale (C-CPE) (Hanna et al., 1992). Deux récepteurs fonctionnels pour les CPE exprimées dans les divers types de cellules, y compris les cellules épithéliales intestinales, ont été identifiés comme CPE-R et VPR-1 (Katahira et al., 1997). Fait intéressant à constater, les 2 récepteurs ont été désignés comme claudine-3 et -4. N-CPE et C-CPE induisent une

hyperperméabilité intestinale chez les animaux et les cultures cellulaires, comme indiqué par le flux de macromolécules et la TER (Takahashi et al., 2005). La liaison directe de C-CPE avec les domaines extracellulaires des claudine-3 et 4 ont été observés.

ARTICLE

***Escherichia coli* STb enterotoxin dislodge claudin-1 from epithelial tight junctions**

Hassan Nassour and J. Daniel Dubreuil*

GREMIP, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Canada



Abstract

Enterotoxigenic *Escherichia coli* produce various heat-labile and heat-stable enterotoxins. STb is a low molecular weight heat-resistant toxin responsible for diarrhea in farm animals, mainly swine. A previous study demonstrated that cells having internalized STb toxin induce epithelial barrier dysfunction through changes in tight junction (TJ) proteins. These modifications contribute probably to the diarrhea observed. To gain insight into the mechanism of increased intestinal permeability following STb exposure we treated human colon cells (T84) with purified STb toxin after which cells were harvested and proteins extracted. Using a 1% Nonidet P-40-containing solution we investigated the distribution of claudin-1, a major structural and functional TJ protein responsible for the epithelium impermeability, between membrane (NP40-insoluble) and the cytoplasmic (NP-40 soluble) location. Using immunoblot and confocal microscopy, we observed that treatment of T84 cell monolayers with STb induced redistribution of claudin-1. After 24h, cells grown in Ca^{++} -free medium treated with STb showed about 40% more claudin-1 in the cytoplasm compare to the control. Switching from Ca^{++} -free to Ca^{++} -enriched medium (1.8 mM) increased the dislodgement rate of claudin-1 as comparable quantitative delocalization was observed after only 6h. Medium supplemented with the same concentration of Mg^{++} or Zn^{++} did not affect the dislodgement rate compare to the Ca^{++} -free medium. Using anti-phosphoserine and anti-phosphothreonine antibodies we observed that the loss of membrane claudin-1 was accompanied by dephosphorylation of this TJ protein. Overall, our findings showed an important redistribution of claudin-1 in cells treated with STb toxin. The loss of phosphorylated TJ membrane claudin-1 is likely to be involved in the increased permeability observed. The mechanisms by which these changes are brought about remain to be elucidated.

Introduction

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) represent an important cause of severe diarrhea in newborn animals [1] and diarrhea in Man following the ingestion of contaminated food and water [2]. Expression of both colonization factors and toxins are required for disruption of intestinal fluid homeostasis, leading to diarrhea [3]. ETEC strains are known to produce several types of enterotoxins, including heat-labile enterotoxin (LT), heat-stable enterotoxin a (STa) and heat-stable enterotoxin b (STb) [4]. Enteroaggregative heat-stable toxin 1 (EAST1) was also shown to be produced by ETEC [5,6].

STb, a 48-amino-acid peptide of 5.2 kDa, secreted by ETEC strains is mainly associated with post-weaning diarrhea in piglets [7,8]. *In vivo*, STb binds to its receptor, sulfatide, an acidic glycosphingolipid localized at the surface of intestinal epithelial cells [9]. Then, STb is internalized and stimulates a pertussis toxin-sensitive G protein (G α i3) [10]. This causes an influx of extracellular calcium ions through a ligand-gated calcium ion channel. The increased intracellular Ca⁺⁺ stimulates protein kinase C (PKC) that phosphorylates and activates the cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR), leading to Cl⁻ secretion. The calcium increase also activates phospholipases A₂ responsible for the release of arachidonic acid from membrane phospholipids leading to production of prostaglandin E₂ (PGE₂) and 5-hydroxytryptamine (5-HT) [11,12]. These molecules mediate transport of water and HCO₃⁻ from enterocytes into the intestinal lumen and prevent Na⁺ absorption resulting in watery diarrhea [7].

Using immunoblot or enzyme-linked assays, Berberov et al. (2004) demonstrated that EAST-1, LT and STb could be concurrently expressed by porcine ETEC strains [13]. Also, Zhang et al. (2006) observed that only LT-and STb-positive strains caused appreciable diarrhea in 5-days-old pigs [14]. Futher, Erume et al. (2008) results indicated that LT is a more significant contributor than STb to the virulence of F₄-positive ETEC strain infections [15]. However, recent data by Loos et al. (2012) did not support a greater role of LT but instead suggested a dominant role for STb in small intestinal secretion early after post-weaning infection, as well as in the induced innate immune response through differential regulation of immune mediators like interleukin-1 and interleukin-17 [16].

The intestinal lumen is covered by a uniform single layer of epithelial cells. This epithelial layer serves as an environmental barrier [17]. This barrier comprises a number of transmembrane proteins including, but not limited to, tight junction (TJ) proteins like occludins, claudins, and junctional adhesion molecules (JAMs). TJ-associated proteins includes cytoplasmic peripheral membrane proteins such as ZO-1 and ZO-2 known to be associated with transmembrane proteins that includes occludin and claudin families with the apical perijunction of F-actin ring [18]. The F-actin network forms the cell cytoskeleton [19]. TJs act as a barrier controlling penetration of ions, solutes, and water, through intercellular spaces and act as a fence dividing apical and basolateral domains to compartmentalize the plasma membrane. These characteristics of TJs provide also a barrier to prevent the entry of pathogens and foreign substances from invading and facilitate directional exchanges of material [20]. Besides the cell maintenance TJs are essential to both cellular development and normal barrier function [21].

Although human epithelial cells have incorporated barriers to block microorganisms to gain access to deeper cell layers within tissues, certain pathogens have evolved to exploit and thus control TJs to alter this barrier. These pathogens use an array of tactics to hijack junctional structures to their advantage. Some pathogens use TJ proteins as receptors for attachment and subsequent internalization. Others destroy the TJs thereby providing a gateway to the underlying tissue. For example, pathogens such as enteropathogenic *E. coli*, serotype O127:H6 [22], enterohemorrhagic *E. coli* producing a shiga toxin-independent non-bloody diarrhea [23], serotype O157:H7 [24], bacterial toxins such as *Clostridium difficile* toxins A and B [25], *Vibrio cholerae* Zonula occludens toxin [26], secreted autotransporter toxin [27] disrupt TJs [28].

Many studies on ETEC enterotoxins used T84 human colon cells, a cell line commonly used to study bacterial enterotoxin secretory processes [29]. Kreisberg et al. (2011) observed that LT-producing strains could affect cellular permeability independently of STa production [29]. However, in a study of Nakashima et al. (2013), STa elicited a reduction in TER and causes not only induction of water secretion but also intestinal barrier dysfunction but did not increase the paracellular permeability of FITC-labelled dextran [30]. For STb toxin, a reduction in TER associated with an increased in paracellular permeability was associated with a marked alteration of F-actin stress fibers [31]. F-actin filament dissolution and condensation were accompanied by

redistribution and/or fragmentation of ZO-1, claudin-1, and occludin. Therefore, reduction in TER resistance and paracellular permeability to FITC-labeled dextran is recognized as indices of the decreased integrity of epithelial cells intoxicated with these toxins.

STb toxin generated an increase in cytoplasmically located TJ proteins including claudin-1 [31]. Less phosphorylated claudin-1 is found in the cytoplasm and highly phosphorylated claudin-1 is selectively concentrated at TJs monitored as NP-40-insoluble material [28,32,33]. Detergent insolubility of proteins is considered to indicate their integration into macromolecular phosphorylated complexes such as intercellular junctions [32,34]. Membrane-associated claudin-1 is known to be important structural and functional components in maintaining TJ integrity [35].

PKC is a family of serine-threonine kinases known to regulate epithelial barrier function. PKC are epithelial calcium-dependent enzymes and appears to regulate both subcellular localization and phosphorylation states of several TJ-associated proteins including claudin-1 [36]. The aim of the present study was to examine the effects of STb on location and phosphorylation state of claudin-1 in T84 intestinal epithelial cells.

Materials and methods

Culture media, antibodies, and reagents

Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), Ham's F-12 nutrient mixture (F-12), phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4, free of calcium chloride and magnesium chloride), 5% fetal bovine serum (FBS), rabbit polyclonal anti-claudin-1, goat anti-rabbit Alexa 488 antibodies, bovine serum albumin (BSA), and DAPI (4',6-diamidino-2 phenylindole dihydrochloride) were purchased from Invitrogen, Canada. FITC-phalloidin and Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) was purchased from Sigma. Factor Xa was from Roche and phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) was from Gibco BRL. Anti-phosphoserine and anti-phosphothreonine antibodies were purchased from Abcam.

Production and STb purification

Recombinant STb toxin was produced as described previously, using a HB101 strain harboring

the plasmid pMAL-STb, which codes for the fusion protein MBP-STb [37]. Ampicillin, at a final concentration of 50 mg/ml, was used as the selection agent for bacteria carrying the plasmid pMAL-STb. Bacteria were grown in Rich medium (10 g tryptone, 5 g yeast extract, 5 g NaCl, 2 g dextrose per liter) for 18 h at 37°C in an orbital shaker set at 180 rpm. A volume of 5 ml of an overnight bacterial culture was transferred to 500 ml of fresh Rich medium and returned to the orbital shaker until the optical density at 600 nm reached 0.5. Then, 0.3 mM IPTG was added to induce the synthesis of the fusion protein. The induction was allowed to proceed for 3 h in the orbital shaker. Cells were harvested by centrifugation at 4,000 x g for 15 min at 4°C. The pellet was gently washed in a volume of 250 ml of 30mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 20% sucrose and 1mM EDTA. After centrifugation at 8,000 x g for 20 min at 4°C, an osmotic shock of bacteria was induced using a solution of 5 mM MgSO₄ containing 0.4 mM PMSF and then centrifuged at 7,000 g for 20 min at 4°C. The supernatant containing the fusion protein (MBP-STb) was filter-sterilized using a 0.22- μ m-pore-size tangential flow filter (VacuCap; Pall Life Sciences). The fusion protein was affinity-purified at 4°C on a 30 ml amylose column (New England BioLabs) at a flow rate of 0.2 ml/min using a column buffer solution of (10mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, 1mM (pH 8.0)). Then, a 10 mM was added to this buffer in order to elute maltose-binding proteins. The eluted proteins were dialyzed against MilliQ water using a 12,000 to 14,000 Da membrane (Spectrum, Dominguez, CA). Dialyzed material was then concentrated using a speed-vac and cleaved using factor Xa enzyme (Roche) in a cleavage buffer consisting of 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, and 1 mM CaCl₂ (pH 8.0). Using an AKTA-10 purifier system (GE Healthcare), the cleaved material was loaded onto a C₈ reverse-phase column (PerkinElmer, Montreal, Canada) and eluted with a linear gradient of acetonitrile in water solution containing 0.1% trifluoroacetic acid. Using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific), a standard curve of various concentrations of aprotinin (molecular weight of ~ 6,500) with absorbance at 214 nm was prepared. STb preparations were quantified using the generated standard curve and kept at -20°C until use [38].

Intestinal cell culture and treatments

T84 human colon intestinal epithelial cells, used as a model to study the effects of enterotoxins on TJ proteins [29,30,39-42] were obtained from the American Type Culture Collection. Cells (passage 5 to 18) were maintained in equal volumes of Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) and F-12 supplemented with 5% (vol/vol) fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen,

Canada). Cells were grown in T-75 culture flasks (Sarstedt, Canada) at 37°C, 5% CO₂ in a humidified incubator. Cell viability of T84 cell line was measured using Trypan blue [43]. For maintenance purposes, confluent T84 monolayers were passaged weekly using trypsin-EDTA treatment in phosphate buffered saline (PBS: Invitrogen) free of calcium chloride and magnesium chloride.

For immunofluorescence experiments, T84 cells were seeded, on LabTek 8-well chamber slides (Fisher Scientific, Canada), at a density of 150,000 cells/ml and used after 2 days of growth. One hour before treatment with purified STb cell monolayers was washed using PBS and the medium was changed to medium without FBS.

Detergent extraction of cell monolayers

Cell monolayers were grown on tissue culture plates and treated with purified STb (4 nmoles) for 0, 6, 12 and 24h and then subjected to detergent extraction with non-ionic Nonidet P-40 (a non-ionic, non-denaturing detergent) (NP40) according to the method of Sakakibara et al. (1997) [32]. After STb treatment, cells were washed three times with cold PBS, and centrifuged for 10 minutes at 16 000xg. After centrifugation, the cell pellet was lysed with ice-cold NP-40 buffer (25 mM HEPES/NaOH (pH 7,4), 150 mM NaCl, 4 mM EDTA, 25 mM NaF, 1% NP-40, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml aprotinin). After centrifugation at 16 000xg, the supernatant was collected as the NP40-soluble fraction. The pellet was resuspended in sodium dodecyl sulfate (SDS) lysis buffer (1% SDS, 25 mM HEPES (pH 7.4), 4 mM EDTA, 25 mM NaF) and homogenized. The homogenate was diluted with an appropriate volume of NP40 buffer and the lysate was left for 10 minutes and recentrifuged. The supernatant was collected and used as the NP-40-insoluble fraction.

Gel Electrophoresis and immunoblotting

For electrophoresis, equal amounts of total protein within each fraction were loaded onto a polyacrylamide gel. Proteins were dissolved in sample buffer (10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, 3% SDS, 0.0625 M Tris-HCl (pH 6.8), 0.01% bromophenol blue) and heated for 10 minutes at 100°C. Samples were resolved by one-dimensional SDS-PAGE as described by Laemmli (1970) using a 12% gel and the fractioned proteins were electroblotted onto a PVDF membranes (Millipore, 0,45 µm pore size; Bedford, MA, Canada) [44]. After blocking the

membrane with 3% milk in PBS containing 0.1% Tween 20 (PBS-T), membranes were incubated with polyclonal antibodies against claudin-1 (1:2000) (Invitrogen), phosphothreonine and phosphoserine (1:2000) (Abcam), washed in PBS-T and further incubated with HRP-conjugated secondary antibodies (1:4000) (Biorad). A liquid substrate system for membranes TM-blue (Sigma) was used to detect the enzymatic activity of the secondary antibody. The density ratio of the specific bands was quantified using ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Representative blots from multiple experiments (minimum of three) are shown in the figures. Blots were digitally contrasted to preserved relative intensity of specific claudin-1 bands.

Cations enrichment studies

T84 cells were grown in calcium-free medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Ham's F-12 nutrient mixture (F-12) with 5% FBS) and then transferred to the calcium-enriched medium (1.8 mM CaCl₂) for 24h and then treated with 4 nmoles of purified STb for 0, 6, 12 and 24h. Cells were then subjected to detergent extraction, resolved by one-dimensional SDS-PAGE and electrophoretically transferred as described above. The same experiments were done using two others divalent ions, Mg⁺⁺ and Zn⁺⁺, to assess the specificity of Ca⁺⁺ in the increased rate of claudin-1 dislodgement and actin disorganization.

Immunofluorescence microscopy of actin cytoskeleton and tight junction proteins

For claudin-1 staining, T84 cells were seeded on cover slips at 1x10⁵ cells/ml and fixed with 100% ethanol for 20 minutes. Cells were then permeabilized with 1% Triton X-100 in PBS for 10 minutes, soaked in blocking solution (PBS containing 1% BSA) for 1h, and then incubated with the anti-claudin-1 antibody (1:100) for 1h in a moist chamber. The samples were washed three times with PBS and then incubated for 1h with FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG (Biorad). Samples were then washed with PBS three times, mounted in PBS containing 1% p-phenylenediamine and 90% glycerol.

For staining of F-actin filaments, cells were washed three times with PBS, permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 10 min at room temperature, and blocked with 2% BSA-PBS for 45 min before incubation with fluorescein-phalloidin for 45 min at room temperature [31]. The cell monolayers were washed again three times with PBS. The slides were observed with a confocal microscope (Olympus FV1000IX81) at x40 magnification for claudin-1 and F-actin.

Statistical analyses

For claudin-1 dislodgment study in Ca⁺⁺-free medium, a linear mixed model was used with treatment as a fixed factor and id as a random factor to account for the lack of independence among the three samples for each subject. Tukey's post-hoc tests were used to examine the differences between pairs of treatment means.

For divalent-enriched cations experiments, data were transformed using the logarithm base 10 to normalize distributions. A linear mixed model was used with treatment and time as fixed factors and sample id as a random factor. A priori contrasts were performed to compare pairs of means adjusting the alpha level for each comparison using the Bonferroni sequential procedure to maintain the experimentwise error rate at the nominal value. Statistical analyses were carried out with SAS v.9.3 (Cary, N.C.) and the level of statistical significance was set at 5% throughout.

Results

STb affects the distribution of claudin-1

Since STb toxin was previously shown to increase paracellular permeability [31], we wanted to address whether translocation of TJ proteins was involved in this process. We thus analyzed the time-dependent distribution of claudin-1, a protein with a major role in sealing TJs, between Nonidet P-40-soluble and -insoluble fractions (Fig. 1).

Purified STb toxin (4 nmoles) was added to the apical side of T84 cell monolayers, and incubated for 6, 12 or 24h. Cell proteins were then extracted with a buffer containing Nonidet P-40 to determine the amount of membrane-associated claudin-1 (NP-40-insoluble) and cytoplasmically located (NP-40-soluble). Extracted proteins were separated on a 12% acrylamide SDS-PAGE and western blotted using an anti-claudin-1 antibody. The relative intensity of claudin-1 protein bands was measured and compared to the intensity of GAPDH, our internal control. The negative control consisted of untreated cell monolayer.

In STb treated cells, we observed, after 24, a marked increase in the level of NP-40-soluble claudin-1 and a decrease in NP-40-insoluble claudin-1 (Fig. 1). Densitometric analyses revealed a 40% increase in NP-40-soluble claudin-1 level and a comparable decrease in the NP-40-

insoluble level. There were no significant differences in claudin-1 amount between untreated cell monolayers and cell monolayers treated with STb for 6h or 12h. After 24h, the difference in the distribution of claudin-1 was statistically significant compared to the control.

Also, following a 24h treatment with STb, T84 cell monolayers were fixed, permeabilized, and stained to highlight the F-actin and claudin-1 organization. Using confocal microscopy, untreated T84 cell monolayers showed well-organized F-actin filaments surrounding the cells and as stress fibers and claudin-1 proteins surrounding cell boundaries while STb-treated cell monolayers exhibited a loss of organization and focal grouping of claudin-1 with condensation of F-actin filaments (Fig. 2).

Effect of Ca^{++} on the rate of claudin-1 redistribution

Calcium plays a critical role in the regulation of several cellular processes. As Ca^{++} was previously related to STb toxicity [10] and a calcium enrichment experiment conducted by Sakakibara et al. (1997) revealed that TJ formation was accompanied by an increase in NP-40-insoluble TJ proteins levels including claudin-1 [32], this divalent metal ion was investigated in relation to its possible involvement in claudin-1 distribution.

We thus examined the relation between calcium, STb toxin and NP-40-insoluble claudin-1 level. First, in calcium-free medium in absence of STb, claudin-1 was approximately equally distributed between the NP-40-soluble and -insoluble fractions (Fig. 3A and B; gray bar). However, after calcium enrichment (1.8 mM CaCl_2), the bulk of claudin-1 was found in the NP-40-insoluble fraction (Fig. 3B; black bar). Incubation of T84 cells in calcium-enriched medium in presence of STb resulted in a significant dislodgement of claudin-1 observed as an increase in NP-40-soluble claudin-1 (Fig. 3A and B; white bar). For STb-treated cells, in Ca^{++} -enriched medium, changes in the distribution of claudin-1 were apparent after 6h and were similar after 12 and 24h (Fig. 3; white bar). Overall, compared to GAPDH, the amount of claudin-1 was similar under the various conditions tested. Only the distribution between membrane and cytoplasmic locations was affected.

To examine how STb in presence of calcium influenced cell morphology, confluent T84 cell monolayers were incubated for 6h and 24h. Confocal microscopy analyses indicated that after 6

and 24h, calcium-enrichment alone had no effect on actin filament organization. Cells grown in calcium-free and calcium-enriched media showed well-organized F-actin filaments circling each cell as well as stress fibers (Fig. 4; calcium-free and calcium-enriched). However, after 6h in calcium-enriched medium, STb-treated cell monolayers exhibited disruption of actin filaments surrounding the cells and stress fibers with condensation of F-actin filaments (Fig. 4; calcium-enriched/STb). In calcium-free medium, actin condensation was not observed before 24h in presence of STb toxin (Data not shown).

Effect of Mg^{++} and Zn^{++} enrichment

To assess the specificity of Ca^{++} on the rate of claudin-1 dislodgment and actin condensation, two divalent metal ions, Mg^{++} and Zn^{++} were compared to Ca^{++} . As seen in Figure 5 and 6, the rate in redistribution of NP-40-soluble and -insoluble claudin-1 levels were shown to be Ca^{++} specific as neither Mg^{++} nor Zn^{++} could increase the rate of claudin-1 dislodgement. Nevertheless, changes in claudin-1 location and actin condensation in Mg^{++} - and Zn^{++} -enriched media were observed as described before in calcium-free medium after 24 h (Fig. 7 and 8).

Phosphorylation state of claudin-1

The phosphorylation state of claudin-1 in NP-40-insoluble (membrane location) and -soluble fraction (cytoplasmic location) was studied. For comparison purposes, claudin-1 levels were adjusted, in the various fractions, to the same level as can be observed with anti-claudin 1 (Fig. 9). In untreated T84 cells, threonine phosphorylation was observed in the NP-40-insoluble fraction using anti-phosphothreonine antibodies (Fig. 9B, left panel), while nonphosphorylated threonine was found in the NP-40-soluble fraction (Fig. 9A, left panel). Moreover, the level of phosphothreonine in claudin-1 was reduced in the NP-40-insoluble fraction after 24h of exposure to STb toxin (Fig. 9B, right panel). Thus, STb toxin induces the dislodgment of claudin-1 from membrane to cytoplasmic location and this change correlated with the observation of non-phosphorylated claudin-1. The same results were observed using an anti-serine antibody (Data not shown).

Discussion

A number of factors can be responsible for epithelial barrier dysfunction, including microbial infection. Enteric pathogens have developed strategies that induce the production of diarrhea in

infected hosts, through disruption of intercellular TJs [45,46]. Many studies have indicated that toxins can modulate the epithelial barrier by targeting junctional as well as cytoskeletal cell components and thus for some pathogens the changes facilitates invasion across the mucosal surface [47]. In this study, we investigated effects of STb toxin on claudin-1 location and phosphorylation levels in cultured T84 epithelial cells.

LT and STa toxin were recently shown to cause an increase in the epithelial cell permeability observed as a trans-epithelial resistance (TER) decrease and passage of dextran-FITC by disrupting TJs of T84 cells [30]. We thus compared the cellular NP-40 detergent partitioning and the state of phosphorylation of claudin-1 in epithelial T84 cell line following STb treatment. This cell line display distinct barrier characteristics (i.e., T84 cells form a very tight monolayer with high TER and low permeability to uncharged molecules) [31,33].

We first assessed claudin-1 location in T84 cells by immunostaining and confocal imaging. Claudin-1 and occludin has been demonstrated before to be apically located sealing the TJs [31,33]. It has also been suggested that claudin-1 contribute to cell adhesion [48]. In our study, claudin-1 was recovered in both the NP-40-soluble and-insoluble fractions of the cell extracts (Fig. 2 a, b). Since the TJ strands are assumed to be resistant to detergent extraction [49], these findings indicates the existence of claudin-1 both as a junctional complex and as a soluble pool of proteins. The distribution of claudin-1 in two distinct subcellular pools had been reported earlier [50].

Mechanisms underlying the perturbation of the epithelial barrier are numerous. Some compounds directly interact with single TJ proteins [51], whereas others disturb barrier function by a general modification of TJ strands [52]. Reorganization of the actin ring also results in loss of tight junction integrity [53]. STb was previously found to affect the actin ring of T84 cells [31]. The authors also reported shortening of the actin filaments and appearance of actin condensation after treatment with STb toxin. This is consistent with our results (Fig.2) where shortening of the filaments was observed. The lack of reorganization of the actin ring suggests that STb does affect TJs via a change in actin architecture. The relevance of the changes in actin filaments with regard to TJs integrity remains to be established.

The effect of STb on TJ proteins was examined in an attempt to clarify the mechanisms that

underlies the observed changes. The loss of claudin-1 from membranes in STb-treated T84 cell monolayers indicates a loss of TJ integrity and therefore changes in barrier properties. Western blotting of T84 cell fractions provided further evidence for a change in subcellular location of the TJ protein claudin-1. The claudin-1 content of the membrane fraction decreased with STb treatment in a time-dependent manner (Fig. 1) while the claudin-1 content of the NP-40-soluble fraction increased with time, indicating that claudin-1 translocate from the membrane to the cytosol in response to treatment with STb. This shift of claudin-1 into the soluble fraction had been observed in Caco-2 cells following ATP depletion (15, 21).

The observed effect of STb on claudin-1 delocalization is likely contributing to the pathogenesis of ETEC by allowing the passage of electrolytes and water through the paracellular space. Dreyfus et al. (1993) examined the effect of STb on the internal Ca^{++} concentration of transformed and primary cells of different tissues and animal species. They suggested that STb opens a GTP-binding regulatory protein-linked receptor-operated Ca^{++} channel in the plasma membrane. Beyond these studies, nothing is known of the relation between STb, Ca^{++} and TJ proteins. Our results suggest that STb induces a rapid time-dependent toxicity by translocation of claudin-1 from membrane to a more soluble form.

The increased calcium levels are also thought to regulate phospholipases (A2 and C) that release arachidonic acid from membrane phospholipids, leading to the formation of intestinal secretagogues PGE_2 and 5-HT, which mediate water and electrolyte transport out of intestinal cells [54]. In our study, the important role of calcium was confirmed where by adding the calcium to the culture medium STb increased the rate of disruption of the barrier integrity. Others divalent cations had no significant effect on STb toxicity.

It has been proposed that claudins can be regulated by PKC-mediated phosphorylation, modulating barrier function in the cells [33]. Thus, in Caco-2 cells, inactivation of PKC- Φ reduced phosphorylation of claudin-1 and decreased the membrane to cytosolic distribution of the claudin-1 [55]. In ovarian cancer cells, phorbol ester-mediated PKC activation induced phosphorylation of claudins and decreased barrier function [56], and in human epidermal keratinocytes, formation of TJs was suggested to be regulated by a PKC-induced phosphorylation of claudin-4 [57]. A previous study had shown binding of STb to its receptor is associated with

the uptake of Ca^{++} into the cell, activating PKC, which through phosphorylation activates CFTR [58]. Based on the fact that STb activates PKC and that STb opens a GTP-binding regulatory protein-linked receptor-operated Ca^{++} channel in the plasma membrane [10], we can hypothesize that PKC signalling pathway may be involved in TJs dysfunction as well as cytoskeletal changes. In T84 untreated cells, phosphorylated claudins-1 was found only in NP-40 insoluble fraction, whereas in NP-40 soluble fraction, claudin-1 was not phosphorylated. Since STb induces a major decrease in the apical distribution of claudin-1 and a reduction in the barrier function [31], a change in the phosphorylation state might be the mechanism by which STb indirectly acts.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Distribution of claudin-1 in Nonidet P-40-soluble and -insoluble fractions in T84 cell monolayers in response to STb toxin. (A) NP-40-soluble and (B) NP-40-insoluble fractions. Black: untreated cells, white: cells treated with STb for various times. Lower panel: Immunoblot showing claudin-1 and GAPDH used to evaluate their relative amounts. Proteins were separated on a 12% acrylamide SDS-PAGE and immunoblotted with appropriate antibodies. After 24h, STb treatment induced a loss of claudin-1 in the NP-40-insoluble fraction (membrane location). At the same time, a comparable increase of claudin-1 was observed in the NP-40-soluble fraction (cytoplasm location) (n=3). However, no differences were observed between STb-treated and -untreated cell monolayers after 6 or 12h treatment. CLDN-1: claudin-1; GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

Figure 2. Effect of STb on claudin-1 and F-actin arrangement. After 24h treatment with STb, T84 cells were fixed, permeabilized, and incubated with anti-claudin-1 antibody. Secondary antibody coupled to Alexa 488 was then added. F-actin was stained using FITC-phalloidin. Untreated cell monolayers stained for claudin-1 showed continuous bands around each cell whereas STb toxin provoked a loss of the “chicken wire” pattern with focal grouping. In untreated cell monolayers, regularly arranged actin filaments around cell contour and as stress fibers were observed. In STb-treated cells, condensation of the F-actin was observed. Three independent experiments were conducted, and representative images are shown. Bar, 30 μ m.

Figure 3. Distribution of claudin-1 in NP-40-soluble and -insoluble fractions in T84 cell monolayers in response to STb toxin after Ca^{++} enrichment. (A) NP-40-soluble and (B) NP-40-insoluble fractions. Gray: calcium-free medium, black: calcium-enriched medium, white: calcium-enriched medium treated with STb. Lower panel: Immunoblot showing claudin-1 and GAPDH used to evaluate their relative amounts. T84 cells were grown in calcium-enriched medium (1.8 mM) for 24h and treated with STb toxin for 6, 12 or 24h. Cells were extracted with Nonidet P-40 buffer. In Ca^{++} -enriched medium, the amount of NP-40-insoluble claudin-1 was increased compared to calcium-free condition. Addition of STb toxin provokes dislodgment of NP-40-insoluble claudin-1 to the soluble fraction (n=3). CLDN-1: claudin-1; GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

Figure 4. Effect of Ca^{++} -enrichment on the rate of STb toxin activity. Cells grown in calcium-free and calcium-enriched (1.8 mM) media were compared after 6 and 24h. Confocal microscopy was used to analyze the distribution of actin filaments stained with FITC-phalloidin. Calcium-enriched medium had no visible effect on the actin organization whereas in calcium-enriched medium STb provoked actin condensation after 6h. In calcium-free medium, actin condensation was observed only after 24h (Data not shown) Bar, 30 μm .

Figure 5. Effect of Mg^{++} -enrichment on claudin-1 displacement rate. (A) NP-40-soluble and (B) NP-40-insoluble fractions. Gray: calcium-free medium, black: Mg^{++} -enriched medium, white: Mg^{++} -enriched medium treated with STb for 6, 12 and 24h. Lower panel: Immunoblot showing claudin-1 and GAPDH used to evaluate their relative amounts. NP-40 cell extracted proteins were separated on a 12% acrylamide SDS-PAGE and immunoblotted with anti-claudin-1 and anti-GAPDH antibodies. The calcium-free medium was Mg^{++} -enriched (1.8 mM). There was no significant difference in claudin-1 dislodgement rate under Mg^{++} -enriched condition compared to calcium-free medium. After 24h, claudin-1 dislodgement was observed as seen before in calcium-free medium (n=3). CLDN-1: claudin-1, GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

Figure 6. Effect of Zn^{++} -enrichment on claudin-1 displacement rate. (A) NP-40-soluble and (B) NP-40-insoluble fractions. Gray: calcium-free medium, black: Zn^{++} -enriched medium, white: Zn^{++} -enriched medium treated with STb for 6, 12 and 24h. Lower panel: Immunoblot showing claudin-1 and GAPDH used to evaluate their relative amounts. NP-40 cell extracted proteins were separated on a 12% acrylamide SDS-PAGE and immunoblotted with anti-claudin-1 and anti-GAPDH antibodies. The calcium-free medium was Zn^{++} -enriched (1.8 mM). There was no significant difference in claudin-1 dislodgement rate under Zn^{++} -enriched condition compared to calcium-free medium. After 24h, claudin-1 dislodgement was observed as seen before in calcium-free medium (n=3). CLDN-1: claudin-1, GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

Figure 7. Effect of Mg^{++} -enrichment on the rate of STb toxin activity. Cells grown in calcium-free and magnesium-enriched (1.8 mM) media were compared after 6 and 24h. Confocal microscopy was used to analyze the distribution of actin filaments stained with FITC-phalloidin. Magnesium-enriched medium had no visible effect on the actin organization whereas in calcium-

enriched medium STb provoked actin condensation after 24h. In calcium-free medium, actin condensation was observed only after 24h (Data not shown) Bar, 30 μm

Figure 8. Effect of Zn^{++} -enrichment on the rate of STb toxin activity. Cells grown in calcium-free and zinc-enriched (1.8 mM) media were compared after 6 and 24h. Confocal microscopy was used to analyze the distribution of actin filaments stained with FITC-phalloidin. Zinc-enriched medium had no visible effect on the actin organization whereas in zinc-enriched medium STb provoked actin condensation after 24h. In calcium-free medium, actin condensation was observed only after 24h (Data not shown) Bar, 30 μm

Figure 9. Phosphorylation state of claudin-1 as found in the membrane and cytoplasmic locations. (A) NP-40-soluble and (B) NP-40-insoluble fractions of STb-treated T84 cells. Left panel: untreated, right panel: STb-treated. Cell proteins extracted with NP-40 were migrated on a 12% acrylamide SDS-PAGE and immunoblotted with anti-phosphothreonine (Anti-P-thr). The amount of claudin-1 was adjusted to the same level in the various fractions using the anti-claudin-1 antibodies (anti-CLDN-1). The claudin-1 in NP-40-insoluble fraction is phosphorylated whereas in the NP-40-soluble fraction it is not phosphorylated. The amount of phosphorylated claudin-1 in the NP-40-insoluble was decreased in STb treated cells compared to control.

FIGURES

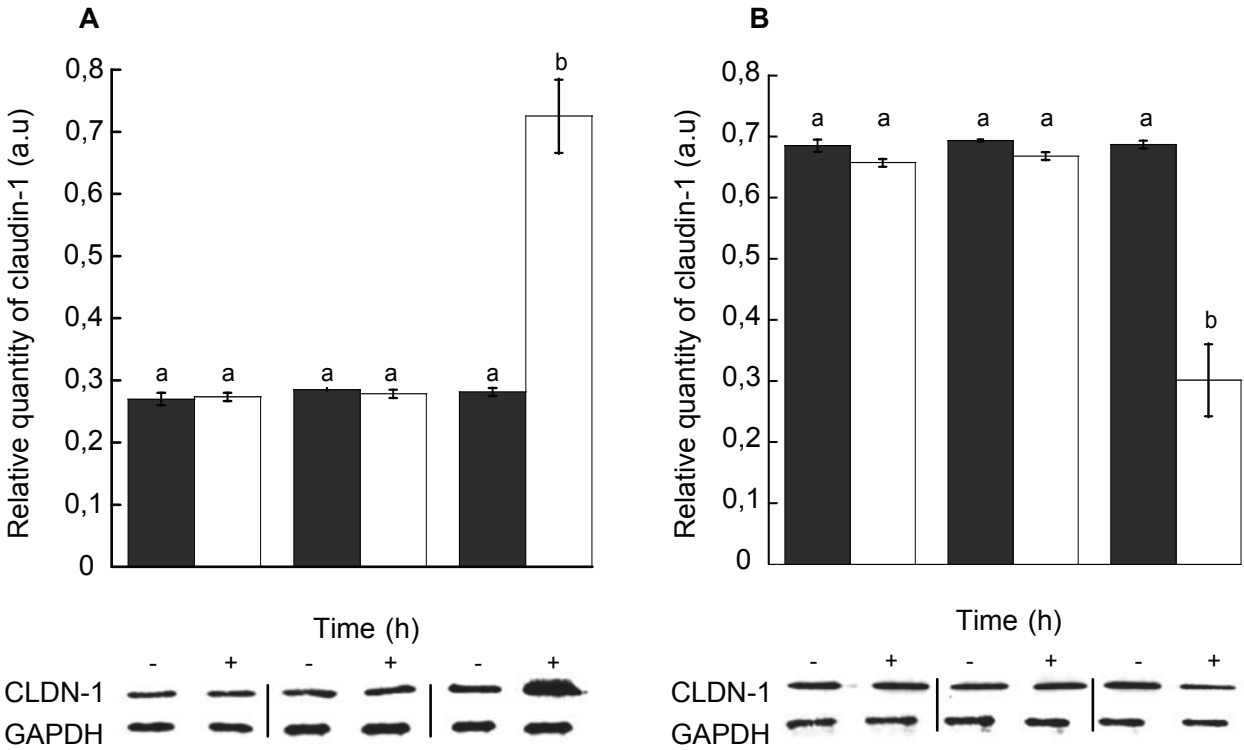


Figure 1

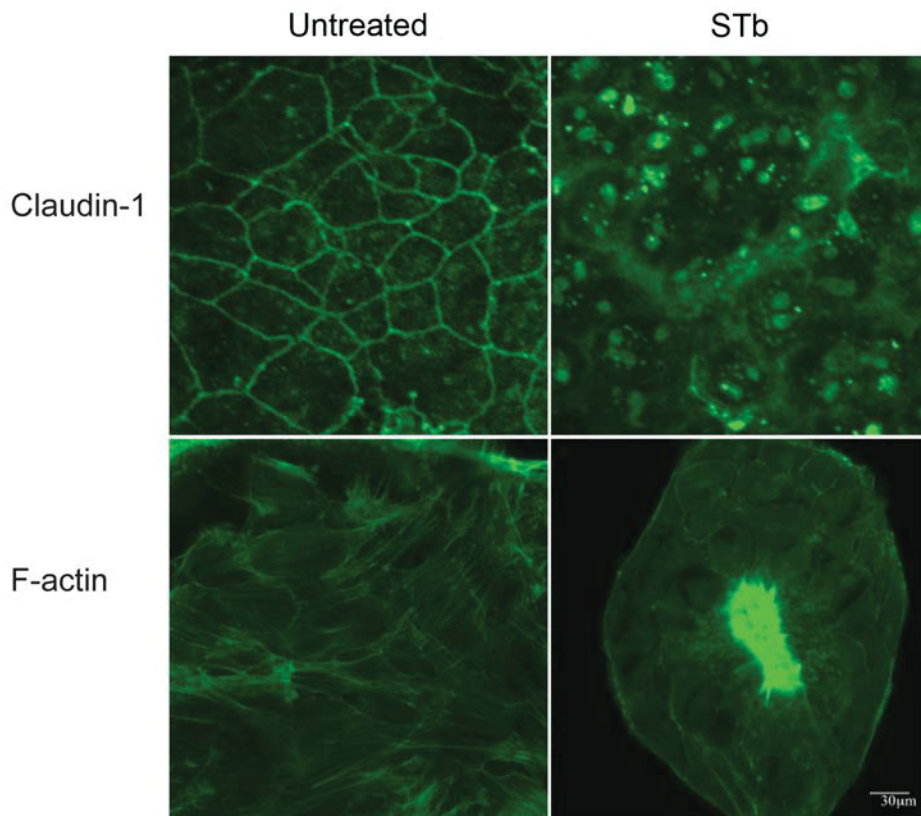


Figure 2

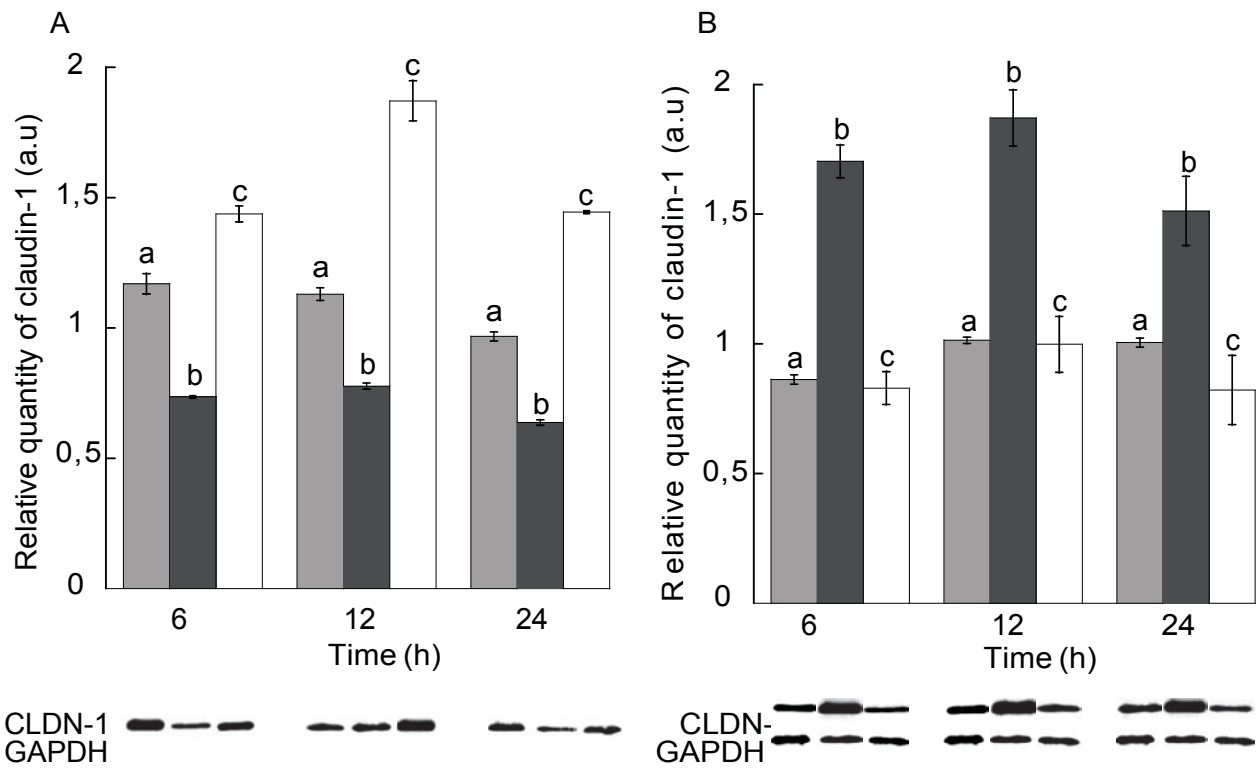


Figure 3

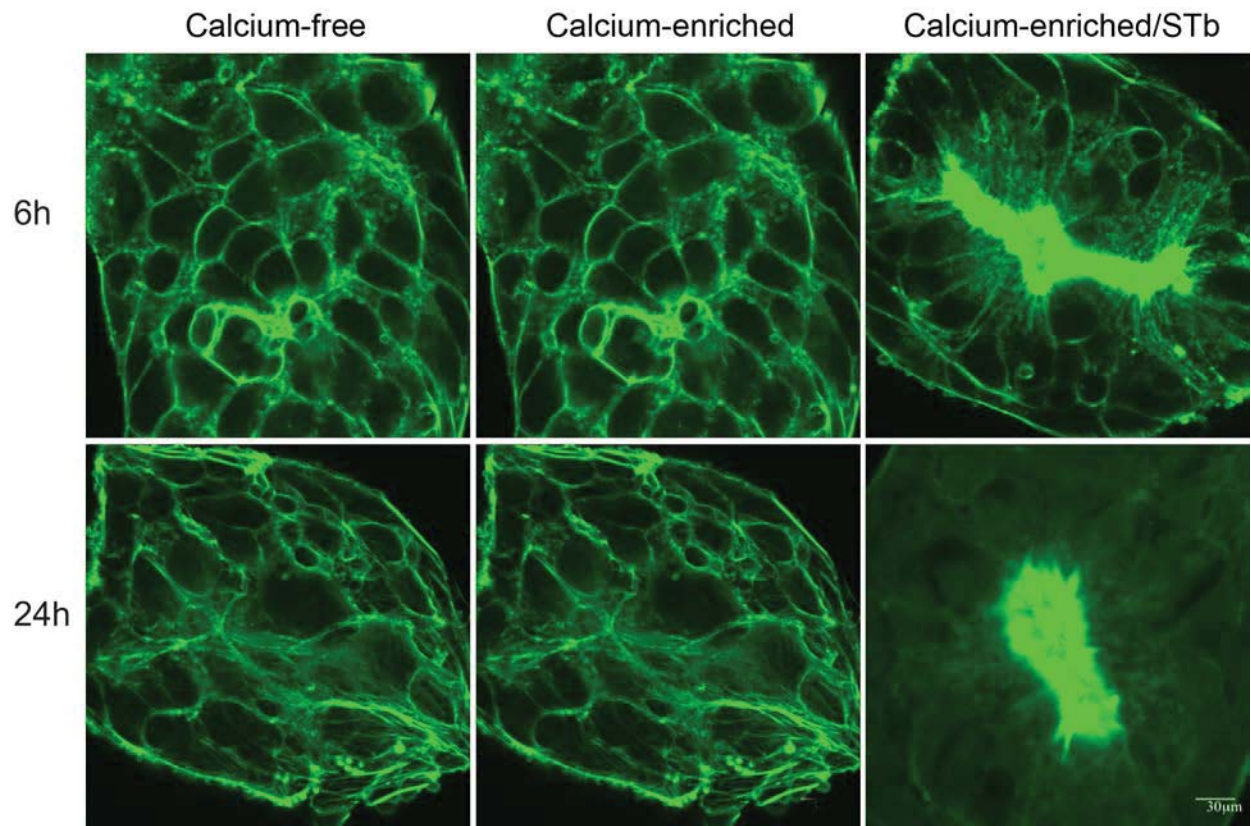


Figure 4

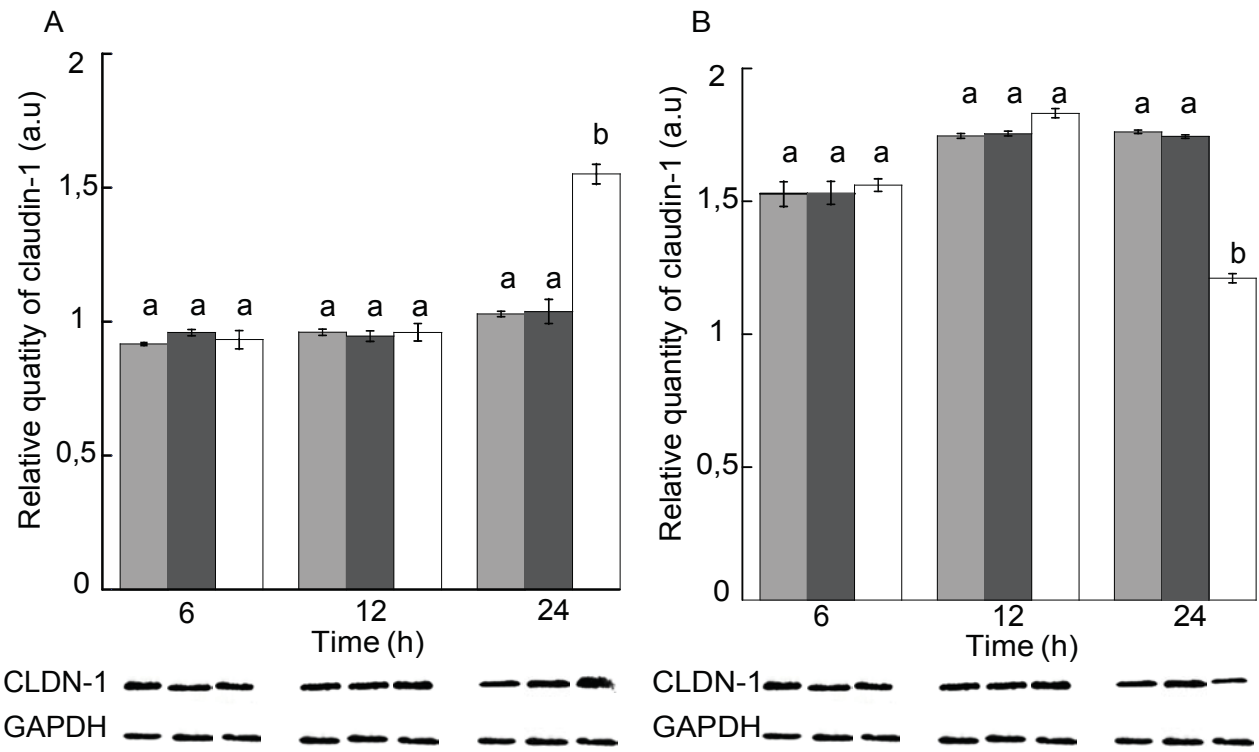


Figure 5

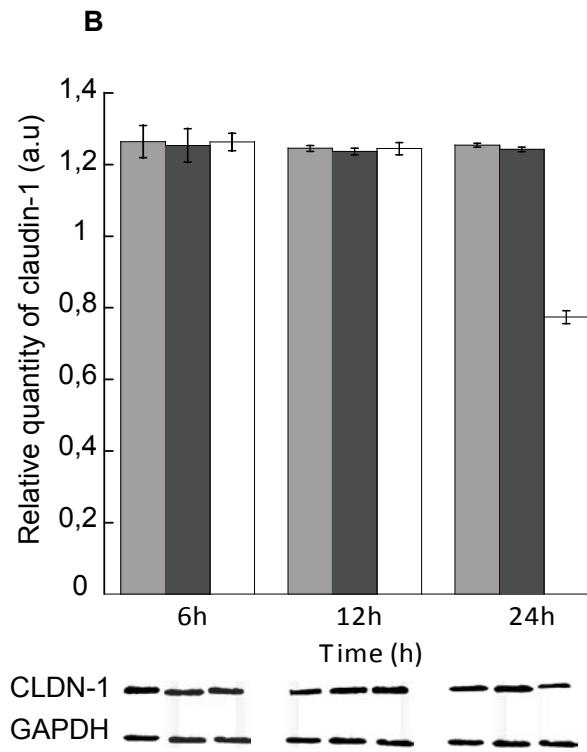
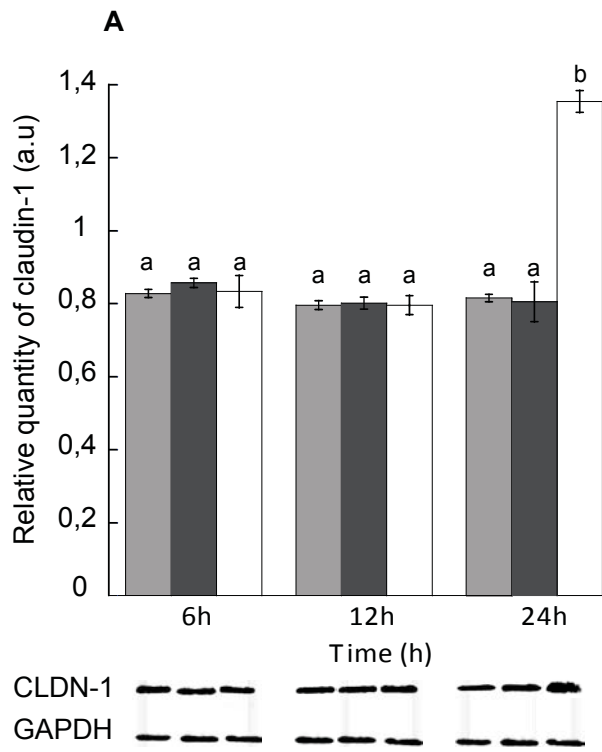


Figure 6

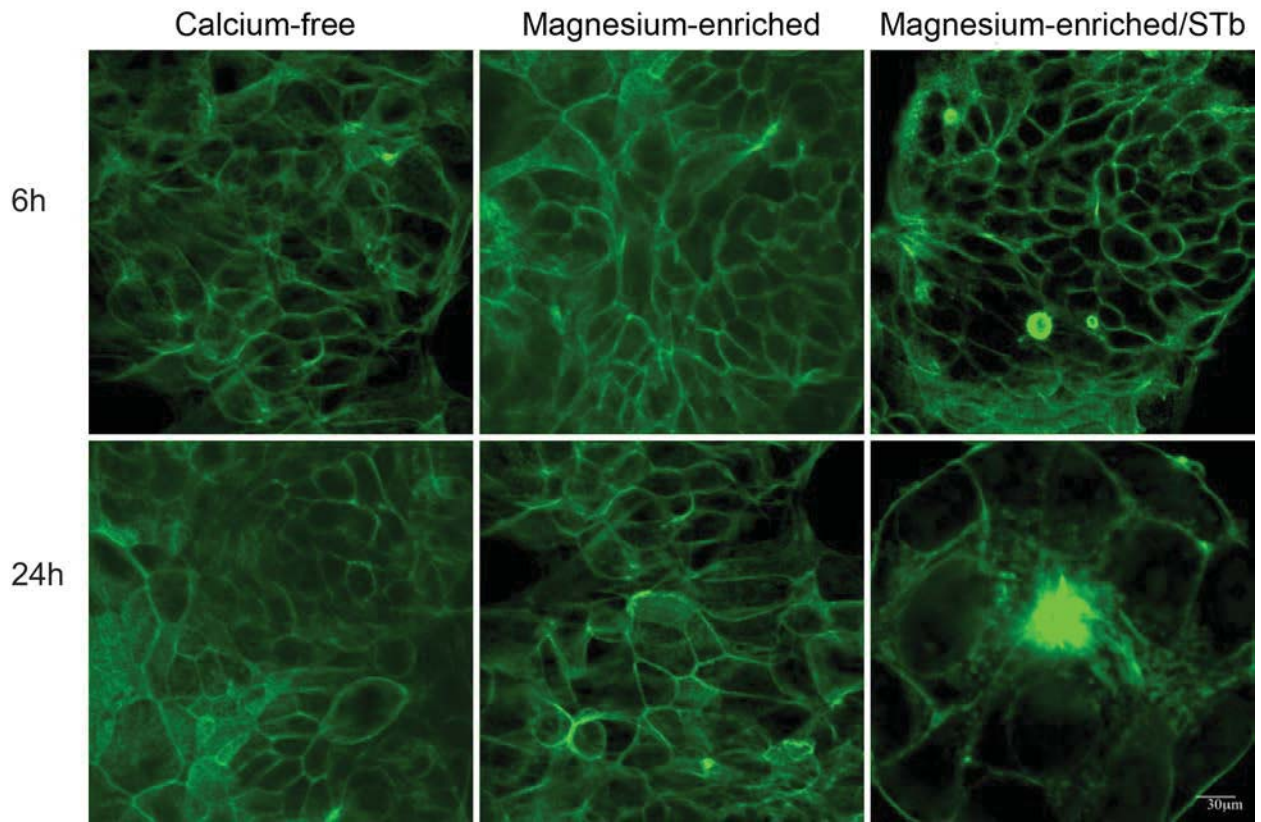


Figure 7

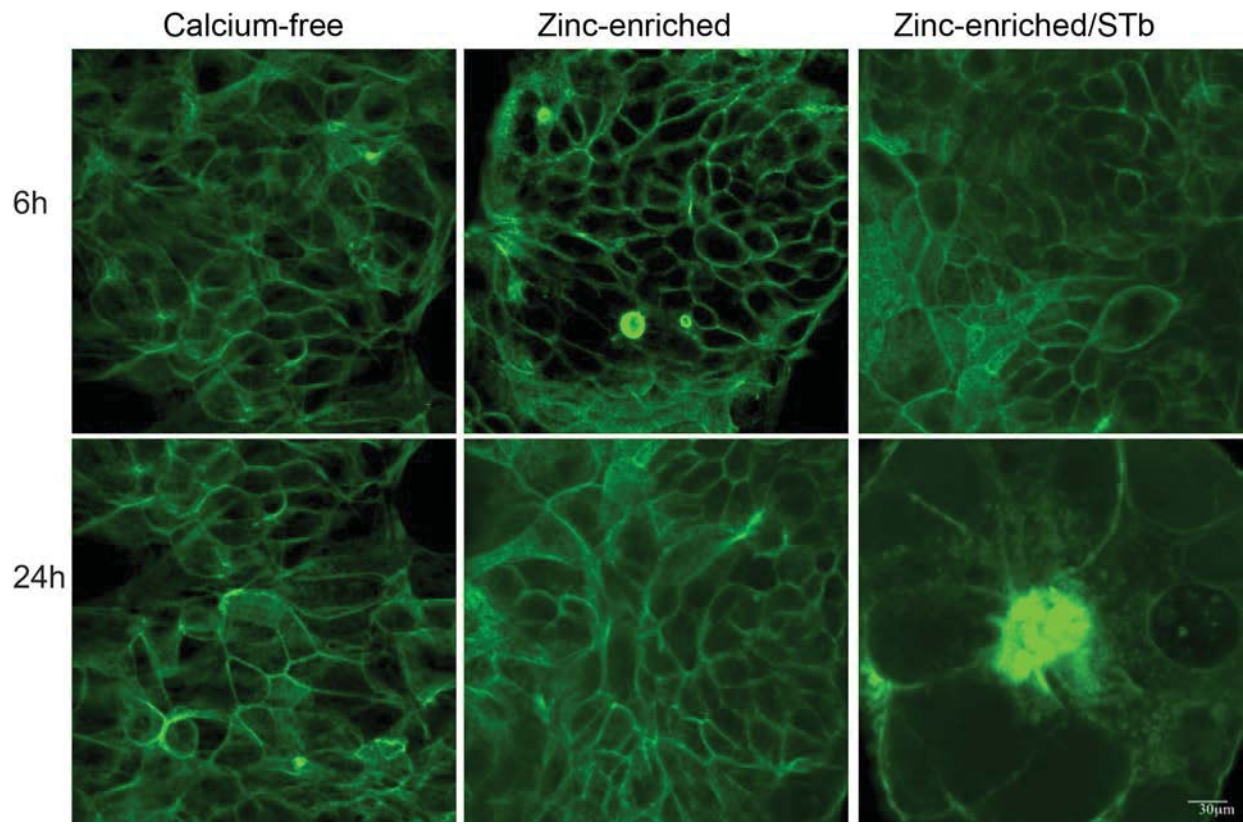


Figure 8

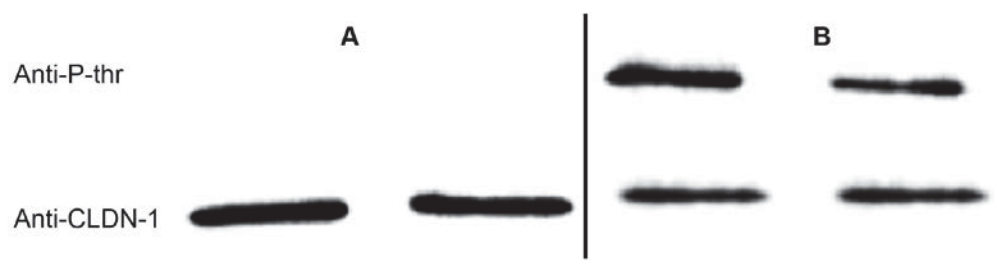


Figure 9

REFERENCES

1. Nagy B, Fekete PZ (2005) Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol* 295: 443---454.
2. Fleckenstein JM, Hardwidge PR, Munson GP, Rasko DA, Sommerfelt H, et al. (2010) Molecular mechanisms of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *Microbes Infect* 12: 89---98.
3. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2: 123---140.
4. Nataro JP, Kaper JB (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11: 142---201.
5. Paiva de Sousa C, Dubreuil JD (2001) Distribution and expression of the astA gene (EAST1 toxin) in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Int J Med Microbiol* 291: 15---20.
6. Savarino SJ, McVeigh A, Watson J, Cravioto A, Molina J, et al. (1996) Enteraggregative *Escherichia coli* heat---stable enterotoxin is not restricted to enteraggregative *E. coli*. *J Infect Dis* 173: 1019---1022.
7. Dubreuil JD (2008) *Escherichia coli* STb toxin and colibacillosis: knowing is half the battle. *FEMS Microbiol Lett* 278: 137---145.
8. Fairbrother JM, Nadeau E, Gyles CL (2005) *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim Health Res Rev* 6: 17---39.
9. Rousset E, Harel J, Dubreuil JD (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.
10. Dreyfus LA, Harville B, Howard DE, Shaban R, Beatty DM, et al. (1993) Calcium influx mediated by the *Escherichia coli* heat---stable enterotoxin B (STB). *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 3202---3206.
11. Harville BA, Dreyfus LA (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.

12. Harville BA, Dreyfus LA (1996) Release of serotonin from RBL-2H3 cells by the *Escherichia coli* peptide toxin STb. *Peptides* 17: 363-366.
13. Berberov EM, Zhou Y, Francis DH, Scott MA, Kachman SD, et al. (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.
14. Zhang W, Berberov EM, Freeling J, He D, Moxley RA, et al. (2006) Significance of heat-stable and heat-labile enterotoxins in porcine colibacillosis in an additive model for pathogenicity studies. *Infect Immun* 74: 3107-3114.
15. Erume J, Berberov EM, Kachman SD, Scott MA, Zhou Y, et al. (2008) Comparison of the contributions of heat-labile enterotoxin and heat-stable enterotoxin b to the virulence of enterotoxigenic *Escherichia coli* in F4ac receptor-positive young pigs. *Infect Immun* 76: 3141-3149.
16. Loos M, Geens M, Schauvliege S, Gasthuys F, van der Meulen J, et al. (2012) Role of heat-stable enterotoxins in the induction of early immune responses in piglets after infection with enterotoxigenic *Escherichia coli*. *PLoS One* 7: e41041.
17. Berkes J, Viswanathan VK, Savkovic SD, Hecht G (2003) Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. *Gut* 52: 439-451.
18. Puthenedam M, Williams PH, Lakshmi BS, Balakrishnan A (2007) Modulation of tight junction barrier function by outer membrane proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*: role of F-actin and junctional adhesion molecule-1. *Cell Biol Int* 31: 836-844.
19. Balkovetz DF, Katz J (2003) Bacterial invasion by a paracellular route: divide and conquer. *Microbes Infect* 5: 613-619.
20. Roselli M, Finamore A, Britti MS, Konstantinov SR, Smidt H, et al. (2007) The novel porcine *Lactobacillus sobrius* strain protects intestinal cells from enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 infection and prevents membrane barrier damage. *J Nutr* 137: 2709-2716.
21. Anderson JM, Balda MS, Fanning AS (1993) The structure and regulation of tight junctions. *Curr Opin Cell Biol* 5: 772-778.

22. Philpott DJ, McKay DM, Sherman PM, Perdue MH (1996) Infection of T84 cells with enteropathogenic *Escherichia coli* alters barrier and transport functions. *Am J Physiol* 270: G634---645.
23. Roxas JL, Koutsouris A, Bellmeyer A, Tesfay S, Royan S, et al. (2010) Enterohemorrhagic *E. coli* alters murine intestinal epithelial tight junction protein expression and barrier function in a Shiga toxin independent manner. *Lab Invest* 90: 1152---1168.
24. Philpott DJ, McKay DM, Mak W, Perdue MH, Sherman PM (1998) Signal transduction pathways involved in enterohemorrhagic *Escherichia coli*---induced alterations in T84 epithelial permeability. *Infect Immun* 66: 1680---1687.
25. Nusrat A, von Eichel---Streiber C, Turner JR, Verkade P, Madara JL, et al. (2001) *Clostridium difficile* toxins disrupt epithelial barrier function by altering membrane microdomain localization of tight junction proteins. *Infect Immun* 69: 1329---1336.
26. Schmidt E, Kelly SM, van der Walle CF (2007) Tight junction modulation and biochemical characterisation of the zonula occludens toxin C---and N---termini. *FEBS Lett* 581: 2974---2980.
27. Guignot J, Chaplais C, Coconnier---Polter MH, Servin AL (2007) The secreted autotransporter toxin, Sat, functions as a virulence factor in Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* by promoting lesions in tight junction of polarized epithelial cells. *Cell Microbiol* 9: 204---221.
28. Suzuki T (2013) Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol Life Sci* 70: 631---659.
29. Kreisberg RB, Harper J, Strauman MC, Marohn M, Clements JD, et al. (2011) Induction of increased permeability of polarized enterocyte monolayers by enterotoxigenic *Escherichia coli* heat---labile enterotoxin. *Am J Trop Med Hyg* 84: 451---455.
30. Nakashima R, Kamata Y, Nishikawa Y (2013) Effects of *Escherichia coli* heat---stable enterotoxin and guanylin on the barrier integrity of intestinal epithelial T84 cells. *Vet Immunol Immunopathol* 152: 78---81.
31. Ngendahayo Mukiza C, Dubreuil JD (2013) *Escherichia coli* heat---stable toxin b impairs intestinal epithelial barrier function by altering tight junction proteins. *Infect Immun* 81: 2819---2827.

32. Sakakibara A, Furuse M, Saitou M, Ando---Akatsuka Y, Tsukita S (1997) Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J Cell Biol* 137: 1393---1401.
33. Sjo A, Magnusson KE, Peterson KH (2003) Distinct effects of protein kinase C on the barrier function at different developmental stages. *Biosci Rep* 23: 87---102.
34. Fujibe M, Chiba H, Kojima T, Soma T, Wada T, et al. (2004) Thr203 of claudin---1, a putative phosphorylation site for MAP kinase, is required to promote the barrier function of tight junctions. *Exp Cell Res* 295: 36---47.
35. Suzuki H, Kondoh M, Takahashi A, Yagi K (2012) Proof of concept for claudin---targeted drug development. *Ann NY Acad Sci* 1258: 65---70.
36. Andreeva AY, Krause E, Muller EC, Blasig IE, Utepbergenov DI (2001) Protein kinase C regulates the phosphorylation and cellular localization of occludin. *J Biol Chem* 276: 38480---38486.
37. Syed HC, Dubreuil JD (2012) *Escherichia coli* STb toxin induces apoptosis in intestinal epithelial cell lines. *Microb Pathog* 53: 147---153.
38. Labrie V, Beausoleil HE, Harel J, Dubreuil JD (2001) Binding to sulfatide and enterotoxicity of various *Escherichia coli* STb mutants. *Microbiology* 147: 3141---3148.
39. Toriano R, Kierbel A, Ramirez MA, Malnic G, Parisi M (2001) Spontaneous water secretion in T84 cells: effects of STa enterotoxin, bumetanide, VIP, forskolin, and A---23187. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281: G816---822.
40. Visweswariah SS, Shanthi G, Balganesht TS (1992) Interaction of heat---stable enterotoxins with human colonic (T84) cells: modulation of the activation of guanylylcyclase. *Microb Pathog* 12: 209---218.
41. Chao KL, Dreyfus LA (1997) Interaction of *Escherichia coli* heat---stable enterotoxin B with cultured human intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 65: 3209---3217.
42. Strauman MC, Harper JM, Harrington SM, Boll EJ, Nataro JP (2010) Enterotoxigenic *Escherichia coli* disrupts epithelial cell tight junctions. *Infect Immun* 78: 4958---4964.
43. Ricardo R, Phelan K (2008) Counting and determining the viability of cultured cells. *J Vis Exp*.

44. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680---685.
45. Viswanathan VK, Koutsouris A, Lukic S, Pilkinton M, Simonovic I, et al. (2004) Comparative analysis of EspF from enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* in alteration of epithelial barrier function. *Infect Immun* 72: 3218---3227.
46. Simonovic I, Arpin M, Koutsouris A, Falk---Krziesinski HJ, Hecht G (2001) Enteropathogenic *Escherichia coli* activates ezrin, which participates in disruption of tight junction barrier function. *Infect Immun* 69: 5679---5688.
47. Soong G, Parker D, Magargee M, Prince AS (2008) The type III toxins of *Pseudomonas aeruginosa* disrupt epithelial barrier function. *J Bacteriol* 190: 2814---2821.
48. Kuhn S, Koch M, Nubel T, Ladwein M, Antolovic D, et al. (2007) A complex of EpCAM, claudin---7, CD44 variant isoforms, and tetraspanins promotes colorectal cancer progression. *Mol Cancer Res* 5: 553---567.
49. Stevenson BR, Anderson JM, Bullivant S (1988) The epithelial tight junction: structure, function and preliminary biochemical characterization. *Mol Cell Biochem* 83: 129---145.
50. de Oliveira SS, de Oliveira IM, De Souza W, Morgado---Diaz JA (2005) Claudins upregulation in human colorectal cancer. *FEBS Lett* 579: 6179---6185.
51. Fujita K, Katahira J, Horiguchi Y, Sonoda N, Furuse M, et al. (2000) *Clostridium perfringens* enterotoxin binds to the second extracellular loop of claudin---3, a tight junction integral membrane protein. *FEBS Lett* 476: 258---261.
52. Krug SM, Fromm M, Gunzel D (2009) Two---path impedance spectroscopy for measuring paracellular and transcellular epithelial resistance. *Biophys J* 97: 2202---2211.
53. Walsh SV, Hopkins AM, Chen J, Narumiya S, Parkos CA, et al. (2001) Rho kinase regulates tight junction function and is necessary for tight junction assembly in polarized intestinal epithelia. *Gastroenterology* 121: 566---579.
54. Arriaga YL, Harville BA, Dreyfus LA (1995) Contribution of individual disulfide bonds to biological action of *Escherichia coli* heat---stable enterotoxin B. *Infect Immun* 63: 4715---4720.

55. Banan A, Zhang LJ, Shaikh M, Fields JZ, Choudhary S, et al. (2005) theta Isoform of protein kinase C alters barrier function in intestinal epithelium through modulation of distinct claudin isotypes: a novel mechanism for regulation of permeability. *J Pharmacol Exp Ther* 313: 962---982.
56. D'Souza T, Indig FE, Morin PJ (2007) Phosphorylation of claudin---4 by PKCepsilon regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells. *Exp Cell Res* 313: 3364---3375.
57. Aono S, Hirai Y (2008) Phosphorylation of claudin---4 is required for tight junction formation in a human keratinocyte cell line. *Exp Cell Res* 314: 3326---3339.
58. Turner SM, Scott---Tucker A, Cooper LM, Henderson IR (2006) Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 263: 10---20.

DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

Les jonctions serrées sont des jonctions intercellulaires situées du côté apical. Malgré leur apparence, ces protéines transmembranaires couvrent l'espace intercellulaire, diminuent la zone paracellulaire et sont essentielles pour leur fonction. Souvent, de très petites ouvertures existent au niveau extracellulaire dans ces sites, qui permettent le passage des molécules de taille nanométrique (Nitta et al., 2003), mais l'étanchéité peut être beaucoup plus serrée, même pour limiter les molécules d'eau (Furuse et al., 2002). Grâce à la modification de la fonction de certaines protéines des jonctions serrées, la déshydratation à travers la barrière épidermique a été observée (Furuse et al., 2002). Cette modification des jonctions serrées a également été proposée pour être impliquée dans la génération de la diarrhée par un mécanisme "leak flux" dans lesquelles l'eau et des ions pénètrent dans le lumen de l'intestin (espace ouvert) par l'intermédiaire d'un mouvement passif en réponse à une rupture de la barrière intestinale (Schmitz et al., 2000). Bien que les jonctions serrées aient également été proposées pour fonctionner dans la ségrégation des protéines apicales liées à la membrane à partir de celles au niveau basolatéral, des études récentes sur les cellules épithéliales totalement polarisées dépourvues de jonctions serrées ont clairement montré que la ségrégation des protéines est maintenue, stimulant ainsi la fonction de transmission sélective des protéines transmembranaires des jonctions serrées (Umeda et al., 2006). Ces protéines peuvent être regroupées en deux grandes catégories en fonction de leur structure. Les occludines et les claudines couvrent quatre fois la membrane et interagissent avec les cellules adjacentes par leurs boucles extracellulaires.

Toutes ces protéines transmembranaires ont la capacité d'interagir avec les membres de la guanylate kinase associée à la membrane (MAGUK) de la famille des adaptateurs cytoplasmiques. Les protéines MAGUK les plus étudiées au niveau des jonctions serrées sont les protéines *zonula occludens* (ZO-1, ZO-2 et ZO-3). ZO-1 a été la première protéine découverte exclusivement au niveau des jonctions serrées (Stevenson et al., 1986). Il peut interagir directement avec chacune des protéines transmembranaires, occludine et claudines, des jonctions serrées ainsi que le cytosquelette d'actine. ZO-1 est une phosphoprotéine de 225 kDa qui a été identifiée et appelée ZO-1 (Nougayrede et Donnerberg 2004). On croyait que ZO-1 lie les protéines de jonctions serrées au cytosquelette (Caron et al., 2006), qui ont été montrées pour

moduler les fonctions de barrière (Shen et al., 2006; Viswanathan et al., 2004). Notre étude s'est concentrée sur les protéines des jonctions serrées, les claudines-1.

Interactions Claudine-Claudine:

Après avoir identifié les claudines en tant que constituants des jonctions serrées, Furuse et al. (1998) ont démontré que l'expression de la claudine-1 dans les fibroblastes conduit à la formation de polymères linéaires continue qui ont été similaire aux fibrilles vues dans cellules épithéliales en culture et dans les tissus épithéliaux (Furuse et al., 1998b; Furuse et al., 1999; Van Itallie et al., 2001). Dans des essais biochimiques, les claudines ont été démontrées pour former des multimères. Afin de mieux définir la capacité de claudines individuelles à se polymériser, Yamazaki et al. (2011) ont exprimé plusieurs claudines différentes dans une lignée de cellules épithéliales comme les cellules S7, qui manquent la plupart des claudines et que normalement ne contiennent aucun des brins de jonctions serrées. Ces auteurs ont constaté que, dans ces cellules, les claudines, mais pas la plupart des autres claudines, pourraient se polymériser et former des brins quand elles seront exprimées de façon stable.

Dans les cellules et les tissus épithéliaux, il apparait que la plupart des jonctions serrées contiennent plus d'un type de claudines. Plusieurs études ont démontré que plusieurs claudines sont présentes dans un seul brin de jonction serrée, ce qui suggère que ces différents produits de la claudine pourra se copolymériser. Des études récentes de Piontek et al. (2011) ont commencé à cataloguer la capacité des différentes claudines pour former des hétéropolymères (Piontek et al., 2011). Ces auteurs ont mis l'accent sur ces claudines qui sont exprimées dans le système vasculaire cérébral, y compris la claudine-1. Les claudines marquées par fluorescence ont subi une transfection dans des cellules par paires et les interactions ont été détectées par la méthode (FRET- permettant d'étudier des interactions entre deux molécules). Ils ont constaté que la plupart des claudines qu'ils ont étudiées pourraient interagir entre eux.

Les claudines s'associent non seulement en cis, mais aussi à travers l'espace paracellulaire, en trans. En dépit de la conservation de séquence considérable entre les différentes claudines, les interactions entre les différentes claudines hétérotypiques en trans semblent être relativement

rare. Par exemple, les claudines -3 et -4 ont une similarité de séquence considérable dans le premier domaine extracellulaire, mais n'interagissent pas en trans. Cependant, la mutation d'un seul acide aminé dans le premier domaine extracellulaire de la claudine-3 était suffisante pour favoriser l'interaction avec la claudine-4 (Daugherty et al., 2007). De la même façon, l'analyse mutationnelle d'un seul résidu de tyrosine critique dans le deuxième domaine extracellulaire peut interdire des interactions entre les claudines-1 et -5 (Piontek et al., 2011). Dans l'ensemble, les données publiées suggèrent que les exigences de séquence pour les interactions trans à travers les cellules sont beaucoup plus strictes que les interactions cis dans les brins d'une seule bicouche.

Bien que les études *in vitro* suggèrent que les interactions trans pour les claudines individuelles sont faibles (Lim et al., 2008), plusieurs éléments de preuve suggèrent que les claudines polymérisées sont susceptibles de former des interactions très stables. Tout d'abord, l'expression exogène de claudines dans les fibroblastes entraîne une augmentation de l'adhésion entre les cellules (Kubota et al., 1999). Enfin, l'analyse de FRAP de claudines dans les cellules épithéliales révèle un très faible niveau de mobilité, ce qui est compatible avec la capacité de ces protéines de former des polymères stables avec une faible diffusion dans la membrane (Shen et al., 2008). Cependant, il est intéressant de noter que lorsque les claudines fluorescentes (GFP fusionnée – de l'anglais Green Fluorescent Protein) ont été exprimées dans les fibroblastes, les brins appariés formés entre les cellules ont été dynamiques. Bien que ce comportement dynamique n'a pas été visualisé dans les cellules épithéliales, il est possible que cela se produise à une période de temps plus lente. Ce problème pourrait permettre au joint de jonction serrée d'être maintenu en tant que cellules épithéliales adjacentes et de changer de position par rapport à l'autre ou se diviser en cas d'apoptose.

Interaction claudine-ZO:

Toutes ces protéines transmembranaires ont la capacité d'interagir avec des membres de la guanylate kinase associée à la membrane (MAGUK) de la famille des adaptateurs cytoplasmiques. Les protéines MAGUK les plus étudiées au niveau des jonctions serrées sont les protéines de la zonula (ZO-1, ZO-2 et ZO-3). ZO-1 a été la première protéine découverte exclusivement au niveau des jonctions serrées (Stevenson et al., 1986). Elle peut interagir

directement avec chacune des protéines transmembranaires des jonctions serrées ainsi que le cytosquelette d'actine.

Les trois protéines d'échafaudage ZO de la jonction serrée contiennent chacune trois motifs PDZ de liaison dans leur partie N-terminale (Amieva et al., 2003) et presque toutes les claudines ont un motif PDZ de liaison à leurs extrémités carboxylées. Tsukita et al. (1999) ont démontré une liaison directe des protéines de fusion GST représentant les queues carboxylées de claudines 1 à 8 au domaine His-PDZ-1 de ZO-1 (Itoh et al., 1999).

Modulation des jonctions serrées:

1. Calcium et le cytosquelette:

Le lien entre les jonctions serrées et le cytosquelette a été décrit par Meza et al. (1980) dans une étude qui combine la perturbation des microtubules et des microfilaments par l'intermédiaire des effets de la colchicine et de la cytochalasine B sur le degré d'étanchéité des jonctions serrées (Meza et al., 1980). La colchicine et la cytochalasine B entraînent des perturbations des microtubules et microfilaments cytoplasmiques respectivement, avec une diminution de la résistance électrique transépithéliale (TEER). L'élimination du Ca^{++} extracellulaire a également conduit à l'escamotage des microtubules et des microfilaments, coïncidant avec l'ouverture des jonctions serrées.

La microscopie électronique a révélé également une désorganisation marquée et une diminution du nombre de brins étroits intramembranaires de réseaux de jonctions, associée à une diminution de la TEER, lorsque l'épithélium de la vésicule biliaire a été exposé à des conditions de Ca^{++} extracellulaire. Non seulement cet effet est réversible, mais lorsque la concentration intracellulaire de Ca^{++} a été augmentée au-delà de celle de l'échantillon témoin, le nombre de brins et de la profondeur à laquelle ils descendent dans la région subjonctionnelle ont été augmentés, coïncidant avec une augmentation de la TEER (Palant et al., 1983). Le fait d'exposer les cellules épithéliales à des conditions extracellulaires à Ca^{++} conduit à une redistribution de ZO-1 à partir de la membrane plasmique vers le cytoplasme (Siliciano et Goodenough 1988).

L'ajout de l'adénosine 3', 5' monophosphates (AMP cyclique) à la surface de la muqueuse de la vésicule biliaire a provoqué une augmentation réversible de la TEER, renforçant ainsi l'argument au profit d'un lien entre la modulation du cytosquelette et la fonction des jonctions serrées (Duffey et al., 1981). Il a également été observé que les filaments du cytosquelette des bordures épithéliales sont encapsulés dans des anneaux circonférentiels de l'actine et de la myosine (Hull et Staehelin 1979). Cet anneau d'actomyosine se trouve au niveau des jonctions adhérentes (Burgess 1982; Rodewald et al., 1976). La contraction de l'anneau d'actomyosine est également associée à la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine, impliquant le Ca^{++} et la calmoduline-dépendante de la chaîne légère de la myosine (MLCK) dans la modulation des jonctions serrées (Keller et Mooseker 1982). Les progrès récents en biologie moléculaire ont mis en lumière le rôle de MLCK dans la modulation des jonctions serrées. Dans l'épithélium intestinal, deux isoformes de MLCK (MLCK1 et MLCK2) sont exprimées, chacun avec sa propre localisation et sa fonction subcellulaire (Clayburgh et al., 2004). Ainsi, le MLCK1 est principalement exprimé dans l'épithélium des villosités et se concentre au niveau du noyau d'actomyosine perijunctional, alors que le MLCK2 est exprimé tout au long de l'axe des villosités . La régulation positive de MLCK1 conduit à la perte de la fonction barrière au niveau des jonctions serrées (Blair et al., 2006). La perte de la barrière a été également associée à la réorganisation de l'actine perijunctional, l'occludine, claudines et ZO- 1, et des études ont montré que la perte de la barrière, induite par le MLCK, dépend largement de la région où l'actine est associée aux jonctions serrées (Shen et al., 2006; Yu et al., 2010).

Phosphorylation:

La localisation de l'occludine et des claudines dans le complexe des jonctions serrées est régulée par la phosphorylation, qui à son tour, est régulée par des kinases (tyrosine kinase c et la protéine kinase C) et les phosphatases (protéine sérine / thréonine phosphatase 2A). Une nouvelle protéine kinase C, PKC η , principalement exprimée dans l'épithélium intestinal, est impliquée dans la phosphorylation de l'occludine et des claudines au niveau des résidus thréonine et sérine. L'inhibition de la PKC a perturbé la répartition d'occludine, claudines et de ZO-1 dans le complexe des jonctions serrées et la fonction de barrière épithéliale est ainsi perdue. Cela indique que la phosphorylation est essentielle pour les interactions occludine-claudine- ZO-1 et pourrait

moduler la fonction de la barrière épithéliale (Raleigh et al., 2011). L'importance de la phosphorylation dans la modulation des jonctions serrées a été illustrée lors de la phosphorylation de la sérine 408 (S408) dans la queue cytoplasmique C-terminale des occludines et claudines. Cette phosphorylation a été identifiée comme un interrupteur qui module le flux paracellulaire. Cette phosphorylation de CK2 module également les interactions entre occludine, ZO-1, la claudine-1 et la claudine-2, ce qui génère des fractions mobiles de ces complexes, régulant ainsi la structure des jonctions serrées (Raleigh et al., 2011).

Facteurs modulant les jonctions serrées: *Zonula occludens* toxin

Vibrio cholerae est un agent pathogène qui produit des endotoxines différentes telles que la toxine du choléra, la toxine de *zonula occludens* (zot) et accessoire entérotoxine cholérique [5]. Il a émis l'hypothèse que Zot contribue à la déshydratation causée par la diarrhée *Vibrio cholerae*, car elle augmente la perméabilité paracellulaire et ainsi l'eau et les électrolytes à se déplacer dans la lumière sous la force hydrostatique. Dans une étude portant sur différents modèles *in vitro*, il a été constaté que Zot est capable d'activer une cascade complexe d'évènements intracellulaires qui aboutissent à la régulation de la perméabilité des jonctions serrées. Il a été suggéré que la liaison de Zot à un récepteur spécifique de la surface épithéliale a conduit à un réarrangement réversible du réseau d'actine provoquée par la PKC-dépendante (Fasano et al., 1995). Zot a également été capable d'améliorer de manière significative l'absorption de plusieurs médicaments, du nature hydrophile et à travers les monocouches de la lignée humaine *in vitro* de cellules épithéliales intestinales Caco-2 (Cox et al., 2001; Cox et al., 2002) .

STb:

Un certain nombre de facteurs peuvent être responsables du dysfonctionnement de la barrière épithéliale, y compris l'infection microbienne. Les pathogènes entériques ont développé des stratégies qui induisent la production de la diarrhée chez les hôtes infectés, par la perturbation des jonctions serrées (TJs) (Nakashima et al., 2013; Visweswariah et al., 1992). De nombreuses études ont indiqué que les toxines peuvent moduler la barrière épithéliale en ciblant les TJs ainsi que des composants du cytosquelette (l'actine) des cellules et donc, pour certains agents

pathogènes, ces changements facilitent l'invasion à travers la surface de la muqueuse (Strauman et al., 2010). Dans cette étude, nous avons cerné les effets de la toxine STb sur la localisation de la claudine-1 et son niveau de phosphorylation dans les cellules épithéliales (T84).

Les toxines LT et STa ont été récemment présentées dans le but de provoquer une augmentation de la perméabilité qui se traduit par la réduction de la résistance transépithéliale (TER) observée (Nakashima et al., 2013). Nous avons comparé ainsi le partitionnement cellulaire induit par le détergent NP-40 et l'état de phosphorylation de la claudine-1 dans la lignée épithéliale T84 après un traitement avec STb.

Nous avons d'abord évalué la localisation de la claudine-1 dans les cellules T84 par immunomarquage et imagerie confocale. La claudine-1 et l'occludine ont démontré à être situés au niveau de la partie apicale des TJs (Ngendahayo Mukiza et Dubreuil 2013; Sjo et al., 2003). Il a également été suggéré que la claudine-1 contribue à l'adhésion cellulaire (Stevenson et al., 1988). Dans notre étude, on a récupéré la claudine-1 dans les deux fractions NP-40 solubles et insolubles dans des extraits cellulaires. Étant donné que les brins des TJs sont censés être résistants à l'extraction par détergent (de Oliveira et al., 2005), ces résultats indiquent l'existence de la claudine-1 à la fois comme un complexe associé à la membrane et un groupe de protéines solubles. La distribution de la claudine-1 dans deux fractions subcellulaires distinctes avait été rapportée (Fujita et al., 2000).

Les mécanismes qui sous-tendent la perturbation de la barrière épithéliale sont nombreux. Certains des composés interagissent directement avec les TJs (Krug et al., 2009), tandis que d'autres perturbent la fonction de la barrière par une modification générale de brins des TJs (Walsh et al., 2001). La réorganisation de l'anneau d'actine (Arriaga et al., 1995) se traduit également par une perte de l'intégrité des jonctions serrées. STb a déjà été trouvé pour affecter l'anneau d'actine des cellules T84 (Ngendahayo Mukiza et Dubreuil 2013). Les auteurs ont également signalé un raccourcissement des filaments d'actine et l'apparence de la condensation de l'actine après le traitement avec la toxine STb. Ceci est cohérent avec nos résultats où le raccourcissement des filaments a été observé. L'absence de réorganisation de l'anneau d'actine suggère que STb n'affecte pas les TJs via une modification de l'architecture de l'actine. La

pertinence des changements dans les filaments d'actine à l'égard de l'intégrité des TJs reste à établir.

L'effet de la toxine STb sur les protéines des TJs a été examiné dans une tentative de clarifier les mécanismes qui sous-tendent les changements observés. La perte de la claudine-1 à partir de la membrane de cellules T84 traitées avec STb indique une perte d'intégrité des TJs et donc changements dans les propriétés de la barrière épithéliale. L'immunobuvardage des fractions de cellules T84 fournit une preuve supplémentaire d'un changement de la localisation subcellulaire de la claudine-1. La teneur de la claudine-1 dans la fraction membranaire a diminué après le traitement avec STb d'une manière dépendante du temps. La teneur de la claudine-1 dans la fraction soluble a augmenté avec le temps, ce qui indique que la claudine-1 s'est transloquée à partir de la membrane vers le cytosol en réponse au traitement avec STb. Ce déplacement de la claudine-1 dans la fraction soluble a été observé dans les cellules Caco-2 suite à l'épuisement de l'ATP (Anderson et al., 1993; Erume et al., 2008).

L'effet de délocalisation de STb observée sur la claudine-1 contribue probablement à la pathogenèse de ETEC en permettant le passage des électrolytes et de l'eau à travers l'espace paracellulaire. Dreyfus et al. (1993) ont suggéré que STb ouvre un canal du calcium. Au-delà de ces études, on ne sait rien de la relation entre STb, Ca^{++} et les TJs. Nos résultats suggèrent que STb induit une toxicité rapide en fonction du temps par la translocation de la claudine-1 à partir de la membrane en une forme plus soluble dans le cytosol.

Les niveaux de calcium accrus sont également censés réguler les phospholipases (A2 et C) qui libèrent l'acide arachidonique des phospholipides de la membrane, ce qui conduit à la formation de PGE2 et de 5-HT, qui assure la médiation de l'eau et le transport de l'électrolyte (Banan et al., 2005). Dans notre étude, le rôle important de calcium a été confirmé par l'ajout du calcium dans le milieu de culture où l'effet de STb a augmenté le taux de perturbation de l'intégrité de la barrière à court terme. Autres cations bivalents n'ont eu aucun effet significatif sur le taux de toxicité de STb.

Il a été proposé que les claudines peuvent être régulées par la phosphorylation médiée par PKC (Sjo et al., 2003). Ainsi, dans les cellules Caco-2, l'inactivation de la PKC- Φ réduit la phosphorylation de la claudine-1 et réduit la forme membranaire des claudines-1 en une forme soluble dans le cytosol (D'Souza et al., 2007). Dans les cellules cancéreuses de l'ovaire, l'activation de la PKC par le « phorbol-ester » induit la phosphorylation de claudines et réduit la fonction de barrière (Aono et Hirai 2008), alors que dans les kératinocytes épidermiques humains, la formation de TJs a été suggérée d'être règlementée par une phosphorylation induite par la PKC de claudine- 4 (Turner et al., 2006). Une étude antérieure a montré que la liaison de STb à son récepteur est associée à l'absorption de Ca^{++} dans la cellule, activation PKC, qui active, par phosphorylation, la protéine CFTR. Sur la base que STb active PKC et que STb ouvre un canal Ca^{++} liant ainsi un GTP dans la membrane plasmique (Dreyfus et al., 1993), on peut émettre l'hypothèse que la voie de signalisation du PKC peut être impliquée dans un dysfonctionnement des TJs.

Dans les cellules non traitées T84, les claudines-1 phosphorylées n'ont été trouvées que dans la fraction insoluble, tandis que dans la fraction soluble, la claudine-1 n'était pas phosphorylée. Depuis que STb induit une diminution importante de la distribution apicale de la claudine-1 et une diminution de la fonction de barrière (Dreyfus et al., 1993), un changement dans l'état de phosphorylation peut être le mécanisme par lequel STb agit indirectement.

BIBLIOGRAPHIE

Al-Sadi, R., Khatib, K., Guo, S., Ye, D., Youssef, M. & Ma, T. (2011) Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300, G1054-1064

Amieva, M. R., Vogelmann, R., Covacci, A., Tompkins, L. S., Nelson, W. J. & Falkow, S. (2003) Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science* 300, 1430-1434

Anderson, J. M., Balda, M. S. & Fanning, A. S. (1993) The structure and regulation of tight junctions. *Current Opinion in Cell Biology* 5, 772-778

Aono, R., Tsukagoshi, N. & Yamamoto, M. (1998) Involvement of outer membrane protein TolC, a possible member of the mar-sox regulon, in maintenance and improvement of organic solvent tolerance of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* 180, 938-944

Aono, S. & Hirai, Y. (2008) Phosphorylation of claudin-4 is required for tight junction formation in a human keratinocyte cell line. *Experimental Cell Research* 314, 3326-3339

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. *Infection and Immunity* 63, 4715-4720

Ballabh, P., Braun, A. & Nedergaard, M. (2004) The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of Disease* 16, 1-13

Banan, A., Zhang, L. J., Shaikh, M., Fields, J. Z., Choudhary, S., Forsyth, C. B., Farhadi, A. & Keshavarzian, A. (2005) θ Isoform of protein kinase C alters barrier function in intestinal epithelium through modulation of distinct claudin isotypes: a novel mechanism

for regulation of permeability. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 313,962---982

Bauer, H., Zweimueller---Mayer, J., Steinbacher, P., Lametschwandtner, A. & Bauer, H. C. (2010) The dual role of zonula occludens (ZO) proteins. *J Biomed Biotechnol* 2010, 402593

Baum, B. & Georgiou, M. (2011) Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. *Journal of Cell Biology* 192,907---917

Bazzoni, G. & Dejana, E. (2004) Endothelial cell---to---cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiological Reviews* 84,869---901

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 Microbiology Letters* 209,183---188

Benz, I. & Schmidt, M. A. (1989) Cloning and expression of an adhesin (AIDA---I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 57, 1506---1511

Blair, S. A., Kane, S. V., Clayburgh, D. R. & Turner, J. R. (2006) Epithelial myosin light chain kinase expression and activity are upregulated in inflammatory bowel disease. *Laboratory Investigation* 86, 191---201

Bleuel, C., Grosse, C., Taudte, N., Scherer, J., Wesenberg, D., Krauss, G. J., Nies, D. H. & Grass, G. (2005) TolC is involved in enterobactin efflux across the outer membrane of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 187, 6701---6707

Bradfield, P. F., Nourshargh, S., Aurrand-Lions, M. & Imhof, B. A. (2007) JAM family and related proteins in leukocyte migration (Vestweber series). *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27, 2104---2112

Brynstad, S. & Granum, P. E. (2002) *Clostridium perfringens* and foodborne infections. *International Journal of Food Microbiology* 74, 195---202

Burgess, D. R. (1982) Reactivation of intestinal epithelial cell brush border motility: ATP---dependent contraction via a terminal web contractile ring. *Journal of Cell Biology* 95, 853---863

Cardoso, F. L., Brites, D. & Brito, M. A. (2010) Looking at the blood---brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Res Rev* 64, 328---363

Caron, E., Crepin, V. F., Simpson, N., Knutton, S., Garmendia, J. & Frankel, G. (2006) Subversion of actin dynamics by EPEC and EHEC. *Current Opinion in Microbiology* 9, 40---45

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

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

Clayburgh, D. R., Rosen, S., Witkowski, E. D., Wang, F., Blair, S., Dudek, S., Garcia, J. G., Alverdy, J. C. & Turner, J. R. (2004) A differentiation---dependent splice variant of myosin light chain kinase, MLCK1, regulates epithelial tight junction permeability. *Journal of Biological Chemistry* 279, 55506---55513

Cox, D. S., Gao, H., Raje, S., Scott, K. R. & Eddington, N. D. (2001) Enhancing the permeation of marker compounds and enaminone anticonvulsants across Caco---2 monolayers by

modulating tight junctions using zonula occludens toxin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 52, 145---150

Cox, D. S., Raje, S., Gao, H., Salama, N. N. & Eddington, N. D. (2002) Enhanced permeability of molecular weight markers and poorly bioavailable compounds across Caco---2 cell monolayers using the absorption enhancer, zonula occludens toxin. *Pharmaceutical Research* 19, 1680---1688

D'souza, T., Agarwal, R. & Morin, P. J. (2005) Phosphorylation of claudin---3 at threonine 192 by cAMP---dependent protein kinase regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells. *Journal of Biological Chemistry* 280, 26233---26240

D'souza, T., Indig, F. E. & Morin, P. J. (2007) Phosphorylation of claudin---4 by PKCepsilon regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells. *Experimental Cell Research* 313, 3364---3375

Daugherty, B. L., Ward, C., Smith, T., Ritzenthaler, J. D. & Koval, M. (2007) Regulation of heterotypic claudin compatibility. *Journal of Biological Chemistry* 282, 30005---30013

De Oliveira, S. S., De Oliveira, I. M., De Souza, W. & Morgado---Diaz, J. A. (2005) Claudins upregulation in human colorectal cancer. *FEBS Letters* 579, 6179---6185

Dean, E. A., Whipp, S. C. & Moon, H. W. (1989) Age---specific colonization of porcine intestinal epithelium by 987P---pilated enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 57, 82---87

Di Pierro, M., Lu, R., Uzzau, S., Wang, W., Margaretten, K., Pazzani, C., Maimone, F. & Fasano, A. (2001) Zonula occludens toxin structure---function analysis. Identification of the fragment biologically active on tight junctions and of the zonulin receptor binding domain. *Journal of Biological Chemistry* 276, 19160---19165

Dickinson, B. L. & Clements, J. D. (1995) Dissociation of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin adjuvanticity from ADP-ribosyltransferase activity. *Infection and Immunity* 63, 1617-1623

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).

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90, 3202-3206

Dreyfus, L. A., Urban, R. G., Whipp, S. C., Slaughter, C., Tachias, K. & Kupersztoch, Y. M. (1992) Purification of the STB enterotoxin of *Escherichia coli* and the role of selected amino acids on its secretion, stability and toxicity. *Molecular Microbiology* 6, 2397-2406

Duffey, M. E., Hainau, B., Ho, S. & Bentzel, C. J. (1981) Regulation of epithelial tight junction permeability by cyclic AMP. *Nature* 294, 451-453

Eckhardt, M. (2008) The role and metabolism of sulfatide in the nervous system. *Molecular Neurobiology* 37, 93-103

Erume, J., Berberov, E. M., Kachman, S. D., Scott, M. A., Zhou, Y., Francis, D. H. & Moxley, R. A. (2008) Comparison of the contributions of heat-labile enterotoxin and heat-stable enterotoxin b to the virulence of enterotoxigenic *Escherichia coli* in F4ac receptor-positive young pigs. *Infection and Immunity* 76, 3141-3149

Evans, D. G., Silver, R. P., Evans, D. J., Jr., Chase, D. G. & Gorbach, S. L. (1975) Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in *Escherichia coli* enterotoxigenic for humans. *Infection and Immunity* 12, 656-667

Evans, D. J., Jr. & Evans, D. G. (1973) Three characteristics associated with enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from man. *Infection and Immunity* 8, 322-328

Fasano, A. (1998) Modulation of intestinal permeability: an innovative method of oral drug delivery for the treatment of inherited and acquired human diseases. *Molecular Genetics and Metabolism* 64, 12---18

Fasano, A., Baudry, B., Pumplin, D. W., Wasserman, S. S., Tall, B. D., Ketley, J. M. & Kaper, J. B. (1991) *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 5242---5246

Fasano, A., Fiorentini, C., Donelli, G., Uzzau, S., Kaper, J. B., Margaretten, K., Ding, X., Guandalini, S., Comstock, L. & Goldblum, S. E. (1995) Zonula occludens toxin modulates tight junctions through protein kinase C---dependent actin reorganization, in vitro. *Journal of Clinical Investigation* 96, 710---720

Fasano, A. & Uzzau, S. (1997) Modulation of intestinal tight junctions by Zonula occludens toxin permits enteral administration of insulin and other macromolecules in an animal model. *Journal of Clinical Investigation* 99, 1158---1164

Finkelstein, R. A., Vasil, M. L., Jones, J. R., Anderson, R. A. & Barnard, T. (1976) Clinical cholera caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology* 3, 382---384

Francis, D. H., Erickson, A. K. & Grange, P. A. (1999) K88 adhesins of enterotoxigenic *Escherichia coli* and their porcine enterocyte receptors. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 473, 147---154

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. *Microbiology and Immunology* 41, 633---636

Fujita, H., Chiba, H., Yokozaki, H., Sakai, N., Sugimoto, K., Wada, T., Kojima, T., Yamashita, T. & Sawada, N. (2006) Differential expression and subcellular localization of claudin---7, ---8, ---12, ---13, and ---15 along the mouse intestine. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 54, 933---944

Fujita, K., Katahira, J., Horiguchi, Y., Sonoda, N., Furuse, M. & Tsukita, S. (2000) *Clostridium perfringens* enterotoxin binds to the second extracellular loop of claudin---3, a tight junction integral membrane protein. *FEBS Letters* 476, 258---261

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

Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K. & Tsukita, S. (1998a) Claudin---1 and ---2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *Journal of Cell Biology* 141, 1539---1550

Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., Haratake, A., Sugitani, Y., Noda, T., Kubo, A. & Tsukita, S. (2002) Claudin---based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin---1---deficient mice. *Journal of Cell Biology* 156, 1099---1111

Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S. & Tsukita, S. (1993) Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *Journal of Cell Biology* 123, 1777---1788

Furuse, M., Itoh, M., Hirase, T., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S. & Tsukita, S. (1994) Direct association of occludin with ZO---1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *Journal of Cell Biology* 127, 1617---1626

Furuse, M., Sasaki, H., Fujimoto, K. & Tsukita, S. (1998b) A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *Journal of Cell Biology* 143, 391-401

Furuse, M., Sasaki, H. & Tsukita, S. (1999) Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *Journal of Cell Biology* 147, 891-903
Ghai, O. P., Menon, P. S. & Bhan, M. K. (1980) Pathogenesis of diarrhea due to *Escherichia coli*. *Indian Journal of Pediatrics* 47, 311-316

Goldblum, S. E., Rai, U., Tripathi, A., Thakar, M., De Leo, L., Di Toro, N., Not, T., Ramachandran, R., Puche, A. C., Hollenberg, M. D. & Fasano, A. (2011) The active Zot domain (aa 288-293) increases ZO-1 and myosin 1C serine/threonine phosphorylation, alters interaction between ZO-1 and its binding partners, and induces tight junction disassembly through proteinase activated receptor 2 activation. *FASEB Journal* 25, 144-158

Goncalves, C., Berthiaume, F., Mourez, M. & Dubreuil, J. D. (2008) *Escherichia coli* STb toxin binding to sulfatide and its inhibition by carragenan. *FEMS Microbiology Letters* 281, 30-35
Goncalves, C. & Dubreuil, J. D. (2009) Effect of *Escherichia coli* STb toxin on NIH-3T3 cells. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 55, 432-441

Goncalves, C., Vachon, V., Schwartz, J. L. & Dubreuil, J. D. (2007) The *Escherichia coli* enterotoxin STb permeabilizes piglet jejunal brush border membrane vesicles. *Infection and Immunity* 75, 2208-2213

Gonzalez-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P. & Jaramillo, B. E. (2003) Tight junction proteins. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 81, 1-44

Guo, X., Harrison, R. W. & Tai, P. C. (2006) Nucleotide-dependent dimerization of the C-terminal domain of the ABC transporter CvaB in colicin V secretion. *Journal of Bacteriology* 188, 2383-2391

Hanna, P. C., Wieckowski, E. U., Mietzner, T. A. & McClane, B. A. (1992) Mapping of functional regions of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *Infection and Immunity* 60, 2110---2114

Holmes, J. L., Van Itallie, C. M., Rasmussen, J. E. & Anderson, J. M. (2006) Claudin profiling in the mouse during postnatal intestinal development and along the gastrointestinal tract reveals complex expression patterns. *Gene Expression Patterns* 6, 581---588

Hull, B. E. & Staehelin, L. A. (1979) The terminal web. A reevaluation of its structure and function. *Journal of Cell Biology* 81, 67---82

Ikenouchi, J., Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., Tsukita, S. & Tsukita, S. (2005) Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *Journal of Cell Biology* 171, 939---945

Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M. & Tsukita, S. (1999) Direct binding of three tight junction---associated MAGUKs, ZO---1, ZO---2, and ZO---3, with the COOH termini of claudins. *Journal of Cell Biology* 147, 1351---1363

Jain, S., Suzuki, T., Seth, A., Samak, G. & Rao, R. (2011) Protein kinase C ζ phosphorylates occludin and promotes assembly of epithelial tight junctions. *Biochemical Journal* 437, 289---299

Jansson, L., Tobias, J., Lebens, M., Svennerholm, A. M. & Teneberg, S. (2006) The major subunit, CfaB, of colonization factor antigen i from enterotoxigenic *Escherichia coli* is a glycosphingolipid binding protein. *Infection and Immunity* 74, 3488---3497

Kaper, J. B. (2005) Pathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology* 295, 355---356

Katahira, J., Sugiyama, H., Inoue, N., Horiguchi, Y., Matsuda, M. & Sugimoto, N. (1997) *Clostridium perfringens* enterotoxin utilizes two structurally related membrane proteins as functional receptors in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 272, 26652---26658

Keller, T. C., 3rd & Mooseker, M. S. (1982) Ca^{++} ---calmodulin---dependent phosphorylation of myosin, and its role in brush border contraction in vitro. *Journal of Cell Biology* 95, 943---959
Kiela, P. R. & Ghishan, F. K. (2009) Ion transport in the intestine. *Curr Opin Gastroenterol* 25, 87---91

Krause, G., Winkler, L., Piehl, C., Blasig, I., Piontek, J. & Muller, S. L. (2009) Structure and function of extracellular claudin domains. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1165, 34---43

Krug, S. M., Fromm, M. & Gunzel, D. (2009) Two---path impedance spectroscopy for measuring paracellular and transcellular epithelial resistance. *Biophysical Journal* 97, 2202---2211

Kubota, K., Furuse, M., Sasaki, H., Sonoda, N., Fujita, K., Nagafuchi, A. & Tsukita, S. (1999) $Ca(2+)$ ---independent cell---adhesion activity of claudins, a family of integral membrane proteins localized at tight junctions. *Current Biology* 9, 1035---1038

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. *Journal of Bacteriology* 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. *Biochimica et Biophysica 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. *Veterinary Research* 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. *Infection and Immunity* 42, 264-268

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

Lim, T. S., Vedula, S. R., Hunziker, W. & Lim, C. T. (2008) Kinetics of adhesion mediated by extracellular loops of claudin-2 as revealed by single-molecule force spectroscopy. *Journal of Molecular Biology* 381, 681-691

Mainil, J. G., Jacquemin, E., Pohl, P., Kaeckenbeeck, A. & Benz, I. (2002) DNA sequences coding for the F18 fimbriae and AIDA adhesin are localised on the same plasmid in *Escherichia coli* isolates from piglets. *Veterinary Microbiology* 86, 303-311

Mandell, K. J. & Parkos, C. A. (2005) The JAM family of proteins. *Adv Drug Deliv Rev* 57, 857-867

Martin-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., Panzeri, C., Stoppacciaro, A., Ruco, L., Villa, A., Simmons, D. & Dejana, E. (1998) Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at

intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *Journal of Cell Biology* 142, 117---127

Mcclane, B. A., Wnek, A. P., Hulkower, K. I. & Hanna, P. C. (1988) Divalent cation involvement in the action of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. Early events in enterotoxin action are divalent cation---independent. *Journal of Biological Chemistry* 263, 2423---2435

Mel, S. F., Fullner, K. J., Wimer---Mackin, S., Lencer, W. I. & Mekalanos, J. J. (2000) Association of protease activity in *Vibrio cholerae* vaccine strains with decreases in transcellular epithelial resistance of polarized T84 intestinal epithelial cells. *Infection and Immunity* 68, 6487---6492

Meza, I., Ibarra, G., Sabanero, M., Martinez---Palomo, A. & Cereijido, M. (1980) Occluding junctions and cytoskeletal components in a cultured transporting epithelium. *Journal of Cell Biology* 87, 746---754

Miyake, M., Hanajima, M., Matsuzawa, T., Kobayashi, C., Minami, M., Abe, A. & Horiguchi, Y. (2005) Binding of intimin with Tir on the bacterial surface is prerequisite for the barrier disruption induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 337, 922---927

Muza---Moons, M. M., Schneeberger, E. E. & Hecht, G. A. (2004) Enteropathogenic *Escherichia coli* infection leads to appearance of aberrant tight junction strands in the lateral membrane of intestinal epithelial cells. *Cell Microbiology* 6, 783---793

Nagy, B., Casey, T. A., Whipp, S. C. & Moon, H. W. (1992) Susceptibility of porcine intestine to pilus---mediated adhesion by some isolates of piliated enterotoxigenic *Escherichia coli* increases with age. *Infection and Immunity* 60, 1285---1294

Nagy, B. & Fekete, P. Z. (1999) Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Veterinary Research* 30, 259---284

Nakashima, R., Kamata, Y. & Nishikawa, Y. (2013) Effects of *Escherichia coli* heat---stable enterotoxin and guanylin on the barrier integrity of intestinal epithelial T84 cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 152, 78---81

Ngendahayo Mukiza, C. & Dubreuil, J. D. (2013) *Escherichia coli* heat---stable toxin b impairs intestinal epithelial barrier function by altering tight junction proteins. *Infection and Immunity* 81, 2819---2827

Nishino, K., Yamada, J., Hirakawa, H., Hirata, T. & Yamaguchi, A. (2003) Roles of TolC---dependent multidrug transporters of *Escherichia coli* in resistance to beta---lactams. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47, 3030---3033

Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M. & Tsukita, S. (2003) Size---selective loosening of the blood---brain barrier in claudin---5---deficient mice. *Journal of Cell Biology* 161, 653---660

Nougayrede, J. P. & Sonnenberg, M. S. (2004) Enteropathogenic *Escherichia coli* EspF is targeted to mitochondria and is required to initiate the mitochondrial death pathway. *Cell Microbiology* 6, 1097---1111

Nunbhakdi---Craig, V., Machleidt, T., Ogris, E., Bellotto, D., White, C. L., 3rd & Sontag, E. (2002) Protein phosphatase 2A associates with and regulates atypical PKC and the epithelial tight junction complex. *Journal of Cell Biology* 158, 967---978

Oda, H. & Takeichi, M. (2011) Evolution: structural and functional diversity of cadherin at the adherens junction. *Journal of Cell Biology* 193, 1137---1146

Orskov, I. & Orskov, F. (1990) Serologic classification of fimbriae. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 151, 71---90

Palant, C. E., Duffey, M. E., Mookerjee, B. K., Ho, S. & Bentzel, C. J. (1983) Ca²⁺ regulation of tight---junction permeability and structure in *Necturus* gallbladder. *American Journal of Physiology* 245, C203---212

Philpott, D. J., McKay, D. M., Mak, W., Perdue, M. H. & Sherman, P. M. (1998) Signal transduction pathways involved in enterohemorrhagic *Escherichia coli*---induced alterations in T84 epithelial permeability. *Infection and Immunity* 66, 1680---1687

Piontek, J., Fritzsche, S., Cording, J., Richter, S., Hartwig, J., Walter, M., Yu, D., Turner, J. R., Gehring, C., Rahn, H. P., Wolburg, H. & Blasig, I. E. (2011) Elucidating the principles of the molecular organization of heteropolymeric tight junction strands. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68, 3903---3918

Qadri, F., Saha, A., Ahmed, T., Al Tarique, A., Begum, Y. A. & Svennerholm, A. M. (2007) Disease burden due to enterotoxigenic *Escherichia coli* in the first 2 years of life in an urban community in Bangladesh. *Infection and Immunity* 75, 3961---3968

Raleigh, D. R., Boe, D. M., Yu, D., Weber, C. R., Marchiando, A. M., Bradford, E. M., Wang, Y., Wu, L., Schneeberger, E. E., Shen, L. & Turner, J. R. (2011) Occludin S408 phosphorylation regulates tight junction protein interactions and barrier function. *Journal of Cell Biology* 193, 565---582

Rao, R. (2009) Occludin phosphorylation in regulation of epithelial tight junctions. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1165, 62---68

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

Rodewald, R., Newman, S. B. & Karnovsky, M. J. (1976) Contraction of isolated brush borders from the intestinal epithelium. *Journal of Cell Biology* 70, 541---554

Rosenberg, E. Y., Bertenthal, D., Nilles, M. L., Bertrand, K. P. & Nikaido, H. (2003) Bile salts and fatty acids induce the expression of *Escherichia coli* AcrAB multidrug efflux pump through their interaction with Rob regulatory protein. *Molecular Microbiology* 48, 1609---1619

Rousset, E., Harel, J. & Dubreuil, J. D. (1998a) Binding characteristics of *Escherichia coli* enterotoxin b (STb) to the pig jejunum and partial characterization of the molecule involved. *Microbial Pathogenesis* 24, 277---288

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

Runnels, P. L., Moon, H. W. & Schneider, R. A. (1980) Development of resistance with host age to adhesion of K99+ *Escherichia coli* to isolated intestinal epithelial cells. *Infection and Immunity* 28, 298---300

Sack, R. B., Gorbach, S. L., Banwell, J. G., Jacobs, B., Chatterjee, B. D. & Mitra, R. C. (1971) Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from patients with severe cholera---like disease. *Journal of Infectious Diseases* 123, 378---385

Saitou, M., Fujimoto, K., Doi, Y., Itoh, M., Fujimoto, T., Furuse, M., Takano, H., Noda, T. & Tsukita, S. (1998) Occludin---deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *Journal of Cell Biology* 141, 397---408

Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J. D., Fromm, M., Takano, H., Noda, T. & Tsukita, S. (2000) Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Molecular Biology of the Cell* 11, 4131---4142

Sakakibara, A., Furuse, M., Saitou, M., Ando---Akatsuka, Y. & Tsukita, S. (1997) Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *Journal of Cell Biology* 137,1393---1401

Sandoval, K. E. & Witt, K. A. (2008) Blood---brain barrier tight junction permeability and ischemicstroke. *Neurobiology of Disease* 32,200---219

Savkovic, S. D., Koutsouris, A. & Hecht, G. (2003) PKC zeta participates in activation of inflammatory response induced by enteropathogenic *E. coli*. *Am J Physiol Cell Physiol* 285, C512---521

Schmitz, H., Barmeyer, C., Gitter, A. H., Wullstein, F., Bentzel, C. J., Fromm, M., Riecken, E. O. & Schulzke, J. D. (2000) Epithelial barrier and transport function of the colon in ulcerative colitis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 915, 312---326

Schulzke, J. D., Gitter, A. H., Mankertz, J., Spiegel, S., Seidler, U., Amasheh, S., Saitou, M., Tsukita, S. & Fromm, M. (2005) Epithelial transport and barrier function in occludin---deficient mice. *Biochimica et Biophysica Acta* 1669,34---42

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

Seth, A., Sheth, P., Elias, B. C. & Rao, R. (2007) Protein phosphatases 2A and 1 interact with occludin and negatively regulate the assembly of tight junctions in the CACO---2 cell monolayer. *Journal of Biological Chemistry* 282,11487---11498

Shen, L., Black, E. D., Witkowski, E. D., Lencer, W. I., Guerriero, V., Schneeberger, E. E. & Turner, J. R. (2006) Myosin light chain phosphorylation regulates barrier function by remodeling tight junction structure. *Journal of Cell Science* 119,2095---2106

Shen, L., Weber, C. R. & Turner, J. R. (2008) The tight junction protein complex undergoes rapid and continuous molecular remodeling at steady state. *Journal of Cell Biology* 181, 683---695

Shifflett, D. E., Clayburgh, D. R., Koutsouris, A., Turner, J. R. & Hecht, G. A. (2005) Enteropathogenic *E. coli* disrupts tight junction barrier function and structure in vivo. *Laboratory Investigation* 85, 1308---1324

Shin, K., Fogg, V. C. & Margolis, B. (2006) Tight junctions and cell polarity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 22, 207---235

Siliciano, J. D. & Goodenough, D. A. (1988) Localization of the tight junction protein, ZO---1, is modulated by extracellular calcium and cell---cell contact in Madin---Darby canine kidney epithelial cells. *Journal of Cell Biology* 107, 2389---2399

Sixma, T. K., Pronk, S. E., Kalk, K. H., Wartna, E. S., Van Zanten, B. A., Witholt, B. & Hol, W. G. (1991) Crystal structure of a cholera toxin---related heat---labile enterotoxin from *E. coli*. *Nature* 351, 371---377

Sjo, A., Magnusson, K. E. & Peterson, K. H. (2003) Distinct effects of protein kinase C on the barrier function at different developmental stages. *Bioscience Reports* 23, 87---102

Smit, H., Gastra, W., Kamerling, J. P., Vliegenthart, J. F. & De Graaf, F. K. (1984) Isolation and structural characterization of the equine erythrocyte receptor for enterotoxigenic *Escherichia coli* K99 fimbrial adhesin. *Infection and Immunity* 46, 578---584

Smith, H. W. & Halls, S. (1967) Studies on *Escherichia coli* enterotoxin. *Journal of Pathology and Bacteriology* 93, 531---543

Stevenson, B. R., Anderson, J. M. & Bullivant, S. (1988) The epithelial tight junction: structure, function and preliminary biochemical characterization. *Molecular and Cellular Biochemistry* 83, 129---145

Stevenson, B. R., Siliciano, J. D., Mooseker, M. S. & Goodenough, D. A. (1986) Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *Journal of Cell Biology* 103, 755-766

Strauman, M. C., Harper, J. M., Harrington, S. M., Boll, E. J. & Nataro, J. P. (2010) Enteroaggregative *Escherichia coli* disrupts epithelial cell tight junctions. *Infection and Immunity* 78, 4958-4964

Streatfield, S. J., Sandkvist, M., Sixma, T. K., Bagdasarian, M., Hol, W. G. & Hirst, T. R. (1992) Intermolecular interactions between the A and B subunits of heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli* promote holotoxin assembly and stability in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 12140-12144

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

Takahashi, A., Kondoh, M., Masuyama, A., Fujii, M., Mizuguchi, H., Horiguchi, Y. & Watanabe, Y. (2005) Role of C-terminal regions of the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin in its interaction with claudin-4. *Journal of Controlled Release* 108, 56-62

Tanaka, M., Kamata, R. & Sakai, R. (2005) EphA2 phosphorylates the cytoplasmic tail of Claudin-4 and mediates paracellular permeability. *Journal of Biological Chemistry* 280, 42375-42382

Teneberg, S., Hirst, T. R., Angstrom, J. & Karlsson, K. A. (1994) Comparison of the glycolipid-binding specificities of cholera toxin and porcine *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin: identification of a receptor-active non-ganglioside glycolipid for the heat-labile toxin in infant rabbit small intestine. *Glycoconjugate Journal* 11, 533-540

Tomson, F. L., Koutsouris, A., Viswanathan, V. K., Turner, J. R., Savkovic, S. D. & Hecht, G. (2004) Differing roles of protein kinase C- ζ in disruption of tight junction barrier by enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Gastroenterology* 127, 859---869

Turner, J. R. (2009) Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol* 9, 799---809

Turner, S. M., Scott---Tucker, A., Cooper, L. M. & Henderson, I. R. (2006) Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* 263, 10---20

Umeda, K., Ikenouchi, J., Katahira---Tayama, S., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., Matsui, T., Tsukita, S., Furuse, M. & Tsukita, S. (2006) ZO---1 and ZO---2 independently determine where claudins are polymerized in tight---junction strand formation. *Cell* 126, 741---754

Umeda, K., Matsui, T., Nakayama, M., Furuse, K., Sasaki, H., Furuse, M. & Tsukita, S. (2004) Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO---1. *Journal of Biological Chemistry* 279, 44785---44794

Vaandrager, A. B., Van Der Wiel, E., Hom, M. L., Luthjens, L. H. & De Jonge, H. R. (1994) Heat---stable enterotoxin receptor/guanylyl cyclase C is an oligomer consisting of functionally distinct subunits, which are non---covalently linked in the intestine. *Journal of Biological Chemistry* 269, 16409---16415

Vakharia, H., German, G. J. & Misra, R. (2001) Isolation and characterization of *Escherichia coli* tolC mutants defective in secreting enzymatically active alpha---hemolysin. *Journal of Bacteriology* 183, 6908---6916

Van Itallie, C., Rahner, C. & Anderson, J. M. (2001) Regulated expression of claudin---4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *Journal of Clinical Investigation* 107, 1319---1327

Van Itallie, C. M. & Anderson, J. M. (2006) Claudins and epithelial paracellular transport. *Annual Review of Physiology* 68, 403---429

Viswanathan, V. K., Koutsouris, A., Lukic, S., Pilkinton, M., Simonovic, I., Simonovic, M. & Hecht, G. (2004) Comparative analysis of EspF from enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* in alteration of epithelial barrier function. *Infection and Immunity* 72, 3218---3227

Visweswariah, S. S., Shanthi, G. & Balganes, T. S. (1992) Interaction of heat---stable enterotoxins with human colonic (T84) cells: modulation of the activation of guanylyl cyclase. *Microbial Pathogenesis* 12, 209---218

Walker, R. I., Steele, D. & Aguado, T. (2007) Analysis of strategies to successfully vaccinate infants in developing countries against enterotoxigenic *E. coli* (EPEC) disease. *Vaccine* 25, 2545---2566

Walsh, S. V., Hopkins, A. M., Chen, J., Narumiya, S., Parkos, C. A. & Nusrat, A. (2001) Rho kinase regulates tight junction function and is necessary for tight junction assembly in polarized intestinal epithelia. *Gastroenterology* 121, 566---579

WHO (2006) Future directions for research on enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccines for developing countries. *Weekly Epidemiological Record* 81, 97---104

Wu, Z., Nybom, P. & Magnusson, K. E. (2000) Distinct effects of *Vibrio cholerae* haemagglutinin/protease on the structure and localization of the tight junction---associated proteins occludin and ZO---1. *Cell Microbiology* 2, 11---17

Xu, J., Kausalya, P. J., Phua, D. C., Ali, S. M., Hossain, Z. & Hunziker, W. (2008) Early embryonic lethality of mice lacking ZO---2, but Not ZO---3, reveals critical and nonredundant

roles for individual zonula occludens proteins in mammalian development. *Molecular and Cellular Biology* 28, 1669---1678

Yamamoto, T. & Echeverria, P. (1996) Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat---stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans. *Infection and Immunity* 64, 1441---1445

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

Yoder, J. S., Cesario, S., Plotkin, V., Ma, X., Kelly---Shannon, K. & Dworkin, M. S. (2006) Outbreak of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection with an unusually long duration of illness. *Clinical Infectious Diseases* 42, 1513---1517

Yu, D., Marchiando, A. M., Weber, C. R., Raleigh, D. R., Wang, Y., Shen, L. & Turner, J. R. (2010) MLCK---dependent exchange and actin binding region---dependent anchoring of ZO---1 regulate tight junction barrier function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 8237---8241