

Université de Montréal

**Étude des voies d'internalisation de l'entérotoxine STb d'*Escherichia coli*
dans des lignées cellulaires**

par

Marie-Astrid Albert

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

Décembre 2009

© Marie-Astrid Albert, 2009

Université de Montréal
Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

**Étude des voies d'internalisation de l'entérotoxine STb d'*Escherichia coli*
dans des lignées cellulaires**

présenté par

Marie-Astrid Albert

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Dr Michael Mourez, président-rapporteur

Dr J. Daniel Dubreuil, directeur de recherche

Dre Mariela Segura, membre du jury

RÉSUMÉ

Résumé

L'entérotoxine stable à la chaleur STb est produite par les *Escherichia coli* entérotoxigènes (ETEC). Son rôle dans la diarrhée post-sevrage porcine est établi. L'internalisation de STb a été observée dans des cellules épithéliales intestinales humaines et de rat. Cependant, le mécanisme d'internalisation n'est pas totalement compris, particulièrement dans le jéjunum porcine, la cible *in vivo* de STb. Par la cytométrie en flux, nous avons examiné l'internalisation de STb couplée à un marqueur fluorescent dans les cellules épithéliales intestinales porcines IPEC-J2 et les fibroblastes murins NIH3T3. Nos résultats révèlent que l'internalisation de STb est température-indépendante dans les IPEC-J2 tandis qu'elle est température-dépendante dans les NIH3T3, où la réorganisation de l'actine est aussi nécessaire. Toutefois, les niveaux de sulfatide, le récepteur de STb, sont semblables à la surface des deux lignées. Le sulfatide est internalisé à 37°C de façon similaire entre les deux types cellulaires. La rupture des *lipid rafts*, les microdomaines membranaires contenant le sulfatide, par la méthyl- β -cyclodextrine ou la génistéine, n'affecte pas l'internalisation de STb dans les deux lignées. Notre étude indique que le mécanisme d'internalisation de STb est dépendant du type cellulaire. L'activité de la cellule hôte peut être requise ou non. Le récepteur de STb, le sulfatide, n'est pas directement impliqué dans ces mécanismes. L'internalisation activité cellulaire-dépendante suggère une endocytose, nécessitant la réorganisation de l'actine mais pas les *lipid rafts*. L'internalisation de STb est donc un processus complexe dépendant du type cellulaire, qu'il apparait plus relevant d'étudier dans des modèles cellulaires représentatifs des conditions *in vivo*.

Mots clés : *Escherichia coli*, entérotoxine STb, internalisation, type cellulaire, sulfatide, *lipid rafts*.

ABSTRACT

Abstract

Heat-stable enterotoxin b (STb) is one of the toxins produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) and its role in swine post-weaning diarrhea is well established. Internalization of STb in intestinal human and rat epithelial cells has been shown by previous studies. However, the uptake mechanism is still not fully understood, especially in porcine jejunum epithelium, the *in vivo* STb target. Using flow cytometry, we studied internalization of fluorescently-labelled STb in porcine epithelial intestinal IPEC-J2 and murine fibroblast NIH3T3 cell lines. Our results revealed that STb is internalized in both cell lines. Toxin uptake is not dependent on the temperature in IPEC-J2 cells, whereas it is in NIH3T3 fibroblasts. Actin reorganization is only required for STb internalization in NIH3T3 cells. However, membrane sulfatide, the toxin receptor, is similarly present in both cell lines and similarly internalized with time at 37°C. Disruption of lipid rafts, known to contain sulfatide, with inhibitors (methyl- β -cyclodextrin or genistein), did not affect toxin uptake in both cell lines. Altogether, these data indicate that STb internalization mechanisms are cell-type dependent. Moreover, uptake can depend on host cell activity or not. Sulfatide, the toxin receptor, is not directly involved in these mechanisms. Uptake independent on cell activity occurs in porcine intestinal epithelium. The cell activity-dependent uptake suggests an endocytosis, which requires actin rearrangement and is not mediated by lipid rafts. STb internalization is therefore a complex process varying upon cell type, which should preferentially be studied in cellular models representative of *in vivo* conditions, such as porcine cell lines.

Keywords : *Escherichia coli*, STb enterotoxin, internalization, cell type, sulfatide, lipid rafts.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	x
REMERCIEMENTS	xiii
INTRODUCTION.....	1
RECENSION DES ÉCRITS	3
1. <i>Escherichia coli</i> pathogène	4
2. <i>Escherichia coli</i> entérotoxigène	6
2.1 Généralités	6
2.2 Facteurs de colonisation.....	10
2.2.1 <i>Fimbriae</i>	11
2.2.2 <i>Adhésines afimbriaires</i>	12
2.3 Entérotoxines	13
2.3.1 <i>Toxine de haut poids moléculaire : LT</i>	14
2.3.1.1 <i>Généralités</i>	14
2.3.1.2 <i>Génétique et sécrétion</i>	14
2.3.1.3 <i>Mécanisme d'action</i>	17
2.3.1.4 <i>LT et adhésion bactérienne</i>	19
2.3.2 <i>Toxines de faible poids moléculaire</i>	19
2.3.2.1 <i>STa</i>	20
2.3.2.1.1 <i>Généralités</i>	20
2.3.2.1.2 <i>Mécanisme d'action</i>	22
2.3.2.2 <i>EAST1</i>	24
2.3.2.3 <i>STb</i>	25
3. Entérotoxine STb	25
3.1 Généralités	25
3.2 Génétique	27
3.3 Importance clinique	29
3.4 Biogenèse.....	31
3.5 Relations structure-fonction.....	35

3.6 Mécanisme d'action	37
3.6.1 Généralités	37
3.6.2 Mécanisme d'action cellulaire.....	38
3.6.2.1 Oligomérisation	38
3.6.2.2 Récepteur	39
3.6.2.3 Pores membranaires et internalisation.....	41
3.6.2.4 Effets cytoplasmiques.....	43
3.6.2.5 Modèle proposé.....	46
4. Problématique et démarche scientifique.....	46
MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS.....	50
Article.....	51
Internalization mechanisms of <i>Escherichia coli</i> STb enterotoxin are cell type- dependent	52
<i>Abstract</i>	53
<i>Introduction</i>	54
<i>Materials and methods</i>	57
<i>Results</i>	61
<i>Discussion</i>	66
<i>Acknowledgements</i>	70
<i>References</i>	71
<i>Figures legends</i>	75
DISCUSSION	84
1. Internalisation de STb et type cellulaire.....	85
2. Rôle du récepteur dans l'internalisation de STb	86
3. Mécanismes d'internalisation de STb	88
3.1 Internalisation indépendante de l'activité de la cellule hôte	88
3.2 Internalisation dépendante de l'activité de la cellule hôte	91
4. Rôle de l'internalisation dans la pathogenèse de STb	93
CONCLUSION	96
BIBLIOGRAPHIE.....	98

LISTE DES FIGURES

Recension des écrits

Figure 1. Pathogenèse des <i>Escherichia coli</i> entérotoxigènes.	8
Figure 2. Entérotoxine LT des ETEC.	15
Figure 3. Trafic et effets intracellulaires de l'entérotoxine LT.	18
Figure 4. Entérotoxine STa des ETEC.	21
Figure 5. Effets cellulaires de l'entérotoxine STa et du peptide endogène guanyline.	23
Figure 6. Entérotoxine STb des ETEC.	26
Figure 7. Biogenèse et sécrétion de STb : modèle actuellement proposé.	33
Figure 8. Relation structure-fonction de l'entérotoxine STb.	36
Figure 9. Récepteur de l'entérotoxine STb.	40
Figure 10. Internalisation de la toxine STb : modèle actuellement proposé.	44
Figure 11. Mécanisme d'action potentiel de la toxine STb.	47

Méthodologie et résultats

Figure 1. Association and internalization of STb-FITC in IPEC-J2 and NIH3T3 cell lines.	78
Figure 2. Disruption of actin polymerization by cytochalasin D in IPEC-J2 and NIH3T3 cells.	79
Figure 3. Involvement of actin polymerization in STb uptake in IPEC-J2 and NIH3T3 cell lines.	80
Figure 4. Cell surface sulfatide detection on IPEC-J2 and NIH3T3 cell lines.	81
Figure 5. Internalization of membrane sulfatide with time at 37°C.	82
Figure 6. Role of lipid rafts in STb uptake.	83

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

5-HT	5-hydroxytryptamine
a.a.	Acide(s) aminé(s)
AAF	Aggregative Adherence Fimbriae
ABC	ATP-binding Cassette transporter
AC	adénylate cyclase
ADP	Adenosine Diphosphate
A/E	Attaching and Effacing
Afa	Afimbrial adhesins
AIDA-I	Adhesin Involved in Diffuse Adherence
Ala	Alanine
AMPc	Adenosine Monophosphate cyclique
Asn	Asparagine
BBMV _s	Brush Border Membrane Vesicles
CaMKII	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II
CAT	Catalytic domain
CCCP	Carbonyl Cyanide 3-ChloroPhénylhydrazone
CFA/I	Colonization Factor Antigen I
CFDA	Carboxyfluorescein Diacetate
CFs	Colonization Factors
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
CNF	Cytotoxic Necrosing Factor
CPPs	Cell Penetrating Peptides
CRP	cAMP Receptor Protein
CS	Coli Surface antigen
CT	Cholera Toxin
Cys	Cystéine
CytD	Cytochalasin D
DAEC	Diffusely Adhering <i>E.coli</i>
DAF	Decay Accelerating Factor
DegP	Degradation Protease
DMEM	Dubelcco's Modified Eagle's Medium
DMM	Davis Minimal Medium
DsbA	Disulfide bond oxidoreductase A

ECD	Extracellular Domain
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	Enteraggregative <i>E.coli</i>
EAST-1	Enteraggregative <i>E.coli</i> Heat-Stable Toxin 1
EHEC	Enterohemorrhagic <i>E.coli</i>
EIEC	Enteroinvasive <i>E.coli</i>
EPEC	Enteropathogenic <i>E.coli</i>
Esp	<i>E.coli</i> secreted proteins
ETEC	Enterotoxigenic <i>E.coli</i>
EtpA	ETEC two-partner protein A
ExPEC	Extra-intestinal Pathogenic <i>E.coli</i>
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
GC-C	Guanylate Cyclase-C
Gly	Glycine
GMPC	Guanosine Monophosphate cyclique
GM1	Monosialotetrahexosylganglioside
GM3	Monosialodihexosylganglioside
GTP	Guanosine Triphosphate
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Ile	Isoleucine
Ipa	Invasion plasmid antigen
IPEC-J2	Intestinal Porcine Epithelial Cells-Jejunum 2
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
Leu	Leucine
<i>lipid rafts</i>	Radeaux lipidiques
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Heat-labile enterotoxin
Lys	Lysine
MacAB	Macrolide-specific ABC-type efflux transporter
m β CD	Methyl- β -cyclodextrin
MBP	Maltose-binding Protein
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
Met	Méthionine
MFPs	Membrane Fusion Proteins
MNEC	Meningitis/sepsis-associated <i>E.coli</i>
NAG-ST	Non-agglutinable <i>V.cholerae</i> heat-stable enterotoxin

OMVs	Outer Membrane Vesicles
Paa	Porcine attaching- and effacing-associated protein
PBS	Phosphate Buffered Saline
Pet	Plasmid-encoded toxin
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
Phe	Phénylalanine
Pic	Protein involved in intestinal colonization
Pmf	Proton-motive force
Pro	Proline
PT	Pertussis Toxin
RE	Réticulum Endoplasmique
RTX	Repeats in Toxin
Sat	Secreted autotransporter toxin
SEB	Staphylococcal Enterotoxin B
Sec	Secretory
SepA	Serine-protease autotransporter A
ShET1	<i>Shigella</i> Enterotoxin 1
SHU	Syndrome Hémolytique et Urémique
siRNA	Small interfering RNA
SPR	Surface Plasmon Resonance
Src	Sarcoma
STa	Heat-stable enterotoxin a
STb	Heat-stable enterotoxin b
STs	Heat-stable enterotoxins
Stx(2e)	Shiga-like toxin (type 2e)
T2SS	Type II Secretion System
T3SS	Type III Secretion System
Tat	Transactivator of transcription
Tf-Alexa488	Alexa488-conjugated transferrin
Tir	Translocated intimin receptor
TSB	Trypticase Soy Broth
UPEC	Uropathogenic <i>E.coli</i>
Val	Valine
<i>V.cholerae</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
VT	Verocytotoxin
<i>Y.enterolitica</i>	<i>Yersinia enterolitica</i>
Y-ST	<i>Yersinia</i> Stable Toxin

REMERCIEMENTS

Au terme de ce projet, qu'il me soit d'abord permis de remercier mon directeur de recherche, le Dr Daniel Dubreuil, qui m'a donné l'opportunité de réaliser une maîtrise dans son laboratoire et de participer à des congrès nationaux et internationaux. Cette expérience fut enrichissante et constitue un tremplin pour ma carrière future. Je lui en suis très reconnaissante.

Je tiens à exprimer ma gratitude au Dr Robert Nabi de m'avoir accueillie en stage dans son laboratoire à Vancouver et de m'avoir ainsi fait découvrir le versant ouest de la recherche scientifique au Canada. Merci également au Dr Liliana Kojic et aux autres membres du Nabi lab, qui n'ont ménagé ni leur temps, ni même leurs week-ends, pour m'apprendre les différentes techniques de biologie cellulaire.

Merci aux membres de mon comité conseil, Dr Jacques Lussier, Dr Daniel Martineau et Dr Michael Mourez, pour leur disponibilité et leurs idées.

Je remercie le Dr Michael Mourez de m'avoir donné l'occasion de participer à ses labmeetings hebdomadaires et d'élargir mes horizons en matière de science et de microbiologie. Ses conseils avisés durant les derniers mois de cette maîtrise m'ont été particulièrement bénéfiques.

Merci à Victoria Girard pour son amitié, ses suggestions lors de la rédaction de ce mémoire, et son réconfort, même à distance.

Merci à Christine Taillon, pour son appui et notre complicité durant ces 3 années au laboratoire, à Richard Graveline, d'avoir rendu ma vie au Québec plus Montréalaise, et à Alexandra Grasteau, pour son aide informatique!

Mes remerciements s'adressent également à Patrick Vincent et Annie Desrosiers, qui m'ont facilité l'utilisation du microscope confocal et du cytomètre en flux à la faculté, à Mark Hancock et Francis Beaudry, pour leur aide et leurs conseils, ainsi qu'à tous les membres des laboratoires Mourez, Harel et Jacques.

Enfin, je ne peux conclure ce mémoire sans remercier mes parents, qui m'ont initié à la culture et la science nord-américaines dès la vie *in utero*, et sans qui ce défi Outre-Atlantique n'aurait pas eu lieu. Ils ont toujours mis tout en œuvre pour nous offrir un environnement familial chaleureux et nous construire un avenir solide. Leur affection, leur grande détermination et leur profond sens de l'effort n'ont cessé de me motiver durant ces 3 ans et m'ont toujours rappelé de persévérer dans les moments plus difficiles. Merci aussi à mon frère et ma sœur, qui, par leurs appels, leurs emails et leurs courriers, m'ont encouragée.

INTRODUCTION

Pour coloniser et envahir un hôte, une bactérie produit plusieurs types de facteurs de virulence, dont des toxines. Certaines toxines sont sécrétées au contact des cellules hôtes et agissent soit à partir de la surface cellulaire, soit après leur internalisation dans les cellules. D'autres sont directement injectées dans le cytoplasme. Les toxines affectent de nombreux processus physiologiques de l'hôte en ciblant, par exemple, des protéines G, des kinases, le cytosquelette, les ribosomes ou les jonctions serrées, ce qui entraîne, entre autres, la sécrétion d'ions, l'arrêt de la synthèse protéique, la lyse cellulaire, la vacuolisation, l'invasion de l'épithélium, l'inhibition de l'activation lymphocytaire ou encore la rupture des jonctions serrées. Ces altérations permettent à la bactérie de se multiplier au niveau du site d'infection dans des conditions favorables à sa croissance, souvent au détriment des cellules eucaryotes. Elles lui permettent aussi d'échapper au système immunitaire et dans certains cas, d'atteindre d'autres sites de colonisation *via* la circulation sanguine (Kaper *et al.*, 2004).

Parmi les différents pathotypes d'*Escherichia coli* causant des infections intestinales, les *E.coli* entérotoxinogènes (ETEC) sont notamment définies par la production de toxines protéiques spécifiques, appelées entérotoxines (Kaper *et al.*, 2004). Une entérotoxine est considérée comme telle si elle stimule une sécrétion de fluides et d'électrolytes dans divers modèles intestinaux *in vivo* et *in vitro* sans évidence histologique de dommages cellulaires (Sears & Kaper, 1996). Les entérotoxines sécrétées par les ETEC sont soit de poids moléculaire élevé et labiles à la chaleur, soit de poids moléculaire faible et stables à la chaleur. Elles agissent toutes sur les entérocytes en diminuant l'absorption et en augmentant la sécrétion de fluides et d'électrolytes, ce qui entraîne une diarrhée aqueuse, la manifestation clinique des infections par ETEC.

L'entérotoxine de faible poids moléculaire et stable à la chaleur STb se distingue des autres entérotoxines des ETEC par une structure peptidique caractéristique et une activité biologique variable selon l'espèce animale. Elle est principalement identifiée chez des souches isolées de porcs atteints de diarrhée. Cependant, son mécanisme d'action cellulaire intestinal, en particulier au niveau de l'épithélium intestinal porcin, n'est que partiellement compris à ce jour. Ce mémoire porte sur l'étude d'une étape de ce mécanisme d'action, soit l'internalisation de STb, dans deux lignées cellulaires, dont une lignée issue du jéjunum de porc.

RECENSION DES ÉCRITS

1. *Escherichia coli* pathogène

Bien que la majorité des souches d'*Escherichia coli* soient des commensales intestinales des mammifères, quelques unes sont capables de causer des infections intestinales ou extra-intestinales (infections urinaires, septicémies, méningites) (Orskov & Orskov, 1992, Kaper *et al.*, 2004). La survenue de ces infections est associée à la présence de combinaisons particulières de gènes de virulence, appelées virotypes, codant pour l'expression de facteurs de virulence dont des adhésines, toxines, systèmes d'acquisition du fer et autres protéines nécessaires à la colonisation et l'invasion de l'hôte. Ces combinaisons particulières de gènes correspondent à des pathotypes spécifiques. Les *E.coli* pathogènes regroupent à ce jour six pathotypes responsables d'infections intestinales (Kaper *et al.*, 2004) ainsi que les *E.coli* extra-intestinales (Anderson *et al.*, 2004, Mokady *et al.*, 2005, Smith *et al.*, 2007, Wiles *et al.*, 2008) :

- les *E.coli* entéro-pathogènes (EPEC), causant des lésions de type « attachantes et effaçantes » (A/E) avec formation d'un piédestal, par le biais de l'adhésine Intimine, son récepteur Tir et d'un système de sécrétion de type III (T3SS) injectant les protéines effectrices Esp (*E.coli* secreted protein). Ces effecteurs du T3SS peuvent être considérés comme des toxines puisqu'ils perturbent le métabolisme et l'histologie de l'épithélium intestinal de l'hôte après leur livraison intracellulaire (Spears *et al.*, 2006) ;
- les *E.coli* entérohémorragiques (EHEC), caractérisées par une dose infectieuse extrêmement faible, inférieure à 100 bactéries. Leur principal facteur de virulence est la Shiga-like toxin (Stx) ou vérocytotoxine (VT), une toxine A:B₅ causant des diarrhées sanglantes et le syndrome hémolytique urémique (SHU). Ces souches forment également des lésions A/E par un T3SS. D'autres toxines sont produites, comme une hémolysine de type RTX (Repeats in Toxin) (Spears *et al.*, 2006, Gyles, 2007) ;
- les *E.coli* entéroagrégatives (EAEC), adhérant en agrégats de type « briques empilées » (Nataro & Kaper, 1998) grâce aux fimbriae AAF (Aggregative Adherence Fimbriae). Ces souches forment un biofilm épais avec la mucine de l'hôte et sécrètent des entérotoxines et cytotoxines. Parmi ces toxines, on retrouve l'autotransporteur Pic à activité mucinase, l'autotransporteur de type sérine-protéase Pet (Plasmid-encoded toxin), l'entérotoxine ShET1 (*Shigella* enterotoxin 1) et l'entérotoxine entéroagrégative stable à la chaleur

EAST-1 (EnteroAggregative *E.coli* heat-Stable Toxin 1), impliqués dans la sécrétion d'ions par l'épithélium intestinal et le remodelage du cytosquelette (Weintraub, 2007) ;

- les *E.coli* entéroinvasives (EIEC), qui, comme *Shigella*, envahissent les cellules épithéliales hôtes par endocytose, lyse de la vacuole, multiplication intracellulaire et extension de la colonisation aux cellules adjacentes suite au recrutement de l'actine (colite inflammatoire invasive). Les effecteurs Ipa injectés par un T3SS en sont responsables. L'autotransporteur de type serine-protéase SepA et l'entérotoxine ShET1 sont également impliqués dans la cytotoxicité. Cependant, les EIEC ne causent généralement qu'une diarrhée aqueuse (Parsot, 2005) ;

- les *E.coli* médiant l'adhérence diffuse (DAEC), identifiées grâce à leur phénotype d'adhérence diffuse (Diffuse Adherence) à la surface des cellules HEp-2 et HeLa (Scaletsky *et al.*, 1984, Nataro *et al.*, 1987). Elles produisent des adhésines fimbriaires (F1845; Afa (Afimbrial Adhesins) qui, malgré leur dénomination, sont en fait fimbriaires) et des adhésines afimbriaires (AIDA-I, Adhesin Involved in Diffuse Adherence). Après fixation sur son récepteur DAF (Decay Accelerating Factor) à la surface cellulaire, l'adhésine F1845 induit la formation de longues extensions cellulaires par la cellule hôte qui s'enroulent autour de la bactérie adhérente. Le facteur cytotoxique nécrosant (CNF) et des hémolysines sont aussi produites par certaines DAEC (Nataro *et al.*, 1985, Servin, 2005) ;

- les *E.coli* entérotoxigènes (ETEC), exprimant des facteurs de colonisation (CFs) qui assurent leur adhésion à l'épithélium intestinal, et sécrétant aussi différentes toxines de poids moléculaire élevé (LT) et faible (STs). Ces toxines sont typiques des ETEC et entraînent une diarrhée aqueuse (Nagy & Fekete, 2005, Qadri *et al.*, 2005). Les ETEC, comme les EPEC et EHEC, sont aussi pathogènes pour les animaux ;

- les *E.coli* causant des infections extra-intestinales (ExPEC) rassemblent les *E.coli* uropathogènes (UPEC) et les *E.coli* causant des septicémies et méningites (MNEC). Les UPEC produisent des hémolysines, l'autotransporteur de type sérine-protéase Sat et des CNFs, ces derniers étant également produits par les MNEC (Kaper *et al.*, 2004).

L'entérotoxine stable à la chaleur STb, qui est le sujet de ce mémoire, est sécrétée par les ETEC. La prochaine section sera centrée sur ce pathotype d'*E.coli*.

2. *Escherichia coli* entérotoxigène

2.1 Généralités

Les *E.coli* entérotoxigènes (ETEC) sont les plus fréquemment responsables d'infections entériques chez l'humain, en particulier les enfants des pays en développement (Qadri *et al.*, 2005), et chez les animaux de ferme (Fairbrother *et al.*, 2005). La première mise en évidence des ETEC date de 1956 (De *et al.*, 1956). Des souches de *E.coli* isolées d'enfants et d'adultes en Inde présentant une pathologie semblable au choléra causent une accumulation de fluides dans des segments ligaturés d'iléon de lapin, comme le fait *V.cholerae*. En 1968, Sack rapporte la présence de *E.coli* dans les fèces et le petit intestin d'enfants et d'adultes présentant eux aussi une affection semblable au choléra (Sack, 1968). Les cultures vivantes et les filtrats de culture de ces isolats entraînent une forte sécrétion dans les anses ligaturées iléales de lapin (Gorbach *et al.*, 1971, Sack *et al.*, 1971). Le sérotype de *E.coli* O148:K?:H28 est reconnu comme la cause de la diarrhée du voyageur (Rowe *et al.*, 1970). Ces souches sont aussi responsables de diarrhée sévère chez plusieurs espèces animales dont le porc, le veau et le lapin (Smith & Halls, 1967a, Gyles & Barnum, 1969, Smith & Linggood, 1971). Différentes études, chez le porc notamment, permettent finalement l'identification de leurs principaux mécanismes de virulence, dont la production de toxines et de facteurs de colonisation spécifiques (Smith & Halls, 1967b, Sack *et al.*, 1974, So *et al.*, 1978, Gill & Richardson, 1980, Gaastra & de Graaf, 1982, Rao, 1985, Nataro & Kaper, 1998).

Les ETEC sont définies par deux critères les différenciant des autres pathotypes de *E.coli* causant la diarrhée (Gaastra & de Graaf, 1982, Gaastra & Svennerholm, 1996, Kaper *et al.*, 2004, Qadri *et al.*, 2005) :

- la production de un ou plusieurs facteurs de colonisation (CFs), permettant l'adhérence des bactéries à des récepteurs de l'épithélium du petit intestin de l'hôte, sans induire de modifications histologiques significatives. L'adhésion bactérienne est essentielle à l'initiation du processus infectieux. Ces adhésines sont attachées à la surface de la bactérie et sont, dépendamment des souches, soit

des fimbriae (filaments polymériques), soit des adhésines non filamenteuses (une seule protéine monomérique ou oligomérique);

- l'expression d'une ou plusieurs entérotoxines protéiques, de poids moléculaire élevé et labile à la chaleur (LT) ou de poids moléculaire faible et stables à la chaleur (STs). Suite à l'attachement et la multiplication des bactéries, ces entérotoxines agissent sur les cellules épithéliales intestinales en diminuant l'absorption et en augmentant la sécrétion de fluides et d'électrolytes, pour finalement causer une diarrhée aqueuse.

Ces facteurs de colonisation et entérotoxines sont codés et régulés par de grands plasmides transmissibles. Leur fonction est dépendante de facteurs de l'hôte, comme les récepteurs présents sur la membrane des entérocytes ainsi que les enzymes et les messagers intracellulaires qu'ils ont pour cible.

Les isolats cliniques ETEC issus d'humains et d'animaux appartiennent à un grand nombre de sérotypes (Nagy & Fekete, 1999, Qadri *et al.*, 2005), définis par l'antigène O du LPS de la membrane externe et l'antigène flagellaire H (Kaper *et al.*, 2004). L'antigène O associé aux ETEC confère la plus grande variété, avec O6, O78, O8, O128 et O153 comme sérotypes majeurs chez les souches humaines (Wolf, 1997) et O8, O9, O20, O101, O138, O141, O149, O157 chez les souches animales (Nagy & Fekete, 1999). Le sérotype O149 est malgré tout prédominant parmi les souches ETEC porcines (Fairbrother *et al.*, 2005). Les sérotypes H sont aussi variés mais plus limités. Le sérotypage est donc moins efficace pour l'identification des ETEC.

La pathogenèse des ETEC (Figure 1) (www.ecl-lab.com) débute par l'ingestion de bactéries présentes dans l'environnement (eau, nourriture contaminées par les déchets humains ou animaux). Dans le tractus intestinal, les ETEC adhèrent intimement aux entérocytes en se fixant sur des récepteurs spécifiques *via* leurs adhésines fimbriaires ou afimbriaires. Selon le type d'adhésine exprimé par la souche, la colonisation bactérienne a lieu principalement sur les muqueuses du jéjunum et/ou de l'iléon. L'attachement n'induit pas de lésions morphologiques de l'épithélium. Les toxines sont alors sécrétées par la bactérie adhérente. Elles agissent sur les entérocytes, entraînant une perte d'eau et d'électrolytes dans la lumière intestinale, responsable de la diarrhée. La période

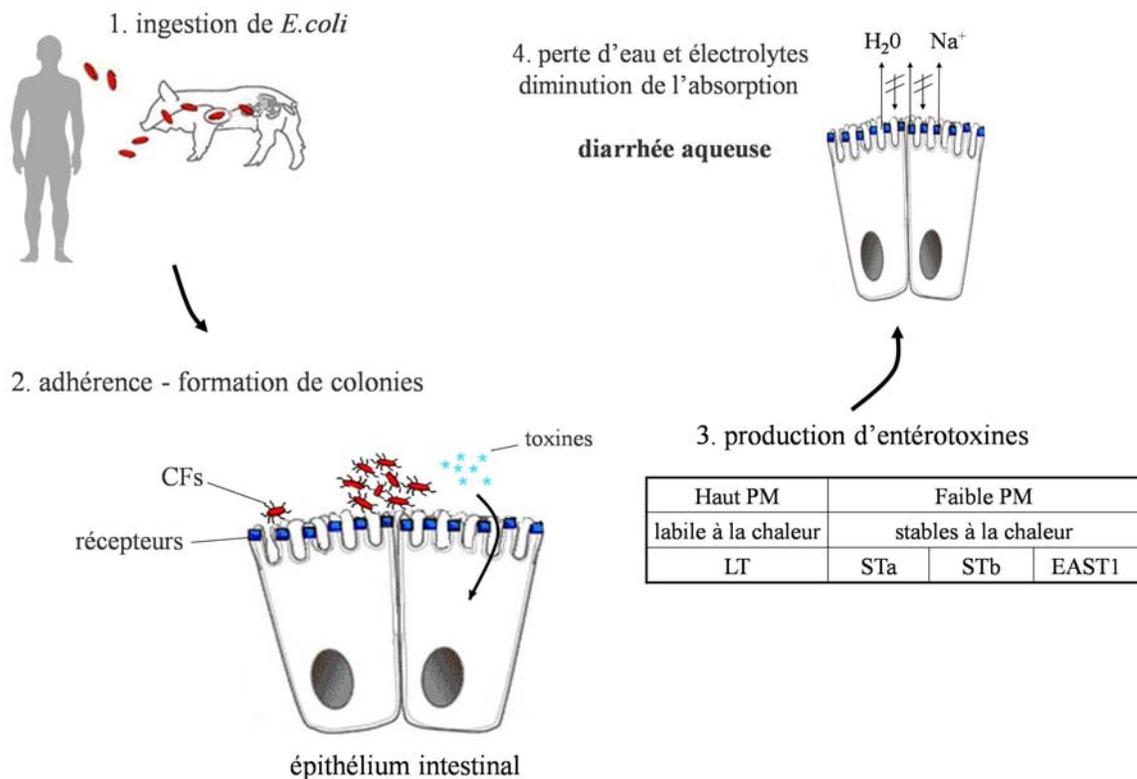


Figure 1. Pathogenèse des *Escherichia coli* entérotoxigènes. (1) les ETEC présentes dans l'environnement sont ingérées par l'hôte; (2) dans l'intestin, elles adhèrent intimement aux entérocytes du jéjunum et/ou de l'iléon par l'intermédiaire de leurs facteurs de colonisations fimbriaires ou afimbriaires (CFs) en se fixant sur des récepteurs spécifiques, puis se multiplient localement en formant des colonies; (3) plusieurs entérotoxines (LT, STs) seules ou en combinaison peuvent être sécrétées. Elles agissent sur le métabolisme des cellules cibles, soit à partir de la surface de la cellule, soit après internalisation dans le cytoplasme; (4) la perte d'eau et d'électrolytes vers la lumière intestinale ainsi que la diminution de l'absorption des ions et des fluides qu'elles entraînent causent finalement la diarrhée aqueuse chez l'hôte. Adapté de la référence (www.ecl-lab.com).

d'incubation des ETEC se situe entre 10 heures et 3 jours, selon le type de souche et les entérotoxines sécrétées (Gupta *et al.*, 2008). La maladie dure habituellement entre 3 et 5 jours chez l'humain (Dalton *et al.*, 1999) et entre 1 et 5 jours chez le porc (Fairbrother *et al.*, 2005). Les manifestations cliniques peuvent être modérées sans déshydratation, ou sévères avec déshydratation, perte de poids et décès éventuel du patient ou de l'animal. Des complications extra-intestinales (septicémies post-diarrhéiques) sont observées chez le porc (Fairbrother & Ngeleka, 1994, Berberov *et al.*, 2004).

Chez l'humain, l'épidémiologie des infections entériques par ETEC est reliée aux faibles conditions socio-économiques dans les pays en développement où la situation sanitaire est médiocre. Selon des estimations récentes, les ETEC sont responsables chaque année de 840 millions de cas d'infections entériques, parmi lesquels 300-400 millions chez des enfants de moins de 5 ans, et d'environ 380 000 décès dans le monde, même si 50 millions d'enfants de moins de 5 ans sont des porteurs asymptomatiques (Wenneras & Erling, 2004, Sanchez & Holmgren, 2005, Gupta *et al.*, 2008). Les ETEC sont la cause la plus courante de la diarrhée du voyageur (Rowe *et al.*, 1970, Sanchez & Holmgren, 2005). Chez l'homme, la susceptibilité aux infections par ETEC a récemment été liée au groupe sanguin A ou AB, ainsi qu'au groupe sanguin de Lewis de type « a » (Qadri *et al.*, 2007, Ahmed *et al.*, 2009). Les antigènes des groupes sanguins ABO et de Lewis sont des résidus saccharidiques de composition variable conjugués à des protéines ou des lipides (Morgan & Watkins, 2000). En plus d'être exposés à la surface des érythrocytes, ces antigènes sont aussi présents à la surface de la muqueuse intestinale (Bjork *et al.*, 1987). La susceptibilité aux infections selon le groupe sanguin peut notamment s'expliquer par le fait que les fimbriae CFA/I exprimés par les ETEC infectant les humains (cf. paragraphe 2.2.1) se lient à des glycosphingolipides intestinaux portant des antigènes de Lewis de type « a » mais non de type « b » (Jansson *et al.*, 2006).

Chez les animaux de ferme, en particulier le veau et le porc, les ETEC constituent un pathotype majeur de *E.coli* responsable de diarrhées sévères (colibacilloses entériques), typiquement après la naissance et également quelques jours après le sevrage chez le porc (diarrhée post-sevrage) (Nagy & Fekete, 2005). Ce genre de pathologie est par contre rare voire inexistante chez le lapin, les chevaux et la volaille (Nagy & Fekete,

2005). La diarrhée post-sevrage est une des plus importantes maladies affectant l'industrie porcine (Fairbrother *et al.*, 2005). La diarrhée débute quelques jours après l'arrêt de l'allaitement. La perte de poids, les retards de croissance, le traitement antibiotique et le décès fréquent des animaux sont un coût important pour les élevages. Dans l'environnement, les ETEC sont capables de survivre au moins 6 mois protégées dans le fumier (van Beers-Schreurs *et al.*, 1992) et peuvent être disséminées par la nourriture, les autres porcs ou d'autres espèces animales (Fairbrother *et al.*, 2005). La dose infectieuse se situe entre 10^5 et 10^7 bactéries (Fairbrother J.M., communication personnelle). Le stress, un environnement microbiologique nouveau, le manque d'anticorps maternels et les changements d'alimentation suite au sevrage contribuent à la survenue et la sévérité de la pathologie. La présence de récepteurs à la surface des cellules épithéliales intestinales pour certains facteurs de colonisation des ETEC varie selon l'âge des porcelets, les rendant plus ou moins susceptibles aux infections. L'existence de récepteurs spécifiques aux espèces et la dose infectieuse élevée des ETEC chez l'humain (10^6 - 10^{10} bactéries (Gupta *et al.*, 2008)) suggèrent que les souches animales ne représentent pas de véritable danger pour l'homme et les rendent difficilement transmissibles par voie directe, contrairement aux EHEC O157:H7 ou encore à *Shigella* (Nagy & Fekete, 2005). Les similarités entre la pathogenèse chez l'homme et les animaux permettent par contre l'étude des infections humaines dans des modèles animaux.

Les facteurs de colonisation et entérotoxines des ETEC sont développés dans les paragraphes 2.2 et 2.3 qui suivent. L'entérotoxine STb sera décrite en détail dans la section 3 de cette revue.

2.2 Facteurs de colonisation

Les facteurs de colonisation (CFs) exprimés par les ETEC sont des structures protéiques exposées à la surface de la bactérie. Les CFs les plus communs chez les ETEC sont les fimbriae mais plusieurs adhésines afimbriaires ont aussi été mises en évidence. Les facteurs de colonisation interviennent dans les étapes précoces de l'infection de l'hôte, en assurant l'attachement des bactéries au petit intestin et la colonisation de la muqueuse

intestinale malgré le péristaltisme. Leurs différentes spécificités de liaison à des récepteurs assurent le tropisme des souches pour certaines espèces et certains hôtes au sein d'une même espèce.

2.2.1 Fimbriae

Les fimbriae des ETEC sont des appendices de surface filamenteux protéiques, droits, incurvés ou ondulés, et dont les sous-unités majeures sont de poids moléculaires variables (15-25 kDa) (Gaastra & Svennerholm, 1996, Nagy & Fekete, 1999, Qadri *et al.*, 2005). Ils sont composés de sous-unités protéiques majeures et mineures. La fonction d'adhésion peut être assurée par les sous-unités majeures ou par des protéines spécifiques situées au bout des filaments. Les fimbriae des ETEC ont été premièrement désignés comme l'antigène K et sont maintenant identifiés par la lettre F associée à un nombre (Gaastra & de Graaf, 1982, Nagy & Fekete, 1999, Qadri *et al.*, 2005). Sur cette base, on distingue entre autres F2, correspondant au CFA/I des ETEC humaines, ainsi que F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P) et F18, chez les souches animales. Une autre nomenclature les désignant comme les « Coli Surface antigens » (CS) existe également (Gaastra & Svennerholm, 1996). La capacité des CFs à agglutiner les érythrocytes de différentes espèces a aussi été utilisée pour leur classification.

Les opérons codant pour les fimbriae des souches ETEC humaines et animales sont situés sur de grands plasmides (Gaastra & Svennerholm, 1996, Van den Broeck *et al.*, 2000). Ils comprennent des gènes codant pour les protéines constituant les sous-unités majeures du fimbriae (pilines) et les sous-unités mineures, ainsi que des gènes codant pour les protéines régulant l'expression du fimbriae et les protéines d'assemblage du fimbriae de type chaperone périplasmique et protéine « usher » de la membrane externe (Gaastra & Svennerholm, 1996, Mu *et al.*, 2008). Leur expression est gouvernée par différents mécanismes de variations de phase qui reflètent les changements environnementaux (température, pH) et qui assurent l'adaptation des bactéries à l'environnement (Hacker, 1992, Nagy & Fekete, 1999).

Chez les ETEC isolées d'humains, plus de 20 facteurs de colonisation fimbriaires ont été décrits. Les plus fréquemment détectés sont les fimbriae CFA/I et CS6 (Gyles &

Barnum, 1969, Sack *et al.*, 2007). Aucun facteur de colonisation associé à l'humain n'a cependant pu être mis en évidence chez les souches ETEC exprimant l'entérotoxine STb (Lortie *et al.*, 1991, Dubreuil, 1997). Les fimbriae CFA/I et CS6 ne seront donc pas décrits dans cette revue.

Les CFs des ETEC animales sont clairement différents des CFs des souches destinées à coloniser l'humain. Les adhésines les plus connues des ETEC infectant les animaux sont les fimbriae de surface F4(K88), F5(K99), F6(987P) et F18 (Nagy & Fekete, 2005). Les fimbriae F5 et F6 sont associés aux ETEC responsables de diarrhée chez le veau et le porc nouveau-nés mais ne sont pas retrouvés en association avec la toxine STb. Chez les ETEC porcines par contre, les fimbriae F4 et F18 sont fréquemment identifiés en combinaison avec STb. La majorité des souches *E.coli* isolées de porcs malades dans les études récentes sont soit F4- soit F18-positives (Frydendahl, 2002, Zhang *et al.*, 2007). Le fimbriae F4 est associé à la diarrhée chez les porcelets nouveau-nés et sevrés alors que F18 est typiquement associé à la diarrhée chez le porc sevré (Fairbrother *et al.*, 2005). Certaines souches ETEC peuvent aussi produire plusieurs adhésines en même temps, comme F4/F18, mais le rôle de ces combinaisons dans la pathogenèse n'a pas été déterminé (Nagy & Fekete, 1999).

2.2.2 Adhésines afimbriaires

L'adhésine impliquée dans l'adhérence diffuse AIDA-I (*Adhesin Involved in Diffuse Adherence*) a été identifiée comme adhésine potentielle chez les souches ETEC porcines F18-positives causant la diarrhée post-sevrage (Niewerth *et al.*, 2001, Mainil *et al.*, 2002, Ha *et al.*, 2003, Ngeleka *et al.*, 2003). AIDA-I est une protéine de la catégorie des autotransporteurs ancrée dans la membrane externe bactérienne et responsable du phénotype d'adhérence diffuse des DAEC (Benz & Schmidt, 1989, Benz & Schmidt, 1992). La prévalence du gène *aidA* codant pour AIDA-I est significativement plus élevée chez les souches *E.coli* isolées de porcs atteints de diarrhée comparé aux souches issues de porcs sans infection intestinale (Niewerth *et al.*, 2001, Ngeleka *et al.*, 2003). AIDA-I est donc positivement associé à la survenue de la pathologie chez le porc. Le gène est absent des *E.coli* issues d'autres animaux (Niewerth *et al.*, 2001). Le gène *aidA* est

retrouvé sur de grands plasmides et est plus prévalent chez les souches F18-positives (Niewerth *et al.*, 2001, Zhao *et al.*, 2009). Il est aussi associé au gène codant pour la toxine STb chez les ETEC isolées de porcs nouveau-nés et sevrés présentant une diarrhée et les observations montrent que la protéine joue un rôle dans la colonisation de l'intestin porcin par ces souches (cf. section 3, paragraphe 3.4) (Ha *et al.*, 2003, Ngeleka *et al.*, 2003).

Des adhésines non fimbriaires potentiellement impliquées dans la diarrhée humaine et animale sont continuellement mises en évidence. Paa (Porcine attaching- and effacing-associated protein), au départ identifié chez une souche EPEC porcine (Batisson *et al.*, 2003), a été proposé comme adhésine des ETEC de sérotype O149 F18-positives causant la diarrhée post-sevrage chez le porc (An *et al.*, 1999, Leclerc *et al.*, 2007). Son rôle dans la pathogenèse chez le porc est encore inconnu. D'autres études indiquent que EtpA, une protéine associée au flagelle des ETEC (Fleckenstein *et al.*, 2006), permet l'adhésion entre le flagelle et les cellules hôtes et favorise la colonisation des bactéries dans l'intestin (Roy *et al.*, 2008, Roy *et al.*, 2009). Ces interactions flagelles-entérocytes seraient précoces et transitoires et faciliteraient l'adhésion médiée par les fimbriae (Roy *et al.*, 2009). La contribution de EtpA dans l'adhérence des ETEC humaines et animales doit encore être définie.

2.3 Entérotoxines

Les entérotoxines synthétisées et sécrétées par les souches ETEC sont des protéines classées selon leur poids moléculaire et leur stabilité à la chaleur. On distingue la toxine LT (poids moléculaire élevé, labile à la chaleur), correspondant à deux variants, LT-I et LT-II, et les toxines STs (faible poids moléculaire, stables à la chaleur), regroupant STa, STb et EAST1 (Kaper *et al.*, 2004). Contrairement aux facteurs de colonisation, les entérotoxines agissent dans les étapes tardives de la pathogenèse chez l'hôte. Suite à l'attachement bactérien à l'épithélium, elles sont sécrétées au niveau des cellules hôtes puis stimulent une sécrétion et diminuent l'absorption de fluides par les entérocytes sans évidence histologique *in vitro* de dommages cellulaires (diarrhée aqueuse) (Sears & Kaper, 1996). D'autres toxines connues sont fréquemment détectées chez les ETEC,

comme l' α -hémolysine ou la Shiga-like toxin 2e (Stx2e), mais, bien qu'elles augmentent la pathogénicité des souches, elles ne sont pas caractéristiques de ce pathotype.

2.3.1 Toxine de haut poids moléculaire : LT

2.3.1.1 Généralités

La toxine LT des ETEC fut identifiée en 1969 chez des souches de *E.coli* pathogènes chez le porc (Gyles & Barnum, 1969). La toxine est responsable de diarrhée chez l'humain (Qadri *et al.*, 2005, Sanchez & Holmgren, 2005) et chez les animaux (Fairbrother *et al.*, 2005, Nagy & Fekete, 2005). Elle est impliquée en particulier dans la survenue de la diarrhée sévère et de la septicémie post-diarrhéique chez le porc (Berberov *et al.*, 2004).

LT est une toxine de 84 kDa de structure A:B_x (Figure 2a) dans laquelle la sous-unité A porte l'activité enzymatique et est associée de façon non covalente aux 5 sous-unités B identiques formant un pentamère en anneau (Sixma *et al.*, 1991, Sixma *et al.*, 1993). Ce pentamère est responsable de la liaison au récepteur, le ganglioside GM1 (Figure 2b) à la surface de la cellule hôte (Spangler, 1992, De Haan & Hirst, 2004). La sous-unité A est constituée d'un premier domaine nommé A1 portant une activité ADP-ribosyl transférase, lié par un pont disulfure à un second domaine A2, qui attache A1 à la sous-unité B (Figure 2a).

La littérature rapporte 2 formes de toxine LT, LT-I et LT-II, différant par leurs sous-unités B (environ 60% d'homologie) (Pickett *et al.*, 1987, Pickett *et al.*, 1989, Sears & Kaper, 1996). LT-I est similaire à la toxine cholérique (CT) de *V.cholerae*. C'est la forme la plus fréquemment identifiée chez les souches ETEC humaines et animales. LT-II n'est que rarement isolée chez les souches humaines (Seriwatana *et al.*, 1988) et n'est pas associée à la maladie chez l'animal (Holmes *et al.*, 1986).

2.3.1.2 Génétique et sécrétion

Les gènes codant pour LT chez *E.coli* sont regroupés au sein d'un opéron situé dans des éléments transposables présents sur de grands plasmides de virulence (So *et al.*, 1978, Schlor *et al.*, 2000). Ces plasmides portent aussi des gènes codant pour d'autres entérotoxines des ETEC et des fimbriae. Les sous-unités A et B de LT sont codées par

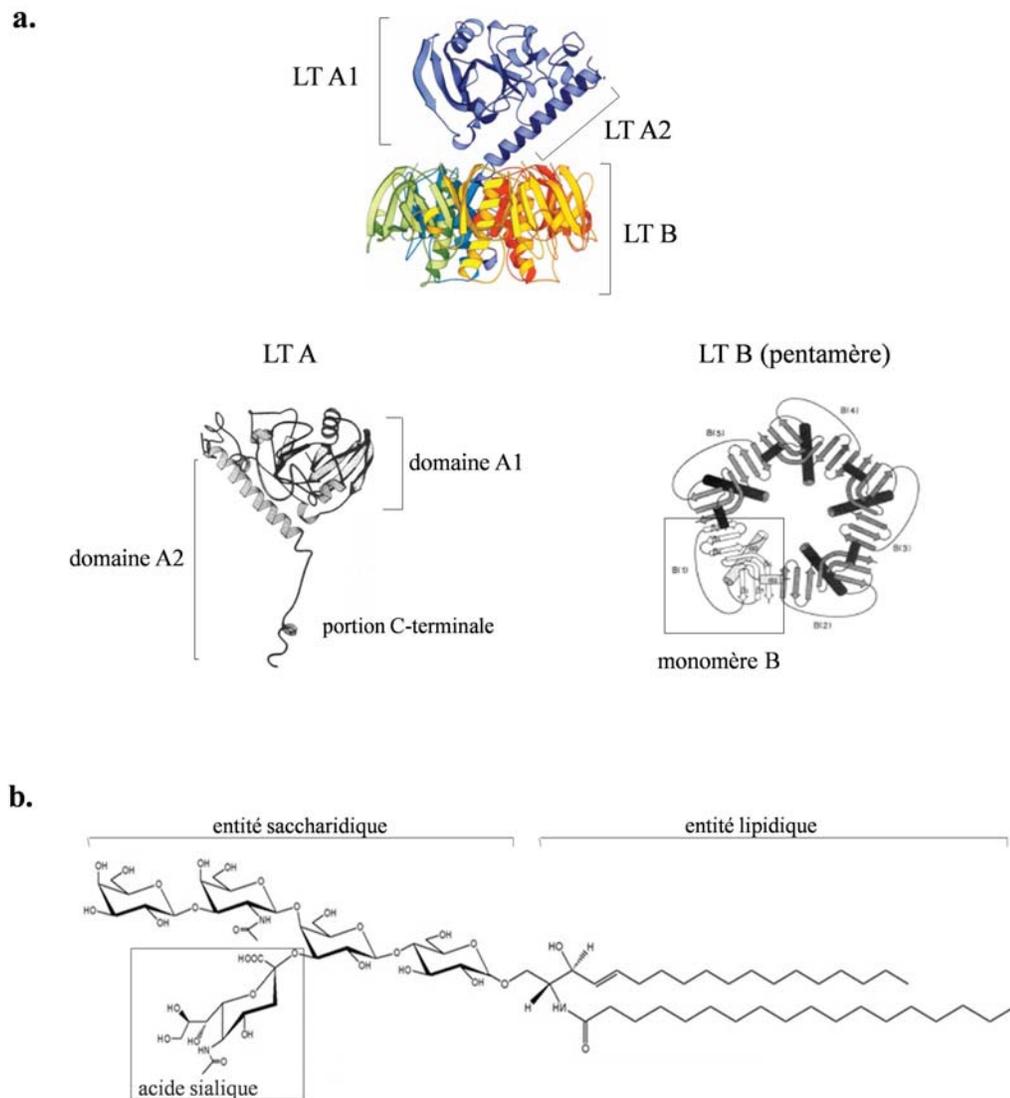


Figure 2. Entérotoxine LT des ETEC. (a) structure cristallographique de l'holotoxine (complexe A:B₅) et structure secondaire des sous-unités A et B. La portion C-terminale du domaine A2 de la sous-unité A pénètre dans le pore central formé par le pentamère B, lui-même composé des monomères de sous-unités B. **(b)** structure du récepteur, le monosialoganglioside GM1. Adapté des références (Sixma *et al.*, 1991, Spangler, 1992, Sixma *et al.*, 1993, De Haan & Hirst, 2004).

deux gènes nommés *eltA* et *eltB*, respectivement. Comme pour CT, les monomères des sous-unités A et B de LT sont transloqués au travers de la membrane interne bactérienne par le système Sec puis repliés et assemblés en holotoxine de type A:B₅ (Figure 2a) dans le périplasma (Sandkvist *et al.*, 1997, Tauschek *et al.*, 2002). Le mécanisme de sécrétion de la toxine LT vers le milieu extérieur est toujours sujet à discussion. D'une part, la toxine LT présente dans le périplasma serait sécrétée par des systèmes de sécrétion de type II (T2SS) (Tauschek *et al.*, 2002, Horstman & Kuehn, 2002, Strozen & Howard, 2009), comme CT (Sandkvist *et al.*, 1997). Elle serait ensuite associée aux LPS membranaires *via* la sous-unité B (Horstman & Kuehn, 2002) en interagissant avec des résidus saccharidiques du *core* externe du LPS (Horstman *et al.*, 2004, Mudrak *et al.*, 2009). La toxine serait finalement libérée par les OMVs (Outer Membrane Vesicles, vésicules de membrane externe) bourgeonnant à partir de la membrane externe (Horstman & Kuehn, 2000, Horstman & Kuehn, 2002). Les OMVs sont des protéoliposomes de 50 à 200 nm de diamètre constitués de lipides et de protéines de membrane externe ainsi que de protéines périplasmiques, libérés de manière constitutive et inductible par les espèces pathogènes et non-pathogènes de Gram-négatifs (Kuehn & Kesty, 2005, Mashburn-Warren & Whiteley, 2006). D'autre part, la toxine LT présente dans le périplasma serait aussi directement libérée par la formation des OMVs, étant donné que LT est également trouvée à l'intérieur des vésicules (Horstman & Kuehn, 2000, Horstman & Kuehn, 2002). Lors du contact avec la cellule hôte, la sécrétion de la toxine est focalisée à un pôle bactérien, permettant aux ETEC de livrer LT en empêchant sa neutralisation par les anticorps de la muqueuse intestinale (Dorsey *et al.*, 2006).

Les OMVs portant la toxine LT sont captées et internalisées par la cellule hôte *in vitro*, ce qui entrainerait l'effet toxique de la protéine (Kesty *et al.*, 2004). Bien que LT associée aux OMVs induise le même type de toxicité cellulaire *in vitro* que la toxine purifiée soluble (Horstman & Kuehn, 2000), l'effet de LT en présence ou en absence d'OMVs n'a pas été directement comparé. Il n'est donc pas établi si les OMVs potentialisent l'activité biologique de la toxine en plus de la véhiculer. Il n'est pas non plus prouvé que la quantité de toxine LT associée aux vésicules soit suffisante pour initier la diarrhée clinique *in vivo*.

2.3.1.3 Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action de la toxine LT est semblable à celui de la toxine CT et abondamment décrit dans de nombreuses revues (Figure 3) (Spangler, 1992, Sears & Kaper, 1996, Sandvig *et al.*, 1997, De Haan & Hirst, 2004, Hirst & D'Souza, 2006, Sanchez & Holmgren, 2008). La toxine se lie d'abord de façon irréversible et avec grande affinité à son récepteur, le GM1, un monosialoganglioside de la membrane cellulaire des entérocytes (Figure 2b). Le site de liaison aux résidus saccharidiques du GM1 se situe à l'interface de deux sous-unités B, ce qui explique la force de fixation beaucoup plus élevée du pentamère comparée à celle de chaque monomère individuel (Tsuji *et al.*, 1985, Merritt *et al.*, 1994). La sous-unité B de LT peut se lier à d'autres glycosphingolipides et à des glycoprotéines à la surface des cellules intestinales de plusieurs espèces animales (Zemelman *et al.*, 1989, Griffiths & Critchley, 1991, Balanzino *et al.*, 1999). Ces molécules membranaires différentes du GM1 pourraient aussi servir de récepteurs fonctionnels et jouer un rôle dans l'activité biologique à la toxine LT. Il est en effet établi que l'holotoxine LT déclenche un effet toxique *in vitro* et *in vivo* même en présence d'un excès de sous-unité B de CT bloquant le GM1 disponible (Galvan *et al.*, 1999, Galvan *et al.*, 2006).

Suite à la fixation au GM1, l'holotoxine est internalisée dans la cellule par endocytose récepteur-dépendante et est ensuite amenée par transport rétrograde vers le Golgi et le réticulum endoplasmique (Figure 3) (Bastiaens *et al.*, 1996, Torgersen *et al.*, 2001). Dans la lumière du réticulum, la sous-unité A responsable de l'activité toxique de LT, est clivée, libérant le domaine A1 actif du reste de la toxine. Ce fragment A1 est transloqué dans le cytoplasme et migre jusqu'à la membrane basolatérale des entérocytes. Il modifie alors de façon covalente la sous-unité α de la protéine G_s , une protéine liant le GTP et régulant l'activité de l'adénylate cyclase (AC). Cette modification entraîne l'activation constitutive de l'AC et la production accrue d'AMP cyclique (AMPc). L'augmentation intracellulaire d'AMPc conduit à l'activation de la protéine kinase A AMPc-dépendante (PKA), qui phosphoryle ensuite un domaine du canal CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) situé dans la membrane apicale. L'efflux continu d'ions chlorures et d'eau dans le lumen intestinal est aussi associé à une

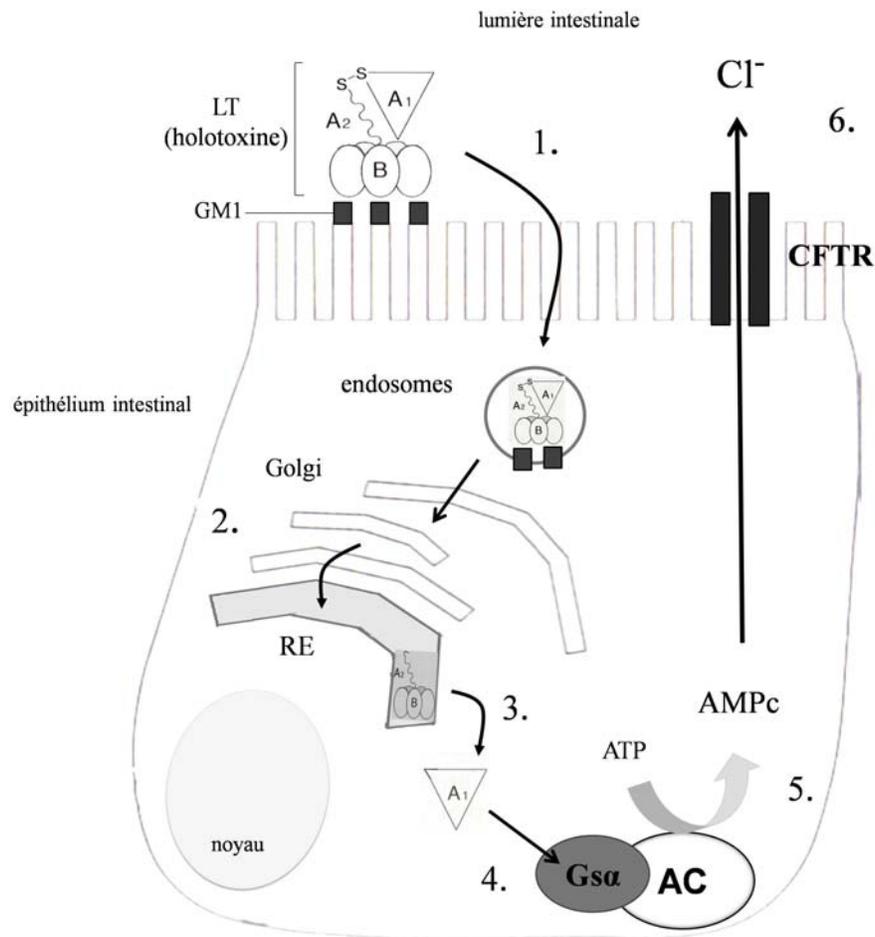


Figure 3. Trafic et effets intracellulaires de l'entérotoxine LT. (1) fixation au récepteur membranaire GM1 et internalisation récepteur-dépendante dans les endosomes; (2) transfert vers le réticulum endoplasmique (RE) *via* l'appareil de Golgi; (3) clivage du domaine A1 dans la lumière du RE et translocation dans le cytoplasme; (4) au pôle basal des entérocytes, fixation covalente du domaine A1 à la protéine G_{sα} régulant l'adenylate cyclase (AC); (5) activation constitutive de l'AC et augmentation des concentrations cytoplasmiques d'AMPC; (6) activation du canal membranaire CFTR et sécrétion d'ions Cl⁻ et d'eau, causant la diarrhée. Adapté des références (Hirst & D'Souza, 2006, Massignani *et al.*, 2006).

diminution de l'entrée de sodium et d'eau dans les cellules. La perte de fluides conduit à une diarrhée aqueuse importante (Figure 3) (Hirst & D'Souza, 2006).

2.3.1.4 LT et adhésion bactérienne

En plus de l'entérotoxicité, LT joue un rôle dans l'adhésion bactérienne. La présence de LT chez certaines souches ETEC favorise la colonisation bactérienne du petit intestin porcin (Berberov *et al.*, 2004, Zhang *et al.*, 2006) et murin (Allen *et al.*, 2006), ainsi que l'adhésion à différents types de cellules épithéliales intestinales *in vitro* (Johnson *et al.*, 2009). Des résultats similaires ont été observés pour CT dans un modèle de lapin (Pierce *et al.*, 1985). Pour expliquer le phénotype d'adhésion de LT, il a été suggéré que la toxine agisse directement comme une adhésine, *via* la sous-unité B formant un pont entre les LPS des OMVs et le GM1 des entérocytes (Horstman & Kuehn, 2000, Horstman & Kuehn, 2002, Kesty *et al.*, 2004). Des résultats récents indiquent que la promotion de l'adhésion est principalement due à l'activité ADP-ribosylante de la sous-unité A (Figure 2a), la sous-unité B ne jouant qu'un rôle secondaire (Johnson *et al.*, 2009). L'AMPC libéré par les cellules hôtes sous l'effet de la sous-unité A (Figure 3) augmenterait en fait la transcription des sous-unités du fimbriae F4, favorisant ainsi l'adhésion bactérienne (Johnson *et al.*, 2009).

2.3.2 Toxines de faible poids moléculaire

Les toxines de faible poids moléculaire des ETEC regroupent STa, EAST1 et STb. STa est associée à la maladie à la fois chez les humains et les animaux. EAST1 est très semblable à STa et trouvée également dans d'autres pathotypes de *E.coli*. Enfin, STb est associée principalement à la diarrhée chez les porcelets. Elles sont décrites dans plusieurs revues (Dubreuil, 1997, Hasegawa & Shimonishi, 2005, Bolin *et al.*, 2006, Dubreuil, 2006b, Dubreuil, 2006a, Veilleux & Dubreuil, 2006).

2.3.2.1 *STa*

2.3.2.1.1 Généralités

STa (ST-I) est un analogue structurel de la guanyline, un peptide endogène régulant le transport d'eau et d'électrolytes au travers de l'épithélium intestinal (Greenberg *et al.*, 1997). La toxine *STa* a été mise en évidence pour la première fois chez des souches infectant le porc et le veau (Dreyfus *et al.*, 1983, Thompson & Giannella, 1985). *STa* est un peptide acide (pI 3.98) et de faible poids moléculaire (~2 kDa), composé de 18 ou 19 acides aminés (a.a.), selon sa présence chez des souches porcines ou humaines (*STap*, *STah*) (Figure 4a) (Moseley *et al.*, 1983). Sa structure est maintenue par trois ponts disulfures (Figure 4a, b). En comparaison, la guanyline comprend 15 a.a. et deux ponts disulfures. *STa* résiste 15 minutes à 100°C et est insensible aux protéases intestinales comme la trypsine. Contrairement à *STb*, la toxine est soluble dans le méthanol et induit une sécrétion de fluides chez le souriceau nouveau-né (cf. section 3, paragraphe 3.1). Les trois ponts disulfures sont nécessaires à la toxicité et confèrent au peptide son repliement, qui est impliqué dans sa plus grande résistance aux protéases par rapport à la guanyline (Figure 4b) (Carpick & Gariepy, 1993, Bolin *et al.*, 2006, Tian *et al.*, 2008). Treize a.a. C-terminaux assurent l'activité toxique, parmi lesquels les a.a. 11 à 14 (séquence consensus N-P-A-C, Asn-Pro-Ala-Cys) qui constituent le domaine d'interaction avec le récepteur (Gariepy *et al.*, 1986, Ozaki *et al.*, 1991). Certains a.a. C-terminaux sont conservés chez des peptides thermostables homologues ayant une activité biologique similaire et synthétisés par d'autres pathogènes entériques, comme *Y.enterocolitica* et *V.cholerae* non-O1, et dans la guanyline (Figure 4c) (Sears & Kaper, 1996, Dubreuil, 2006b).

Le gène *estA* codant pour *STa* est localisé sur plusieurs plasmides et fait partie d'un transposon (So & McCarthy, 1980). *STa*(p/h) est traduit sous la forme d'un précurseur de 72 a.a. (pré-pro-peptide), transloqué dans le périplasme par le système Sec puis clivé après la séquence signal N-terminale de 19 a.a. par une signal peptidase (Okamoto & Takahara, 1990, Rasheed *et al.*, 1990). Le pro-peptide de 53 a.a. restant est à son tour clivé dans le périplasme par une protéase indéterminée, éliminant la pro-région et libérant le peptide mature de 18 ou 19 a.a. biologiquement actif (Yamanaka *et al.*, 1997). La pro-région optimiserait la translocation au travers de la membrane interne

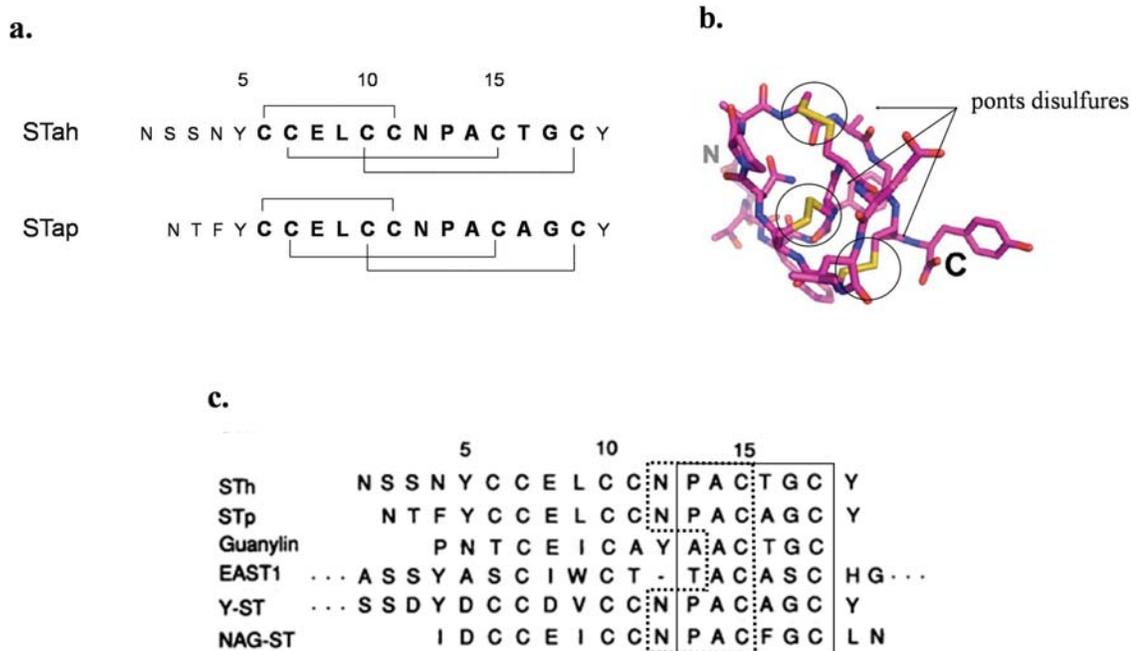


Figure 4. Entérotoxine STa des ETEC. (a) séquence primaire de STah et STap, montrant les 3 ponts disulfures. Les 13 a.a. C-terminaux constituant le domaine de liaison et d'activation de la GC-C sont indiqués en gras (Garipey *et al.*, 1986). (b) modélisation de la structure tertiaire de STa après formation des 3 ponts disulfures et repliement. (c) comparaison des séquences en a.a. de STah, STap, leur analogue endogène guanyline, EAST1 et de peptides analogues chez *Y.enterolytica* (Y-ST) et *V.cholerae* non-O1 (NAG-ST). trait continu : séquence commune à tous les peptides, motif (a.a. non polaire, Ala, Cys, a.a. polaire, Cys); trait discontinu : a.a. communs de la séquence consensus N-P-A-C. Adapté des références (Savarino *et al.*, 1991, Dubreuil, 2006b, Tian *et al.*, 2008).

(Yamanaka & Okamoto, 1996). Le peptide mature est finalement sécrété vers le milieu extracellulaire par le canal de membrane externe TolC (Yamanaka *et al.*, 1998). La formation des ponts disulfures intramoléculaires est sujette à controverse : elle aurait lieu soit dans le périplasma *via* l'oxydoréductase DsbA (Yamanaka *et al.*, 1994), soit dans le milieu extracellulaire indépendamment de DsbA (Batisson & der Vartanian, 2000).

Concernant l'importance clinique de la toxine STa, la combinaison STa/LT est fréquemment associée aux ETEC responsables de diarrhée chez l'enfant et chez le voyageur (Steinsland *et al.*, 2002, Bolin *et al.*, 2006). STa est aussi particulièrement associée aux ETEC causant la diarrhée chez les veaux et les porcelets nouveau-nés, où elle est la seule entérotoxine retrouvée, et est également produite par certaines ETEC impliquées dans la diarrhée porcine du post-sevrage, mais rarement comme la seule entérotoxine (Fairbrother *et al.*, 2005, Nagy & Fekete, 2005).

2.3.2.1.2 Mécanisme d'action

Une fois libéré par les bactéries au contact de l'épithélium intestinal, STa se lie à une protéine de la membrane apicale des entérocytes, la guanylate cyclase C (GC-C), comme le fait la guanyline (Figure 5) (Hasegawa & Shimonishi, 2005, Dubreuil, 2006b). La guanylate cyclase C (environ 140 kDa) possède un domaine de liaison extracellulaire et un domaine protéine-kinase intracellulaire. La liaison réversible de STa au domaine extracellulaire de GC-C entraîne l'activation de l'enzyme, probablement *via* une modification conformationnelle du domaine kinase (Field *et al.*, 1978, Guerrant *et al.*, 1980, Frantz *et al.*, 1984, Schulz *et al.*, 1990). La production de GMP cyclique (GMPC) intracellulaire est accrue. Une réduction de l'absorption d'eau et d'électrolytes se produit par inhibition des transporteurs membranaires de Na⁺ (Vaandrager, 2002). Les niveaux élevés de GMPC activent une protéine kinase GMPC-dépendante, qui recrute alors le canal CFTR dans la membrane apicale et l'active par phosphorylation (Forte *et al.*, 1992, Golin-Bisello *et al.*, 2005). L'ouverture du canal CFTR provoque une sécrétion de Cl⁻ et d'eau (Chao *et al.*, 1994). Il en résulte une sécrétion de fluides dans le lumen intestinal et la diarrhée (Figure 5). STa stimule également la sécrétion de bicarbonate dans le duodénum par un mécanisme indépendant de la GC-C et du canal CFTR

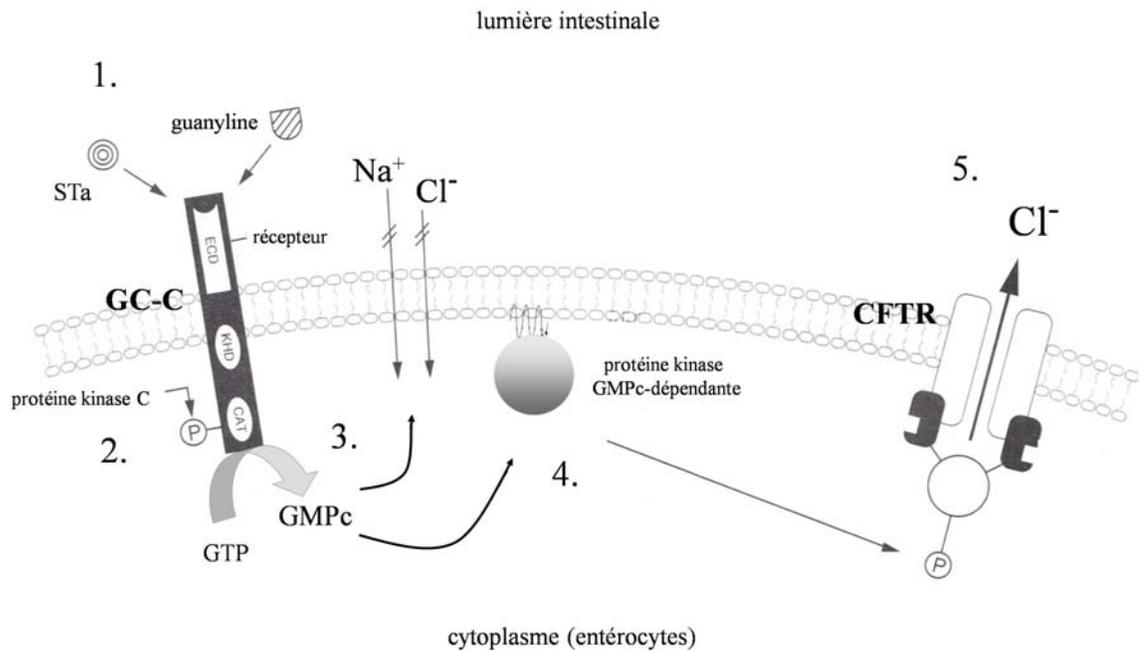


Figure 5. Effets cellulaires de l'entérotoxine STa et du peptide endogène guanyline. (1) interaction de STa ou de la guanyline avec le domaine extracellulaire (ECD) de la guanylate cyclase C (GC-C); (2) activation du domaine protéine-kinase C et phosphorylation du domaine catalytique (CAT); (3) production 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 la référence (Dubreuil, 2006b).

(Sellers *et al.*, 2008). Des récepteurs alternatifs existeraient donc, comme d'autres études l'ont déjà suggéré (Sears & Kaper, 1996).

2.3.2.2 EAST1

La toxine thermostable entéroagrégate EAST1 (Enteroaggregative *E.coli* Heat-Stable Toxin 1) comprend 38 a.a. (4.1kDa) et deux ponts disulfures impliquant quatre cystéines, ce qui maintient la structure du peptide (Figure 4c) (Savarino *et al.*, 1993). La toxine a été à l'origine purifiée de filtrats de culture de la souche EAEC 17-2 isolée de fèces d'un enfant souffrant de diarrhée (Savarino *et al.*, 1991). Par la suite, elle a été détectée chez d'autres pathotypes de *E.coli*, dont les ETEC ainsi que chez d'autres genres bactériens comme *Salmonella* (Savarino *et al.*, 1996, Ménard & Dubreuil, 2002, Zhou *et al.*, 2002, Veilleux & Dubreuil, 2006). La toxine est retrouvée chez des souches *E.coli* isolées d'humains et de porc notamment (Bertin *et al.*, 1998, Paiva de Sousa & Dubreuil, 2001, Osek, 2003, Veilleux & Dubreuil, 2006, Yuste *et al.*, 2006).

EAST1 est codée par le gène *astA*, se situant sur le chromosome bactérien et/ou sur des plasmides (McVeigh *et al.*, 2000). Plusieurs variants de la toxine ont été identifiés mais leur toxicité est inconnue (Yamamoto *et al.*, 1997, Ménard & Dubreuil, 2002). Chez les souches ETEC isolées de porcs malades, le gène *astA* est souvent retrouvé en association avec les gènes codant pour F4 et F18 (Choi *et al.*, 2001a, Choi *et al.*, 2001b, Zhang *et al.*, 2007).

EAST1 présente un mécanisme d'action semblable à STa et la guanyline, vu leurs similarités de structure (Savarino *et al.*, 1991). La toxine interagit avec la GC-C, probablement grâce aux 2 a.a. conservés de la séquence consensus N-P-A-C (A-C, Ala-Cys) (Figure 4c), et stimule la synthèse de GMPc (Fasano, 2002, Dubreuil, 2006b). Plusieurs études ne rapportent pas d'association entre EAST1 et la diarrhée chez l'humain (Savarino *et al.*, 1991, Savarino *et al.*, 1993, Yamamoto & Echeverria, 1996, Vila *et al.*, 1998, Okeke & Nataro, 2001). Le rôle de la toxine dans la diarrhée animale causée par les ETEC n'est pas établi. Le gène *astA* est en effet retrouvé chez des souches isolées d'animaux sains (Ngeleka *et al.*, 2003).

2.3.2.3 STb

L'entérotoxine stable à la chaleur STb (ST-II) fut mise en évidence en 1978 par Burgess et collaborateurs (Burgess *et al.*, 1978). Bien que STa et STb aient plusieurs similitudes, dont leur faible poids moléculaire, leur stabilité thermique et leur entérotoxicité, les peptides sont largement différents en terme de structure et d'activité biologique. Les caractéristiques de cette seconde entérotoxine thermostable sont exposées en détail dans la prochaine section.

3. Entérotoxine STb

3.1 Généralités

L'entérotoxine STb des ETEC est un peptide de faible poids moléculaire (5.2 kDa), composé de 48 a.a., stable à la chaleur (30 min à 100°C) et basique (pI 9.6) (Burgess *et al.*, 1978, Fujii *et al.*, 1991, Handl *et al.*, 1993, Fujii *et al.*, 1994) (Figure 6a). Deux ponts disulfures intramoléculaires formés entre les cystéines 10 et 48 et 21 et 36 confèrent au peptide une structure particulière en épingle à cheveux (Sukumar *et al.*, 1995). Contrairement à STa, STb est sensible à la digestion par les protéases de type trypsine (Whipp, 1987, Whipp, 1991, Dubreuil *et al.*, 1991, Hitotsubashi *et al.*, 1992b). La toxine est impliquée dans la diarrhée chez les animaux, en particulier le porc. Dans le jéjunum porcin, elle entraîne une sécrétion de fluides intestinaux en 30 min avec un effet maximal après 3 à 6 heures (Kennedy *et al.*, 1984, Weikel *et al.*, 1986a). Son rôle dans la diarrhée humaine n'est pas établi (Dubreuil, 1997).

En tentant de purifier STa à partir de la souche *E.coli* pathogène porcine P16 de sérotype O9:K9, Burgess et collaborateurs (1978) notent des anomalies lors de l'extraction de la toxine par le méthanol. Alors que STa est soluble dans le méthanol, un résidu y reste insoluble. Le test biologique standard utilisé pour détecter la présence de STa est le modèle du souriceau nouveau-né. L'animal est inoculé avec du surnageant de culture bactérienne par injection intra-gastrique percutanée ou gavage puis sacrifié afin d'évaluer le poids des intestins après la sécrétion de fluides causée par la toxine

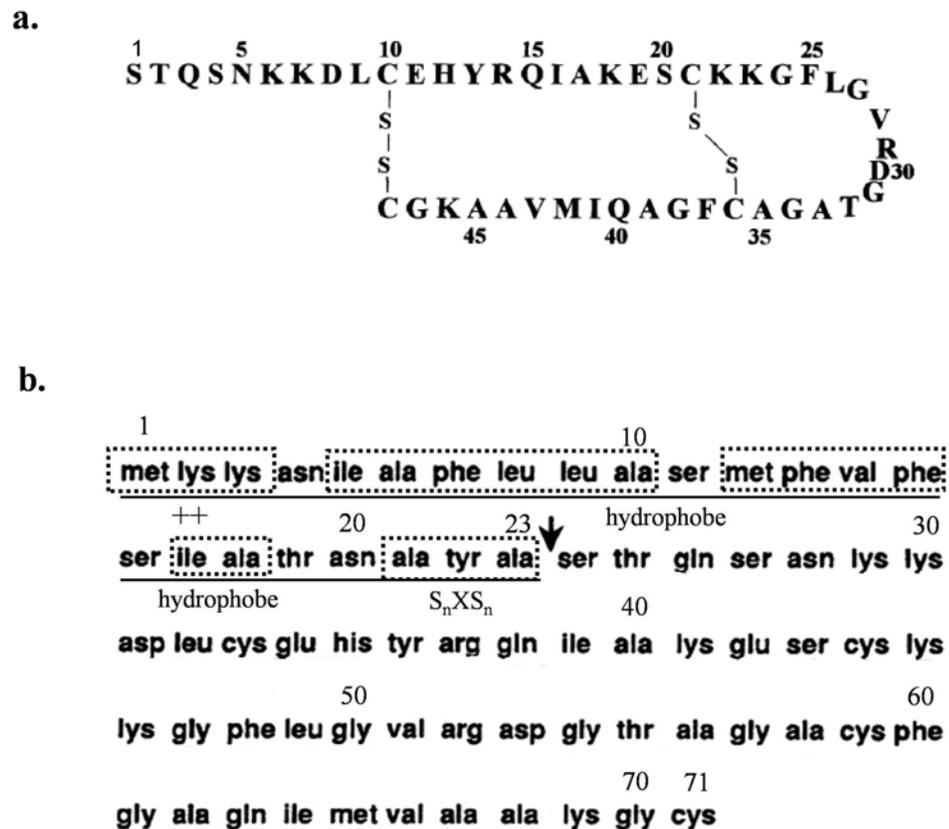


Figure 6. Entérotoxine STb des ETEC. (a) séquence en a.a. et structure en épingle à cheveux après formation des ponts disulfures Cys10-Cys48 et Cys21-Cys36. La numérotation des a.a. fait référence à la protéine mature après clivage de la séquence signal. (b) séquence du précurseur de 71 a.a. Les 23 a.a. correspondant à la séquence signal N-terminale sont soulignés (partie N-terminale : charge nette négative; segment central : a.a. hydrophobes; partie C-terminale de type S_nXS_n), suivis du site de clivage lors de la conversion du précurseur en la forme mature du peptide, indiqué par une flèche. Adapté des références (Lee *et al.*, 1983, Picken *et al.*, 1983, Kupersztoch *et al.*, 1990, Sukumar *et al.*, 1995).

(Giannella, 1976). La fraction soluble dans le méthanol extraite par Burgess *et al.* est en effet toxique chez le souriceau nouveau-né, confirmant qu'elle contient STa, alors que la fraction insoluble dans le méthanol ne l'est pas. D'autres différences d'activité biologique entre l'extrait et le résidu sont mises en évidence dans le modèle des segments ligaturés intestinaux de divers animaux. Le résidu insoluble dans le méthanol est actif dans les boucles de porc sevré de 6 et 9 semaines et de lapin, comme le montre la sécrétion de fluides intestinaux après injection du composé, alors que STa ne l'est pas. Contrairement à STa, le résidu insoluble n'est pas toxique chez le veau ni chez le porcelet nouveau-né (Burgess *et al.*, 1978). Les surnageants de culture des souches actives dans les boucles de porc sevré de 6 et 9 semaines et de lapin montrent aussi une stabilité à la chaleur après 30 minutes d'incubation à 100°C. L'ensemble de ces observations suggère donc l'existence de deux entérotoxines stables à la chaleur mais ayant une activité biologique différente selon l'espèce et l'âge de l'animal. Burgess et collaborateurs (1978) désignent alors STa (heat-Stable Toxin a), la fraction soluble dans le méthanol jusque là appelée ST (heat-Stable Toxin), et STb (heat-Stable Toxin b), le résidu insoluble dans le méthanol. D'autres études ont confirmé ces résultats par la suite, certains auteurs désignant STa, ST-I, et STb, ST-II (Gyles, 1979, Moon *et al.*, 1980, Whipp *et al.*, 1981, Lee *et al.*, 1983, Picken *et al.*, 1983, Kennedy *et al.*, 1984).

3.2 Génétique

Le gène codant pour STb (*estB*) a été cloné et séquencé à partir de plasmides provenant de souches ETEC isolées de porcelets présentant une diarrhée (Lee *et al.*, 1983, Picken *et al.*, 1983). Ces souches n'ont pas d'activité biologique chez le souriceau nouveau-né mais sont actives dans les segments ligaturés de porc sevré (Gyles, 1979, Mazaitis *et al.*, 1981, Lee *et al.*, 1983). La séquence protéique déduite à partir du gène *estB* correspond à un polypeptide de 71 a.a. (Figure 6b). Celui-ci présente une séquence signal caractéristique, constituée des 23 premiers a.a. N-terminaux. Cette séquence indique que la toxine est synthétisée dans le cytoplasme bactérien sous la forme d'un précurseur qui est sécrété vers le milieu extracellulaire après clivage. La forme mature du peptide est donc composée des 48 a.a. C-terminaux du précurseur (Figure 6b) (Lee *et al.*, 1983, Picken *et*

al., 1983). Même si leur taille et leur organisation sont comparables, *estA* et *estB* sont génétiquement distincts et les séquences en a.a. déduites sont totalement différentes (So & McCarthy, 1980, Picken *et al.*, 1983). Ces gènes codent donc pour deux toxines différentes, soit *estA* pour STa et *estB* pour STb.

Chez les souches ETEC de sérotypes porcins caractéristiques, le gène *estB* est retrouvé sur des plasmides hétérogènes de taille variable (Harnett & Gyles, 1985, Fekete *et al.*, 2003) et fait partie de transposons (Lee *et al.*, 1985, Hu *et al.*, 1987, Fekete *et al.*, 2003). Le gène *estA*, des gènes de résistance aux antibiotiques, dont la tétracycline, et des gènes codant pour des fimbriae comme F5, peuvent aussi être présents sur ces plasmides et groupés en îlots de pathogénicité (Harnett & Gyles, 1985, Fekete *et al.*, 2003).

Un variant de STb (His12→Asn) a été récemment mis en évidence chez la souche ETEC porcine F18-positif 2173 (Fekete *et al.*, 2003, Taillon *et al.*, 2008). Ce variant est retrouvé chez 23% des souches ETEC porcines isolées au Québec entre 1980 et 2007, de virotypes divers mais toutes positives pour la toxine STa et résistantes à la tétracycline comme la souche 2173 (Taillon *et al.*, 2008). La signification biologique et toxique *in vivo* de ce variant par rapport à la forme précédemment décrite doit encore être évaluée.

La transcription de *estB* est régulée par un promoteur faible (Spandau & Lee, 1987), ce qui peut expliquer le faible niveau d'expression de la toxine *in vivo* chez les souches sauvages (Urban *et al.*, 1991) et les différences d'accumulation de fluides causées par ces souches dans les segments ligaturés intestinaux de rat (Dubreuil *et al.*, 1991). La régulation du gène est peu connue. Une étude réalisée par notre laboratoire a démontré que l'expression de la toxine est sujette à la répression catabolite car la présence de glucose dans le milieu réprime la production de STb (Busque *et al.*, 1995). Un site de liaison de la protéine régulatrice CRP (cAMP Receptor Protein) est également retrouvé en amont du gène *estB*.

L'expression de la toxine et ses propriétés biologiques au cours de la croissance de souches ETEC ont aussi été étudiées par Busque *et al.* (1995). La production de la toxine par la souche sauvage porcine 82-4247 (sérotipe O115; LT-négative; STa-négative; STb-positif) a été suivie dans plusieurs milieux (Dubreuil *et al.*, 1991, Busque *et al.*, 1995). La plus grande quantité de STb est produite en milieu TSB (Trypticase Soy Broth) et la toxine est aussi sécrétée dans le milieu minimum DMM (Davis minimal medium). En

milieu TSB, la production de STb dans le surnageant de culture survient après quelques heures et augmente parallèlement à la croissance. Elle atteint ensuite un plateau et reste stable après environ 3 jours de croissance. Le surnageant de culture bactérienne prélevé à différents moments au cours de la croissance induit une sécrétion de fluides dans les segments intestinaux ligaturés de rat. Ces résultats indiquent que la toxine est soit stable dans le milieu, soit synthétisée en quantité équivalente à la quantité de toxine dégradée (Busque *et al.*, 1995).

3.3 Importance clinique

Le gène *estB* est principalement identifié chez des souches isolées de porcs atteints de diarrhée (Moon *et al.*, 1980, Echeverria *et al.*, 1984, Wilson & Francis, 1986, Fairbrother *et al.*, 2005). Le gène est aussi retrouvé dans des isolats de *E.coli* provenant d'autres animaux dont les bovins, le poulet, le chien, le chat, le furet et le cheval (Mainil *et al.*, 1986, Mainil *et al.*, 1990, Akashi *et al.*, 1993, Holland *et al.*, 1996, Dubreuil, 2006a). Il est fréquemment détecté chez des souches isolées d'animaux apparemment sains (Holland *et al.*, 1996, Dubreuil, 1997). Chez l'humain, la prévalence du gène *estB* parmi les isolats prélevés dans différentes zones géographiques est faible (Echeverria *et al.*, 1984, Echeverria *et al.*, 1985, Moon *et al.*, 1986, Weikel *et al.*, 1986b) et rarement associée à la diarrhée (Echeverria *et al.*, 1984, Guerrant *et al.*, 1990). Des souches ETEC STb-positives isolées chez l'homme malade ont toutefois été décrites mais elles produisent par contre les toxines LT et/ou STa en plus de STb (Lortie *et al.*, 1991, Handl & Flock, 1992, Okamoto *et al.*, 1993, Dubreuil, 1997). La colonisation de l'intestin humain semble plutôt avoir lieu à partir d'un réservoir porcin, par l'ingestion de nourriture contaminée (Lortie *et al.*, 1991). Toutefois, l'effet de la toxine sur l'intestin humain est encore controversé (cf. paragraphe 3.6.1).

Chez le porc, la prévalence du gène *estB* est élevée et positivement associée aux ETEC responsables de la diarrhée post-sevrage (Fairbrother *et al.*, 2005, Chapman *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 2007). En effet, 72.6% des ETEC F4 ou F18-positives isolées de porcs sevrés aux Etats-Unis possèdent le gène *estB* (Zhang *et al.*,

2007). La toxine STb est dans tous les cas détectée en association avec les toxines LT et/ou STa chez les ETEC causant la diarrhée porcine (Moon *et al.*, 1986, Fairbrother *et al.*, 2005, Chapman *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 2007). Des souches isolées de porcelets nouveau-nés atteints ou non de diarrhée possédant *estB* comme seul gène codant pour une entérotoxine ont tout de même été mises en évidence (Moon *et al.*, 1980, Moon *et al.*, 1986, Wilson & Francis, 1986).

En Amérique du Nord, les virotypes majeurs associés à la diarrhée post-sevrage porcine sont F4/LT/STb (42.5% des souches F4-positives), F4/LT/STb/EAST1 (23.9% des souches F4-positives) et F18/STa/STb/Stx2e (31.7% des souches F18-positives) (Zhang *et al.*, 2007). Des associations semblables entre STb et les fimbriae F4 et F18 ont été rapportées au Danemark (Frydendahl, 2002). Deux nouveaux virotypes, AIDA-I/STb/EAST1 et AIDA-I/STb, sont observés chez 4.7% des isolats de *E.coli* issus de porcelets nouveau-nés et sevrés atteints de diarrhée (Ngeleka *et al.*, 2003). Ces isolats sont notamment F4-négatifs et induisent la maladie lors d'infection expérimentale de porcelets (Ngeleka *et al.*, 2003). L'évaluation de la maladie après l'inoculation des souches AIDA-I⁺/STb⁺ et AIDA-I⁻/STb⁺ à des porcelets suggère que l'adhésine AIDA-I et la toxine STb sont suffisantes pour, respectivement, initialiser la colonisation intestinale et induire la diarrhée (Ravi *et al.*, 2007). D'autres études sont nécessaires pour suivre le rôle de ces souches AIDA-I/STb émergentes dans la diarrhée porcine.

Chez les souches ETEC F4-positives, le rôle de STb dans la virulence est faible comparé à celui de la toxine LT. En effet, des souches *E.coli* de type F4/STb/EAST1 inoculées à des porcelets gnotobiotiques induisent une réponse clinique variable comparé aux souches F4/LT/STb/EAST1 ou F4/LT/EAST1 qui causent la diarrhée chez tous les animaux traités (Berberov *et al.*, 2004, Zhang *et al.*, 2006). Cette réponse clinique variable pourrait être uniquement due à STb car la toxine EAST1 ne semble pas avoir de rôle dans la diarrhée porcine causée par les ETEC (Ngeleka *et al.*, 2003, Zhang *et al.*, 2006, Erume *et al.*, 2008). Il a aussi été observé que la virulence d'une souche F4/LT/STb n'est pas significativement réduite chez des porcelets nouveau-nés après délétion du gène *estB* (Erume *et al.*, 2008). Quant à l'importance de la toxine dans la pathogenèse des souches ETEC F18-positives responsables de diarrhée post-sevrage, elle n'a pas encore été évaluée.

En résumé, la toxine STb est associée à la virulence des souches ETEC qui infectent le porc, en particulier celles responsables de diarrhée post-sevrage. La toxine n'est pas suffisante pour induire la pathologie. Il est possible que STb ait un effet additif à ceux d'autres toxines, comme le suggèrent la prévalence des souches exprimant LT et/ou STa en plus de STb, et les observations cliniques après inoculation de porcelets par différentes souches F4-positives.

3.4 Biogenèse

La toxine n'est pas associée à la fraction cellulaire mais trouvée principalement dans le surnageant de culture (Kupersztoch *et al.*, 1990), ce qui est cohérent avec la présence de la séquence signal N-terminale de sécrétion extracellulaire de 23 a.a. (Figure 6b) (Lee *et al.*, 1983, Picken *et al.*, 1983). Le modèle actuel de sécrétion de la toxine est présenté dans la figure 7.

Le passage du polypeptide du cytoplasme vers le périplasma bactérien dépend de SecA, l'ATPase du système de translocation Sec (Kupersztoch *et al.*, 1990). Le précurseur de 71 a.a. est donc transporté au travers de la membrane interne par la voie générale de sécrétion protéique bactérienne Sec (Pugsley, 1993, Lee & Schneewind, 2001), comme la toxine STa (Okamoto & Takahara, 1990). La séquence signal de 23 a.a. de STb possède les caractéristiques d'une séquence signal classique associée à la sécrétion par Sec chez les Gram-positifs et -négatifs (Figure 6b). La partie N-terminale porte une charge nette positive grâce aux lysines basiques. Le segment central est constitué d'a.a. hydrophobes (Ile, Ala, Phe, Leu, Met, Val). Enfin, la partie C-terminale est de type S_nXS_n , correspondant à la présence d'un a.a. quelconque (X) entouré de deux a.a. à courte chaîne latérale (S, short) (Fekkes & Driessen, 1999). La protéine du système Sec reconnaissant cette séquence signal à proximité de la membrane interne bactérienne pourrait être l'ATPase SecA (Kupersztoch *et al.*, 1990, Manting & Driessen, 2000). Après passage du polypeptide au travers du translocon Sec dans la membrane interne, une signal peptidase clive la séquence signal juste après le segment S_nXS_n (Figures 6b, 7). Le peptide restant de 48 a.a. est alors libéré dans le périplasma (Kupersztoch *et al.*, 1990). La translocation de la toxine est diminuée par le CCCP

(Carbonyl Cyanide 3-ChloroPhénylhydrazone) (Kupersztoch *et al.*, 1990), un ionophore de protons qui dissipe le potentiel de membrane et découple la force proton-motrice (pmf, proton-motive force) (Daniels *et al.*, 1981). Le moteur de la machinerie Sec est l'hydrolyse de l'ATP par l'ATPase SecA. Toutefois, la pmf peut aussi être utilisée par Sec dans les étapes tardives de la translocation pour optimiser le processus (Manting & Driessen, 2000). Ceci peut justifier l'effet du CCCP sur la translocation de STb au travers de la membrane interne.

Dans le périplasma, DsbA, une oxydoréductase, catalyse la formation des deux ponts disulfures entre les cystéines 10-48 et 21-36 du peptide (Foreman *et al.*, 1995, Okamoto *et al.*, 1995), entraînant un repliement en épingle à cheveux (Figures 6a, 7). DsbA est couramment impliquée dans la formation de ponts disulfures chez d'autres protéines du périplasma et de la membrane externe de *E.coli* (Bardwell & Beckwith, 1993, Dailey & Berg, 1993), comme suggéré pour l'entérotoxine STa (Yamanaka *et al.*, 1994).

La mutation du gène codant pour DsbA entraîne l'absence de la toxine dans le surnageant bactérien et la présence d'intermédiaires périplasmiques (Kupersztoch *et al.*, 1990, Foreman *et al.*, 1995, Okamoto *et al.*, 1995, Okamoto *et al.*, 2001). Après mutation des 4 cystéines, les peptides sont exportés vers le périplasma mais y sont dégradés (Dreyfus *et al.*, 1992, Okamoto *et al.*, 1995), excepté la toxine mutée au niveau de la Cys48, qui est en partie sécrétée dans le surnageant de culture mais a perdu ses premiers 14 a.a. N-terminaux (Okamoto *et al.*, 1995). La formation des deux ponts disulfures et le repliement subséquent de la structure sont donc essentiels à la sécrétion au travers de la membrane externe. En l'absence de ces deux ponts ou lorsque les cystéines sont mal appariées, STb est dégradé partiellement ou complètement dans le périplasma (Foreman *et al.*, 1995, Okamoto *et al.*, 1995). La dégradation pourrait être initiée par une protéase hydrolysant le lien peptidique des a.a. 14-15. La création d'une structure locale dans cette région grâce aux ponts disulfures formés empêcherait la dégradation périplasmique de STb (Okamoto *et al.*, 1995). DegP, une protéase périplasmique de *E.coli*, n'est pas impliquée dans la dégradation de la toxine (Dreyfus *et al.*, 1992). Aucune protéase responsable de cette dégradation n'a encore été identifiée à ce jour.

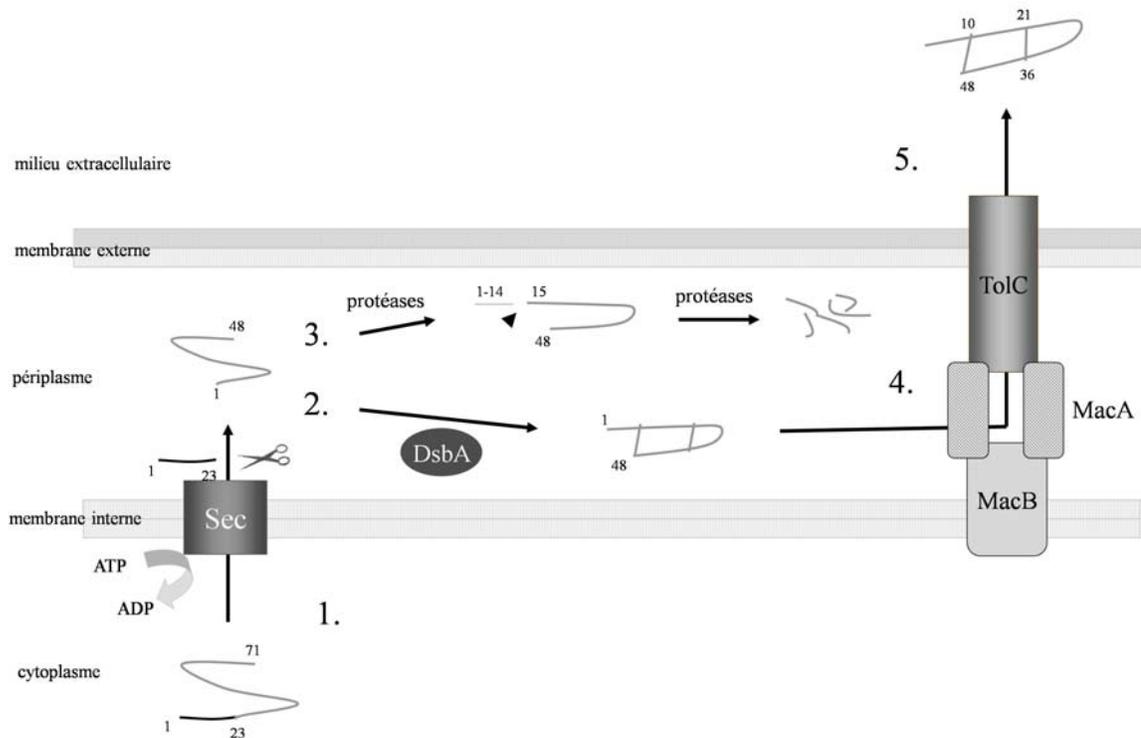


Figure 7. Biogenèse et sécrétion de STb : modèle actuellement proposé. (1) translocation dans le périplasma du précurseur de 71 a.a. par le système Sec suivi du clivage de la séquence signal N-terminale de 23 a.a.; (2) formation des deux ponts disulfures par l'oxydoréductase périplasmique DsbA et repliement du peptide; (3) dégradation du peptide en cas de non-formation des ponts disulfures ou de mauvais appariement des cystéines par des protéases périplasmiques de type trypsine. Les a.a. 14-15 constituent une cible d'initiation de la digestion par les protéases; (4) transfert du peptide correctement formé au système MacAB dans la membrane interne; (5) export vers le milieu extracellulaire après passage par le canal de membrane externe TolC. Adapté des références (Kupersztoch *et al.*, 1990, Foreman *et al.*, 1995, Okamoto *et al.*, 1995, Yamanaka *et al.*, 2008).

Le transporteur TolC (Foreman *et al.*, 1995) et le transporteur MacAB, (Yamanaka *et al.*, 2008) sont impliqués dans l'export de la toxine au travers de la membrane externe (Figure 7). TolC est une protéine de membrane externe, formant un tunnel-canal qui s'étend dans le périplasma (Lee & Schneewind, 2001). TolC n'est pas spécifique du substrat et permet entre autres l'export des toxines RTX, comme l' α -hémolysine de *E.coli* par exemple. Dans le système de sécrétion de type I, TolC forme un complexe tripartite avec des protéines de fusion membranaires (MFPs) et des transporteurs ABC, ancrés dans la membrane interne, dont le système MacAB qui permet l'efflux des macrolides (Kobayashi *et al.*, 2001, Lee & Schneewind, 2001, Kobayashi *et al.*, 2003, Xu *et al.*, 2009). MacA, la protéine de fusion membranaire, stimule l'activité ATPase de MacB, le transporteur ABC de la membrane interne, fournissant l'énergie nécessaire à l'export (Kobayashi *et al.*, 2001, Tikhonova *et al.*, 2007). Ce complexe tripartite permet habituellement le passage des protéines depuis le cytoplasme vers le milieu externe en une seule étape sans intermédiaires périplasmiques (Lee & Schneewind, 2001, Desvaux *et al.*, 2004). La cristallisation de la région périplasmique de MacB suggère cependant que cette protéine pourrait renfermer un site d'entrée pour un substrat dans le périplasma (Xu *et al.*, 2009). Comme la toxine est transloquée dans le périplasma par le système Sec, elle y serait captée par le système MacAB, l'amenant à proximité de TolC, qui, finalement, la transporterait vers l'extérieur. L'interaction directe entre MacA et STb n'a cependant pas pu être mise en évidence (Yamanaka *et al.*, 2008). Il est possible que la toxine soit prise en charge par d'autres protéines de transport l'amenant à proximité du complexe MacAB-TolC. Après passage au travers de la membrane externe, la forme mature de 48 a.a. est finalement libérée dans le milieu extracellulaire (Figure 7) (Foreman *et al.*, 1995).

De nombreuses questions subsistent donc quant au transport général de STb vers le milieu extracellulaire. Des protéines cytoplasmiques et périplasmiques stabilisant le peptide avant/après la formation des ponts disulfures pourraient exister. D'autres protéines pourraient aussi assister le transport de la toxine dans le périplasma et lui permettre d'atteindre le canal TolC. Enfin, la façon dont le peptide mature recourbé serait reconnu par le système MacAB-TolC et le traverserait est encore indéterminée.

3.5 Relations structure-fonction

La conformation tridimensionnelle de la toxine en solution a été établie par résonance magnétique nucléaire (Figure 8a) (Sukumar *et al.*, 1995). Le motif structural central de STb se compose de deux ponts disulfures reliant deux hélices- α antiparallèles, la première amphipatique entre Cys10-Lys22 en N-terminal, et la seconde hydrophobe entre Gly38-Ala44 en C-terminal. Les deux hélices sont connectées par une boucle dont la flexibilité est conférée par la présence de plusieurs glycines (Creighton, 1994). La toxine contient plusieurs a.a. basiques (pI 9.6) (Handl *et al.*, 1993), qui la rendent susceptible à la dégradation par les protéases de type trypsine (Whipp, 1987, Fujii *et al.*, 1994).

Plusieurs études ont évalué le rôle relatif des a.a. du peptide dans son activité toxique et sa liaison au récepteur (Figure 8b).

Comme nous l'avons vu au paragraphe 3.4, les deux ponts disulfures sont impliqués dans la stabilité périplasmique du peptide lors de sa biogenèse (Foreman *et al.*, 1995, Okamoto *et al.*, 1995). La mutation des cystéines qui les composent a aussi montré qu'ils sont essentiels à l'activité toxique de STb (Dreyfus *et al.*, 1992, Arriaga *et al.*, 1995). Une perte de structure est observée en absence du pont Cys21-Cys36 et après réduction des ponts disulfures suivie de l'alkylation des cystéines (Dreyfus *et al.*, 1992, Arriaga *et al.*, 1995, Sukumar *et al.*, 1995). L'absence d'un seul pont et la réduction-alkylation du peptide suppriment l'activité toxique de STb dans les segments intestinaux de rat *in vivo* (Dreyfus *et al.*, 1992, Arriaga *et al.*, 1995). La structure de la toxine est donc indispensable à son activité toxique.

L'extrémité N-terminale de 7 a.a. n'est pas impliquée dans l'activité de la toxine, comme l'étude de mutations dans cette région l'a suggéré (Figure 8b) (Fujii *et al.*, 1994). C'est aussi le cas pour STa (Figure 4c) (Gariépy *et al.*, 1986).

La Lys18 de l'hélice- α N-terminale amphipatique a un rôle dans la toxicité (Figure 8b) (Fujii *et al.*, 1994).

Dans la boucle flexible, les glycines et les a.a. chargés Lys22, Lys23, Arg29 et Asp30 sont impliqués dans la liaison du peptide au récepteur et l'activité toxique du peptide dans les segments ligaturés intestinaux de rat et de porc (Figure 8b) (Dreyfus *et al.*, 1992, Fujii *et al.*, 1994, Labrie *et al.*, 2001a). Le récepteur de STb, le sulfatide, est

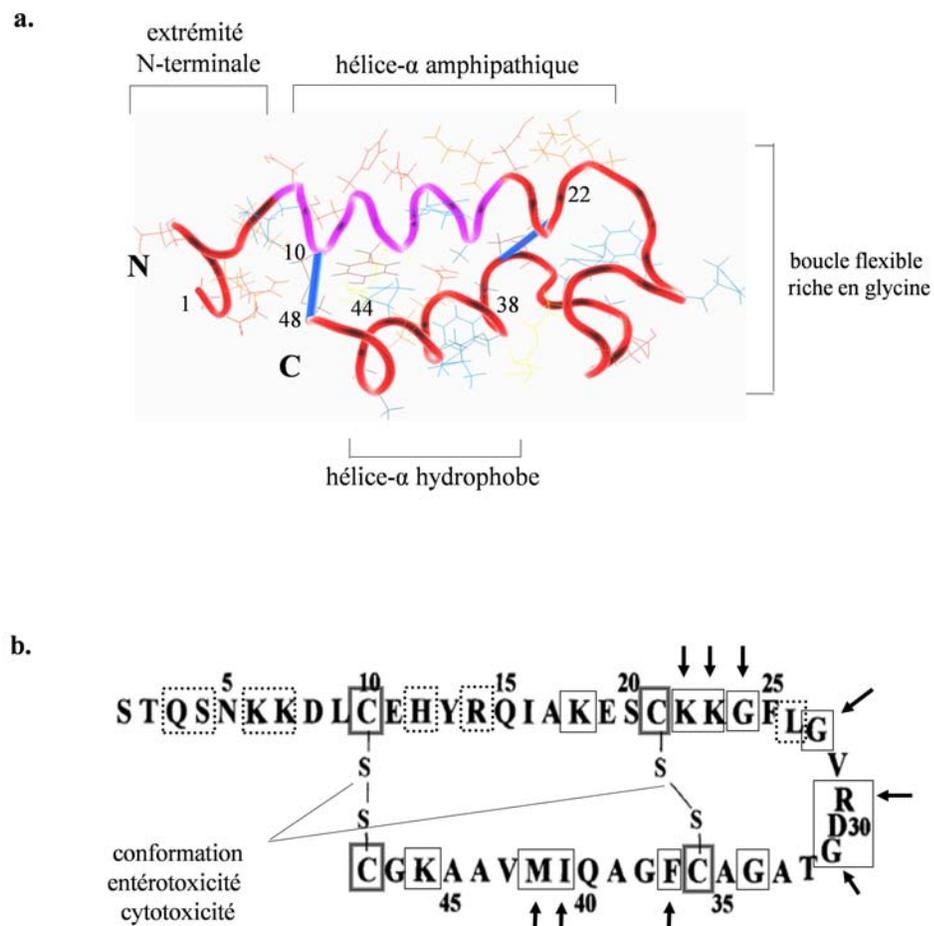


Figure 8. Relation structure-fonction de l'entérotoxine STb. (a) structure tridimensionnelle et arrangements secondaires de la toxine. Les ponts disulfures sont indiqués en trait épais. (b) rôles des a.a. étudiés par modification chimique et/ou mutagenèse dirigée dans la conformation et l'activité de la toxine. trait double : cystéines nécessaires à la conformation et l'activité; trait simple continu : a.a. essentiels à l'entérotoxicité; trait simple discontinu : a.a. non essentiels à l'entérotoxicité; flèche : a.a. impliqués dans la liaison au récepteur. Adapté des références (Dreyfus *et al.*, 1992, Fujii *et al.*, 1994, Arriaga *et al.*, 1995, Sukumar *et al.*, 1995, Labrie *et al.*, 2001a).

un glycosphingolipide membranaire chargé négativement (cf. paragraphe 3.6.2.2, Figure 9a) (Rousset *et al.*, 1998b). La région de STb interagissant avec le récepteur est inconnue à ce jour mais les charges des Lys22, Lys23 et Arg29 pourraient permettre l'interaction de la toxine avec le sulfatide (Labrie *et al.*, 2001a).

La région C-terminale (a.a. 38-44) constitue l'hélice- α hydrophobe (Figure 8b) (Sukumar *et al.*, 1995). La Lys46 contribue à la toxicité (Fujii *et al.*, 1994). Les a.a. hydrophobes Phe37, Ile41 et Met42 jouent un rôle dans la liaison au récepteur *in vitro* et l'entérotoxicité *in vivo* chez le rat (Labrie *et al.*, 2001a). Le rôle des ces a.a. dans la fixation au récepteur n'est pas clair étant donné que l'épitope présumé du récepteur reconnu par STb est un groupement chargé négativement. L'hélice- α hydrophobe joue par contre un rôle dans la formation d'oligomères de 6 ou 7 monomères de STb (cf. paragraphe 3.6.2.1) (Labrie *et al.*, 2001b). Ces oligomères préalablement formés en solution seraient impliqués dans la fixation au récepteur, ce qui expliquerait l'importance de l'hélice- α C-terminale dans l'interaction toxine-sulfatide et dans l'activité toxique du peptide (Labrie *et al.*, 2001b).

3.6 Mécanisme d'action

3.6.1 Généralités

La toxine entraîne une sécrétion de fluides dans la lumière intestinale. Cet effet biologique a été observé dans les segments ligaturés d'intestin de porcelet sevré (Burgess *et al.*, 1978, Kennedy *et al.*, 1984, Weikel *et al.*, 1986a, Whipp, 1987). La sécrétion de fluides survient aussi dans les segments ligaturés d'intestin de rat et de souris en présence d'un inhibiteur de protéases intestinales (Whipp, 1990, Whipp, 1991, Dubreuil *et al.*, 1991, Hitotsubashi *et al.*, 1992b). En effet, la toxine est dégradée par les protéases de type trypsine présentes en quantités variables dans l'intestin selon l'espèce animale (Whipp, 1987). Chez le porc sevré et la souris, la sécrétion survient 30 minutes après l'injection dans les segments. Le volume de fluide accumulé atteint un maximum en 3 à 6 heures et subsiste jusqu'à 8 heures après l'injection, constituant une plus longue durée d'action que celle de la toxine STa (Kennedy *et al.*, 1984, Weikel *et al.*, 1986a, Hitotsubashi *et al.*,

1992b). Aucun effet de STb n'est observé *in vitro* sur des tissus d'iléon humain en chambres de Ussing (Weikel *et al.*, 1986b). Ceci peut justifier la faible prévalence de souches STb-positives isolées chez l'homme (cf. paragraphe 3.3). Par contre, le récepteur de la toxine est présent au niveau de l'intestin humain (cf. paragraphe 3.6.2.2) et l'internalisation de STb a lieu dans des lignées cellulaires épithéliales intestinales humaines (cf. paragraphe 3.6.2.3). Ces observations contradictoires ne permettent donc pas à ce jour d'établir l'effet toxique de STb sur l'intestin humain. Certaines études rapportent des altérations histologiques de l'épithélium du jéjunum porcin, comme la déformation et la desquamation des cellules épithéliales et l'atrophie partielle des villosités, une heure après l'injection de surnageants de culture de souches STb-positives (Whipp *et al.*, 1986, Rose *et al.*, 1987, Whipp *et al.*, 1987). Les fluides sécrétés *in vivo* dans le jéjunum de porcelet sevré contiennent du bicarbonate et une accumulation de sodium et de chlore (Weikel *et al.*, 1986a). Le mécanisme d'action cellulaire de STb n'est que partiellement compris. Les événements cellulaires décrits dans la littérature sont présentés dans les paragraphes suivants.

3.6.2 Mécanisme d'action cellulaire

3.6.2.1 Oligomérisation

La toxine STb s'associe en hexamères de 28 kDa et en heptamères de 32 kDa en solution *in vitro* (Labrie *et al.*, 2001b). La structure tridimensionnelle de la toxine est nécessaire à la formation de ces oligomères. Ces hexamères et heptamères sont formés *via* l'interaction des hélices- α hydrophobes C-terminales de monomères de STb, comme l'a suggéré l'étude de mutations dans cette région (Labrie *et al.*, 2001b). Ces mutants présentent également une liaison au récepteur *in vitro* diminuée et sont aussi moins toxiques dans les segments intestinaux ligaturés de rat (cf. paragraphe 3.5) (Labrie *et al.*, 2001a). L'oligomérisation serait donc nécessaire à la fixation au récepteur et par conséquent, à la toxicité induite par STb. L'arrangement de ces oligomères n'a pas été analysé. Rappelons que la sous-unité B de la toxine LT des ETEC fixant le récepteur est pentamérique (Figure 2a) (Sixma *et al.*, 1991). Quant à la toxine STa, elle forme aussi des hexamères en anneau qui pourraient être impliqués dans l'activation de son récepteur, la guanylate cyclase C (Sato & Shimonishi, 2004).

3.6.2.2 Récepteur

A la surface des entérocytes, la toxine se lie à son récepteur, le sulfatide (SO₃-3galactosylβ1céramide, Figure 9a). Sa fonctionnalité a été démontrée par notre équipe à l'aide des segments ligaturés de rat (Rousset *et al.*, 1998b). Ce glycosphingolipide est situé dans la membrane des cellules épithéliales de la bordure en brosse de l'intestin porcine (Rousset *et al.*, 1998b, Beausoleil *et al.*, 2002b). D'autres travaux rapportent aussi l'interaction entre STb et des lipides membranaires, plutôt que des protéines ou des glycoprotéines (Chao & Dreyfus, 1997, Chao & Dreyfus, 1999). L'interaction entre la toxine et les cellules épithéliales est rapide et observée *in vitro* en 5 à 10 minutes (Chao & Dreyfus, 1997, Rousset *et al.*, 1998b). STb se lie également *in vitro* à des gangliosides, dont le GM3 (Figure 9b) (Rousset *et al.*, 1998a, Rousset *et al.*, 1998b). Ces résultats sont contredits par d'autres travaux (Chao & Dreyfus, 1997, Beausoleil & Dubreuil, 2001) mais la liaison de la toxine à ce type de lipides pourrait dépendre de la position d'un ou plusieurs acides sialiques (Figure 9b) sur les gangliosides testés dans ces études (Rousset *et al.*, 1998b). Le rôle de ces glycolipides dans la liaison de STb à l'épithélium n'est donc pas établi.

L'interaction entre STb et le sulfatide *in vitro* est dose-dépendante et saturable. La constante d'affinité de l'interaction déterminée par la technique de résonance plasmonique de surface (SPR) est de 2.4 ± 0.61 nM (Gonçalves *et al.*, 2008). Les a.a. de la toxine probablement impliqués dans la liaison au sulfatide ont été présentés ci-dessus (cf. paragraphe 3.5, Figure 8b). L'épitope du sulfatide reconnu par STb est le galactose portant le sulfate en position 3 (Rousset *et al.*, 1998a, Rousset *et al.*, 1998b, Beausoleil & Dubreuil, 2001, Gonçalves *et al.*, 2008), bien que la λ-carragénine, un polymère de galactose sulfaté en positions 2 et 6 (Figure 9c), inhibe aussi la fixation de la toxine au sulfatide (Gonçalves *et al.*, 2008). L'importance de la charge négative du sulfate indique que la liaison entre la toxine et son récepteur est en partie assurée par des interactions ioniques.

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 9a) (Eckhardt, 2008). Le sulfatide est le constituant majoritaire de la myéline des neurones et est retrouvé également dans les cellules du tractus gastro-intestinal du porc et

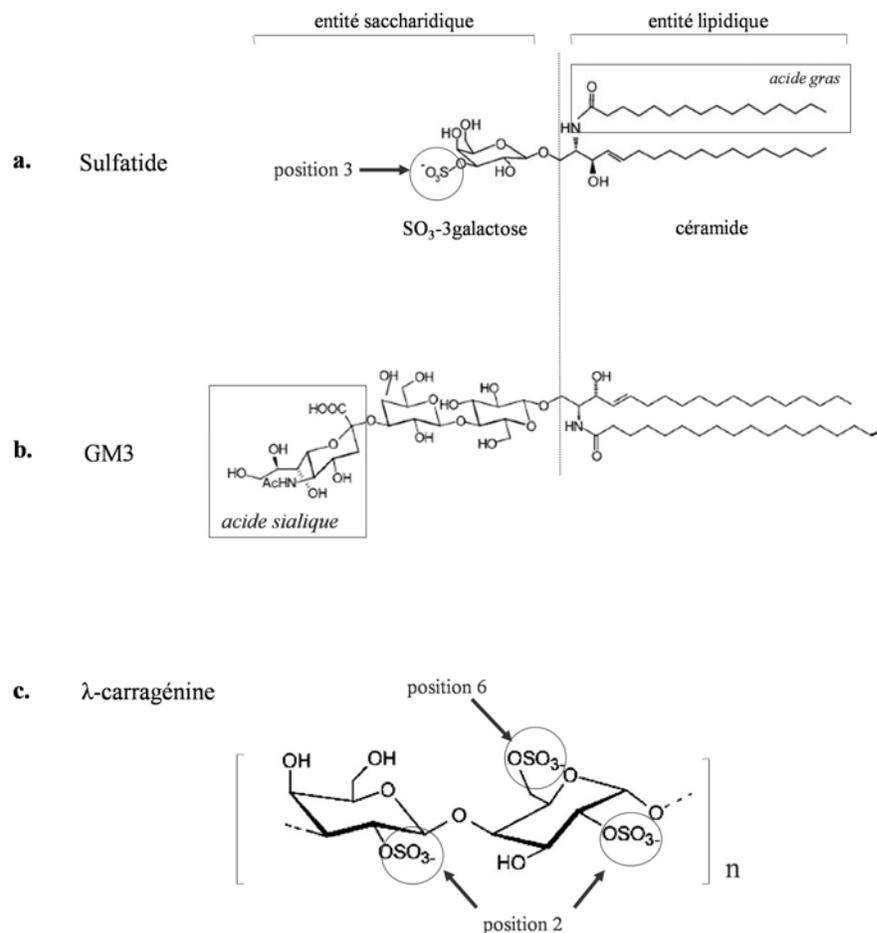


Figure 9. Récepteur de l'entérotoxine STb. (a) structure du sulfatide. Le galactose porte un groupement sulfate en position 3 et est lié à un céramide. La chaîne d'acide gras du céramide est de longueur variable selon le type cellulaire et peut aussi être hydroxylée (Eckhardt, 2008). (b) structure du ganglioside GM3. Les gangliosides sont composés d'une partie oligosaccharidique portant un ou plusieurs acides sialiques et d'un céramide. (c) structure de la λ-carragénine. Ce polysaccharide sulfaté est extrait de l'algue rouge marine (*Rhodophyceae*) et est constitué d'unités répétées de deux galactoses, portant des groupements sulfates en positions 2 et 6 (3 charges négatives par disaccharide) (Michel *et al.*, 2006). Les trois sulfates par unité répétée confèrent au polymère une charge négative élevée. Adapté des références (De Libero & Mori, 2005, Michel *et al.*, 2006, Eckhardt, 2008).

de l'homme (Rousset *et al.*, 1998b, Beausoleil *et al.*, 2002b, Delacour *et al.*, 2005, Eckhardt, 2008), ainsi qu'en faible quantité dans le petit intestin de souris et de rat (Breimer *et al.*, 1983). Il est absent du petit intestin bovin (Teneberg *et al.*, 1994). Le sulfatide membranaire est présent presque exclusivement dans le feuillet externe de la bicouche lipidique (Eckhardt, 2008) et localisé dans les radeaux lipidiques ou «*lipid rafts*» (Delacour *et al.*, 2005, Kolter & Sandhoff, 2005, Weerachayanukul *et al.*, 2007). Les *lipid rafts* sont des microdomaines de la membrane riches en cholestérol et en glycosphingolipides. Ils sont impliqués dans l'endocytose et les cascades de signalisation cellulaire chez la cellule eucaryote (Simons & Toomre, 2000, Parton & Richards, 2003, Laude & Prior, 2004).

En plus de son rôle fonctionnel dans les cellules nerveuses, le sulfatide est impliqué dans l'adhésion cellulaire *via* des protéines de matrice extracellulaire (Roberts & Ginsburg, 1988), dans la protection de la muqueuse gastrique (Natomi *et al.*, 1993) et dans la présentation d'antigènes lors de l'activation lymphocytaire (De Libero & Mori, 2005). Le sulfatide permet également l'adhésion bactérienne aux cellules cibles, tel que décrit pour certaines ETEC (Khan *et al.*, 1996, Choi & Schifferli, 1999, Jansson *et al.*, 2009), pour *Helicobacter pylori* (Kamisago *et al.*, 1996, Huesca *et al.*, 1998, Tang *et al.*, 2001) et pour des pathogènes respiratoires comme *Mycoplasma pneumoniae* et *Bordetella pertussis* (Krivan *et al.*, 1989, Brennan *et al.*, 1991).

3.6.2.3 Pores membranaires et internalisation

STb perméabilise les vésicules de membrane de la bordure en brosse de jéjunum porcin de façon non spécifique et dose-dépendante, en formant vraisemblablement des pores cationiques non sélectifs (Gonçalves *et al.*, 2007). Cet effet est rapide puisqu'il est observé *in vitro* en moins de 30 secondes d'incubation avec la toxine. La structure tridimensionnelle de STb est nécessaire à la perméabilisation de ces vésicules de membrane. L'association de la toxine en oligomères (cf. paragraphe 3.6.2.1) (Labrie *et al.*, 2001b) pourrait notamment permettre la formation de ces pores membranaires. D'autres études réalisées au laboratoire ont aussi suggéré cette atteinte de la membrane par la toxine. STb entraîne en effet l'entrée de colorants vitaux, comme le bleu de Trypan ou l'iodure de propidium, de façon dose-dépendante dans des lignées cellulaires de

plusieurs origines, sans pourtant affecter la viabilité des cellules (Beausoleil *et al.*, 2002a, Gonçalves *et al.*, 2008, Gonçalves & Dubreuil, 2009). Le rôle de cette perturbation membranaire dans la sécrétion de fluides induite par la toxine n'a pas été déterminé.

Plusieurs travaux ont mis en évidence l'internalisation de la toxine STb dans les cellules. Ce processus pourrait être l'étape initiale de l'induction de la sécrétion de fluides. Chao et Dreyfus (1997) ont étudié l'association *in vitro* de la toxine aux deux lignées cellulaires épithéliales intestinales humaines HT29 et T84. L'interaction entre STb marqué à l'iode radioactif (STb-I¹²⁵) et les cellules est rapide (quelques minutes) et dose-dépendante. Suite au traitement des cellules par une solution acide isotonique dans le but d'éliminer la toxine fixée en surface, environ 45 à 65% de la quantité totale de STb-I¹²⁵ restent insérés dans la membrane cellulaire et/ou sont internalisés dans le cytoplasme. L'analyse des cellules par immunofluorescence a confirmé la présence de toxine au niveau de la membrane et dans le cytoplasme. Le marquage cytoplasmique diffus observé suggère que la toxine ne cible pas d'organelle spécifique. L'internalisation est indépendante de la température, des réarrangements du cytosquelette et ne requiert pas d'énergie. Ces observations indiquent que l'entrée de la toxine dans la cellule n'a lieu ni par une endocytose de type clathrine-dépendante ou clathrine-indépendante, ni par macropinocytose. Ces résultats peuvent aussi refléter la formation d'un complexe stable STb-lipides membranaires, capable d'interagir avec des protéines de membrane, comme des protéines G, et de déclencher la sécrétion de fluides (cf. paragraphe 3.6.2.4). Des résultats similaires ont été obtenus avec des cellules épithéliales intestinales de rat (Chao & Dreyfus, 1999). Une étude réalisée dans notre laboratoire montre la présence de la toxine *in vivo* dans l'épithélium intestinal de rat, 3 heures après l'injection de STb dans le modèle des segments ligaturés (Labrie *et al.*, 2002). La toxine, détectée par l'intermédiaire d'un antisérum anti-STb couplé à l'or colloïdal en microscopie électronique, est retrouvée en majorité dans le cytoplasme et liée en faible quantité à la membrane. Sa distribution aléatoire dans le cytoplasme indique à nouveau qu'aucun organelle n'est ciblé par la toxine. L'hélice- α hydrophobe C-terminale du peptide est impliquée dans le processus (Labrie *et al.*, 2002). L'internalisation de la toxine conjuguée à la sonde fluorescente isothiocyanate de fluorescéine (FITC) a lieu également dans la lignée de fibroblastes murins NIH3T3 après deux heures d'incubation (Gonçalves &

Dubreuil, 2009). Le rôle de l'internalisation dans la pathogenèse est encore inconnu à ce jour.

Sur base de ces différentes observations, un modèle du mécanisme d'internalisation cellulaire de STb est actuellement proposé (Figure 10) (Dubreuil, 2006a). La toxine forme tout d'abord des oligomères en s'associant avec elle-même, le milieu aqueux contraignant l'interaction des hélices- α hydrophobes de monomères de toxine entre elles. Ces oligomères interagissent avec le sulfatide membranaire. L'interaction pourrait nécessiter plusieurs sulfatides, comme c'est le cas pour la liaison de la sous-unité B de la toxine LT au ganglioside GM1 (cf. paragraphe 2.3.1) et pour la liaison de la toxine STa au domaine extracellulaire de la guanylate cyclase C (Vaandrager *et al.*, 1994, Sears & Kaper, 1996, Sato & Shimonishi, 2004). La liaison de STb au sulfatide déstabilise la membrane et permet ensuite l'insertion de la toxine monomérique ou oligomérique dans la bicouche lipidique. L'insertion sous forme d'oligomères crée des pores grâce aux hélices- α hydrophobes en contact avec les phospholipides membranaires, les hélices- α hydrophiles constituant le pore perméable aux cations. La toxine sous forme monomérique ou oligomérique insérée dans les lipides est aussi transportée dans le cytoplasme, par un mécanisme indépendant de facteurs de l'hôte, puis active une protéine G et la cascade d'événements cellulaires conduisant à la diarrhée (cf. paragraphe 3.6.2.4) (Figure 10).

3.6.2.4 Effets cytoplasmiques

Contrairement aux toxines LT et STa des ETEC, STb n'induit pas d'augmentation d'AMPc et de GMPc dans les cellules (Kennedy *et al.*, 1984, Hitotsubashi *et al.*, 1992b, Peterson & Whipp, 1995). La toxine active une protéine G membranaire ($G_{\alpha 13}$) sensible à la toxine pertussis (PT) de *Bordetella pertussis*, et qui régule l'ouverture d'un canal calcique membranaire (Dreyfus *et al.*, 1993). L'ouverture de ce canal entraîne un influx de calcium extracellulaire dans le cytoplasme, observé *in vitro* dans la lignée épithéliale intestinale humaine HT29 et la lignée épithéliale rénale de chien MDCK (Dreyfus *et al.*, 1993). Le niveau élevé de calcium cytoplasmique est responsable de l'activation d'une protéine kinase II Ca^{2+} -calmoduline-dépendante (CaMKII) dans les cellules intestinales de souris après injection de STb (Fujii *et al.*, 1997). La CaMKII induit la sécrétion d'ions

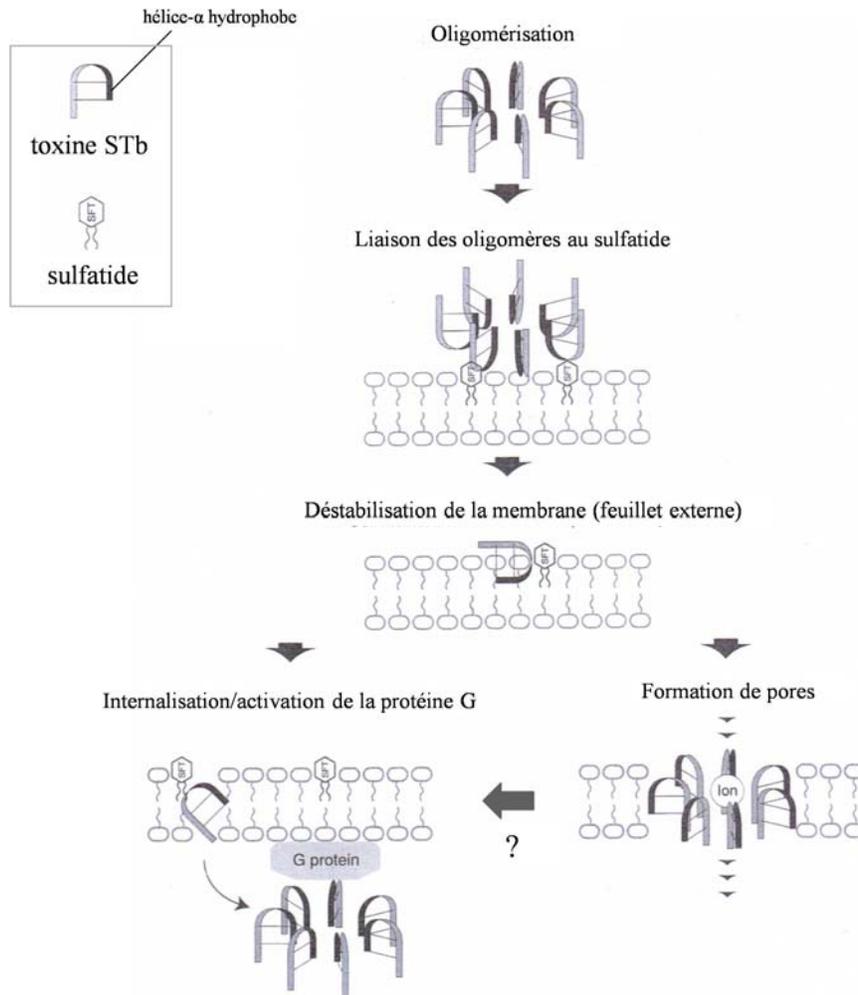


Figure 10. Internalisation de la toxine STb : modèle actuellement proposé. L'oligomérisation de la toxine a lieu *via* l'interaction des hélices- α hydrophobes C-terminales entre elles de 6 ou 7 monomères de STb. Les oligomères se lient au sulfatide et déstabilisent la membrane cellulaire. Cette association permet l'insertion de la toxine dans la membrane lipidique suivie par son passage dans le cytoplasme, la formation de pores non spécifiques et l'activation des événements cellulaires menant à la diarrhée. Adapté de la référence (Dubreuil, 2006a).

chlorures dans l'intestin notamment, en stimulant l'ouverture des « canaux chlorures activés par le calcium » (CaCCs, Calcium-activated Chloride Channels) par phosphorylation (Worrell & Frizzell, 1991, Hartzell *et al.*, 2005).

Notre laboratoire a récemment mis en évidence la localisation intracellulaire de la toxine au niveau des mitochondries de fibroblastes murins NIH3T3 après 6h d'incubation en microscopie à fluorescence (Gonçalves & Dubreuil, 2009). Une hyperpolarisation mitochondriale dose-dépendante a été observée à l'aide d'une sonde fluorescente en cytométrie en flux, suggérant une atteinte du fonctionnement des mitochondries. D'autres lésions histologiques, dont un bourgeonnement cellulaire et l'élargissement du noyau, sont aussi présentes. Ces événements suggèrent l'induction d'une apoptose mais d'autres travaux sont nécessaires pour confirmer ce phénomène.

STb induit la sécrétion de prostaglandine E₂ (PGE₂) et de sérotonine (5-HT) dans la lumière intestinale, comme le montre l'inhibition de la sécrétion due à la toxine en présence d'inhibiteurs de la synthèse des prostaglandines et d'antagonistes des récepteurs sérotoninergiques chez la souris et le rat (Hitotsubashi *et al.*, 1992b, Fujii *et al.*, 1995, Harville & Dreyfus, 1995, Peterson & Whipp, 1995, Harville & Dreyfus, 1996). La synthèse de PGE₂ est activée en partie par la 5-HT libérée par les cellules entérochromaffines de la muqueuse intestinale (Hitotsubashi *et al.*, 1992b). Elle est aussi causée par l'activation directe de la phospholipase A₂, probablement grâce à l'augmentation du calcium intracellulaire causée par STb (Hitotsubashi *et al.*, 1992b, Fujii *et al.*, 1995, Harville & Dreyfus, 1995, Harville & Dreyfus, 1996). Des effets similaires ont aussi été observés pour la toxine STa (Dubreuil, 2006b). Les prostaglandines et la 5-HT favorisent normalement la sécrétion de fluides et la motilité de l'intestin. La toxine en tire donc profit pour causer la diarrhée.

La 5-HT intestinale est généralement sécrétée par les cellules nerveuses entériques, en plus des cellules entérochromaffines. Il a été montré que la toxine accélère la motilité spontanée de sections d'iléon murin lorsqu'elle est appliquée sur les faces mucosale et séreuse des tissus (Hitotsubashi *et al.*, 1992a). STb pourrait donc agir directement sur les cellules musculaires et le système nerveux entérique de la sous-muqueuse intestinale (Peterson & Whipp, 1995). La transcytose de la toxine au travers de l'épithélium n'a cependant pas été démontrée.

3.6.2.5 Modèle proposé

Le mécanisme d'action de la toxine actuellement proposé est présenté dans la figure 11 (Dubreuil, 2006a, Dubreuil, 2008). La toxine forme des hexamères et heptamères en solution. Ces oligomères se lient au sulfatide ancré dans la membrane des entérocytes, par l'intermédiaire de la boucle flexible de la toxine et du galactose sulfaté en position 3 du sulfatide. Les oligomères forment des pores membranaires perméables aux cations. La toxine est aussi internalisée dans le cytoplasme où elle agit sur le potentiel mitochondrial. A partir de la membrane ou directement à partir du cytoplasme, STb active la protéine $G_{\alpha 13}$ régulant un canal calcique membranaire. L'augmentation de la concentration de calcium cytoplasmique active une protéine kinase II Ca^{2+} -calmoduline-dépendante. La libération de PGE_2 et de 5-HT est déclenchée. L'ensemble de ces événements stimule finalement l'ouverture d'un ou de plusieurs canaux ioniques membranaires indéterminés. Les ions Na^+ , Cl^- et HCO_3^- sécrétés entraînant la perte d'eau et la diarrhée (Figure 11).

4. Problématique et démarche scientifique

Comme nous l'avons déjà mentionné au paragraphe 3.6.2.3, la toxine STb est internalisée *in vitro* dans les cellules épithéliales intestinales humaines et de rat, ainsi qu'*in vivo* dans l'épithélium intestinal de rat (Chao & Dreyfus, 1997, Chao & Dreyfus, 1999, Labrie *et al.*, 2002). Le modèle actuel d'internalisation (Figure 10) propose que, suite à son oligomérisation et son interaction avec le sulfatide membranaire, la toxine s'insère dans la bicouche lipidique sous forme monomérique ou oligomérique. Elle resterait alors insérée de façon stable dans la membrane cellulaire et/ou serait transloquée dans le cytoplasme, par un processus de déstabilisation ou rupture membranaire indépendant de l'activité et de facteurs de la cellule hôte. Les mécanismes moléculaires de l'internalisation de la toxine n'ont cependant pas été étudiés en détail. En comparaison, l'endocytose récepteur-dépendante vers le réticulum endoplasmique de la toxine LT des ETEC a été largement décrite (Figure 3) tandis que la toxine STa n'est pas internalisée et déclenche une cascade d'événements directement à partir de la surface de l'épithélium (Figure 5).

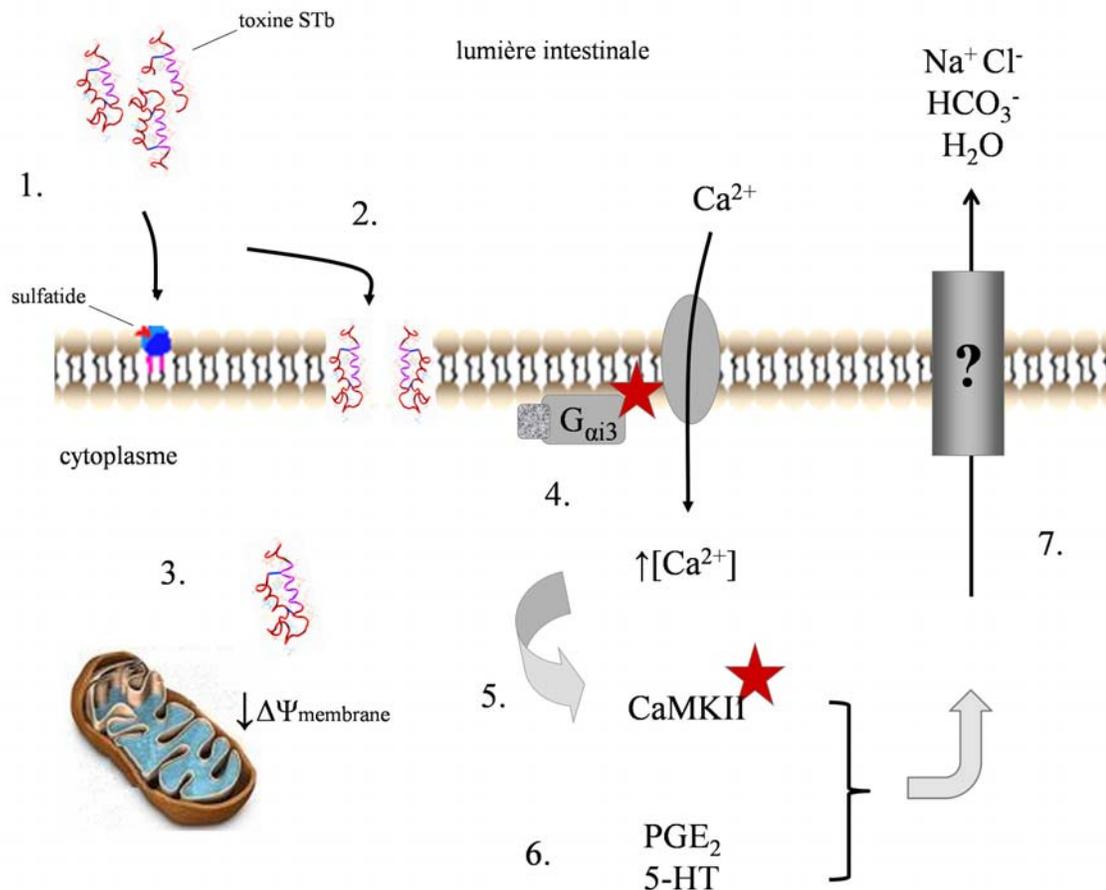


Figure 11. Mécanisme d'action potentiel de la toxine STb. (1) oligomérisation de la toxine et liaison au sulfatide membranaire des entérocytes; (2) formation de pores non spécifiques perméables aux cations ; (3) internalisation de la toxine et déstabilisation du potentiel mitochondrial; (4) activation d'une protéine $G_{\alpha i3}$ couplée à un canal calcique membranaire et augmentation de la concentration en ions calcium dans le cytoplasme; (5) activation d'une protéine kinase II Ca^{2+} -calmoduline-dépendante (CaMKII); (6) libération de prostaglandine E_2 (PGE_2) à partir des phospholipides membranaires, et de sérotonine (5-HT) par les cellules entérochromaffines; (7) ouverture de canaux ioniques membranaires indéterminés et sécrétion d'ions Na^+ , Cl^- et HCO_3^- menant à la diarrhée. Adapté des références (Dubreuil, 2006a, Dubreuil, 2008).

Le modèle actuel du mécanisme d'internalisation de la toxine se base principalement sur des observations dans des lignées épithéliales intestinales humaines et dans l'épithélium intestinal de rat. La cible préférentielle de la toxine *in vivo* est toutefois l'épithélium intestinal porcine (cf. section 3, paragraphe 3.3). La perméabilisation membranaire causée par STb a été observée *in vitro* avec une lignée épithéliale intestinale porcine (Gonçalves *et al.*, 2008) mais l'internalisation proprement dite n'a pas été analysée dans ce type de modèle. Dès lors, l'internalisation de STb a-t-elle bien lieu dans l'épithélium porcine? Si oui, comment se déroule-t-elle? S'agit-il d'une traversée de la membrane lipidique indépendante de l'activité de la cellule hôte, tel qu'observé dans les lignées intestinales humaines, ou au contraire d'un processus d'endocytose? Par ailleurs, les travaux sur le mécanisme d'internalisation de STb dans les cellules épithéliales intestinales humaines (Chao & Dreyfus, 1997) ont été réalisés avant la mise en évidence du récepteur de la toxine, le sulfatide (Rousset *et al.*, 1998b). Le modèle actuel d'internalisation suppose que STb s'insère dans la membrane et soit internalisé suite à son interaction avec le sulfatide membranaire. À notre connaissance, aucune étude n'a évalué l'importance du récepteur dans le processus d'internalisation de STb. Le rôle du sulfatide dans le mécanisme est donc toujours inconnu. La toxine LT, par exemple, est internalisée dépendamment de son récepteur, le glycosphingolipide membranaire GM1 (Figures 2, 3). L'internalisation de STb est-elle aussi directement dépendante du récepteur glycolipidique de la toxine, le sulfatide?

Ces différentes questions nous ont conduits à étudier l'internalisation de la toxine couplée à un fluorophore par la technique de cytométrie en flux (FACS) dans deux lignées cellulaires. La lignée épithéliale intestinale porcine IPEC-J2 constitue un modèle *in vitro* de la cible de STb chez le porc (Schierack *et al.*, 2006) et la lignée de fibroblastes murins NIH3T3 est un modèle cellulaire fréquemment utilisé pour l'étude de l'internalisation de ligands et de toxines (Benlimame *et al.*, 1998, Le & Nabi, 2003). Nous nous sommes d'abord intéressés à l'effet de la température sur l'entrée de STb dans ces deux types cellulaires. Nous avons également cherché à caractériser l'implication du cytosquelette, à l'aide d'inhibiteurs de la polymérisation de composants du cytosquelette. La température et le réarrangement du cytosquelette facteurs influencent en effet l'endocytose de complexes ligands-récepteurs et leur rôle dans l'internalisation de STb a

été préalablement étudié dans les lignées intestinales humaines (Chao & Dreyfus, 1997). Le rôle du récepteur, le sulfatide, a aussi été considéré. Enfin, nous avons tenté de déterminer si les *lipid rafts*, qui contiennent le sulfatide, interviennent dans l'internalisation de la toxine, en utilisant des agents chimiques inhibiteurs.

MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS

Article

**Internalization mechanisms of *Escherichia coli* STb enterotoxin are
cell type-dependent**

(en préparation)

Journal visé : FEMS Immunology and medical microbiology

**Internalization mechanisms of *Escherichia coli* STb enterotoxin are
cell type-dependent**

Marie-Astrid Albert¹, Liliana D. Kojic², Ivan R. Nabi², and J. Daniel Dubreuil*¹

¹*Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP), Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Québec, Canada,* ²*Department of Cellular and Physiological Sciences, Life Sciences Institute, University of British Columbia, Vancouver, Canada*

* Corresponding author

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

Phone : (450) 773-8521 ext. 18433. Fax : (450) 778-8108

Abstract

Previous studies have shown that *Escherichia coli* STb enterotoxin is internalized in intestinal epithelial cells, including those of rat intestinal ligated loops where fluid secretion was induced following injection of the toxin. This suggests that internalization is required for STb pathogenesis. The uptake mechanism, however, remains to be clarified, in particular in porcine jejunum epithelium, the STb target. Using flow cytometry, we studied internalization of STb labelled with fluorescein isothiocyanate in porcine intestinal epithelial IPEC-J2 and murine fibroblast NIH3T3 cell lines. Our results revealed that STb is internalized in both cell lines. Uptake does not depend on temperature in IPEC-J2 cells, whereas it does in NIH3T3 fibroblasts. Inhibitors of cytoskeleton rearrangement used in this study showed that actin reorganization is only required for STb internalization in NIH3T3 cells. However, sulfatide, the toxin receptor, is similarly present in the plasma membrane of both cell lines and similarly internalized with time at 37°C. Disruption of lipid rafts, known to contain sulfatide, following treatment with methyl- β -cyclodextrin or genistein did not affect toxin uptake in either cell line. Overall, our study indicates that, depending on cell type, STb is internalized by different processes. STb internalization should thus preferentially be studied in cellular models representative of *in vivo* conditions. Toxin uptake can depend on host cell activity or not. Although thought to be required to bind the toxin, sulfatide, the STb receptor, is not directly involved in these mechanisms. Uptake independent on cell activity occurs in porcine intestinal epithelium. The cell activity-dependent uptake suggests an endocytosis, which requires actin rearrangement and is not mediated by lipid rafts.

Introduction

Heat-stable enterotoxin b (STb) is one of the toxins produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) which mediate intestinal fluid secretion and diarrhea in animals (Burgess *et al.*, 1978). Its role in swine post-weaning diarrhea is well established and constitutes a major problem for swine industry (Fairbrother *et al.*, 2005). The toxin is a 48-amino acids, basic peptide (5.2 kDa) and includes two α -helices, one amphipathic (residues 10-22) and the other hydrophobic (residues 38-48). The two helices are linked by two disulfide bonds and separated by a glycine-rich loop (Sukumar *et al.*, 1995). This specific structure is required for enterotoxicity (Arriaga *et al.*, 1995, Okamoto *et al.*, 1995).

The process by which the toxin induces *in vivo* watery diarrhea is not completely understood. STb binds to a glycolipidic receptor, sulfatide (Rousset *et al.*, 1998b). This glycosphingolipid is present on brush border membranes of the pig jejunum (Rousset *et al.*, 1998b, Beausoleil & Dubreuil, 2001). STb enterotoxin forms hexamers and heptamers through hydrophobic bonds between the C-terminal hydrophobic α -helix (Labrie *et al.*, 2001b), which could be necessary for sulfatide binding (Labrie *et al.*, 2001a). *In vitro* studies have shown that the pathway of toxin-induced intestinal secretion involves the activation of a GTP-binding protein ($G_{\alpha 13}$ protein) regulating a calcium channel. Opening of this channel results in an elevation of intracellular calcium (Dreyfus *et al.*, 1993, Harville & Dreyfus, 1995), which presumably activates a calcium-calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII). This signalling event may in turn open a plasma membrane chloride channel (Fujii *et al.*, 1997). In addition, intracellular calcium concentration seems to regulate phospholipase A2, which catalyzes the release of arachidonic acid from

membrane phospholipids, and ultimately the formation of prostaglandin E₂ (Hitotsubashi *et al.*, 1992b, Fujii *et al.*, 1995, Harville & Dreyfus, 1995). Serotonin release by enterochromaffin cells and possibly the nervous enteric system has also been involved in the intestinal action of STb (Hitotsubashi *et al.*, 1992b, Harville & Dreyfus, 1995, Harville & Dreyfus, 1996). PGE₂ and serotonin generally promote intestinal secretion and intestinal motility. They might represent an important part of the fluid secretion process induced by the toxin. This cascade of cellular events leads finally to the release of water and HCO₃⁻, Na⁺ and Cl⁻ ions in the intestinal lumen, causing diarrhea (Dubreuil, 2006a). Moreover, STb permeabilizes brush border membrane vesicles from pig jejunum (BBMVs), through the direct formation of pores (Gonçalves *et al.*, 2007). This effect on the membrane has been observed in several cell lines and allows the entry of vital stains, such as propidium iodide or trypan blue, without affecting cell viability (Beausoleil *et al.*, 2002, Gonçalves *et al.*, 2008, Gonçalves & Dubreuil, 2009). Whether permeabilization and pore formation may contribute to the induction of fluid secretion associated with diarrhea is not known.

The steps following STb attachment to the membrane sulfatide remain unresolved. A previous study of Chao and Dreyfus (1997) has shown that radio-labelled toxin (STb-I¹²⁵) associates with HT29 and T84 human intestinal epithelial cell lines. After treatment with an isotonic acid solution which removes surface-bound STb-I¹²⁵, about half of the toxin is inserted in the plasma membrane and/or present in the cytoplasm, as confirmed by fluorescence microscopy. Internalization is independent on temperature and cytoskeleton reorganization and does not require energy. Similar observations have been made with isolated rat intestinal epithelial cells (Chao & Dreyfus, 1999). Our group has also demonstrated the internalization of STb *in vivo* within rat intestinal epithelial cells

(Labrie *et al.*, 2002). Following injection in rat ligated intestinal loops, the toxin was revealed in intestinal sections with gold-conjugated anti-STb antiserum by electron microscopy and was found to be randomly distributed inside the cytoplasm (Labrie *et al.*, 2002). The current model of internalization based on these observations assumes that, following its oligomerization and interaction with membrane sulfatide, the monomeric and/or oligomeric toxin integrates into the lipid bilayer. This membrane destabilization or disruption finally induces the STb translocation into the cytoplasm, independently of host cell activity (Dubreuil, 2006).

Even though internalization of *E.coli* STb enterotoxin in cells has been established, the toxin entry mechanism is still not fully understood, especially in porcine jejunal epithelium, the *in vivo* target of the toxin. Moreover, to our knowledge, role of sulfatide, the toxin receptor, in this internalization has never been considered. In this study, we examined using flow cytometry the association and internalization of STb in porcine epithelial intestinal IPEC-J2 and murine fibroblast NIH3T3 cell lines. In particular, the involvement of temperature, cytoskeleton reorganisation, toxin receptor, and membrane microdomains in the process of internalization was investigated.

Materials and methods

Production and purification of STb enterotoxin. STb enterotoxin from *E.coli* was produced as previously described (Gonçalves *et al.*, 2007). Briefly, an *E.coli* HB101 strain, harboring the pMal-STb plasmid responsible for the expression of a maltose-binding protein–mature STb (MBP-STb) fusion protein, was grown in Luria-Bertani Broth medium supplemented with 50 µg/ml ampicillin until the 600 nm optical density (OD₆₀₀) reached 0.5. MBP-STb fusion protein synthesis was induced for 3 h with 0.3 mM IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) (Sigma Chemical Co., Oakville, ON, Canada). Osmotic shock was performed by resuspension of centrifuged bacteria in 30 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 20% (wt/vol) sucrose and 1 mM EDTA, followed by a second resuspension in 5 mM MgSO₄. The fusion protein contained in the supernatant was affinity purified on an amylose resin (New England Biolabs, Pickering, ON, Canada) and then clived with Xa protease factor (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). The cleaved material was separated on an Aquapore C₈ reversed-phase column (Perkin Elmer, Shelton, CT, USA) with HPLC Akta Purifier10 system (GE Healthcare, Baie d’Urfé, QC, Canada). Mature STb was eluted with a linear gradient of acetonitrile (5 to 100%) in a 0.1% trifluoroacetic acid-water solution, and quantified at 214 nm with NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Nepean, ON, Canada), using aprotinin as a reference. Identity of the peptide was confirmed by Western Blot with an anti-STb antiserum.

Cell culture. IPEC-J2 cells derived from porcine epithelial cells were kindly supplied by Dr A. Blikslager (North Carolina State University, Raleigh, NC, USA) (Schierack *et al.*, 2006). Cells were grown and maintained in 50% Dubelcco’s Modified Eagle’s Medium

(DMEM) and 50% Nutrient Mixture F12 supplemented with 5% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin. Swiss mouse fibroblast NIH3T3 cell line was supplied by Dr. I.R. Nabi (Benlimame *et al.*, 1998) and grown in DMEM supplemented with 10% newborn calf serum and 1% vitamins, L-glutamin, non essential amino acids and penicillin-streptomycin antibiotic mixture. All media and supplements for cell culture were purchased from Invitrogen Life Technologies Inc. (Burlington, ON, Canada). Both cell lines were maintained at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere.

Flow cytometry STb internalization studies. STb enterotoxin was conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC) with the EZ-label TMFITC protein labelling kit (Pierce Rockford, IL, USA) according to the manufacturer's instructions. Cells were plated 24 h (NIH3T3) or 48 h (IPEC-J2) before experiments to reach 60% confluence and detached using 0.05% trypsin-EDTA solution (Invitrogen life Sciences, Burlington, ON Canada), followed by neutralization with complete media. Cells were split in tubes at a density of 500 000 cells per tube. After centrifugation, cells were suspended with 0.5 or 2 µg/ml STb-FITC in Phosphate Buffered Saline (PBS, pH 7.4) and incubated for 30 min at 4°C or 37°C. Cell surface-bound labeled toxin was removed with pronase (400 µg/ml, Sigma) for 10 minutes. Cells were then washed twice with cold PBS and were finally analyzed by flow cytometry. Where indicated, cells were pretreated for 30 min at 37°C in serum-free media with 10 or 20 µM cytochalasin D (Sigma), 5 mM methyl-βcyclodextrin (Sigma), as previously described (Chao & Dreyfus, 1997, Kojic *et al.*, 2007), or 25 µg/ml genistein (Sigma), as the highest concentration not affecting transferrin uptake negative control. These treatments were maintained during incubation with STb-FITC or 15 µg/ml Alexa488-conjugated transferrin (Invitrogen) in PBS for 30 min at 37°C (Kojic *et al.*,

2007). Flow cytometry acquisition and analysis were performed on at least 10000 cells using CellquestPro software on a FACSCalibur (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada).

Flow cytometry sulfatide experiments. Cells were grown, detached and split in tubes as described above. After washing with PBS, non specific surface binding sites were blocked with PBS containing 1% bovine serum albumin for 10 min at room temperature. Surface sulfatide was then detected by mouse monoclonal anti-sulfatide primary antibody (Sulph I, 18 µg/ml) obtained from Dr P. Fredman, University of Göteborg, Göteborg, Sweden (Fredman *et al.*, 1988), for 30 min at 4°C. Revelation was performed with FITC-conjugated goat anti-mouse secondary antibody (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) incubated in the same conditions. To study surface sulfatide internalization, cells were incubated with anti-sulfatide antibody for 30 min at 4°C, washed with PBS to remove unbound antibodies and incubated for 15 or 60 min at 37°C. Residual surface-bound antibodies were detected with the FITC-labelled goat anti-mouse secondary antibody for 30 min at 4°C, prior to FACS analysis.

Confocal microscopy. IPEC-J2 and NIH3T3 cell lines were plated 2-3 days before the experiments on glass coverslips and treated for 30 min at 37°C with 10 or 20 µM cytochalasin D in their respective serum-free medium. Cells were rinsed three times with PBS, fixed 15 min with 3% paraformaldehyde (Sigma) and permeabilized with 0.2% Triton X-100 (Sigma). Actin filaments were labelled with 40 µg/ml phalloidin-FITC (Sigma) for 40 min at room temperature. Coverslips were mounted on glass slides in a Celvol 205 polyvinyl alcohol solution (Celanese, Dallas, TX, USA) and conserved at 4°C.

Confocal images were obtained using a 488 nm laser (green) of an Olympus FV1000 IX81 microscope (60X objective) (Olympus, Melville, NY, USA).

Results

STb enterotoxin association and internalization in IPEC-J2 and NIH3T3 cell lines.

In order to characterize the poorly understood internalization mechanism of STb toxin, we examined the binding and the uptake of the toxin in the porcine intestinal epithelial IPEC-J2, and the murine fibroblast NIH3T3 cell lines, as previously performed in HT29 and T84 human intestinal cell lines (Chao & Dreyfus, 1997). IPEC-J2 cells are derived from porcine jejunal epithelial cells and provide a workable model to study ETEC pathogenesis and STb mechanism of action (Schierack *et al.*, 2006, Gonçalves *et al.*, 2008, Koh *et al.*, 2008). NIH3T3 mouse fibroblasts internalize STb toxin (Gonçalves & Dubreuil, 2009) and are extensively used to study pathogenesis of bacterial toxins and internalization of ligands (Benlimame *et al.*, 1998, Le & Nabi, 2003, Gerhard *et al.*, 2005, Ohnishi *et al.*, 2008). Association of STb labelled with fluorescein isothiocyanate (FITC) with both cell lines and toxin internalization were determined at 4°C and 37°C using flow cytometry analysis of pronase-treated (internalization) or untreated (association) cells that were incubated with the FITC-conjugated toxin (Fig. 1). At subphysiological temperatures, cellular processes are slower, a condition that should preclude the toxin uptake, whereas warming of cells at 37°C typically results in an increase of ligand binding and internalization due to endocytosis (Prywes *et al.*, 1986, Sandvig *et al.*, 1989, Koh *et al.*, 1992, Paccaud *et al.*, 1992, Chao & Dreyfus, 1997, Benlimame *et al.*, 1998, Le & Nabi, 2003). Figure 1A represents fluorescence of IPEC-J2 and NIH3T3 cells treated with 2 µg/ml STb-FITC at 4°C (thin line curves) and at 37°C (bold line curves). Shaded area curves refer to control cells incubated with no toxin. Association of the FITC-

labelled toxin with cells at 4°C or 37°C resulted in a shift of cells fluorescence (mean fluorescence intensities, MFI) to the right for both cell lines (Fig. 1A, top graphs). This shift was greater at 37°C. In both cell lines, percentages of positive cells revealed a highly significant association of the toxin with the cells at 37°C relative to 4°C (Fig. 1B, 1C).

Protease treatment generally allows removing surface bound-ligand (Goud & Antoine, 1984, Spycher & Nydegger, 1986, Kojic *et al.*, 2007). Thus, under pronase treatment, only the ligand which is internalized can resist the protease effect and the remaining fluorescence usually defines ligand internalization. In IPEC-J2 cells, a significant amount of toxin was removed at 37°C (Fig. 1B, 1C). As such, STb-FITC uptake was not significantly different between 4°C and 37°C in these cells (Fig. 1A, bottom graph, 1B, 1C). In contrast, NIH3T3 showed a higher STb-FITC internalization at 37°C compared to 4°C, with both STb concentrations tested (Fig. 1A, bottom graph, 1B, 1C). At 4°C, a certain amount of the FITC-labelled toxin resisting pronase treatment is internalized in both cell lines, relative to controls cells not incubated with the toxin (Fig. 1A).

Actin reorganization is involved in STb uptake in NIH3T3 fibroblasts. Cytoskeleton reorganization is often involved in endocytic processes (Apodaca, 2001, Robertson *et al.*, 2009). The possible role of actin polymerization in the internalization of STb was studied using cytochalasin D. This fungal metabolite acts as an actin polymerization inhibitor, binding to F-actin subunits and preventing their association with the end of the filaments. It thus can stop endocytic and phagocytic processes (Cooper, 1987). The inhibitory effect of the drug on actin polymerization in IPEC-J2 and NIH3T3 cells was confirmed by fluorescence microscopy. Cells were pre-treated for 30 minutes at 37°C with 10 µM (Fig.

2) or 20 μM cytochalasin D (data not shown), as previously described (Chao & Dreyfus, 1997, Kojic *et al.*, 2007). Actin filaments were revealed using phalloidin-FITC, another actin-binding fungal toxin (Cooper, 1987, Small *et al.*, 1988). As expected, cytochalasin D, at both concentrations, disrupted the long actin bundle network in both cell lines, resulting in aggregates in IPEC-J2 cells (Fig. 2A), or in shorter and disorganized actin fibres in NIH3T3 cells (Fig. 2B). To study the role of actin reorganization in STb internalization, IPEC-J2 and NIH3T3 cells, were pretreated with 10 μM (Fig. 3) or 20 μM (data not shown) of cytochalasin D and were incubated with FITC-labelled toxin (0.5 or 2 $\mu\text{g/ml}$) for 30 min under the same conditions. Figure 3A presents fluorescence of IPEC-J2 (left panel) and NIH3T3 (right panel) cells, following treatment with the inhibitor. In NIH3T3 cells, cells fluorescence intensity was moved to the left after cytochalasin D treatment (thin line) compared to the control (bold line). This level was similar to the STb-FITC labelled cells at 4°C (dashed line). No effect was observed with cytochalasin D in IPEC-J2 cells. Percentages of positive cells (Fig. 3B, 3C) confirmed that STb-FITC internalization in IPEC-J2 cells was not affected by 10 μM cytochalasin D. In contrast, the drug significantly reduced the toxin uptake in NIH3T3 cells compared to the control (Fig. 3B, 3C). Higher concentration of cytochalasin D (20 μM) gave identical results (data not shown). The role of microtubule assemblage in toxin uptake was also studied using nocodazole, a microtubule depolymerizing agent (Lee *et al.*, 1980). Nocodazole at 10 or 20 μM (Le & Nabi, 2003) had no significant effect on STb uptake in either cell line (data not shown).

Sulfatide is detected on IPEC-J2 and NIH3T3 cell surface and internalized with time. Sulfatide, the functional receptor for STb, is a membrane glycosphingolipid present

on the porcine intestinal epithelium cell membrane (Rousset *et al.*, 1998a, Rousset *et al.*, 1998b, Beausoleil & Dubreuil, 2001). Presence of sulfatide at the surface of IPEC-J2 and NIH3T3 cells was confirmed using an anti-sulfatide monoclonal antibody (Fredman *et al.*, 1988) revealed by a FITC-conjugated secondary antibody at 4°C (Fig. 4). As shown in Fig. 4A, detection of membrane sulfatide with the anti-sulfatide antibody resulted in a shift of the cells fluorescence (bold line) to the right in both cell lines, relative to controls labelled with the secondary antibody only (shaded area curves). Fluorescence curves for these controls were similar to those of untreated cells and no fluorescence was observed for cells labelled with the anti-sulfatide antibody only (data not shown). Percentages of positive cells with bound anti-sulfatide antibody were significantly higher than those due to the secondary antibody only (Fig. 4B), indicating that surface sulfatide was present on IPEC-J2 and NIH3T3 cells.

As STb is internalized into cells (Chao & Dreyfus, 1997, Labrie *et al.*, 2002), we presumed that sulfatide would be internalized as well, as described for GM1 in the internalization of cholera toxin (Sanchez & Holmgren, 2008). Internalization of membrane sulfatide was measured after 15 or 60 min incubation at 37°C (Fig. 5). In both cell lines (Fig. 5A), a shift of the curves to the left was noted at 37°C (15 and 60 min: thin and dashed lines, respectively) compared to the control at 4°C (bold line; 0 min at 37°C; initial surface sulfatide). Positive cells percentages were significantly decreased with time at 37°C in both cell lines (IPEC-J2, $p < 0.001$; NIH3T3, $p < 0.05$) (Fig. 5B), indicating the internalization of the sulfatide-bound antibodies at 37°C. The strongest reduction occurred in 15 min, after which the decrease seems to stabilize until 60 min.

Lipid rafts do not mediate toxin uptake. Lipid rafts are highly ordered membrane microdomains, distinct from the surrounding membrane and rich in cholesterol, glycosphingolipids and saturated lipids (Laude & Prior, 2004). Proteins found in these specialized domains include acylated signalling proteins, such as Src family kinases (Simons & Toomre, 2000). As lipid rafts are responsible for the endocytosis of various ligands (Parton & Richards, 2003) and contain sulfatide, the STb receptor (Delacour *et al.*, 2005, Eckhardt, 2008), we examined the involvement of these microdomains in toxin internalization. Rafts disruption is generally performed by cells treatment with methyl- β -cyclodextrin (m β CD), a cholesterol-depleting agent, or genistein, a Src family tyrosine-kinase inhibitor, preventing endocytosis from these domains (Akiyama *et al.*, 1987, Smart & Anderson, 2002, Le & Nabi, 2003, Kojic *et al.*, 2007). Transferrin is commonly used as a negative control ligand, because of its clathrin-dependent endocytosis (Brown *et al.*, 1983). After cells treatment with m β CD (Fig. 6) or genistein (data not shown), uptake of STb-FITC or Alexa 488-conjugated transferrin in IPEC-J2 and NIH3T3 cells was assessed. In both cell lines, no significant difference in toxin internalization was observed in the presence of m β CD (Fig. 6A, 6B), with no effect on transferrin uptake (Fig. 6C). Toxin uptake was not prevented by genistein either (data not shown).

Discussion

Several studies have established that *E.coli* heat-stable enterotoxin STb is internalized in human and rat intestinal epithelial cells (Chao & Dreyfus, 1997, Chao & Dreyfus, 1999, Labrie *et al.*, 2002). However, the molecular details of the internalization process are still unknown, in particular in porcine jejunal epithelium, the *in vivo* target of the toxin. In this research work, we investigated the association and the internalization of STb at 4°C and 37°C with two cell lines, IPEC-J2 and NIH3T3, using flow cytometry. Our results indicate that STb association with both cell lines is temperature-dependent. STb internalization, determined after pronase treatment, is temperature-independent in IPEC-J2 cells, as opposed to NIH3T3 cells, in which it is temperature-dependent. Both cell lines exhibit little STb internalization at 4°C, suggesting that a small fraction of the toxin could be stably inserted in the membrane or translocated in the cytoplasm even when cellular processes are slower. These data indicate that STb can be internalized by various processes depending on cell type. The temperature-independent internalization of STb has been demonstrated in human HT29 and T84 and rat intestinal cell lines by Chao and Dreyfus (1997, 1999), as around 55% of the total STb-I¹²⁵ were already internalized at 4°C and 22°C after only 30 seconds. In contrast, the positive effect of temperature we observed in NIH3T3 fibroblasts supports the hypothesis that an endocytic process also mediates STb uptake. Inhibitors of cytoskeleton reorganization confirmed that STb internalization is dependent on actin polymerization in NIH3T3 fibroblasts. This corroborates the idea that STb undergoes a temperature-dependent endocytic pathway in this cell line (Mayor & Pagano, 2007, Robertson *et al.*, 2009). By contrast, actin rearrangement is not involved in the STb uptake in porcine intestinal IPEC-J2 cells, as

previously showed by Chao and Dreyfus (1997) with human T84 and HT29 intestinal cell lines. This result is consistent with our observations on the lack of temperature effect in this cell line.

The toxin receptor, sulfatide, is a membrane glycosphingolipid (Rousset *et al.*, 1998b). To our knowledge, its role in toxin internalization has never been studied. It is similarly present on the surface of IPEC-J2 and NIH3T3 cells and similarly internalized with time at 37°C in both cell lines. This internalization reflects the cellular sulfatide turnover. Membrane sulfatide undergoes recycling by endocytosis and transport to lysosomes to be degraded (Kolter & Sandhoff, 2005), whereas it is synthesized in the endoplasmic reticulum and the Golgi before being inserted in the membrane by exocytosis of the sulfatide-carrying vesicles (Eckhardt, 2008). Sulfatide is reported to be located in membrane lipid rafts (Delacour *et al.*, 2005, Eckhardt, 2008), which are found to be increasingly involved in endocytosis of various molecules (Sandvig & van Deurs, 2002, Conner & Schmid, 2003, Parton & Richards, 2003, van der Goot & Young, 2009). Indeed, sulfatide endogenous internalization depends on these membrane microdomains, as rafts disruptors such as genistein inhibit this endocytosis independently on cell type (Singh *et al.*, 2003). Our data show that lipid rafts disruption with m β CD or genistein did not affect internalization of STb in either cell line. It thus appears that similarities in terms of surface sulfatide levels and internalization in IPEC-J2 and NIH3T3 cells cannot explain discrepancies observed in STb internalization between these two cell lines. Moreover, internalization pathways taken by sulfatide and STb seem to be different. Together, these results suggest that toxin uptake does not directly depend on sulfatide. As sulfatide is known as the STb receptor, we might hypothesize that the toxin uses sulfatide

as a “docking” molecule (Beausoleil & Dubreuil, 2001), whereas another potential membrane protein or lipid would be involved in its internalization. It is known that STb binds to some gangliosides, including GM3 (Rousset *et al.*, 1998b), although some studies have contradicted this observation (Chao & Dreyfus, 1997, Beausoleil & Dubreuil, 2001). Competition studies between STb-I¹²⁵ and an excess of unlabelled toxin in HT29 and T84 cells have also indicated that STb interacts with multiple molecules on the cell membrane, instead of a particular one (Chao & Dreyfus, 1997).

In summary, our data show that *E.coli* STb enterotoxin is internalized in both cell lines tested, especially in the porcine intestinal epithelial cell line. More importantly, this study reveals that STb internalization mechanisms vary upon cell type. This phenomenon is also observed with cholera toxin and Shiga toxin, which undergo multiple uptake pathways depending on cell type particularities (Sandvig *et al.*, 2002, Pang *et al.*, 2004). Toxin uptake mechanisms can be dependent on host cell activity or not. Sulfatide, the toxin receptor, is not directly involved in these processes. In porcine intestinal epithelial cells, STb is internalized independently on host cell activity. However, the specific mechanisms by which the toxin is inserted in the plasma membrane and/or translocated into the cytoplasm (Dubreuil, 2006) remains to be elucidated. Membrane lipid bilayer interaction by insertion and translocation independently on host cell activity has been described with plant antimicrobial thionins (Stec, 2006), amphipatic α -helical peptides (Shai, 1999) or proteins able to translocate across cell membranes, such as HIV-1 Tat protein (Hercé & Garcia, 2007a). These peptides and proteins (20-100 amino acids) share a basic and cationic structure with disulfide bonds and/or amphipatic α -helices. Thionins membrane insertion is sufficient to activate calcium uptake and phospholipase A2 in host

cell (Stec, 2006), cellular events that are also induced by STb (Dreyfus *et al.*, 1993, Fujii *et al.*, 1995). Proteins such as Tat can translocate membranes due to highly basic short sequence segments, categorized in a family of peptides called cell-penetrating peptides (CPPs, 10-30 a.a.) (Vives *et al.*, 1997, Trehin & Merkle, 2004). A Tat CPP spontaneous translocation mechanism across cell membranes has recently been proposed (Herce & Garcia, 2007b). It involves strong interactions between peptides and phospholipids charges on both sides of the lipid bilayer, a thinning of the membrane and peptides insertion that nucleate the formation of a transient pore, followed by the translocation of peptides diffusing on the pore surface (Herce & Garcia, 2007b). As STb shares common structural features with all these molecules, mechanisms of toxin cell membrane insertion and translocation could be similar. In addition, toxin internalization can depend on cell activity, as observed in NIH3T3 fibroblasts, indicating a possible involvement of endocytosis. This process requires actin polymerization and is not mediated by lipid rafts. The STb uptake dependence on actin integrity further supports that lipid rafts are not involved in this pathway, as actin disruption generally enhances raft-mediated endocytosis (Kojic *et al.*, 2007).

Internalization of STb therefore appears to be a more sophisticated process than expected. The porcine IPEC-J2 cell line has been used because it seems to be a representative model of the *in vivo* target of the toxin. Since STb uptake mechanisms vary upon cell type, it would be more relevant to use cellular models related to *in vivo* conditions, such as porcine cell lines, to study toxin internalization.

Acknowledgements

This work was supported by a grant to J. Daniel Dubreuil from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and by the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies. M.A. Albert received a grant from the Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP). We thank Patrick Vincent from the Centre de Recherche en Reproduction Animale de l'Université de Montréal for his technical assistance with confocal microscopy.

References

- Akiyama, T., J. Ishida, S. Nakagawa, H. Ogawara, S. Watanabe, N. Itoh, M. Shibuya & Y. Fukami, (1987) Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* **262**: 5592-5595.
- Apodaca, G., (2001) Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton. *Traffic* **2**: 149-159.
- Arriaga, Y. L., B. A. Harville & L. A. Dreyfus, (1995) Contribution of individual disulfide bonds to biological action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B. *Infect Immun* **63**: 4715-4720.
- Beausoleil, H. E. & J. D. Dubreuil, (2001) *In vitro* binding characteristics and affinity for sulfatide of *Escherichia coli* STb enterotoxin. *Receptors Channels* **7**: 401-411.
- Beausoleil, H. E., V. Labrie & J. D. Dubreuil, (2002) Trypan blue uptake by chinese hamster ovary cultured epithelial cells: a cellular model to study *Escherichia coli* STb enterotoxin. *Toxicon* **40**: 185-191.
- Benlimame, N., P. U. Le & I. R. Nabi, (1998) Localization of autocrine motility factor receptor to caveolae and clathrin-independent internalization of its ligand to smooth endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* **9**: 1773-1786.
- Brown, M. S., R. G. Anderson & J. L. Goldstein, (1983) Recycling receptors: the round-trip itinerary of migrant membrane proteins. *Cell* **32**: 663-667.
- Burgess, M. N., R. J. Bywater, C. M. Cowley, N. A. Mullan & P. M. Newsome, (1978) Biological evaluation of a methanol-soluble, heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits, and calves. *Infect Immun* **21**: 526-531.
- Chao, K. L. & L. A. Dreyfus, (1997) Interaction of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B with cultured human intestinal epithelial cells. *Infect Immun* **65**: 3209-3217.
- Chao, K. L. & L. A. Dreyfus, (1999) Interaction of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B with rat intestinal epithelial cells and membrane lipids. *FEMS Microbiol Lett* **172**: 91-97.
- Conner, S. D. & S. L. Schmid, (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **422**: 37-44.
- Cooper, J. A., (1987) Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol* **105**: 1473-1478.
- Delacour, D., V. Gouyer, J. P. Zanetta, H. Drobecq, E. Leteurtre, G. Grard, O. Moreau-Hannedouche, E. Maes, A. Pons, S. Andre, A. Le Bivic, H. J. Gabius, A. Manninen, K. Simons & G. Huet, (2005) Galectin-4 and sulfatides in apical membrane trafficking in enterocyte-like cells. *J Cell Biol* **169**: 491-501.
- Dreyfus, L. A., B. Harville, D. E. Howard, R. Shaban, D. M. Beatty & S. J. Morris, (1993) Calcium influx mediated by the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B (STB). *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 3202-3206.
- Dubreuil, J. D., (2006) *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b. In: The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins, third edition. J. E. Alouf & M. R. Popoff (eds). London: Elsevier, pp. 491-503.
- Eckhardt, M., (2008) The role and metabolism of sulfatide in the nervous system. *Mol Neurobiol* **37**: 93-103.

- Fairbrother, J. M., E. Nadeau & C. L. Gyles, (2005) *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim Health Res Rev* **6**: 17-39.
- Fredman, P., L. Mattsson, K. Andersson, P. Davidsson, I. Ishizuka, S. Jeansson, J. E. Mansson & L. Svennerholm, (1988) Characterization of the binding epitope of a monoclonal antibody to sulphatide. *Biochem J* **251**: 17-22.
- Fujii, Y., Y. Kondo & K. Okamoto, (1995) Involvement of prostaglandin E2 synthesis in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *FEMS Microbiol Lett* **130**: 259-265.
- Fujii, Y., T. Nomura, H. Yamanaka & K. Okamoto, (1997) Involvement of Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase II in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *Microbiol Immunol* **41**: 633-636.
- Gerhard, R., S. Burger, H. Tatge, H. Genth, I. Just & F. Hofmann, (2005) Comparison of wild type with recombinant *Clostridium difficile* toxin A. *Microb Pathog* **38**: 77-83.
- Gonçalves, C., F. Berthiaume, M. Mourez & J. D. Dubreuil, (2008) *Escherichia coli* STb toxin binding to sulfatide and its inhibition by carragenan. *FEMS Microbiol Lett* **281**: 30-35.
- Gonçalves, C. & J. D. Dubreuil, (2009) Effect of *Escherichia coli* STb toxin on NIH-3T3 cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* **55**: 432-441.
- Gonçalves, C., V. Vachon, J. L. Schwartz & J. D. Dubreuil, (2007) The *Escherichia coli* enterotoxin STb permeabilizes piglet jejunal brush border membrane vesicles. *Infect Immun* **75**: 2208-2213.
- Goud, B. & J. C. Antoine, (1984) Emergence of a surface immunoglobulin recycling process during B lymphocyte differentiation. *J Cell Biol* **98**: 1238-1246.
- Harville, B. A. & L. A. Dreyfus, (1995) Involvement of 5-hydroxytryptamine and prostaglandin E2 in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B. *Infect Immun* **63**: 745-750.
- Harville, B. A. & L. A. Dreyfus, (1996) Release of serotonin from RBL-2H3 cells by the *Escherichia coli* peptide toxin STb. *Peptides* **17**: 363-366.
- Herce, H. D. & A. E. Garcia, (2007a) Cell penetrating peptides: how do they do it? *J Biol Phys* **33**: 345-356.
- Herce, H. D. & A. E. Garcia, (2007b) Molecular dynamics simulations suggest a mechanism for translocation of the HIV-1 TAT peptide across lipid membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 20805-20810.
- Hitotsubashi, S., Y. Fujii, H. Yamanaka & K. Okamoto, (1992) Some properties of purified *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *Infect Immun* **60**: 4468-4474.
- Koh, G. Y., D. R. Nussenzveig, J. Okolicany, D. A. Price & T. Maack, (1992) Dynamics of atrial natriuretic factor-guanylate cyclase receptors and receptor-ligand complexes in cultured glomerular mesangial and renomedullary interstitial cells. *J Biol Chem* **267**: 11987-11994.
- Koh, S. Y., S. George, V. Brozel, R. Moxley, D. Francis & R. S. Kaushik, (2008) Porcine intestinal epithelial cell lines as a new *in vitro* model for studying adherence and pathogenesis of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Vet Microbiol* **130**: 191-197.
- Kojic, L. D., B. Joshi, P. Lajoie, P. U. Le, M. E. Cox, D. A. Turbin, S. M. Wiseman & I. R. Nabi, (2007) Raft-dependent endocytosis of autocrine motility factor is

- phosphatidylinositol 3-kinase-dependent in breast carcinoma cells. *J Biol Chem* **282**: 29305-29313.
- Kolter, T. & K. Sandhoff, (2005) Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 81-103.
- Labrie, V., H. E. Beausoleil, J. Harel & J. D. Dubreuil, (2001a) Binding to sulfatide and enterotoxicity of various *Escherichia coli* STb mutants. *Microbiology* **147**: 3141-3148.
- Labrie, V., J. Harel & J. D. Dubreuil, (2001b) Oligomerization of *Escherichia coli* enterotoxin b through its C-terminal hydrophobic alpha-helix. *Biochim Biophys Acta* **1535**: 128-133.
- Labrie, V., J. Harel & J. D. Dubreuil, (2002) *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b (STb) *in vivo* internalization within rat intestinal epithelial cells. *Vet Res* **33**: 223-228.
- Laude, A. J. & I. A. Prior, (2004) Plasma membrane microdomains: organization, function and trafficking. *Mol Membr Biol* **21**: 193-205.
- Le, P. U. & I. R. Nabi, (2003) Distinct caveolae-mediated endocytic pathways target the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* **116**: 1059-1071.
- Lee, J. C., D. J. Field & L. L. Lee, (1980) Effects of nocodazole on structures of calf brain tubulin. *Biochemistry* **19**: 6209-6215.
- Mayor, S. & R. E. Pagano, (2007) Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 603-612.
- Ohnishi, H., M. Miyake, S. Kamitani & Y. Horiguchi, (2008) The morphological changes in cultured cells caused by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *FEMS Microbiol Lett* **279**: 174-179.
- Okamoto, K., T. Baba, H. Yamanaka, N. Akashi & Y. Fujii, (1995) Disulfide bond formation and secretion of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *J Bacteriol* **177**: 4579-4586.
- Paccaud, J. P., K. Siddle & J. L. Carpentier, (1992) Internalization of the human insulin receptor. The insulin-independent pathway. *J Biol Chem* **267**: 13101-13106.
- Pang, H., P. U. Le & I. R. Nabi, (2004) Ganglioside GM1 levels are a determinant of the extent of caveolae/raft-dependent endocytosis of cholera toxin to the Golgi apparatus. *J Cell Sci* **117**: 1421-1430.
- Parton, R. G. & A. A. Richards, (2003) Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic* **4**: 724-738.
- Prywes, R., E. Livneh, A. Ullrich & J. Schlessinger, (1986) Mutations in the cytoplasmic domain of EGF receptor affect EGF binding and receptor internalization. *EMBO J* **5**: 2179-2190.
- Robertson, A. S., E. Smythe & K. R. Ayscough, (2009) Functions of actin in endocytosis. *Cell Mol Life Sci* **66**: 2049-2065.
- Rousset, E., J. Harel & J. D. Dubreuil, (1998a) Binding characteristics of *Escherichia coli* enterotoxin b (STb) to the pig jejunum and partial characterization of the molecule involved. *Microb Pathog* **24**: 277-288.
- Rousset, E., J. Harel & J. D. Dubreuil, (1998b) Sulfatide from the pig jejunum brush border epithelial cell surface is involved in binding of *Escherichia coli* enterotoxin b. *Infect Immun* **66**: 5650-5658.

- Sanchez, J. & J. Holmgren, (2008) Cholera toxin structure, gene regulation and pathophysiological and immunological aspects. *Cell Mol Life Sci* **65**: 1347-1360.
- Sandvig, K., S. Grimmer, S. U. Lauvrak, M. L. Torgersen, G. Skretting, B. van Deurs & T. G. Iversen, (2002) Pathways followed by ricin and Shiga toxin into cells. *Histochem Cell Biol* **117**: 131-141.
- Sandvig, K., S. Olsnes, J. E. Brown, O. W. Petersen & B. van Deurs, (1989) Endocytosis from coated pits of Shiga toxin: a glycolipid-binding protein from *Shigella dysenteriae* 1. *J Cell Biol* **108**: 1331-1343.
- Sandvig, K. & B. van Deurs, (2002) Membrane traffic exploited by protein toxins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**: 1-24.
- Schierack, P., M. Nordhoff, M. Pollmann, K. D. Weyrauch, S. Amasheh, U. Lodemann, J. Jores, B. Tachu, S. Kleta, A. Bliklager, K. Tedin & L. H. Wieler, (2006) Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for *in vitro* studies of microbial pathogenesis in swine. *Histochem Cell Biol* **125**: 293-305.
- Shai, Y., (1999) Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta* **1462**: 55-70.
- Simons, K. & D. Toomre, (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: 31-39.
- Singh, R. D., V. Puri, J. T. Valiyaveetil, D. L. Marks, R. Bittman & R. E. Pagano, (2003) Selective caveolin-1-dependent endocytosis of glycosphingolipids. *Mol Biol Cell* **14**: 3254-3265.
- Small, J. V., S. Zobeley, G. Rinnerthaler & H. Faulstich, (1988) Coumarin-phalloidin: a new actin probe permitting triple immunofluorescence microscopy of the cytoskeleton. *J Cell Sci* **89 (Pt 1)**: 21-24.
- Smart, E. J. & R. G. Anderson, (2002) Alterations in membrane cholesterol that affect structure and function of caveolae. *Methods Enzymol* **353**: 131-139.
- Spycher, M. O. & U. E. Nydegger, (1986) Part of the activating cross-linked immunoglobulin G is internalized by human platelets to sites not accessible for enzymatic digestion. *Blood* **67**: 12-18.
- Stec, B., (2006) Plant thionins--the structural perspective. *Cell Mol Life Sci* **63**: 1370-1385.
- Sukumar, M., J. Rizo, M. Wall, L. A. Dreyfus, Y. M. Kupersztoch & L. M. Gierasch, (1995) The structure of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b by nuclear magnetic resonance and circular dichroism. *Protein Sci* **4**: 1718-1729.
- Trehin, R. & H. P. Merkle, (2004) Chances and pitfalls of cell penetrating peptides for cellular drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* **58**: 209-223.
- van der Goot, G. & J. A. Young, (2009) Receptors of anthrax toxin and cell entry. *Mol Aspects Med* **30**: 406-412.
- Vives, E., P. Brodin & B. Lebleu, (1997) A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem* **272**: 16010-16017.

Figures legends

Figure 1. Association and internalization of STb-FITC in IPEC-J2 and NIH3T3 cell lines. IPEC-J2 and NIH3T3 cells were incubated for 30 min at 4°C or 37 °C with 0.5 or 2 µg/ml STb-FITC in PBS. FACS analysis was performed before and after a 10 min incubation with pronase (400 µg/ml). **(A)** Fluorescence of IPEC-J2 (left) and NIH3T3 (right) cells labelled with 2 µg/ml STb-FITC, before (top graphs) and after (bottom graphs) pronase treatment (shaded areas : control cells incubated with PBS only; thin lines : STb-FITC stained cells at 4°C; bold lines : STb-FITC stained cells at 37°C; one representative experiment). **(B)** and **(C)** percentages of fluorescent positive IPEC-J2 and NIH3T3 cells after addition of 0.5 µg/ml or 2 µg/ml STb-FITC, respectively. Positive cells percentages are derived from an arbitrarily 5% positive staining cut-off set on the pronase-untreated 4°C controls. Experiments were performed three times in duplicate (mean ± SEM; Two-way analysis of variance, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 relative to the respective controls).

Figure 2. Disruption of actin polymerization by cytochalasin D in IPEC-J2 and NIH3T3 cells. IPEC-J2 **(A)** and NIH3T3 **(B)** cells were pretreated with 10 µM cytochalasin D (CytD) for 30 min at 37°C in serum-free media. F-actin of paraformaldehyde-fixed cells was revealed with phalloidin-FITC (40 µg/ml). Untreated cells were labelled in parallel after incubation for 30 min at 37°C in serum-free media. Pictures were taken with an Olympus FV100 confocal microscope (60X objective). Each bottom panel shows 2x zoomed images of the inset (white box, first row) with phalloidin-FITC in green. Experiments were repeated twice in duplicate.

Figure 3. Involvement of actin polymerization in STb uptake in IPEC-J2 and NIH3T3 cell lines. IPEC-J2 and NIH3T3 cells, pretreated for 30 min at 37°C with 10 µM cytochalasin D in serum-free media, were incubated with 0.5 µg/ml or 2 µg/ml STb-FITC in PBS, prior to incubation with pronase (400 µg/ml) and FACS analysis. **(A)** Fluorescence of IPEC-J2 (left) and NIH3T3 (right) cells labelled with 2 µg/ml STb-FITC (shaded areas : unlabelled cells in PBS; bold lines : STb-FITC control cells at 37°C; thin lines : STb-FITC labelled cells treated with 10 µM cytochalasin D at 37°C; dashed lines : STb-FITC labelled cells at 4°C; one representative experiment). Percentages of positive cells incubated with 0.5 µg/ml **(B)** or 2 µg/ml STb-FITC **(C)** are presented. Percentages of positive cells were defined relative to a 100% positivity cut-off set arbitrarily on STb-FITC control cells at 37°C. Experiments were performed three times in duplicate (mean ± SEM; One-way analysis of variance, **p<0.01 relative to the respective controls).

Figure 4. Cell surface sulfatide detection on IPEC-J2 and NIH3T3 cell lines. Washed cells were incubated with monoclonal anti-sulfatide antibody followed by FITC-labeled goat anti-mouse secondary antibody. Fluorescence associated with cells was measured by FACS. **(A)** Fluorescence of IPEC-J2 (left) and NIH3T3 (right) cells labelled with secondary antibody only (shaded areas, negative controls) and the anti-sulfatide antibody (bold lines) (one representative experiment). **(B)** Percentages of FITC-positive cells labelled with secondary antibody only (negative controls) or anti-sulfatide antibody are presented. Percentages were determined on the basis of an arbitrarily 5% positive staining cut-off set on the negative controls (secondary antibody only). Graphs represent the average of three experiments in duplicate (mean ± SEM; Student's t-test, ***p<0.0001 relative to controls).

Figure 5. Internalization of membrane sulfatide with time at 37°C. Surface sulfatide internalization was followed by flow cytometry. IPEC-J2 and NIH3T3 cells were first incubated with anti-sulfatide antibody for 30 min at 4°C followed by incubation at 37°C for 15 or 60 min. Residual surface-bound antibody was detected with FITC-conjugated secondary antibody at 4°C. Initial surface sulfatide level was detected directly after incubation with anti-sulfatide antibody at 4°C. Decrease of **(A)** fluorescence of IPEC-J2 (left) and NIH3T3 (right) labelled with anti-sulfatide antibody (bold lines : initial level, 0 min; thin lines : 15 min; dashed lines : 60 min; one representative experiment), and **(B)** FITC-positive cells percentages after incubation at 37°C, are presented. Positive staining percentages are derived from the 5% arbitrarily set cut-offs in Fig. 4. Experiments were performed three times in duplicate (mean \pm SEM; linear regression).

Figure 6. Role of lipid rafts in STb uptake. IPEC-J2 and NIH3T3 cells were pretreated for 30 min at 37°C with 5 mM methyl- β -cyclodextrin (m β CD) in serum-free media and then incubated with 0.5 μ g/ml **(A)**, 2 μ g/ml STb-FITC **(B)** or 15 μ g/ml Tf-Alexa488 **(C)**, prior to incubation with pronase (400 μ g/ml) and FACS analysis. Controls were treated in parallel after 30 min of incubation in serum-free media. Data are presented as percentages of STb-FITC positive cells, determined relative to a 100% positivity cut-off set arbitrarily on control cells. Experiments were performed twice in duplicate (mean \pm SEM; One-way analysis of variance).

Figure 1.

A.

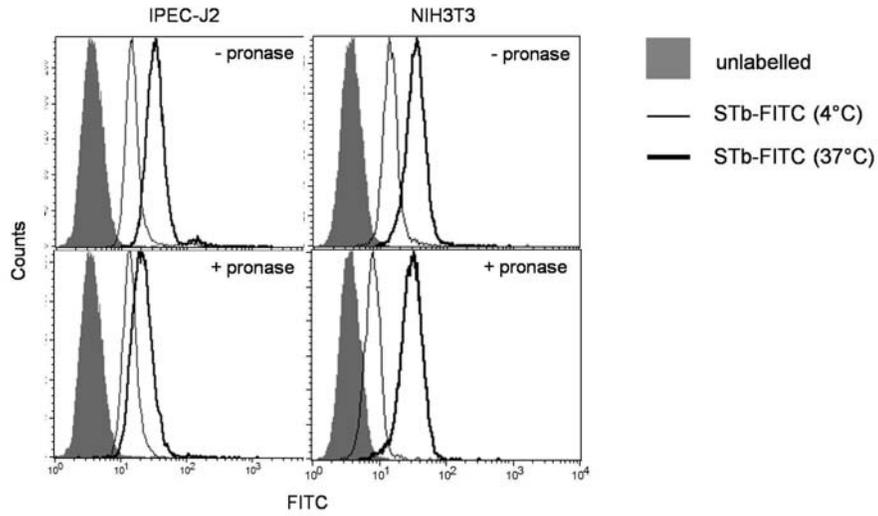
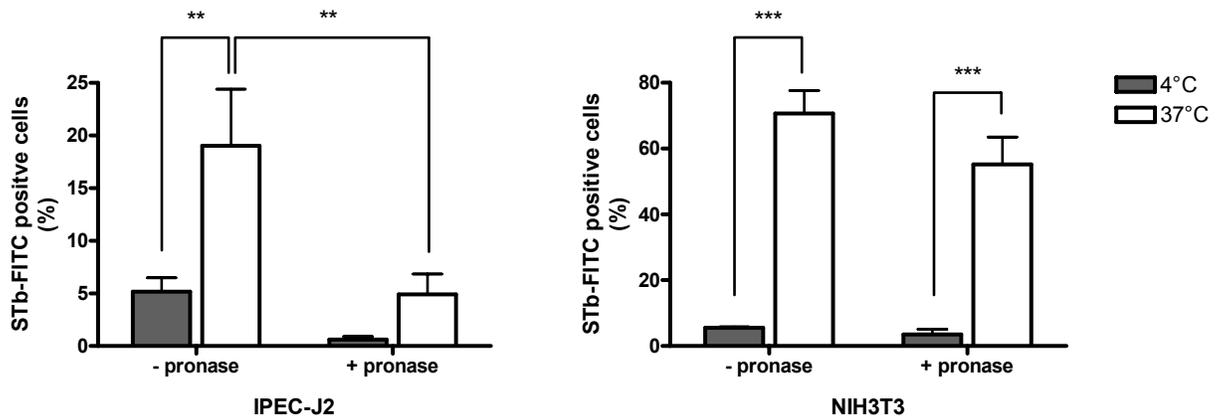
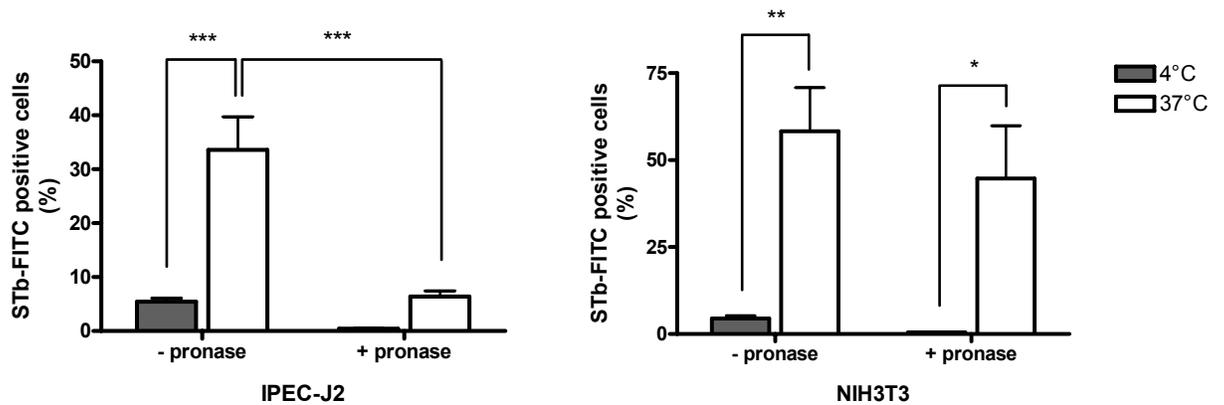
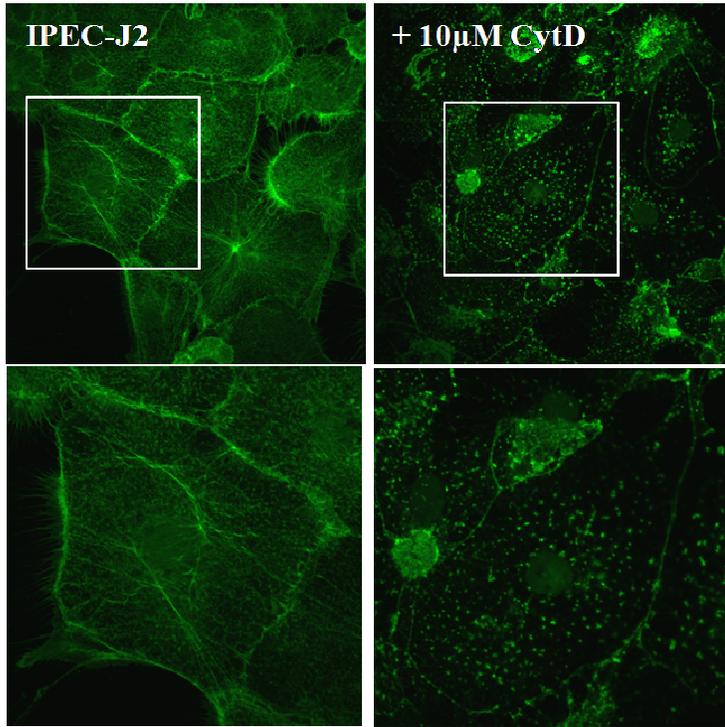
B. STb-FITC 0.5 $\mu\text{g/ml}$ C. STb-FITC 2 $\mu\text{g/ml}$ 

Figure 2.

A.



B.

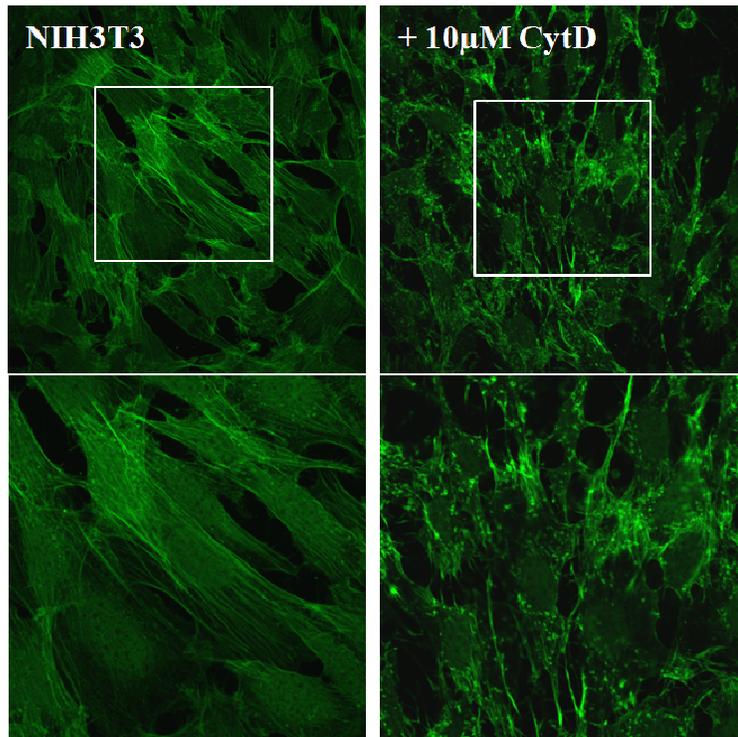
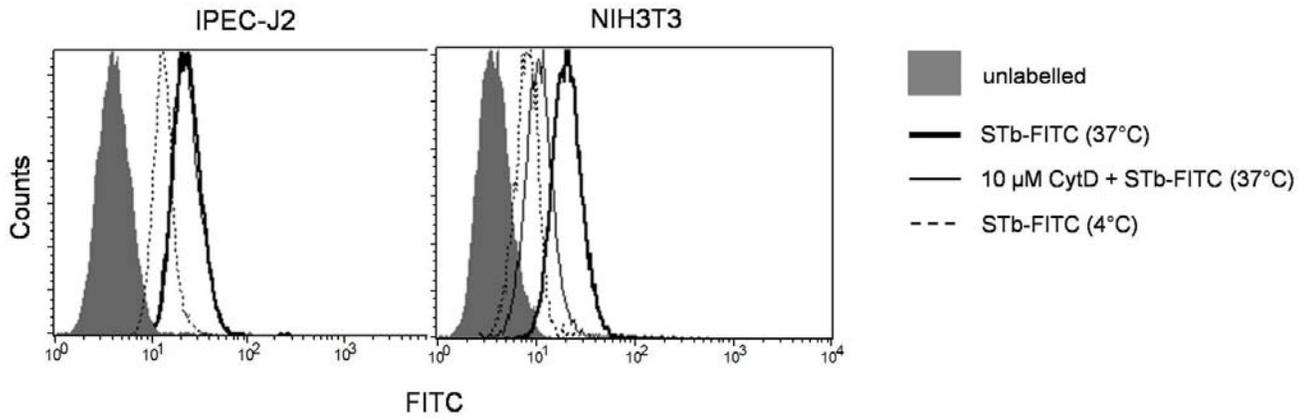
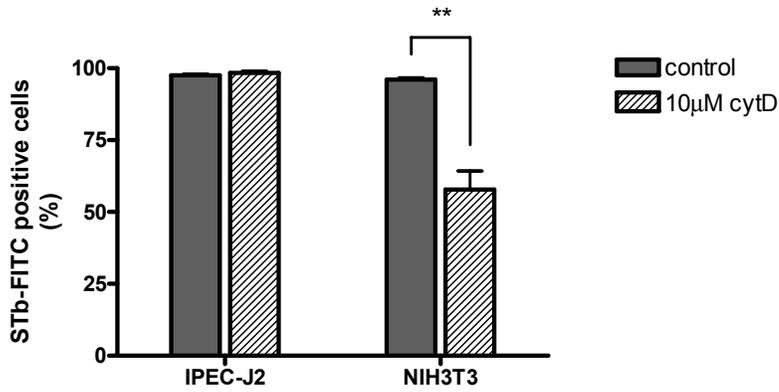


Figure 3.

A.



B. STb-FITC 0.5 μ g/ml



C. STb-FITC 2 μ g/ml

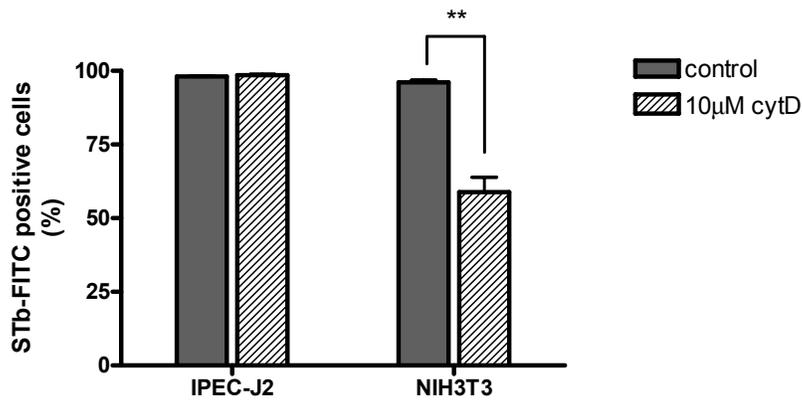
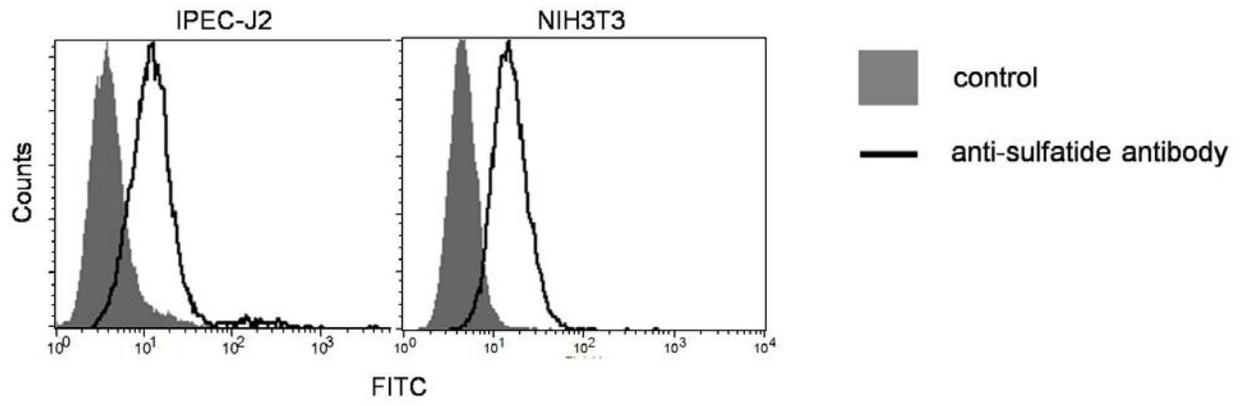


Figure 4.

A.



B.

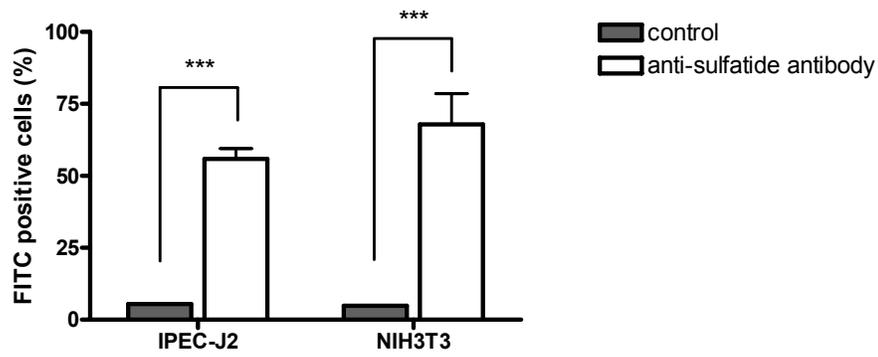
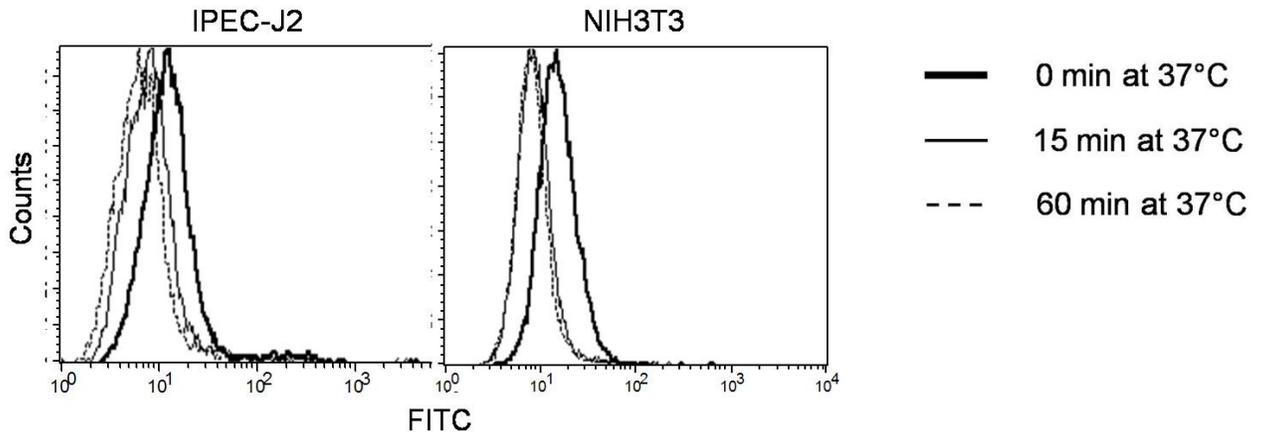


Figure 5.

A.



B.

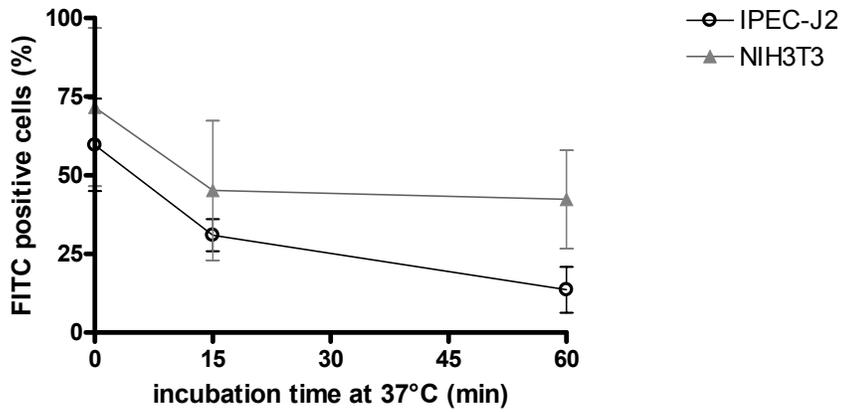
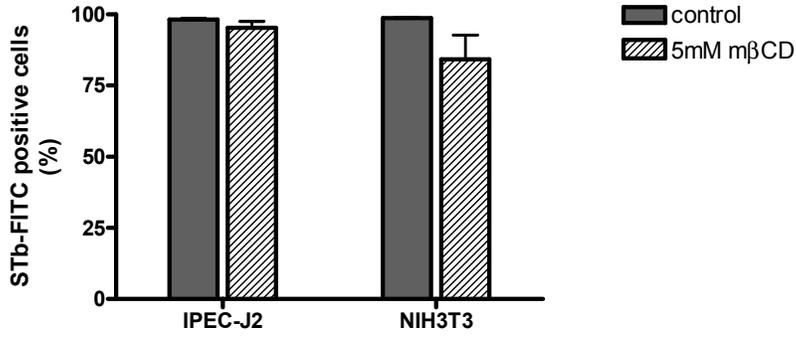
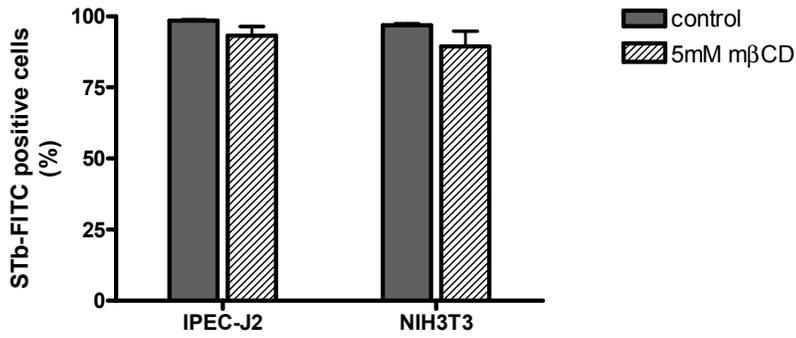


Figure 6.

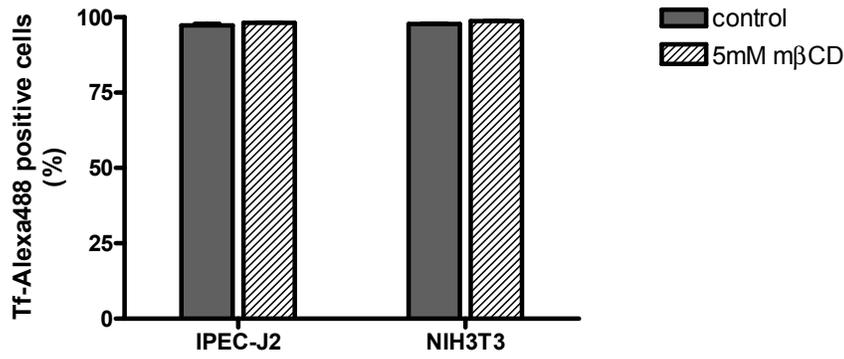
A. STb-FITC 0.5 $\mu\text{g/ml}$



B. STb-FITC 2 $\mu\text{g/ml}$



C. Tf-Alexa488



DISCUSSION

1. Internalisation de STb et type cellulaire

L'objectif de ce travail était d'étudier l'internalisation de STb dans deux lignées cellulaires, en particulier une lignée issue du jéjunum porcin. Cette lignée est considérée comme un modèle adéquat pour l'étude de la pathogenèse intestinale des souches ETEC (Schierack *et al.*, 2006, Koh *et al.*, 2008). Cette étude indique tout d'abord que l'internalisation de STb a lieu dans les deux lignées cellulaires. Nos résultats montrent que la température n'a pas d'effet sur l'internalisation de la toxine dans les IPEC-J2 et que la réorganisation de l'actine n'est pas impliquée dans ce mécanisme. Dans les NIH3T3 par contre, l'effet inverse est observé : STb est internalisé dépendamment de la température et la polymérisation de l'actine est nécessaire au processus. STb peut donc être internalisé par différents mécanismes selon le type cellulaire. La toxine cholérique de *V.cholerae* est également internalisée de différentes façons en fonction des caractéristiques du type cellulaire (Torgersen *et al.*, 2001, Le & Nabi, 2003). L'expression variable du ganglioside GM1, son récepteur, selon le type cellulaire est un déterminant dans le choix de la voie d'internalisation de la toxine (Pang *et al.*, 2004). Des résultats similaires sont rapportés pour la Shiga toxine de *Shigella* (Sandvig *et al.*, 2002). La localisation du complexe toxine-récepteur dans les *lipid rafts*, dépendante du type cellulaire, pourrait justifier les différences observées dans l'internalisation de cette toxine (Falguieres *et al.*, 2001). L'internalisation dépendante du type cellulaire existe donc dans la nature et STb pourrait aussi faire partie de ce schéma. Étant donné que, selon nos résultats, le niveau du récepteur, le sulfatide, est comparable entre les IPEC-J2 et les NIH3T3 et que les *lipid rafts* ne sont pas impliqués dans l'internalisation de la toxine, il est probable que, dans le cas de STb, un autre phénomène encore inconnu justifie ces différences selon le type cellulaire. Les différentes voies d'internalisation empruntées par STb pourraient conduire la toxine vers des organelles cellulaires différents, comme c'est le cas pour la toxine cholérique (Le & Nabi, 2003). Comme nous le verrons plus loin dans cette discussion, les cibles intracellulaires de la toxine STb sont encore peu connues et mériteraient d'être investiguées.

L'internalisation de STb est donc un phénomène complexe. La lignée intestinale porcine IPEC-J2 a été choisie car elle semble être un modèle *in vitro* représentatif de la

cible de l'entérotoxine chez le porc (Schierack *et al.*, 2006, Gonçalves *et al.*, 2008). Comme les mécanismes d'internalisation de STb dépendent du type cellulaire, il apparaît plus relevant d'utiliser, à l'avenir, des modèles cellulaires s'approchant des conditions *in vivo*, en l'occurrence des lignées porcines, pour étudier l'internalisation de la toxine. Les cellules IPEC-J2 polarisées devraient notamment nous permettre d'en apprendre davantage sur ce phénomène lors de futures recherches.

2. Rôle du récepteur dans l'internalisation de STb

Nos résultats indiquent que le sulfatide n'est pas directement impliqué dans le mécanisme d'internalisation de la toxine. Plusieurs observations conduisent à cette conclusion. Tout d'abord, les niveaux de sulfatide à la surface des cellules IPEC-J2 and NIH3T3 sont semblables. Nous avons ensuite montré que le sulfatide est internalisé au cours du temps à 37°C de façon similaire entre les deux lignées cellulaires. Cette internalisation reflète le recyclage du sulfatide cellulaire. Le sulfatide est généralement transporté par endocytose jusqu'aux lysosomes où il est dégradé (Kolter & Sandhoff, 2005), tandis qu'il est synthétisé dans le réticulum endoplasmique et le Golgi avant d'être finalement inséré dans la membrane par l'exocytose des vésicules qui le transportent (Eckhardt, 2008). La littérature rapporte que le sulfatide est présent dans les *lipid rafts* (Delacour *et al.*, 2005, Eckhardt, 2008). L'endocytose endogène du sulfatide, tout comme celle de plusieurs autres glycosphingolipides membranaires, est inhibée par la génistéine et par la nystatine (Singh *et al.*, 2003), deux agents causant la rupture des *rafts*. Ceci indique que le sulfatide est internalisé vers les endosomes et lysosomes par un mécanisme impliquant ces microdomaines lipidiques (Singh *et al.*, 2003, Cheng *et al.*, 2006). Cette internalisation endogène est indépendante du type cellulaire (Singh *et al.*, 2003). A l'inverse, nos résultats montrent que des molécules causant la rupture des *rafts*, en particulier la génistéine, n'ont pas d'effet sur l'internalisation de la toxine. En résumé, les similarités observées avec les IPEC-J2 et les NIH3T3 concernant le niveau du sulfatide en surface et le taux de son internalisation ne peuvent expliquer les différences d'internalisation de STb mises en évidence entre ces deux types cellulaires, de point de vue de la dépendance à la température et la réorganisation de l'actine. De plus, il apparaît que l'internalisation

endogène du sulfatide que nous avons observée et celle de la toxine suivent des voies distinctes. Le sulfatide n'est donc pas directement impliqué dans l'internalisation de STb. Cependant, il n'est pas exclu que la liaison de STb au sulfatide perturbe le mécanisme d'endocytose endogène du glycolipide et l'entraîne dans le cytoplasme par une autre voie. Ce phénomène est notamment décrit pour la liaison de la toxine cholérique au GM1, selon les spécificités de la cellule hôte (Singh *et al.*, 2003). D'autres expériences nous permettraient de confirmer l'absence de rôle du sulfatide dans le mécanisme d'internalisation de STb. L'inhibition de l'internalisation du sulfatide au cours du temps à 37°C par la génistéine pourrait être démontrée dans les IPEC-J2 et NIH3T3. Il serait aussi intéressant de suivre en parallèle l'internalisation de la toxine et celle du sulfatide en temps réel dans les cellules vivantes en microscopie confocale, afin de certifier que les deux molécules suivent des voies différentes. Cette étude pourrait également être réalisée en présence d'inhibiteurs des *rafts*, ce qui permettrait d'interrompre l'internalisation du sulfatide sans affecter sa présence en surface nécessaire à la liaison de la toxine, et de confirmer visuellement que STb est internalisé dans ces conditions.

Le sulfatide est le récepteur de la toxine (Rousset *et al.*, 1998b). S'il n'est pas directement impliqué dans l'internalisation, il servirait alors de premier point d'ancrage de STb à la surface cellulaire, par le biais d'une interaction transitoire (Beausoleil & Dubreuil, 2001). Il est connu que la toxine perméabilise les membranes des vésicules de la bordure en brosse porcine par la formation de pores non spécifiques perméables aux cations (Gonçalves *et al.*, 2007). Cet événement est observé *in vitro* en moins de 30 secondes (Gonçalves *et al.*, 2007). Pour former des pores, la toxine s'insérerait donc très rapidement dans la membrane après son contact avec la surface cellulaire, suggérant que l'interaction avec le sulfatide n'est que momentanée. Suite à l'interaction STb-sulfatide, il est possible que d'autres lipides membranaires ou protéines soient requis pour faciliter l'internalisation. Rousset *et al.* (1998a, b) ont observé la liaison de STb *in vitro* à des gangliosides, dont le GM3 (cf. Recension des écrits, paragraphe 3.6.2.2, Figure 9b). Ces résultats sont contredits par d'autres travaux (Chao & Dreyfus, 1997, Beausoleil & Dubreuil, 2001). La liaison de la toxine à ce type de glycolipides pourrait dépendre de la position et du nombre d'acides sialiques sur les gangliosides testés dans ces études (Rousset *et al.*, 1998b). STb se lie également à une protéine de 25 kDa isolée de fractions

de membrane de cellules intestinales murines solubles dans les détergents (Hitotsubashi *et al.*, 1994). Chao et Dreyfus (1997) ont proposé que cette protéine soit cytoplasmique ou associée au feuillet interne de la membrane cellulaire, comme une protéine G activée par la toxine. La localisation de cette protéine est toujours inconnue mais elle pourrait constituer une protéine de liaison de la toxine au moment de l'association à la membrane et de l'internalisation. De plus, l'étude de la compétition entre STb-I¹²⁵ et un excès de toxine non marquée dans les cellules HT29 et T84 a indiqué que STb interagit avec de multiples molécules à la surface cellulaire, et non une en particulier (Chao & Dreyfus, 1997). Au vu des mécanismes d'internalisation différents mis en évidence entre les types cellulaires dans cette étude, il est probable que, si d'autres molécules sont impliquées, elles soient aussi différentes en fonction de la lignée étudiée.

3. Mécanismes d'internalisation de STb

Selon notre étude, l'internalisation de la toxine peut dépendre de l'activité de cellule hôte ou non. La température et la rupture de la réorganisation de l'actine, deux facteurs relatifs à l'activité physiologique de la cellule hôte, ont en effet un impact différent sur l'internalisation de STb selon la lignée cellulaire.

3.1 Internalisation indépendante de l'activité de la cellule hôte

Dans la lignée intestinale porcine IPEC-J2, l'internalisation est indépendante de l'activité physiologique de la cellule hôte, étant donné l'absence d'effet de la température, de la rupture de la polymérisation de l'actine par la cytochalasine D et de celle des *lipid rafts* par la m β CD et la génistéine. Ces observations dans la lignée intestinale porcine confirment les résultats de Chao et Dreyfus (1997) avec les lignées intestinales humaines HT29 et T84. Ces auteurs ont constaté que la majeure partie du STb-I¹²⁵ associé aux HT29 et T84 se situe dans le cytoplasme, le reste étant inséré dans la membrane. A ce sujet, la technique de cytométrie en flux utilisée dans notre étude, ne permet pas de savoir si la fluorescence résiduelle des cellules après le traitement par la pronase correspond au

STb-FITC inséré dans la membrane et/ou à sa présence dans le cytoplasme. En effet, la toxine qui serait intégrée dans la membrane résisterait au traitement par la protéase. Il serait donc intéressant d'appuyer nos observations par l'étude de la localisation cellulaire de STb en microscopie à fluorescence, ou en évaluant la présence de la toxine dans les extraits membranaires et cytoplasmiques des IPEC-J2. Il est cependant très probable qu'une partie de la toxine soit internalisée, plusieurs études l'ayant observé dans des cellules intestinales humaines et de rat *in vivo* et *in vitro* (Chao & Dreyfus, 1997, Chao & Dreyfus, 1999, Labrie *et al.*, 2002).

Les résultats obtenus avec les cellules IPEC-J2 concordent donc avec le modèle actuel d'internalisation de STb (cf. Recension des écrits, section 3, paragraphe 3.6.2.3) (Dubreuil, 2006a). Pour rappel, ce modèle propose que, suite à son oligomérisation et son interaction avec le sulfatide membranaire, la toxine s'insère dans la bicouche lipidique sous forme monomérique ou oligomérique. Elle reste alors insérée de façon stable dans la membrane cellulaire et/ou est transloquée dans le cytoplasme, par un processus de déstabilisation ou de rupture membranaire indépendant de l'activité de la cellule hôte et qui ne requiert pas d'énergie. La toxine pourrait donc être à la fois intégrée de façon stable dans la membrane des IPEC-J2 et également transférée dans leur cytoplasme. Ces deux phénomènes sont décrits pour d'autres peptides. On peut citer les thionines, des peptides végétaux antimicrobiens basiques d'environ 45 a.a. (Stec, 2006) et les « peptides antimicrobiens composés d'hélice- α amphipatiques » (amphipatic α -helical peptides) (Gazit *et al.*, 1994, Blondelle *et al.*, 1999, Shai, 1999), ou encore les protéines capable de translocation membranaire, comme la protéine Tat du virus HIV (Herce & Garcia, 2007a). Globalement, ces peptides et protéines de longueur variable (environ 20-100 a.a.) ont en commun leur caractère basique et cationique, ainsi que la présence de ponts disulfures et/ou d'une ou plusieurs hélices- α amphipatiques dans leur structure. Ces molécules interagissent avec les surfaces lipidiques soit en s'adsorbant sur la membrane cellulaire, ce qui cause une déstabilisation membranaire, soit en s'y insérant, pour créer des pores qui augmentent la perméabilité des cellules cibles, tel qu'observé pour STb avec les IPEC-J2 (Gonçalves *et al.*, 2008) et les vésicules de membranes de la bordure en brosse porcines (BBMVs) (Gonçalves *et al.*, 2007). Ces molécules traversent aussi la membrane. Dans le cas des thionines, l'insertion membranaire est suffisante pour activer

une entrée de calcium dans la cellule et l'activation de la phospholipase A2 (Stec, 2006), deux événements cellulaires aussi retrouvés dans le mécanisme d'action de STb (cf. Recension des écrits, section 3, Figure 11). Les protéines comme Tat sont dotées de propriétés de translocation membranaire (Vives *et al.*, 1997, Trehin & Merkle, 2004), grâce à la présence dans leur structure de segments d'acides aminés basiques de 10-30 a.a., regroupés sous le terme « peptides pénétrant les cellules » (Cell Penetrating Peptides, CPPs) (Vives *et al.*, 1997, Trehin & Merkle, 2004, Herce & Garcia, 2007a). Les CPPs sont maintenant utilisés pour transporter des protéines ou même des liposomes « cargos » dans les cellules. Le mécanisme par lequel ces peptides chargés et hydrophiles gagnent le cytoplasme est encore très controversé (Trehin & Merkle, 2004). Une étude récente suggère cependant un nouveau modèle de translocation du CPP de Tat, qui ne requiert pas d'énergie (Herce & Garcia, 2007b). Les peptides se lient à la membrane en interagissant avec les charges des phospholipides. L'accumulation des peptides séquestre les charges lipidiques avoisinantes, créant des régions membranaires fortement chargées, ce qui attire les peptides vers les phospholipides chargés de la face cytoplasmique de la membrane. La membrane s'amincit, réduisant la barrière hydrophobe, et permet l'entrée d'eau et la formation d'un pore. La translocation des peptides dans la cellule a lieu par diffusion passive au travers du pore aqueux transitoire, ce qui n'entraîne pas de dommages membranaires (Herce & Garcia, 2007b).

Comme nous l'avons mentionné plus haut, nous ne pouvons confirmer si l'internalisation par les IPEC-J2 correspond à l'insertion de la toxine dans la membrane ou à sa présence dans le cytoplasme. La toxine présente plusieurs des propriétés des différents peptides présentés ci-dessus. Il s'agit notamment de son faible poids moléculaire, de ses hélices- α amphipatique N-terminale et hydrophobe C-terminale (Segrest *et al.*, 1990, Sukumar *et al.*, 1995), de ses a.a. basiques (pI 9.6) (Handl *et al.*, 1993), ainsi que de sa capacité d'oligomérisation (Labrie *et al.*, 2001b) et de formation de pores (Gonçalves *et al.*, 2007). La combinaison de ces propriétés pourrait à la fois lui permettre de s'insérer de façon stable dans la membrane et d'être également transloquée dans le cytoplasme passivement, indépendamment de l'activité de la cellule hôte. Dans cette optique, la technique de FRET (Förster/Fluorescence Resonance Energy Transfer) permettrait de suivre l'interaction entre la toxine couplée à un marqueur fluorescent et

une sonde membranaire fluorescente et de mettre en évidence l'insertion stable et/ou transitoire de STb dans la membrane. La FRET est le transfert d'énergie d'un chromophore donneur à l'état excité vers un chromophore accepteur (Sekar & Periasamy, 2003, Jares-Erijman & Jovin, 2006). Lorsque l'accepteur et le donneur sont dissociés, c'est l'émission du donneur qui est détectée après excitation de celui-ci. Par contre, lorsque le donneur se retrouve à proximité de l'accepteur (1-10 nm) suite à leur interaction, l'émission principalement détectée après excitation du donneur est celle de l'accepteur, du au FRET du donneur excité vers l'accepteur. Cette technique peut être réalisée avec des cellules vivantes en microscopie confocale (Sekar & Periasamy, 2003, Jares-Erijman & Jovin, 2006). Il pourrait aussi être intéressant de vérifier la présence de STb dans le contenu des BBMV's porcines. On sait que la toxine perméabilise ces vésicules par la formation de pores (Gonçalves *et al.*, 2007). De plus, les BBMV's ne possèdent ni la machinerie cellulaire d'endocytose, ni celle fournissant l'énergie. Une translocation « passive » des membranes devrait donc pouvoir être observée dans ces conditions.

3.2 Internalisation dépendante de l'activité de la cellule hôte

Nos résultats montrent que l'internalisation de la toxine peut aussi dépendre de l'activité et de facteurs de l'hôte, tel qu'observé dans les fibroblastes NIH3T3 avec la température et de la réorganisation de l'actine. Ces deux facteurs sont caractéristiques d'une endocytose. Aux températures inférieures à la température physiologique, les processus cellulaires sont ralentis, ce qui empêche l'internalisation de ligands, tandis qu'à 37°C, une augmentation de l'internalisation se produit typiquement grâce à l'endocytose (Prywes *et al.*, 1986, Sandvig *et al.*, 1989, Koh *et al.*, 1992, Paccaud *et al.*, 1992, Chao & Dreyfus, 1997, Benlimame *et al.*, 1998, Le & Nabi, 2003). La polymérisation de l'actine est également impliquée dans divers mécanismes d'endocytose (Robertson *et al.*, 2009), comme il en sera question ci-dessous. Par ailleurs, l'endocytose de STb observée dans cette étude n'a pas lieu par le biais des *lipid rafts* car l'utilisation de la m β CD, un agent séquestrant le cholestérol, et de la génistéine, un inhibiteur des tyrosines kinases impliquées dans l'endocytose des *rafts*, n'ont pas d'impact sur l'internalisation de la

toxine. La dépendance du mécanisme par rapport à la polymérisation de l'actine appuie davantage l'idée que les *lipid rafts* ne sont pas impliqués dans l'endocytose de la toxine. En effet, la rupture de l'actine favorise généralement l'endocytose *raft*-dépendante (Kojic *et al.*, 2007). Une ou plusieurs autres voies d'endocytose seraient donc en cause.

Les études réalisées ces dernières années rapportent que de nombreuses voies d'endocytose distinctes d'un point de vue morphologique et moléculaire existent. La plus connue est celle dépendante de la clathrine, qui, de plus, n'a pas été considérée dans ce travail et est facilitée par la polymérisation de l'actine (Conner & Schmid, 2003, Robertson *et al.*, 2009). La macropinocytose est un autre type d'endocytose requis pour l'internalisation de grandes quantités de fluides et de facteurs de croissance. Elle est principalement actine-dépendante et est donc inhibée par la dépolymérisation des filaments d'actine induite, par exemple, par la cytochalasine D (Kojic *et al.*, 2007, Mayor & Pagano, 2007). Cette voie n'a pas non plus été étudiée dans ce travail. De nombreuses autres voies clathrine- et rafts-indépendantes ont aussi été identifiées, bien que leur destination intracellulaire soit encore peu connue. Certaines pourraient même être interdépendantes (Benmerah & Lamaze, 2002, Conner & Schmid, 2003, Mayor & Pagano, 2007, Doherty & McMahon, 2009).

Plusieurs approches visant à étudier l'endocytose d'un ligand en cytométrie en flux et en microscopie à fluorescence pourraient être testées afin de préciser la ou les voie(s) d'endocytose de STb dans les NIH3T3 (Benmerah & Lamaze, 2002, Conner & Schmid, 2003, Kojic *et al.*, 2007, Mayor & Pagano, 2007). Il serait possible d'utiliser des inhibiteurs pharmacologiques de certaines voies. L'amiloride, par exemple, mériterait d'être testé car il inhibe la macropinocytose. La chlorpromazine inhibe la voie clathrine-dépendante tandis que le dynasore bloque la fission membranaire et la formation des vésicules en inhibant la dynamine, une GTPase impliquée dans plusieurs types d'endocytose. On peut également citer l'expression de « mutants dominants négatifs » de protéines comme la clathrine ou la dynamine. Ces mutants ont pour effet d'inhiber l'endocytose clathrine-dépendante et les voies dynamine-dépendantes. Les petits ARNs interférents (siRNA) sont un autre moyen d'inhiber l'expression de diverses protéines impliquées dans l'endocytose. A l'inverse, la surexpression de ces protéines est également possible et permet d'évaluer si l'internalisation est augmentée dans de telles

conditions. Les progrès récents de la microscopie à fluorescence et confocale nous permettraient aussi de suivre en temps réel l'endocytose de la toxine couplée à un fluorophore dans les cellules vivantes, par rapport à la localisation de protéines fluorescentes ayant un rôle dans l'endocytose (p.e. clathrine, dynamine) ou internalisées par des voies d'endocytose connues (p.e. toxine cholérique, transferrine). Enfin, la microscopie électronique est une méthode couramment utilisée pour caractériser le type d'invaginations membranaires et de vésicules (taille, forme, présence ou absence de protéines en surface) impliquées dans l'internalisation d'un ligand.

4. Rôle de l'internalisation dans la pathogenèse de STb

Ce travail avait pour but l'identification préliminaire du mécanisme d'internalisation de STb. Le rôle de l'internalisation dans le mécanisme d'action de la toxine est cependant toujours mal compris. L'internalisation de la toxine est associée à la sécrétion de fluides puisqu'elle a été mise en évidence dans des segments ligaturés de rat remplis de fluides après injection de STb (Labrie *et al.*, 2002). Cependant, un lien direct n'a pas encore été établi.

Il est difficile de relier l'internalisation à l'induction de la mort cellulaire au niveau de l'épithélium. Des travaux récents réalisés dans notre laboratoire indiquent en effet que la viabilité des cellules IPEC-J2 et des NIH3T3 évaluée en FACS n'est pas affectée après 24h d'incubation avec différentes concentrations de toxine (Gonçalves *et al.*, 2008, Gonçalves & Dubreuil, 2009). Les membranes cellulaires sont perméabilisées, comme en témoigne l'entrée du colorant vital iodure de propidium dans les cellules, mais les estérases cellulaires sont pourtant toujours actives, tel qu'indiqué par le marquage des cellules avec le CFDA (diacétate de carboxyfluorescéine). Dans ces conditions, la toxine doit être aussi internalisée, comme l'indiquent nos résultats avec ces deux lignées cellulaires. Il est donc peu probable que l'internalisation ait un effet sur la viabilité cellulaire.

L'internalisation pourrait également être associée à l'activation d'une cible cytoplasmique encore inconnue et impliquée dans la sécrétion de fluides. Les travaux de Chao et Dreyfus (1997) et Labrie *et al.* (2002) n'ont pas pu mettre en évidence de

vésicules ou d'organelles du cytoplasme ciblés par la toxine internalisée. Une étude récente réalisée par notre groupe a montré que la toxine est localisée au niveau des mitochondries des fibroblastes NIH3T3 et y induit une hyperpolarisation membranaire (Gonçalves & Dubreuil, 2009). Cette atteinte mitochondriale pourrait en partie justifier l'utilité de l'internalisation de STb. Des études préliminaires réalisées au laboratoire ont montré que la toxine était située au niveau du réticulum endoplasmique lisse dans les NIH3T3 (Penel S., Nabi I.R. & Dubreuil J.D., données non publiées). Ces résultats ont cependant été contredits par la suite (Strugnell S.S. & Nabi I.R., données non publiées). Ces travaux mériteraient d'être approfondis, en particulier dans les IPEC-J2, un modèle cellulaire s'approchant des conditions *in vivo*, en étudiant la colocalisation entre la toxine et des marqueurs d'organelles cellulaires en microscopie confocale.

Enfin, l'internalisation de STb pourrait être un moyen d'atteindre une cible sous l'épithélium intestinal par transcytose (Tuma & Hubbard, 2003). Une étude de Hitotsubashi *et al.* (1992b) a montré que STb accélère la motilité spontanée de sections d'iléon murin lorsqu'elle est appliquée sur les faces mucosale et séreuse des tissus. La toxine induit la sécrétion de sérotonine dans l'intestin, une hormone qui est en partie libérée par les cellules nerveuses entériques (Hitotsubashi *et al.*, 1992a, Harville & Dreyfus, 1995, Fujii *et al.*, 1997). *In vivo*, la toxine est sécrétée par la bactérie sur la face apicale des entérocytes. Elle pourrait agir directement sur les cellules musculaires et les cellules nerveuses de la sous-muqueuse si elle est amenée par transcytose vers les tissus sous-épithéliaux. La toxine Stx des EHEC et l'entérotoxine B de *Staphylococcus aureus* (SEB), par exemple, sont transportées par ce mécanisme au travers de lignées intestinales polarisées, ce qui leur permet *in vivo* d'atteindre la voie sanguine (Acheson *et al.*, 1996, Philpott *et al.*, 1997, Shupp *et al.*, 2002). Il serait donc intéressant d'étudier la transcytose de la toxine STb au travers des cellules IPEC-J2 polarisées par la technique classique du Transwell (Tuma & Hubbard, 2003). L'effet de STb sur des lignées cellulaires musculaires et nerveuses mériterait également d'être évalué.

En résumé, notre étude démontre que le mécanisme d'internalisation de la toxine dépend du type cellulaire. Cette internalisation peut nécessiter l'activité de la cellule hôte

ou non, et le récepteur n'a pas de rôle direct dans ces mécanismes. Dans l'épithélium porcin, l'internalisation est de type activité cellulaire-indépendante. Quant à l'internalisation dépendante de l'activité cellulaire, elle requiert un réarrangement de l'actine mais les *lipid rafts* ne sont par contre pas impliqués dans cette voie.

CONCLUSION

Ce travail nous a permis d'en apprendre davantage sur une étape du mécanisme d'action de l'entérotoxine STb d'*E.coli*, soit son internalisation dans les cellules. L'internalisation est un phénomène intervenant fréquemment dans la pathogenèse d'une toxine bactérienne. Elle est directement reliée à l'invasion de l'hôte ainsi qu'à l'établissement de conditions favorables à la croissance de la bactérie au site d'infection (Kaper *et al.*, 2004). L'internalisation de STb, bien que mise en évidence par plusieurs travaux, n'a jamais été analysée dans l'épithélium porcine, la cible *in vivo* de l'entérotoxine. Le mécanisme d'entrée de STb dans la cellule n'a été que peu étudié et le rôle du récepteur de la toxine, le sulfatide, dans le processus n'a jamais été considéré.

Notre étude démontre tout d'abord l'internalisation de STb dans deux lignées cellulaires, dont une lignée épithéliale intestinale porcine. De plus, l'ensemble des expériences réalisées montre que l'internalisation dépend de mécanismes différents selon le type cellulaire. Ce phénomène a aussi été décrit pour d'autres toxines, qui sont internalisées de différentes manières en fonction des caractéristiques cellulaires (Sandvig *et al.*, 2002, Pang *et al.*, 2004). L'internalisation de STb peut dépendre de l'activité de la cellule hôte ou non. Dans tous les cas par contre, elle n'est pas directement liée au récepteur de la toxine, le sulfatide. L'internalisation indépendante de l'activité de la cellule hôte a lieu dans l'épithélium porcine. Quant à l'internalisation dépendante de l'activité cellulaire, elle suggère que la toxine peut entrer dans le cytoplasme par une endocytose, qui nécessite la réorganisation des filaments d'actine mais pas les *lipid rafts*. Comme les mécanismes d'internalisation de STb dépendent du type cellulaire, il apparaît plus relevant d'utiliser, à l'avenir, des modèles cellulaires s'approchant des conditions *in vivo*, en l'occurrence des lignées porcines, pour étudier le phénomène.

L'internalisation de la toxine STb dans la cellule est donc un processus plus complexe qu'imaginé auparavant et reste un vaste sujet à explorer. Ce travail ouvre de nouvelles perspectives quant à l'étude de ce mécanisme, notamment dans des lignées porcines polarisées. L'identification de molécules et de voies d'internalisation eucaryotes impliqués dans le processus devrait aussi permettre de mieux comprendre globalement l'interaction complexe entre une toxine et une cellule hôte.

BIBLIOGRAPHIE

- www.ecl-lab.com : *Escherichia coli* Laboratory (EcL), Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Québec, Canada
- Acheson, D. W., R. Moore, S. De Breucker, L. Lincicome, M. Jacewicz, E. Skutelsky & G. T. Keusch, (1996) Translocation of Shiga toxin across polarized intestinal cells in tissue culture. *Infect Immun* **64**: 3294-3300.
- Ahmed, T., A. Lundgren, M. Arifuzzaman, F. Qadri, S. Teneberg & A. M. Svennerholm, (2009) Children with the Le(a+b-) blood group have increased susceptibility to diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* expressing colonization factor I group fimbriae. *Infect Immun* **77**: 2059-2064.
- Akashi, N., S. Hitotsubashi, H. Yamanaka, Y. Fujii, T. Tsuji, A. Miyama, J. E. Joya & K. Okamoto, (1993) Production of heat-stable enterotoxin II by chicken clinical isolates of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **109**: 311-315.
- Akiyama, T., J. Ishida, S. Nakagawa, H. Ogawara, S. Watanabe, N. Itoh, M. Shibuya & Y. Fukami, (1987) Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* **262**: 5592-5595.
- Allen, K. P., M. M. Randolph & J. M. Fleckenstein, (2006) Importance of heat-labile enterotoxin in colonization of the adult mouse small intestine by human enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Infect Immun* **74**: 869-875.
- An, H., J. M. Fairbrother, C. Desautels & J. Harel, (1999) Distribution of a novel locus called Paa (porcine attaching and effacing associated) among enteric *Escherichia coli*. *Adv Exp Med Biol* **473**: 179-184.
- Anderson, G. G., K. W. Dodson, T. M. Hooton & S. J. Hultgren, (2004) Intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Trends Microbiol* **12**: 424-430.
- Apodaca, G., (2001) Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton. *Traffic* **2**: 149-159.
- Arriaga, Y. L., B. A. Harville & L. A. Dreyfus, (1995) Contribution of individual disulfide bonds to biological action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B. *Infect Immun* **63**: 4715-4720.
- Balanzino, L. E., J. L. Barra, E. M. Galvan, G. A. Roth & C. G. Monferran, (1999) Interaction of cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin with

- glycoconjugates from rabbit intestinal brush border membranes: relationship with ABH blood group determinants. *Mol Cell Biochem* **194**: 53-62.
- Bardwell, J. C. & J. Beckwith, (1993) The bonds that tie: catalyzed disulfide bond formation. *Cell* **74**: 769-771.
- Bastiaens, P. I., I. V. Majoul, P. J. Verveer, H. D. Soling & T. M. Jovin, (1996) Imaging the intracellular trafficking and state of the AB5 quaternary structure of cholera toxin. *EMBO J* **15**: 4246-4253.
- Batisson, I. & M. der Vartanian, (2000) Extracellular DsbA-insensitive folding of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin STa *in vitro*. *J Biol Chem* **275**: 10582-10589.
- Batisson, I., M. P. Guimond, F. Girard, H. An, C. Zhu, E. Oswald, J. M. Fairbrother, M. Jacques & J. Harel, (2003) Characterization of the novel factor paa involved in the early steps of the adhesion mechanism of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infect Immun* **71**: 4516-4525.
- Beausoleil, H. E. & J. D. Dubreuil, (2001) *In vitro* binding characteristics and affinity for sulfatide of *Escherichia coli* STb enterotoxin. *Receptors Channels* **7**: 401-411.
- Beausoleil, H. E., V. Labrie & J. D. Dubreuil, (2002a) Trypan blue uptake by chinese hamster ovary cultured epithelial cells: a cellular model to study *Escherichia coli* STb enterotoxin. *Toxicon* **40**: 185-191.
- Beausoleil, H. E., F. Lepine & J. D. Dubreuil, (2002b) LC-MS analysis of pig intestine sulfatides: interaction with *Escherichia coli* STb enterotoxin and characterization of molecular species present. *FEMS Microbiol Lett* **209**: 183-188.
- Benlimame, N., P. U. Le & I. R. Nabi, (1998) Localization of autocrine motility factor receptor to caveolae and clathrin-independent internalization of its ligand to smooth endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* **9**: 1773-1786.
- Benmerah, A. & C. Lamaze, (2002) Endocytose : chaque voie compte! *Medecine Sciences* **18**: 1126-1136.
- Benz, I. & M. A. Schmidt, (1989) Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **57**: 1506-1511.

- Benz, I. & M. A. Schmidt, (1992) Isolation and serologic characterization of AIDA-I, the adhesin mediating the diffuse adherence phenotype of the diarrhea-associated *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27). *Infect Immun* **60**: 13-18.
- Berberov, E. M., Y. Zhou, D. H. Francis, M. A. Scott, S. D. Kachman & R. A. Moxley, (2004) Relative importance of heat-labile enterotoxin in the causation of severe diarrheal disease in the gnotobiotic piglet model by a strain of enterotoxigenic *Escherichia coli* that produces multiple enterotoxins. *Infect Immun* **72**: 3914-3924.
- Bertin, Y., C. Martin, J. P. Girardeau, P. Pohl & M. Contrepois, (1998) Association of genes encoding P fimbriae, CS31A antigen and EAST 1 toxin among CNF1-producing *Escherichia coli* strains from cattle with septicemia and diarrhea. *FEMS Microbiol Lett* **162**: 235-239.
- Bjork, S., M. E. Breimer, G. C. Hansson, K. A. Karlsson & H. Leffler, (1987) Structures of blood group glycosphingolipids of human small intestine. A relation between the expression of fucolipids of epithelial cells and the ABO, Le and Se phenotype of the donor. *J Biol Chem* **262**: 6758-6765.
- Blondelle, S. E., K. Lohner & M. Aguilar, (1999) Lipid-induced conformation and lipid-binding properties of cytolytic and antimicrobial peptides: determination and biological specificity. *Biochim Biophys Acta* **1462**: 89-108.
- Bolin, I., G. Wiklund, F. Qadri, O. Torres, A. L. Bourgeois, S. Savarino & A. M. Svennerholm, (2006) Enterotoxigenic *Escherichia coli* with STh and STp genotypes is associated with diarrhea both in children in areas of endemicity and in travelers. *J Clin Microbiol* **44**: 3872-3877.
- Breimer, M. E., G. C. Hansson, K. A. Karlsson & H. Leffler, (1983) The preparative separation of sialic acid-containing lipids from sulphate group-containing glycolipids from small intestine of different animals. Analysis by thin-layer chromatography and detection of novel species. *J Biochem* **93**: 1473-1485.
- Brennan, M. J., J. H. Hannah & E. Leininger, (1991) Adhesion of *Bordetella pertussis* to sulfatides and to the GalNAc beta 4Gal sequence found in glycosphingolipids. *J Biol Chem* **266**: 18827-18831.
- Brown, M. S., R. G. Anderson & J. L. Goldstein, (1983) Recycling receptors: the round-trip itinerary of migrant membrane proteins. *Cell* **32**: 663-667.

- Burgess, M. N., R. J. Bywater, C. M. Cowley, N. A. Mullan & P. M. Newsome, (1978) Biological evaluation of a methanol-soluble, heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits, and calves. *Infect Immun* **21**: 526-531.
- Busque, P., A. Letellier, J. Harel & J. D. Dubreuil, (1995) Production of *Escherichia coli* STb enterotoxin is subject to catabolite repression. *Microbiology* **141** (Pt 7): 1621-1627.
- Carpick, B. W. & J. Garipey, (1993) The *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is a long-lived superagonist of guanylin. *Infect Immun* **61**: 4710-4715.
- Chao, A. C., F. J. de Sauvage, Y. J. Dong, J. A. Wagner, D. V. Goeddel & P. Gardner, (1994) Activation of intestinal CFTR Cl⁻ channel by heat-stable enterotoxin and guanylin via cAMP-dependent protein kinase. *EMBO J* **13**: 1065-1072.
- Chao, K. L. & L. A. Dreyfus, (1997) Interaction of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B with cultured human intestinal epithelial cells. *Infect Immun* **65**: 3209-3217.
- Chao, K. L. & L. A. Dreyfus, (1999) Interaction of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B with rat intestinal epithelial cells and membrane lipids. *FEMS Microbiol Lett* **172**: 91-97.
- Chapman, T. A., X. Y. Wu, I. Barchia, K. A. Bettelheim, S. Driesen, D. Trott, M. Wilson & J. J. Chin, (2006) Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. *Appl Environ Microbiol* **72**: 4782-4795.
- Cheng, Z. J., R. D. Singh, D. L. Marks & R. E. Pagano, (2006) Membrane microdomains, caveolae, and caveolar endocytosis of sphingolipids. *Mol Membr Biol* **23**: 101-110.
- Choi, B. K. & D. M. Schifferli, (1999) Lysine residue 117 of the FasG adhesin of enterotoxigenic *Escherichia coli* is essential for binding of 987P fimbriae to sulfatide. *Infect Immun* **67**: 5755-5761.
- Choi, C., W. Cho, H. Chung, T. Jung, J. Kim & C. Chae, (2001a) Prevalence of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1) gene in isolates in weaned pigs with diarrhea and/or edema disease. *Vet Microbiol* **81**: 65-71.

- Choi, C., D. Kwon & C. Chae, (2001b) Prevalence of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene and its relationship with fimbrial and enterotoxin genes in *E. coli* isolated from diarrheic piglets. *J Vet Diagn Invest* **13**: 26-29.
- Conner, S. D. & S. L. Schmid, (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **422**: 37-44.
- Cooper, J. A., (1987) Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol* **105**: 1473-1478.
- Creighton, T. E., (1994) *Proteins. Structures and Molecular Properties, 2nd edition*. New York : W. H. Freeman and Company.
- Dailey, F. E. & H. C. Berg, (1993) Mutants in disulfide bond formation that disrupt flagellar assembly in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 1043-1047.
- Dalton, C. B., E. D. Mintz, J. G. Wells, C. A. Bopp & R. V. Tauxe, (1999) Outbreaks of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in American adults: a clinical and epidemiologic profile. *Epidemiol Infect* **123**: 9-16.
- Daniels, C. J., D. G. Bole, S. C. Quay & D. L. Oxender, (1981) Role for membrane potential in the secretion of protein into the periplasm of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 5396-5400.
- De Haan, L. & T. R. Hirst, (2004) Cholera toxin: a paradigm for multi-functional engagement of cellular mechanisms (Review). *Mol Membr Biol* **21**: 77-92.
- De Libero, G. & L. Mori, (2005) Recognition of lipid antigens by T cells. *Nat Rev Immunol* **5**: 485-496.
- De, S. N., K. Bhattacharya & J. K. Sarkar, (1956) A study of the pathogenicity of strains of *Bacterium coli* from acute and chronic enteritis. *J Pathol Bacteriol* **71**: 201-209.
- Delacour, D., V. Gouyer, J. P. Zanetta, H. Drobecq, E. Leteurtre, G. Grard, O. Moreau-Hannedouche, E. Maes, A. Pons, S. Andre, A. Le Bivic, H. J. Gabius, A. Manninen, K. Simons & G. Huet, (2005) Galectin-4 and sulfatides in apical membrane trafficking in enterocyte-like cells. *J Cell Biol* **169**: 491-501.
- Desvaux, M., N. J. Parham, A. Scott-Tucker & I. R. Henderson, (2004) The general secretory pathway: a general misnomer? *Trends Microbiol* **12**: 306-309.

- Doherty, G. J. & H. T. McMahon, (2009) Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem* **78**: 857-902.
- Dorsey, F. C., J. F. Fischer & J. M. Fleckenstein, (2006) Directed delivery of heat-labile enterotoxin by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* **8**: 1516-1527.
- Dreyfus, L. A., J. C. Frantz & D. C. Robertson, (1983) Chemical properties of heat-stable enterotoxins produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* of different host origins. *Infect Immun* **42**: 539-548.
- Dreyfus, L. A., B. Harville, D. E. Howard, R. Shaban, D. M. Beatty & S. J. Morris, (1993) Calcium influx mediated by the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B (STB). *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 3202-3206.
- Dreyfus, L. A., R. G. Urban, S. C. Whipp, C. Slaughter, K. Tachias & Y. M. Kupersztoch, (1992) Purification of the STB enterotoxin of *Escherichia coli* and the role of selected amino acids on its secretion, stability and toxicity. *Mol Microbiol* **6**: 2397-2406.
- Dubreuil, J. D., (1997) *Escherichia coli* STb enterotoxin. *Microbiology* **143 (Pt 6)**: 1783-1795.
- Dubreuil, J. D., (2006a) *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b. In: The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins, third edition. J. E. Alouf & M. R. Popoff (eds). London: Elsevier, pp. 491-503.
- Dubreuil, J. D., (2006b) *Escherichia coli*, *Vibrio*, and *Yersinia* species heat-stable enterotoxins. In: The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins, third edition. J. E. Alouf & M. R. Popoff (eds). London: Elsevier, pp. 798-817.
- Dubreuil, J. D., (2008) *Escherichia coli* STb toxin and colibacillosis: knowing is half the battle. *FEMS Microbiol Lett* **278**: 137-145.
- Dubreuil, J. D., J. M. Fairbrother, R. Lallier & S. Lariviere, (1991) Production and purification of heat-stable enterotoxin b from a porcine *Escherichia coli* strain. *Infect Immun* **59**: 198-203.
- Echeverria, P., J. Seriwatana, U. Patamaroj, S. L. Moseley, A. McFarland, O. Chityothin & W. Chaicumpa, (1984) Prevalence of heat-stable II enterotoxigenic *Escherichia coli* in pigs, water, and people at farms in Thailand as determined by DNA hybridization. *J Clin Microbiol* **19**: 489-491.

- Echeverria, P., J. Seriwatana, D. N. Taylor, C. Tirapat, W. Chaicumpa & B. Rowe, (1985) Identification by DNA hybridization of enterotoxigenic *Escherichia coli* in a longitudinal study of villages in Thailand. *J Infect Dis* **151**: 124-130.
- Eckhardt, M., (2008) The role and metabolism of sulfatide in the nervous system. *Mol Neurobiol* **37**: 93-103.
- Erume, J., E. M. Berberov, S. D. Kachman, M. A. Scott, Y. Zhou, D. H. Francis & R. A. Moxley, (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.
- Fairbrother, J. M., E. Nadeau & C. L. Gyles, (2005) *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim Health Res Rev* **6**: 17-39.
- Fairbrother, J. M. & M. Ngeleka, (1994) Extraintestinal *Escherichia coli* infections in pigs. In: *Escherichia coli* in domestic animals and humans. C. L. Gyles (ed). Wallingford: CAB International, pp. 221-236.
- Falguieres, T., F. Mallard, C. Baron, D. Hanau, C. Lingwood, B. Goud, J. Salamero & L. Johannes, (2001) Targeting of Shiga toxin B-subunit to retrograde transport route in association with detergent-resistant membranes. *Mol Biol Cell* **12**: 2453-2468.
- Fasano, A., (2002) Toxins and the gut: role in human disease. *Gut* **50 Suppl 3**: III9-14.
- Fekete, P. Z., G. Schneider, F. Olasz, G. Blum-Oehler, J. H. Hacker & B. Nagy, (2003) Detection of a plasmid-encoded pathogenicity island in F18+ enterotoxigenic and verotoxigenic *Escherichia coli* from weaned pigs. *Int J Med Microbiol* **293**: 287-298.
- Fekkes, P. & A. J. Driessen, (1999) Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 161-173.
- Field, M., L. H. Graf, Jr., W. J. Laird & P. L. Smith, (1978) Heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: *in vitro* effects on guanylate cyclase activity, cyclic GMP concentration, and ion transport in small intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**: 2800-2804.

- Fleckenstein, J. M., K. Roy, J. F. Fischer & M. Burkitt, (2006) Identification of a two-partner secretion locus of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **74**: 2245-2258.
- Foreman, D. T., Y. Martinez, G. Coombs, A. Torres & Y. M. Kupersztoch, (1995) TolC and DsbA are needed for the secretion of STB, a heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **18**: 237-245.
- Forte, L. R., P. K. Thorne, S. L. Eber, W. J. Krause, R. H. Freeman, S. H. Francis & J. D. Corbin, (1992) Stimulation of intestinal Cl⁻ transport by heat-stable enterotoxin: activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *Am J Physiol* **263**: C607-615.
- Frantz, J. C., L. Jaso-Friedman & D. C. Robertson, (1984) Binding of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin to rat intestinal cells and brush border membranes. *Infect Immun* **43**: 622-630.
- Fredman, P., L. Mattsson, K. Andersson, P. Davidsson, I. Ishizuka, S. Jeansson, J. E. Mansson & L. Svennerholm, (1988) Characterization of the binding epitope of a monoclonal antibody to sulphatide. *Biochem J* **251**: 17-22.
- Frydendahl, K., (2002) Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. *Vet Microbiol* **85**: 169-182.
- Fujii, Y., M. Hayashi, S. Hitotsubashi, Y. Fuke, H. Yamanaka & K. Okamoto, (1991) Purification and characterization of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *J Bacteriol* **173**: 5516-5522.
- Fujii, Y., Y. Kondo & K. Okamoto, (1995) Involvement of prostaglandin E2 synthesis in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *FEMS Microbiol Lett* **130**: 259-265.
- Fujii, Y., T. Nomura, H. Yamanaka & K. Okamoto, (1997) Involvement of Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *Microbiol Immunol* **41**: 633-636.
- Fujii, Y., Y. Okamuro, S. Hitotsubashi, A. Saito, N. Akashi & K. Okamoto, (1994) Effect of alterations of basic amino acid residues of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II on enterotoxicity. *Infect Immun* **62**: 2295-2301.

- Gaastra, W. & F. K. de Graaf, (1982) Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Microbiol Rev* **46**: 129-161.
- Gaastra, W. & A. M. Svennerholm, (1996) Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Trends Microbiol* **4**: 444-452.
- Galvan, E. M., G. A. Roth & C. G. Monferran, (1999) Participation of ABH glycoconjugates in the secretory response to *Escherichia coli* heat-labile toxin in rabbit intestine. *J Infect Dis* **180**: 419-425.
- Galvan, E. M., G. A. Roth & C. G. Monferran, (2006) Functional interaction of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin with blood group A-active glycoconjugates from differentiated HT29 cells. *FEBS J* **273**: 3444-3453.
- Garipey, J., A. Lane, F. Frayman, D. Wilbur, W. Robien, G. K. Schoolnik & O. Jardetzky, (1986) Structure of the toxic domain of the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin ST I. *Biochemistry* **25**: 7854-7866.
- Gazit, E., W. J. Lee, P. T. Brey & Y. Shai, (1994) Mode of action of the antibacterial cecropin B2: a spectrofluorometric study. *Biochemistry* **33**: 10681-10692.
- Gerhard, R., S. Burger, H. Tatge, H. Genth, I. Just & F. Hofmann, (2005) Comparison of wild type with recombinant *Clostridium difficile* toxin A. *Microb Pathog* **38**: 77-83.
- Giannella, R. A., (1976) Suckling mouse model for detection of heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin: characteristics of the model. *Infect Immun* **14**: 95-99.
- Gill, D. M. & S. H. Richardson, (1980) Adenosine diphosphate-ribosylation of adenylate cyclase catalyzed by heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*: comparison with cholera toxin. *J Infect Dis* **141**: 64-70.
- Golin-Bisello, F., N. Bradbury & N. Ameen, (2005) STa and cGMP stimulate CFTR translocation to the surface of villus enterocytes in rat jejunum and is regulated by protein kinase G. *Am J Physiol Cell Physiol* **289**: C708-716.
- Gonçalves, C., F. Berthiaume, M. Mourez & J. D. Dubreuil, (2008) *Escherichia coli* STb toxin binding to sulfatide and its inhibition by carragenan. *FEMS Microbiol Lett* **281**: 30-35.
- Gonçalves, C. & J. D. Dubreuil, (2009) Effect of *Escherichia coli* STb toxin on NIH-3T3 cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* **55**: 432-441.

- Gonçalves, C., V. Vachon, J. L. Schwartz & J. D. Dubreuil, (2007) The *Escherichia coli* enterotoxin STb permeabilizes piglet jejunal brush border membrane vesicles. *Infect Immun* **75**: 2208-2213.
- Gorbach, S. L., J. G. Banwell, B. D. Chatterjee, B. Jacobs & R. B. Sack, (1971) Acute undifferentiated human diarrhea in the tropics. I. Alterations in intestinal microflora. *J Clin Invest* **50**: 881-889.
- Goud, B. & J. C. Antoine, (1984) Emergence of a surface immunoglobulin recycling process during B lymphocyte differentiation. *J Cell Biol* **98**: 1238-1246.
- Greenberg, R. N., M. Hill, J. Crytzer, W. J. Krause, S. L. Eber, F. K. Hamra & L. R. Forte, (1997) Comparison of effects of uroguanylin, guanylin, and *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin STa in mouse intestine and kidney: evidence that uroguanylin is an intestinal natriuretic hormone. *J Investig Med* **45**: 276-282.
- Griffiths, S. L. & D. R. Critchley, (1991) Characterisation of the binding sites for *Escherichia coli* heat-labile toxin type I in intestinal brush borders. *Biochim Biophys Acta* **1075**: 154-161.
- Guerrant, R. L., J. M. Hughes, B. Chang, D. C. Robertson & F. Murad, (1980) Activation of intestinal guanylate cyclase by heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: studies of tissue specificity, potential receptors, and intermediates. *J Infect Dis* **142**: 220-228.
- Guerrant, R. L., J. M. Hughes, N. L. Lima & J. Crane, (1990) Diarrhea in developed and developing countries: magnitude, special settings, and etiologies. *Rev Infect Dis* **12 Suppl 1**: S41-50.
- Gupta, S. K., J. Keck, P. K. Ram, J. A. Crump, M. A. Miller & E. D. Mintz, (2008) Part III. Analysis of data gaps pertaining to enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in low and medium human development index countries, 1984-2005. *Epidemiol Infect* **136**: 721-738.
- Gyles, C. L., (1979) Limitations of the infant mouse test for *Escherichia coli* heat stable enterotoxin. *Can J Comp Med* **43**: 371-379.
- Gyles, C. L., (2007) Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J Anim Sci* **85**: E45-62.

- Gyles, C. L. & D. A. Barnum, (1969) A heat-labile enterotoxin from strains of *Escherichia coli* enteropathogenic for pigs. *J Infect Dis* **120**: 419-426.
- Ha, S. K., C. Choi & C. Chae, (2003) Prevalence of a gene encoding adhesin involved in diffuse adherence among *Escherichia coli* isolates in pigs with postweaning diarrhea or edema disease. *J Vet Diagn Invest* **15**: 378-381.
- Hacker, J., (1992) Role of fimbrial adhesins in the pathogenesis of *Escherichia coli* infections. *Can J Microbiol* **38**: 720-727.
- Handl, C. E. & J. I. Flock, (1992) STb producing *Escherichia coli* are rarely associated with infantile diarrhoea. *J Diarrhoeal Dis Res* **10**: 37-38.
- Handl, C. E., J. Harel, J. I. Flock & J. D. Dubreuil, (1993) High yield of active STb enterotoxin from a fusion protein (MBP-STb) expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **4**: 275-281.
- Harnett, N. M. & C. L. Gyles, (1985) Enterotoxin plasmids in bovine and porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* of O groups 9, 20, 64 and 101. *Can J Comp Med* **49**: 79-87.
- Hartzell, C., I. Putzier & J. Arreola, (2005) Calcium-activated chloride channels. *Annu Rev Physiol* **67**: 719-758.
- Harville, B. A. & L. A. Dreyfus, (1995) Involvement of 5-hydroxytryptamine and prostaglandin E2 in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B. *Infect Immun* **63**: 745-750.
- Harville, B. A. & L. A. Dreyfus, (1996) Release of serotonin from RBL-2H3 cells by the *Escherichia coli* peptide toxin STb. *Peptides* **17**: 363-366.
- Hasegawa, M. & Y. Shimonishi, (2005) Recognition and signal transduction mechanism of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin and its receptor, guanylate cyclase C. *J Pept Res* **65**: 261-271.
- Herece, H. D. & A. E. Garcia, (2007a) Cell penetrating peptides: how do they do it? *J Biol Phys* **33**: 345-356.
- Herece, H. D. & A. E. Garcia, (2007b) Molecular dynamics simulations suggest a mechanism for translocation of the HIV-1 TAT peptide across lipid membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 20805-20810.

- Hirst, T. R. & J. M. D'Souza, (2006) *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* thermolabile enterotoxin. In: The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins, third edition. J. E. Alouf & M. R. Popoff (eds). London: Elsevier, pp. 270-290.
- Hitotsubashi, S., M. Akagi, A. Saitou, H. Yamanaka, Y. Fujii & K. Okamoto, (1992a) Action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II on isolated sections of mouse ileum. *FEMS Microbiol Lett* **69**: 249-252.
- Hitotsubashi, S., Y. Fujii & K. Okamoto, (1994) Binding protein for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II in mouse intestinal membrane. *FEMS Microbiol Lett* **122**: 297-302.
- Hitotsubashi, S., Y. Fujii, H. Yamanaka & K. Okamoto, (1992b) Some properties of purified *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *Infect Immun* **60**: 4468-4474.
- Holland, R. E., S. D. Grimes, R. D. Walker & R. A. Wilson, (1996) Experimental inoculation of foals and pigs with an enterotoxigenic *E. coli* isolated from a foal. *Vet Microbiol* **52**: 249-257.
- Holmes, R. K., E. M. Twiddy & C. L. Pickett, (1986) Purification and characterization of type II heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun* **53**: 464-473.
- Horstman, A. L., S. J. Bauman & M. J. Kuehn, (2004) Lipopolysaccharide 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid (Kdo) core determines bacterial association of secreted toxins. *J Biol Chem* **279**: 8070-8075.
- Horstman, A. L. & M. J. Kuehn, (2000) Enterotoxigenic *Escherichia coli* secretes active heat-labile enterotoxin via outer membrane vesicles. *J Biol Chem* **275**: 12489-12496.
- Horstman, A. L. & M. J. Kuehn, (2002) Bacterial surface association of heat-labile enterotoxin through lipopolysaccharide after secretion via the general secretory pathway. *J Biol Chem* **277**: 32538-32545.
- Hu, S. T., M. K. Yang, D. F. Spandau & C. H. Lee, (1987) Characterization of the terminal sequences flanking the transposon that carries the *Escherichia coli* enterotoxin STII gene. *Gene* **55**: 157-167.
- Huesca, M., A. Goodwin, A. Bhagwansingh, P. Hoffman & C. A. Lingwood, (1998) Characterization of an acidic-pH-inducible stress protein (hsp70), a putative sulfatide binding adhesin, from *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* **66**: 4061-4067.

- Jansson, L., J. Tobias, C. Jarefjall, M. Lebens, A. M. Svennerholm & S. Teneberg, (2009) Sulfatide recognition by colonization factor antigen CS6 from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *PLoS One* **4**: e4487.
- Jansson, L., J. Tobias, M. Lebens, A. M. Svennerholm & S. Teneberg, (2006) The major subunit, CfaB, of colonization factor antigen I from enterotoxigenic *Escherichia coli* is a glycosphingolipid binding protein. *Infect Immun* **74**: 3488-3497.
- Jares-Erijman, E. A. & T. M. Jovin, (2006) Imaging molecular interactions in living cells by FRET microscopy. *Curr Opin Chem Biol* **10**: 409-416.
- Johnson, A. M., R. S. Kaushik, D. H. Francis, J. M. Fleckenstein & P. R. Hardwidge, (2009) Heat-labile enterotoxin promotes *Escherichia coli* adherence to intestinal epithelial cells. *J Bacteriol* **191**: 178-186.
- Kamisago, S., M. Iwamori, T. Tai, K. Mitamura, Y. Yazaki & K. Sugano, (1996) Role of sulfatides in adhesion of *Helicobacter pylori* to gastric cancer cells. *Infect Immun* **64**: 624-628.
- Kaper, J. B., J. P. Nataro & H. L. Mobley, (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* **2**: 123-140.
- Kennedy, D. J., R. N. Greenberg, J. A. Dunn, R. Abernathy, J. S. Rytse & R. L. Guerrant, (1984) Effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin STb on intestines of mice, rats, rabbits, and piglets. *Infect Immun* **46**: 639-643.
- Kesty, N. C., K. M. Mason, M. Reedy, S. E. Miller & M. J. Kuehn, (2004) Enterotoxigenic *Escherichia coli* vesicles target toxin delivery into mammalian cells. *EMBO J* **23**: 4538-4549.
- Khan, A. S., N. C. Johnston, H. Goldfine & D. M. Schifferli, (1996) Porcine 987P glycolipid receptors on intestinal brush borders and their cognate bacterial ligands. *Infect Immun* **64**: 3688-3693.
- Kobayashi, N., K. Nishino, T. Hirata & A. Yamaguchi, (2003) Membrane topology of ABC-type macrolide antibiotic exporter MacB in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **546**: 241-246.
- Kobayashi, N., K. Nishino & A. Yamaguchi, (2001) Novel macrolide-specific ABC-type efflux transporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**: 5639-5644.

- Koh, G. Y., D. R. Nussenzveig, J. Okolicany, D. A. Price & T. Maack, (1992) Dynamics of atrial natriuretic factor-guanylate cyclase receptors and receptor-ligand complexes in cultured glomerular mesangial and renomedullary interstitial cells. *J Biol Chem* **267**: 11987-11994.
- Koh, S. Y., S. George, V. Brozel, R. Moxley, D. Francis & R. S. Kaushik, (2008) Porcine intestinal epithelial cell lines as a new *in vitro* model for studying adherence and pathogenesis of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Vet Microbiol* **130**: 191-197.
- Kojic, L. D., B. Joshi, P. Lajoie, P. U. Le, M. E. Cox, D. A. Turbin, S. M. Wiseman & I. R. Nabi, (2007) Raft-dependent endocytosis of autocrine motility factor is phosphatidylinositol 3-kinase-dependent in breast carcinoma cells. *J Biol Chem* **282**: 29305-29313.
- Kolter, T. & K. Sandhoff, (2005) Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 81-103.
- Krivan, H. C., L. D. Olson, M. F. Barile, V. Ginsburg & D. D. Roberts, (1989) Adhesion of *Mycoplasma pneumoniae* to sulfated glycolipids and inhibition by dextran sulfate. *J Biol Chem* **264**: 9283-9288.
- Kuehn, M. J. & N. C. Kesty, (2005) Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev* **19**: 2645-2655.
- Kupersztoch, Y. M., K. Tachias, C. R. Moomaw, L. A. Dreyfus, R. Urban, C. Slaughter & S. Whipp, (1990) Secretion of methanol-insoluble heat-stable enterotoxin (STB): energy- and secA-dependent conversion of pre-STB to an intermediate indistinguishable from the extracellular toxin. *J Bacteriol* **172**: 2427-2432.
- Labrie, V., H. E. Beausoleil, J. Harel & J. D. Dubreuil, (2001a) Binding to sulfatide and enterotoxicity of various *Escherichia coli* STb mutants. *Microbiology* **147**: 3141-3148.
- Labrie, V., J. Harel & J. D. Dubreuil, (2001b) Oligomerization of *Escherichia coli* enterotoxin b through its C-terminal hydrophobic alpha-helix. *Biochim Biophys Acta* **1535**: 128-133.

- Labrie, V., J. Harel & J. D. Dubreuil, (2002) *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b (STb) *in vivo* internalization within rat intestinal epithelial cells. *Vet Res* **33**: 223-228.
- Laude, A. J. & I. A. Prior, (2004) Plasma membrane microdomains: organization, function and trafficking. *Mol Membr Biol* **21**: 193-205.
- Le, P. U. & I. R. Nabi, (2003) Distinct caveolae-mediated endocytic pathways target the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* **116**: 1059-1071.
- Leclerc, S., P. Boerlin, C. Gyles, J. D. Dubreuil, M. Mourez, J. M. Fairbrother & J. Harel, (2007) paa, originally identified in attaching and effacing *Escherichia coli*, is also associated with enterotoxigenic *E. coli*. *Res Microbiol* **158**: 97-104.
- Lee, C. H., S. T. Hu, P. J. Swiatek, S. L. Moseley, S. D. Allen & M. So, (1985) Isolation of a novel transposon which carries the *Escherichia coli* enterotoxin STII gene. *J Bacteriol* **162**: 615-620.
- Lee, C. H., S. L. Moseley, H. W. Moon, S. C. Whipp, C. L. Gyles & M. So, (1983) Characterization of the gene encoding heat-stable toxin II and preliminary molecular epidemiological studies of enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable toxin II producers. *Infect Immun* **42**: 264-268.
- Lee, J. C., D. J. Field & L. L. Lee, (1980) Effects of nocodazole on structures of calf brain tubulin. *Biochemistry* **19**: 6209-6215.
- Lee, V. T. & O. Schneewind, (2001) Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. *Genes Dev* **15**: 1725-1752.
- Lortie, L. A., J. D. Dubreuil & J. Harel, (1991) Characterization of *Escherichia coli* strains producing heat-stable enterotoxin b (STb) isolated from humans with diarrhea. *J Clin Microbiol* **29**: 656-659.
- Mainil, J. G., F. Bex, E. Jacquemin, P. Pohl, M. Couturier & A. Kaeckenbeeck, (1990) Prevalence of four enterotoxin (STaP, STaH, STb, and LT) and four adhesin subunit (K99, K88, 987P, and F41) genes among *Escherichia coli* isolates from cattle. *Am J Vet Res* **51**: 187-190.
- Mainil, J. G., E. Jacquemin, P. Pohl, A. Kaeckenbeeck & I. Benz, (2002) DNA sequences coding for the F18 fimbriae and AIDA adhesin are localised on the same plasmid in *Escherichia coli* isolates from piglets. *Vet Microbiol* **86**: 303-311.

- Mainil, J. G., S. L. Moseley, R. A. Schneider, K. Sutch, T. A. Casey & H. W. Moon, (1986) Hybridization of bovine *Escherichia coli* isolates with gene probes for four enterotoxins (STaP, STaH, STb, LT) and one adhesion factor (K99). *Am J Vet Res* **47**: 1145-1148.
- Manting, E. H. & A. J. Driessen, (2000) *Escherichia coli* translocase: the unravelling of a molecular machine. *Mol Microbiol* **37**: 226-238.
- Mashburn-Warren, L. M. & M. Whiteley, (2006) Special delivery: vesicle trafficking in prokaryotes. *Mol Microbiol* **61**: 839-846.
- Masignani, V., M. Pizza & R. Rappuoli, (2006) Molecular, functional, and evolutionary aspects of ADP-ribosylating toxins. In: The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins, third edition. J. E. Alouf & M. R. Popoff (eds). London: Elsevier, pp. 213-244.
- Mayor, S. & R. E. Pagano, (2007) Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 603-612.
- Mazaitis, A. J., R. Maas & W. K. Maas, (1981) Structure of a naturally occurring plasmid with genes for enterotoxin production and drug resistance. *J Bacteriol* **145**: 97-105.
- McVeigh, A., A. Fasano, D. A. Scott, S. Jelacic, S. L. Moseley, D. C. Robertson & S. J. Savarino, (2000) IS1414, an *Escherichia coli* insertion sequence with a heat-stable enterotoxin gene embedded in a transposase-like gene. *Infect Immun* **68**: 5710-5715.
- Ménard, L. P. & J. D. Dubreuil, (2002) Enteraggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist. *Crit Rev Microbiol* **28**: 43-60.
- Merritt, E. A., T. K. Sixma, K. H. Kalk, B. A. van Zanten & W. G. Hol, (1994) Galactose-binding site in *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT) and cholera toxin (CT). *Mol Microbiol* **13**: 745-753.
- Michel, G., P. Nyval-Collen, T. Barbeyron, M. Czjzek & W. Helbert, (2006) Bioconversion of red seaweed galactans: a focus on bacterial agarases and carrageenases. *Appl Microbiol Biotechnol* **71**: 23-33.

- Mokady, D., U. Gophna & E. Z. Ron, (2005) Virulence factors of septicemic *Escherichia coli* strains. *Int J Med Microbiol* **295**: 455-462.
- Moon, H. W., E. M. Kohler, R. A. Schneider & S. C. Whipp, (1980) Prevalence of pilus antigens, enterotoxin types, and enteropathogenicity among K88-negative enterotoxigenic *Escherichia coli* from neonatal pigs. *Infect Immun* **27**: 222-230.
- Moon, H. W., R. A. Schneider & S. L. Moseley, (1986) Comparative prevalence of four enterotoxin genes among *Escherichia coli* isolated from swine. *Am J Vet Res* **47**: 210-212.
- Morgan, W. T. & W. M. Watkins, (2000) Unravelling the biochemical basis of blood group ABO and Lewis antigenic specificity. *Glycoconj J* **17**: 501-530.
- Moseley, S. L., M. Samadpour-Motalebi & S. Falkow, (1983) Plasmid association and nucleotide sequence relationships of two genes encoding heat-stable enterotoxin production in *Escherichia coli* H-10407. *J Bacteriol* **156**: 441-443.
- Mu, X. Q., S. J. Savarino & E. Bullitt, (2008) The three-dimensional structure of CFA/I adhesion pili: traveler's diarrhea bacteria hang on by a spring. *J Mol Biol* **376**: 614-620.
- Mudrak, B., D. L. Rodriguez & M. J. Kuehn, (2009) Residues of heat-labile enterotoxin involved in bacterial cell surface binding. *J Bacteriol* **191**: 2917-2925.
- Nagy, B. & P. Z. Fekete, (1999) Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Vet Res* **30**: 259-284.
- Nagy, B. & P. Z. Fekete, (2005) Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol* **295**: 443-454.
- Nataro, J. P. & J. B. Kaper, (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**: 142-201.
- Nataro, J. P., J. B. Kaper, R. Robins-Browne, V. Prado, P. Vial & M. M. Levine, (1987) Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEP-2 cells. *Pediatr Infect Dis J* **6**: 829-831.
- Nataro, J. P., I. C. Scaletsky, J. B. Kaper, M. M. Levine & L. R. Trabulsi, (1985) Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **48**: 378-383.

- Natomi, H., T. Saitoh, K. Sugano, M. Iwamori, M. Fukayama & Y. Nagai, (1993) Systematic analysis of glycosphingolipids in the human gastrointestinal tract: enrichment of sulfatides with hydroxylated longer-chain fatty acids in the gastric and duodenal mucosa. *Lipids* **28**: 737-742.
- Ngeleka, M., J. Pritchard, G. Appleyard, D. M. Middleton & J. M. Fairbrother, (2003) Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. *J Vet Diagn Invest* **15**: 242-252.
- Niewerth, U., A. Frey, T. Voss, C. Le Bouguenec, G. Baljer, S. Franke & M. A. Schmidt, (2001) The AIDA autotransporter system is associated with F18 and stx2e in *Escherichia coli* isolates from pigs diagnosed with edema disease and postweaning diarrhea. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**: 143-149.
- Ohnishi, H., M. Miyake, S. Kamitani & Y. Horiguchi, (2008) The morphological changes in cultured cells caused by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *FEMS Microbiol Lett* **279**: 174-179.
- Okamoto, K., T. Baba, H. Yamanaka, N. Akashi & Y. Fujii, (1995) Disulfide bond formation and secretion of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *J Bacteriol* **177**: 4579-4586.
- Okamoto, K., Y. Fujii, N. Akashi, S. Hitotsubashi, H. Kurazono, T. Karasawa & Y. Takeda, (1993) Identification and characterization of heat-stable enterotoxin II-producing *Escherichia coli* from patients with diarrhea. *Microbiol Immunol* **37**: 411-414.
- Okamoto, K. & M. Takahara, (1990) Synthesis of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin STp as a pre-pro form and role of the pro sequence in secretion. *J Bacteriol* **172**: 5260-5265.
- Okamoto, K., H. Yamanaka, M. Takeji & Y. Fuji, (2001) Region of heat-stable enterotoxin II of *Escherichia coli* involved in translocation across the outer membrane. *Microbiol Immunol* **45**: 349-355.
- Okeke, I. N. & J. P. Nataro, (2001) Enterοaggregative *Escherichia coli*. *Lancet Infect Dis* **1**: 304-313.

- Orskov, F. & I. Orskov, (1992) *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Can J Microbiol* **38**: 699-704.
- Osek, J., (2003) Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1) gene and its relationship with fimbrial and enterotoxin markers in *E. coli* isolates from pigs with diarrhoea. *Vet Microbiol* **91**: 65-72.
- Ozaki, H., T. Sato, H. Kubota, Y. Hata, Y. Katsube & Y. Shimonishi, (1991) Molecular structure of the toxin domain of heat-stable enterotoxin produced by a pathogenic strain of *Escherichia coli*. A putative binding site for a binding protein on rat intestinal epithelial cell membranes. *J Biol Chem* **266**: 5934-5941.
- Paccaud, J. P., K. Siddle & J. L. Carpentier, (1992) Internalization of the human insulin receptor. The insulin-independent pathway. *J Biol Chem* **267**: 13101-13106.
- Paiva de Sousa, C. & J. D. Dubreuil, (2001) Distribution and expression of the *astA* gene (EAST1 toxin) in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Int J Med Microbiol* **291**: 15-20.
- Pang, H., P. U. Le & I. R. Nabi, (2004) Ganglioside GM1 levels are a determinant of the extent of caveolae/raft-dependent endocytosis of cholera toxin to the Golgi apparatus. *J Cell Sci* **117**: 1421-1430.
- Parsot, C., (2005) *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. *FEMS Microbiol Lett* **252**: 11-18.
- Parton, R. G. & A. A. Richards, (2003) Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic* **4**: 724-738.
- Peterson, J. W. & S. C. Whipp, (1995) Comparison of the mechanisms of action of cholera toxin and the heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. *Infect Immun* **63**: 1452-1461.
- Philpott, D. J., C. A. Ackerley, A. J. Kiliaan, M. A. Karmali, M. H. Perdue & P. M. Sherman, (1997) Translocation of verotoxin-1 across T84 monolayers: mechanism of bacterial toxin penetration of epithelium. *Am J Physiol* **273**: G1349-1358.
- Picken, R. N., A. J. Mazaitis, W. K. Maas, M. Rey & H. Heyneker, (1983) Nucleotide sequence of the gene for heat-stable enterotoxin II of *Escherichia coli*. *Infect Immun* **42**: 269-275.

- Pickett, C. L., E. M. Twiddy, C. Coker & R. K. Holmes, (1989) Cloning, nucleotide sequence, and hybridization studies of the type IIb heat-labile enterotoxin gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **171**: 4945-4952.
- Pickett, C. L., D. L. Weinstein & R. K. Holmes, (1987) Genetics of type IIa heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*: operon fusions, nucleotide sequence, and hybridization studies. *J Bacteriol* **169**: 5180-5187.
- Pierce, N. F., J. B. Kaper, J. J. Mekalanos & W. C. Cray, Jr., (1985) Role of cholera toxin in enteric colonization by *Vibrio cholerae* O1 in rabbits. *Infect Immun* **50**: 813-816.
- Prywes, R., E. Livneh, A. Ullrich & J. Schlessinger, (1986) Mutations in the cytoplasmic domain of EGF receptor affect EGF binding and receptor internalization. *EMBO J* **5**: 2179-2190.
- Pugsley, A. P., (1993) The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* **57**: 50-108.
- Qadri, F., A. Saha, T. Ahmed, A. Al Tarique, Y. A. Begum & A. M. Svennerholm, (2007) Disease burden due to enterotoxigenic *Escherichia coli* in the first 2 years of life in an urban community in Bangladesh. *Infect Immun* **75**: 3961-3968.
- Qadri, F., A. M. Svennerholm, A. S. Faruque & R. B. Sack, (2005) Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Rev* **18**: 465-483.
- Rao, M. C., (1985) Toxins which activate guanylate cyclase: heat-stable enterotoxins. *Ciba Found Symp* **112**: 74-93.
- Rasheed, J. K., L. M. Guzman-Verduzco & Y. M. Kupersztoch, (1990) Two precursors of the heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: evidence of extracellular processing. *Mol Microbiol* **4**: 265-273.
- Ravi, M., M. Ngeleka, S. H. Kim, C. Gyles, F. Berthiaume, M. Mourez, D. Middleton & E. Simko, (2007) Contribution of AIDA-I to the pathogenicity of a porcine diarrheagenic *Escherichia coli* and to intestinal colonization through biofilm formation in pigs. *Vet Microbiol* **120**: 308-319.
- Roberts, D. D. & V. Ginsburg, (1988) Sulfated glycolipids and cell adhesion. *Arch Biochem Biophys* **267**: 405-415.

- Robertson, A. S., E. Smythe & K. R. Ayscough, (2009) Functions of actin in endocytosis. *Cell Mol Life Sci* **66**: 2049-2065.
- Rose, R., S. C. Whipp & H. W. Moon, (1987) Effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b on small intestinal villi in pigs, rabbits, and lambs. *Vet Pathol* **24**: 71-79.
- Rousset, E., J. Harel & J. D. Dubreuil, (1998a) Binding characteristics of *Escherichia coli* enterotoxin b (STb) to the pig jejunum and partial characterization of the molecule involved. *Microb Pathog* **24**: 277-288.
- Rousset, E., J. Harel & J. D. Dubreuil, (1998b) Sulfatide from the pig jejunum brush border epithelial cell surface is involved in binding of *Escherichia coli* enterotoxin b. *Infect Immun* **66**: 5650-5658.
- Rowe, B., J. Taylor & K. A. Bettelheim, (1970) An investigation of traveller's diarrhoea. *Lancet* **1**: 1-5.
- Roy, K., D. Hamilton, K. P. Allen, M. P. Randolph & J. M. Fleckenstein, (2008) The EtpA exoprotein of enterotoxigenic *Escherichia coli* promotes intestinal colonization and is a protective antigen in an experimental model of murine infection. *Infect Immun* **76**: 2106-2112.
- Roy, K., G. M. Hilliard, D. J. Hamilton, J. Luo, M. M. Ostmann & J. M. Fleckenstein, (2009) Enterotoxigenic *Escherichia coli* EtpA mediates adhesion between flagella and host cells. *Nature* **457**: 594-598.
- Sack, D. A., J. Shimko, O. Torres, A. L. Bourgeois, D. S. Francia, B. Gustafsson, A. Karnell, I. Nyquist & A. M. Svennerholm, (2007) Randomised, double-blind, safety and efficacy of a killed oral vaccine for enterotoxigenic *E. coli* diarrhoea of travellers to Guatemala and Mexico. *Vaccine* **25**: 4392-4400.
- Sack, R. B., (1968). In: Proceedings of the 4th Joint Conference. Japan-U.S. Coop. Med. Sci. Program (ed). Unzen, Japan, pp. 23-25.
- Sack, R. B., S. L. Gorbach, J. G. Banwell, B. Jacobs, B. D. Chatterjee & R. C. Mitra, (1971) Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from patients with severe cholera-like disease. *J Infect Dis* **123**: 378-385.
- Sack, R. B., B. Jacobs & R. Mitra, (1974) Antitoxin responses to infections with enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **129**: 330-335.

- Sanchez, J. & J. Holmgren, (2005) Virulence factors, pathogenesis and vaccine protection in cholera and ETEC diarrhea. *Curr Opin Immunol* **17**: 388-398.
- Sanchez, J. & J. Holmgren, (2008) Cholera toxin structure, gene regulation and pathophysiological and immunological aspects. *Cell Mol Life Sci* **65**: 1347-1360.
- Sandkvist, M., L. O. Michel, L. P. Hough, V. M. Morales, M. Bagdasarian, M. Koomey & V. J. DiRita, (1997) General secretion pathway (eps) genes required for toxin secretion and outer membrane biogenesis in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **179**: 6994-7003.
- Sandvig, K., O. Garred & B. van Deurs, (1997) Intracellular transport and processing of protein toxins produced by enteric bacteria. *Adv Exp Med Biol* **412**: 225-232.
- Sandvig, K., S. Grimmer, S. U. Lauvrak, M. L. Torgersen, G. Skretting, B. van Deurs & T. G. Iversen, (2002) Pathways followed by ricin and Shiga toxin into cells. *Histochem Cell Biol* **117**: 131-141.
- Sandvig, K., S. Olsnes, J. E. Brown, O. W. Petersen & B. van Deurs, (1989) Endocytosis from coated pits of Shiga toxin: a glycolipid-binding protein from *Shigella dysenteriae* 1. *J Cell Biol* **108**: 1331-1343.
- Sandvig, K. & B. van Deurs, (2002) Membrane traffic exploited by protein toxins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**: 1-24.
- Sato, T. & Y. Shimonishi, (2004) Structural features of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin that activates membrane-associated guanylyl cyclase. *J Pept Res* **63**: 200-206.
- Savarino, S. J., A. Fasano, D. C. Robertson & M. M. Levine, (1991) Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an *in vitro* rabbit intestinal model. *J Clin Invest* **87**: 1450-1455.
- Savarino, S. J., A. Fasano, J. Watson, B. M. Martin, M. M. Levine, S. Guandalini & P. Guerry, (1993) Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 3093-3097.
- Savarino, S. J., A. McVeigh, J. Watson, A. Cravioto, J. Molina, P. Echeverria, M. K. Bhan, M. M. Levine & A. Fasano, (1996) Enteroaggregative *Escherichia coli*

- heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli*. *J Infect Dis* **173**: 1019-1022.
- Scaletsky, I. C., M. L. Silva & L. R. Trabulsi, (1984) Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect Immun* **45**: 534-536.
- Schierack, P., M. Nordhoff, M. Pollmann, K. D. Weyrauch, S. Amasheh, U. Lodemann, J. Jores, B. Tachu, S. Kleta, A. Blikslager, K. Tedin & L. H. Wieler, (2006) Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for *in vitro* studies of microbial pathogenesis in swine. *Histochem Cell Biol* **125**: 293-305.
- Schlor, S., S. Riedl, J. Blass & J. Reidl, (2000) Genetic rearrangements of the regions adjacent to genes encoding heat-labile enterotoxins (*eltAB*) of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol* **66**: 352-358.
- Schulz, S., C. K. Green, P. S. Yuen & D. L. Garbers, (1990) Guanylyl cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor. *Cell* **63**: 941-948.
- Sears, C. L. & J. B. Kaper, (1996) Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol Rev* **60**: 167-215.
- Segrest, J. P., H. De Loof, J. G. Dohlman, C. G. Brouillette & G. M. Anantharamaiah, (1990) Amphipathic helix motif: classes and properties. *Proteins* **8**: 103-117.
- Sekar, R. B. & A. Periasamy, (2003) Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. *J Cell Biol* **160**: 629-633.
- Sellers, Z. M., E. Mann, A. Smith, K. H. Ko, R. Giannella, M. B. Cohen, K. E. Barrett & H. Dong, (2008) Heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli* (STa) can stimulate duodenal HCO₃⁻ secretion via a novel GC-C- and CFTR-independent pathway. *FASEB J* **22**: 1306-1316.
- Seriwatana, J., P. Echeverria, D. N. Taylor, L. Rasrianaul, J. E. Brown, J. S. Peiris & C. L. Clayton, (1988) Type II heat-labile enterotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from animals and humans. *Infect Immun* **56**: 1158-1161.
- Servin, A. L., (2005) Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **18**: 264-292.
- Shai, Y., (1999) Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta* **1462**: 55-70.

- Shupp, J. W., M. Jett & C. H. Pontzer, (2002) Identification of a transcytosis epitope on staphylococcal enterotoxins. *Infect Immun* **70**: 2178-2186.
- Simons, K. & D. Toomre, (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: 31-39.
- Singh, R. D., V. Puri, J. T. Valiyaveetil, D. L. Marks, R. Bittman & R. E. Pagano, (2003) Selective caveolin-1-dependent endocytosis of glycosphingolipids. *Mol Biol Cell* **14**: 3254-3265.
- Sixma, T. K., K. H. Kalk, B. A. van Zanten, Z. Dauter, J. Kingma, B. Witholt & W. G. Hol, (1993) Refined structure of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin, a close relative of cholera toxin. *J Mol Biol* **230**: 890-918.
- Sixma, T. K., S. E. Pronk, K. H. Kalk, E. S. Wartna, B. A. van Zanten, B. Witholt & W. G. Hol, (1991) Crystal structure of a cholera toxin-related heat-labile enterotoxin from *E. coli*. *Nature* **351**: 371-377.
- Small, J. V., S. Zobeley, G. Rinnerthaler & H. Faulstich, (1988) Coumarin-phalloidin: a new actin probe permitting triple immunofluorescence microscopy of the cytoskeleton. *J Cell Sci* **89 (Pt 1)**: 21-24.
- Smart, E. J. & R. G. Anderson, (2002) Alterations in membrane cholesterol that affect structure and function of caveolae. *Methods Enzymol* **353**: 131-139.
- Smith, H. W. & S. Halls, (1967a) Observations by the ligated intestinal segment and oral inoculation methods on *Escherichia coli* infections in pigs, calves, lambs and rabbits. *J Pathol Bacteriol* **93**: 499-529.
- Smith, H. W. & S. Halls, (1967b) Studies on *Escherichia coli* enterotoxin. *J Pathol Bacteriol* **93**: 531-543.
- Smith, H. W. & M. A. Linggood, (1971) The transmissible nature of enterotoxin production in a human enteropathogenic strain of *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* **4**: 301-305.
- Smith, J. L., P. M. Fratamico & N. W. Gunther, (2007) Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathog Dis* **4**: 134-163.
- So, M., W. S. Dallas & S. Falkow, (1978) Characterization of an *Escherichia coli* plasmid encoding for synthesis of heat-labile toxin: molecular cloning of the toxin determinant. *Infect Immun* **21**: 405-411.

- So, M. & B. J. McCarthy, (1980) Nucleotide sequence of the bacterial transposon Tn1681 encoding a heat-stable (ST) toxin and its identification in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**: 4011-4015.
- Spandau, D. F. & C. H. Lee, (1987) Determination of the promoter strength of the gene encoding *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *J Bacteriol* **169**: 1740-1744.
- Spangler, B. D., (1992) Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol Rev* **56**: 622-647.
- Spears, K. J., A. J. Roe & D. L. Gally, (2006) A comparison of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis. *FEMS Microbiol Lett* **255**: 187-202.
- Spycher, M. O. & U. E. Nydegger, (1986) Part of the activating cross-linked immunoglobulin G is internalized by human platelets to sites not accessible for enzymatic digestion. *Blood* **67**: 12-18.
- Stec, B., (2006) Plant thionins--the structural perspective. *Cell Mol Life Sci* **63**: 1370-1385.
- Steinsland, H., P. Valentiner-Branth, M. Perch, F. Dias, T. K. Fischer, P. Aaby, K. Molbak & H. Sommerfelt, (2002) Enterotoxigenic *Escherichia coli* infections and diarrhea in a cohort of young children in Guinea-Bissau. *J Infect Dis* **186**: 1740-1747.
- Strozen, T. & S. P. Howard, (2009) Requirement for Alpha and Beta type II secretion systems for secretion of heat-labile enterotoxin in enterotoxigenic *Escherichia coli*. Conference poster presented at : 59th Annual Conference of the Canadian Society of Microbiologists (CSM); 2009, June 15-18; Montreal, QC, Canada.
- Sukumar, M., J. Rizo, M. Wall, L. A. Dreyfus, Y. M. Kupersztoch & L. M. Gierasch, (1995) The structure of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b by nuclear magnetic resonance and circular dichroism. *Protein Sci* **4**: 1718-1729.
- Taillon, C., E. Nadeau, M. Mourez & J. D. Dubreuil, (2008) Heterogeneity of *Escherichia coli* STb enterotoxin isolated from diseased pigs. *J Med Microbiol* **57**: 887-890.
- Tang, W., K. Seino, M. Ito, T. Konishi, H. Senda, M. Makuuchi, N. Kojima & T. Mizuochi, (2001) Requirement of ceramide for adhesion of *Helicobacter pylori* to glycosphingolipids. *FEBS Lett* **504**: 31-35.

- Tauschek, M., R. J. Gorrell, R. A. Strugnell & R. M. Robins-Browne, (2002) Identification of a protein secretory pathway for the secretion of heat-labile enterotoxin by an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 7066-7071.
- Teneberg, S., P. T. Willemsen, F. K. de Graaf, G. Stenhagen, W. Pimlott, P. A. Jovall, J. Angstrom & K. A. Karlsson, (1994) Characterization of gangliosides of epithelial cells of calf small intestine, with special reference to receptor-active sequences for enteropathogenic *Escherichia coli* K99. *J Biochem* **116**: 560-574.
- Thompson, M. R. & R. A. Giannella, (1985) Revised amino acid sequence for a heat-stable enterotoxin produced by an *Escherichia coli* strain (18D) that is pathogenic for humans. *Infect Immun* **47**: 834-836.
- Tian, X., A. M. Michal, P. Li, H. R. Wolfe, S. A. Waldman & E. Wickstrom, (2008) STa peptide analogs for probing guanylyl cyclase C. *Biopolymers* **90**: 713-723.
- Tikhonova, E. B., V. K. Devroy, S. Y. Lau & H. I. Zgurskaya, (2007) Reconstitution of the *Escherichia coli* macrolide transporter: the periplasmic membrane fusion protein MacA stimulates the ATPase activity of MacB. *Mol Microbiol* **63**: 895-910.
- Torgersen, M. L., G. Skretting, B. van Deurs & K. Sandvig, (2001) Internalization of cholera toxin by different endocytic mechanisms. *J Cell Sci* **114**: 3737-3747.
- Trehin, R. & H. P. Merkle, (2004) Chances and pitfalls of cell penetrating peptides for cellular drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* **58**: 209-223.
- Tsuji, T., T. Honda, T. Miwatani, S. Wakabayashi & H. Matsubara, (1985) Analysis of receptor-binding site in *Escherichia coli* enterotoxin. *J Biol Chem* **260**: 8552-8558.
- Tuma, P. L. & A. L. Hubbard, (2003) Transcytosis: crossing cellular barriers. *Physiol Rev* **83**: 871-932.
- Urban, R. G., E. M. Pipper & L. A. Dreyfus, (1991) Monoclonal antibodies specific for the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin STb. *J Clin Microbiol* **29**: 1963-1968.
- Vaandrager, A. B., (2002) Structure and function of the heat-stable enterotoxin receptor/guanylyl cyclase C. *Mol Cell Biochem* **230**: 73-83.

- Vaandrager, A. B., E. van der Wiel, M. L. Hom, L. H. Luthjens & H. R. de Jonge, (1994) Heat-stable enterotoxin receptor/guanylyl cyclase C is an oligomer consisting of functionally distinct subunits, which are non-covalently linked in the intestine. *J Biol Chem* **269**: 16409-16415.
- van Beers-Schreurs, H. M., L. Vellenga, T. Wensing & H. J. Breukink, (1992) The pathogenesis of the post-weaning syndrome in weaned piglets: a review. *Vet Q* **14**: 29-34.
- Van den Broeck, W., E. Cox, B. Oudega & B. M. Goddeeris, (2000) The F4 fimbrial antigen of *Escherichia coli* and its receptors. *Vet Microbiol* **71**: 223-244.
- van der Goot, G. & J. A. Young, (2009) Receptors of anthrax toxin and cell entry. *Mol Aspects Med* **30**: 406-412.
- Veilleux, S. & J. D. Dubreuil, (2006) Presence of *Escherichia coli* carrying the EAST1 toxin gene in farm animals. *Vet Res* **37**: 3-13.
- Vila, J., A. Gene, M. Vargas, J. Gascon, C. Latorre & M. T. Jimenez de Anta, (1998) A case-control study of diarrhoea in children caused by *Escherichia coli* producing heat-stable enterotoxin (EAST-1). *J Med Microbiol* **47**: 889-891.
- Vives, E., P. Brodin & B. Lebleu, (1997) A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem* **272**: 16010-16017.
- Weerachatanukul, W., I. Probodh, K. Kongmanas, N. Tanphaichitr & L. J. Johnston, (2007) Visualizing the localization of sulfoglycolipids in lipid raft domains in model membranes and sperm membrane extracts. *Biochim Biophys Acta* **1768**: 299-310.
- Weikel, C. S., H. N. Nellans & R. L. Guerrant, (1986a) *In vivo* and *in vitro* effects of a novel enterotoxin, STb, produced by *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **153**: 893-901.
- Weikel, C. S., K. M. Tiemens, S. L. Moseley, I. M. Huq & R. L. Guerrant, (1986b) Species specificity and lack of production of STb enterotoxin by *Escherichia coli* strains isolated from humans with diarrheal illness. *Infect Immun* **52**: 323-325.
- Weintraub, A., (2007) Enteroadgregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. *J Med Microbiol* **56**: 4-8.

- Wenneras, C. & V. Erling, (2004) Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli*-associated diarrhoea and carrier state in the developing world. *J Health Popul Nutr* **22**: 370-382.
- Whipp, S. C., (1987) Protease degradation of *Escherichia coli* heat-stable, mouse-negative, pig-positive enterotoxin. *Infect Immun* **55**: 2057-2060.
- Whipp, S. C., (1990) Assay for enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable toxin b in rats and mice. *Infect Immun* **58**: 930-934.
- Whipp, S. C., (1991) Intestinal responses to enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable toxin b in non-porcine species. *Am J Vet Res* **52**: 734-737.
- Whipp, S. C., E. Kokue, R. W. Morgan, R. Rose & H. W. Moon, (1987) Functional significance of histologic alterations induced by *Escherichia coli* pig-specific, mouse-negative, heat-stable enterotoxin (STb). *Vet Res Commun* **11**: 41-55.
- Whipp, S. C., H. W. Moon & R. A. Argenzio, (1981) Comparison of enterotoxic activities of heat-stable enterotoxins from class 1 and class 2 *Escherichia coli* of swine origin. *Infect Immun* **31**: 245-251.
- Whipp, S. C., S. L. Moseley & H. W. Moon, (1986) Microscopic alterations in jejunal epithelium of 3-week-old pigs induced by pig-specific, mouse-negative, heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin. *Am J Vet Res* **47**: 615-618.
- Wiles, T. J., R. R. Kulesus & M. A. Mulvey, (2008) Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol* **85**: 11-19.
- Wilson, R. A. & D. H. Francis, (1986) Fimbriae and enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with colibacillosis. *Am J Vet Res* **47**: 213-217.
- Wolf, M. K., (1997) Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **10**: 569-584.
- Worrell, R. T. & R. A. Frizzell, (1991) CaMKII mediates stimulation of chloride conductance by calcium in T84 cells. *Am J Physiol* **260**: C877-882.
- Xu, Y., S. H. Sim, K. H. Nam, X. L. Jin, H. M. Kim, K. Y. Hwang, K. Lee & N. C. Ha, (2009) Crystal structure of the periplasmic region of MacB, a noncanonic ABC transporter. *Biochemistry* **48**: 5218-5225.

- Yamamoto, T. & P. Echeverria, (1996) Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans. *Infect Immun* **64**: 1441-1445.
- Yamamoto, T., N. Wakisaka, F. Sato & A. Kato, (1997) Comparison of the nucleotide sequence of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 genes among diarrhea-associated *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **147**: 89-95.
- Yamanaka, H., M. Kameyama, T. Baba, Y. Fujii & K. Okamoto, (1994) Maturation pathway of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin I: requirement of DsbA for disulfide bond formation. *J Bacteriol* **176**: 2906-2913.
- Yamanaka, H., H. Kobayashi, E. Takahashi & K. Okamoto, (2008) MacAB is involved in the secretion of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *J Bacteriol* **190**: 7693-7698.
- Yamanaka, H., T. Nomura, Y. Fujii & K. Okamoto, (1997) Extracellular secretion of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin I across the outer membrane. *J Bacteriol* **179**: 3383-3390.
- Yamanaka, H., T. Nomura, Y. Fujii & K. Okamoto, (1998) Need for TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein, in the secretion of heat-stable enterotoxin I across the outer membrane. *Microb Pathog* **25**: 111-120.
- Yamanaka, H. & K. Okamoto, (1996) Amino acid residues in the pro region of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin I that affect efficiency of translocation across the inner membrane. *Infect Immun* **64**: 2700-2708.
- Yuste, M., R. De La Fuente, J. A. Ruiz-Santa-Quiteria, D. Cid & J. A. Orden, (2006) Detection of the *astA* (EAST1) gene in attaching and effacing *Escherichia coli* from ruminants. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **53**: 75-77.
- Zemelman, B. V., S. H. Chu & W. A. Walker, (1989) Host response to *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin via two microvillus membrane receptors in the rat intestine. *Infect Immun* **57**: 2947-2952.
- Zhang, W., E. M. Berberov, J. Freeling, D. He, R. A. Moxley & D. H. Francis, (2006) Significance of heat-stable and heat-labile enterotoxins in porcine colibacillosis in an additive model for pathogenicity studies. *Infect Immun* **74**: 3107-3114.

- Zhang, W., M. Zhao, L. Ruesch, A. Omot & D. Francis, (2007) Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. *Vet Microbiol* **123**: 145-152.
- Zhao, L., X. Chen, X. Xu, G. Song & X. Liu, (2009) Analysis of the AIDA-I gene sequence and prevalence in *Escherichia coli* isolates from pigs with post-weaning diarrhoea and oedema disease. *Vet J* **180**: 124-129.
- Zhou, Z., J. Ogasawara, Y. Nishikawa, Y. Seto, A. Helander, A. Hase, N. Iritani, H. Nakamura, K. Arikawa, A. Kai, Y. Kamata, H. Hoshi & K. Haruki, (2002) An outbreak of gastroenteritis in Osaka, Japan due to *Escherichia coli* serogroup O166:H15 that had a coding gene for enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1). *Epidemiol Infect* **128**: 363-371.