

Signaux moléculaires induisant l'entrée des bactéries entéropathogènes dans les cellules épithéliales : convergences et paradoxes

Robert Ménard
Philippe Sansonetti

Les bactéries entéropathogènes des genres *Shigella*, *Salmonella* et *Yersinia* ont en commun la capacité de franchir la barrière intestinale. Dans les modèles de cellules épithéliales en culture, elles induisent d'importantes modifications structurales des cellules et peuvent toutes détourner les fonctions du cytosquelette de la cellule au profit de leur entrée. Cependant, malgré d'évidentes analogies phénotypiques dont rendent compte de nombreuses homologies retrouvées parmi les gènes impliqués dans l'invasion des cellules, il existe des différences de stratégie que reflète la diversité physiopathologique des infections causées par ces pathogènes. Pour chacune d'elles est ici présenté l'état des connaissances sur les bases cellulaires et moléculaires de la relation hôte-pathogène, en analysant les signaux cellulaires transduits et leurs effecteurs bactériens.

ADRESSE

R. Ménard : docteur en médecine, ancien interne des hôpitaux de Paris, actuellement boursier EMBO, department of pathology, université de New York, États-Unis. Ph. Sansonetti : docteur en médecine, professeur à l'Institut Pasteur. Unité de pathogénie microbienne moléculaire, Inserm U. 389, Institut Pasteur, 28, rue du Dr-Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.

TIRÉS À PART

Ph. Sansonetti.

m/s n° 4, vol. 12, avril 96

Les bactéries des genres *Shigella*, *Salmonella* et des espèces entéropathogènes de *Yersinia* sont responsables de maladies envahissant l'intestin chez l'homme. Elles ont en commun de franchir la barrière intestinale essentiellement *via* les cellules M [1-5], cellules spécialisées de l'épithélium qui recouvrent les structures lymphoïdes de la muqueuse. En revanche, leur devenir dans la barrière et leur pouvoir pathogène sur les cellules de l'hôte les opposent nettement (figure 1). *Shigella*, qui provoque un syndrome dysentérique, entraîne des destructions majeures de la mu-

queuse colo-rectale. Les cellules épithéliales ou des organes lymphoïdes de la muqueuse sont les cibles électives de ces pathogènes qui ne disséminent qu'exceptionnellement au-delà de la muqueuse. A l'inverse, *Salmonella typhi* et les salmonelles paratyphiques, responsables des fièvres typhoïdes et paratyphoïdes, les nombreux sérotypes de salmonelles responsables chez l'homme de gastro-entérites d'origine alimentaire (dont *S. typhimurium*) et les souches de *Yersinia* responsables surtout d'adénites mésentériques (*Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica*) traversent la barrière intestinale au niveau de l'iléon pour

RÉFÉRENCES

1. Perdomo JJ, Cavaillon JM, Huerre M, Ohayon H, Gounon P, Sansonetti PJ. Acute inflammation causes epithelial invasion and mucosal destruction in experimental shigellosis. *J Exp Med* 1994; 180: 1307-19.
2. Sansonetti P. Stratégie d'infection des cellules épithéliales par les bactéries invasives, étude du modèle *Shigella*. *médecine/sciences* 1990; suppl 7: 40-6.
3. Jones BD, Ghori N, Falkow S. *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J Exp Med* 1994; 180: 15-23.
4. Grützka A, Hanski C, Hahn H, Riecken EO. Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches: a common mechanism shared by *Yersinia enterocolitica* and other enteroinvasive bacteria. *Gut* 1990; 31: 1011-5.
5. Cornélis G. Le plasmide pW, élément clé de la virulence des *Yersinia*. *médecine/sciences* 1995; 11: 1295-304.
6. Clerc P, Sansonetti PJ. Entry of *Shigella flexneri* into HeLa cells: evidence for directed phagocytosis involving actin polymerization and myosin accumulation. *Infect Immun* 1987; 55: 2681-8.
7. Adam T, Arpin M, Prévost MC, Gounon P, Sansonetti PJ. Cytoskeletal rearrangements and functional role of T-plastin during entry of *Shigella flexneri* into HeLa cells. *J Cell Biol* 1995; 129: 367-81.
8. Dehio C, Prévost MC, Sansonetti PJ. Invasion of epithelial cells by *Shigella flexneri* induces tyrosine phosphorylation of cortactin by a pp60^{src} mediated signalling pathway. *EMBO J* 1995; 14: 2471-82.
9. Wu H, Parsons JT. Cortactin, an 80/85-kilodalton pp60^{src} substrate, is a filamentous actin-binding protein enriched in the cell cortex. *J Cell Biol* 1993; 120: 1417-26.
10. Ridley AJ, Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 1992; 70: 389-99.

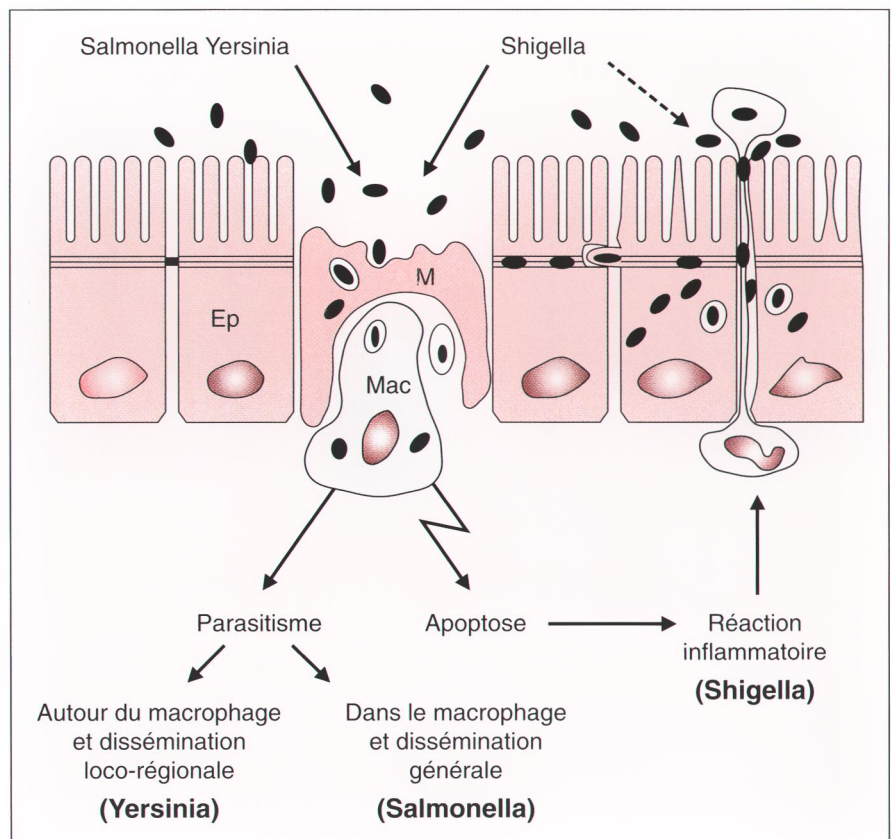


Figure 1. Physiopathologie comparée des infections à *Shigella*, *Yersinia* et *Salmonella*. *Shigella*, *Yersinia* et *Salmonella* pénètrent la barrière intestinale via les cellules M (M), dont le rôle est d'assurer le transfert de particules ou de micro-organismes de la lumière digestive vers les cellules lymphoïdes sous-jacentes. Une partie du pouvoir pathogène des bactéries invasives est de permettre l'attachement spécifique et de faciliter l'entrée dans les cellules M naturellement permmissives. Après franchissement de la cellule M, l'interaction avec les macrophages (Mac) du follicule lymphoïde est un véritable carrefour physiopathologique. Une partie essentielle du pouvoir pathogène de *Salmonella* et de *Yersinia*, qui envahissent modérément les cellules épithéliales (Ep), est leur potentiel de survie dans ou autour des phagocytes professionnels [50]. A l'inverse, *Shigella* pénètre dans le macrophage et induit rapidement son apoptose [51], ce qui entraîne le recrutement de polynucléaires (PN) sur le site d'infection. L'intense réaction inflammatoire, et notamment la transmigration de PN entre les entérocytes, permet l'entrée de bactéries luminales par la face basolatérale des cellules et est en grande partie responsable des lésions de la muqueuse [1].

s'établir à distance. Ces bactéries envahissent modérément les cellules épithéliales de la muqueuse intestinale et échappent surtout à l'activité antibactérienne des macrophages associés aux structures folliculaires des sites d'entrée. En adhérant à (*Yersinia*), ou en survivant dans (*Salmonella*) les cellules phagocytaires, elles migrent vers les ganglions mésenté-

riques et éventuellement les organes à distance. Toutes ces bactéries entraînent aussi des modifications structurales des cellules épithéliales en culture et peuvent se retrouver en position intracellulaire, dans des vacuoles ou au contact du cytoplasme. Nous exposons ici les bases moléculaires du pouvoir pathogène de ces bactéries sur les cellules en culture.

Shigella : une entrée par macropinocytose

Les cellules HeLa en culture constituent le modèle d'étude *in vitro* de la virulence de *Shigella* le plus fréquemment utilisé. Elles permettent de définir et de caractériser les phénotypes majeurs de virulence de la bactérie, comme l'entrée dans la cellule et le mouvement intracellulaire. Cependant, cultivées à confluence, ces cellules épithéliales non intestinales n'établissent pas les relations intercellulaires des cellules différenciées d'un épithélium colique; elles ne permettent donc pas une étude fine de l'interaction entre la bactérie et l'épithélium qui nécessite, outre les modèles animaux d'infection, l'utilisation de systèmes complexes comportant plusieurs populations cellulaires, et notamment des cellules épithéliales polarisées et jointives. Ces systèmes ne seront pas envisagés ici.

Dans les cellules HeLa, l'entrée de *Shigella* survient surtout au niveau des plaques d'adhérence focale [6], structures dans lesquelles des filaments d'actine et des protéines liant l'actine s'associent à des composants de la matrice extracellulaire par l'intermédiaire des intégrines. Après adhérence, *Shigella* induit localement d'importantes modifications de la surface cellulaire, comparables à celles induites par les facteurs de croissance ou les agents mitogènes [7]. Des projections cellulaires émergent autour de la bactérie et fusionnent à distance pour englober une ou plusieurs bactéries dans des vacuoles de macropinocytose. Les remaniements de la surface cellulaire sont sous-tendus par des filaments d'actine orientés en faisceaux parallèles et polymérisés à partir de foyers de nucléation d'actine qui apparaissent précocement sous la zone d'interaction bactérie-cellule. La plastine, protéine permettant la compaction de filaments d'actine, est présente dans ces projections et son rôle essentiel dans l'entrée de *Shigella* a été montré par l'expression transitoire de mutants dominants négatifs pour cette protéine. L'entrée de *Shigella* s'accompagne aussi de la phosphorylation de résidus tyrosine d'une protéine majoritaire, la cortactine, qui se concentre dans les projections [8].

Cette protéine qui s'associe à l'actine filamenteuse et en particulier aux structures dynamiques du cytosquelette sous-cortical [9], pourrait lier les filaments à la membrane plasmique.

Les petites protéines liant le GTP de type Rho et la protéine pp60^{c-src} (Src) sont à ce jour les seuls intervenants connus dans la cascade de signalisation aboutissant aux réarrangements du cytosquelette. Les petites GTPases Rho (A, B et C) sont impliquées dans la formation de structures complexes du cytosquelette comme les fibres de tension, les plaques d'adhérence focales ou les projections membranaires [10-12]. Lors de l'entrée de *Shigella* dans les cellules HeLa, RhoB et RhoC s'accumulent à l'extrémité des projections induites par les bactéries, alors que RhoA s'accumule autour des bactéries en cours d'internalisation [13]. De plus, un inhibiteur spécifique de Rho, la toxine C3 de *Clostridium botulinum*, empêche la formation des projections induites par *Shigella* et abolit l'entrée des bactéries. La toxine C3 n'empêche pas l'apparition précoce des points de nucléation d'actine, ce qui suggère que les protéines Rho n'interviennent que secondairement dans l'extension des foyers de nucléation en des projections contenant de longs filaments polymérisés. La protéine Src, membre de la famille des tyrosine kinases membranaires sans domaine récepteur, pourrait être parmi les cibles premières de la bactérie. La protéine Src, qui se concentre dans les plaques d'adhérence et intervient en particulier lors de la croissance et de la différenciation cellulaires [14], est activée et recrutée autour de *Shigella* en cours d'internalisation et assure la phosphorylation de la cortactine [8]. La surexpression transitoire de Src dans les cellules HeLa entraîne la formation de projections diffuses et provoque l'internalisation de souches non invasives de *Shigella*. Bien que n'ayant pas encore reçu de démonstration directe, le rôle de Src dans l'entrée de *Shigella* est donc probable.

RÉFÉRENCES

11. Nishiyama T, Sasaki T, Takaishi K, Kato M, Hideaki Y, Araki K, Matsuura Y, Takai Y. *racp21* is involved in insulin-induced membrane ruffling and *rhop21* is involved in hepatocyte growth factor- and 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced membrane ruffling in KB cells. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 2447-56.
12. Zalman G, Closson V, Honoré N, Olofsson B, Tavittian A. Participation de la cascade des gènes *Rho* à la régulation du cytosquelette: rôle possible dans les mécanismes d'oncogénèse. *médecine/sciences* 1995; 11: 1551-6.
13. Adam T, Giry M, Boquet P, Sansonetti PJ. Rho-dependent ruffling causes *Shigella* entry into epithelial cells. *EMBO J* 1996 (sous presse).
14. Pawson T, Schlessinger J. SH2 and SH3 domains. *Curr Biol* 1993; 3: 434-42.
15. Maurelli AT, Baudry B, d'Hauteville H, Hale TL, Sansonetti PJ. Cloning of plasmid DNA sequences involved in invasion of HeLa cells by *Shigella flexneri*. *Infect Immun* 1985; 49: 164-71.
16. Sasakawa C, Makino S, Kamata K, Yoshikawa M. Isolation, characterization, and mapping of Tn5 insertions into the 140-Megadalton invasion plasmid defective in the mouse Sereny test in *Shigella flexneri* 2a. *Infect Immun* 1986; 54: 32-6.
17. Parsot C. *Shigella flexneri*: genetics of entry and intercellular dissemination in epithelial cells. *Curr Topics Microbiol Immunol* 1994; 192: 217-41.
18. Ménard R, Sansonetti P, Parsot C, Vasselton T. Extracellular association and cytoplasmic partitioning of the IpaB and IpaC invasins of *S. flexneri*. *Cell* 1994; 79: 515-25.
19. Ménard R, Sansonetti P, Parsot C. The secretion of the *Shigella flexneri* Ipa invasins is induced by epithelial cells and controlled by IpaB and IpaD. *EMBO J* 1994; 13: 5293-302.

Shigella : une entrée induite par une toxine

L'étude des bases génétiques de l'entrée de *S. flexneri* dans les cellules a montré qu'une région de 31 kb d'un grand plasmide retrouvé chez les quatre espèces de *Shigella* est suffisante pour conférer l'entrée dans les cellules [15, 16]. Cette région contient plus de trente gènes, dont presque tous ont été étudiés par mutagenèse dirigée [17]. Les protéines codées par cette région et essentielles à l'induction des remaniements du cytosquelette sont les protéines IpgC, IpaB, IpaC, IpaD et les produits d'un appareil de sécrétion, appelé translocon Mxi-Spa, qui permet la sécrétion des trois protéines Ipa dans le milieu de culture (figure 2) [5]. IpgC est un chaperon cytoplasmique qui s'associe à chacune des protéines IpaB et IpaC dans le cytoplasme, assure leur stabilité et empêche leur association [18]. Chez les bactéries cultivées *in vitro*, l'activité de sécrétion des Ipa est faible et celles-ci s'accumulent dans le cytoplasme bactérien.

Lorsque la bactérie est au contact de la cellule, les protéines Ipa sont massivement libérées dans l'environnement [19]. IpaB et IpaC, mais pas IpaD, s'associent alors dans un complexe soluble qui semble rendre compte de tous les événements cellulaires associés à l'entrée de *Shigella* [20]. Comme les bactéries invasives, des billes de latex portant ce complexe sont rapidement internalisées dans les cellules en culture au sein de projections membranaires et entraînent des réarrangements du réseau d'actine sous-jacent impliquant les petites protéines Rho. Le mode d'action du complexe d'invasion est encore inconnu. IpaB possède deux régions hydrophobes semblables à certains domaines des α -hémolysines et des leucotoxines de la famille RTX, molécules formant des pores dans les membranes de nombreux types de cellules nucléées [21]. IpaB pourrait donc s'insérer dans la membrane de la cellule cible. La seule formation d'un pore, à laquelle pourrait contribuer IpaC, pourrait induire un flux entrant/flux sortant d'ions à l'origine de la cascade de transmission du signal aboutissant à la polymérisation d'actine. L'insertion de

IpaB dans la membrane pourrait, au contraire, permettre la translocation d'un effecteur final, comme IpaC, agissant sur une cible localisée dans le cytosol de la cellule et activant la polymérisation d'actine.

Salmonella, une stratégie d'entrée proche de celle de Shigella

Comme *Shigella*, *Salmonella* est internalisée dans les cellules épithéliales en culture au sein de projections membranaires sous-tendues par une importante filamentation d'actine et une accumulation de protéines liant l'actine [22]. Sur le plan morphologique, rien ne semble distinguer le processus d'entrée de *Shigella* et de *Salmonella*. En revanche, les signaux induits par ces deux types de bactéries sont différents.

Les premiers travaux sur la transmission du signal induit par *Salmonella* ont montré que l'invasion des cellules Henle-407 par *S. typhimurium* provoquait la phosphorylation de résidus tyrosine d'un certain nombre de protéines, dont le récepteur de l'EGF (*epidermal growth factor*) [23]. L'activation de ce récepteur aboutit normalement à la stimulation de son activité tyrosine kinase, essentielle aux réponses cellulaires au facteur de croissance, notamment la survenue de projections cellulaires et la réorganisation des microfilaments d'actine [24]. Les voies de signalisation induites par *S. typhimurium* et l'EGF dans les cellules Henle-407, de même que le profil des protéines phosphorylées semblent identiques : dans les deux cas on observe une augmentation rapide de la concentration de Ca^{2+} libre intracellulaire ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) par flux entrant de Ca^{2+} extracellulaire [25, 26] (figure 3). Pourtant, le récepteur de l'EGF n'est pas la porte d'entrée exclusive de *S. typhimurium*, puisque celle-ci peut entrer dans des cellules n'exprimant pas le récepteur de l'EGF [27]. Il semble même que les voies d'activation contrôlées par les petites GTPases Rac (qui contrôlent en particulier le récepteur de l'EGF) ou Rho ne soient pas nécessaires à l'entrée et à la formation des projections induites par *Salmonella*. Il a donc été suggéré que les effecteurs de l'entrée de *Salmonella* pourraient reconnaître des déterminants com-

RÉFÉRENCES

20. Ménard R, Prévost MC, Gounon P, Sansonetti PJ, Dehio D. The secreted Ipa complex of *Shigella flexneri* promotes entry into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 (sous presse).
21. Braun V, Schönherr R, Hobbie S. Enterobacterial hemolysins: activation, secretion and pore formation. *Trends Microbiol* 1993; 1: 211-6.
22. Francis CL, Ryan TA, Jones BD, Smith SJ, Falkow S. Ruffles induced by *Salmonella* and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria. *Nature* 1993; 364: 639-42.
23. Galan JE, Pace J, Hayman MJ. Involvement of the epidermal growth factor receptor in the invasion of cultured mammalian cells by *Salmonella typhimurium*. *Nature* 1992; 357: 588-9.
24. Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990; 61: 203-12.
25. Pace J, Hayman MJ, Galan JE. Signal transduction and invasion of epithelial cells by *S. typhimurium*. *Cell* 1993; 72: 505-14.
26. Peppelenbosch MP, Tertoolen LGJ, den Hertog J, de Laat SW. Epidermal growth factor activates calcium channels by phospholipase $A_2/5$ -lipoxygenase-mediated leukotriene C_4 production. *Cell* 1992; 69: 295-303.
27. Jones BD, Paterson HF, Hall A, Falkow S. *Salmonella typhimurium* induces membrane ruffling by a growth factor-receptor-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10390-4.
28. Galan JE. *Salmonella* entry into mammalian cells: different yet converging signal transduction pathways? *Trends Cell Biol* 1994; 4: 196-9.
29. Ruschkowski S, Rosenshine I, Finlay BB. *Salmonella typhimurium* induces an inositol phosphate flux in infected epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett* 1992; 74: 121-6.
30. Clerc P, Berthon B, Claret M, Sansonetti PJ. Internalization of *Shigella flexneri* into HeLa cells occurs without an increase in cytosolic Ca^{2+} concentration. *Infect Immun* 1989; 57: 2919-22.
31. Groisman EA, Ochman H. Cognate gene clusters govern invasion of host epithelial cells by *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri*. *EMBO J* 1993; 12: 3779-87.

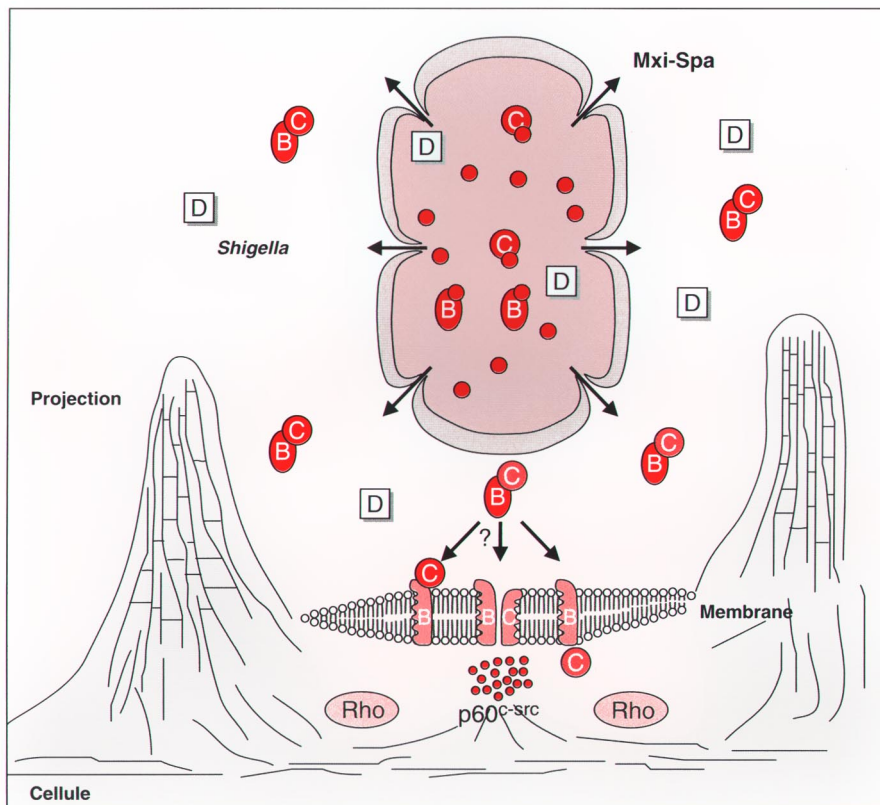


Figure 2. **Modèle d'interaction Shigella-cellule.** Le système d'entrée de Shigella dans les cellules épithéliales comporte un appareil de sécrétion, le translocon Mxi-Spa, et les quatre protéines IpgC (●), IpaB (B), IpaC (C), et IpaD (D). Shigella pénètre dans la cellule après sécrétion induite par la cellule cible des protéines IpaB et IpaC, qui s'associent en un complexe qui induit la formation de projections membranaires. La libération de IpaB et IpaC est modulée par deux protéines «intermédiaires» : IpgC, agissant dans le cytoplasme bactérien pour permettre l'accumulation et la partition des sous-unités du complexe, et IpaD, agissant dans l'appareil de sécrétion spécifique pour assurer leur rétention en l'absence de la cellule cible. Le mode d'action du complexe est inconnu, mais il est probable que IpaB s'insère dans les membranes de la cellule cible pour y former un pore. IpaC pourrait masquer les régions hydrophobes de IpaB avant son interaction avec la membrane, ou s'insérer comme IpaB dans la membrane, ou être transloquée par IpaB et agir sur une cible cytoplasmique. Du côté de la cellule, l'entrée de Shigella induit en particulier le recrutement de petites GTPases de type Rho, nécessaires à l'extension des projections membranaires, et le recrutement sous-membranaire et juxta-bactérien et l'activation de Src. L'hypothèse actuelle est que l'événement initial serait l'induction, au contact de la bactérie, d'une accumulation transmembranaire de pp60^{src}. Celle-ci pourrait être directement responsable de la formation des projections membranaires, après recrutement et activation d'autres protéines de transmission du signal ou du cytosquelette.

muns à une variété de récepteurs, dont le récepteur de l'EGF, qui stimuleraient des voies de signalisation variables avec la lignée cellulaire et le type de récepteur impliqués [28]. Dans les cellules HeLa par exemple, la voie de transmission du signal induit par *Salmonella* est différente de celle observée dans les cellules Henle-407. *Salmonella* y provoque une augmentation de la concentration d'inositol triphosphate, probablement par activation de la phospholipase C γ , toutes deux nécessaires à l'internalisation des bactéries ainsi qu'à l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ par libération de stocks intracellulaires de Ca^{2+} [29].

Quelles que soient les lignées cellulaires utilisées, l'augmentation locale de la $[Ca^{2+}]_i$, connue pour régler les fonctions de diverses protéines associées au cytosquelette et entraîner une dépolymérisation rapide d'actine, semble être nécessaire à la formation des projections cellulaires par *Salmonella*. A l'inverse, aucune variation de la $[Ca^{2+}]_i$ n'a été observée après l'entrée de *Shigella* dans les cellules HeLa [30].

La majorité des travaux génétiques sur l'entrée de *Salmonella* dans les cellules ont concerné *S. typhimurium*. Tous les gènes d'entrée de cette bactérie décrits à ce jour couvrent une région chromosomique d'environ 40 kb [4]. La plupart d'entre eux ont un homologue dans la région d'entrée du grand plasmide de *Shigella*. Notamment, les gènes nommés *inv* et *spa* sont analogues des gènes *mxi* et *spa* de *S. flexneri* et ont la même organisation [31]; ils permettent aussi la sécrétion des protéines effectrices de l'entrée. Quatre gènes appelés *sip*, récemment identifiés chez *S. typhi* et *S. typhimurium*, sont analogues des gènes *ipgC-ipaB-C-D* de *Shigella* et ont une organisation identique [32]. L'ensemble des gènes nécessaires, et probablement suffisants, à l'entrée de *Shigella* sont donc conservés chez *Salmonella*.

Yersinia : modulation entre entrée et résistance à la phagocytose

Dans les modèles *in vitro*, la première étape de l'interaction *Yersinia*-cellule est une adhérence intime. Le pathogène peut alors rester attaché à la

RÉFÉRENCES

32. Hermant D, Ménard R, Arricau N, Par-sot C, Popoff MY. Functional conservation of the *Salmonella* and *Shigella* effectors of entry into epithelial cells. *Mol Microbiol* 1995; 17: 781-9.
33. Falkow S. Bacterial entry into eukaryotic cells. *Cell* 1991; 65: 1099-102.
34. Isberg RR, Falkow S. A single genetic locus encoded by *Yersinia pseudotuberculosis* permits invasion of cultured animal cells by *Escherichia coli* K-12. *Nature* 1985; 317: 262-4.
35. Isberg RR, Tran Van Nhieu G. Binding and internalization of microorganisms by integrin receptors. *Trends Microbiol* 1994; 2: 10-4.
36. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69: 11-25.
37. Burridge K, Turner CE, Romer LH. Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125^{FAK} accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly. *J Cell Biol* 1992; 119: 893-903.
38. Isberg RR. Discrimination between intracellular uptake and surface adhesion of bacterial pathogens. *Science* 1991; 252: 934-8.
39. Simonet M, Richard S, Berche P. Electron microscopic evidence for *in vivo* extracellular localization of *Yersinia pseudotuberculosis* harboring the pYV plasmid. *Infect Immun* 1990; 58: 841-5.
40. Guan K, Dixon JE. Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*. *Science* 1990; 249: 553-6.
41. Rosqvist R, Forsberg A, Wolf-Watz H. Intracellular targeting of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. *Infect Immun* 1991; 59: 4562-9.
42. Michiels T, Vanootehem JC, Lambert de Rouvoit C, China B, Gustin B, Boudry P, Cornelis GR. Analysis of *virC*, an operon involved in the secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* 1991; 173: 4994-5009.

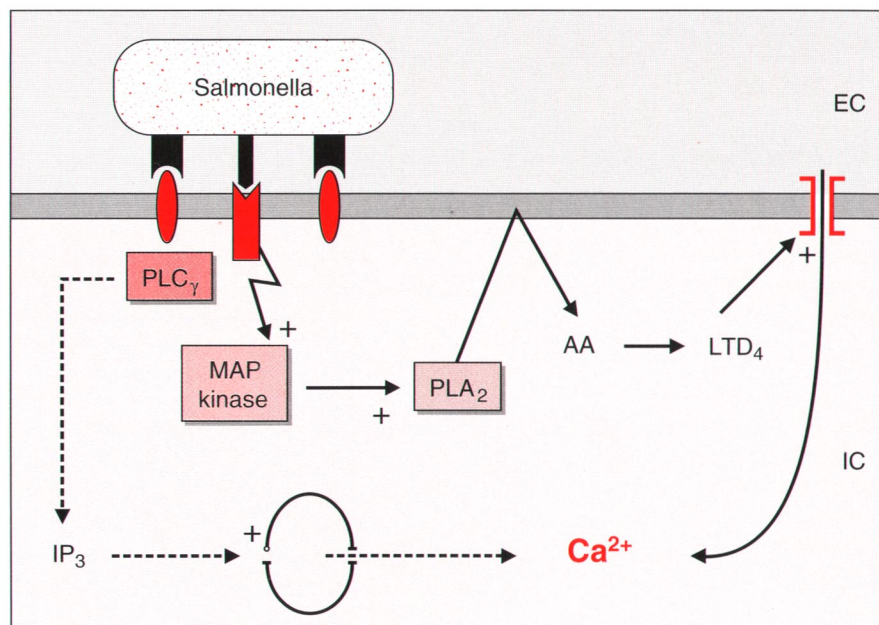


Figure 3. Modèle de signalisation induite par *S. typhimurium*. Quelle que soit la lignée cellulaire utilisée, une augmentation locale de la $[Ca^{2+}]_i$ est observée après l'interaction hôte-pathogène. Les événements aboutissant à l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ semblent dépendre de la lignée cellulaire et probablement du récepteur stimulé par la bactérie. Dans les cellules Henle-407 (traits pleins), *S. typhimurium* stimulerait le récepteur de l'EGF (epidermal growth factor) et entraînerait un flux entrant de Ca^{2+} extracellulaire comparable à celui obtenu après traitement des cellules par l'EGF et par une voie d'activation semblable. Celle-ci ferait intervenir la MAP kinase (mitogen activated protein kinase), dont les résidus tyrosine sont phosphorylés après contact bactérien, et qui activerait alors la PLA_2 (phospholipase A_2). Cette activation entraînerait la production d'AA (acide arachidonique) à partir de phospholipides membranaires qui seraient convertis par la voie de la 5-lipoxygénase en un certain nombre de métabolites dont le LTD_4 (leucotriène D_4). Celui-ci permettrait alors un flux entrant de Ca^{2+} à partir de l'extérieur de la cellule. Dans les cellules HeLa (traits en pointillé), la voie de signalisation induite par *S. typhimurium* impliquerait la libération de Ca^{2+} à partir de stocks intracellulaires, induite par l'activation de la $PLC\gamma$ (phospholipase $C\gamma$) et la production d' IP_3 (inositol trisphosphate). EC : milieu extracellulaire; IC: milieu intracellulaire.

surface de la cellule ou pénétrer dans la cellule. L'entrée de *Yersinia*, à la différence de celle de *Shigella* ou de *Salmonella*, ne nécessite pas une participation active du pathogène et n'entraîne pas la formation de projections cellulaires. Quelques minutes après le début de l'interaction, des modifications importantes de l'architecture du cytosquelette et de la forme de la cellule sont observées : progressivement, la cellule infectée s'arrondit et se détache de la matrice extracellulaire.

Trois protéines de *Yersinia* suffisent individuellement à permettre l'entrée dans les cellules en culture à une souche de *E. coli* de laboratoire [33]. La plus efficace est l'invasine (Inv), protéine de membrane externe se liant avec une forte affinité aux intégrines à chaîne $\beta 1$ de la cellule hôte [34, 35], qui lient normalement diverses protéines de la matrice extracellulaire. Une des fonctions des intégrines est de convertir les signaux extracellulaires transmis par l'adhérence d'un ligand en une

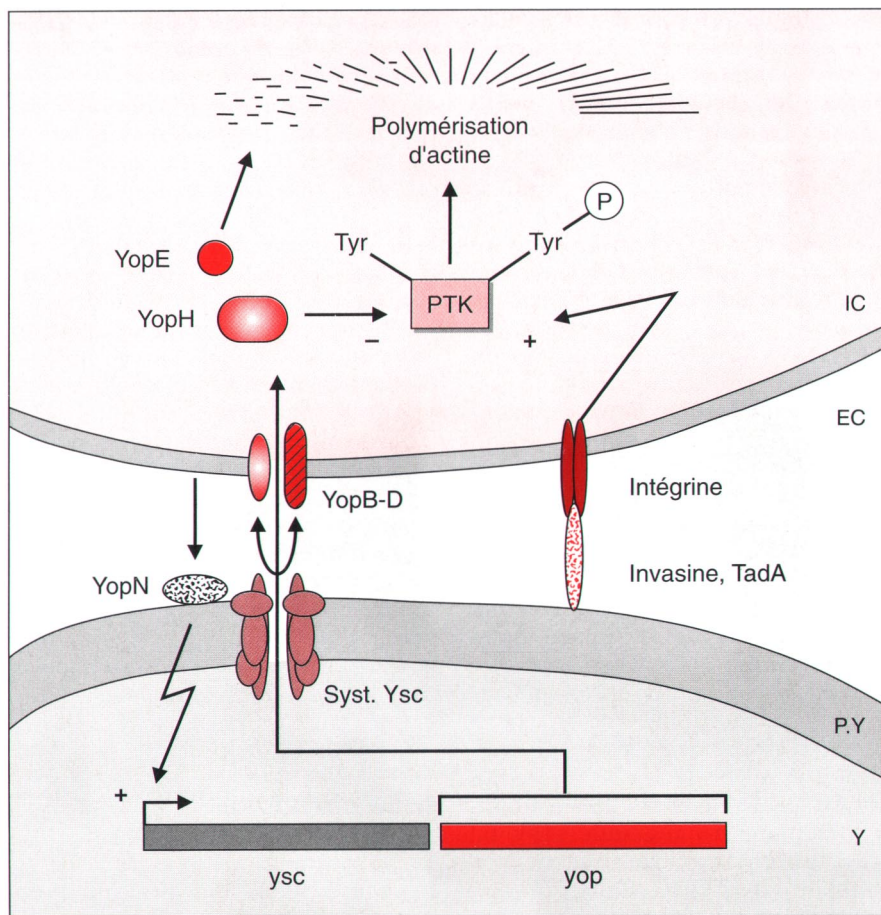


Figure 4. Modèle d'interaction *Yersinia*-cellule. *Yersinia* recouverte d'invasine s'attache aux intégrines de la surface cellulaire. La forte affinité de l'interaction invasine-intégrine permet de rompre l'association préalable intégrine-ligand de la matrice extracellulaire, en particulier la fibronectine. Si le nombre de récepteurs disponibles est suffisant, une interaction séquentielle survient et la bactérie est progressivement englobée grâce à la polymérisation d'actine induite via la phosphorylation de PTK (partie droite du schéma). Le contact *Yersinia*-cellule déclenche aussi la synthèse des protéines Yop et de leurs systèmes de sécrétion Ysc (syst. Ysc). YopN, protéine localisée à la surface des bactéries, serait le détecteur du contact avec la cellule qui met en route l'activation de la transcription des autres gènes yop et ysc ainsi que le transfert polarisé des Yop. YopB et YopD formeraient un complexe de translocation, dans le cytoplasme de la cellule, des toxines à cible intracellulaire, comme YopH et YopE. Celles-ci s'opposent à l'entrée de la bactérie, YopH en inhibant les PTK par déphosphorylation des résidus Tyr-P et YopE en dépolymérisant les filaments d'actine (partie gauche du schéma). L'inféctiosité de *Yersinia* au cours de l'infection pourrait ainsi être modulée, en fonction de la prépondérance du système d'adhérence aux intégrines ou de celui de translocation des protéines Yop, entre attachement et entrée dans la cellule. L'invasine, produite à température ambiante, semble jouer un rôle majeur à un niveau précoce de l'infection en augmentant l'adhérence et l'efficacité d'entrée dans les cellules M [52]. A un stade plus tardif et dans les tissus, le système Yop devient prépondérant et empêche l'internalisation dans les phagocytes professionnels. EC: milieu extracellulaire; IC: milieu intracellulaire; PY: paroi bactérienne.

réponse du cytosquelette [36]. Le mécanisme par lequel l'intégrine transmet le signal est inconnu, mais on connaît diverses modifications cellulaires associées à la stimulation des intégrines, comme la phosphorylation de résidus tyrosine de la PTK pp125^{FAK} et de la paxilline [37], toutes deux localisées dans les plaques d'adhérence focales. La phosphorylation de résidus tyrosine de protéines cellulaires survient aussi lorsque les intégrines sont activées par leur liaison à l'invasine. Les interactions intégrine-invasine successives induiraient, *via* la phosphorylation de PTK, la polymérisation d'actine sous-jacente nécessaire à l'englobement progressif (en « fermeture éclair ») de la bactérie [38].

En marge des nombreux travaux réalisés depuis 10 ans sur l'invasine (*m/s n° 10, vol. 3, p. 626*), protéine définissant le paradigme d'entrée d'une bactérie dans une cellule phagocytaire non professionnelle, les données anatomo-pathologiques se sont paradoxalement accumulées en faveur de la position majoritairement extracellulaire de *Yersinia* [39]. Les travaux portant sur les autres facteurs de virulence de *Yersinia* ont indirectement montré que l'invasine, qui permet l'entrée quand elle est exprimée seule chez *E. coli*, agit probablement en tant qu'adhésine chez les souches entéropathogènes de *Yersinia*. Ces souches produisent en effet une dizaine de protéines codées par un plasmide de virulence appelées Yop qui sont nécessaires à la virulence dans les modèles animaux et sont responsables des remaniements de l'architecture des cellules en culture [5]. Les protéines Yop interfèrent avec les signaux contrôlant l'architecture du cytosquelette de la cellule et induisent un signal qui s'oppose à celui induit par l'invasine (*figure 4*). Les mieux connues sont YopH et YopE. YopH possède une activité tyrosine-phosphatase nécessaire à la déphosphorylation rapide de résidus tyrosine phosphorylés de protéines de cellules infectées par *Yersinia* [40]. Le domaine C-terminal de YopH est analogue au domaine catalytique des protéines tyrosine phosphatases (PTPases) eucaryotes et il est probable que YopH s'oppose aux signaux de phagocytose en déphosphorylant les PTK activées. La protéi-

RÉFÉRENCES

43. Bergman T, Erickson K, Galyov E, Persson C, Wolf-Watz H. The *lcrB* (*yscN/U*) gene cluster of *Yersinia pseudotuberculosis* is involved in Yop secretion and shows high homology to the *spa* gene clusters of *Shigella flexneri* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 1994; 176: 2619-26.
44. Hakansson S, Bergman T, Vanooteghem JC, Cornelis G, Wolf-Watz H. YopB and YopD constitute a novel class of *Yersinia* Yop proteins. *Infect Immun* 1993; 61: 71-80.
45. Wattiau P, Bernier B, Deslée P, Michiels T, Cornelis GR. Individual chaperones required for Yop secretion by *Yersinia*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 10493-7.
46. Van Gijsegem F, Genin S, Boucher C. Conservation of secretion pathways for pathogenicity determinants of plant and animal bacteria. *Trends Microbiol* 1993; 1: 175-80.
47. Rosqvist R, Magnusson KE, Wolf-Watz H. Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells. *EMBO J* 1994; 13: 964-72.
48. Zychlinski A, Kenny B, Ménard R, Prévost MC, Holland IB, Sansonetti PJ. IpaB mediates macrophage apoptosis induced by *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* 1994; 11: 619-27.
49. Jonas D, Walev I, Berger T, Liebetrau M, Palmer M, Bhakdi S. Novel path to apoptosis: small transmembrane pores created by staphylococcal alpha-toxin in T lymphocytes evoke internucleosomal DNA degradation. *Infect Immun* 1994; 62: 1304-12.
50. Bliska JB, Galan JE, Falkow S. Signal transduction in the mammalian cell during bacterial attachment and entry. *Cell* 1993; 73: 903-20.
51. Zychlinsky A, Prévost MC, Sansonetti PJ. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature* 1992; 358: 167-9.
52. Pepe JC, Miller VL. *Yersinia enterocolitica* invasive: a primary role in the initiation of infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 6473-7.

ne YopE s'oppose aussi aux mécanismes de phagocytose de l'hôte. Elle est suffisante pour induire une dépolymérisation des filaments d'actine mais sa cible reste inconnue [41]. Les protéines Yop sont sécrétées dans le milieu de culture *via* un appareil de sécrétion appelé Ysc [5] dont la plupart des éléments sont conservés dans les systèmes Mxi-Spa de *Shigella* et Inv-Spa de *Salmonella* [42, 43]. Pourtant, les protéines Yop purifiées incubées avec les cellules restent sans effet, suggérant qu'elles doivent être transloquées à travers la membrane de la cellule pour atteindre leur cible cellulaire. Sur la base de données structurales et d'analyse de l'action de surnageants de divers mutants *yop*, les protéines YopB et YopD semblent chacune nécessaire à cette fonction de translocation à travers la membrane de la cellule [44]. Ces deux produits sont codés par l'opéron *syncD-yopB-yopD* qui présente des similitudes avec l'opéron *ipgC-ipaB-ipaC* de *Shigella*. La protéine SycD est homologue de IpgC et se lie à chacune des protéines YopB et YopD dans le cytoplasme bactérien pour empêcher leur dégradation [45]. YopB possède deux régions hydrophobes semblables à celles de IpaB. YopD, qui s'insère probablement elle aussi dans la membrane de la cellule [44], ne présente, en revanche, aucune ressemblance avec IpaC. Cette différence explique peut-être que le système SycD-YopB/D de *Yersinia* ait la seule fonction de translocation de molécules effectrices et que le système IpgC-IpaB/C de *Shigella* comporte à la fois l'effecteur final et son appareil de translocation.

Des systèmes de sécrétion proches mais adaptés à des stratégies distinctes

Shigella, *Salmonella* et *Yersinia* sont donc dotées de systèmes de virulence très conservés et possèdent en particulier un même type d'appareil de sécrétion des effecteurs dans l'environnement, probablement en une seule étape qui court-circuite le périplasme [46]. Sur les vingt protéines de l'appareil Mxi-Spa de *Shigella*, 17 ont un homologue dans l'appareil Inv-Spa de *Salmonella* et 13 dans l'ap-

pareil Ysc de *Yersinia*. Dans le cas de *Shigella* [18] et de *Yersinia* [47], et probablement aussi de *Salmonella*, l'activité du translocon est augmentée par le contact avec la cellule cible. Les bases moléculaires de la virulence sont en réalité très différentes dans les deux cas. La réponse de *Shigella* s'apparente à une vidange vers le milieu de protéines Ipa pré-synthétisées. Celle de *Yersinia* correspond au contraire à la mise en place de son système de virulence, comprenant l'activation de l'expression des gènes *yop* et le transfert polarisé de leur produit. Les Yop sont directement « injectées » dans le cytoplasme de la cellule, et non dans le milieu, probablement en raison de l'ouverture ou de l'assemblage spécifique des translocons aux seules zones d'attachement à la cellule. Bien que proches par leur structure, les translocons se sont donc adaptés aux stratégies d'infection : stockage des invasines et libération déclenchée par la cellule permettant une internalisation rapide pour *Shigella*, et induction de l'expression et transfert polarisé des protéines antiphagocytaires permettant une cytotoxicité au long cours pour *Yersinia*.

Le paradoxe *Shigella-Salmonella*

La conservation des effecteurs de l'entrée de *Shigella* et de *Salmonella*, les protéines Ipa et Sip, et la différence des signaux d'entrée de ces bactéries constituent aujourd'hui un paradoxe de taille. Alors que l'entrée de *Shigella* nécessite les petites protéines Rho mais pas d'élévation de la $[Ca^{2+}]_i$, la situation est inverse dans le cas de *Salmonella*. De plus, les protéines Ipa, et en particulier IpaB, sont impliquées dans l'apoptose du macrophage et dans la lyse de la membrane de la vacuole de phagocytose qui permet à *Shigella* de se retrouver libre dans le cytoplasme de la cellule [48], alors que *Salmonella* ne produit aucun de ces phénotypes. La différence de signalisation d'entrée induite par *Shigella* ou *Salmonella* pourrait être due à la spécificité différente d'un effecteur final, par exemple IpaC et SipC qui, bien que proches, possèdent des régions non conservées [31]. Elle pourrait, au contraire, être due à la différence de

concentration d'effecteurs aux fonctions identiques, formant par exemple des pores de diamètre plus ou moins grand. L'exemple de la toxine α du staphylocoque montre qu'une telle hypothèse est envisageable [49]. Une faible concentration de cette toxine induit la formation de pores de petite taille qui entraîne l'apoptose des lymphocytes T par un mécanisme mettant en jeu un flux entrant de Na^+ et un flux sortant de K^+ . A plus forte concentration, le diamètre des pores augmente, ce qui permet alors un flux entrant de Ca^{2+} mais n'induit plus l'apoptose. Une autre possibilité est que la différence de signalisation serait due à l'action supplémentaire d'autres facteurs chez l'une ou l'autre des bactéries, agissant en modulant l'action des protéines Ipa et/ou Sip, à la façon de l'entrée de *Yersinia* soumise aux effets contradictoires de l'invasine et des protéines Yop.

Conclusion

Bien qu'elles entraînent des remaniements cellulaires d'une nature différente, les bactéries des genres *Shigella*, *Salmonella* et *Yersinia* sont dotées d'appareils de virulence fonctionnant selon des schémas très proches, utilisés par *Shigella* et *Salmonella* pour pénétrer dans les cellules épithéliales et par *Yersinia* pour, au contraire, s'opposer à la phagocytose par le macrophage. Il est surprenant de constater que le système d'entrée potentiellement le plus simple, représenté par une interaction ligand bactérien de surface-récepteur cellulaire et dont l'exemple type est le couple invasine-intégrine β_1 , n'a pas été retenu par les bactéries réellement invasives comme *Shigella* et *Salmonella*.

Au plan physiopathologique, la translocation de la barrière intestinale semble pouvoir être réalisée par des systèmes effecteurs différents (Invasine de *Yersinia*, système d'invasion de *Shigella* et de *Salmonella*) qui, après adhérence des bactéries aux cellules M, aident au passage à travers ces cellules. L'interaction avec les cellules phagocytaires, en particulier avec les macrophages des dômes folliculaires, constitue le véritable carrefour qui va déterminer le profil

évolutif ultérieur de l'infection. *Yersinia* empêche son internalisation et survit à la surface du macrophage qu'elle utilise pour gagner les ganglions mésentériques, *Salmonella* pénètre et survit dans le macrophage pour infecter le parenchyme d'organes à distance, notamment le foie et la rate, et *Shigella* détruit le macrophage et provoque une réaction inflammatoire locale permettant une infection entérocytaire massive (figure 1).

Au plan moléculaire, il apparaît que les altérations cellulaires, et probablement aussi les maladies, causées par ces bactéries entéropathogènes sont déterminées par la combinaison de modules de virulence conservés. Cet effet spectaculaire de l'évolution ne devrait pas manquer d'inspirer les travaux futurs sur l'interface hôte-pathogène, qui tenteront de comparer ces différents systèmes de virulence par des approches de complémentation hétérologue et de construction de molécules hybrides. Cela devrait aboutir non seulement à une meilleure compréhension des processus de virulence des bactéries entéropathogènes mais aussi à la multiplication des outils d'étude des circuits de signalisation des cellules eucaryotes ■

Summary

Molecular signals triggering entry of enteroinvasive bacteria into eucaryotic cells: convergences and paradoxes

Enteropathogenic bacteria belonging to the genus *Shigella*, *Salmonella*, and *Yersinia* share a common capacity to cross the intestinal barrier. In *in vitro* models using epithelial cells grown in tissue culture dish, these bacteria induce major structural modifications of cells and are all capable of diverting cytoskeletal functions to the benefit of their entry. However, despite obvious phenotypical analogies that are reflected in the numerous homologies existing among the genes involved in cellular invasion, differences in strategies also exist which are reflected in the physiological diversity of infections caused by these pathogens. For each of them, the state of the art in our knowledge of the molecular and cellular bases of the host-pathogen relationship is presented. The cellular signals transduced as well as their bacterial effectors are considered.