

Toxines bactériennes : facteurs de virulence et outils de biologie cellulaire

**Antoine Galmiche
Patrice Boquet**

De nombreuses bactéries rencontrées en pathologie humaine produisent des toxines protéiques. L'étude du mode d'action de ces molécules possède un double intérêt. Elle s'intègre d'abord à l'étude des interactions entre les bactéries et leur hôte. Par ailleurs, les toxines constituent des exemples spectaculaires de détournement du fonctionnement des cellules eucaryotes au profit des bactéries. En mettant à jour ces mécanismes, l'étude de ces protéines a permis la découverte de nouvelles activités utilisables dans l'étude des fonctions cellulaires. Ces activités sont particulièrement intéressantes du fait de leur étroite spécificité de cible. Par exemple, les toxines bactériennes ont permis de démontrer l'implication des protéines G de la famille Rho dans l'organisation du cytosquelette d'actine, et d'étudier celle des SNARE dans le contrôle du trafic vésiculaire. L'étude de ces molécules toxiques offre ensuite un modèle d'adressage cellulaire spécifique. Les toxines bactériennes constituent donc un champ actif de recherche dont le retentissement s'étend non seulement à la microbiologie, mais aussi à la biologie cellulaire.

ADRESSES

A. Galmiche, P. Boquet: Inserm U. 452, UFR de médecine, avenue de Valombrose, 06107 Nice Cedex 2, France.

m/s n° 6-7, vol. 17, juin-juillet 2001

La meilleure classification des toxines bactériennes repose sur leur mode d'action. Certaines toxines agissent à l'extérieur de la cellule en se liant à des récepteurs cellulaires ou en réalisant des pores dans la membrane. D'autres toxines sont capables d'induire

la translocation d'un fragment catalytique dans le cytoplasme. Dans cette revue, nous avons choisi de présenter un aperçu des connaissances les plus récentes qui ont été acquises sur le mode d'action et les cibles des toxines formant des pores ou possédant une activité intracytoplasmique.

Interaction des toxines avec les membranes cellulaires

Les toxines formant des pores : un assemblage de protéines dans la bicouche lipidique

Les toxines interagissant avec le cholestérol (streptolysine O, pneumolysine, listériolysine, perfringolysine), et les hémolysines RTX comme l' α -hémolysine d'*E. coli*, ainsi que l' α -staphylolysine et l'aérolysine sont les principales toxines formant des pores (voir revue dans [1]). Le *Tableau I* résume les propriétés comparées des pores formés par ces toxines (d'après [1]). Les toxines interagissant avec le cholestérol sont des molécules de 50 à 60 kDa produites par de nombreuses bactéries à Gram positif, en particulier des genres *Streptococcus*, *Bacillus*, *Listeria* [2]. Elles possèdent un motif consensus carboxy-terminal de 11 acides aminés comprenant une cystéine conservée. Elles s'oligomérisent dans la membrane en des complexes de très haut poids moléculaire. Les toxines RTX sont en revanche produites par de nombreuses bactéries à Gram négatif. Cette famille de toxines possède pour représentant le mieux connu l' α -hémolysine d'*E. coli* et tire son nom de la présence d'un motif de 9 acides aminés répétés riches en Gly et Asp qui pourraient contribuer à fixer la toxine à la membrane plasmique. La famille des toxines RTX comprend deux membres plus distants : l'adénylate cyclase CyA de *Bordetella pertussis* et la toxine RtxA de *Vibrio cholerae*. Ces protéines possèdent des activités indépendantes de la formation de pores, respectivement une induction de production d'AMPc dans le cas de CyA [3], et un

pontage covalent des monomères d'actine dans le cas de RtxA [4].

Initialement, ces toxines ont souvent été décrites comme des hémolysines du fait de leur action sur la paroi des globules rouges. Cette activité ne joue vraisemblablement pas de rôle en pathologie. Contrairement à une opinion largement répandue, ces toxines possèdent des effets largement indépendants de la lyse cellulaire. Ces effets sont fonction de la taille des pores et de leur perméabilité sélective pour les ions ou les facteurs cytosoliques. Une activité importante de ces toxines pourrait être le déclenchement d'une réponse inflammatoire. L' α -staphylolysine induit la formation de pores de très faible diamètre. Dans les monocytes, cette perméabilisation de la membrane active la caspase 1, ou ICE protéase, une protéine qui joue un rôle dans la maturation de l'interleukine-1 β et les phénomènes inflammatoires [5]. Les effets des toxines qui interagissent avec le cholestérol, comme la streptolysine O, ont été moins étudiés. Lorsqu'elle est produite par la bactérie invasive *Listeria monocytogenes*, la listériolysine permettrait à la bactérie de s'échapper de sa vacuole d'internalisation pour permettre sa réplication dans le cytoplasme [6]. Outre son activité pour l'invasion bactérienne, la listériolysine s'est récemment révélée capable d'activer le facteur NF κ B et l'expression des molécules d'adhérence en surface de cellules endothéliales [7]. De même, les toxines RTX possèdent de multiples effets sur les cellules. Il a été montré récemment que l' α -hémolysine produite par les souches d'*E. coli* uropathogènes provoque des oscillations de la concentration cytosolique en Ca²⁺, ces oscillations étant peut-être impliquées dans l'induction de

la production de cytokines pro-inflammatoires [8].

L'étude de l'insertion et de l'assemblage des toxines formant des pores dans les membranes pose le problème de l'interaction de ces molécules, initialement produites sous forme de monomères hydrophiles, avec la bicouche lipidique. L'étude du mode d'action de l'aérolysine, produite par la bactérie *Aeromonas hydrophila*, a permis de mieux comprendre comment un pore pouvait s'assembler et s'insérer dans la membrane cellulaire (voir revue dans [9]). Plusieurs étapes rendent compte de la formation du pore de l'aérolysine (*figure 1*). (1) L'aérolysine est initialement produite sous forme d'un pré-curseur hydrosoluble formant des dimères, la proaérolysine. Cette proaérolysine reconnaît avec une forte affinité le motif glycosylphosphatidylinositol (GPI) [10]. Cette modification post-traductionnelle, ajoutée à l'extrémité carboxy-terminale de certaines protéines au niveau du réticulum endoplasmique, permet leur arrimage au feuillet externe de la membrane plasmique. (2) Une activation protéolytique de la proaérolysine en aérolysine est réalisée par une protéase cellulaire, la furine. (3) L'aérolysine activée devient alors susceptible de s'oligomériser. (4) L'insertion du pore dans la membrane fait suite à l'oligomérisation (une heptamérisation dans le cas de l'aérolysine), du fait du démasquage de régions hydrophobes de la protéine normalement enfouies dans la protéine monomérique. Une caractéristique particulièrement importante des toxines formant des pores, et qui a été mise en évidence par l'étude de l'aérolysine, est l'utilisation par ces molécules des microdomaines de la membrane plasmique, mieux connus

Tableau I. Propriétés comparées des principales toxines formant des pores (d'après [1]).

	α -hémolysine, <i>S. aureus</i>	Streptolysine O	Hémolysines RTX, <i>E. coli</i>
Poids moléculaire	34 kDa	62 kDa	110 kDa
Nombre de résidus	297 pas de Cys	538 une Cys	1 024 pas de Cys
Degré d'oligomérisation	7	variable de 25 à 80	?
Diamètre du pore	0,6 à 1 nm	plus de 30 nm	1 à 1,5 nm

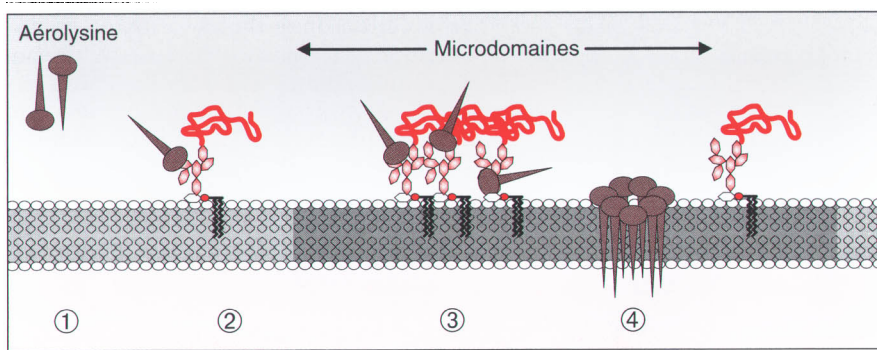


Figure 1. **Assemblage du pore de l'aérolysine.** Plusieurs étapes rendent compte de la formation du pore de l'aérolysine. (1) L'aérolysine est initialement produite sous forme d'un précurseur hydrosoluble formant des dimères, la proaérolysine. (2) La proaérolysine reconnaît avec une forte affinité le motif glycosylphosphatidylinositol (gpi) sur le versant externe de la membrane plasmique. A ce niveau, une activation protéolytique de la proaérolysine en aérolysine est réalisée par une protéase cellulaire, la furine. (3) Les GPI possèdent des propriétés de diffusibilité latérale et de confinement transitoire dans des microdomaines de la membrane plasmique qui favorisent la formation d'heptamères. (4) L'insertion du pore dans la membrane fait suite au démasquage de régions hydrophobes de la protéine normalement enfouies dans la protéine monomérique.

sous l'appellation de *rafts* [11]. Ces microdomaines membranaires sont des régions possédant une composition en lipides distincte du reste de la membrane, enrichies en cholestérol et en sphingolipides. Les toxines formant des pores semblent utiliser les composants de ces *rafts* comme récepteurs cellulaires, qu'il s'agisse du cholestérol dans le cas des homologues de la streptolysine ou de l'ancrage GPI dans le cas de l'aérolysine. Ces protéines pourraient utiliser les *rafts* de la membrane comme plates-formes de concentration pour favoriser l'oligomérisation des monomères et l'assemblage du pore [10]. Les toxines qui forment des pores sont d'un usage courant en biologie cellulaire car elles permettent de perméabiliser de façon contrôlée la membrane cellulaire pour y introduire divers réactifs : l'utilisation de l' α -staphylolysine induit la formation de pores permettant un flux sélectif d'ions monovalents K^+ , alors que les toxines interagissant avec le cholestérol permettent d'introduire des molécules de grande taille.

Les toxines AB : des systèmes d'injection de molécules dans le cytoplasme

Pour introduire leur activité toxique dans le cytoplasme, les toxines à mode d'action intracellulaire, ou

toxines AB, doivent d'abord interagir avec la membrane. Les toxines AB sont généralement organisées en deux domaines : un domaine catalytique A porte l'activité toxique, et un domaine B permet l'attachement à la cellule cible [12]. Deux stratégies semblent avoir été exploitées par ces toxines pour permettre l'introduction de leurs activités toxiques dans les cellules (figure 2).

La première est illustrée par l'action de la toxine diphtérique (TD). Dans ce mécanisme, la toxine inclut dans sa structure un domaine polypeptidique qui lui permet de subir une translocation à travers la membrane. Du fait que ces protéines injectent leur sous-unité A dans un compartiment endosomique, donc juste après leur entrée dans la cellule, on peut les qualifier de toxines à cheminement court. Ces toxines regroupent, outre la toxine diphtérique, les neurotoxines clostridiales (toxines tétaïque et botuliniques, toxines de *Bacillus anthracis*, facteur cytotoxique nécrosant d'*E. coli*). La toxine diphtérique est produite par *Corynebacterium diptheriae* sous forme d'un polypeptide précurseur. La toxine diphtérique reconnaît, grâce à son extrémité carboxy-terminale un récepteur cellulaire, qui est le précurseur de l'HB-EGF (*heparin-binding epidermal growth factor*). La fixation sur le récepteur cellulaire permet à la furine de

cliver la toxine en ses deux sous-unités A et B qui restent associées grâce à un pont disulfure. La sous-unité A possède l'activité de la toxine diphtérique, une activité enzymatique ADP-ribosyl transférase active sur EF2, un des facteurs d'élongation de la synthèse protéique dans les cellules eucaryotes. Après interaction avec son récepteur cellulaire, la toxine diphtérique associée à celui-ci est internalisée au sein de vésicules recouvertes de clathrine et elle rejoint l'endosome de tri. L'insertion membranaire et la translocation du domaine catalytique de la toxine diphtérique ont lieu dans cet endosome [13] : la toxine diphtérique, exposée aux faibles valeurs de pH de ce compartiment, subit une dénaturation partielle qui permet son interaction avec les membranes. Le domaine A est capable d'adopter une conformation dite en *molten globule*, une structure protéique compacte, mais dépourvue de structure tertiaire rigide, dont les propriétés de déformabilité pourraient être mises à profit pour permettre sa translocation à travers la bicouche lipidique [14]. Concomitamment, le pH acide induit la protonation de deux résidus acides de la sous-unité B, Glu349 et Asp352, présents au sommet d'une épingle à cheveux constituée de deux hélices α , les hélices TH8 et TH9. La protonation de ces résidus permet de neutraliser leur charge et elle autorise la translocation des hélices à travers la membrane cellulaire [15]. Celle-ci s'accompagne de l'apparition d'un pore dont le rôle est relativement mal connu. Alors qu'il avait été initialement suggéré qu'il pouvait servir au passage de la chaîne peptidique partiellement dénaturée, des travaux récents suggèrent que ce pore accompagne la translocation plutôt qu'il n'y participe [16]. Même si ce dernier point mérite d'être mieux documenté, la toxine diphtérique pourrait traverser la membrane cellulaire sans la participation de protéines cellulaires : le phénomène de translocation déclenchée par les faibles valeurs de pH de la toxine diphtérique a été ainsi reconstitué dans un modèle de membrane lipidique artificielle [17].

La seconde stratégie utilisée par les toxines AB pour injecter leur activité catalytique dans le cytoplasme fait

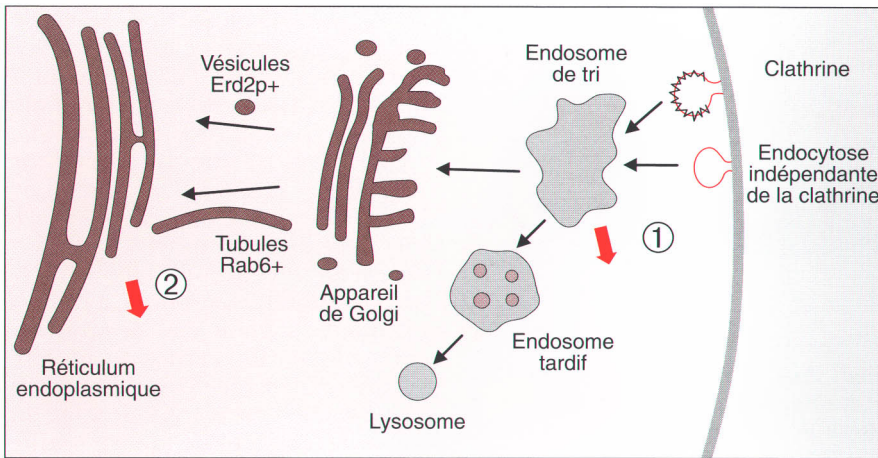


Figure 2. **Toxines à trafic court et à trafic long.** Deux stratégies sont utilisées par les toxines à mode d'action intracellulaire pour permettre l'introduction de leurs activités toxiques dans les cellules. (1) La toxine diphtérique (TD) injecte sa sous-unité A à partir d'un compartiment endosomal, donc juste après son entrée dans la cellule. On peut la qualifier de toxine à cheminement court. (2) La toxine cholérique (TC) et les toxines de *Shigella dysenteriae* (toxines de shiga ou apparentées) utilisent le translocon, un appareil de translocation des protéines qui réside dans le réticulum endoplasmique. Après leur endocytose, ces toxines sont transportées jusqu'au réticulum endoplasmique par une étape de transport rétrograde. On peut donc les qualifier de toxines à cheminement long. Le transport rétrograde de l'appareil de Golgi au réticulum endoplasmique peut être effectué par des intermédiaires vésiculaires Erd2p+ ou tubulaires Rab6+ dans les cas respectifs de la TC et des toxines de shiga.

appel à un appareil de translocation des protéines inhérent à la cellule. Ces toxines ne contiennent pas leur propre système de translocation membranaire. Ce mécanisme a été décrit dans le cas des toxines de *Shigella dysenteriae* (toxine de shiga ou toxines apparentées), de la toxine cholérique (TC), de la toxine du ricin et de l'exotoxine A de *Pseudomonas aeruginosa*. Une caractéristique importante des toxines qui utilisent ce mode de translocation de leur activité catalytique est constituée par leur trafic intracellulaire (revue dans [18]) : après leur endocytose, ces toxines sont en effet transportées jusqu'au réticulum endoplasmique par une étape de transport rétrograde. On peut donc qualifier ces molécules de toxines à cheminement long. A la différence de la toxine diphtérique, les sous-unités A et B de la toxine cholérique sont codées par deux gènes distincts (*ctxA* et *ctxB*), qui sont cependant regroupés dans le même opéron. La toxine cholérique est composée d'une sous-unité A de 27 kDa qui s'associe à un pentamère de sous-unités B de 11,7 kDa (for-

mant la structure AB₅ commune à la toxine cholérique, à la toxine pertussique et aux entérotoxines thermolabiles d'*E. coli*). Les sous-unités B de la toxine cholérique reconnaissent le ganglioside G_{M1}, un glycolipide ubiquitaire de la surface des cellules eucaryotes. Comme dans le cas de la toxine diphtérique, le fragment A de la toxine cholérique est clivé en deux fragments A1 et A2 qui restent reliés par un pont disulfure. La sous-unité A1 contient l'activité catalytique, permettant l'ADP-ribosylation de la sous-unité α de la protéine Gs sur son résidu Arg201. Cette modification post-traductionnelle réduit l'activité GTPasique intrinsèque de G α s, la rend constitutivement active et provoque l'activation de l'adénylate cyclase dans l'entérocyte. Liée au ganglioside G_{M1}, la toxine cholérique est internalisée par des vésicules d'endocytose non recouvertes de clathrine [19, 20]. Le ganglioside G_{M1} étant un composant des microdomaines de membrane insolubles aux détergents, l'endocytose de la toxine cholérique est probablement dépendante de ces structures. Après son transfert dans

les endosomes de tri, la toxine cholérique est transportée vers le réseau trans-golgien, puis vers l'appareil de Golgi, pour aboutir dans le réticulum endoplasmique [18]. Pour induire son transport rétrograde, la toxine cholérique détourne à son profit l'appareil de rétention des protéines résidentes du réticulum endoplasmique. L'extrémité carboxy-terminale de la sous-unité A2 possède un motif peptidique KDEL qui est reconnu par un récepteur spécifique, la protéine Erd2p [21]. Dans le Golgi, la reconnaissance du motif KDEL provoque l'assemblage de vésicules contenant la toxine cholérique recouvertes par le coatomère [22], un manteau impliqué dans la formation des vésicules adressées au réticulum. Dans ce compartiment, le franchissement membranaire du domaine catalytique fait intervenir une structure protéique permettant normalement le passage des protéines sécrétées en cours de synthèse du cytosol vers la lumière du réticulum endoplasmique (RE) : le translocon. Ce dispositif est principalement constitué par le complexe protéique Sec61. Le translocon est utilisé par les sous-unités A1-A2 de TC pour leur injection dans le cytoplasme [23]. A la différence des protéines du réticulum endoplasmique destinées à être dégradées et empruntant le translocon de façon rétrograde, le transport de la toxine cholérique vers le cytoplasme n'implique pas la présence du protéasome, mais serait dépendant de la présence de protéines du réticulum endoplasmique [23]. De façon intéressante, une stratégie différente semble avoir été choisie par la toxine de Shiga pour accéder au réticulum endoplasmique [24]. Le transfert rétrograde de la shigatoxine n'est en effet pas dépendant du récepteur du KDEL ou du coatomère, alors que la petite protéine G Rab6 semble requise [24]. Rab6 pourrait coordonner la formation et l'adressage d'intermédiaires membranaires tubulaires émis par le réseau trans-golgien contenant la toxine qui rejoindraient le réticulum endoplasmique [25] (figure 2). Les mécanismes qui permettent l'adressage spécifique des protéines à cheminement long de l'endosome de tri vers le réseau trans-golgien puis le réticulum endoplasmique constituent un sujet d'étude important.

Toxines bactériennes et GTPases de la famille Rho

Plusieurs toxines bactériennes modifient les petites GTPases de la superfamille Ras, particulièrement celles de la branche Rho. Ces toxines peuvent exercer une activité inhibante (l'exoenzyme C3 de *Clostridium botulinum*, les toxines A et B de *Clostridium difficile*) ou stimulante (les facteurs CNF1 d'*E. coli* et DNT de *Bordetella*) sur ces GTPases (voir revue dans [26]). L'utilisation de ces toxines a permis de faire avancer la compréhension de l'activation des petites protéines de la famille Rho, de leurs modalités d'interaction avec leurs différents effecteurs, et de mettre en évidence leur rôle de coordinateurs des comportements cellulaires. Les petites protéines G possèdent un fonctionnement qui les assimile à des interrupteurs moléculaires, du fait de leur oscillation entre les formes liées aux GDP et au GTP (voir revue dans [27]). A l'état basal, la protéine RhoA sous forme GDP est pratiquement totalement associée au facteur cytosolique Rho-GDI. L'activation de RhoA, c'est-à-dire son passage sous forme GTP, est réalisée par des facteurs d'échange GEF (*GTPase exchange factors*), et elle est contemporaine de la translocation de RhoA à la membrane cellulaire. Les petites protéines G reviennent à leur état de base par hydrolyse du GTP en GDP, du fait de leur activité GTPasique, à la fois intrinsèque et stimulée par des protéines GAP (*GTPase-activating protein*). Sous sa forme GTP, la protéine est capable d'interagir avec différentes protéines effectrices, dont les mieux étudiées sont notamment des kinases sur résidus Ser/Thr (Rho kinase et protéine kinase N), des enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides (phospho-inositides kinases, phospholipase D) ou des protéines adaptatrices impliquées dans la transduction de différents signaux (Rhotekine, Rhophiline, p140Dia) [27]. Les effets sur le cytosquelette d'actine constituent la conséquence la plus spectaculaire de l'intoxication par l'exoenzyme C3 de *C. botulinum* et les toxines A et B de *C. difficile* (figure 3). La C3 et les toxines A et B induisent la disparition des fibres de tension (*stress fibers*) constituées

d'actine avec des stratégies assez différentes. La C3 est capable d'ADP-ribosyler la protéine Rho sur son résidu Asn41 [28], alors que les toxines A et B de *C. difficile* possèdent une activité glucosyl-transférase dirigée sur les résidus Thr37 de Rho et Thr35 de Cdc42 et Rac [29, 30]. Les modifications de Rho par la C3 ou la toxine B induisent d'abord des effets sur l'alternance GDP/GTP (changements de sensibilité vis-à-vis des GEF et des GAP), et sur l'interaction avec leurs effecteurs [31] (figure 4). Dans le cas de la C3, le blocage de l'activation de Rho par ses GEF a été rapporté en même temps que les perturbations du couplage de Rho avec son effecteur [31]. La part respective de ces deux mécanismes d'inhibition dans les effets de C3 reste à déterminer [32], ainsi que les effets de l'ADP-ribosylation sur la structure de Rho. L'analyse structurale a été récemment appliquée à l'étude des conséquences de la glucosylation de

la protéine Ras par une toxine clostridiale voisine des toxines A et B de *C. difficile*, la toxine létale de *C. sordellii* [33, 34]: la glucosylation de Ras sur le résidu Thr35 empêche la modification de conformation de la boucle effectrice accompagnant l'échange du GDP en GTP, bloquant l'interaction de la petite protéine G activée avec ses effecteurs [35]. Un autre mécanisme qui pourrait contribuer au blocage de la transduction en aval de Rho a été récemment décrit: l'accumulation de Rho glucosylée à la membrane de la cellule [36]. Ce blocage de l'alternance cytosol-membrane résulte du fait que Rho glucosylée n'est plus extraite par le facteur RhoGDI, et il est peut-être à l'origine d'un effet dominant négatif du Rho glucosylé [36]. Au contraire, la protéine Rho ADP-ribosylée par C3 reste associée de façon très stable au facteur Rho-GDI et s'accumule sous forme GDP dans le cytoplasme (figure 4).

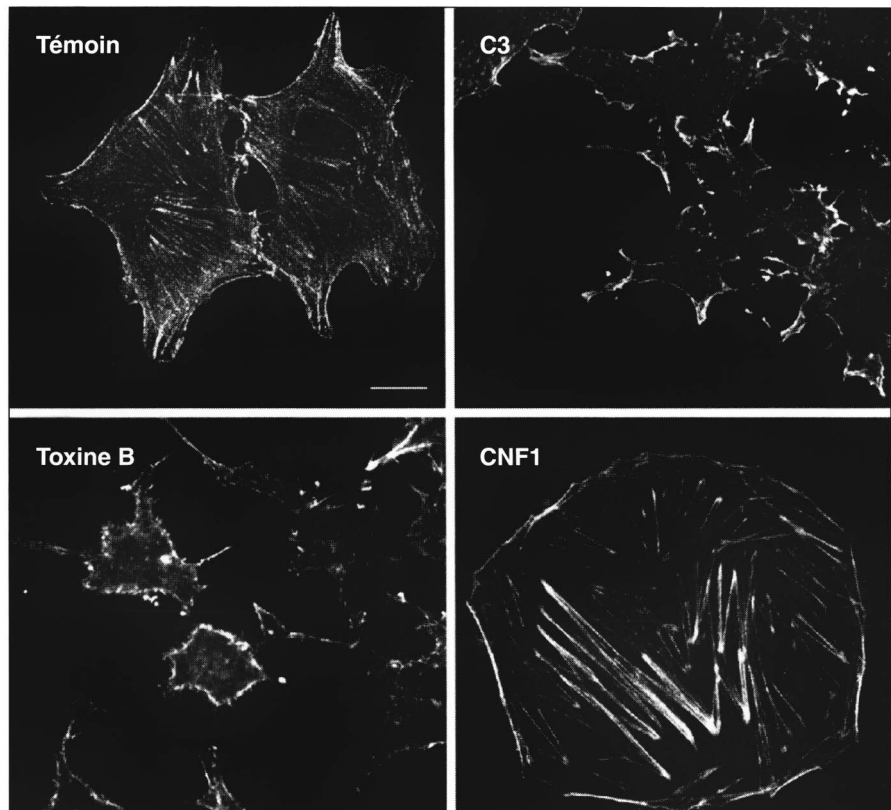


Figure 3. Effet des toxines actives sur les petites protéines G sur le cytosquelette d'actine. Le marquage par la phalloïdine fluorescente permet d'observer de façon particulièrement nette les remaniements du cytosquelette d'actine induits par les toxines bactériennes actives sur les petites protéines G de la famille de Rho (barre: 10 µm).

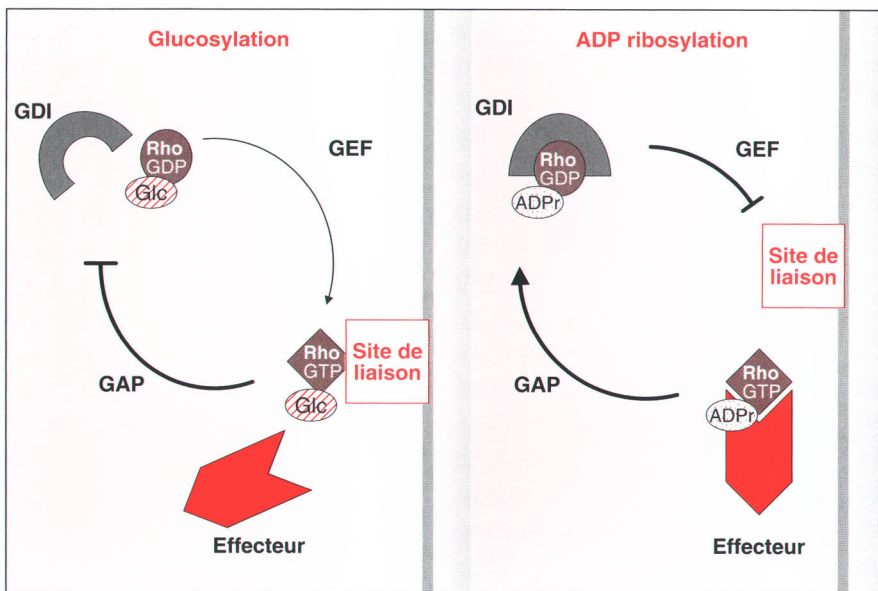


Figure 4. Cycle de la petite protéine G RhoA et effet des toxines C3 et B. À l'état basal, la protéine RhoA sous forme GDP est associée au facteur cytosolique Rho-GDI. Le passage de RhoA sous forme GTP, est réalisée par des facteurs d'échange GEF (GTPase exchange factors), et elle est contemporaine de la translocation de RhoA à la membrane cellulaire. Les petites protéines G reviennent à leur état de base par hydrolyse du GTP en GDP, du fait de leur activité GTPasique intrinsèque et stimulée par des protéines GAP (GTPase-activating protein). Sous sa forme GTP, la protéine est capable d'interagir avec ses effecteurs. Les modifications post-traductionnelles de Rho catalysées par les toxines (ADP-ribosylation et glucosylation principalement) perturbent ce cycle de façons différentes [31, 36].

Le facteur cytotoxique nécrosant (*cytotoxic necrotizing factor*, CNF) est une toxine produite par certaines souches d'*E. coli* uropathogènes et entéropathogènes. Il provoque sur les cellules qui y sont sensibles l'apparition de voiles ondulants sous-tendus par des remaniements de l'actine corticale et une augmentation du nombre des fibres de tension. En fait, la toxine réalise une activation des petites protéines G Rho, Rac et Cdc42 par déamination du résidu Gln63 / 61. La petite protéine G Rho perd son activité GTPasique aussi bien basale que stimulée par la GAP [37, 38]. Une autre toxine bactérienne semble présenter la même activité dirigée sur le résidu Glu63 de Rho: il s'agit de la toxine dermonécrotique (DNT) de *Bordetella pertussis* [38]. Dans le cas de la toxine dermonécrotique, des résultats récents suggèrent que l'activation de Rho résulte plutôt d'une réaction de polyamination utilisant les polyamines cellulaires comme la putrescine, la

spermidine ou la spermine [40, 41]. La polyamination permettrait l'interaction de Rho avec son principal effecteur, la Rho kinase, indépendamment de son statut GDP/GTP [41].

Pour détourner les voies de transduction cellulaire, l'évolution bactérienne a apparemment favorisé l'apparition de nombreuses toxines, aussi bien inhibitrices qu'activatrices, des petites protéines G de la famille de Rho. Cet état de fait reflète probablement à la fois l'importance des GTPases de la famille de Rho dans l'organisation du cytosquelette d'actine, et celle du détournement du cytosquelette d'actine pour la virulence bactérienne. D'autres toxines sont d'ailleurs directement actives sur l'actine, comme la toxine C2 produite par *Clostridium botulinum*, qui est capable d'ADP ribosyler les isoformes non musculaires d'actine [42]. Les toxines actives sur les petites GTPases constituent de remarquables outils de bio-

logie cellulaire. Elles permettent de contrôler de façon très efficace et sélective l'état d'activation de ces petites protéines G. Des études destinées à comprendre comment ces toxines reconnaissent et modifient les petites protéines G de la famille de Rho ont été entreprises dans l'espoir de contrôler leur spécificité et d'étendre leur utilisation à d'autres cibles, comme par exemple les Rab [43-45].

Toxines actives sur le trafic vésiculaire

Le tétanos et le botulisme sont des maladies paralysantes causées par des toxines produites par les bactéries *Clostridium tetanii* et *botulinum* (voir revue dans [46]). Dans les cellules eucaryotes, ces toxines possèdent un même mode d'action. Elles préviennent la transmission synaptique en bloquant la fusion des membranes des vésicules contenant le neuromédiateur avec la membrane plasmique. Une différence notable existe toutefois entre tétanos et botulisme. Les différents sérotypes de toxine botulinique agissent sur les fibres nerveuses périphériques cholinergiques, et ils réalisent une « dénévation chimique » du muscle qui provoque une paralysie flasque. La toxine tétanique effectue en revanche un long trajet qui l'amène dans le système nerveux central. Ce trajet est effectué, après reconnaissance des terminaisons nerveuses périphériques, grâce à une série d'étapes de transcytose, c'est-à-dire de transport axonal rétrograde [46]. La toxine tétanique bloque finalement la libération des neurotransmetteurs inhibiteurs GABA et glycine par les interneurons médullaires. A l'opposé du tableau clinique réalisé par le botulisme, le tétanos est provoqué par l'activation simultanée des groupes musculaires possédant des effets antagonistes, et il en résulte une paralysie spastique. Les différents sérotypes de toxines botuliques et la toxine tétanique possèdent une organisation générale en deux chaînes reliées par un pont disulfure: une chaîne lourde d'environ 800 acides aminés est impliquée dans la reconnaissance du récepteur à la surface des neurones et la translocation de la toxine. Une chaîne légère porte l'activité toxique, longue

d'environ 400 acides aminés et contient un motif HEXXH qui lui permet de lier un atome de zinc [46]. La toxine tétanique est une métalloprotéase dont le fonctionnement dépend du Zn^{2+} , et qui est capable de cliver la synaptobrevine. Des travaux complémentaires ont montré que les différents sérotypes de toxines botuliques possèdent un mode d'action voisin de celui de la toxine tétanique. Trois protéines qui participent à l'exocytose ont été identifiées comme des substrats des toxines botuliques: la synaptobrevine est présente sur la membrane des vésicules de neurotransmetteur et elle est la cible des sérotypes B, D, F et G. Les sérotypes A et E clivent SNAP25 (*soluble NSF [N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein] adaptor proteins*), tandis que le sérotype C clive à la fois SNAP25 et syntaxine (*figure 5*). SNAP25 et syntaxine sont des protéines qui sont présentes sur la membrane plasmique présynaptique. L'étude des neurotoxines clostridiales a donc permis de montrer l'importance de la synaptobrevine, de la syntaxine, et de SNAP25 dans la neurosécrétion, et plus généralement, dans le trafic des vésicules dans les cellules. Ces molécules, connues sous l'appellation de SNARE (*SNAP receptors*) (*m/s 2001, n° 5, p. 669*), forment ensemble un complexe dont la structure a été récemment déterminée (*voir revue dans [47]*), qui pourrait constituer la composante essentielle de l'appareil

de fusion des membranes cellulaires, suivant des modalités qui restent cependant à déterminer.

La toxine vacuolisante VacA est produite dans l'estomac humain par environ la moitié des souches d'*Helicobacter pylori*. Cette bactérie pathogène est à l'origine de la maladie ulcéreuse et des cancers de l'estomac. La toxine VacA pourrait contribuer à l'apparition des maladies associées à l'infection par *Helicobacter pylori* [48]. Elle tire son nom de sa faculté de provoquer l'apparition de larges vacuoles aux dépens des compartiments endosomiques tardifs (*voir revue dans [49]*). Lorsqu'elle est appliquée sur les cellules eucaryotes en cultures, la cytotoxine est à l'origine de l'apparition d'une perméabilité membranaire pour les anions et spécialement l'ion chlorure [50]. Nous avons récemment montré que le domaine amino-terminal de 34 kDa de VacA, introduit dans le cytoplasme de cellules eucaryotes par transfection, possédait des propriétés d'adressage spécifique vers la mitochondrie et induisait dans ces cellules un phénomène d'apoptose [51] (*figure 6*). Nos données suggèrent que la toxine vacuolisante A pourrait posséder un fonctionnement l'apparentant à la famille des toxines AB et que la mitochondrie pourrait en constituer la cible. Des travaux à venir devront déterminer dans quelle mesure cette propriété pourrait rendre compte des effets de VacA.

Autres activités toxiques

L'anthrax est une affection produite par un germe à Gram positif: *Bacillus anthracis*. La bactérie colonise les plaies bénignes et produit des toxines qui sont à l'origine de lésions pustuleuses. Du fait de l'absence d'espace périplasmique, la bactérie produit séparément les polypeptides qui portent l'activité catalytique et ceux qui reconnaissent le récepteur en surface de la cellule eucaryote. L'antigène protecteur (ainsi appelé du fait de son utilisation vaccinale) forme un heptamère qui interagit avec la membrane d'une façon similaire à la toxine α de staphylocoque et qui est capable de transloquer deux activités enzymatiques toxiques: le facteur œdémateux (*œdema factor*), une adénylate cyclase, et le facteur létal (*lethal factor*; LF), une métalloprotéase à Zn^{2+} . Il a été montré que le facteur létal est capable de cliver l'extrémité amino-terminale des protéines MEK 1 et 2 (*mitogen extracellular signal kinase*), ces enzymes étant les MAPK-kinases (*mitogen activated protein kinase kinase*) (MAPKK) responsables de l'activation par phosphorylation des ERK (*extracellular regulated kinase*) [52], de même que d'autres membres de la famille des MAPKK [53] (*m/s 1999, n° 10, p. 1155*). De façon notable, il a récemment été observé que l'extrémité amino-terminale qui était clivée par le facteur létal était impliquée dans la recon-

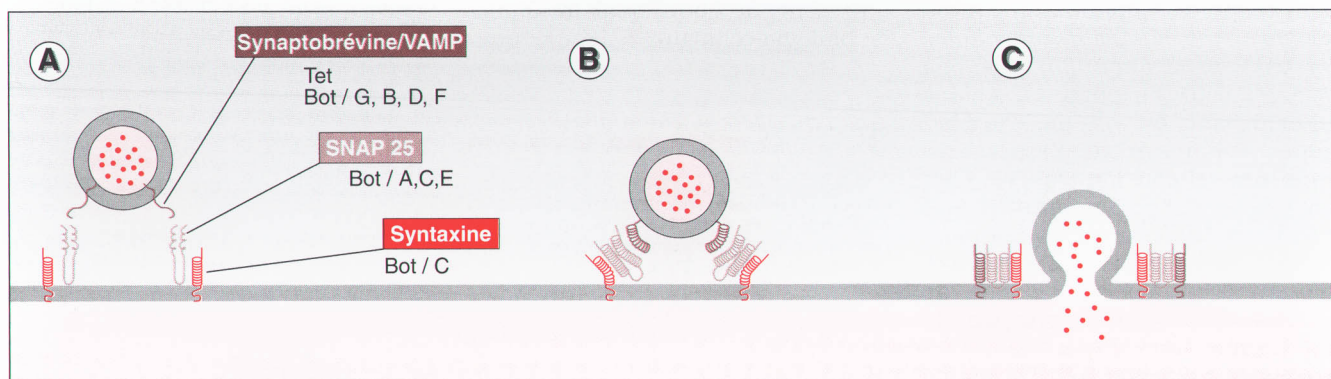


Figure 5. **Mode d'action des neurotoxines clostridiales.** La toxine tétanique et les différents sérotypes de toxine botulique possèdent une activité protéase dirigée contre les SNARE. De ce fait, elles empêchent la membrane des vésicules synaptiques de fusionner avec la membrane présynaptique et bloquent l'exocytose des neuromédiateurs. La synaptobrevine, ou VAMP, est présente sur la membrane des vésicules de neurotransmetteur et elle est la cible de la toxine tétanique et des sérotypes B, D, F et G de toxine botulique. Les sérotypes A et E clivent SNAP25, tandis que le sérotype C clive à la fois SNAP25 et syntaxine, sur la membrane cible.

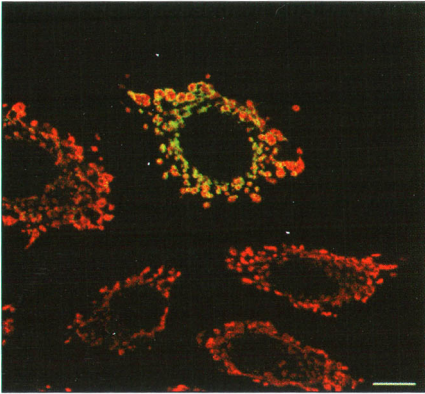


Figure 6. **Adressage mitochondrial de la toxine VacA.** Les propriétés d'adressage mitochondrial de l'extrémité amino-terminale de la toxine VacA ont été mises en évidence en transfectant dans des cellules HeLa une construction chimérique avec la protéine GFP, possédant des propriétés de fluorescence intrinsèque verte. Dans les cellules transfectées, une co-localisation pratiquement totale a été observée avec le marquage mitochondrial, réalisé au moyen d'un anticorps reconnaissant spécifiquement cet organelle (fluorescence rouge) (barre: 10 µm).

naissance spécifique des substrats MAPK [54], suggérant que le clivage par le facteur létal était responsable d'une modification de cette spécificité.

L'activité d'une autre famille de toxines bactériennes, les *cytolethal distending toxins* (CDT), a également été décrite. Les CDT sont des toxines produites par plusieurs bactéries pathogènes de l'épithélium intestinal, par exemple *Campylobacter jejuni*. Les CDT provoquent un arrêt du cycle cellulaire en phase G2 et une augmentation du volume cytoplasmique, à l'origine de l'aspect distendu des cellules intoxiquées. Elles sont constituées de 3 sous-unités A, B et C. Deux études récentes ont montré que la sous-unité B des CDT contient l'activité intracellulaire de ces toxines, et que ce polypeptide agit comme une DNase de type I capable de couper l'ADN génomique des cellules eucaryotes durant la phase S du cycle cellulaire [55, 56]. La protéine Cdc2 est ainsi maintenue sous forme phosphorylée et il en résulte un blocage du cycle cellulaire [57].

La toxine de Shiga et les toxines apparentées (anciennement dénommées vérotoxines) sont des facteurs de virulence respectifs des shigelles et des *E. coli* entérohémorragiques (les EHEC). Des études cliniques ont suggéré que les patients qui étaient porteurs de ces EHEC (spécialement le sérotype O157:H7) présentaient un risque accru de colite hémorragique et de syndrome hémolytique et urémique. La toxine de Shiga et les toxines apparentées sont des ARN-glycosidases capables de cliver la liaison N-glycosidique de l'adénosine en position 4 324 de l'ARN ribosomique 28S. Il en résulte une inactivation du ribosome et un arrêt de la synthèse protéique [58]. Récemment, il a été observé que la vérotoxine produite par les *E. coli* O157:H7 était capable d'atteindre la mitochondrie et d'y complexer la protéine Bcl-2 [59], provoquant peut-être par ce mécanisme l'apoptose des cellules en culture.

Conclusions et perspectives

Bien souvent, la production d'une toxine participe à une étape de la vie de la bactérie chez son hôte. De nombreuses toxines détournent le cytosquelette et les systèmes d'adressage des vésicules, par exemple à des fins de colonisation ou d'invasion des épithéliums [60]. L'étude du mode d'action des toxines bactériennes permet donc de décrire les étapes de la virulence bactérienne. En même temps, elle permet la mise au point de réactifs de choix pour les études de biologie cellulaire ■

RÉFÉRENCES

1. Bakdi S, Bayley H, Valeva A, *et al.* Staphylococcal alpha-toxin, streptolysin-O, and *Escherichia coli* hemolysin: prototypes of pore-forming bacterial cytolysins. *Arch Microbiol* 1996; 165: 73-9.
2. Alouf JE. Cholesterol-binding cytolytic protein toxins. *Int J Med Microbiol* 2000; 290: 351-6.
3. Ladant D, Ullmann A. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends Microbiol* 1999; 7: 172-6.
4. Fullner KJ, Mekalanos JJ. *In vivo* covalent cross-linking of cellular actin by the *Vibrio cholerae* RTX toxin. *EMBO J* 2000; 20: 5315-23.

5. Walev I, Reske K, Palmer M, *et al.* Potassium-inhibited processing of I11β in human monocytes. *EMBO J* 1995; 14: 1607-14.
6. Bielecki J, Yougman P, Connelly P, Portnoy DA. *Bacillus subtilis* expressing a haemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells. *Nature* 1990; 345: 175-6.
7. Kayal S, Lilienbaum A, Poyart C, Memet S, Israel A, Berche P. Listeriolysin O-dependent activation of endothelial cells during infection with *Listeria monocytogenes*: activation of NFκB and upregulation of adhesion molecules and chemokines. *Mol Microbiol* 1999; 31: 1709-22.
8. Uhlen P, Laestadius A, Jahnukainen T, *et al.* Alpha-haemolysin of uropathogenic *E. coli* induces Ca²⁺ oscillations in renal epithelial cells. *Nature* 2000; 405: 694-7.
9. Abrami L, Fivaz M, Van der Goot G. Adventures of a pore-forming toxin at the target cell surface. *Trends Microbiol* 2000; 8: 168-72.
10. Abrami L, Van der Goot G. Plasma membrane microdomains act as concentration platforms to facilitate intoxication by aerolysin. *J Cell Biol* 1999; 147: 175-84.
11. Brown DA, London E. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998; 14: 111-36.
12. Falnes P, Sandvig K. Penetration of protein toxins into cells. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12: 407-13.
13. Lemichez E, Bomsel M, Devilliers G, *et al.* Membrane translocation of diphtheria toxin fragment A exploits early to late endosome trafficking machinery. *Mol Microbiol* 1997; 23: 445-57.
14. Ren J, *et al.* Interaction of diphtheria toxin T domain with molten globule-like proteins and its implications for translocation. *Science* 1999; 284: 955-7.
15. O'Keefe DO, Cabiaux V, Choe S, Eisenberg D, Collier RJ. pH-dependent insertion of proteins into membranes: B-chain mutation of diphtheria toxin that inhibits membrane translocation. *Glu349-Lys*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 6202-6.
16. Lanzrein M, Sand O, Olsnes S. GPI-anchored diphtheria toxin receptor allows membrane translocation of the toxin without detectable ion channel activity. *EMBO J* 1996; 15: 725-34.
17. Oh KJ, Senzel L, Collier RJ, Finkelstein A. Translocation of the catalytic domain of diphtheria toxin across planar phospholipid bilayers by its own T domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 8467-70.
18. Lord JM, Roberts LM. Toxin entry: retrograde transport through the secretory pathway. *J Cell Biol* 1998; 140: 733-6.
19. Orlandi PA, Fishman PH. Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J Cell Biol* 1998; 141: 905-15.

RÉFÉRENCES

20. Wolf AA, Jobling MG, Wimer-Mackin S, *et al*. Ganglioside structure dictates signal transduction by cholera toxin and association with caveolae-like membrane domains in polarized epithelia. *J Cell Biol* 1998; 141: 917-27.
21. Lencer WI, Constable C, Moe S, *et al*. Targeting of cholera toxin and *Escherichia coli* heat labile toxin in polarized epithelia: role of COOH-terminal KDEL. *J Cell Biol* 1995; 131: 951-62.
22. Majoul I, Sohn K, Wieland FT, Pepperkok R, Pizza M, Hillemann J, Soling HD. KDEL receptor (Erd2p)-mediated retrograde transport of the cholera toxin A subunit from the Golgi involves COPI, p23, and the COOH-terminus of Erd2p. *J Cell Biol* 1998; 143: 601-12.
23. Schmitz A, Herrgen H, Winkeler A, Herzog V. Cholera toxin is exported from microsomes by the Sec61p complex. *J Cell Biol* 2000; 148: 1203-12.
24. Girod A, Storrie B, Simpson JC, *et al*. Evidence for a COPI-independent transport route from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Nat Cell Biol* 1999; 1: 423-30.
25. White J, Johannes L, Mallard F, *et al*. Rab6 coordinates a novel Golgi to ER retrograde transport pathway in live cells. *J Cell Biol* 1999; 147: 743-60.
26. Boquet P. Bacterial toxins inhibiting or activating small GTP-binding proteins. *Ann NY Acad Sci* 1999; 886: 83-90.
27. Bishop AL, Hall A. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 2000; 348: 241-55.
28. Sekine A, Jujiwara M, Narumiya S. Asparagine residue in the rho gene product is the modification site for botulinum ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem* 1989; 264: 8602-5.
29. Just I, Selzer J, Wilm M, Von Eichel-Streiber C, Mann M, Aktories K. Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. *Nature* 1995; 375: 500-3.
30. Just I, Wilm M, Selzer J, *et al*. The enterotoxin from *Clostridium difficile* (Tox A) monoglucosylates the Rho proteins. *J Biol Chem* 1995; 270: 13932-6.
31. Sehr P, Joseph G, Genth H, Just I, Pick E, Aktories K. Glucosylation and ADP ribosylation of Rho proteins: effects on nucleotide binding, GTPase activity, and effector coupling. *Biochemistry* 1998; 37: 5296-304.
32. Barth H, Olenik C, Sehr P, Schmidt G, Aktories K, Meyer DK. Neosynthesis and activation of Rho by *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor (CNF1) reverse cytopathic effects of ADP-ribosylated Rho. *J Biol Chem* 1999; 274: 27407-14.
33. Popoff MR, Chaves O, Lemichez E, *et al*. Ras, Rap, and Rac small GTP-binding proteins are targets for *Clostridium sordellii* lethal toxin glucosylation. *J Biol Chem* 1996; 271: 10217-24.
34. Just I, Selzer J, Hofman F, Green GA, Aktories K. Inactivation of Ras by *Clostridium Sordellii* lethal toxin-catalyzed glucosylation. *J Biol Chem* 1996; 271: 10149-53.
35. Vetter IR, Hofmann F, Wohlgenuth S, Herrmann C, Just I. Structural consequences of mono-glucosylation of Ha-Ras by *Clostridium sordellii* lethal toxin. *J Mol Biol* 2000; 301: 1091-5.
36. Genth H, Aktories K, Just I. Monoglucosylation of RhoA at threonine 37 blocks cytosol-membrane cycling. *J Biol Chem* 1999; 274: 29050-6.
37. Flatau G, Lemichez E, Gauthier M, *et al*. Toxin-induced glutamine-deamidation of Rho. *Nature* 1997; 387: 729-33.
38. Schmidt G, Sehr P, Wilm M, Selzer J, Mann M, Aktories K. Rho gln63 is deamidated by *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1. *Nature* 1997; 387: 725-9.
39. Horiguchi Y, Inoue N, Masuda M, *et al*. *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotizing toxin induces reorganization of actin stress fibers through deamidation of Gln-63 of the GTP-binding protein Rho. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 11623-6.
40. Schmidt G, Goehring UM, Schirmer J, Lerm M, Aktories K. Identification of the C-terminal part of Bordetella dermonecrotic toxin as a transglutaminase for rho GTPases. *J Biol Chem* 1999; 274: 31875-81.
41. Masuda M, Betancourt L, Matsuzawa T, *et al*. Activation of Rho through a cross-link with polyamines catalyzed by *Bordetella* dermonecrotizing toxin. *EMBO J* 2000; 19: 521-30.
42. Aktories K, Barmann M, Ohishi I, *et al*. Botulinum C2 toxin ADP-ribosylates actin. *Nature* 1986; 322: 390-2.
43. Wilde C, Genth H, Aktories K, Just I. Recognition of RhoA by *Clostridium botulinum* C3 exoenzyme. *J Biol Chem* 2000; 275: 16478-83.
44. Lerm M, Schmidt G, Goehring UM, Schirmer J, Aktories K. Identification of the region of Rho involved in substrate recognition by *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1). *J Biol Chem* 1999; 274: 28999-9004.
45. Flatau G, Landraud L, Boquet P, Bruzzone M, Munro P. Deamidation of RhoA glutamine 63 by the *Escherichia coli* CNF1 toxin requires a short sequence of the GTPase switch 2 domain. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 267: 588-92.
46. Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol Rev* 2000; 80: 717-66.
47. Jahn R, Sudhof TC. Membrane fusion and exocytosis. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 863-911.
48. Telford JL, Ghiara P, Dell'Orco M, *et al*. Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. *J Exp Med* 1994; 179: 1653-8.
49. Reyrat JM, Pelicic V, Papini E, Montecucco C, Rappuoli R, Telford JL. Towards deciphering the *Helicobacter pylori* cytotoxin. *Mol Microbiol* 1999; 34: 197-204.
50. Szabo I, Brutsche S, Tombola F, *et al*. Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity. *EMBO J* 1999; 18: 5517-27.
51. Galmiche A, Rassow J, Doye A, *et al*. The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. *EMBO J* 2000; 19: 6361-70.
52. Duesbery NS, Webb CP, Leppla SH, *et al*. Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor. *Science* 1998; 280: 734-7.
53. Vitale G, Bernardi L, Napolitani G, Mock M, Montecucco C. Susceptibility of mitogen-activated protein kinase kinase family members to proteolysis by anthrax lethal factor. *Biochem J* 2000; 352: 739-45.
54. Tanoue T, Adachi M, Moriguchi T, Nishida E. A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 110-6.
55. Lara-Tejero M, Galan JE. A bacterial toxin that controls cell cycle progression as a deoxyribonuclease I-like protein. *Science* 2000; 290: 354-7.
56. Elwell CA, Dreyfus LA. DNase I homologous residues in CdtB are critical for cytolethal distending toxin-mediated cell cycle arrest. *Mol Microbiol* 2000; 37: 952-63.
57. Comayras C, Tasca C, Peres SY, Ducommun B, Oswald E, De Rycke J. *Escherichia coli* cytolethal distending toxin blocks the HeLa cell cycle at the G2/M transition by preventing cdc2 protein kinase dephosphorylation and activation. *Infect Immun* 1997; 65: 5088-95.
58. Endo Y, Mitsui K, Motizuki M, Tsurugi K. The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28 S ribosomal RNA caused by the toxins. *J Biol Chem* 1987; 262: 5908-12.
59. Suzuki A, Doi H, Matsuzawa F, *et al*. Bcl-2 antiapoptotic protein mediates verotoxin II-induced cell death: possible association between Bcl-2 and tissue failure by *E. coli* O157: H7. *Genes Dev* 2000; 14: 1734-40.
60. Finlay BB, Cossart P. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science* 1997; 276: 718-25.

Summary

Bacterial toxins: virulence factors and cell biology tools

Many pathogenic bacteria produce protein toxins. Studying their mode of action presents a double interest. On one hand, toxins play a role in the host-bacteria interaction, and they can influence the clinical course of bacterial infections. On the other hand, toxins are also spectacular examples of cellular functions diversion. New bacterial toxin activities have been described over the last decade, and they have become widely used as cell biology tools, since they target important regulators of cell functions with very tight specificity. Bacterial toxins have been for instance instrumental in the discovery of the role played by small GTPases of the Rho family in the control of the actin cytoskeleton organization, and in the study of SNAREs molecules in vesicular traffic. Bacterial toxins are often organized in different domains that fulfill the following functions: (1) a toxic domain, very often an enzyme; (2) a domain that interacts with a cell surface receptor; (3) a domain that allows active domain delivery of the catalytic subunit in the cytoplasm and which acts as a « molecular syringe » across the cell membrane. The study of the mode of action of bacterial toxins is therefore an active field of research in both microbiology and cellular biology.