

Le plasmide pYV, élément clé de la virulence des *Yersinia*

Guy R. Cornélis

Les bactéries *Yersinia pestis*, *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica* ont le même tropisme pour les tissus lymphoïdes et partagent la capacité de résister à la réponse immune primitive de l'hôte. Ils ont en commun un plasmide très conservé de 70kb, pYV, qui code pour l'essentiel de ce qui fait la virulence de ces bactéries : l'adhésine YadA, onze protéines Yop et le système pour les sécréter. La seule Yop dont la fonction soit connue, YopH, est une phosphotyrosine phosphatase qui, en déphosphorylant les protéines de régulation de la cellule hôte, vraisemblablement empêche la réponse antibactérienne, ce qui constitue un nouveau mécanisme de pathogénie microbienne. Le système original de sécrétion des Yop, mis en évidence dans d'autres pathogènes humains et végétaux, semble voué à la sécrétion des facteurs de virulence : ceux-ci ne sont pas sécrétés dans le milieu extracellulaire mais directement introduits dans la cellule eucaryote quand la bactérie adhère à sa surface. Enfin, le chromosome de *Y. enterocolitica* code pour une entérotoxine thermostable, Yst, reliée à StI de *E. coli* et à la guanylyl cyclase intestinale, complétant ainsi la panoplie de virulence de ce type de bactérie.

ADRESSE

G.R. Cornélis : professeur de microbiologie, directeur de l'unité de pathogénie microbienne, faculté de médecine de l'université catholique de Louvain et Institut international de pathologie cellulaire et moléculaire, 74, avenue Hippocrate, B-1200 Bruxelles, Belgique.

L'étude de la relation d'un parasite avec son hôte, à l'échelle moléculaire et cellulaire, permet de mieux comprendre non seulement l'infection mais également certains aspects de l'hôte lui-même [1]. Toutes les bactéries pathogènes de l'homme et de l'animal sont actuellement réétudiées et la bactériologie médicale, science un peu désuète datant du début du siècle, est en

train de vivre un second âge d'or. Quelques notions fondamentales ont émergé récemment: le rôle important des plasmides dans la virulence, l'utilisation de mécanismes communs par des bactéries qui provoquent des maladies très différentes et enfin le transfert génétique horizontal entre cellules eucaryotes et cellules procaryotes. Les bactéries du genre *Yersinia* illustrent parfaitement ces trois aspects.

RÉFÉRENCES

1. Capron, A. Le langage moléculaire des parasites. *médecine/sciences* 1995; 11: 431-9.
2. Grützkau 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.
3. Tauxe RV, Vandepitte J, Wauters G, Martin SM, Goossens V, De Mol P, Van Noyen R, Thiers G. *Yersinia enterocolitica* infections and pork: the missing link. *Lancet* 1987; ii: 1129-32.
4. Cornelis G, Sluiter C, Lambert de Rouvroit C, Michiels T. Homology between VirF, the transcriptional activator of the *Yersinia* virulence regulon, and AraC, the *Escherichia coli* arabinose operon regulator. *J Bacteriol* 1989; 171: 254-62.
5. China B, Sory M-P, N'Guyen BT, De Bruyere M, Cornelis G. Role of the YadA protein in prevention of opsonization of *Yersinia enterocolitica* by C3b molecules. *Infect Immun* 1993; 61: 3129-36.
6. China B, N'Guyen BT, De Bruyere M, Cornelis G. Role of YadA in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 1994; 62: 1275-81.
7. Rosqvist R, Skurnik M, Wolf-Watz H. Increased virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* by two independent mutations. *Nature* 1988; 334: 522-5.
8. Guan K, Dixon JE. Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*. *Science* 1990; 249: 553-6.
9. Stuckey JA, Schubert HL, Fauman EB, Zhang ZY, Dixon JE, Saper MA. Crystal structure of *Yersinia* protein tyrosine phosphatase at 2.5 Å and the complex with tungstate. *Nature* 1994; 370: 571-5.
10. Bliska JB, Guan K, Dixon JE, Falkow S. A mechanism of bacterial pathogenesis: tyrosine phosphate hydrolysis of host proteins by an essential *Yersinia* virulence determinant. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 1187-91.
11. Rosqvist R, Bölin I, Wolf-Watz H. Inhibition of phagocytosis in *Yersinia pseudotuberculosis*: a virulence plasmid-encoded ability involving the Yop2b protein. *Infect Immun* 1988; 56: 2139-43.

De la peste à une gastroentérite bénigne

Les *Yersinia* sont des bactéries à Gram négatif appartenant à la famille des entérobactériacées. Le genre comprend trois espèces pathogènes pour l'homme : *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica*. *Y. pestis* est inoculée dans l'organisme par une morsure de puce, puis dissémine. *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica* sont ingérées et franchissent la barrière intestinale au niveau des cellules M [2]. Elles envahissent ensuite les plaques de Peyer puis les ganglions mésentériques et éventuellement les tissus profonds (figure 1). Si *Y. pestis* et *Y. pseudotuberculosis* sont avant tout des agents de zoonoses, *Y. enterocolitica* est couramment rencontrée chez l'homme pour lequel elle représente une importante cause de gastroentérite. L'infection à *Y. enterocolitica* entraîne une diarrhée, parfois très fruste, de la fièvre et des douleurs abdominales qui peuvent être sévères au point d'évoquer une appendicite. La source principale de contamination humaine est la viande de porc crue ou mal cuite [3]. Quelques cas d'infection systémique ont été rapportés aux États-Unis et en Angleterre chez des patients ayant reçu des transfusions sanguines et notamment des autotransfusions. Ces accidents, très sévères, s'expliquent par l'existence d'une légère bactériémie chez le donneur au moment du prélèvement et par la capacité qu'ont les *Yersinia* de se multiplier à 4°C pendant le stockage des poches de sang. Bien que les trois espèces pathogènes de *Yersinia* causent des maladies dont la voie d'entrée, et surtout la gravité, sont très différentes, elles manifestent un même tropisme pour le tissu lymphoïde et partagent un équipement génétique extraordinairement conservé. *Y. enterocolitica* constitue donc un excellent modèle pour l'étude de la peste.

Le plasmide pYV, un système intégré d'agression

Les trois espèces pathogènes de *Yersinia* hébergent un plasmide de 70 kb que l'on appelle pYV (*plasmid respon-*

sible for Yersinia virulence), essentiel pour la virulence. Ce plasmide, qui n'est pas conjugatif, constitue un système d'agression tellement complet qu'on en viendrait presque à le considérer comme un élément génétique pathogène utilisant une bactérie pour sa propagation. Il gouverne l'insertion de deux protéines, YadA et YlpA, dans la membrane externe de la bactérie ainsi que la sécrétion à l'extérieur de celle-ci de onze protéines appelées Yop. Le plasmide pYV code non seulement pour YadA, YlpA et les Yop mais aussi pour toute la machinerie qui permet l'exportation rapide de grandes quantités de Yop à travers les deux membranes de la bactérie. Le plasmide pYV, enfin, contient les gènes régulateurs requis pour commander cette exportation au moment opportun et y consacrer l'essentiel du potentiel métabolique de la bactérie. Le plasmide pYV (figure 2) est un élément génétique très compact. Il y a peu de distance entre les opérons et, au sein des opérons, les gènes se suivent sans interruption et même souvent avec un chevauchement des codons d'arrêt et d'initiation. Le plasmide pYV apparaît donc comme un élément génétique fort achevé, ce qui explique peut-être les ravages que peut causer *Y. pestis*. L'expression des gènes d'agression du plasmide pYV est réglée par la température : ils sont exprimés à 37°C, la température de l'hôte, mais non à basse température. Parmi ces gènes thermorégulés, un grand nombre – mais pas tous – se trouvent sous le contrôle du gène *virF* [4]. Ce gène code pour un activateur transcriptionnel appartenant à une grande famille dont l'archétype est AraC, le régulateur de l'opéron arabinose de *E. coli*. *In vitro*, l'expression des gènes *yop* est également contrôlée par la concentration en ions Ca²⁺. Cette seconde régulation génétique, qui n'est pas encore bien comprise, est de type négatif. La sécrétion des protéines Yop est donc doublement contrôlée et elle contrôle elle-même la croissance de la bactérie : à 37°C et en absence de Ca²⁺, les *Yersinia* arrêtent leur croissance et elles sécrètent les protéines Yop. La liaison entre l'activation des gènes du plasmide pYV et la restriction de la croissance bactérienne n'est pas encore bien comprise, elle non plus.

L'adhésine YadA

L'adhésine YadA (*Yersinia* adhésine A) (figure 3) est une protéine multimérique ancrée dans la membrane externe des *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis* cultivées à 37 °C. Elle en augmente l'hydrophobicité et lui confère la capacité d'adhérer non seulement à des cellules épithéliales en culture et à des constituants de la matrice extracellulaire mais encore à des supports inertes comme le verre. YadA confère également à *Y. enterocolitica* la capacité de résister à l'activité bactéricide du sérum humain. YadA n'empêche pas le dépôt de C3b sur la bactérie mais elle fixe le facteur sérique H, ce qui entraîne la dégradation de C3b et, partant, l'arrêt de l'activation du complément par la voie alternative [5]. En l'absence d'anticorps spécifiques, YadA protège également *Y. enterocolitica* de la phagocytose par les leucocytes polymorphonucléaires humains [6]. Cette résistance est probablement également une conséquence de la dégradation des opsonines C3b. Par cette double intervention, la protéine YadA joue donc un rôle important dans la pathogénie de *Y. enterocolitica*, mais ce rôle est difficile à établir au moyen d'un modèle animal car les différences que l'on rencontre entre les espèces animales au niveau du complément sont très importantes. Très curieusement, chez *Y. pestis* le gène *yadA* est inactivé par une mutation ponctuelle [7].

Les protéines Yop

Ces onze protéines représentent des facteurs essentiels de la virulence des *Yersinia*: toute mutation dans l'un ou l'autre des gènes *yop* entraîne une augmentation très significative de la dose létale 50 pour la souris. Il faut préciser immédiatement que les Yop ne sont pas des toxines au sens strict du terme. En effet, les Yop purifiées n'ont aucune action toxique, ni pour des cellules en culture, ni pour l'animal. YopH, la protéine Yop la mieux connue, est une protéine phosphotyrosine phosphatase (PTPase) dont la séquence présente une similitude significative avec celle de tyrosine phosphatases eucaryotes comme CD45 des leucocytes [8]. YopH possède notamment tous les résidus

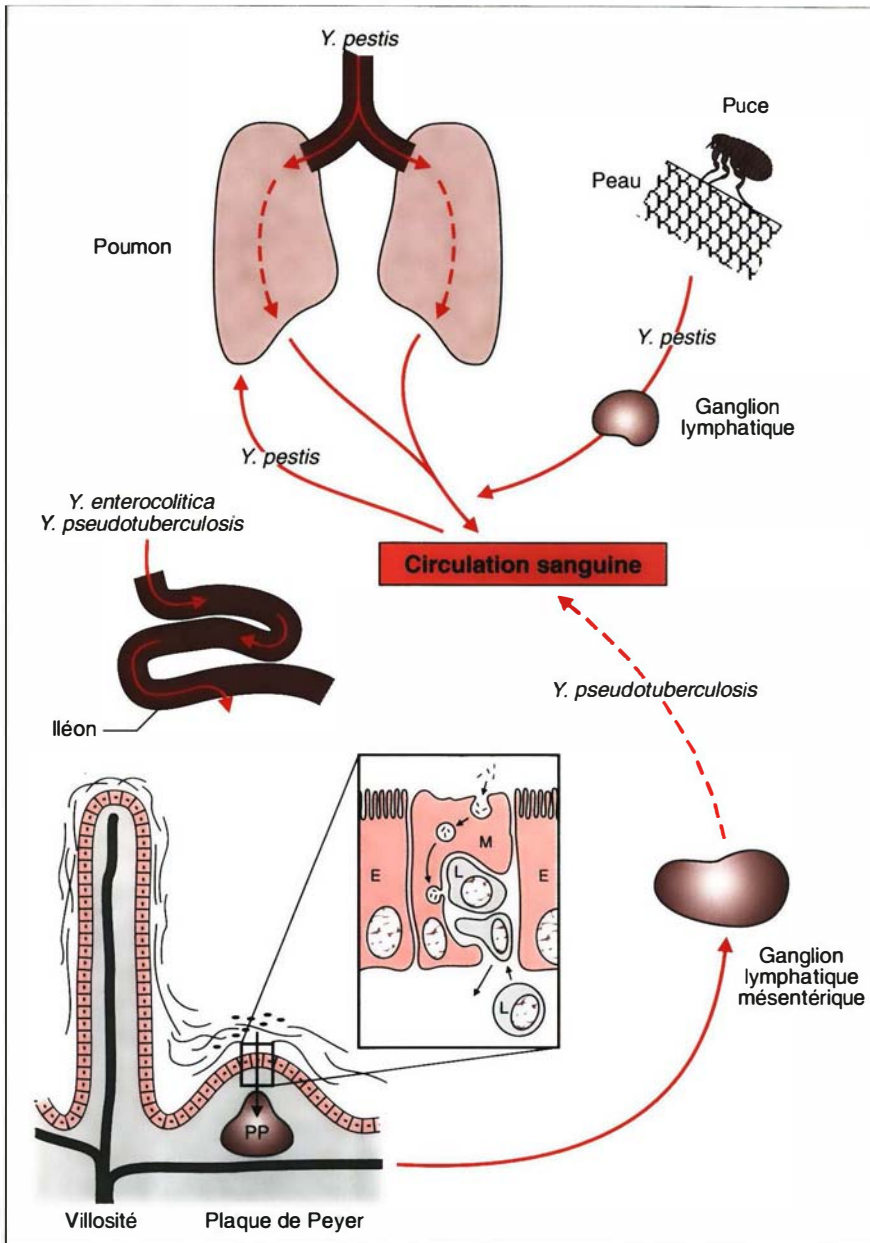


Figure 1. Représentation schématique des voies de l'infection et de la localisation corporelle de *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica*. Les lignes pleines montrent le cheminement usuel tandis que les lignes pointillées indiquent un événement plus rare. *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis* pénètrent par voie digestive, *Y. pestis* pénètre, soit par les voies aériennes, soit par piqûre de puce. La dissémination se fait par voies lymphatique et sanguine. Encadré : une cellule M, entourée d'entérocytes (E) et de lymphocytes (L).

RÉFÉRENCES

12. Galyov E, Håkansson S, Forsberg A, Wolf-Watz H. A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. *Nature* 1993; 361: 730-2.
13. Leung KY, Reisner BS, Straley SC. YopM inhibits platelet aggregation and is necessary for virulence of *Yersinia pestis* in mice. *Infect Immun* 1990; 58: 3262-71.
14. Michiels T, Wattiau P, Brasseur R, Ruyschaert JM, Cornelis G. Secretion of Yop proteins by *Yersinia*. *Infect Immun* 1990; 58: 2840-9.
15. Michiels T, Vanooteeghem JC, Lambert de Rouvroit C, China B, Sory MP, Gustin A, 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.
16. Woestyn S, Allaoui A, Wattiau P, Cornelis GR. YscN, the putative energizer of the *Yersinia* Yops secretion machinery. *J Bacteriol* 1994; 176: 1561-9.
17. Allaoui A, Woestyn S, Sluiter C, Cornelis GR. YscU, a *Yersinia enterocolitica* inner-membrane protein involved in Yop secretion. *J Bacteriol* 1994; 176: 4534-42.
18. Russel M. Phage assembly: a paradigm for bacterial virulence factor export? *Science* 1994; 265: 612-4.
19. Van Gijsegem F, Genin S, Boucher CA. Conservation of secretion pathways for pathogenicity determinants of plant and animal pathogenic bacteria. *Trends Microbiol* 1993; 1: 175-80.
20. Wattiau P, Bernier B, Deslee P, Michiels T, Cornelis G. Individual chaperones required for Yop secretion by *Yersinia*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 10493-7.
21. Wattiau P, Cornelis G. SycE, a chaperone-like protein of *Yersinia enterocolitica* involved in the secretion of YopE. *Mol Microbiol* 1993; 8: 123-31.
22. 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.
23. 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.

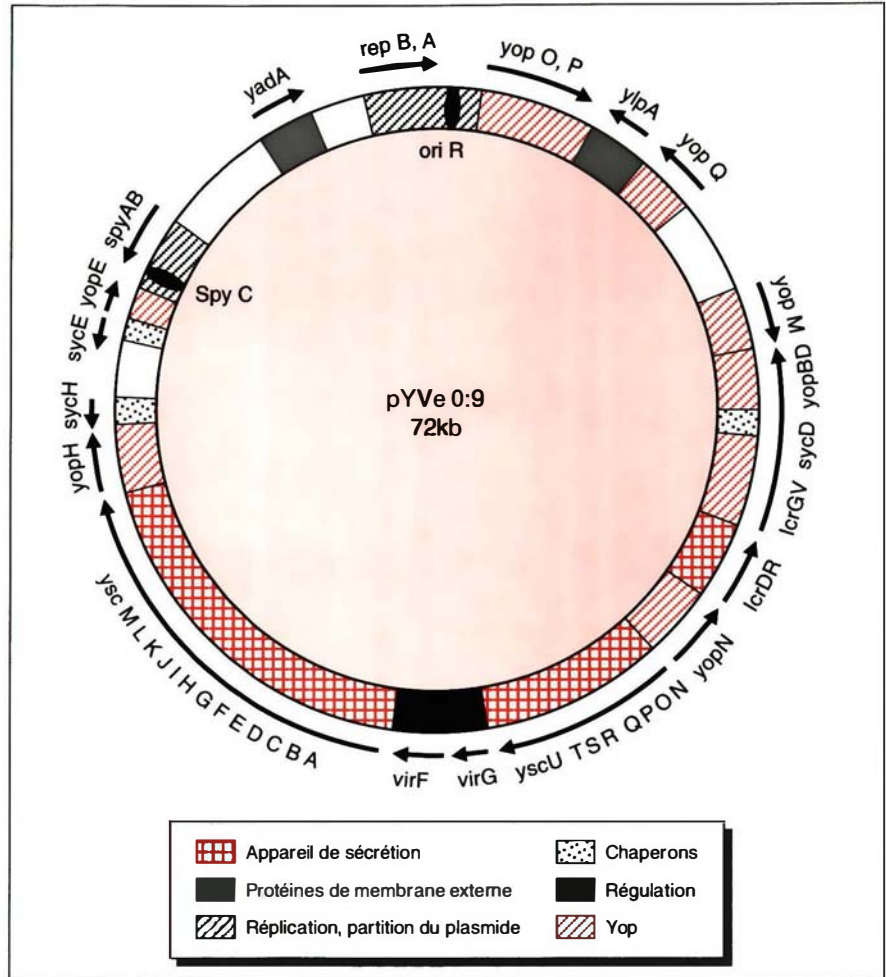
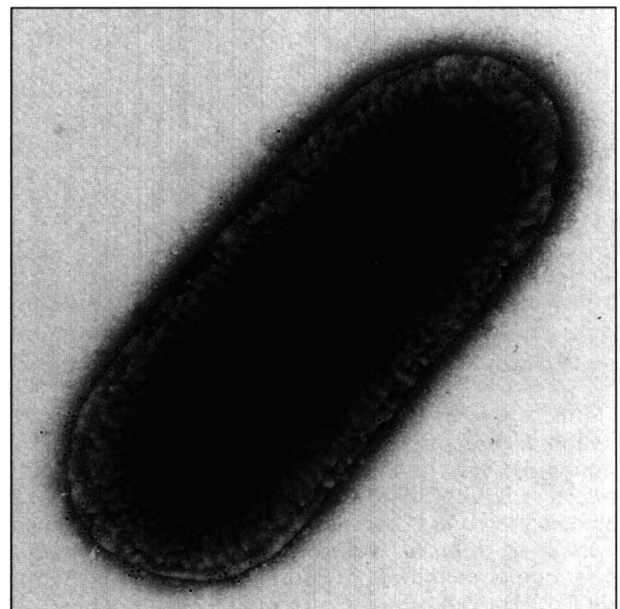


Figure 2. Le plasmide pYV des *Y. enterocolitica* du sérotype O:9.

Figure 3. *Yersinia enterocolitica* (micrographie électronique, x 100 000). Les points noirs sont des grains d'or couplés à un anticorps anti-YadA, l'adhésine majeure de *Y. enterocolitica*. (Cliché M. Iriarte et S. Knutton.)



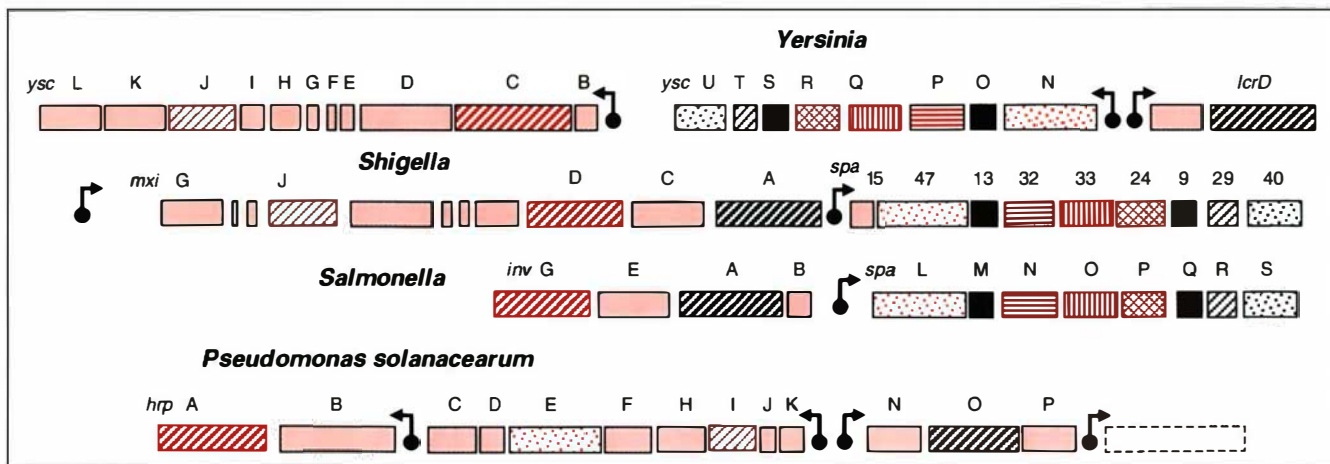


Figure 4. Gènes codant pour le système de sécrétion des protéines Yop (gènes yscBCDEFGHIJKLMNQRSTU et IcrD) et leurs homologues chez *Shigella* (mxiC,D,J et spa40,29,9,24,33,32,13,47), *Salmonella* (invE,G et spaSRQPONML) et *Pseudomonas solanacearum*. (hrpA,E,I). Les gènes homologues sont colorés et hachurés de la même manière dans les quatre genres.

invariants des PTPases eucaryotes, incluant la cystéine qui forme un intermédiaire phosphocystéine pendant la réaction de déphosphorylation. L'analyse cristallographique montre que cette cystéine occupe le centre d'une boucle de liaison au phosphate, caractéristique des PTPases [9]. L'action de YopH s'exerce *in vitro* sur au moins trois phosphoprotéines du macrophage [10] et elle conduit à l'inhibition de la phagocytose par celui-ci [11]. YopO est une sérine thréonine kinase également apparentée à des kinases eucaryotes [12]. YopE exerce une action délétère sur le cytosquelette. YopM est une protéine de 48 kDa dont un domaine ressemble au domaine de la glycoprotéine plaquettaire α GPIb qui fixe la thrombine. Cette ressemblance n'est probablement pas fortuite car YopM fixe également la thrombine [13]. Une autre des protéines Yop est l'antigène protecteur V découvert chez *Y. pestis* vers le milieu des années 1950 mais dont le rôle reste toujours mystérieux. Enfin, on ne connaît pas d'activité enzymatique, toxique ou de liaison pour YopB, YopD, YopN, YopP, YopQ et YopR. Il faut cependant noter que YopB présente une légère similitude avec l'hémolysine produite par de nombreux *Escherichia coli* uropathogènes. Avec ces connaissances, il n'est pas encore

possible de dresser une image cohérente de l'intervention des Yop dans la pathogénie, mais, comme nous le verrons par la suite, les idées commencent à se mettre en place.

Un nouveau mécanisme de sécrétion chez les bactéries

Les protéines Yop ont été initialement décrites comme des protéines de la membrane externe des *Yersinia*. Nous avons montré qu'elles ne sont pas ancrées dans la membrane mais sécrétées dans le milieu extérieur [14]. Cependant, elles tendent à former des agrégats qui sédimentent avec les membranes au cours des étapes de purification de ces dernières, ce qui explique la confusion. La confusion était d'autant plus aisée que les entérobactéries capables de sécréter des protéines dans le milieu extérieur sont plutôt rares et que les Yop n'ont pas de séquence signal. Étant donné cette absence de séquence signal, nous avons considéré que les protéines Yop devaient être sécrétées par un mécanisme d'un type nouveau. Nous avons ensuite fait l'hypothèse que ce mécanisme de sécrétion devait également être codé par le plasmide pYV lui-même [15]. Effectivement, ce sont les opérons yscA-M et yscN-U (ysc pour yop secretion) ainsi que le gène IcrD du

plasmide pYV qui codent pour ce nouveau système de sécrétion [15-17]. La démonstration que ces gènes sont impliqués dans la sécrétion plutôt que dans la régulation fut malaisée parce qu'il y a une rétro-inhibition de la transcription des gènes yop lorsque la sécrétion est compromise [17]. Trois éléments nous paraissent intéressants à relever à propos de ce système de sécrétion, qui est encore loin d'être totalement compris. D'abord, il semble comporter beaucoup plus de protéines ancrées dans la membrane interne que dans la membrane externe. Cela est paradoxal dans la mesure où l'originalité du système réside bien plus dans la franchissement de la seconde membrane que dans celui de la première. La principale protéine de la membrane externe, YscC, appartient à une nouvelle famille en pleine expansion et dont l'archétype est la protéine PIV, une protéine multimérique qui permet l'extrusion des particules de bactériophages à ADN monocaténaire [18]. Vu la taille des éléments dont elle permet la sortie, PIV doit constituer un pore à ouverture contrôlée. Cela est probablement également vrai pour YscC. Le second élément remarquable de ce système de sécrétion est sa distribution au sein du monde microbien. Le groupe de Ph. Sansonetti à l'Institut Pasteur l'a décrit chez *Shigella* et

RÉFÉRENCES

24. Sory MP, Cornelis G. Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from *Yersinia enterocolitica* into HeLa cells. *Mol Microbiol* 1994; 14: 583-94.

25. Lessi M, Lanka E. Common mechanisms in bacterial conjugation and Ti-mediated T-DNA transfer to plant cells. *Cell* 1994; 77: 321-4.

26. Roggentin P, Schauer R, Hoyer LL, Vimr ER. The sialidase superfamily and its spread by horizontal gene transfer. *Mol Microbiology* 1993; 9: 915-21.

27. Vanooteghem JC, Cornelis G. Structural and functional similarities between the replication region of the *Yersinia* virulence plasmid and the RepFIIA replicons. *Bacteriol* 1990; 172: 3600-8.

28. Carniel E, Guiyoule A, Guilvout I, Mercereau-Puijajalon O. Molecular cloning, iron-regulation and mutagenesis of the *irp2* gene encoding HMWP2, a protein specific for the highly pathogenic *Yersinia*. *Mol Microbiol* 1992; 6: 379-88.

29. Iriarte M, Vanooteghem JC, Delor I, Diaz R, Knutton S, Cornelis G. The Myf fibrillae of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* 1993; 9: 507-20.

30. Sodeinde OA, Subrahmanyam YVBK, Stark K, Quan T, Bao Y, Goguen J. A surface protease and the invasive character of plague. *Science* 1992; 258: 1004-7.

31. Delor I, Kaeckenbeek A, Wauters G, Cornelis GR. Nucleotide sequence of *yst*, the *Yersinia enterocolitica* gene encoding the heat-stable enterotoxin, and prevalence of the gene among the pathogenic and non-pathogenic *Yersinia*. *Infect Immun* 1990; 58: 2983-8.

32. Currie MG, Fok KF, Kato J, Moore RJ, Hamra FK, Duffin KL, Smith CE. Guanylin: an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 947-51.

33. Isberg RR. Pathways for the penetration of enteroinvasive *Yersinia* into mammalian cells. *Mol Biol Med* 1990; 7: 73-82.

34. Tran Van Nhieu G, Isberg RR. Bacterial internalization mediated by $\beta 1$ chain integrins is determined by ligand affinity and receptor density. *EMBO J* 1993; 12: 1887-95.

35. Pepe JC, Miller VM. *Yersinia enterocolitica* invasins: a primary role in the initiation of infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 6473-7.

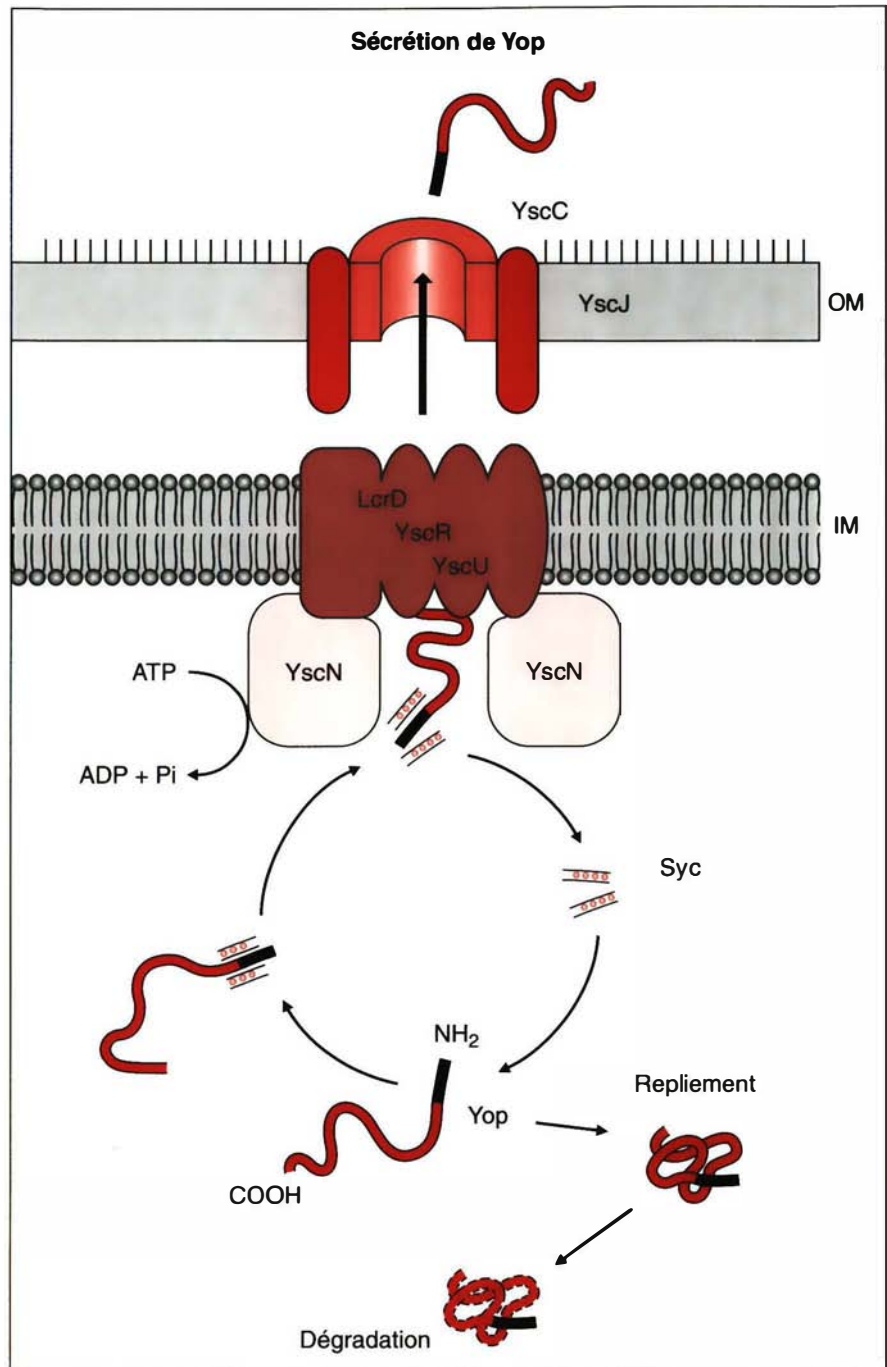


Figure 5. **Représentation schématique de la sécrétion des protéines Yop.** La protéine YscC forme probablement un pore dans la membrane externe. YscJ est une lipoprotéine également ancrée dans cette membrane externe. Les protéines LcrD, YscR et YscU sont des protéines de la membrane interne. YscN est une ATPase. Les protéines Syc sont des chaperons cytoplasmiques. Ils constituent des pilotes ou des éléments anti-repliment ou anti-association. C'est le domaine amino-terminal des protéines Yop (ici en noir) qui détermine leur sécrétion. OM: membrane externe de la bactérie; IM, membrane interne.

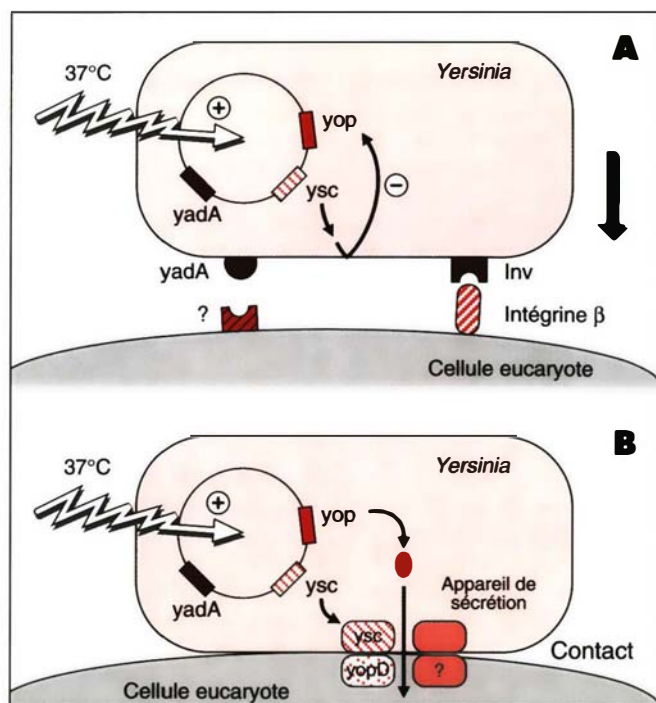


Figure 6. **Contact entre une *Yersinia* et une cellule eucaryote suivi de la translocation de protéines Yop.** A. En l'absence de contact avec une cellule eucaryote, l'expression des gènes *ysc* et *yop* est réprimée. B. Au contact, l'inhibition est levée, la machine de sécrétion (protéines Ysc) s'assemble dans les membranes de la bactérie tandis que la protéine YopD forme un appareil destiné à permettre la translocation d'autres protéines Yop dans le cytoplasme de la cellule eucaryote.

d'autres l'ont retrouvé chez *Salmonella*, chez les *E. coli* entéropathogènes et même chez des bactéries phytopathogènes telles que *Pseudomonas solanacearum* et *Xanthomonas campestris* [19] (figure 4). Il semble donc que ce nouveau système de sécrétion soit spécialement destiné à l'exportation de protéines de virulence. La similitude entre les gènes *ysc* de *Yersinia* et les gènes *hrp* des bactéries phytopathogènes a permis d'attribuer une fonction à ces derniers et de découvrir les protéines sécrétées, les harpines. Par ailleurs, tous les produits de l'opéron *yscN-U* ressemblent à des protéines qui interviennent à des étapes encore peu précisées de la synthèse et de l'assemblage des flagelles de *E. coli* ou même de *Bacillus subtilis*. On est donc tenté de penser que les protéines de virulence et les composants du flagelle sont exportés au moyen de systèmes qui ont une origine com-

mune. Cette coïncidence entre sécrétion des Yop et assemblage des flagelles fait penser que certaines protéines Yop pourraient peut-être jouer un rôle structural. Cette supposition est étayée par des observations d'un autre ordre que nous allons envisager plus loin.

Enfin, comme nous l'avons vu, une des particularités de ce système de sécrétion réside dans l'absence de clivage d'une séquence signal des protéines Yop au cours de leur exportation. Cependant, bien qu'on ne distingue rien de commun entre les domaines N-terminaux des différentes protéines Yop, ce sont bien ces domaines qui servent à leur tri [14].

Des chaperons individuels

Plusieurs gènes *yop* sont, chacun, accompagnés d'un petit gène codant

pour une protéine très acide d'environ 16 kDa. Les mutations introduites dans ces gènes ancillaires ont pour effet de supprimer la sécrétion de la protéine Yop correspondante. L'effet ne porte ni sur la transcription ni sur la traduction du gène *yop* mais sur le futur de la protéine Yop elle-même. Nous avons donc considéré que ces petites protéines acides étaient des chaperons spécifiques et nous avons montré qu'elles se lient effectivement à la protéine Yop correspondante. Elles ne sont cependant pas sécrétées avec la protéine Yop. Nous les avons appelées « Syc » pour *specific Yop chaperone*. Jusqu'ici, nous avons caractérisé SycE, SycH et SycD, les chaperons respectifs de YopE, YopH et YopD [20, 21]. Ces chaperons peuvent constituer des pilotes individuels qui guident les protéines Yop naissantes vers le système d'exportation et pallient ainsi l'absence de séquence signal. Ils peuvent également avoir une fonction antirepliement ou antiassociation dans le cytoplasme. La figure 5 illustre ce que nous savons du système de sécrétion des Yop.

Un nouveau type de relation entre bactéries et cellules eucaryotes

Les observations histologiques effectuées sur la souris infectée montrent des microcolonies de *Y. enterocolitica* extracellulaires [22]. Cette observation est en accord avec le fait que les *Yersinia* résistent à la phagocytose par les polymorphonucléaires et les macrophages. Elle est cependant surprenante si l'on considère que YopH agit sur des résidus phosphotyrosine impliqués dans des processus d'activation cellulaire. On a donc tenté de démontrer la translocation de protéines Yop, depuis le milieu extracellulaire vers le compartiment intracellulaire. Le groupe de H. Wolf-Watz (Umeå, Suède) a montré la translocation de YopE en faisant appel à la microscopie confocale [23]. Nous avons appliqué la stratégie, courante en génétique bactérienne, de l'enzyme *reporter* en utilisant le domaine adénylyl-cyclase (Cya) de la cyclosine, une toxine de *Bordetella pertussis* particulièrement étudiée par le groupe de A. Ullmann à l'Institut Pasteur. Avec

M.-P. Sory, nous avons construit un gène chimérique codant pour une protéine hybride YopE-Cya qui a conservé l'activité cyclase dépendante de la calmoduline et qui est sécrétée par *Y. enterocolitica* avec les autres Yop. Nous avons infecté des monocouches de cellules HeLa par des *Y. enterocolitica* recombinantes et avons observé que les cellules HeLa accumulaient de l'AMPc, même si nous empêchions les bactéries d'y pénétrer [24]. La protéine YopE fait donc bien l'objet d'une translocation à travers la membrane cytoplasmique (figure 6). Ainsi, les *Yersinia* agressent les cellules de leur hôte par un mécanisme nouveau en pathogénie microbienne: un contact intime avec une cellule cible suivi de l'internalisation d'une enzyme. Dans le cas de YopH, cette translocation entraîne la déphosphorylation de trois protéines [10] et cette déphosphorylation pourrait être la cause de l'inhibition de la phagocytose (figure 7).

En étudiant différents mutants de *Y. enterocolitica*, on peut observer que le phénomène de translocation de YopE exige l'attachement intime des bactéries à la surface cellulaire et l'intervention d'autres protéines Yop, notamment YopD [24] (figure 6). Cela suggère que la translocation de YopE, et peut-être de YopH, est réalisée au moyen d'un organite disposé à la surface de la bactérie. Cet organite, qui serait lui-même constitué de certaines protéines Yop, servirait à faire passer d'autres protéines Yop à travers la membrane de la cellule eucaryote cible. L'analogie dont nous avons fait état entre le système de sécrétion des Yop et le système de sécrétion des composants flagellaires renforce beaucoup cette hypothèse. Le système de virulence serait, au moins partiellement, dérivé du système locomoteur bactérien. Cette hypothèse séduisante évoque une autre dans un domaine connexe: la machinerie qui transfère le T-ADN du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* dans la cellule végétale réceptrice serait, quant à elle, dérivée d'une machinerie de conjugaison dont le rôle est de transférer des plasmides d'une bactérie à une autre [25]. Nous voyons donc deux exemples de récupération de structures extracellulaires bactériennes à des fins de pathogénie.

Le paradoxe du Ca²⁺

In vitro, la sécrétion des protéines Yop par *Yersinia* est inhibée par des concentrations millimolaires de Ca²⁺, à savoir celles qui règnent en dehors des cellules de l'hôte. Cette observation a fait penser que, *in vivo*, les *Yersinia* ne sécrètent les Yop que lorsqu'elles sont dans le compartiment intracellulaire, où le Ca²⁺ est en concentration micromolaire. Cela semble en contradiction avec le mécanisme que nous venons de proposer. De deux choses l'une : ou bien le modèle de la bactérie extracellulaire qui injecte les Yop dans le cytoplasme de cellules de l'hôte est incorrect, ou bien la sécrétion des Yop est possible *in vivo* en présence de Ca²⁺. Le mécanisme de déclenchement pourrait être le contact avec une cellule eucaryote. En effet, lorsqu'on place les *Yersinia* dans le milieu qui sert à la culture des cellules HeLa, on n'observe pas de sécrétion de Yop. En revanche, lorsqu'on y ajoute des cellules HeLa, on observe la translocation des Yop dans ces mêmes cellules [24]. La répression de la sécrétion des Yop peut donc être levée par le contact avec des cellules eucaryotes. Cela suggère qu'un signal est transmis de la surface jusqu'au cytoplasme bactérien. YopN pourrait être

un des éléments d'une cascade qui reste très mystérieuse. On sait en effet depuis de nombreuses années qu'un mutant *yopN* sécrète les Yop, même en présence de Ca²⁺. En conclusion, *in vivo*, la sécrétion des Yop semble induite par le contact avec une cellule et elle est couplée à leur internalisation. La sécrétion libre, comme nous l'observons au laboratoire après chélation des ions Ca²⁺, pourrait donc n'être qu'un artefact qui a eu l'énorme avantage de nous mettre sur la piste de la découverte du système.

Transfert génétique horizontal?

La synthèse d'une tyrosine phosphatase proche de celle des cellules eucaryotes (figure 8) pourrait-elle résulter d'une évolution convergente, alors que les procaryotes phosphorylent peu leurs protéines et jamais – dans l'état actuel des connaissances – sur des résidus tyrosine? L'hypothèse d'un transfert horizontal, d'une cellule eucaryote à une bactérie, paraît certainement plus séduisante, mais elle implique la solution de nombreux problèmes dont le moindre n'est pas le reformatage de l'information génétique. Si transfert il y a eu, non seulement l'ADN transféré a dû

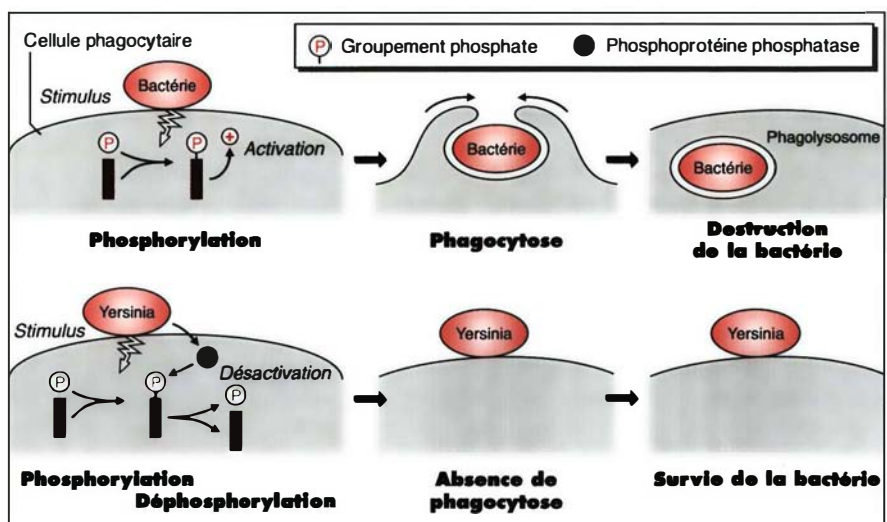
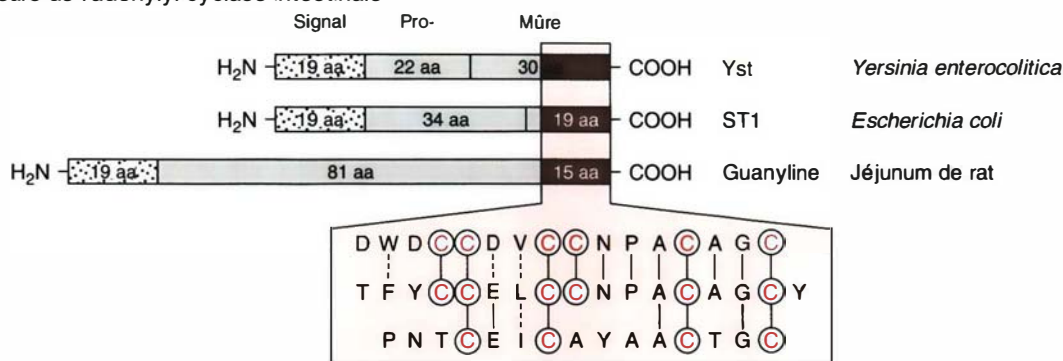


Figure 7. Représentation schématique du rôle de la tyrosine phosphatase YopH dans l'inhibition de la phagocytose.

Éléments de la virulence de *Yersinia* et leurs homologues procaryotes et eucaryotes

A • Peptides activateurs de l'adénylyl cyclase intestinale



B • Protéine phosphotyrosine phosphatases

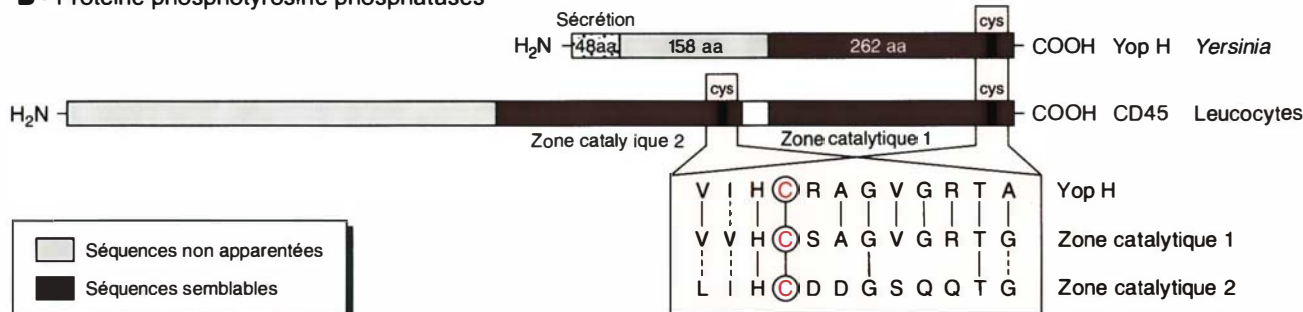


Figure 8. *Les Yersinia ont-elles emprunté leurs déterminants de virulence à un hôte eucaryote ancestral?* A. Comparaison des entérotoxines Yst et ST1 à la guanyline, un peptide qui stimule la guanylyl cyclase des cellules de la lignée colonique T84 et qui déplace la toxine ST1 préalablement fixée sur ces cellules. B. Comparaison de YopH avec CD45 des leucocytes (Genbank Y00062).

être intégré dans la séquence codante d'un gène impliqué dans la biosynthèse d'un appareil de type flagellaire, mais encore il a été intégré dans un circuit régulateur permettant son expression au stade adéquat de l'infection. L'hypothèse du transfert horizontal d'un gène de tyrosine phosphatase entre cellule eucaryote et procaryote peut dès lors paraître gratuite. Il faut cependant savoir que cette même hypothèse vient d'être formulée dans le cas de la sialidase, une autre enzyme qui pourrait être impliquée dans la virulence de certaines bactéries et qui présente une étrange distribution dans le monde microbien [26].

En réfléchissant à un mécanisme de transfert génétique interspécifique, on pense évidemment à des virus et

on pourrait être tenté de considérer le plasmide pYV comme le descendant d'un bactériophage. Le système d'injection pourrait bien être le descendant d'une capsid filamentaire et le caractère très compact de l'information génétique du plasmide pYV rappelle les génomes phagiques. Cependant, en ce qui concerne ses fonctions ancillaires – répllication, partition –, le plasmide pYV est étrangement proche des grands plasmides de multirésistance aux antibiotiques [27]. L'analyse de la séquence complète du plasmide devrait permettre la mise en évidence de cicatrices laissées par des remaniements ancestraux. Peut-être alors pourra-t-on formuler une hypothèse concernant la genèse de ce remarquable plasmide pYV.

Modulation par le chromosome

Le plasmide pYV que nous venons de décrire est, sans conteste, la clé majeure de la virulence des *Yersinia*. Il confère essentiellement la capacité de résister à la réponse immunitaire primaire de l'hôte. L'effet de ce plasmide est modulé par l'intervention d'autres éléments qui sont codés par le chromosome ou par deux autres plasmides que l'on ne rencontre que chez *Y. pestis*. Sans vouloir entrer dans le détail, citons les systèmes de capture du fer [28], l'appendice fibrillaire Myf [29], l'activateur du plasminogène Pla [30] ainsi que l'entérotoxine thermostable Yst et l'internaline Inv qui seront envisagées ci-dessous.

Yst, une hormone bactérienne?

Y. enterocolitica ne fait pas que traverser le tube digestif pour atteindre les organes lymphoïdes qui y sont associés, elle cause également une diarrhée qui, dans certains cas, constitue le seul symptôme. La diarrhée est notamment très marquée chez le jeune lapin infecté mais elle est absente chez la souris. A la différence de *Y. pseudotuberculosis* et de *Y. pestis*, *Y. enterocolitica* produit une entérotoxine thermostable apparentée à la toxine ST1 des *E. coli* entérotoxigènes. Comme ST1, cette toxine polypeptidique que nous avons appelée Yst agit en stimulant la guanylyl cyclase intestinale. Lorsque le gène *yst* est délété du chromosome de *Y. enterocolitica* par génétique inverse, la souche recombinante ne produit plus de diarrhée chez le lapin, mais elle continue de provoquer une infection qui se traduit par l'apparition d'anticorps circulants dirigés contre les protéines Yop [31]. L'entérotoxine Yst semble donc responsable de la diarrhée, au moins chez le jeune lapin. Les entérotoxines thermostables sont connues depuis plusieurs années, mais le regard qu'on porte sur elles a singulièrement évolué depuis peu. Des auteurs américains ont, en effet, découvert dans des extraits de jéjunum de rat un peptide qui stimule la guanylyl cyclase des cellules de la lignée colonique T84 et qui déplace la toxine ST1 préalablement fixée sur ces cellules. Cette hormone, appelée guanyline, pourrait avoir pour fonction le maintien de l'hydratation de la couche de mucine [32]. Sa séquence présente une intéressante similitude avec celle des entérotoxines thermostables (figure 8). Deux éléments paraissent intéressants à ce sujet. D'abord, ST1 et Yst constituent des exemples de toxines bactériennes agissant comme des analogues d'hormones. C'est une nouvelle manière pour les bactéries d'assujettir les cellules de l'hôte et, dans ce cas-ci, le profit consiste vraisemblablement dans la dissémination que provoque la diarrhée. Ensuite, on peut relever que la découverte de la guanyline est le résultat d'une recherche qui est partie de l'entérotoxine ST1. C'est donc un exemple, dans la biologie eucaryote, de décou-

verte qui résulte de l'étude de la pathogénie microbienne.

L'invasine Inv

Les *Y. enterocolitica* et *pseudotuberculosis* ont la capacité de pénétrer dans des cellules épithéliales ou fibroblastiques cultivées *in vitro*. Trois protéines de la membrane externe de *Y. enterocolitica* peuvent conférer cette propriété, indépendamment l'une de l'autre: l'invasine Inv (*m/s n°10, vol. 3, p. 626*), l'invasine Ail et l'adhésine YadA dont il a déjà été question. L'invasine Inv, de loin la plus efficace des trois [33], est une protéine d'environ 100 kDa qui se lie aux intégrines de la famille $\beta 1$ par son domaine C-terminal. Cette fixation à forte affinité suffit à déclencher un phénomène d'internalisation qui est passif en ce qui concerne la bactérie [34]. Curieusement, *Y. pestis* ne synthétise pas cette invasine. Plus curieusement encore, un double mutant de *Y. pseudotuberculosis*, incapable de synthétiser à la fois Inv et YadA, voit sa virulence augmenter et non diminuer [7]. Ces deux observations provocatrices de Hans Wolf-Watz ont fait douter du rôle de l'invasine dans la pathogénie. Il a cependant été montré récemment que, au moins chez *Y. enterocolitica*, l'invasine facilite l'étape initiale de franchissement de l'épithélium intestinal [35] ■

Summary

The pYV plasmid, key element of *Yersinia* virulence

Although *Yersinia pestis*, *Y. pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica* infect their host by different routes and cause diseases of variable severity, they share a common tropism for lymphoid tissues and a common capacity to resist the primary immune response of the host. They also share a highly conserved 70-kb plasmid called pYV. This plasmid encodes the adhesin YadA and eleven secreted proteins called Yops. YopH is a tyrosine phosphoprotein phosphatase related to eukaryotic tyrosine phosphatases. Less is known about the ten other Yops. All the Yops are secreted by a new secretion system which is also encoded by the pYV plasmid. This new system has also been encountered in other human pathogens such as *Shigella* and *Salmonella* but, surprisingly, also in plant pathogens such as *Pseudomonas solanacearum*. This system seems thus to be devoted to the secretion of virulence determinants. Yop secretion is not accompanied by the removal of a N-terminal signal sequence. It requires the presence of cytoplasmic individual chaperones called «Syc» proteins. Yops are not freely secreted in the extracellular compartment but rather «injected» into eukaryotic cells when the bacterium adheres at their surface. In the case of YopH, this presumably leads to dephosphorylation of some regulatory proteins and so, prevents the antibacterial response. This represents a new mechanism in microbial pathogenesis. The chromosome of *Y. enterocolitica* completes the virulence panoply of *Y. enterocolitica* by encoding Yst, a thermostable enterotoxin related to ST1 of *Escherichia coli* and to guanylin, an endogenous activator of the intestinal guanylyl cyclase.

TIRÉS À PART

G.R. Cornélis.