médecine/sciences 1997 ; 13 : 66-9

La toxine de Pasteurella multocida, un activateur de la mitogenèse et de la réorganisation du cytosquelette

Les souches toxigènes de *Pasteurella multocida** sont impliquées dans l'étiologie de la rhinite atrophique chez les animaux d'élevage et particulièrement chez le porc [1]. Cette maladie est caractérisée par la dégradation ostéolytique des cornets nasaux. La toxine de *Pasteurella multocida* (PMT) a été purifiée et séquencée. Elle est constituée d'un peptide simple de poids moléculaire élevé : 1 285 acides aminés, 146 kilodaltons. De plus, les techniques de purification par chromatographie d'affinité permettent de produire aujourd'hui des stocks de toxine biologiquement très active. Cette protéine possède une homologie structurale certaine avec d'autres protéines bactériennes dont les facteurs nécrotiques cytotoxiques CNF1 et CNF2 de *Escherichia coli*, ainsi que les toxines de *Bordetella pertussis*, *B. parapertussis* et *B. bronchiseptica*... L'existence d'une superfamille de toxines dermonécrotiques est effectivement proposée [2, 3].

Une toxine pas si toxique !

Les effets cytopathiques de la PMT sur les cellules épithéliales ou polarisées sont connus [1]. Par exemple, après injection intradermique chez des rongeurs, elle produit des lésions dermonécrotiques sévères. La toxine altère le phénotype des cellules de l'épithélium nasal (perte des cils, dépolarisation, métaplasie) en combinaison avec la toxine de *B. bronchiseptica* (pathogène coopératif), alors qu'elle interrompt la croissance et induit la rétraction des cellules pulmonaires embryonnaires et des cellules rénales de singe (Vero) cultivées en monocouche. Ses effets mitogènes et cytopathiques sur les cellules ostéoblastiques devront être analysés avec précision car ils semblent varier en fonction du stade de différenciation cellulaire [4]. Cependant, il a été vérifié que la toxine exerce une action positive sur la population des ostéoclastes. Chez des animaux de laboratoire infectés, nous avons observé que la PMT stimule anormalement la résorption osseuse en augmentant le nombre et la taille des ostéoclastes multinucléés [5] confirmant les données de la maladie porcine. Utilisant des os longs de souris fœtales maintenus en absence de sérum à l'aide d'un système de culture organotypique [6], nous avons montré que cette action ostéolytique s'exerce sur deux cibles différentes. La toxine stimule la résorption dans des radius et cubitus contenant des ostéoclastes mûrs ainsi que dans des métatarses dépourvus d'ostéoclastes et possédant des précurseurs ostéoclastiques (mitotiques et post-mitotiques) dans leur périoste. A l'aide d'une méthode de détection cytochimique de la phosphatase acide résistante au tartrate, nous avons aussi observé que la toxine agit en synergie avec le sérum de veau fœtal et la $1,25[OH]_2$ vitamine D_3 pour activer la résorption osseuse, stimulant la néoformation des ostéoclastes et de leurs précurseurs post-mitotiques immédiats (les deux types contiennent l'enzyme ; *figure 1*). Dans une autre série d'expériences, la PMT induisait la production de préostéoclastes et d'ostéoclastes dans des cultures de moelle osseuse [7]. Ensemble, ces résultats suggèrent que la PMT pourrait à la fois activer les ostéoclastes fonctionnels et induire la prolifération/différenciation des progéniteurs ostéoclastiques dérivant des cellules souches hématopoïétiques. En outre, ils indiquent que l'action cellulaire de la toxine s'exerce sur une(des) cible(s) ubiquitaire(s).

Un puissant mitogène

Cette idée que la PMT puisse agir sur différents types cellulaires se trouva vite renforcée par les analyses microscopiques faites sur des métatarses fœtaux cultivés en présence de toxine [6]. La PMT permet la survie des cellules du périoste et stimule la différenciation des cellules souches en adipoblastes aussi efficacement que le sérum. En outre, l'épaisseur du périoste augmente de façon extraordinaire du fait de la prolifération des fibroblastes/ostéoblastes après neuf jours de culture en présence de toxine seule (*figure 2*). De façon similaire, la PMT augmente très significativement le nombre de fibroblastes contaminants dans les cultures de moelle osseuse [7]. Ces données sont en accord avec une étude publiée par Rozengurt *et al.* (Londres, GB) [8] démontrant l'action mitogène de la PMT sur les fibroblastes murins Swiss 3T3 et autres lignées apparentées. Quatre articles publiés par le même groupe [9-12] mettent en lumière les effets de la PMT sur l'activation de la kinase FAK (*focal adhesion kinase*) ainsi que sur l'induction des signaux intracellulaires associés à la cascade des phospho-inositides, à l'activité protéine kinase C et à la mobilisation du Ca^{2+} à partir des compartiments de réserve. Leurs expériences ont aussi

* multocida *signifie mortel pour plusieurs.*

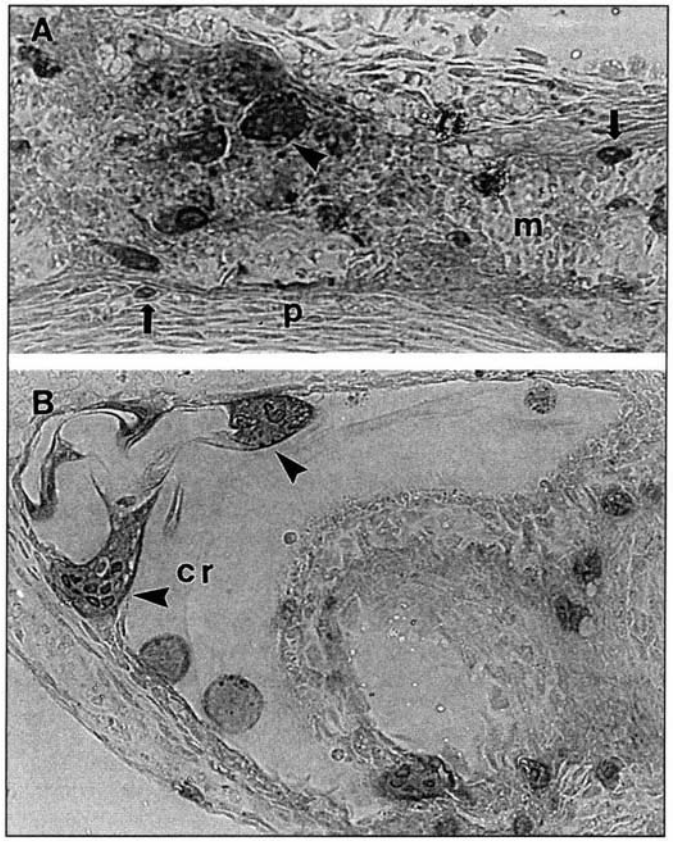

Figure 1. ***Détection de l'activité phosphatase acide résistante au tartrate dans des métatarses de souris fœtales de 16 jours. A.*** *diaphyse;* ***B.*** *métaphyse et cavité de résorption (cr). Les cellules positives apparaissent plus foncées. En combinaison avec d'autres agents ostéolytiques (ici du sérum bovin fœtal), la PMT stimule la néoformation de préostéoclastes mononucléés (cellules positives, indiquées par les flèches) dans le périoste (p) et d'ostéoclastes multinucléés (flèches triangulaires) dans la médulla (m) après neuf jours de culture. Aucun marquage n'apparaît dans les organes cultivés sans supplément (non illustré). (G x 680.)*

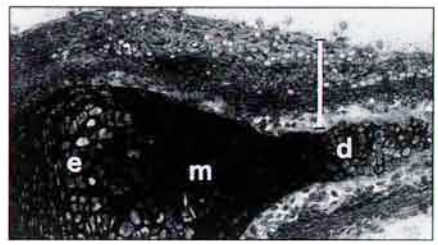

Figure 2. ***Métatarse de souris fœtale de 16 jours cultivé pendant neuf jours en présence de PMT.*** *Le cartilage non minéralisé apparaît très foncé (d: diaphyse; m: métaphyse; e : épiphyse). La PMT induit une augmentation importante du périoste en stimulant la prolifération rapide des fibroblastes et des ostéoblastes. Le trait blanc délimite l'épaisseur du périoste (environ 300 µm). Elle est cinq à six fois supérieure à celle des os cultivés en présence de sérum bovin fœtal seul (non illustré). (Coloration au bleu de toluidine, G x 580.)*

révélé que l'action de la toxine est contrecarrée par l'ajout de méthylamine, un agent lysosomotrophique qui bloque l'internalisation des récepteurs membranaires. Cela suggère que l'effet observé sur la synthèse d'ADN nécessiterait l'internalisation de la protéine. Nos travaux [13] indiquent que la PMT active la mitogenèse des fibroblastes 3T3 à faible dose, soit de 0,5 à 5 ng/ml, appuyant les résultats précédents [8] et les données recueillies à partir des cultures d'os fœtaux [6]. Son efficacité sur les fibroblastes isolés ou sur les fibroblastes du périoste paraît même supérieure à celle des régulateurs classiques que sont le sérum et les facteurs de croissance. Nous avons pu confirmer l'effet inhibiteur de la méthylamine sur la réponse mitogène des fibroblastes 3T3 à la PMT et avons constaté que l'ajout de gangliosides contrecarre aussi son action (inhibition compétitive). Ce dernier résultat, observé en présence des gangliosides de types GM_1, GM_2 ou GM_3, signifie que la toxine se fixe aux cellules par l'intermédiaire de cette classe particulière de glycolipides, comme cela a déjà été montré pour d'autres toxines [14]. Un tel mécanisme paraît vraisemblable car des observations ultrastructurales récentes montrent que les gangliosides GM_1 sont concentrés dans les *caveolae*, des domaines membranaires associés au phénomène de potocytose* [15]. Ces domaines, riches en cavéoline et en kinases de type Src, participeraient activement à la transmission des signaux mitogéniques [16]. Appuyant l'hypothèse d'une interaction PMT-gangliosides, des tests de liaison de PMT marquée à l'or colloïdal indiquent que l'ajout de gangliosides exogènes réduit le marquage au niveau des membranes [17]. La même étude révèle que les sites de liaison sont plus nombreux dans les *caveolae*. Les données actuelles indiquent que le mode de liaison de la PMT rappelle celui d'autres toxines bactériennes alors que le mécanisme de transmission intracellulaire du signal impliquerait des effecteurs associés à la voie de la protéine kinase C plutôt qu'à la voie dépendant de l'AMP cyclique.

Un réorganisateur du cytosquelette

Il est connu depuis peu que la toxine CNF2 de *E. coli*, de structure apparentée à celle de la PMT, induit la réorganisation du cytosquelette dans

* Caveolae : *compartiments membranaires d'endocytose dans lesquels se concentrent des petites molécules, pour être internalisées par un processus appelé potocytose.*

des cellules Hep2 en activant préférentiellement les petites protéines G de type Rho, membres de la famille Ras [18]. Ce résultat est particulièrement intéressant car la fonction centrale des protéines RhoA et Rac1 dans la séquence de réorganisation du réseau d'actine cortical a été décomposée dans des fibroblastes 3T3 induits à se diviser [19]. Le réseau cortical se fragmente et polymérise rapidement (induction des filopodes et du *ruffling*) par l'action de la protéine Cdc42 et celle de Rac1 sur un effecteur non identifié (une kinase ou peut-être une oxydase comme chez les phagocytes *(m/s n° 7, vol. 11, p. 1039)* [20, 21]). La protéine kinase C serait également impliquée lors de cet événement précoce car la phosphorylation de son substrat MARCKS(80K) *(m/s n° 2, vol. 9, p. 221)* enclenche la dépolymérisation du réseau d'actine périphérique [22] et l'enzyme optimalise la polymérisation des filaments [23]. Ensuite, les filaments d'actine se condensent pour former des fibres de stress, lesquelles convergent en des points de contact précis du cytosquelette et de la membrane plasmique, les adhérences focales, dont la formation dépend de l'activité RhoA [21]. Ce réarrangement du cytosquelette est effectivement caractéristique des cellules se rétractant et se préparant à la division mitotique. Afin de vérifier si la PMT agit sur la dynamique du cytosquelette, nous avons analysé la localisation de l'actine par marquage à la phalloïdine fluorescente dans des fibroblastes 3T3 [13] et des ostéoblastes quiescents réactivés par la toxine. La PMT suscite surtout, comme l'acide lysophosphatidique présent dans le sérum, la néoformation des fibres de stress bien qu'elle stimule aussi le *ruffling* membranaire *(figure 3)*. Il faut noter, toutefois, que la PMT exerce son effet sur la formation de fibres d'actine assez rapidement, dès la dixième minute d'incubation, comparée au sérum et à la bombésine dont les mêmes effets furent apparents après 15-30 minutes dans nos essais. L'effet de la PMT sur la rétraction des cellules est également rapide et intense. Ces résultats sont surprenants à première vue car les travaux de Staddon *et al.* (Londres, GB) [9, 10] suggèrent que le processus obligatoire d'internalisation de la PMT retarderait l'induction des signaux intracellulaires par la toxine (production d'inositol phosphates, mobilisation de Ca^{2+}, phosphorylation de FAK et des substrats de la protéine kinase C) ; en comparaison, les facteurs de croissance non internalisés activent directement les transducteurs membranaires. Toutefois, des essais réalisés plus tôt sur des cellules Balb/c 3T3 ont révélé que des vésicules transportant des toxines bactériennes sont présentes dans le cytoplasme après seulement cinq minutes d'incubation [24], appuyant l'idée d'un transport rapide. En étudiant l'effet de la méthylamine sur les cellules incubées avec la PMT, nous avons observé que l'agent lysosomotrophique bloque la formation des fibres de stress et la synthèse d'ADN. Curieusement, l'induction des fillipodes et du *ruffling* durant les premières minutes d'incubation est bien perceptible dans ces conditions alors qu'elle l'est difficilement en présence de toxine seule. Cela signifie peut-être que l'internalisation de la protéine est requise pour induire une réorganisation complète du réseau d'actine et la réponse mitogénique mais que certains événements précoces seraient indépendants de ce phénomène. Il est également possible que les effets observés découlent de la coopérativité de liaison et d'agrégation des récepteurs pour induire une réponse cellulaire complète puisqu'il a été suggéré plus tôt que la méthylamine préviendrait initialement l'agrégation des protéines de la membrane plasmique [25].

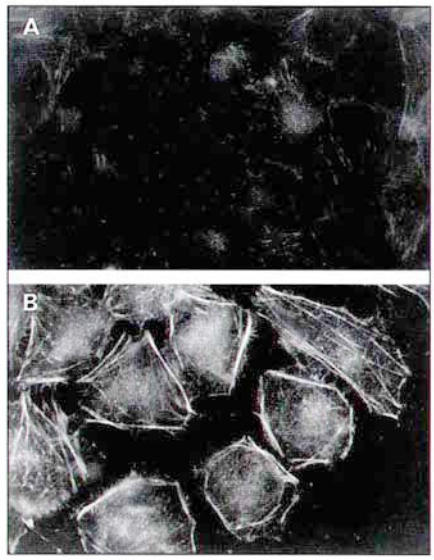

Figure 3. ***La PMT stimule la néoformation des fibres de stress et cause la rétraction du cytoplasme de cellules en culture. A.*** *Les ostéoblastes sont quiescents, étalés et contiennent peu de longues fibres d'actine (localisation à la phalloïdine fluorescente).* ***B.*** *Les ostéoblastes incubés deux heures avec la toxine sont rétractés et contiennent des fibres de stress. (G x 2 400.)*

Le lien cytosquelette-mitogenèse

En conclusion, quel lien existe-t-il entre la reconnaissance des protéines organisatrices du cytosquelette comme cibles privilégiées de la PMT, ses effets cytopathiques sur les cellules épithéliales et le potentiel mitogène de la toxine sur les fibroblastes ? D'une part, il est juste de souligner que la différence des réponses observées sur les cellules épithéliales et les fibroblastes appuie l'idée d'une relation étroite PMT-cytosquelette. En effet, il a été montré que les agents qui activent rapidement la redistribution de l'actine et la mitogenèse dans les fibroblastes induisent plutôt la dépolarisation et l'apoptose des cellules épithéliales. Ce dernier phénomène porte le nom d'*Anoikis* ou de mort induite par détachement du substrat [26]. D'autre part, s'il est vrai que la PMT active les protéines Rho, le lien cytosquelette-mitogenèse s'expliquerait car il semble exister une association fonctionnelle entre l'activation de Rho et la production des signaux dépendants du Ca^{2+}. Parmi les substrats reconnus ou potentiels de Rho, la phosphatidylinositol-3 kinase influence positivement la production de seconds messagers activant la protéine kinase C et la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire [19, 27]. Des études récentes [12, 28, 29] suggèrent en outre que l'activation de Rho et celle de la protéine kinase C par la toxine ou d'autres régulateurs constitueraient deux signaux primaires pour l'activation

ultérieure de FAK et de la protéine cytosquelettique paxilline.

En résumé, les propriétés *in vitro* de la PMT semblent indiquer que la protéine exerce son action biologique par l'intermédiaire d'un ou des substrat(s) ubiquitaire(s). L'implication de la bactérie *Pasteurella multocida* dans la rhinite atrophique serait donc liée à l'accumulation du micro-organisme dans l'environnement nasal et à l'extrême sensibilité de la population ostéoclastique à l'action de la toxine. Des travaux en cours permettront de vérifier si la PMT active la réorganisation du cytosquelette et l'activité fonctionnelle dans plusieurs types de cellules isolées (ostéoblastes, ostéoclastes, etc.) et d'étudier en outre son mode d'action sur différents effecteurs cytosoliques et membranaires des voies de transmission des signaux ■

RÉFÉRENCES

1. Foged NT. *Pasteurella multocida* toxin: the characterization of the toxin and its significance in the diagnosis and prevention of progressive atrophic rhinitis in pigs. *Acta Path Microb Immun Scand* 1992; 100 (suppl 25): 5-56.

2. Falbo V, Pace T, Picci L, Pizzi E, Caprioli A. Isolation and nucleotide sequence of the gene encoding cytotoxic necrotizing factor 1 of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1994; 61: 4909-14.

3. Walker KE, Weiss AA. Characterization of the dermonecrotic toxin in members of the genus *Bordetella*. *Infect Immun* 1994; 62: 3817-27.

4. Mullan PB, Lax AJ. *Pasteurella multocida* toxin is a mitogen for bone cells in primary culture. *Infect Immun* 1996; 64: 959-65.

5. Martineau-Doizé B, Caya I, Gagné S, Jutras I, Dumas G. Effects of *Pasteurella multocida* toxin on the osteoclast population of the rat. *J Comp Path* 1993; 108: 81-91.

6. Chailler P, Martineau-Doizé B. Co-stimulation of resorption and osteogenesis in fetal long bones in organ culture: effects of serum, vitamin D_3 and osteolytic toxin from *Pasteurella multocida* (abstract) *Am Soc Cell Biol Washington* 1995.

7. Jutras I, Martineau-Doizé B. Stimulation of osteoclast-like cell formation by *Pasteurella multocida* toxin from hemopoietic progenitor cells in mouse bone marrow cultures. *Can J Vet Res* 1996; 60: 34-9.

8. Rozengurt E, Higgins T, Chanter N, Lax AJ, Staddon JM. *Pasteurella multocida* toxin: potent mitogen for cultured fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 123-7.

9. Staddon JM, Chanter N, Alistair JL, Higgins TE, Rozengurt E. *Pasteurella multocida* toxin, a potent mitogen, stimulates protein kinase C-dependent and -independent protein phosphorylation in Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem* 1990; 265: 11841-8.

10. Staddon JM, Barker CJ, Murphy AC, Chanter N, Lax AJ, Michell RH, Rozengurt E. *Pasteurella multocida* toxin, a potent mitogen, increases inositol 1,4,5-trisphosphate and mobilizes Ca^{2+} in Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem* 1991; 266: 4840-7.

11. Murphy AC, Rozengurt E. *Pasteurella multocida* toxin selectively facilitates phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis by bombesin, vasopressin, and endothelin. *J Biol Chem* 1992; 267: 25296-303.

12. Lacerda HM, Lax AJ, Rozengurt E. *Pasteurella multocida* toxin, a potent intracellularly acting mitogen, induces $p125^{FAK}$ and paxillin tyrosine phosphorylation, actin stress fiber formation, and focal contact assembly in Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 439-45.

13. Dudet LI, Chailler P, Dubreuil JD, Martineau-Doizé B. *Pasteurella multocida* toxin stimulates mitogenesis and cytoskeleton reorganization in Swiss 3T3 fibroblasts. *J Cell Physiol* 1996; 168: 173-82.

14. Fishman PH. Role of membrane gangliosides in the binding and action of bacterial toxins. *J Membr Biol* 1982; 69: 85-97.

15. Parton RG. Ultrastructural localization of gangliosides; GM_1 is concentrated in caveolae. *J Histochem Cytochem* 1994; 42: 155-66.

16. Travis J. Cell biologists explore « tiny caves ». *Science* 1993; 262: 1208-9.

17. Pettit RK, Ackerman MR, Rimler RB. Receptor-mediated binding of *Pasteurella multocida* dermonecrotic toxin to canine osteosarcoma and monkey kidney (vero) cells. *Lab Invest* 1993; 69: 94-100.

18. Oswald E, Sugai M, Labigne A, Wu HC, Fiorentini C, Boquet P, O'Brien AD. Cytotoxic necrotizing factor 2 produced by virulent *Escherichia coli* modifies the small GTP-binding protein Rho involved in assembly of actin stress fibers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 3814-8.

19. Fort P, Vincent S. Transduction du signal mitogénique, cytosquelette et petites protéines G; vers un réseau de protéines GAP? *Med Sci* 1993; 9: 59-65.

20. Bokoch GM. Regulation of the human neutrophil NADPH oxidase by the Rac GTP-binding proteins. *Curr Op Cell Biol* 1994; 6: 212-8.

21. Zalcman G, Closson V, Honoré N, Olofsson B, Tavitian A. Participation de la cascade des gènes *Rho* à la régulation du cytosquelette: rôle possible dans les mécanismes d'oncogenèse. *Med Sci* 1995; 11: 1551-6.

22. Aderem A. The MARCKS Brothers: a family of protein kinase C substrates. *Cell* 1992; 71: 713-6.

23. Ohta Y, Akiyama T, Nishida E, Sakai H. Protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase induce opposite effects on actin polymerizability. *FEBS Lett* 1987; 222: 305-10.

24. Parton RG, Ockleford CD, Critchley DR. Tetanus toxin binding to mouse spinal cord cells: an evaluation of the role of gangliosides in toxin internalization. *Brain Res* 1988; 475: 118-27.

25. Morris RE, Manhart MD, Saelinger CB. Receptor-mediated entry of *Pseudomonas* toxin: methylamine blocks clustering step. *Infect Immun* 1983; 40: 806-11.

26. Ruoslahti E, Reed JC. Anchorage dependence, integrins and apoptosis. *Cell* 1994; 77: 477-8.

27. Kahn A. La transmission du signal en amont et en aval de Ras. *Med Sci* 1992; 8: 1097-9.

28. Flinn HM, Ridley AJ. Rho stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, p130 and paxillin. *J Cell Sci* 1996; 109: 1133-41.

29. Zhang C, Qiu HE, Krafft GA, Klein WL. Protein kinase C and F-actin are essential for stimulation of neuronal FAK tyrosine phosphorylation by G-proteins and amyloid beta protein. *FEBS Lett* 1996; 386: 185-8.

Pierre Chailler
Laure I. Dudet
Béatrice Martineau-Doizé

Groupe de recherche sur les maladies infectieuses du porc, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal C.P. 5000, Sainte-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6 Canada.

m/s ANNIVERSAIRE EN VIDÉO-CASSETTES

Les conférences de la journée du 10e anniversaire de *médecine/sciences* du 16 mars 1995 sont disponibles sur vidéo-cassettes auprès de :

ASSOCIATION DIFFUSION DES CONNAISSANCES
2, avenue Léon-Bernard,
35043 Rennes Cedex, France.

TIRÉS À PART

B. Martineau-Doizé.