

## FORMATION CONTINUE – ARTICLE DE SYNTHÈSE

**Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli* :****III) Production de toxines**

VAN BOST S., MAINIL J.

Département des maladies infectieuses et parasitaires – Bactériologie  
Faculté de Médecine vétérinaire – Université de Liège – Sart Tilman, Bât B43a – B4000 Liège

Correspondance : Professeur Jacques Mainil  
Tél. : 00-32-(0)4/366 40 50 - FAX: 00-32-(0)4/366 42 61  
Email : jg.mainil@ulg.ac.be

**RESUME :** L'espèce *Escherichia coli* est subdivisée en de nombreuses souches pathogènes pour l'homme et de nombreuses espèces animales sur base de la possession de propriétés ou de la production de facteurs spécifiques qui sont responsables de leur pouvoir pathogène. Ces souches pathogènes sont classiquement divisées en souches à tropisme intestinal (entérotoxigènes, entéro-pathogènes, entérohémorragiques, vérotoxigènes et entéro-invasives) et en souches à tropisme extra-intestinal (uropathogènes et invasives). Les souches invasives provoquent des septicémies et/ou des bactériémies avec localisations dans différents organes (infections systémiques). Si les propriétés et facteurs spécifiques de virulence des souches à tropisme intestinal sont relativement bien connus et caractérisés, ceux des souches à tropisme extra-intestinal le sont beaucoup moins, surtout chez les animaux.

Le but de cette série d'articles de revue est de présenter les connaissances sur les propriétés et facteurs spécifiques des souches à tropisme extra-intestinal : les adhésines et facteurs de colonisation, le franchissement des muqueuses et la survie dans le sang et les organes internes, les propriétés toxiques. Le quatrième article fera le point sur les souches invasives elle-mêmes, particulièrement les souches nécrotoxigènes.

Ce troisième article présente donc les connaissances actuelles sur les propriétés toxiques des souches invasives de colibacilles : endotoxines, facteurs cytotoxiques nécrosants, toxines cytolétales distendantes et toxines hémolytiques.

**PRODUCTION DE TOXINES**

La notion de production par les bactéries de substances dont les effets sont nocifs pour les tissus eucaryotes et qui sont responsables des lésions et signes cliniques, remonte aux débuts des connaissances sur les bactéries pathogènes (Van Heyningen, 1970). La première description d'une substance chimique à effets nocifs fut celle de la toxine diphtérique (Roux et Yersin, 1888); sa découverte fut rapidement suivie par celles des toxines tétanique par Faber en 1889 et botuliques par Van Ermengen en 1898 (Van Heyningen, 1970). L'origine du terme « toxine », employé par Roux et Yersin

(1888), est obscure, mais se trouve probablement dans le nom et adjectif « toxique » (grec: τοξικον, poison). Cependant, ce n'est qu'au début du 20<sup>e</sup> siècle que les mots « toxine », « antitoxine » et « toxoïde » sont utilisés de manière systématique.

**Classification**

Actuellement, les toxines bactériennes de nature protéique sont rassemblées sous le nom d'exotoxines, même si nombre d'entre elles sont localisées à l'intérieur du cytoplasme ou dans le périplasme, par opposition à ce que l'on dénomme l'endotoxine bactérienne, qui correspond au lipide A du lipopolysaccharide (LPS) des

bactéries Gram négatives. Les progrès des cultures cellulaires ont permis non seulement d'en décrire en grand nombre, mais aussi d'en étudier précisément les effets sur les cellules eucaryotes. Les progrès de la chimie et de la génétique ont aussi permis d'en purifier un grand nombre de manière de plus en plus aisée et d'en comprendre le déterminisme génétique. Paradoxalement, leur rôle *in vivo* n'a cependant été prouvé de manière irréfutable, en respectant les postulats moléculaires de Koch (Falkow, 1988), que pour un nombre relativement restreint (toxines diphtérique, tétanique, botulique et cholérique par exemple). Les raisons sont multiples depuis

l'absence de modèles *in vivo* jusqu'à l'absence d'effets réels démontrés dans les modèles disponibles, en passant par l'absence d'effets protecteurs des anticorps spécifiques (Rutter, 1988).

La classification des exotoxines bactériennes est au moins aussi confuse que celles des adhésines (Bonventre, 1970). La raison principale en est l'évolution des critères servant à cette classification. Le premier critère fut clinique: le bacille de la diphtérie produit la toxine diphtérique; celui du tétanos, la toxine tétanique; celui du botulisme, la toxine botulique; celui du choléra, la toxine cholérique; celui du charbon bactérien, la toxine charbonneuse; celui de la maladie de l'oedème chez le porcelet, le principe de la maladie de l'oedème.

L'essor des cultures cellulaires a, non seulement permis de mettre en évidence l'effet de nombreuses toxines, rassemblées sous le vocable de cytotoxines, mais a aussi induit le foisonnement de nouveaux noms selon la lignée utilisée et/ou l'effet observé: vérocytotoxines (VT), produites par *Shigella dysenteriae*, *Sh. sp* et *E. coli* et actives, entre autres, sur cellules Vero; toxines cytolétales distendantes («*Cytolethal Distending Toxins*» ou CDT) de diverses espèces bactériennes, dont *E. coli*, actives sur diverses lignées cellulaires; etc. L'action des toxines sur d'autres cellules cibles ont permis de parler de leucotoxines (globules blancs) et d'hémolysines (globules rouges).

Entretemps, afin de faciliter la mise en évidence des toxines, des tests *in vivo* ont aussi été développés, amenant de nouvelles dénominations: l'injection de toxines tétanique, botulique et de la maladie de l'oedème à des souris se traduisant par des signes nerveux divers, ces toxines ont été baptisées neurotoxines; l'injection des toxines produites par *Vibrio cholerae* et par les souches entérotoxigènes d'*E. coli* dans des anses intestinales ligaturées se traduisant par l'accumulation de fluides, ces toxines ont reçu le nom d'entérotoxines; l'injection de diverses toxines en intradermique, dont celles de *Pasteurella multocida* sérotype D et de *Bordetella bronchiseptica* responsables de la rhinite atrophique du porcelet, se traduisant par de la nécrose, ces toxines ont été dénommées dermonécrotines ou toxines dermonécrotiques; etc. La combinaison des résultats obtenus sur cultures

cellulaires et *in vivo* permet certaines définitions plus complètes: facteurs cytotoxiques nécrosants («*Cytotoxic Necrotising Factors*» ou CNF) d'*E. coli* qui tuent diverses lignées cellulaires et ont un effet dermonécrosant.

Mais bien d'autres critères de dénomination ont été utilisés au cours du temps:

- hommage à un savant: toxine Shiga (Stx) pour la vérocytotoxine de *Sh. dysenteriae*; ce nom est maintenant repris pour les diverses vérocytotoxines d'*E. coli*;
- nom de la bactérie: la perfringolysine de *Clostridium perfringens*; la toxine pertussique de *Bordetella pertussis*;
- le manque de connaissance à l'époque de leur description: l'exotoxine A de *Pseudomonas aeruginosa*; les toxines  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\iota$  de *Clostridium perfringens*; les toxines hémolytiques  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  de *Staphylococcus aureus*; la toxine Vir (= virulence) des souches septicémiques d'*E. coli* chez le veau et l'agneau, maintenant identifiée à la toxine CNF2; etc.

Les essais d'uniformisation les plus récents proposent de classer les toxines en fonction du mécanisme d'action, de la structure et de la génétique, ce qui permet de définir trois groupes principaux (tableau I) (Freer, 1988; Robertson, 1988; Rutter, 1988; Shewen, 1988; Salyers et Whitt, 1994; Krueger et Barbieri, 1995; Tweten, 1995; Welch, 1995; Barbieri et Pedersen, 2000; Salyers et Whitt, 2002):

- i) le premier groupe comprend des toxines qui interagissent avec des récepteurs cellulaires liés aux groupes majeurs d'histocompatibilité: il s'agit des immunotoxines ou superantigènes;
- ii) le deuxième groupe comprend des toxines à activité sur la membrane cytoplasmique des cellules eucaryotes: phospholipases à action sur les glycérophospholipides ou sur les sphingolipides, toxines formant des pores membranaires des bactéries Gram positives, aussi appelées hémolysines labiles à l'oxygène et des bactéries Gram négatives, aussi appelées cytotoxines RTX («*Repeats in ToXins*»);
- iii) le troisième groupe comprend des toxines à activité intracellulaire et à structure dimérique (une sous-unité A

à activité toxique, pour une à 8 sous-unités B, à activité de liaison), synthétisées soit sous forme d'un précurseur unique scindé ultérieurement, soit séparément par deux gènes différents. La sous-unité A donne naissance à la toxine active dont les mécanismes d'activité reconnus jusqu'à présent sont multiples: ADP-ribosylation depuis le nicotinamide dinucléotide (NAD) jusqu'à la cible, activant ou inhibant celle-ci; hydrolyse d'un ARN ribosomal provoquant une inhibition de la synthèse protéique; inhibition de la libération d'acétyl-choline à la plaque neuromotrice résultant en une paralysie flasque; inhibition de la libération d'un inhibiteur de la transmission de l'influx nerveux à hauteur des synapses centrales des nerfs moteurs. Mais, certaines de ces toxines à activité intracellulaire sont de structures mono- ou trimériques: toxines monomériques dermonécrotiques de *Pasteurella multocida* sérotype D et de *Bordetella bronchiseptica* et CNF d'*E. coli*; toxines trimériques charbonneuse produite par *Bacillus anthracis* et cytolétales distendantes (CDT) de diverses espèces bactériennes, dont *E. coli*.

Cette classification ne tient cependant pas compte des toxines peptidiques, comme par exemple les entérotoxines STa et STb des souches entérotoxigènes d'*E. coli*.

### Endotoxines des bactéries Gram négatives

Par endotoxine, il est fait référence à une molécule de nature lipidique (lipide A) de la paroi (membrane externe) des bactéries Gram négatives qui est libérée après la lyse des bactéries. Elle fait partie du lipopolysaccharide (LPS) qui est également composé d'un oligosaccharide (= noyau) et d'un polysaccharide spécifique, dont la variabilité forme la base des antigènes somatiques ou O. Bien que l'endotoxine ne soit pas directement le sujet de cette revue, son implication possible dans certaines manifestations cliniques lors d'infections généralisées mérite qu'on lui accorde quelques lignes (Salyers et Whitt, 1994; Whitfield *et al.*, 1994; Proctor *et al.*, 1995; Hull, 1997).

### Rôle en pathologie

Les effets nocifs attribués au lipide A sont multiples et varient en fonction de l'espèce animale, du lieu de l'in-

Tableau I : Classification la plus récente des exotoxines bactériennes (d'après Salyers et Whitt, 2002)

<b><u>Classe I</u></b>	Autres noms	Superantigènes ou immunotoxines
	Activité	Interaction avec le complexe majeur d'histocompatibilité II
	Rôle dans la cellule	Production de cytokines par lymphocytes T
	Rôle chez l'hôte	Apparition de fièvre et choc toxique
	Exemples	« <i>Toxic shock syndrome</i> » par <i>Staphylococcus aureus</i> Entérotoxine de <i>Staphylococcus aureus</i>
<b><u>Classe II</u></b>	Autres noms	Toxines à activité membranaire
	<b><u>Sous-classe 1</u></b>	
	Activité	Hydrolyse des phospholipides de la membrane cytoplasmique
	Rôle dans la cellule	Lyse cellulaire
	Rôles chez l'hôte	Gangrène, lyse tissulaire, extension de l'infection
	Exemple	Toxine $\alpha$ de <i>Clostridium perfringens</i>
	<b><u>Sous-classe 2</u></b>	
	Activité	Formation de pores dans la membrane cytoplasmique
	Rôles dans la cellule	Lyse cellulaire et/ou du phagosome
	Rôles chez l'hôte	Destruction des macrophages, passage transcellulaire
	Exemples	Hémolysines de <i>Mannheimia haemolytica</i> et de <i>Listeria monocytogenes</i>
<b><u>Classe III</u></b>	Autres noms	Toxines intra-cytoplasmiques de type A-B
	<b><u>Sous-classe 1</u></b>	
	Activité	ADP <sup>a</sup> -ribosylation de la cible avec hyper- ou inactivation
	Rôles dans la cellule	(a) Arrêt de la synthèse des protéines et mort cellulaire (b) Surproduction d'AMP <sup>b</sup> cyclique
	Rôles chez l'hôte	(a) Production de tissu nécrotique et de fausses membranes (b) Hypersécrétion d'eau et d'électrolytes et diarrhée
	Exemples	(a) Toxine de <i>Corynebacterium diphtheriae</i> (b) Entérotoxines de <i>Vibrio cholerae</i> et thermolabile d' <i>Escherichia coli</i>
	<b><u>Sous-classe 2</u></b>	
	Activité	Clivage d'un ARN ribosomal
	Rôle dans la cellule	Arrêt de la synthèse des protéines et mort cellulaire
	Rôle chez l'hôte	?
	Exemples	Vérocytotoxines de <i>Shigella dysenteriae</i> et d' <i>Escherichia coli</i>
	<b><u>Sous-classe 3</u></b>	
	Activité	Protéolyse
	Rôle dans la cellule	Hydrolyse des synaptobrevines, constituants protéiques des vésicules présynaptiques responsables de la libération des neuro-transmetteurs ou inhibiteurs
	Rôle chez l'hôte	Perturbation de la transmission de l'influx nerveux moteur
	Exemples	Toxines de <i>Clostridium tetani</i> et <i>C. botulinum</i>
<b><u>Autres</u></b>	Autre nom	Toxines peptidiques
	Activité	Interaction avec un récepteur membranaire spécifique
	Rôle dans la cellule	Activation de la production de GMP <sup>c</sup> cyclique
	Rôle chez l'hôte	Hypersécrétion d'eau et d'électrolytes
	Exemple	Entérotoxine thermostable de type a d' <i>Escherichia coli</i>

<sup>a</sup> ADP = Adénine Dinucléotide Phosphate

<sup>b</sup> AMP = Adénosine Mononucléotide Phosphate

<sup>c</sup> GMP = Guanosine Mononucléotide Phosphate

fection et de l'espèce bactérienne (= choc septique ou endotoxinique). Bien que l'injection intraveineuse de LPS permette la reproduction de ces signes cliniques, il est difficile d'affirmer l'importance réelle en clinique, sauf dans les cas d'infections chroniques ou de morts bactériennes massives avec libération brutale d'une grande quantité de LPS dans la circulation sanguine. Les espèces les plus sensibles aux effets de l'endotoxine sont l'homme, les équins, les porcs, les bovins, les ovins, les caprins et les chats. Les chiens et les lapins sont relativement résistants.

### Relation structure/activité

De nombreuses recherches au cours de ces dernières années ont permis de mieux connaître la relation structure/activité du lipide A du LPS dont le mécanisme d'action peut se résumer en un mot: immunotoxicité. Les macrophages sont capables de lier le lipide A isolé sur un ou plusieurs récepteurs membranaires, après la formation d'un complexe entre le LPS et une «LPS-binding protein» sérique. Suite à cette liaison, une cascade d'événements membranaires et cytoplasmiques est initiée dans le macrophage, cascade qui aboutit à la libération de TNF- $\alpha$ , d'IL-1, d'IL-6, d'IL-8 et du «platelet-activating factor». Ces cytokines provoquent à leur tour la production de prostaglandines ainsi que l'activation de la cascade du complément et de celle de la coagulation. Les différents intermédiaires provoquent l'apparition de fièvre et d'hypotension généralisée suite à l'augmentation de la perméabilité vasculaire, à l'effet dépressur sur la contraction cardiaque et à la vasodilatation. Des coagulations intravasculaires disséminées (CIVD), de l'hyperglycémie, de la diarrhée sont aussi observées. L'ensemble de ces phénomènes conduisent à la prostration, au choc, au coma et à la mort.

### Mise en évidence

La mise en évidence de l'endotoxine peut se faire *in vivo*, par la production de fièvre chez le lapin après injection, et *in vitro*, par le test de gélification d'extraits de limule ou par un test d'activation du complément (Levin *et al.*, 1970; Cooper *et al.*, 1971; Tomasulo *et al.*, 1977; Meyers *et al.*, 1982).

### Les facteurs cytotoxiques nécrosants

Si les facteurs cytotoxiques nécrosants (ou toxines CNF) sont aujourd'hui bien connues sur le plan moléculaire, leur rôle *in vivo* reste toujours un grand sujet de discussion.

### Historique

Le premier acte consiste en la mise en évidence, dans les années '70, en Grande-Bretagne, d'une toxine (Vir) codée par des gènes localisés sur un plasmide (Vir) dans des souches septicémiques ovines et bovines. Certains plasmides Vir confèrent à des souches *E. coli* K12 de laboratoire, dans lesquelles ils ont été transférés, des propriétés de survie et d'invasion chez des souris et des poulets après injection par voie parentérale (Smith, 1974; 1975; 1978).

Le deuxième acte commence, au début des années '80, en Italie, par la description d'une cytotoxine produite par des souches d'*E. coli* isolées d'enfants diarrhéiques (Caprioli *et al.*, 1983). Cette toxine, présente dans les extraits bactériens, provoque l'apparition de cellules géantes multinucléées dans diverses lignées de cellules (CHO, Vero, HeLa, HEp-II), ainsi que de la nécrose après injection dans le derme de lapin, et tue la souris après injection par voie parentérale (De Rycke *et al.*, 1989; De Rycke et Plassiart, 1990). Cette toxine fut dénommée «Cytotoxic Necrotizing Factor» (Caprioli *et al.*, 1983; 1987).

Le troisième acte débute, quelques années plus tard, en France, par l'isolement à partir de matières fécales de veaux diarrhéiques d'*E. coli* productrices d'une cytotoxine semblable à la toxine CNF rapportée antérieurement (De Rycke *et al.*, 1987). Sa cytotoxicité est moins prononcée (l'effet de multinucléation est moins prononcé et les cellules sont plus allongées) et n'est que partiellement neutralisée par un immunosérum dirigé contre la toxine CNF; par contre, l'effet nécrotique induit par cette nouvelle toxine est plus marqué chez le lapin et s'exerce aussi sur la patte de la souris après injection dans le coussinet plantaire (De Rycke *et al.*, 1987; 1990). L'existence de deux toxines CNF, CNF1 identifiée par Caprioli et collaborateurs (Caprioli *et al.*, 1983; 1987), CNF2 identifiée par De Rycke et collaborateurs (De Rycke *et al.*, 1987), s'est dès lors imposée.

Le quatrième et dernier acte de cette histoire se joue, à nouveau en France, fin des années '80/ début des années '90 et permet d'identifier la toxine CNF2 à la toxine Vir de Smith et collaborateurs (Smith, 1974; 1975; Oswald *et al.*, 1989; Oswald et De Rycke, 1990). Peu de temps après, le nom d'*E. coli* nécrotoxino-gène (NTEC) est proposé par une équipe espagnole (Blanco *et al.*, 1993).

### Description

La toxine CNF1 est une protéine monomérique de 115 kDa en SDS-PAGE, qui exerce à la fois les effets de multinucléation et de nécrose. Sa dose létale 50% (LD50) pour la souris après injection par voie parentérale est de 20 ng. La toxine CNF2 est une protéine monomérique de 110 kDa en SDS-PAGE qui exerce à la fois les effets de multinucléation et de nécrose, y compris de la patte de la souris. Bien que différentes, ces toxines montrent des réactions croisées partielles en immunoblot et en neutralisation de l'effet cytotoxique. En effet, les séquences prédites de 1014 acides aminés sont identiques à 84% et apparentées à 90% (De Rycke *et al.*, 1999).

Les toxines CNF sont apparentées à deux autres toxines bactériennes à activité dermonécrotique: celles des souches de *Pasteurella multocida* sérotype D (PMT) associées à la rhinite atrophique du porcelet et de *Bordetella pertussis* et *Bordetella bronchiseptica* (DNT) (De Rycke *et al.*, 1999; Horiguchi, 2001). Plus récemment, des toxines CNF-like produites par *Vibrio fischeri* et *Yersinia pseudotuberculosis* ont été décrites ainsi que des séquences *cnf*-like dans *Yersinia pestis*, élargissant ainsi cette famille de toxines (Lin *et al.*, 1998; Lockman *et al.*, 2002).

### Rôle en pathologie

Aucun rôle ne peut formellement être attribué aux toxines CNF aujourd'hui, même si diverses expériences ont été effectuées *in vivo* chez diverses espèces animales. Si la toxine CNF1 a été rapidement impliquée dans le développement de troubles nerveux suite à des oedèmes et hémorragies cérébraux, et digestifs avec diarrhée muqueuse, après inoculation intraveineuse à des agneaux (De Rycke et Plassiart, 1990), les résultats obtenus avec des souches NTEC et leurs mutants ne sont pas aussi probants.

Deux souches NTEC1 provoquent de l'entérite et de l'entérocolite chez des porcelets nouveau-nés, après inoculation expérimentale, causant une diarrhée sanguinolente, une bactériémie avec localisation aux poumons et une mortalité relativement élevée (Wray *et al.*, 1993). Récemment, une bactériémie avec localisation aux poumons a été reproduite chez des porcelets axéniques, mais sans entérite, ni diarrhée, tandis que des porcelets conventionnels s'avéraient moins sensibles (Clément, 1997 ; Fournout *et al.*, 2000). Cependant, aucun rôle pour la toxine CNF1 n'a pu être clairement démontré, puisque les souches mutantes alléliques dans le gène *cnf1* produisent les mêmes effets (Fournout *et al.*, 2000). Des résultats similaires ont été obtenus dans un modèle de reproduction expérimentale de diarrhée chez le lapin au moyen de souches NTEC1 sauvages et de leurs mutants alléliques (Elliott *et al.*, 1998). Dans le modèle murin d'infection urinaire ascendante, la comparaison de la virulence de souches uropathogènes humaines NTEC1 mutées dans le gène *cnf1* et de celle des souches sauvages a aussi donné des résultats peu probants, voire contradictoires (Johnson *et al.*, 2000 ; Rippere-Lampe *et al.*, 2001).

En ce qui concerne les souches NTEC2 et la toxine CNF2, un modèle expérimental a permis la reproduction de diarrhée et de bactériémie chez des veaux nouveau-nés, avec localisation dans divers organes internes, dont les poumons (Van Bost et Mainil, 1999 ; Van Bost *et al.*, 2001). Les mêmes expériences avec des mutants alléliques dans le gène *cnf2* indiquent que la toxine CNF2 jouerait un rôle dans l'apparition de diarrhée (Van Bost *et al.*, 2003). Cette possible activité diarrhéogène de la toxine CNF2 pourrait être reliée à l'activité entérotoxique détectée en anses intestinales ligaturées (Gyles, 1994).

L'élucidation du rôle *in vivo* des toxines CNF viendra peut-être de la connaissance de leur activité *in vitro* sur cellules en culture. Les toxines CNF activent de manière permanente, par déamidation d'un résidu Glutamine, certains membres (Rho, Rac, Cdc42 et G25K) d'une famille de GTPases, appelée Rho, qui régissent la physiologie du cytosquelette (Oswald *et al.*, 1994b ; Flatau *et al.*, 1997 ; Schmidt *et al.*, 1997 ; De Rycke *et al.*, 1999 ; Lerm *et al.*, 1999 ;

Sugai *et al.*, 1999 ; Boquet, 2001 ; Horiguchi, 2001). Les conséquences dans les cellules Vero, HeLa, HEP-II et autres (cellules vésicales, endothéliales et intestinales) en culture, de cette activation sont, entre autres, une réorganisation des fibres d'actine en longs et épais filaments appelés fibres de stress, une apparition de replis membranaires, une activation de la synthèse d'ADN et une stimulation de cellules au repos à entrer en phase S du cycle cellulaire de la mitose (De Rycke *et al.*, 1999 ; Boquet, 2001 ; Horiguchi, 2001). La mort cellulaire par apoptose s'ensuit (De Rycke *et al.*, 1996 ; Mills *et al.*, 2000). Une augmentation de la perméabilité de monocouches cellulaires d'origine intestinale a aussi été remarquée ; elle pourrait être à l'origine des diarrhées observées *in vivo* (Gerhard *et al.*, 1998). L'induction de cytokines pro-inflammatoires pourrait aussi jouer un rôle dans l'apparition de diarrhée *in vivo* (Falzano *et al.*, 2003). Cependant, les résultats publiés peuvent être contradictoires et la comparaison des effets cytotoxiques des souches NTEC1 sauvages et de leurs mutants sur cellules en culture donne souvent des résultats peu convaincants et difficiles à interpréter (De Rycke *et al.*, 1999 ; Boquet, 2001 ; Horiguchi, 2001). Ces divergences peuvent trouver leur origine dans le rôle central que jouent les membres de la famille Rho dans le métabolisme cellulaire (Ridley, 1996). Il reste donc beaucoup d'études à réaliser avant de comprendre les effets de CNF1 et CNF2 sur les cellules et de transposer ces résultats *in vivo*.

Ces activités intracellulaires de réorganisation du cytosquelette, de formation de fibres de stress et d'apparition de replis membranaires seraient à l'origine de l'acquisition de capacités de phagocytose de particules de latex, de corps apoptotiques ou de bactéries non invasives par ces cellules en culture après 48 heures d'exposition (Donnenberg et Welch, 1996 ; De Rycke *et al.*, 1999 ; Boquet, 2001 ; Horiguchi, 2001 ; Travaglionne *et al.*, 2002). Inversement, des mutants alléliques dans le gène *cnf1* résistent mieux à la phagocytose par des neutrophiles *in vitro* par rapport à la souche sauvage (Rippere-Lampe *et al.*, 2001). L'acquisition de cette capacité de phagocytose permettrait l'entrée des souches NTEC, par exemple dans les entérocytes, et, après multi-

plication et transcytose, l'envahissement de l'organisme. Par la suite, les toxines CNF pourraient faciliter le franchissement des endothéliums vasculaires et favoriser l'envahissement des organes internes, comme dans les problèmes de méningites. Cependant, il n'y a aucune évidence actuellement de telles activités *in vivo*, ni dans le tractus digestif, ni dans le tractus urinaire, ni à hauteur du système nerveux central (Donnenberg et Welch, 1996 ; De Rycke *et al.*, 1999 ; Boquet, 2001).

### Déterminisme génétique

Les toxines CNF1 et CNF2 sont, chacune, codées par un gène de structure dont le G+C% est de 35% alors que celui d'*E. coli* oscille entre 48 et 52%, ce qui signe probablement leur origine étrangère. Le gène *cnf1* est localisé sur un îlot de pathogénicité chromosomique (Pai-5), à côté de gènes codant pour des adhésines fimbriaires de la famille P (*prs*) et pour une hémolysine  $\alpha$  (*hly*). A l'opposé, le gène *cnf2* est localisé sur un plasmide transférable de type F-like et de haut poids moléculaire, qui a été identifié au plasmide Vir, en compagnie d'autres gènes codant pour des adhésines F17 (= adhésine Vir), pour une aérobactine et/ou pour la résistance à l'activité bactéricide du complément (Smith, 1974 ; Oswald *et al.*, 1989 ; Falbo *et al.*, 1992 ; Oswald *et al.*, 1994a ; 1994b ; De Rycke *et al.*, 1999 ; Dozois et Curtiss, 1999 ; Boquet, 2001 ; Horiguchi, 2001). L'homologie des séquences des gènes *cnf1* et *cnf2* est de 85,7% (Oswald *et al.*, 1994b). Les études sur cellules en culture ont montré que les toxines CNF, qui ne possèdent pas de peptide signal, ne sont pas présentes dans les surnageants de culture, mais seulement dans des extraits bactériens. Les mêmes études ont cependant confirmé qu'au contact de cellules eucaryotes, les toxines CNF sont internalisées dans ces cellules eucaryotes (De Rycke *et al.*, 1999). Mais leur système de sécrétion reste inconnu (Horiguchi, 2001).

La séquence de la toxine CNF1 peut être divisée en trois domaines : le premier qui s'étend des acides aminés 1 à 190 comprend le domaine de liaison à la cellule eucaryote ; le deuxième qui s'étend des acides aminés 191 à 720 correspond à des régions à forte hydrophobicité et pourrait représenter un domaine pour le franchissement de la membrane de la vésicule d'endocy-

tose; le troisième domaine, allant des acides aminés 721 à 1014, est responsable des fonctions catalytiques, et donc cytotoxiques de la protéine (De Rycke *et al.*, 1999; Fabbri *et al.*, 1999; Boquet, 2001; Horiguchi, 2001). La toxine CNF1 entre dans la cellule eucaryote par endocytose, après liaison à un récepteur non identifié et probablement ubiquiste vu le grand spectre cellulaire de la toxine, et son domaine catalytique est ensuite libéré dans le cytoplasme, sans qu'un site de clivage ait pu être mis en évidence à ce jour (Boquet, 2001; Horiguchi, 2001). La relation structure/activité de CNF2 est similaire très probablement, comme le sont celles des toxines dermonécrotiques de *Pasteurella multocida* et de *Bordetella bronchiseptica* (De Rycke *et al.*, 1999; Boquet, 2001; Horiguchi, 2001).

L'expression du gène *cnf1* est soumise à des régulations aux niveaux transcriptionnel et traductionnel. La régulation transcriptionnel dépend de la transcription de l'opéron *hlyCABD* qui code pour l'hémolysine  $\alpha$  et auquel le gène *cnf1* est étroitement associé sur l'îlot de pathogénicité Pai V (Landraud *et al.*, 2003). Les régulations traductionnelles dépendent des codons 6 à 20 (contrôle positif) et 45 à 48 (contrôle négatif) de la séquence du gène *cnf1* lui-même (Fabbri *et al.*, 1999). La régulation de l'expression du gène *cnf2* n'a pas été étudiée à ce jour.

#### Mise en évidence

La production des toxines CNF1 ou CNF2 est recherchée par la mise en évidence, à partir d'extraits bactériens, de cytotoxicité avec neutralisation spécifique (Caprioli *et al.*, 1983; De Rycke *et al.*, 1987; 1990), dermonécrotiques chez l'animal (De Rycke *et al.*, 1989; 1990), ou ELISA (Tabouret et De Rycke, 1990; Oswald *et al.*, 1994c). Des tests génétiques au moyen de sondes ou de PCR existent aussi (Falbo *et al.*, 1993; Oswald *et al.*, 1994a; Mainil *et al.*, 1997; 2001).

#### Les toxines cytolétales distendantes

À l'instar des toxines CNF, les toxines cytolétales distendantes (CDT) sont également bien caractérisées sur le plan moléculaire, alors que leur rôle *in vivo* reste énigmatique.

#### Historique

Les toxines CDT furent décrites pour la première fois à la fin des années '80, suite à l'observation d'une distension progressive de cellules HeLa, HEp-II et CHO en culture, suivie d'un effet cytotoxique létal (d'où le nom « *Cytolethal Distending Toxins* », ou CLDT, ou CDT), après une incubation de 4 à 5 jours en présence de surnageants de cultures de diverses souches d'*E. coli* d'origine humaine et porcine, de *Sh. dysenteriae* type 2, de *Sh. boydii* ou de *Campylobacter* spp (Johnson et Lior, 1987a; 1987b; 1988a; 1988b). Des propriétés similaires furent ensuite observées avec les surnageants de cultures d'*Haemophilus ducreyi* (Cope *et al.*, 1997), d'*Actinobacillus actinomycescomitans* (Sugai *et al.*, 1998) et d'*Helicobacter* sp. (Chien *et al.*, 2000; Young *et al.*, 2000; Kostia *et al.*, 2003). Des variants des premières toxines CDT produites par *E. coli* ont aussi été décrites par la suite dans la classe des souches nécrotoxigènes d'origine humaine et animale et dans celle des souches entérohémorragiques du sérotype O157 (Pérès *et al.*, 1997; De Rycke *et al.*, 1999; De Rycke et Oswald, 2001; Janka *et al.*, 2003; Toth *et al.*, 2003).

#### Description

Les toxines CDT forment en fait une famille comprenant de multiples membres dont les sept suivants ont été formellement identifiés jusqu'à présent, après clonage de leurs gènes: CDT-I, CDT-II, CDT-III et CDT-IV produites par *E. coli* (Pickett *et al.*, 1994; Scott et Kaper, 1994; Pérès *et al.*, 1997; De Rycke *et al.*, 1999; Pickett et Whitehouse, 1999; Toth *et al.*, 2003); CDT-s produite par *Sh. dysenteriae* (Okuda *et al.*, 1995); CDT-c produite par *Campylobacter jejuni* (Pickett *et al.*, 1996); et CDT-h produite par *Haemophilus ducreyi* (Cope *et al.*, 1997). Seuls les variants CDT-III et CDT-IV sont produits par des souches NTEC (Pérès *et al.*, 1997; De Rycke *et al.*, 1999; Toth *et al.*, 2000a; 2000b; De Rycke et Oswald, 2001; Clark *et al.*, 2002; Toth *et al.*, 2003).

L'activité des CDT requiert la production et l'assemblage de trois protéines, CDTA, CDTB et CDTC, dont les poids moléculaires en SDS-PAGE sont respectivement de 27 kDa, 30 kDa et 20 kDa (Comayras *et al.*, 1997). Pour tous les auteurs, la sous-

unité B est le principe actif et possède une activité enzymatique de type désoxyribonucléase. Pour la plupart des auteurs, la sous-unité C intervient dans la liaison au récepteur cellulaire, qui est suivie d'une endocytose clathrine-dépendante de la sous-unité B et le rôle de la sous-unité A est peu compris (modification des sous-unités B et/ou C pour les activer ?) (Cortes-Bratti *et al.*, 2000; Deng *et al.*, 2001; De Rycke et Oswald, 2001; Elwell *et al.*, 2001; Lara-Tejero et Galan, 2001; Frisan *et al.*, 2002). Par contre, certains auteurs attribuent le rôle de liaison au récepteur à la sous-unité A et un rôle dans la cytotoxicité de CDT à la sous-unité C, en conjonction avec la sous-unité B (Frisk *et al.*, 2001; Mao et Di Rienzo, 2002). Ces divergences peuvent provenir de l'étude de toxines CDT différentes sur des modèles cellulaires différents.

Les comparaisons des séquences déduites en acides aminés des trois sous-unités de CDT-I, CDT-II, CDT-III, CDT-s et CDT-c montrent des identités entre 22 % et 93 % et des similarités entre 48 % et 96 %. Les toxines CDT ne montrent cependant aucune homologie significative avec d'autres séquences protéiques bactériennes présentes dans les banques de données (Pérès *et al.*, 1997; Oswald, communication personnelle). Par contre, des homologies de séquence, de structure et de fonction ont été trouvées avec l'enzyme DNase I des cellules de mammifères (Elwell et Dreyfus, 2000; Lara-Tejero et Galan, 2000; Frisk *et al.*, 2001).

#### Rôle en pathologie

Les souches d'*E. coli* productrices de toxines CDT sont associées à des troubles intestinaux et extra-intestinaux chez l'homme et les animaux domestiques. Celles productrices des toxines CDT-I et CDT-II sont essentiellement isolées chez l'homme et peuvent posséder d'autres propriétés pathogènes, comme la production de lésions d'attachement et d'effacement ou de toxines shiga. Celles productrices des toxines CDT-III et CDT-IV sont des souches NTEC2 et NTEC1, respectivement, isolées d'humains et d'animaux (Nataro et Kaper, 1998; De Rycke *et al.*, 1999; Okeke *et al.*, 2000; Toth *et al.*, 2000a; 2000b; Ghilardi *et al.*, 2001; Clark *et al.*, 2002; da Silva et da Silva Leite, 2002; Starcic *et al.*, 2002; Janka *et al.*, 2003; Toth *et al.*, 2003).

Comme pour les toxines CNF, la compréhension du rôle des toxines CDT pourrait venir de la connaissance de leurs mécanismes moléculaires d'action sur des cultures cellulaires. Pour rappel, les activités des toxines CNF sur des cellules en culture (HeLa ou HEp-II) sont l'apparition de fibres de stress, l'activation de la synthèse d'ADN et la stimulation de cellules au repos à entrer en phase S de la mitose provoquant l'apparition de cellules géantes multinucléées (De Rycke *et al.*, 1999). Sur ces mêmes cellules, qui sont non différenciées et se divisent très activement, les toxines CDT provoquent un blocage du cycle cellulaire et de la division du noyau entre la phase G2 et la phase M de la mitose, provoquant l'apparition de cellules géantes mononucléées. Ces cellules entrent en apoptose après 4 à 5 jours. Par contre, sur des cellules LLC-PK1 différenciées, polarisées et qui ne se divisent plus, les toxines CDT, seules, n'ont aucun effet (Aragon *et al.*, 1997; Pérès *et al.*, 1997; Cortes-Bratti *et al.*, 1999; De Rycke *et al.*, 1999; De Rycke et Oswald, 2001; Frisan *et al.*, 2002).

Sur le plan moléculaire, l'action des toxines CDT provoque l'accumulation de la forme phosphorylée inactive d'un régulateur du cycle cellulaire, cdc2. Cette accumulation serait la conséquence de l'action désoxyribonucléase de la sous-unité B des toxines CDT. En effet, les dommages à l'ADN sont détectés par la machinerie du «DNA damage checkpoint» qui arrête de cette manière le processus de la mitose et induit par la suite la transcription de gènes réparateurs (Elledge, 1996; Comayras *et al.*, 1997; Paulovitch *et al.*, 1997; Frisan *et al.*, 2002).

Lorsque des souches nécrotogènes (NTEC1/NTEC2) produisant les toxines CNF1/CNF2 et CDT-IV/CDT-III, respectivement, sont mises en présence de cellules HeLa, des cellules géantes contenant des fibres de stress et mononucléées apparaissent après une phase initiale d'adhérence (De Rycke *et al.*, 1996; Pérès *et al.*, 1997). Si la même culture de souches NTEC2 est mise en présence des cellules LLC-PK1 différenciées et au repos, les mêmes types de cellules géantes apparaissent alors que, seule, la toxine CDT-III était inactive (De Rycke *et al.*, 1999; De Rycke et Oswald, 2001). Il apparaît donc que les toxines CNF et CDT agissent de manière synergique sur cellules LLC-

PK1 : les toxines CNF, de par leur activité mitogène, réactivent le cycle de ces cellules au repos et les font entrer en phase S du cycle au cours duquel elles sont bloquées à la transition G2/M par les toxines CDT, comme le sont les cellules HeLa en présence des toxines CDT seules (De Rycke *et al.*, 1999; De Rycke et Oswald, 2001). Ces modifications sont suivies de mort cellulaire par apoptose après 4 à 5 jours d'incubation (De Rycke *et al.*, 1996).

Si ces actions sur le cycle cellulaire s'avéraient transposables *in vivo*, elles pourraient s'appliquer à hauteur des épithéliums, comme celui de l'intestin, d'une part sur les cellules qui sont actives (action de CDT seule sur le cycle cellulaire, action de CNF sur le cytosquelette) et d'autre part sur celles qui sont au repos (action synergique de CNF et CDT sur le cycle cellulaire, action de CNF sur le cytosquelette). Ces perturbations et modifications pourraient inhiber le cycle de renouvellement cellulaire et provoquer des altérations fonctionnelles avec, comme conséquences potentielles, le prolongement de la colonisation et le franchissement plus facile des muqueuses affaiblies, pour provoquer une bactériémie ou septicémie (De Rycke *et al.*, 1999; Pickett et Whitehouse, 1999; De Rycke et Oswald, 2001).

A l'appui de cette hypothèse, citons l'obtention d'une réponse inflammatoire muqueuse et sous-muqueuse après injection de surnageants de culture dans l'iléon de lapins et de rats (Johnson et Lior, 1988b; Bouzari *et al.*, 1992), ainsi que celle d'une réponse diarrhéogène et de nécrose tissulaire suivie d'hyperplasie régénérative dans le colon descendant de souris après inoculation intragastrique (Okuda *et al.*, 1997). Dans un modèle similaire chez la souris, la toxine CDT de *Campylobacter jejuni* paraît aussi jouer un rôle dans le franchissement de la muqueuse intestinale et l'invasion des organes internes (Purdy *et al.*, 2000). Notons cependant que, dans un modèle expérimental d'infection par voie orale chez le veau nouveau-né, ni la toxine CDT-III, ni la toxine CNF2 ne semblent jouer de rôle direct dans le franchissement de la muqueuse intestinale ou dans le développement de la bactériémie (Van Bost *et al.*, 2003).

### Déterminisme génétique

Les toxines CDT d'*E. coli* et des autres espèces bactériennes sont codées par trois gènes adjacents, voire même se recouvrant légèrement (4 nucléotides entre *cdtA* et *cdtB*), formant un opéron. Ces gènes sont à localisation chromosomique pour *cdt-I*, *cdt-II*, *cdt-IV*, *cdt-s* et *cdt-c* (Pickett *et al.*, 1994; Scott et Kaper, 1994; Okuda *et al.*, 1995; Pickett *et al.*, 1996; Toth *et al.*, 2003; Oswald, communication personnelle) et plasmidique pour *cdt-III* (plasmide CNF2/Vir) (Pérès *et al.*, 1997). Les gènes *cdt-III* pourraient former un îlot de pathogénicité sur le plasmide Vir, car ils sont présents en même temps que les gènes *cnf2* et *f17b* sur un fragment de restriction *SalI* de 40 kbases (Pérès *et al.*, 1997).

Les gènes *cdt* montrent un G+C% relativement bas (38 à 45% pour *cdt-III*), par rapport à *E. coli*, témoignant, comme pour les gènes *cnf*, d'une origine étrangère (Pérès *et al.*, 1997). Peut-être s'agit-il de l'ancêtre commun avec le gène qui code pour la DNase I des cellules de mammifères? Les homologies de séquences nucléotidiques sont élevées entre les gènes *cdtB-I* et *cdtB-IV* (environ 85%) et entre *cdtB-II* et *cdtB-III* (>90%), mais ne dépassent pas 60% entre ces deux paires de gènes (Oswald, communication personnelle). De manière générale, le plus haut degré d'homologie entre les gènes des différentes toxines CDT se retrouve à hauteur des gènes *cdtB* (Frisan *et al.*, 2002). Contrairement aux toxines CNF, les trois protéines CDTA, CDTB et CDTC possèdent un peptide signal à l'extrémité amino-terminale (Pickett *et al.*, 1994; Pérès *et al.*, 1997) qui leur permet d'être sécrétées dans le surnageant de culture, sans s'accumuler dans le périplasme.

### Mise en évidence

Une activité toxique CDT peut être mise en évidence par des tests sur cellules HeLa, HEp-II ou CHO en culture. Ces dernières ont un avantage, car elles sont insensibles aux toxines Vero, qui peuvent aussi être produites par certaines souches synthétisant CDT-I ou CDT-II (Gyles, 1994). Mais la différenciation entre les quatre types de toxines CDT produites par *E. coli* ne peut se faire que par des tests génétiques de PCR avec des primers de famille ou spécifiques des variants et d'hybridation sur colonies avec des

sondes génétiques (Ghilardi *et al.*, 2001; Clark *et al.*, 2002; da Silva et da Silva Leite, 2002; Starcic *et al.*, 2002; Mainil *et al.*, 2003; Toth *et al.*, 2003). Le seul test ELISA existant à ce jour est spécifique de la toxine CDT-c («*Receptor-based ELISA*») (Bag *et al.*, 1993).

### Les toxines hémolytiques

Les hémolysines bactériennes sont certainement les toxines les plus aisées à mettre en évidence, puisqu'il suffit d'une culture sur une gélose au sang pour en observer les effets. Des différences peuvent cependant être observées en fonction de l'origine des érythrocytes.

### Historique

La première description rapportée dans la littérature de la production d'une hémolysine par *E. coli* remonte au début du 20<sup>e</sup> siècle (Kayser, 1903). Cette hémolysine, qui est sécrétée dans le surnageant de culture, fut par la suite, associée aux souches d'*E. coli* isolées d'infections extra-intestinales (septicémie, infections du tractus urinaire, méningite), intestinales (diarrhée du porcelet) et entérotoxémique (maladie de l'œdème du porcelet) (Gyles, 1994; Ludwig et Goebel, 1997). Dans la seconde moitié du 20<sup>e</sup> siècle, il devint évident que plusieurs hémolysines peuvent être produites par *E. coli*. Smith (1963) identifie une hémolysine non sécrétée dans le surnageant de culture. Il la dénomme hémolysine  $\beta$  (Hly $\beta$ ) et baptise l'hémolysine sécrétée, hémolysine  $\alpha$  (Hly $\alpha$ ). Deux autres hémolysines (Hly $\gamma$  et ClyA) ont été identifiées dans des souches K-12 de laboratoire (Walton et Smith, 1969; Ludwig *et al.*, 1995; Donnenberg et Welch, 1996; Uhlin *et al.*, 2000).

Enfin, différentes hémolysines, produites au départ par des souches entérohémorragiques d'*E. coli* (EHEC) appartenant aux sérogroupes O157, O26 et O111 essentiellement, ont été décrites depuis une quinzaine d'années (Beutin, 2000) et se distinguent par une activité uniquement sur globules rouges lavés. Ces dernières hémolysines qui forment aussi un groupe hétérogène ont reçu le nom générique d'entéro-hémolysines vu leur production par des souches essentiellement associées à des troubles intestinaux: Ehly-1, Ehly-2, EHEC-hly (ou Ehx) (Ludwig et Goebel, 1997; Beutin, 2000).

### Description

Les connaissances sur les hémolysines d'*E. coli* sont inégales. Les mieux connues sont Hly $\alpha$  et Ehx et, dans une moindre mesure, Hly $\beta$ . Les connaissances sur les autres hémolysines sont encore très incomplètes (Gyles, 1994; Ludwig et Goebel, 1997). Par sa structure, son mécanisme d'action et sa génétique Hly $\alpha$  est un membre de la grande famille phylogénétique RTX de protéines (Welch, 1995), qui comprend aussi des hémolysines d'autres espèces bactériennes (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Moraxella bovis*, *Mannheimia haemolytica*). Ces protéines RTX partagent les propriétés suivantes:

- i) la séquence aminoterminal de la protéine A ne comprend pas de séquence signal;
- ii) la séquence carboxyterminale de la protéine A signe la destination finale;
- iii) la sécrétion est sous la dépendance de l'hydrolyse d'ATP par la protéine B et d'un système de sécrétion de type I avec la formation d'un canal par la protéine D et la protéine de membrane externe Tol C chez *E. coli*;
- iv) la protéine active A ne s'accumule pas dans le cytoplasme;
- v) la séquence des protéines A comprend des répétitions en tandem de neuf acides aminés près de l'extrémité aminoterminal («*Repeats in ToXins*» = RTX).

Hly $\alpha$ -A est une protéine de 107 kDa, partiellement sensible à la chaleur (Jorgensen *et al.*, 1976). Avant la sécrétion dans le milieu extérieur, Hly $\alpha$ -A doit être activée par acylation avec des acides gras en C12 à C18 (l'acide myristique en C14 est le plus actif), sous l'action de la protéine Hly $\alpha$ -C (18-20 kDa) et par liaison au calcium. L'action toxique de Hly $\alpha$  consiste en la formation de pores à l'intérieur de la membrane cytoplasmique de cellules eucaryotes, érythrocytes et autres, d'origine humaine et animale (mammifères). En milieu hypotonique, l'effet toxique se traduit par une augmentation du volume cellulaire et la lyse osmotique des cellules. Les protéines Hly $\alpha$ -A produites par des souches d'*E. coli* d'origines diverses peuvent présenter certaines différences de séquences, tandis que les protéines Hly $\alpha$ -B et D sont très proches (Shewen, 1988; Gyles, 1994; Donnenberg et Welch, 1996; Ludwig et Goebel, 1997).

Ehx est très proche de Hly $\alpha$  et montre un spectre de cibles cellulaires comparable à celui de Hly $\alpha$ . Il s'agit aussi d'une toxine RTX partiellement thermolabile et exigeant du calcium pour exercer son activité. Cependant, contrairement à Hly $\alpha$ , Ehx n'est pas sécrétée dans le milieu extérieur et reste attachée à la cellule bactérienne, bien qu'un appareil de sécrétion complet comprenant les protéines Ehx-B et Ehx-D ait été décrit. La sécrétion de Ehx est rétablie si les protéines Ehly $\alpha$ -B et Ehly $\alpha$ -D sont fournies en trans (Bauer et Welch, 1996; Ludwig et Goebel, 1997).

Hly $\beta$  est beaucoup moins caractérisée. Elle n'est pas sécrétée par les bactéries et il a été suggéré au début qu'il s'agissait d'une forme de Hly $\alpha$  qui reste attachée à la cellule bactérienne, peut-être suite à des mutations dans l'opéron *hly* (Shewen, 1988; Ludwig et Goebel, 1997). Il avait aussi été montré que la délétion de la séquence qui code pour les 37 acides aminés carboxyterminaux de Hly $\alpha$ -A ne modifie pas son activité hémolytique, mais prévient sa sécrétion dans le milieu extérieur. L'absence de neutralisation de l'activité de Hly $\beta$  par des anticorps dirigés contre Hly $\alpha$  et l'existence de souches d'*E. coli* produisant Hly $\alpha$  et Hly $\beta$  allaient cependant à l'encontre de cette hypothèse (Smith, 1963). Des changements conformationnels dans les hémolysines sécrétées ou non et des différences quantitatives dans la sécrétion, selon le taux de production, pourraient toutefois expliquer ces résultats (Rennie et Arbuthnott, 1974; Donnenberg et Welch, 1996). Les résultats de tests génétiques montrent cependant l'absence de relation entre Hly $\alpha$  et Hly $\beta$  (Welch *et al.*, 1983), ce qui a récemment été confirmée après clonage des gènes qui codent pour Hly $\beta$  (Stopik *et al.*, 2000). Ces résultats n'excluent cependant pas l'existence d'autres Hly $\beta$ , qui correspondraient à la définition phénotypique initiale (Smith, 1963).

### Rôle en pathologie

Les souches d'*E. coli* productrices d'Hly $\alpha$  représentent environ 50% de toutes les souches isolées d'infections extra-intestinales chez l'homme (Gyles, 1994; Donnenberg et Welch, 1996; Ludwig et Goebel, 1997) et il a donc été proposé depuis longtemps que cette toxine soit un facteur important de virulence *in vivo*. Des expé-

riences dans des modèles animaux (rats, souris) avec des mutants déficients pour la production d'Hly $\alpha$  et/ou avec des clones recombinants ayant reçu les gènes codant pour Hly $\alpha$  ont en effet permis de montrer que les souches capables de produire cette toxine sont plus virulentes que leurs équivalentes ayant perdu ou n'ayant pas acquis cette capacité (Gyles, 1994; Donnenberg et Welch, 1996; Ludwig et Goebel, 1997). Ajoutons que des anticorps spécifiques sont produits lors de ces infections généralisées (Mac Laren, 1997), mais leur action protectrice n'a pas, à notre connaissance, été évaluée.

Cependant, l'effet de Hly $\alpha$  reste hypothétique. Il pourrait s'agir d'un effet lytique sur les globules rouges et globules blancs, ou d'un effet toxique sur diverses cellules à dose subhémolytique (cellules rénales, macrophages, lymphocytes, polynucléaires, cellules endothéliales). A faibles doses, il a aussi été suggéré que Hly $\alpha$  intervienne dans le développement du syndrome de détresse respiratoire aiguë qui accompagne les infections généralisées chez l'homme par stimulation de la réaction inflammatoire. Cet effet pourrait être la conséquence de l'augmentation de la production d'interleukine-1 et de «*Tumor Necrosis Factor*», comme démontré *in vivo* chez la souris (Ludwig et Goebel, 1997; Mac Laren, 1997; Koronakis et Hughes, 2002).

Nombre de souches animales responsables d'infections extra-intestinales produisent aussi Hly $\alpha$  et il est probable que son rôle, sous réserve de confirmation, soit semblable, voire identique, à celui de l'Hly $\alpha$  des souches humaines (Beutin, 1999; De Rycke *et al.*, 1999). Le problème est plus particulier pour les infections intestinales à souches productrices d'Hly $\alpha$ , particulièrement représentées dans les souches entérotoxigènes et vérotoxigènes porcines F4+ (K88+) et F18+ (Gyles, 1994; Ludwig et Goebel, 1997; Mainil, 1999; Nagy et Fekete, 1999).

De même, le rôle des entérohémolysines reste sujet à spéculation, même si leur association à certains sérogroupes de souches entérohémorragiques et vérotoxigènes (EHEC et VTEC) est très élevée (Nataro et Kaper, 1998; Beutin, 2000). Quant aux autres hémolysines produites par des souches extra-intestinales, elles n'ont jamais été suffisamment étu-

diées pour que l'on puisse se faire une idée de leur rôle éventuel.

### Déterminisme génétique

Hly $\alpha$  est codée par un opéron (*hly*) dont la structure et l'organisation sont typiques de celles des opérons qui codent pour des toxines RTX sécrétées par un système de type I (Gyles, 1994; Welch, 1995; Donnenberg et Welch, 1996; Ludwig et Goebel, 1997). Cet opéron est formé de quatre gènes dénommés *hlyC*, *hlyA*, *hlyB* et *hlyD* codant respectivement pour une acylase, la protéine de structure, une hydrolase et un tunnel d'excrétion (Gyles, 1994; Welch, 1995; Donnenberg et Welch, 1996; Ludwig et Goebel, 1997). Cet opéron possède des propriétés (G+C % = 39 %, usage préférentiel des codons) qui signent son origine étrangère au génome d'*E. coli*, comme pour les gènes *cnf* et *cdt*. Les opérons *hly* présents dans des souches d'*E. coli* à tropisme différent d'hôte et de tissu montrent des régions de forte homologie, surtout à hauteur des gènes *hlyB* et *hlyD*, ce qui témoigne d'une origine commune. La dissémination de cet opéron peut être liée à sa présence sur des plasmides dans certaines souches (Shewen, 1988; Gyles, 1994).

Il est ainsi bien connu que les opérons *hly* sont essentiellement localisés sur des plasmides dans les souches porcines et canines, tandis qu'ils le sont sur le chromosome bactérien dans les souches humaines et dans les autres souches animales (Shewen, 1988; Gyles, 1994; Ludwig et Goebel, 1997; Mainil, 1999; Nagy et Fekete, 1999; De Rycke *et al.*, 1999; Beutin, 1999). Sur le chromosome bactérien, ces opérons *hly* font souvent partie d'îlots de pathogénicité (Pais), seuls ou en compagnie des gènes *pap/prs* et/ou *cnf1*. Une même souche peut renfermer deux copies de l'opéron *hly* localisées sur des Pais différents: Pai-1 et Pai-2 de la souche 536; Pai-4 et Pai-5 de la souche J96, par exemple (Dozois et Curtiss, 1999; Hacker et Kaper, 2000).

L'opéron *ehx* qui code pour Ehx est un variant de celui qui code pour Hly $\alpha$ , comme l'atteste les possibilités de complémentation *en trans* des gènes *ehxB* et *ehxD* par les gènes *hlyB* et *hlyD*. De plus, le gène *ehxA* montre 60 % d'homologie avec le gène *hly $\alpha$*  (Bauer et Welch, 1996). Les gènes qui codent pour Ehx sont à localisation plasmidique (Beutin, 2000). Les

déterminismes génétiques des autres hémolysines n'ont été que partiellement identifiés. Par exemple, les gènes qui codent pour les entérohémolysines Ehly-1 et Ehly-2 sont localisés sur des phages (Gyles, 1994; Beutin, 2000). Des gènes codant pour Hly $\beta$  ont aussi été récemment clonés (Stopik *et al.*, 2000).

L'expression de l'opéron *hly*, et probablement de l'opéron *ehx*, est soumise à des régulations génétique, transcriptionnelle et post-transcriptionnelle, selon les conditions extérieures en fer, température, atmosphère (Ludwig et Goebel, 1997; Harel et Martin, 1999). Ces régulations sont probablement à l'origine de l'existence de souches qui possèdent les opérons *hly* ou *ehx*, mais n'expriment pas toujours le phénotype hémolytique *in vitro*.

### Mise en évidence

Les tests les plus simples pour mettre en évidence la production d'une hémolysine ou d'une entérohémolysine sont les cultures sur géloses au sang de mouton ou au sang lavé de mouton, respectivement (Smith, 1963; Beutin *et al.*, 1988; 1989). L'hémolyse produite par Hly $\alpha$  est large sur les deux types de géloses, puisque la toxine diffuse dans le milieu; celle produite par Hly $\beta$  est beaucoup plus étroite, puisque la toxine est attachée au corps bactérien. De plus, une activité hémolytique est présente dans le surnageant de culture en milieu liquide dans le cas de production d'Hly $\alpha$  au contraire du cas où Hly $\beta$  est produite. Cette activité dans le surnageant de culture est neutralisée par l'ajout d'EDTA qui chélate le calcium nécessaire à l'activité de Hly $\alpha$  (Pohl *et al.*, 1993). Des immunsérums polyclonaux et des anticorps monoclonaux ont aussi été produits contre Hly $\alpha$  et utilisés en tests de neutralisation ou d'immunoblot (Smith, 1963; Bauer et Welch, 1996). Quant aux entérohémolysines, elles produisent une zone étroite d'hémolyse sur gélose aux globules rouges lavés, mais il n'existe pas de tests phénotypiques pour les différencier entre elles, à notre connaissance. Les résultats de ces tests phénotypiques peuvent être corroborés à ceux de tests génétiques par PCR et sondes génétiques pour les gènes de structure des hémolysines (Welch *et al.*, 1983; Schmidt *et al.*, 1994; Yamamoto *et al.*, 1995; Paton et Paton, 1998). A ces

Tableau II: Caractéristiques et rôles des toxines CNF, CDT et Hly $\alpha$  d'*E. coli*

Toxine	Structure	Classe	Action	Conséquence	Rôles cliniques hypothétiques
CNF <sup>a</sup>	Monomère	III1 <sup>d</sup>	ADP <sup>e</sup> -ribosylation des protéines Rho	Fibres de stress Multinucléation	Propriétés de phagocytose, fragilisation des épithéliums, diarrhée (CNF2)
CDT <sup>b</sup>	Trimère	III?	DNase (?)	Arrêt de la mitose en G2/M	Fragilisation des épithéliums
Hly $\alpha$ <sup>c</sup>	Monomère	II2	Formation de pores membranaires	Lyse cellulaire	Approvisionnement en Fer, dommages cellulaires

<sup>a</sup> CNF = Cytotoxic Nerotizing Factors

<sup>b</sup> CDT = Cytolethal Distending Toxins

<sup>c</sup> Hly $\alpha$  = Hémolysine  $\alpha$

<sup>d</sup> Selon la classification présentée dans le tableau 1

<sup>e</sup> ADP = Adénosine Dinucléotide Phosphate

tests génétiques, des souches négatives phénotypiquement peuvent donner des résultats positifs.

## CONCLUSIONS

Les rôles précis des toxines décrites dans le cadre des colibacillooses extra-intestinales (tableau II) et l'effet toxique exercé par ces souches de colibacilles ne sont pas encore parfaitement compris à ce jour, à l'exception peut-être de ceux de l'hémolysine  $\alpha$  des souches uropathogènes et de l'endotoxine. De plus, certaines hypothèses actuelles attribuent, à côté d'un effet toxique potentiel lors de septicémie, un rôle aux toxines CNF et CDT dans le franchissement des muqueuses (De Rycke *et al.*, 1999; Pickett et Whitehouse, 1999; De Rycke et Oswald, 2001), à la toxine CNF2 dans le déclenchement de diarrhée (Van Bost *et al.*, 2003) et à l'hémolysine  $\alpha$  dans l'approvisionnement en Fer (Griffiths, 1988).

La détermination de ces rôles exacts ne pourra *in fine* se faire que par la réalisation d'infections expérimentales chez les espèces animales hôtes d'origine, en comparant les résultats obtenus avec les souches sauvages et des mutants alléliques dans les gènes codant pour les propriétés étudiées. Dans l'attente de ces expériences, seules des hypothèses peuvent être émises, par extrapolation de résultats obtenus sur cultures cellulaires ou dans des modèles sur autres espèces animales (primates, rats et souris).

## REMERCIEMENTS

Les travaux réalisés sur les souches invasives ont bénéficié de l'appui financier de la Commission Européenne (Action à frais partagés FAIR3-CT96-1335) de 1997 à 1999 et de la DGVI du Ministère fédéral de l'Agriculture (Convention de Recherches 5936) en 2000/2001.

## Virulence factors and specific properties of invasive *Escherichia coli* :

### III) Toxin production

#### SUMMARY

*Escherichia coli* bacterial species is subdivided into several strains that are pathogenic for man and animals, on the basis of their specific properties and factors which are responsible for their pathogenic characters. The pathogenic strains are classically subdivided into strains with intestinal tropism (enterotoxigenic, enteropathogenic, enterohaemorrhagic, verotoxigenic and enteroinvasive) and with extraintestinal tropism (uropathogenic and invasive). Invasive strains cause septicaemia and/or bacteraemia with localisations in different internal organs (systemic infections). If specific virulence properties and factors of strains

with intestinal tropism are quite well known and described, those of strains with extraintestinal tropism are much less characterised, especially in animals.

The purpose of this serie of review articles is to present the current knowledge on specific properties and factors of extraintestinal strains: adhesins and colonisation factors, transmucosal transfer and survival in blood and internal organs, toxicity. The fourth manuscript will deal with the invasive strains themselves, focusing on the necrotoxicogenic strains.

This third manuscript presents the current knowledge on toxins produced by invasive strains of *E. coli*: endotoxins, cytotoxic necrotising factors, cytolethal distending toxins and haemolytic toxins.

## BIBLIOGRAPHIE

- ARAGON V., CHAO K., DREYFUS L.A. Effect of cytolethal distending toxin on F-actin assembly and cell division in Chinese hamster ovary cells. *Infect. Immun.*, 1997, **65**, 3774-3780.
- BAG P.K., RAMAMURTHY T., NAIR U.B. Evidence for the presence of a receptor for the cytolethal distending toxin (CLDT) of *Campylobacter jejuni* on CHO and HeLa cell membranes and development of a receptor-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of CLDT. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1993, **114**, 285-291.
- BARBIERI J.T., PEDERSON K.J. Bacterial toxins in disease production. In: Brogden K.A., Roth J.A., Stanton T.B., Bolin C.A., Minion F.C., Wannemuehler M.J. (Eds), Virulence mechanisms of bacterial pathogens. 3<sup>rd</sup> Edition. ASM Press: Washington, 2000, 163-174.
- BAUER M.E., WELCH R.A. Characterization of an RTX toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.*, 1996, **64**, 167-175.
- BEUTIN L., PRADA J., ZIMMERMANN S., STEPHAN R., ORSKOV I., ORSKOV F. Enterohemolysin, a new type of hemolysin produced by some strains of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Zentralbl. Bakteriolog. Hyg A*, 1988, **267**, 576-588.
- BEUTIN L., MONTENEGRO M.A., ORSKOV I., ORSKOV F., PRADA J., ZIMMERMANN S., STEPHAN R. Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, 1989, **27**, 2559-2564.
- BEUTIN L. *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. *Vet. Res.*, 1999, **30**, 285-298.
- BEUTIN L. Plasmids in VTEC : their role in virulence and their use in typing. In: Duffy G., Garvey P., Coia J., Wasteson Y., Mc Dowell D.A. (Eds), Verocytotoxigenic *Escherichia coli* in Europe. 3: Pathogenicity and Virulence (Proceedings). Concerted Action CT98-3935, The National Food Centre, Dublin, 2000, 126-139.
- BLANCO M., BLANCO J., BLANCO J.E., RAMOS J. Enterotoxigenic, verotoxigenic, and necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolated from cattle in Spain. *Am. J. Vet. Res.*, 1993, **54**, 1446-1451.
- BONVENTRE P.F. The nomenclature of microbial toxins: problems and recommendations. In: Ajl S.J., Kadis S., Montie T.C. (Eds), Microbial toxins: a comprehensive treatise. Volume I : bacterial protein toxins. Academic Press: London, 1970, 29-66.
- BOQUET P. The cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1) from *Escherichia coli*. *Toxicon*, 2001, **39**, 1673-1680.
- BOUZARI S., VATSALA B.R., VARGHESE A. In vitro adherence property of cytolethal distending toxin (CLDT) producing EPEC strains and effect of the toxin on rabbit intestine. *Microb. Pathog.*, 1992, **12**, 153-157.
- CAPRIOLI A., FALBO V., RODA L.G., RUGGERI F.M., ZONA C. Partial purification and characterization of an *Escherichia coli* toxic factor that induces morphological cell alterations. *Infect. Immun.*, 1983, **39**, 1300-1306.
- CAPRIOLI A., FALBO V., RUGGERI F.M., BALDASSARRI L., BISICCHIA R., IPPOLITO G., ROMALI E., DONELLI G. Cytotoxic necrotizing factor production by hemolytic strains of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *J. Clin. Microbiol.*, 1987, **25**, 146-149.
- CHIEN C.C., TAYLOR N.S., GE Z., SCHAUER D.B., YOUNG Y.B., FOX J.G. Identification of *cdtB* homologues and cytolethal distending toxin activity in enterohepatic *Helicobacter* spp. *J. Med. Microbiol.*, 2000, **49**, 525-534.
- CLARK C.G., JOHNSON S.T., EASY R.H., CAMPBELL J.L., RODGERS F.G. PCR for detection of *cdt-III* and the relative frequencies of cytolethal distending toxin variant-producing *Escherichia coli* isolates from humans and animals. *J. Clin. Microbiol.*, 2002, **40**, 2671-2674.
- CLEMENT S. Etude de pathogénèse d'une souche d'*Escherichia coli* produisant CNF1 par l'infection expérimentale de porcelets (Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître ès Sciences (MSc) en Sciences vétérinaires, Option Microbiologie). Université de Montréal: St Hyacinthe, 1997, 75 pages.
- COMAYRAS C., TASCA C., PERES S.Y., DUCOMMUN B., OSWALD E., DE RYCKE J. *Escherichia coli* cytolethal distending toxin blocks the HeLa cell cycle at G2/M transition by preventing cdc2 protein kinase dephosphorylation and activation. *Infect. Immun.*, 1997, **65**, 5088-5095.
- COOPER J.F., LEVIN J., WAGNER H.N. Quantitative comparison of *in vitro* and *in vivo* methods for detection of endotoxin. *J. Lab. Clin. Med.*, 1971, **78**, 138-148.
- COPE L.D., LUMBLEY S., LATIMER J.L., KLESNEY-TAIT J., STEVENS M.K., JOHNSON L.S., PURVEN M., MUNSON R.S.Jr. A diffusible cytotoxin of *Haemophilus ducreyi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, **94**, 4056-4061.
- CORTES-BRATTI X., CHAVES-OLARTE E., LAGERGAD T., THELESTAM M. The cytolethal distending toxin from the chancroid bacterium *Haemophilus ducreyi* induces cell-cycle arrest in the G2 phase. *J. Clin. Invest.*, 1999, **103**, 107-115.
- CORTES-BRATTI X., CHAVES-OLARTE E., LAGERGAD T., THELESTAM M. Cellular internalization of cytolethal distending toxin from *Haemophilus ducreyi*. *J. Clin. Invest.*, 2000, **68**, 6903-6911.
- DA SILVA A., DA SILVA LEITE D. Investigation of putative *cdt* gene in *Escherichia coli* isolates from pigs with diarrhea. *Vet. Microbiol.*, 2002, **89**, 195-200.
- DENG K., LATIMER J.L., LEWIS D.A., HANSEN E.J. Investigation of the interaction among the components of the cytolethal distending toxin of *Haemophilus ducreyi*. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 2001, **285**, 609-615.
- DE RYCKE J., GUILLOT J.F., BOIVIN R. Cytotoxins in non-enterotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from feces of diarrheic calves. *Vet. Microbiol.*, 1987, **15**, 137-150.

- DE RYCKE J., OSWALD E., BOIVIN R. An *in vivo* assay for the detection of cytotoxic strains of *Escherichia coli*. *Ann. Rech. Vét.*, 1989, **20**, 39-46.
- DE RYCKE J., GONZALEZ E.A., BLANCO J., OSWALD E., BLANCO M., BOIVIN R. Evidence for two types of cytotoxic necrotizing factor in human and animal clinical isolates of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, 1990, **28**, 694-699.
- DE RYCKE J., PLASSIART G. Toxic effects for lambs of cytotoxic necrotizing factor from *Escherichia coli*. *Res. Vet. Sci.*, 1990, **49**, 349-354.
- DE RYCKE J., MAZARS P., NOUGAYREDE J.P., TASCA C., BOURY M., HERAULT F., VALETTE A., OSWALD E. Mitotic block and delayed lethality in HeLa epithelial cells exposed to *Escherichia coli* BM2-1 producing cytotoxic necrotizing factor 1. *Infect. Immun.*, 1996, **64**, 1694-1705.
- DE RYCKE J., MILON A., OSWALD E. Necrotoxic *Escherichia coli* (NTEC): two emerging categories of human and animal pathogens. *Vet. Res.*, 1999, **30**, 221-233.
- DE RYCKE J., OSWALD E. Cytolethal distending toxin (CDT) : a bacterial weapon to control host cell proliferation ? *FEMS Microbiol. Lett.*, 2001, **203**, 141-148.
- DONNENBERG M.S., WELCH R.A. Virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. In : Mobley H.L.T., Warre J.W. (Eds), *Urinary tract infections: molecular pathogenesis and clinical management*. ASM Press: Washington, 1996, 135-174.
- DOZOIS C.M., CURTISS R. III. Pathogenic diversity of *Escherichia coli* and the emergence of «exotic» islands in the gene stream. *Vet. Res.*, 1999, **30**, 157-180.
- ELLIOTT S.J., SRINIVAS S., ALBERT M.J., ALAM K., ROBINS-BROWNE R.M., GUNZBURG S.T., MEE B.J., CHANG B.J. Characterization of the roles of hemolysin and other toxins in enteropathy caused by alpha-hemolytic *Escherichia coli* linked to human diarrhea. *Infect. Immun.*, 1998, **66**, 2040-2051.
- ELWELL C.A., DREYFUS L.A. DNase I homologous residues in CdtB are critical for cytolethal distending toxin-mediated cell cycle arrest. *Mol. Microbiol.*, 2000, **37**, 952-963.
- ELWELL C., CHAO K., PATEL K., DREYFUS L. *Escherichia coli* CdtB mediates cytolethal distending toxin all cycle arrest. *Infect. Immun.*, 2001, **69**, 3418-3422.
- FABBRI A., GAUTHIER M., BOQUET P. The 5' region of *cnf1* harbours a translational regulatory mechanism for CNF1 synthesis and encodes the cell-binding domain of the toxin. *Mol. Microbiol.*, 1999, **33**, 108-118.
- FALBO V., FAMIGLIETTI M., CAPRIOLI A. Gene block encoding production of cytotoxic necrotizing factor 1 and hemolysin in *Escherichia coli* isolates from extraintestinal infections. *Infect. Immun.*, 1992, **60**, 2182-2187.
- 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.*, 1993, **61**, 4909-4914.
- FALKOW S. Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. *Rev. Infect. Dis.*, 1988, **10**, S274-S276.
- FALZANO L., QUARANTA M.G., TRAVAGLIONE S., FILIPPINI P., FABBRI A., VIORA M., DONELLI G., FIORENTINI C. Cytotoxic necrotizing factor 1 enhances reactive oxygen species-dependent transcription and secretion of proinflammatory cytokines in human uroepithelial cells. *Infect. Immun.*, 2003, **71**, 4178-4181.
- FLATAU G., LEMICHEZ E., GAUTHIER M., CHARDIN P., PARIS S., FIORENTINI C., BOQUET P. Toxin-induced activation of the G protein p21 Rho by deamidation of glutamine. *Nature*, 1997, **387**, 729-733.
- FOURNOUT S., DOZOIS C.M., ODIN M., DESAUTELS C., PERES S., HERAULT F., DAIGLE F., SEGAFREDO C., LAFFITE J., OSWALD E., FAIRBROTHER J.M., OSWALD I.P. Lack of a role of cytotoxic necrotizing factor 1 toxin from *Escherichia coli* in bacterial pathogenicity and host cytokine response in infected germfree piglets. *Infect. Immun.*, 2000, **68**, 839-847.
- FREER J.M. Toxins as virulence factors of Gram-positive pathogenic bacteria of veterinary importance. In : Roth J.A. (Ed.), *Virulence mechanisms of bacterial pathogens*. ASM Press : Washington, 1988, 264-288.
- FRISAN T., CORTES-BRATTI X., THELESTAM M. Cytolethal distending toxins and activation of DNA damage-dependent checkpoint responses. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2002, **291**, 495-499.
- FRISK A., LEBENS M., JOHANSSON C., AHMED H., SVENSSON L., AHLMAN K., LAGERGAD T. The role of different protein components from the *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin in the generation of cell toxicity. *Microb. Pathog.*, 2001, **30**, 313-324.
- GERHARD R., SCHMIDT G., HOFMANN F., AKTORIES K. Activation of Rho GTPases by *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1 increases intestinal permeability in Caco-2 cells. *Infect. Immun.*, 1998, **66**, 5125-5131.
- GHILARDI A.C., GOMES T.A., TRABULSI L.R. Production of cytolethal distending toxin and other virulence characteristics of *Escherichia coli* strains of serogroup O86. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2001, **96**, 703-708.
- GRIFFITHS E., CHART H., STEVENSON P. High-affinity iron uptake systems and bacterial virulence. In : Roth J.A. (Ed.), *Virulence mechanisms of bacterial pathogens*. ASM Press : Washington, 1988, 121-137.
- GYLES C.L. *Escherichia coli* verotoxins and other cytotoxins. In : Gyles C.L. (Ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International: Wallingford, 1994, 365-398.
- HACKER J., KAPER J.B. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2000, **54**, 641-679.
- HAREL J., MARTIN C. Virulence gene regulation in pathogenic *Escherichia coli*. *Vet. Res.*, 1999, **30**, 131-156.

- HORIGUCHI Y. *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factors and *Bordetella* dermonecrotic toxin: the dermonecrosis-inducing toxins activating Rho small GTPases. *Toxicon*, 2001, **39**, 1619-1627.
- HULL S. *Escherichia coli* lipopolysaccharide in pathogenesis and virulence. In : Sussman M. (Ed.), *Escherichia coli*: mechanisms of virulence. Cambridge University Press : Cambridge, 1997, 145-167.
- JANKA A., BIELASZEWSKA M., DOBRINDT U., GREUNE L., SCHMIDT M.A., KARCH H. Cytolethal distending toxin gene cluster in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H- and O157:H7 : characterization and evolutionary considerations. *Infect. Immun.*, 2003, **71**, 3634-3638.
- JOHNSON J.R., O'BRYAN T.T., LOW D.A., LING G., DELAVARI P., FASCHING C., RUSSO T.A., CARLINO U., STELL A.L. Evidence of commonality between canine and human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains that express papG allele III. *Infect. Immun.*, 2000, **68**, 3327-3336.
- JOHNSON W.M., LIOR H. Response of chinese ovary hamster cells to a cytolethal distending toxin (CDT) of *Escherichia coli* and possible misinterpretation as heat-labile (LT) enterotoxin. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1987a, **43**, 19-23.
- JOHNSON W.M., LIOR H. Production of Shiga toxin and a cytolethal distending toxin (CLDT) produced by serogroups of *Shigella* spp. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1987b, **48**, 235-238.
- JOHNSON W.M., LIOR H. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Escherichia coli* isolates from clinical material. *Microb. Pathog.*, 1988a, **4**, 103-113.
- JOHNSON W.M., LIOR H. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter* spp. *Microb. Pathog.*, 1988b, **4**, 115-126.
- JORGENSEN S.E., SHORT E.C., HURTZ H.J., MUSSEN H.K., WU G.K. Studies on the origin of the alpha-haemolysin produced by *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.*, 1976, **9**, 173-189.
- KAYSER H. Ueber Bakterienschämolyse, im Besonderen das Colilysin. *Zeitschr. Hyg. Infektionskrankh.*, 1903, **42**, 118-138.
- KORONAKIS V., HUGHES C. Hemolysin. In : Donnenberg M.S. (Ed), *Escherichia coli*: virulence mechanisms of a versatile pathogen. Academic Press: London, 2002, 361-378.
- KOSTIA S., VEIJALAINEN P., HIRVI U., HANNINEN M.L. Cytolethal distending toxin B gene (*cdtB*) homologues in taxa 2, 3 and 8 and in six canine isolates of *Helicobacter* sp. Flexispira. *J. Med. Microbiol.*, 2003, **52**, 103-108.
- KRUEGER K.M., BARBIERI J.T. Bacterial ADP-ribosylating exotoxins. In : Roth J.A., Bolin C.A., Brogden K.A., Minion F.C., Wannemuehler M.J. (Eds), *Virulence mechanisms of bacterial pathogens*. 2<sup>nd</sup> Edition. ASM Press : Washington, 1995, 231-242.
- LANDRAUD L., GIBERT M., POPOFF M.R., BOQUET P., GAUTHIER M. Expression of *cnf1* by *Escherichia coli* J96 involves a large upstream DANN region including the *hlyCABD* operon, and is regulated by the RfaH protein. *Mol. Microbiol.*, 2003, **47**, 1653-1667.
- LARA-TEJERO M., GALAN J.E. A bacterial toxin that controls cell cycle progression as a deoxyribonuclease I-like protein. *Science*, 2000, **290**, 354-357.
- LARA-TEJERO M., GALAN J.E. CdtA, CdtB, and CdtC form a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity. *Infect. Immun.*, 2001, **69**, 4358-4365.
- LERM M., SELZER J., HOFFMEYER A., RAPP U.R., AKTORIES K., SCHMIDT G. Deamidation of Cdc42 and Rac by *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1: activation of c-Jun N-terminal kinase in HeLa cells. *Infect. Immun.*, 1999, **67**, 496-503.
- LEVIN J., TOMASULO P.A., OSER R.S. Detection of endotoxin in human blood and demonstration of an inhibitor. *J. Lab. Clin. Med.*, 1970, **75**, 903-911.
- LIN J.W., CHEN L.M., CHEN H.Y., WENG S.F. Identification and analysis of the regulatory region *R&R\** with the *cnf1* gene encoding the cytotoxic necrotizing factor type 1 that closely links to the *lux* regulon of *Vibrio fischeri*. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 1998, **250**, 462-465.
- LOCKMAN H.A., GILLESPIE R.A., BAKER B.D., SHAKHNOVICH E. *Yersinia pseudotuberculosis* produces a cytotoxic necrotizing factor. *Infect. Immun.*, 2002, **70**, 2708-2714.
- LUDWIG A., TENDEL C., BAUER S., BUBERT A., BENZ B., MALBENKOPF H.J., GOEBEL W. SlyA, a regulatory protein from *Salmonella typhimurium*, induces a haemolytic and pore-forming protein in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, 1995, **249**, 474-486.
- LUDWIG A., GOEBEL W. Haemolysins of *Escherichia coli*. In : Sussman M. (Ed.), *Escherichia coli* : mechanisms of virulence. Cambridge University Press : Cambridge, 1997, 281-329.
- MAC LAREN D.M. Soft tissue infection and septicaemia. In: Sussman M. (Ed.), *Escherichia coli*: mechanisms of virulence. Cambridge University Press: Cambridge, 1997, 469-494.
- MAINIL J., JACQUEMIN E., HERAULT F., OSWALD E. Presence of *pap*-, *sfa*-, and *afa*-related sequences in necrotogenic *Escherichia coli* isolates from cattle : evidence for new variants of the AFA family. *Can. J. Vet. Res.*, 1997, **61**, 193-199.
- MAINIL J. Shiga/Verocytotoxins and Shiga/Verotoxigenic *Escherichia coli* in animals. *Vet. Res.*, 1999, **30**, 235-257.
- MAINIL J., WILBAUX M., JACQUEMIN E., OSWALD E., IMBERECHTS H., VAN BOST S. Les souches pathogènes d'*Escherichia coli* chez les chiens et les chats : III) Données bactériologiques et cliniques sur les souches nécrotoxinogènes et sur celles positives pour des adhésines. *Ann. Méd. Vét.*, 2001, **145**, 343-354.
- MAINIL J., JACQUEMIN E., OSWALD E. Prevalence and identity of *cdt*-related sequences in necrotogenic *Escherichia coli*. *Vet. Microbiol.*, 2003, **94**, 159-165.
- MAO X., DI RIENZO J.M. Functional studies of the recombinant subunits of a cytolethal distending holotoxin. *Cell. Microbiol.*, 2002, **4**, 245-255.

- MEYERS K., REED S., CLEM M., BAYLY W. Circulating endotoxin-like substance(s) and altered hemostasis in horses with gastrointestinal disorders : an interim report. *Am. J. Vet. Res.*, 1982, **43**, 2233-2238.
- MILLS M., MEYSICK K.C., O'BRIEN A.D. Cytotoxic necrotizing factor type 1 of uropathogenic *Escherichia coli* kills cultured human uroepithelial 5637 cells by an apoptotic mechanism. *Infect. Immun.*, 2000, **68**, 5869-5880.
- NAGY B., FEKETE P.Zs. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Vet. Res.*, 1999, **30**, 259-284.
- NATARO J.P., KAPER J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1998, **11**, 142-201.
- OKEKE I.N., LAMIKANRA A., STEINRÜCK H., KAPER J.B. Characterization of *Escherichia coli* strains from cases of childhood in provincial southwestern Nigeria. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, **38**, 7-12.
- OKUDA J., KURAZANO H., TAKEDA Y. Distribution of the cytolethal distending toxin A gene (*cdtA*) among species of *Shigella* and *Vibrio*, and cloning and sequencing of the *cdt* gene from *Shigella dysenteriae*. *Microb. Pathog.*, 1995, **18**, 167-172.
- OKUDA J., KUKUMOTO H., TAKEDA Y., NISHIHICHI M. Examination of diarrheagenicity of cytolethal distending toxin : suckling mouse response to the products of the *cdtABC* genes of *Shigella dysenteriae*. *Infect. Immun.*, 1997, **65**, 428-433.
- OSWALD E., DE RYCKE J., GUILLOT J.F., BOIVIN R. Cytotoxic effect of multinucleation in HeLa cultures associated with the presence of Vir plasmid in *Escherichia coli* strains. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1989, **58**, 95-100.
- OSWALD E., DE RYCKE J. A single protein of 110 kDa is associated with the multinucleating and necrotizing activity coded by the Vir plasmid of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1990, **68**, 279-284.
- OSWALD E., POHL P., JACQUEMIN E., LINTERMANS P., VAN MUYLEM K., O'BRIEN A.D., MAINIL J. Specific DNA probes to detect *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factor type 1 or type 2. *J. Med. Microbiol.*, 1994a, **40**, 428-434.
- OSWALD E., SUGAI M., LABIGNE A., WU H.C., FIORENTINI C., BOQUET P., O'BRIEN A.D. Cytotoxic necrotizing factor type 2 produced by virulent *Escherichia coli* modifies the small GTP-binding proteins Rho involved in assembly of actin stress fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994b, **91**, 3814-3818.
- OSWALD E., TABOURET M., BOIVIN R., DE RYCKE J. Detection of *Escherichia coli* strains producing the cytotoxic necrotizing factor type two (CNF2) by enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet. Microbiol.*, 1994c, **40**, 209-218.
- PATON J.C., PATON A.W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1998, **11**, 450-479.
- PERES S.Y., MARCHES O., DAIGLE F., NOUGAYREDE J.P., HERAULT F., TASCA C., DE RYCKE J., OSWALD E. A new cytolethal distending toxin (CDT) from *Escherichia coli* producing CNF2 blocks HeLa cell division in G2/M phase. *Mol. Microbiol.*, 1997, **24**, 1095-1107.
- PICKETT C.L., COTTLE D.L., PESCI E.C., BIKAH G. Cloning, sequencing, and expression of the *Escherichia coli* cytolethal distending toxin genes. *Infect. Immun.*, 1994, **62**, 1046-1051.
- PICKETT C.L., PESCI S.C., CATTLE D.L., RUSSEL G., NALCA ERDEM A., ZEYTIM H. Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* sp. *cdtB* genes. *Infect. Immun.*, 1996, **64**, 2070-2078.
- PICKETT C.L., WHITEHOUSE C.A. The cytolethal distending toxin family. *Trends Microbiol.*, 1999, **7**, 292-297.
- POHL P., OSWALD E., VAN ROBAEYS G., STOCKMANS F., LINTERMANS P., MAINIL J. Tests simples pour le diagnostic présumé des *Escherichia coli* isolées principalement chez les bovins et productrices des cytotoxines nécrosantes (CNF). *Ann. Méd. Vét.*, 1993, **137**, 503-505.
- PROCTOR R.A., DENLINGER L.C., BERTICS P.J. Lipopolysaccharide and bacterial virulence. In : Roth J.A., Bolin C.A., Brogden K.A., Minion F.C., Wannemuehler M.J. (Eds), Virulence mechanisms of bacterial pathogens. 2<sup>nd</sup> Edition. ASM Press : Washington, 1995, 173-194.
- PURDY D., BUSWELL C.M., HODGSON A.E., McALPINE K., HENDERSON I., LEACH A.A. Characterisation of cytolethal distending toxin (CDT) mutants of *Campylobacter jejuni*. *J. Med. Microbiol.*, 2000, **49**, 473-479.
- RENNIE R.P., ARBUTHNOTT J.P. Partial characterization of *Escherichia coli* haemolysin. *J. Med. Microbiol.*, 1974, **7**, 179-188.
- RIDLEY A.J. Rho : theme and variations. *Curr. Biol.*, 1996, **6**, 1256-1264.
- RIPPERE-LAMPE K.E., O'BRIEN A.D., CORION R., LOCKMAN H.A. Mutation of the gene encoding cytotoxic necrotizing factor type 1 (*cnf1*) attenuates the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 2001, **69**, 3954-3964.
- ROBERTSON D.C. Pathogenesis and enterotoxins of diarrheagenic *Escherichia coli*. In : Roth J.A. (Ed.), Virulence mechanisms of bacterial pathogens. ASM Press : Washington, 1988, 241-263.
- ROUX E., YERSIN A. Contribution à l'étude de la diphtérie. *Ann. Inst. Pasteur*, 1888, **2**, 629-661.
- RUTTER J.M. Bacterial toxins as virulence determinants of veterinary pathogens : an overview. In: Roth J.A. (Ed.), Virulence mechanisms of bacterial pathogens. ASM Press : Washington, 1988, 213-227.
- SALYERS A.A., WHITT D.D. Bacterial pathogenesis : a molecular approach. ASM Press : Washington, 1994, 1-418.
- SALYERS A.A., WHITT D.D. Bacterial pathogenesis : a molecular approach. 2<sup>nd</sup> Edition. ASM Press : Washington, 2002, 1-539.
- SCHMIDT G., SEHR P., WILM J., SELZER J., MANN M., AKTORIES K. Gln63 Rho is deaminated by *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor-1. *Nature*, 1997, **387**, 725-729.

- SCHMIDT H., KARCH H., BEUTIN L. The large sized plasmids of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains encode hemolysins which are presumably members of the *E. coli*  $\alpha$ -hemolysin family. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1994, **117**, 189-196.
- SCOTT D.A., KAPER J.B. Cloning and sequencing of the genes encoding *Escherichia coli* cytolethal distending toxin. *Infect. Immun.*, 1994, **62**, 244-251.
- SHEWEN P.E. Cytocidal toxins of Gram-negative rods. In: Roth J.A. (Ed.), Virulence mechanisms of bacterial pathogens. ASM Press: Washington, 1988, 228-240.
- SMITH H.W. The haemolysins of *Escherichia coli*. *J. Pathol. Bacteriol.*, 1963, **85**, 197-211.
- SMITH H.W. A search for transmissible pathogenic characters in invasive strains of *Escherichia coli*: the discovery of a plasmid-controlled toxin and a plasmid-controlled lethal character closely associated, or identical, with Colicin V. *J. Gen. Microbiol.*, 1974, **83**, 95-111.
- SMITH H.W. Observations on *Escherichia coli* infection in calves. In: Rutter J.M. (Ed.), Proceedings of the First Seminar on «Pathology», in the CEC Programme of Coordination of Research in Beef Production. Perinatal Ill-Health in Calves, 1975, Bruxelles. European Commission: Bruxelles, 1975, 47-59.
- SMITH H.W. Transmissible pathogenic characteristics of invasive strains of *Escherichia coli*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1978, **173**, 601-607.
- STARIC M., JOHNSON J.R., STELL A.L., VEN DER GOOT J., HENDRICKS H.G., VAN VORSTENBOSCH C., VAN DIJK L., GAASTRA W. Haemolytic *Escherichia coli* isolated from dogs with diarrhea have characteristics of both uropathogenic and necrotogenic strains. *Vet. Microbiol.*, 2002, **85**, 361-375.
- STOPIK K., HERTVRIG S., APPEL B., BEUTIN L. Cloning of genes encoding *Escherichia coli* beta-hemolysin, a new type of hemolysin associated with VTEC from pigs. In: Duffy G., Garvey P., Coia J., Wasteson Y., Mc Dowell D.A. (Eds), Verocytotoxigenic *Escherichia coli* in Europe. 3: Pathogenicity and Virulence (Proceedings). Concerted Action CT98-3935, The National Food Centre, Dublin, 2000, 200.
- SUGAI M., KAWAMOTO T., PERES S.Y., UENO Y., KOMATSUWAZA H., FUJIWARA T., KURIHAWA H., SUGINAKA H., OSWALD E. The cell cycle-specific growth-inhibitory factor produced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is a cytolethal distending toxin. *Infect. Immun.*, 1998, **66**, 5008-5019.
- SUGAI M., HATAKAZI K., MOGAMI A., OHTA H., PERES S.Y., HERAULT F., HORIGUCHI Y., MASUDA M., UENO Y., KOMATSUWAZA H., SUGINAKA H., OSWALD E. Cytotoxic necrotizing factor type 2 produced by pathogenic *Escherichia coli* deamidates a Gln residue in the conserved G-3 domain of the Rho family and preferentially inhibits the GTPase activity of RhoA and Rac1. *Infect. Immun.*, 1999, **67**, 6550-6557.
- TABOURET M., DE RYCKE J. Detection of cytotoxic necrotizing factor (CNF) in extracts of *Escherichia coli* strains by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Med. Microbiol.*, 1990, **32**, 73-81.
- TOMASULO P.A., LEVIN J., MURPHY P.A., WINKELSTEIN J.A. Biological activities of tritiated endotoxins: Correlation of the *Limulus* lysate assay with rabbit pyrogen and complement-activation assays for endotoxin. *J. Lab. Clin. Med.*, 1977, **89**, 308-315.
- TOTH I., OSWALD E., MAINIL J., AWAD-MASALMEH M., NAGY B. Characterization of intestinal Cnf+ and CDT+ *Escherichia coli* from weaned piglets. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2000a, **290**, 539-542.
- TOTH I., OSWALD E., SZABO B., BARCS I., EMODY L. Virulence markers of human uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated in Hungary. *Adv. Experim. Med. Biol.*, 2000b, **485**, 335-338.
- TOTH I., HERAULT F., BEUTIN L., OSWALD E. Production of cytolethal distending toxins by human and animal pathogenic *Escherichia coli* strains: establishment of the existence of a new *cdt* variant (type IV). *J. Clin. Microbiol.*, 2003, **41**, 4285-4291.
- TRAVAGLIONE S., FALZANO L., FABBRI A., STRINGARO A., FAIS S., FIORENTINI C. Epithelial cells and expression of the phagocytic marker CD68: scavenging of apoptotic bodies following Rho activation. *Toxicol. in Vitro*, 2002, **16**, 405-411.
- TWETEN R.K. Pore-forming toxins of Gram-positive bacteria. In: Roth J.A., Bolin C.A., Brogden K.A., Minion F.C., Wannemuehler M.J. (Eds), Virulence mechanisms of bacterial pathogens. 2<sup>nd</sup> Edition. ASM Press: Washington, 1995, 207-230.
- UHLIN B.E., MIZUNOE Y., OSCARSSON J., WAI S.N., WESTERMARK M. The cytotoxin A from *Escherichia coli*. In: 4<sup>th</sup> International Workshop «Shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* infections», Kyoto, Japan. 2000, 47.
- VAN BOST S., MAINIL J. Reproduction of lesions and clinical signs with a CNF2-producing *Escherichia coli* in neonatal calves. *Adv. Exp. Med.*, 1999, **473**, 125-128.
- VAN BOST S., ROELS S., MAINIL J. Necrotogenic *Escherichia coli* type 2 invade and cause diarrhoea during experimental infection in colostrum-restricted newborn calves. *Vet. Microbiol.*, 2001, **81**, 315-329.
- VAN BOST S., ROELS S., OSWALD E., MAINIL J. Putative roles of CNF2 and CDTIII toxins in experimental infections with necrotogenic *Escherichia coli* type 2 (NTEC2) strains in calves. *Microbes Infect.*, 2003, **5**, 1189-1193.
- VAN HEYNINGEN W.E. General characteristics. In: Ajl S.J., Kadis S., Montie T.C. (Eds), Microbial toxins: a comprehensive treatise. Volume I: Bacterial protein toxins. Academic Press: London, 1970, 1-28.
- WALTON J.R., SMITH D.H. New hemolysin ( $\gamma$ ) produced by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1969, **98**, 304-305.
- WELCH R.A. Phylogenetic analyses of RTX family. In: Roth J.A., Bolin C.A., Brogden K.A., Minion F.C., Wannemuehler M.J. (Eds), Virulence mechanisms of bacterial pathogens. 2<sup>nd</sup> Edition. ASM Press: Washington, 1995, 195-206.
- WELCH R.A., HULL R., FALKOW S. Molecular cloning and physical characterization of a chromosomal hemolysin from *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 1983, **42**, 178-186.

- WHITFIELD C., KENLEYSIDE W.J., CLARKE B.R.  
Structure, function and synthesis of surface polysaccharides in *Escherichia coli*. In: Gyles C.L. (Ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International: Wallingford, 1994, 437-494.
- WRAY C., PIERCY D.W.T., CARROLL P.J., COOLEY W.A. Experimental infection of neonatal pigs with CNF toxin-producing strains of *Escherichia coli*. *Res. Vet. Science*, 1993, **54**, 290-298.
- YAMAMOTO S., TERAJ A., YURI K., KURAZONO H., TAKEDA Y., YOSHIDA O. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 1995, **12**, 85-90.
- YOUNG Y.B., CHIEN C.C., KNOX K.A., TAYLOR N.S., SCHAUER D.B., FOX J.G. Cytolethal distending toxin in avian and human isolates of *Helicobacter pullorum*. *J. Infect. Dis.*, 2000, **182**, 620-623.