

# Aspects modernes de la guerre des bactéries intestinales

## MODULE 1

Philippe SANSONETTI

Unité de Pathogénie Microbienne Moléculaire, INSERM U389, Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15.

## TABLE DES MATIÈRES

### LA BARRIÈRE INTESTINALE, CIBLE DES PATHOGÈNES ENTÉROINVASIFS

### MÉCANISMES MOLÉCULAIRES D'INVASION DES CELLULES ÉPITHÉLIALES PAR LES BACTÉRIES ENTÉROINVASIVES

### RÉPONSE INFLAMMATOIRE A L'INVASION

### COMMENT LES PATHOGÈNES ENTÉROINVASIFS ROMPENT, ENVAHISSENT ET DÉTRUISENT-ILS LA BARRIÈRE INTESTINALE ?

- Voie des cellules M
- Voie d'invasion trans-épithéliale
- Voies d'invasion dépendante de CD18

### CONCLUSION

Il n'existe pas de site dans l'organisme humain où les interactions entre flore microbienne et barrière épithéliale soient plus probables, plus importantes et plus intimes. Le rôle de la flore commensale, riche de  $10^{13}$  microorganismes dans le côlon, dans la différenciation, l'homéostasie et la fonction du tube digestif, commence tout juste à être abordé en termes analytiques et non simplement descriptifs. En revanche, même si elle reste accidentelle, l'interaction entre les bactéries pathogènes et la barrière intestinale a fait l'objet d'études beaucoup plus poussées.

L'étude des mécanismes moléculaires et cellulaires de l'invasion de la barrière intestinale par les bactéries pathogènes a représenté ces dernières années un des domaines moteurs de la recherche sur les mécanismes d'interaction entre les bactéries et leurs cellules cibles. De nouveaux termes sont apparus tels celui de « molecular cross-talk », recouvrant la notion de dialogue moléculaire singulier, d'échange réciproque de signaux aboutissant à l'expression de propriétés de nature diverse : a) entrée d'une bactérie dans une cellule épithéliale, par définition non phagocytaire ; b) survie et croissance de la bactérie au sein d'un compartiment façonné « sur mesure » ; c) motilité intracellulaire de la bactérie et capacité de passer d'une cellule à l'autre ; d) capacité de la bactérie de déclencher une réaction inflammatoire assurant la rupture et la destruction de la barrière épithéliale intestinale, mais aussi, à terme, l'éradication de la bactérie pathogène ; e) capacité de la bactérie de causer la mort de sa cellule hôte, épithéliale ou phagocytaire. A partir des trois pathogènes entéroinvasifs parmi les plus fréquents et les mieux étudiés, *Shigella*, *Yersinia* et *Salmonella*, nous analyserons comment cette succession de dialogues moléculaires singuliers aboutit à la rupture, l'invasion et la destruction inflammatoire de la barrière épithéliale intestinale.

## CONTENTS

### *New aspects of intestinal bacteria war*

### INTESTINAL BARRIER AS A TARGET FOR ENTEROINVASIVE PATHOGENS

### MOLECULAR MECHANISMS OF INVASION OF EPITHELIAL CELLS BY ENTEROINVASIVE BACTERIA

### INFLAMMATORY RESPONSE TO INVASION

### HOW DO ENTEROINVASIVE PATHOGENS BREAK, INVADE AND DESTROY THE INTESTINAL BARRIER?

- M cell route
- Transepithelial invasion route
- CD 18-dependent invasion route

### CONCLUSION

## La barrière intestinale, cible des pathogènes entéroinvasifs

En plus de ses capacités d'absorption et de digestion, l'épithélium intestinal exerce un effet de barrière contre les microorganismes de la flore commensale et les pathogènes. Si les premiers sont généralement incapables de franchir cette barrière chez un individu sain, les seconds ont acquis, essentiellement par transfert horizontal de matériel génétique, la capacité d'en assurer la subversion, voire de l'envahir. L'exclusion des microorganismes n'est pas seulement due à la barrière physique continue et imperméable que constitue l'épithélium grâce aux jonctions intercellulaires serrées [1]. D'autres facteurs participent à cette exclusion, particulièrement les microvillosités de la bordure en brosse et leurs extensions glycoprotéiques constituant le glycocalyx [2]. Péristaltisme intestinal, mucus et molécules à activité antibactérienne tels les sels biliaires, la lactoferrine, le lysozyme et les défensines encore appelées cryptidines, produites par les cellules de Paneth des cryptes intestinales, complètent cette panoplie de moyens de défense anti-infectieuse de la muqueuse intestinale [3]. La muqueuse intestinale a de plus une fonction immunologique en particulier dans le cadre de la production des IgA sécrétées qui jouent un rôle protecteur majeur. L'induction de cette fonction nécessite la capture des antigènes de la flore microbienne intestinale à travers des sites spécialisés correspondant à des zones différenciées de l'épithélium, ou épithélium folliculaire (Follicle Associated Epithelium) doté de cellules M [4]. Ces cellules M, dérivées des cellules épithéliales, sont dépourvues de glycocalyx et de microvillosités à leur surface. Elles présentent une intense activité d'endocytose et sont refermées en poche sur des cellules du système immunitaire : lymphocytes B, macrophages et cellules dendritiques. La différenciation de la cellule

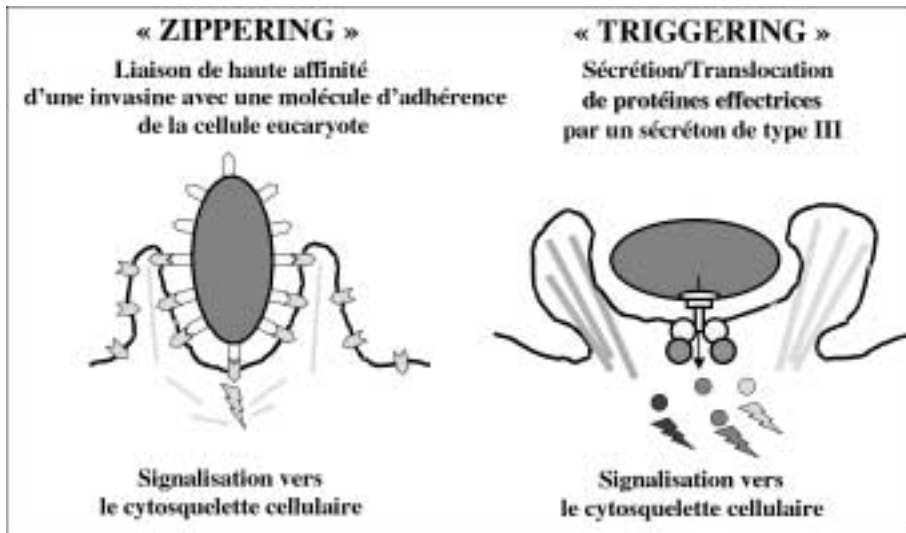


Fig. 1 – Les deux principaux mécanismes moléculaires d'entrée des bactéries dans les cellules épithéliales: « zippering » et « triggering »

The two main mechanisms of entry of bacteria into epithelial cells: zippering and triggering.

épithéliale en cellule M est un processus complexe impliquant une interaction étroite entre cellules épithéliales et cellules lymphoïdes [5]. Une zone sous-jacente riche en macrophages et cellules dendritiques, le dôme, assure l'apprêtage et la présentation des microorganismes et antigènes transloqués à travers les cellules M, afin d'assurer leur présentation optimale aux cellules lymphoïdes compétentes du follicule muqueux sous-jacent. Il s'avère que cette voie physiologique inductrice de l'immunité muqueuse, même si elle ne représente en surface qu'un dix-millième de la surface muqueuse intestinale, constitue une porte d'entrée très « prisée » des pathogènes bactériens et viraux du fait de la perméabilité des cellules M qui les transloquent très efficacement. Un des problèmes majeurs des pathogènes entéroinvasifs devient dès lors de survivre aux cellules tueuses (en particulier les macrophages résidents présents dans le dôme).

protéine de la membrane externe de la bactérie et un récepteur trans-membranaire d'adhérence de la cellule eucaryote. Le second mécanisme, appelé « triggering » ou entrée déclenchée correspond à l'induction d'une réorganisation massive du cytosquelette d'actine de la cellule eucaryote donnant lieu à la formation d'une vacuole de macropinocytose qui va internaliser la bactérie sans la nécessité d'une interaction de haute affinité entre les surfaces bactérienne et cellulaire.

*Yersinia pseudotuberculosis* est un modèle d'entrée par « zippering » qui requiert une protéine de membrane externe de 986 acides aminés, l'Invasine ou Inv [7]. Inv se lie avec une haute affinité aux intégrines de la famille  $\beta 1$  (figure 2) qui sont physiologiquement impliquées dans l'adhérence cellulaire à la matrice [8]. De plus, le domaine cytoplasmique de la sous-unité  $\beta$  des intégrines  $\beta 1$  transmet au cytosquelette cellulaire des signaux

## Mécanismes moléculaires d'invasion des cellules épithéliales par les bactéries entéroinvasives

L'entrée des bactéries dans les cellules épithéliales est la clé du succès d'une stratégie invasive. Les conséquences de cette invasion de la cellule épithéliale sur le déroulement du processus infectieux peuvent être regroupées en deux grandes catégories : a) les bactéries peuvent créer dans la cellule épithéliale une niche assurant leur survie, leur multiplication et leur dissémination. Dans ce contexte, les cellules épithéliales (cellules M et cellules épithéliales *stricto sensu*), représentent donc une véritable porte d'entrée chez l'hôte ; b) les bactéries peuvent reprogrammer la cellule envahie à devenir pro-inflammatoire, la positionnant ainsi au centre d'un réseau d'interactions, en particulier avec les cellules phagocytaires, ce qui va aboutir à la déstabilisation, à la rupture et à la destruction de l'épithélium. Au cours des processus infectieux entéroinvasifs, la cellule épithéliale devient un composant majeur de la réponse innée.

Une propriété commune est la capacité des bactéries entéroinvasives à être internalisées par des cellules qui ne sont pas des phagocytes professionnels. Il convient donc que ces bactéries expriment des propriétés originales leur permettant de se frayer un chemin dans la cellule. Deux grands mécanismes d'entrée des bactéries dans les cellules épithéliales ont été identifiés (figure 1) [6]. Le premier, appelé « zippering », ou entrée par un processus de fermeture éclair, correspond à l'enveloppement intime et progressif de la bactérie au sein de la membrane de la cellule eucaryote répondant à une interaction de haute affinité entre une

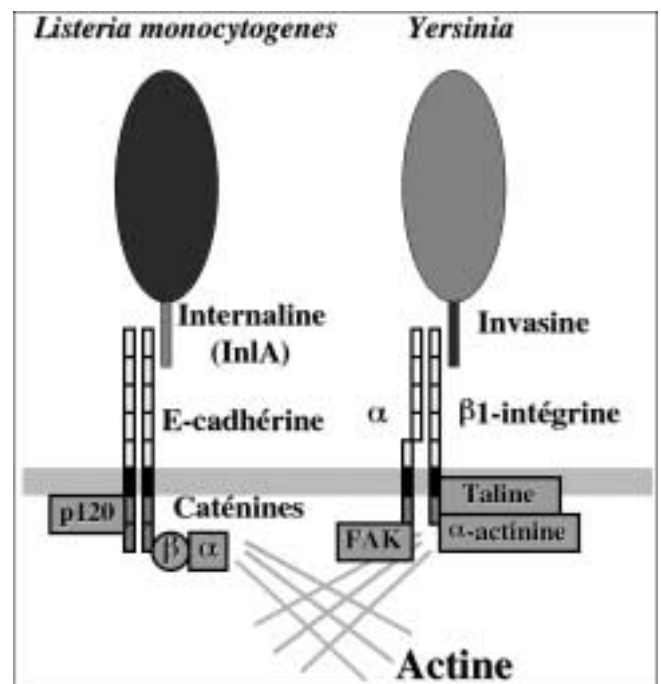
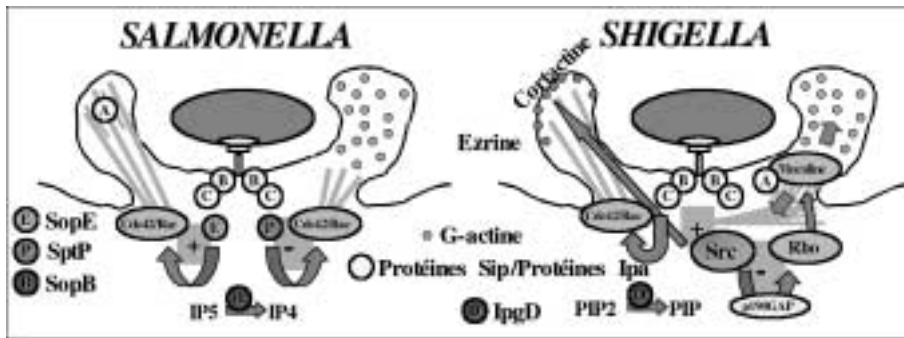


Fig. 2 – Exemples de phénomène d'entrée par « zippering » médiée par l'invasine (*Yersinia*) ou par l'internaline A (*Listeria monocytogenes*)

Examples of zippering entry process mediated by invasin (*Yersinia*) or internalin (*Listeria monocytogenes*)



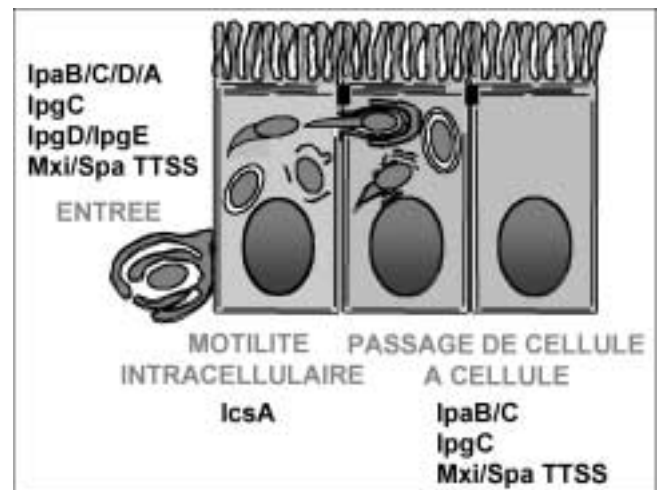
**Fig. 3** – Entrée dans la cellule par « triggering » de *Salmonella* et *Shigella*  
Entry into cell by triggering of *Salmonella* and *Shigella*

d'activation passant par la tyrosine kinase FAK qui renforcent le processus d'internalisation [9].

*Shigella* et *Salmonella* représentent des modèles typiques d'entrée par « triggering » qui requièrent un sécrétion de type III (figure 3), c'est à dire un appareil de sécrétion activable au contact de la cellule eucaryote, permettant à la bactérie d'insérer dans la membrane cellulaire un pore à travers lequel des protéines effectrices peuvent être injectées dans le cytoplasme eucaryote. Ce sécrétion a pu être visualisé [10, 11]. Un résultat spectaculaire, dans ce contexte, est le déclenchement d'une réorganisation massive du cytosquelette liée à l'apparition de multiples foyers sous-membranaires de nucléation de l'actine se transformant rapidement en filaments d'actine dont l'organisation cause la formation de projections de la surface de la cellule qui vont se résoudre en une vacuole de macropinocytose aboutissant à l'internalisation du corps bactérien. La diversité des effecteurs de *Shigella* et *Salmonella* injectés par leurs sécrétions respectifs, les signaux et réorganisations du cytosquelette qu'ils entraînent sont résumés dans la figure 4. Bien que les processus moléculaires diffèrent d'une bactérie à l'autre, il existe des constantes dans la dynamique de réorganisation du cytosquelette : la première étape requiert la nucléation de l'actine sous-membranaire. Cette nucléation est causée par la protéine IpaC chez *Shigella*, un élément constitutif du pore [12] et probablement par son homologue SipC chez *Salmonella* [13]. Une seconde étape requiert l'extension et l'organisation des filaments d'actine issus des foyers de nucléation en structures filopodiales puis lamellipodiales qui constituent la poche de macropinocytose. Ces étapes critiques répondent à l'activation de petites GTPases de la famille Rho, particulièrement Cdc42 et Rac qui induisent ce type de structure dans leur forme liée au GTP [14]. Dans le cas de *Shigella*, IpaC semble en être l'activateur principal [15]. De plus, le recrutement du proto-oncogène *c-src* au foyer d'internalisation contribue à l'extension massive des filaments d'actine grâce à sa capacité de recruter et d'activer par phosphorylation sur tyrosine une protéine de liaison à l'actine, la cortactine et par sa capacité de bloquer l'activité d'une autre GTPase, Rho, entraînant ainsi une activation soutenue de Cdc42 et Rac [16]. Dans le cas de *Salmonella*, une protéine sécrétée, SopE, agit comme un facteur d'échange activant les petites GTPases Cdc42 et Rac pour lesquelles elle catalyse l'échange de GDP pour le GTP [17]. De plus, une autre protéine sécrétée, SipA, se fixe aux filaments d'actine, les stabilise et accroît l'efficacité d'internalisation du foyer [18]. La troisième étape est une étape de réparation permettant la fermeture et la dissolution du foyer et assurant une internalisation efficace de la vacuole. Chez *Shigella*, elle est assurée par l'injection de la protéine IpaA qui lie et active la vinculine, cette dernière liant les filaments d'actine et entraînant leur dépolymérisation [19]. Chez *Salmonella*, elle semble essentiellement assurée par la protéine SptP dont la fonction d'activation de la fonction GTPase de Cdc42 et Rac (passage de la forme liée au GTP à la forme liée au GDP) induit un phénomène opposé à SopE qui amène la dépolymérisation des filaments d'actine [20].

Une fois intracellulaires, *Shigella* et *Salmonella* affectent un comportement radicalement différent qui conditionne largement les différences cliniques observées. Les salmonelles demeurent dans un compartiment vacuolaire modifié au sein duquel elles survivent et se multiplient alors que les shigelles lysent la vacuole de phagocytose, échappent dans le cytoplasme et expriment un phénotype de motilité dépendant de l'actine permettant leur passage de cellule à cellule. La motilité intracellulaire de *Shigella* est due à l'expression polaire d'une protéine de membrane externe, IcsA [21], qui lie sur son extrémité N-terminale caractérisée par des séquences répétées riches en glycine une protéine cytoplasmique, N-WASP [22]. Suivant sa liaison avec IcsA, N-WASP s'active et lie par son domaine C-terminal acide un complexe de sept protéines, Arp2/3, qui entraîne la nucléation/polymérisation de l'actine [23]. La bactérie est alors propulsée dans le cytoplasme cellulaire à la vitesse de polymérisation de l'actine. Ce mouvement permet le passage de la bactérie de cellule à cellule au sein d'une monocouche épithéliale polarisée, ce passage s'effectuant grâce à l'engagement des éléments de la jonction cellulaire, en particulier les cadhérines des jonctions intermédiaires [24]. La bactérie lyse alors les membranes de la protrusion et de la cellule adjacente, permettant ainsi son accès au cytoplasme de cette cellule. Ce processus permet une colonisation rapide et efficace de l'épithélium caractéristique de l'infection par *Shigella* (figure 4).

Les salmonelles pathogènes donnent lieu à la formation d'un compartiment vacuolaire atypique qui acquiert certains composants des compartiments lysosomiaux comme Igp et Lamp, mais ni les cathepsines D et L ni les récepteurs au mannose-6-phosphate, qui sont des marqueurs de maturation tardive des lysosomes [25]. La capacité de façonner ce compartiment particulier par recrutement de matériel membranaire de type



**Fig. 4** – Cycle infectieux de *Shigella* au sein des cellules épithéliales.  
Infectious cycle of *Shigella* in epithelial cells.

lysosome précoce est liée à l'expression d'un second système de virulence appelé SPI2 comportant en particulier un second sécrétion de type III. L'environnement ainsi créé est sans doute favorable à la survie et à la croissance bactérienne. Ce compartiment particulier est aussi caractérisé par sa capacité de former des structures tubulo-acinaires très caractéristiques [26].

## Réponse inflammatoire à l'invasion

Les cellules épithéliales, en réponse à l'invasion par des pathogènes, expriment une gamme importante de molécules pro-inflammatoires : cytokines, chémokines, molécules d'adhésion, etc. [27]. La capacité de discriminer entre les bactéries pathogènes (particulièrement les bactéries invasives) et non-pathogènes est une propriété importante des cellules de l'épithélium intestinal, en particulier colique. Il s'avère de plus en plus que les systèmes de reconnaissance bactérienne utilisés par les cellules épithéliales sont très différents de ceux utilisés par les cellules de lignée myéloïde, en particulier les monocytes-macrophages. Les premiers se sont sans doute développés dans des conditions de pression sélective où le maintien de l'homéostasie de la barrière épithéliale intestinale en présence de la flore commensale est un élément prédominant. Il est en effet probable que l'expression de facteurs de perception des motifs bactériens (LPS, peptidoglycane, lipoprotéines et lipopeptides) comme CD14, TLR2 et TLR4 [28] au niveau des cellules épithéliales qui y sont en permanence exposées a été contre-sélectionnée afin d'éviter les risques d'un état quasi permanent d'inflammation intestinale. Les seules preuves d'une expression de TLR4 par les cellules épithéliales coliques ont été obtenues sur des biopsies intestinales provenant de malades atteints de MICI [29]. On peut cependant considérer qu'en condition d'homéostasie les cellules épithéliales coliques sont réfractaires à la présence de motifs communs aux bactéries tels le LPS et le peptidoglycane. Elles doivent cependant être en mesure de percevoir la présence des bactéries pathogènes. Comment les cellules épithéliales peuvent-elles donc discriminer entre une bactérie pathogène et une bactérie non-pathogène en comparaison des cellules de lignée myéloïde comme monocytes et macrophages et comment répondent-elles lorsque ce processus a été alerté ? Deux systèmes de perception exprimés par les cellules épithéliales sont maintenant identifiés. Un système de perception-signalisation permet la reconnaissance de la flagelline extracellulaire [30]. Il s'avère répondre à l'expression de la molécule TLR5. Cependant, la position essentiellement baso-latérale de cette molécule pose le problème de sa pertinence dans la reconnaissance de bactéries pathogènes lumineuses. Un autre système reconnaît des motifs bactériens en position intracellulaire. Il correspond à un ou plusieurs membres de la famille Nod, particulièrement Nod1, une protéine cytoplasmique exprimée dans les cellules épithéliales, qui est constituée par un motif C-terminal riche en leucine, un domaine central de liaison des nucléotides similaire aux protéines de résistance des plantes et un domaine N-terminal ou domaine CARD similaire aux protéines pro-apoptotiques CED-4 et APAF-1 [31, 32]. Nod-1 reconnaît possiblement le LPS *via* son domaine C-terminal riche en leucine [33]. Nous avons récemment démontré que la présence intracellulaire de *Shigella* était perçue par NOD-1, essentiellement par l'intermédiaire du LPS libéré par la bactérie dans le compartiment cytoplasmique de la cellule épithéliale, conduisant ainsi à l'activation de NF- $\kappa$ B et de Jun-Terminal-Kinase ou JNK [34]. Ceci explique les résultats d'expériences précédemment réalisées au cours desquelles nous avons démontré que la simple micro-injection de LPS dans des cellules épithéliales activait NF- $\kappa$ B [35]. Il apparaît donc que la cellule épithéliale héberge un système moléculaire susceptible de percevoir la présence d'une bactérie intracellulaire et d'y répondre par l'activation de NF- $\kappa$ B. Nous n'avons pas pour

l'instant d'idée précise de la gamme de motifs microbiens reconnus par ce système. Possède-t-il, par exemple, la diversité du système TLR, voire plus encore ? Comment s'effectue la perception ? Quels sont les maillons dans la chaîne de signalisation menant à l'activation de NF- $\kappa$ B et de JNK ? Quel est l'impact de cette activation sur la survie de la cellule infectée [36] ? L'existence et la signification de ce système a récemment pris une grande ampleur avec la démonstration qu'une mutation dans NOD-2, un homologue de NOD-1 essentiellement exprimé dans les macrophages, était présente dans un certain pourcentage de maladies de Crohn [37, 38]. Ceci suggère une possible effraction microbienne mal contrôlée à l'origine des poussées inflammatoires aiguës.

## Comment les pathogènes entéroinvasifs rompent, envahissent et détruisent-ils la barrière intestinale ?

De récents travaux combinant modèles cellulaires *in vitro* et modèles animaux d'invasion bactérienne de l'épithélium intestinal ont révélé un schéma complexe. On peut actuellement reconnaître trois voies principales d'invasion : les cellules M de l'épithélium folliculaire, les cellules épithéliales elles-mêmes et une voie dépendante de CD-18 [39].

### Voie des cellules M

Une grande variété d'espèces bactériennes, virus et protozoaires, transloquent à travers l'épithélium intestinal grâce aux cellules M [40, 41]. Ces pathogènes profitent de l'existence d'une route physiologique de passage des antigènes pour traverser la barrière intestinale. Contrairement au concept classique de traversée primaire des cellules épithéliales qui est extrêmement difficile à réaliser, même pour des bactéries invasives [42], ces bactéries semblent traverser relativement aisément l'épithélium folliculaire *via* les cellules M. Cependant, une autre épreuve dès lors les attend. Elles doivent en effet survivre à la phagocytose par les macrophages résidents du dôme sous-jacent à l'épithélium folliculaire. L'invasion de l'épithélium à proprement parler va donc survenir secondairement, ce qui complique le concept de bactérie entéroinvasive.

Dans le cas de *Shigella* (figure 5), avant que ne se développe le syndrome dysentérique, les lésions initiales de la muqueuse colo-rectale ressemblent souvent à des ulcérations aphtoides correspondant à la présence d'un follicule lymphoïde sous-jacent [43]. De plus, lors d'infections expérimentales chez le singe macaque ou dans l'anse intestinale ligaturée de lapin, il a été montré que le site initial d'entrée des bactéries était l'épithélium folliculaire en regard de nodules lymphoïdes solitaires de la muqueuse colo-rectale chez le singe [44] et des plaques de Peyer chez le lapin [45, 46]. Il n'existe pas de système de surface assurant, chez *Shigella*, l'adhérence à l'apex de la cellule M. Il semble par contre que l'expression du phénotype invasif soit essentielle à une translocation significative. Une fois dans le dôme folliculaire, *Shigella* doit survivre à la phagocytose et aux mécanismes de défense des macrophages résidents. La stratégie de survie, dans ce cas, est de causer la mort apoptotique du macrophage infecté [46, 47]. Cette mort apoptotique est déclenchée par IpaB qui active une cystéine protéase, caspase-1 [48, 49]. Caspase-1 est aussi impliquée dans l'initiation de l'inflammation au niveau des sites d'entrée initiaux de *Shigella* car cet enzyme est aussi impliqué dans la maturation de IL-1 $\beta$  et IL-18, deux puissantes cytokines pro-inflammatoires.

Dans le cas de *Yersinia* (figure 6), deux grands types d'infections peuvent être observés. Avec *Y. enterocolitica*, il s'agit

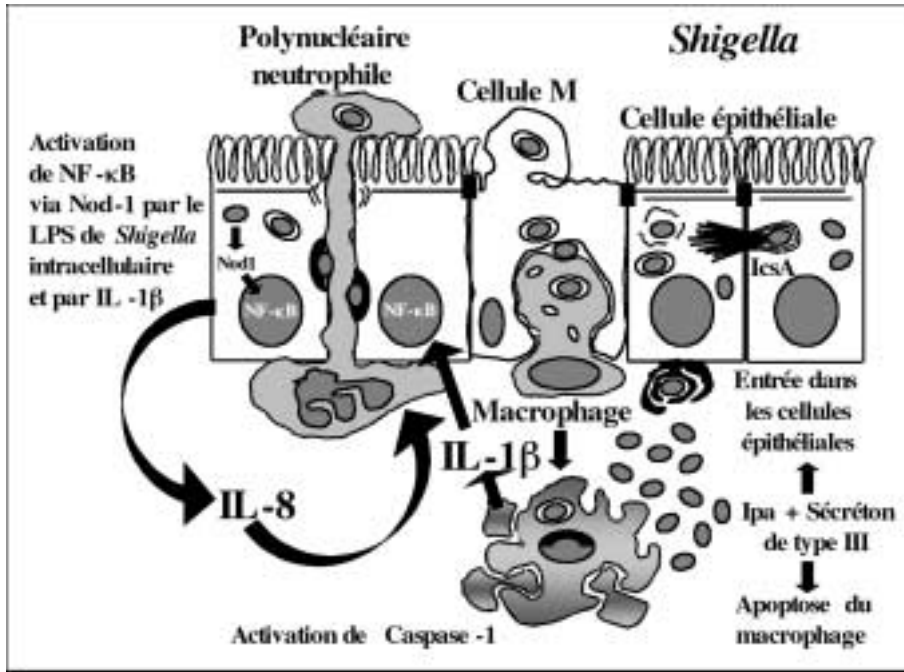


Fig. 5 – Mécanismes moléculaires et cellulaires de l'invasion et de la destruction inflammatoire de la barrière intestinale par *Shigella*

*Molecular and cellular mechanisms of invasion and inflammatory destruction of intestinal barrier by Shigella*

essentiellement d'une diarrhée limitée. Avec *Y. pseudotuberculosis*, la diarrhée est suivie éventuellement d'un tableau d'adénite mésentérique, voire parfois de septicémie. *Yersinia* traverse aussi la barrière intestinale via l'épithélium folliculaire, particulièrement au niveau des plaques de Peyer de l'iléon terminal [50]. Inv de *Y. pseudotuberculosis* lie les intégrines  $\beta 1$  qui sont exprimées sur l'apex de la cellule M et utilise ces récepteurs pour être internalisés par les cellules M. Les mutants Inv- continuent à transloquer à travers les cellules M, mais à un niveau beaucoup plus faible et leur potentiel de colonisation pour les plaques de Peyer est considérablement réduit [51]. D'autres protéines de surface sont probablement impliquées dans ce pouvoir invasif résiduel. Dès le dôme folliculaire atteint, les bactéries, ici encore, doivent survivre aux macrophages résidents. La stratégie de survie de *Yersinia* est marquée par sa capacité d'exercer sur les macrophages une activité anti-phagocytaire. Elle fait ceci par l'intermédiaire de l'injection, à travers le sécrétion de type III, de trois protéines effectrices, YopH, T et E qui rompent l'assemblage du cytosquelette nécessaire au processus phagocytaire [52, 53]. YopH est une tyrosine phosphatase qui déphosphoryle la paxiline, p130<sup>cas</sup> et FAK, trois protéines impliquées dans la constitution des plaques focales requises pour le processus phagocytaire [54]. YopT provoque la dépolymérisation des filaments d'actine entraînant la redistribution de la GTPase Rho [55]. YopE a une fonction GAP qui inhibe la fonction des petites GTPases Rho impliquées dans la phagocytose [56]. Les *Yersiniae* demeurent donc essentiellement extracellulaires au sein des plaques de Peyer et des ganglions mésentériques infectés. Ceci permet leur survie et prépare ainsi l'étape suivante d'entrée intracellulaire.

*Salmonella typhimurium* (figure 7) traverse la barrière épithéliale intestinale chez la souris et cause une infection septicémique fatale. Une situation similaire est observée chez l'homme après infection orale par *Salmonella typhi*. *S. typhimurium* adhère aux cellules M et transloque à travers l'épithélium folliculaire dans l'intestin murin [57, 58]. Elle est toxique pour les cellules M [58, 59]. Des fimbriae appelés Lpf assurent l'adhérence de *S. typhimurium* à l'apex des cellules M [60]. Ils ne sont cependant qu'un des éléments d'un répertoire de systèmes de l'adhésion aux cellules M qui est suivie de modifications massives de surface reflétant une réorganisation du cytosquelette similaire à celle observée lors de l'entrée de la bactérie dans des cellules en

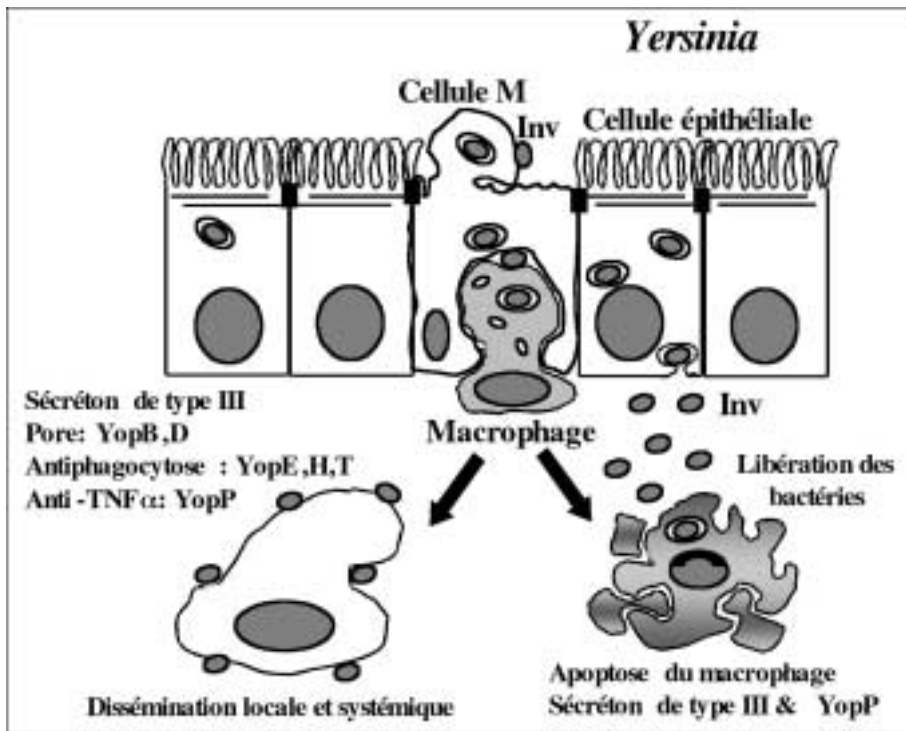
culture [61]. Le système d'invasion SPI1 déjà décrit contribue à l'invasion des cellules M et donc à la capacité de *S. typhimurium* de traverser la barrière épithéliale intestinale [62]. Une fois atteint le dôme folliculaire, faisant suite à sa phagocytose par les macrophages résidents et les cellules dendritiques [63] par l'intermédiaire du système SPI1, *S. typhimurium* cause la mort du macrophage infecté via SipB qui, comme IpaB chez *Shigella*, active Caspase-1 [64]. Cependant, comme mentionné précédemment, *S. typhimurium* a aussi développé une stratégie de survie au sein des macrophages qui pourrait faciliter sa dissémination systémique. SPI2, un second îlot de pathogénicité codant pour un sécrétion de type III alternatif et un certain nombre de protéines effectrices est responsable en partie de la mise en place de ce compartiment de survie [65]. Comment se fait le « switch » entre l'expression de SPI1 qui cause la mort apoptotique du macrophage et l'expression de SPI2 qui entraîne la formation d'un compartiment de type lysosome précoce est un point crucial encore non expliqué. De plus, une série de gènes régulés par le système à deux composants PhoP/Q code pour des protéines contribuant à la survie bactérienne au sein du macrophage. Il s'agit ici d'un très bel exemple de co-évolution au cours duquel un microorganisme doit développer deux stratégies successives, l'une agressive lui permettant de traverser une barrière, l'autre assurant sa survie et un certain respect de ses cellules cibles car, après tout, il n'est pas nécessairement avantageux pour un pathogène de détruire son hôte.

### Voie d'invasion trans-épithéliale

Bien que les cellules M semblent rendre compte d'une grande partie du passage de la barrière épithéliale par les microorganismes entéroinvasifs, il existe très probablement des voies alternatives. La microscopie électronique avait en effet montré l'existence d'un passage trans-épithélial au niveau des villosités de l'intestin grêle pour *Salmonella* [66].

### Voies d'invasion dépendante de CD18

Même si les mutants SPI1-négatifs de *S. typhimurium* sont déficients dans l'invasion des cellules M et des cellules épithéliales, ils conservent leur capacité de disséminer dans la souris et de

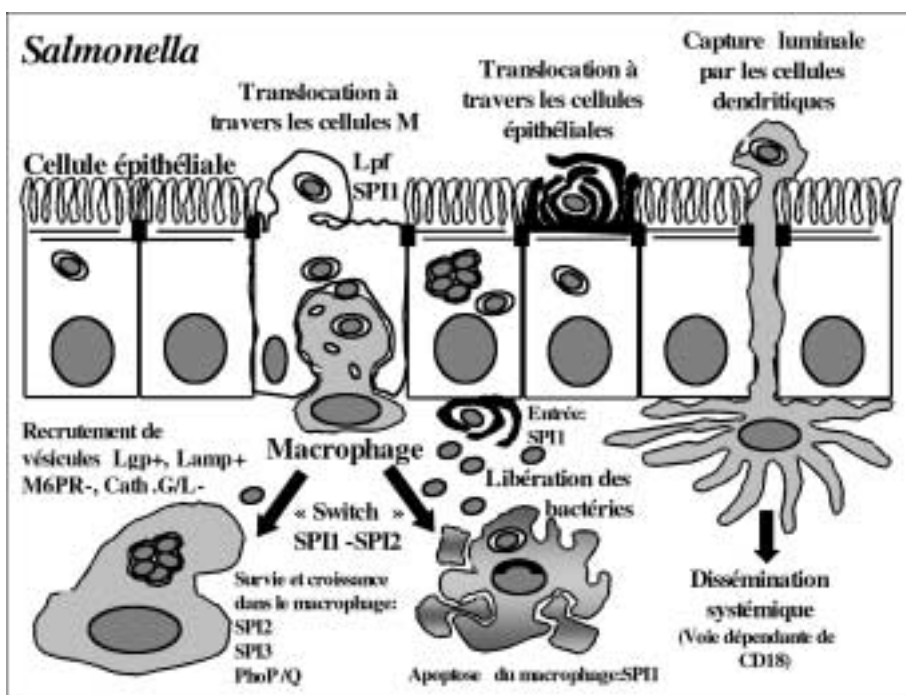


**Fig. 6** – Mécanismes moléculaires et cellulaires de l’invasion de la barrière intestinale par *Yersinia*

*Molecular and cellular mechanisms of epithelial barrier invasion by Yersinia*

la tuer [67]. De la même façon, les mutants *Inv*<sup>-</sup> de *Y. enterocolitica* sont incapables de coloniser les plaques de Peyer et les ganglions mésentériques correspondants, mais conservent leur capacité de dissémination systémique chez la souris [68]. Ces observations ont suggéré qu’il existait des voies alternatives aux cellules M et aux cellules épithéliales pour transloquer à travers la barrière épithéliale intestinale. Une voie dépendante de CD18 existe qui recouvre probablement plusieurs situations [69]. Chez *Salmonella*, il semble que des cellules exprimant la molécule CD18 soient capables de migrer entre les cellules épithéliales et d’aller capturer les bactéries en position luminale avant de les ramener en position sous-épithéliale et, probablement, d’en assurer la dissémination systémique. Il est possible

que les cellules dendritiques en position immédiatement sous-épithéliale hors infection assurent cette fonction [70]. *Shigella* utilise un processus similaire dans la mesure où, faisant suite à l’attraction des polynucléaires neutrophiles par l’IL-8 produite par les cellules épithéliales infectées, ces polynucléaires traversent la barrière épithéliale, en rompent la perméabilité, et facilitent ainsi l’irruption des bactéries dans la région latérobasale où elles peuvent envahir. Dans des modèles de coculture cellulaire *in vitro* [71] et *in vivo* dans l’anse intestinale ligaturée de lapin [72], la neutralisation de l’attachement des polynucléaires neutrophiles aux cellules épithéliales et de leur transmigration par un anticorps anti-CD18 bloque quasi totalement l’invasion cellulaire et tissulaire.



**Fig. 7** – Mécanismes moléculaires et cellulaires de l’invasion de la barrière intestinale par *Salmonella*

*Molecular and cellular mechanisms of intestinal barrier invasion by Salmonella*

## Conclusion

Nous avons tenté de synthétiser les processus complexes permettant à un pathogène entéroinvasif de rompre, d'envahir et d'assurer la destruction inflammatoire de la barrière épithéliale intestinale. L'accent a été mis sur le dialogue moléculaire singulier qui s'établit entre la bactérie invasive et les éléments cellulaires qui constituent cette barrière intestinale. Un jeu subtil existe, aux étapes très précoces du processus infectieux, entre processus invasifs et processus inflammatoires. Nous nous acheminons de plus en plus vers une transition passant de la microbiologie cellulaire à une microbiologie tissulaire prenant en compte la globalité des processus. Des outils nouveaux explorant la globalité de ces processus sont indispensables. Imagerie et méthodologies post-génomiques seront d'une grande aide dans ce nouveau défi dont les applications dans le domaine de la mise au point de vaccins, de traitements anti-infectieux innovants, mais aussi dans la compréhension de l'étiologie et de la physiopathologie des maladies inflammatoires de l'intestin.

**REMERCIEMENTS** - Je tiens à remercier les collaboratrices et collaborateurs de l'Unité de Pathogénie Microbienne Moléculaire pour les échanges qui ont amené à la rédaction de ce texte et Colette Jacquemin pour l'aide précieuse à son édition.

## RÉFÉRENCES

- Madara JL, Nash S, Moore S, Atisook K. Structure and function of the intestinal epithelial barrier in health and disease. *Monog Pathol* 1990;31:306-24.
- Maury J, Nicoletti C, Guzzo-Chambraud I, Maroux S. The filamentous brush border glycocalyx, a mucin-like marker of enterocyte hyperpolarisation. *Eur J Biochem* 1995;228:323-31.
- Sanderson IR, Walker WA. Mucosal barrier, an overview. In : Ogra PL, Lamm ME, Bienenstock J, Mestecky J, Strober W, McGhee JR, eds. *Mucosal Immunology*, Edition 2. San Diego : Academic press, 1999:5-17.
- Neutra MR. M cells in antigen sampling. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999;236:17-22.
- Kerneis S, Bogdanova A, Kraehenbuhl JP. Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria. *Science* 1996;277:949-52.
- Isberg RR. Discrimination between intracellular uptake and surface adhesion of bacterial pathogens. *Science* 1991;252:934-8.
- Isberg RR. Uptake of enteropathogenic *Yersinia* by mammalian cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;209:1-24.
- Isberg RR, Barnes P. Subversion of integrins by enteropathogenic *Yersinia*. *J Cell Science* 2001;114:21-8.
- Alruz M, Isberg RR. Involvement of focal adhesion kinase in invasion-mediated uptake. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13658-63.
- Blocker A, Gounon P, Larquet E. Role of *Shigella*'s type III secretion system in insertion of IpaB and IpaC into the host membrane. *J Cell Biol* 1999;147:683-93.
- Kubori T, Matsushima Y, Nakamura, D. Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* 1998;280:602-5.
- Tran Van Nhieu G, Caron E, Hall A. IpaC determines filopodia formation during *Shigella* entry into epithelial cells. *EMBO J* 1999;18:3249-62.
- Hayward R, Koronakis V. Direct nucleation and bundling of actin by the SipC protein of invasive *Salmonella*. *EMBO J* 1999;18:4926-34.
- Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998;279:509-14.
- Mounier J, Laurent V, Hall A, Fort P, Carlier MF, Sansonetti PJ et al. Rho family GTPases control entry of *Shigella flexneri* into epithelial cells but not intracellular motility. *J Cell Science* 1999;112:2069-80.
- Dumenil G, Sansonetti PJ, Tran Van Nhieu G. Src tyrosine kinase activity down-regulates Rho-dependent responses during *Shigella* entry into epithelial cells and stress fiber formation. *J Cell Sci* 2000;113:71-80.
- Galan J, Zhou D. Striking the balance : modulation of the actin cytoskeleton by *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:8754-61.
- Zhou D, Mooseker MS, Galan JE. Role of the *Salmonella typhimurium* actin-binding protein SipA in bacterial internalisation. *Science* 1999;283:2092-5.
- Bourdet-Sicard R, Rudiger M, Sansonetti PJ. Vinculin is unfolded by the *Shigella* protein IpaA, and the complex promotes F-actin depolymerization. *EMBO J* 1999;18:5853-62.
- Fu Y, Galan JE. A *Salmonella* protein antagonises Rac-1 and Cdc42 to mediate host cell recovery after bacterial invasion. *Nature* 1999;401:293-7.
- Bernardini ML, Mounier J, d'Hauteville H, Coquis-Rondon M, Sansonetti PJ. Identification of icsA, a plasmid locus of *Shigella flexneri* which governs bacterial intra- and intercellular spread through interaction with F-actin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:3867-71.
- Miki H, Suetsugu S, Takenawa T. WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *EMBO J* 1998;17:6932-41.
- Egile C, Loisel TP, Laurent V. Activation of the CDC42 effector N-WASP by the *Shigella* icsA protein promotes actin nucleation by Arp2/3 complex and bacterial actin-ased motility. *J Cell Biol* 1999;146:1319-32.
- Sansonetti PJ, Mounier J, Prévost MC. Cadherin expression is required for the spread of *Shigella flexneri* between epithelial cells. *Cell* 1994;76:829-39.
- Méresse S, Steele-Mortimer O, Finlay BB, Gorvel JP. The Rab-7 GTPase controls the maturation of *Salmonella typhimurium*-containing vacuole in HeLa cells. *EMBO J* 1999;18:4394-403.
- Garcia del Portillo F, Zwick MB, Leung KY, Finlay BB. *Salmonella* induces the formation of filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10544-8.
- Jung HC, Eckmann I, Yang SK. A distinct array of pro-inflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest* 1995;95:55-65.
- Kopp EB, Medzhitov R. The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2000;11:13-8.
- Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of Toll-like receptor 3 and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 2000;68:7010-7.
- Gerwitz AT, Simon PO, Schmitt CK, Taylor LJ, Hagedorn CH, O'Brien AD et al. *Salmonella typhimurium* translocates flagellin across intestinal epithelia, inducing a pro-inflammatory response. *J Clin Invest* 2001;107:99-109.
- Bertin J, Nir W, Fischer C, Tayber O, Errada P, Grant J et al. Human CARD-4 protein is a novel CED-4/APAF-1 cell death family member that activates NF- $\kappa$ B. *J Biol Chem* 1999;274:12955-8.
- Inohara N, Koseki T, del Peso L, Hu Y, Yee C, Chen S et al. Nod-1, an APAF-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor- $\kappa$ B. *J Biol Chem* 1999;274:14560-7.
- Inohara N, Ogura Y, Chen FF, Muto A, Nunez G. Human NOD-1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 2000;276:2551-6.

34. Girardin S, Tournebise R, Mavris M. CARD4/Nod1 mediates NF- $\kappa$ B and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. *EMBO Rep* 2001;2:736-42.
35. Philpott DJ, Yamaoka S, Israël A, Sansonetti PJ. Invasive *Shigella flexneri* activates NF- $\kappa$ B through an LPS-dependent innate intracellular response and leads to IL-8 expression in epithelial cells. *J Immunol* 2000;165:903-14.
36. Philpott D, Girardin S, Sansonetti PJ. Innate immune responses of epithelial cells following infection with bacterial pathogens. *Curr Opin Immunol* 2001;13:410-6.
37. Ogura Y, Bonen D, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603-6.
38. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaïches J et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603.
39. Vasquez-Torrez A, Fang F. Cellular routes of invasion by enteropathogens. *Curr Opin Microbiol* 2000;3:54-9.
40. Owen RL. Uptake and transport of intestinal macromolecules and microorganisms by M cells and Peyer's patches - a historical and personal perspective. *Sem Immunol* 1999;11:157-63.
41. Sansonetti P, Phalipon A. M cells as ports of entry for enteroinvasive pathogens : mechanisms of interaction, consequences for the disease process. *Sem Immunol* 1999;11:193-203.
42. Mounier J, Vasselon T, Hellio R, Lesourd M, Sansonetti PJ. *Shigella flexneri* enters human colonic Caco-2 cells through the baso-lateral pole. *Infect Immun* 1992;60:237-48.
43. Mathan MM, Mathan VI. Intestinal manifestations of invasive diarrheas and their diagnosis. *Rev Infect Dis* 1991;13(suppl.4):S314-8.
44. Sansonetti PJ, Arondel J, Fontaine A, d'Hauteville H, Bernardini ML. OmpB (osmo-regulation) and icsA (cell to cell spread) mutants of *Shigella flexneri*. Evaluation as vaccine candidates. Probes to study the pathogenesis of shigellosis. *Vaccine* 1991;9:416-22.
45. Wassef JS, Keren DF, Mailloux JL. Role of M cells in initial antigen uptake and in ulcer formation in the rabbit intestinal loop model of shigellosis. *Infect Immun* 1989;57:858-63.
46. Sansonetti PJ, Arondel J, Cantey RJ, Prévost MJ, Huerre M. Infection of rabbit Peyer's patches by *Shigella flexneri* : effect of adhesive and invasive bacterial phenotypes on follicular-associated epithelium. *Infect Immun* 1996;64:2752-64.
47. Zychlinsky A, Prévost MC, Sansonetti PJ. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature* 1992;358:167-9.
48. Chen Y, Smith MR, Thirumalai K, Zychlinsky A. A bacterial invasin induces macrophages apoptosis directly to ICE. *EMBO J* 1996;15:3853-60.
49. Hilbi H, Moss JE, Hersh D, Chen Y, Arondel J, Banerjee S et al. *Shigella-induced* apoptosis is dependent on caspase-1 which binds to IpaB. *J Biol Chem* 1998;273:32895-900.
50. Grutzkau A, Hanski C, Hanhn, H, Riecken EO. Involvement of M cell in the bacterial invasion of Peyer's patches : a common mechanism shared by *Yersinia enterocolitica* and other enteroinvasive bacteria. *Gut* 1990;31:1011-5.
51. Clark MA, Hirst BH, Jepson MA. M-cell surface b1 integrin expression and invasin-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. *Infect Immun* 1998;66:1237-43.
52. Fällmann M, Persson C, Wolf-Watz H. *Yersinia* proteins that target host cell signalling pathways. *J Clin Invest* 1997;99:1153-7.
53. Cornelis G. The *Yersinia* deadly kiss. *J Bacteriol* 1998;180:5495-504.
54. Persson C, Carballeira N, Wolf-Watz H, Fällmann M. The PTPase YopH inhibits uptake of *Yersinia*, tyrosine phosphorylation of p130<sup>cas</sup> and FAK, and the associated accumulation of these proteins in peripheral focal adhesions. *EMBO J* 1997;16:2307-18.
55. Zumbihl R, Aepfelbacher M, Andor A, Jacobi C, Ruckdeschel K, Rouot B et al. The cytotoxin YopT of *Yersinia enterocolitica* induces modifications and cellular redistribution of the small GTP-binding protein RhoA. *J Biol Chem* 1999;274:29289-93.
56. Black D, Bliska J. The RhoGAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin YopE is required for antiphagocytosis function and virulence. *Mol Microbiol* 2000;37:515-27.
57. Clark MA, Jepson MA, Simmons NL, Hirst BH. Preferential interaction of *Salmonella typhimurium* with mouse Peyer's patch M cells. *Res Microbiol* 1994;145:543-52.
58. Jones BD, Ghori N, Falkow S. *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialised epithelial M cells of Peyer's patches. *J Exp Med* 1994;180:15-23.
59. Kohbata S, Yokobata H, Yabuuchi E. Cytopathogenic effect of *Salmonella typhi* GIFU10007 on M cells of murine ileal Peyer's patches in ligated ileal loops : an ultrastructural study. *Microbiol Immunol* 1986;30:1225-37.
60. Baumler AJ, Tsolis RM, Heffron F. The Ipf fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella typhimurium* to murine Peyer's patch. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:279-83.
61. Finlay BB, Falkow S. *Salmonella* interaction with polarised human intestinal Caco-2 epithelial cells. *J Infect Dis* 1990;162:1096-106.
62. Penheiter KL, Mathur N, Giles D, Fahlen T, Jones BD. Non-invasive *Salmonella typhimurium* mutants are avirulent because of an inability to enter and destroy M cells of ileal Peyer's patches. *Mol Microbiol* 1997;24:697-709.
63. Hopkins SA, Niedergang F, Cortesy-Theulaz IE, Kraehenbuhl, JP. A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine strain is taken up and survives within murine Peyer's patch dendritic cells. *Cell Microbiol* 2000;2:59-68.
64. Hersh D, Monack DM, Smith MR, Ghori N, Falkow S. The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to Caspase-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:2396-401.
65. Shea J, Hensel M, Gleeson C, Holden D. Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2593-7.
66. Takeuchi A. Electron microscope studies of experimental *Salmonella* infection. *Am J Pathol* 1966;50:109-36.
67. Everest P, Ketley J, Hardy S, Douce G, Khan S, Shea J et al. Evaluation of *Salmonella typhimurium* mutants in a model of experimental gastroenteritis. *Infect Immun* 1999;67:2815-21.
68. Pepe J, Miller VL. *Yersinia enterocolitica* invasin : a primary role in the initiation of infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:6373-7.
69. Vasquez-Torres A, Jones-Carson J, Baumler AJ, Falkow S, Valdivia R, Brown W et al. Extraintestinal dissemination of *Salmonella* via CD18-expressing phagocytes. *Nature* 1999;401:804-8.
70. Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta, G, Bonasio R et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunol* 2001;2:361-7.
71. Perdomo JJ, Gounon P, Sansonetti PJ. Polymorphonuclear leukocyte transmigration promotes invasion of colonic epithelial monolayer by *Shigella flexneri*. *J Clin Invest* 1994;93:633-43.
72. Perdomo O, Cavaillon JM, Huerre M, Ohayon H, Gounon P, Sansonetti PJ. Acute inflammation causes epithelial invasion and mucosal destruction in experimental shigellosis. *J Exp Med* 1994;180:1307-19.