



HAL
open science

Neurotoxinogénèse et Passage des neurotoxines botuliques à travers la barrière intestinale

Chloé Connan

► **To cite this version:**

Chloé Connan. Neurotoxinogénèse et Passage des neurotoxines botuliques à travers la barrière intestinale. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA114830 . tel-01077869

HAL Id: tel-01077869

<https://theses.hal.science/tel-01077869v1>

Submitted on 27 Oct 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Institut Pasteur Paris
Université Paris Sud
Direction Générale de l'Armement



École Doctorale Innovation Thérapeutique

THÈSE

pour obtenir le titre de Docteur en

Biologie

de l'Université Paris Sud

Mention : Microbiologie

Présentée et soutenue par

Chloé CONNAN

Neurotoxinogénèse et Passage des Neurotoxines Botuliques à travers la Barrière Intestinale

Thèse dirigée par Michel POPOFF

préparée dans l'Unité des Bactéries Anaérobies et Toxines

INSTITUT PASTEUR

Soutenue publiquement le 18 octobre 2013

Jury :

Rapporteurs : Alain VANDEWALLE - Dr. UFR de Médecine, Site Bichat Paris
Daniel GILLET - Pr. CEA, Gif sur Yvette

Examineurs : Jordi MOLGO - Dr. CNRS, Gif sur Yvette
Didier HILAIRE - Dr. DGA, Vert-le-Petit
Anne COLLIGNON - Pr. Paris Sud, Chatenay Malabry

Directeur : Michel POPOFF - Dr. Institut Pasteur, Paris



Institut Pasteur Paris
Université Paris Sud
Direction Générale de l'Armement



ÉCOLE DOCTORALE Innovation Thérapeutique

THÈSE

pour obtenir le titre de docteur en

Biologie

de l'Université Paris Sud

Mention : Microbiologie

Présentée et soutenue par

Chloé CONNAN

Neurotoxinogénèse et Passage des Neurotoxines Botuliques à travers la Barrière Intestinale

Thèse dirigée par Michel POPOFF

préparée dans l'Unité des Bactéries Anaérobies et Toxines

INSTITUT PASTEUR

soutenue publiquement le 18 octobre 2013

Jury :

Rapporteurs : Alain VANDEWALLE - Dr. UFR de Médecine, Site Bichat Paris
Daniel GILLET - Pr. CEA, Gif sur Yvette

Examineurs : Jordi MOLGO - Dr. CNRS, Gif sur Yvette
Didier HILAIRE - Dr. DGA, Vert-le-Petit
Anne COLLIGNON - Pr. Paris Sud, Chatenay Malabry

Directeur : Michel POPOFF - Dr. Institut Pasteur, Paris

Table des matières

Remerciements	1
Liste des abbréviations	5
Partie 1 : Introduction	9
I Généralités sur le botulisme	11
I.1 <i>Clostridium botulinum</i> et le Botulisme	13
I.1.1 Aspects historiques : du poison à l'outil pluripotent	13
I.1.2 <i>Clostridium botulinum</i> : aspects bactériologiques	14
I.1.2.1 Découverte des souches neurotoxigènes et classification	14
I.1.2.2 Diversité génétique	17
I.1.2.3 Caractéristiques morphologiques	17
I.1.2.4 Habitats	18
I.1.2.5 Caractéristiques physiologiques	19
I.1.3 Le Botulisme : données épidémiologiques	21
I.1.3.1 Voies de contamination	21
I.1.3.2 Formes cliniques et traitements	22
I.1.3.3 Les chiffres du botulisme en France	23
I.2 Les toxines botuliques	24
I.2.1 Les neurotoxines botuliques	24
I.2.1.1 Organisation génétique des loci botuliques	24
I.2.1.2 Localisation génomique des loci botuliques	26
I.2.1.3 Transferts horizontaux, recombinaisons et diversité génétiques	26
I.2.1.4 Caractéristiques biochimiques et structurales des neurotoxines botuliques	27
I.2.1.5 Les complexes botuliques	29
I.2.1.6 Mode d'action des neurotoxines botuliques	30
I.2.2 Autres toxines produites par <i>C. botulinum</i>	37
I.2.3 Utilisation des neurotoxines et des clostridies	38
II La production des neurotoxines botuliques par <i>Clostridium botulinum</i> : un processus hautement régulé	41
II.1 Cinétique d'expression et de production des complexes botuliques	43

II.2	Les facteurs nutritifs	44
II.3	Les systèmes de régulation	46
II.3.1	Les facteurs sigma	46
II.3.2	Les petits ARN régulateurs	48
II.3.3	Les systèmes à deux composants	49
II.3.4	Le "Quorum sensing"	51
III	La barrière intestinale	55
III.1	Anatomie structurale et fonctionnelle de l'appareil digestif	57
III.2	L'intestin : principal organe d'absorption des nutriments	59
III.2.1	Histologie du tube digestif	59
III.2.1.1	La muqueuse intestinale	60
III.2.1.2	La "muscularis mucosae"	62
III.2.1.3	La sous-muqueuse	62
III.2.1.4	La musculature	62
III.2.1.5	La séreuse	62
III.2.2	Cytologie intestinale	62
III.2.2.1	Les entérocytes	63
III.2.2.2	Les cellules M	64
III.2.2.3	Les cellules caliciformes	64
III.2.2.4	Les cellules de Paneth	65
III.2.2.5	Les cellules entéroendocrines	66
III.2.2.6	Les "tufts cells"	67
III.2.2.7	Les "cup cells"	68
III.2.2.8	Les IELs (IntraEpithelial Lymphocytes)	68
III.2.3	Auto-renouvellement de l'épithélium intestinal	69
III.2.4	Signalisation moléculaire	69
III.3	Le SNE (système nerveux entérique) : un second cerveau	72
III.3.1	Organisation structurale	72
III.3.2	Fonctions du SNE	74
III.3.3	Types neuronaux	74
III.3.3.1	Morphologie	74
III.3.3.2	Définition fonctionnelle des neurones entériques	76
III.3.4	Relation SNE et cellules entéroendocrines	77
III.3.5	Exemple du reflex péristaltique	78
III.4	Les toxines et la barrière intestinale	80
III.4.1	Microbiote intestinal et régulation par les cellules de Paneth	80
III.4.2	Les entérotoxines	80

IV Passage des neurotoxines botuliques à travers la barrière intestinale	87
IV.1 Site d'absorption préférentiel des BoNTs	88
IV.2 Effet de la taille des complexes et rôle des NAPs (Non toxic Associated Protein)	88
IV.3 Cibles cellulaires intestinales et neuronales	90
IV.4 Les modèles d'entrée des neurotoxines botuliques	90
IV.4.1 La voie d'entrée para-cellulaire	92
IV.4.1.1 Les jonctions intercellulaires	92
IV.4.1.2 Modèles d'entrée des neurotoxines botuliques par la voie para-cellulaire	94
IV.4.2 La voie d'entrée intracellulaire et transcytose	95
IV.4.2.1 Implication des protéines G.	96
IV.4.2.2 L'endocytose	98
IV.4.2.3 La voie endosomale dans les cellules polarisées	106
IV.5 Comparaison de l'entrée des BoNTs dans les cellules intestinales versus cellules neuronales	109
IV.5.1 Le modèle de double récepteur	109
IV.5.1.1 Les gangliosides	109
IV.5.1.2 Les protéines réceptrices	110
IV.5.2 Les voies d'endocytose	113
IV.5.3 Le trafic intracellulaire et modèle de transcytose des BoNTs	114
 Partie 2 : Objectifs	 117
 Partie 3 : Résultats	 121
I La toxinogénèse chez <i>C. botulinum</i>	123
I.1 Article n°1 :	124
I.1.1 Résumé.	124
I.1.2 Analyse des souches isogéniques pour <i>botR/A</i>	124
I.1.3 Analyse des souches isogéniques pour les systèmes à deux composants	125
I.1.4 Conclusion	126
I.2 Revue n°1 : Régulation de la production des neurotoxines chez <i>C. botulinum</i> et <i>C. tetani</i>	142
I.2.1 Résumé	142
I.2.2 Introduction	142
I.2.3 Les clostridies producteurs de neurotoxines	143
I.2.4 Organisation des gènes des neurotoxines	143

I.2.4.1	Le locus botulique	143
I.2.4.2	Le locus tétanique	144
I.2.5	La régulation de la production de toxines	145
I.2.5.1	BotR et TetR régulent positivement l'expression des gènes de neurotoxines	145
I.2.5.2	Les systèmes à deux composants (TCS)	146
I.2.5.3	Le "quorum sensing"	146
I.2.5.4	Les petits ARN régulateurs	147
I.2.5.5	Les signaux environnementaux	147
I.2.6	Conclusion	148
II	Passage des neurotoxines à travers la barrière intestinale.	161
II.1	Revue : Absorption et transport des Neurotoxines botuliques	163
II.1.1	Abstract	166
II.1.2	Introduction	166
II.1.3	Botulinum neurotoxin versus Botulinum complexes	167
II.1.4	Naturally acquired botulism	171
II.1.4.1	Botulism by intoxication or food borne botulism	171
II.1.4.2	Botulism by intestinal colonization	171
II.1.4.3	Wound botulism	172
II.1.4.4	Inhalational botulism	172
II.1.4.5	Iatrogenic botulism	172
II.1.4.6	Clinical manifestations of botulism	173
II.1.4.7	BoNT dissemination in naturally acquired botulism	173
II.1.5	Experimental animal botulism	175
II.1.5.1	Experimental botulism by gastrointestinal route	175
II.1.5.2	Experimental intestinal colonization with <i>C. botulinum</i>	177
II.1.5.3	Experimental botulism by inhalation	178
II.1.6	Passage of BoNT/botulinum complexes through cultured epithelial cell monolayers	179
II.1.6.1	BoNT passage through intestinal epithelial cell barrier	179
II.1.6.2	BoNT passage through pulmonary epithelial cell barrier	182
II.1.6.3	Role of ANTPs in BoNT passage through an epithelial barrier	183
II.1.7	BoNT/botulinum complexes entry into intestinal epithelial cells	185
II.1.8	BoNT dissemination	188
II.1.9	Concluding Remarks	191
II.2	Résultats expérimentaux modèle <i>in vivo</i>	195
II.2.1	Cinétique d'entrée des BoNTs dans la paroi intestinale de souris	195

II.2.2	L'entrée de HcB dans la barrière intestinale est dépendante de l'endocytose	200
II.2.3	Identification des cellules de l'épithélium intestinal marquées par HcBCy3	204
II.2.4	Analyse en microscopie à fluorescence	204
II.2.5	Analyse en immunohistochimie	210
II.2.6	Analyse en microscopie électronique	212
II.2.7	Nature des structures filamentaires reconnues par HcB	216
II.2.8	Types de neurones reconnus par HcB	222
II.2.9	Récepteurs cellulaires impliqués dans l'entrée de HcB	230
II.2.10	Discussion	233
II.3	Résultats expérimentaux modèle <i>in vitro</i> : Caractérisation des mécanismes moléculaires d'entrée des BoNTs dans les cellules intestinales	237
II.3.1	Les lignées cellulaires comme modèle d'étude	237
II.3.2	Effet des gangliosides sur l'entrée de HcB	240
II.3.3	Effet des Syt-I et Syt-II sur l'entrée de HcB	242
II.3.4	HcB entre dans les cellules intestinales et neuronales par une endocytose dépendante de la dynamine	247
II.3.5	Voies d'endocytose dépendantes des RhoGTPases	249
II.3.6	Le trafic intracellulaire	251
II.3.7	Discussion	255
II.3.7.1	Les récepteurs impliqués dans l'entrée de HcB dans les cellules neuronales et intestinales sont différents	255
II.3.7.2	HcB entre dans les cellules intestinales et neuronales par une voie dépendante de la dynamine et indépendante des RhoGTPases	257
II.3.7.3	HcB est transporté dans des endosomes précoces et tardifs	258
Partie 4 : Discussion		261
I	La toxinogénèse chez <i>C. botulinum</i> est régulée par des TCSs	265
II	BoNT/B traverse la barrière intestinale à travers les entérocytes et cible les terminaisons de la paroi intestinale	269
III	Les récepteurs impliqués dans l'endocytose de BoNT/B dans les cellules neuronales et intestinales sont différents	273

Annexes	277
A Matériel et méthode	279
A.1 Souches bactériennes, milieux de cultures et antibiotiques	279
A.2 Plasmides et amorces	279
A.3 PCR standards	280
A.4 Construction des souches recombinantes par la méthode d'ARN antisens . . .	280
A.5 Croissance bactérienne et test de viabilité des souches de <i>C. botulinum</i> . . .	282
A.6 Microscopie électronique en transmission	282
A.7 Détection et quantification de la toxine botulique par test ELISA	285
A.8 Dosage de la toxine botulique par détermination de LD50	286
A.9 Western Blot	286
A.10 Extraction d'ARN, reverse transcription	286
A.11 PCR en temps réel	287
A.12 Analyses statistiques	289
A.13 Production et purification des protéines recombinantes et domaines Hc des toxines botuliques	289
A.14 Marquage fluorescent des protéines recombinantes des fragments Hc.	291
A.15 Anticorps et drogues utilisées	291
A.16 Types cellulaires et conditions de culture	293
A.17 Préparation des lamelles pour l'étude sur l'entrée des fragments Hc	293
A.18 Transfections	294
A.19 Préparation des lamelles pour l'analyse microscopie	294
A.20 Tests des anses intestinales ligaturées	295
A.20.1 Types de souris utilisés	295
A.20.2 Techniques d'anses intestinales	295
A.20.3 Préparation des tissus pour l'immunofluorescence	296
A.20.4 Préparation des tissus pour l'immunohistochimie	296
A.20.5 Préparation des tissus pour la microscopie électronique	296
A.21 Analyse microscopique	297
A.21.1 Microscopes utilisés	297
A.21.2 Logiciel utilisé pour le traitement des images	299
A.22 Statuts éthiques	300
B Publication annexe	301
Bibliographie	321
Liste des Figures	372

Résumé	373
--------	-----

Abstract	373
----------	-----

Remerciements

J'ai essayé de repousser le plus tard possible le moment où je devrais écrire les remerciements, mais il arrive un moment où, comme pour la thèse, il faut bien finir par se plonger dedans.

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement Michel Popoff pour m'avoir accueillie et encadrée durant ma thèse. J'ai pu tout au long de ces 3 dernières années, réaliser ma thèse dans d'excellentes conditions de travail et je tiens sincèrement à le remercier de m'avoir donnée ma chance dès le Master 1.

Je tiens également à remercier mes rapporteurs Daniel Gillet et Alain Vandewalle, d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie également les membres du jury Jordi Molgo, Didier Hilaire et Anne Collignon d'avoir examiné ce manuscrit.

Je tiens à remercier la DGA pour avoir financé ce travail de thèse ainsi que le programme AntiBotABE.

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien scientifique et humain des collaborateurs et amis.

Alors je tiens tout d'abord à remercier l'équipe de Marc Lecuit et tout particulièrement Olivier Disson pour m'avoir enseignée la technique d'anse intestinale qui m'aura servie pendant plus de 2 ans et j'espère me servira longtemps encore. Merci également à Cindy Fèvre pour ses discussions scientifiques inspirées sur les intestins.

Merci à Jean Michel Goujon d'avoir effectué les expériences d'immunohistochimie et de microscopie électronique en un temps record. Merci à son efficacité, sa gentillesse et son implication.

Merci à l'équipe de la Plateforme d'Imagerie Dynamique et notamment Jean Yves Tinevez, Audrey Salles, Emmanuelle Perret, Anne Danckaert, Nathalie Aulner, Pascal Roux ainsi que toute l'équipe pour m'avoir conseillée et fait découvrir le monde merveilleux de la microscopie dans la bonne humeur.

Mais bien sûr, un scientifique n'est rien sans son équipe.

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe BAT, les anciens comme les nouveaux, ainsi que ceux qui n'y ont fait qu'un passage. Merci à Christelle Mazuet pour m'avoir conseillée tout au long de cette thèse et qui a toujours répondu à mes questions et doutes scientifiques. Merci à Serge Pauillac pour sa gentillesse et sa bonne humeur quotidienne, mais comment fait-il? Merci à l'équipe du CNR, Christine Legeay et Jean Sautereau, le petit couple, qui forme à eux deux, l'exemple même d'une parfaite équipe, et à Philippe Bouvet. Et bien sûr, merci à l'équipe du labo de prépa pour leur dévouement sans faille.

Je tiens tout particulièrement à remercier les Post Docs du labo, ceux présents et ceux qui se sont déjà envolé vers de nouveaux horizons. Merci à Cécile Denève Larrazet (Cécyle) pour sa présence et son soutien moral tout au long de cette thèse dans les bons et les mauvais moments. Merci à Diana Chapeton Montes, fraîchement arrivée dans le laboratoire, pour son franc parlé un brin sarcastique. Ne change pas ! Merci à Marie Voillequin, tout juste arrivée aussi, qui m'a été d'une aide précieuse surtout pour la fin de la thèse. Merci pour sa bonne humeur et son dévouement. Mais je n'oublie pas bien sûr Maryse Duphot, Cell Mother, qui m'a tout appris en termes de cultures cellulaire. Merci pour cette relation humaine que tu m'as offert pendant toutes ses années. Ah et que dire de Carolina Varela Chavez, Padmée pour les intimes. Présentes dans les bons et les mauvais moments, surmontant tous les obstacles scientifiques et moraux, mon meilleur public. Merci pour ton soutien ! Et que serait l'unité BAT sans notre chère Nathalie Hatchi, qui nous a désormais quitté pour de plus chaudes contrées. Merci à toi pour m'avoir appris que les relations humaines peuvent être simples. Merci pour ta gentillesse et surtout tes qualités humaines.

J'ai trouvé en vous une seconde famille.

Merci à tout ceux que j'ai eu l'occasion de croiser mais qui m'ont tant apporté, je pense notamment à Guylène K'ouas et Laeticia Bellon.

Je tiens également à remercier les amis du Master avec lesquels nous avons vécu et partagé tous les moments forts. Merci pour ces repas « décompression ». Alors merci à Camille Danne, Laura Grange (Binome), Laure Saujet et Francois Vromman pour ces déjeunés du vendredi qui m'ont fait tant de bien. Merci à Sandrine Vitry pour ses conseils avisés et sa gentillesse.

Je n'oublie pas non plus les amis « microscopeux » du fond du couloir, Sebastien Herbert, Hua Wong, Hervé MARIE-NELLY et Mickael Lelek pour nos discussions souvent louphoques.

Pour finir, je tiens à remercier du plus profond du cœur mes parents ainsi que ma grand-mère pour leur soutien. Je tiens à remercier tout particulièrement Gabriel Ducret, mon ami, ma famille, pour sa présence et son calme légendaire. Merci à lui de m'avoir montrée ce qu'il ne fallait pas faire !

Je pense avoir battu mon record de merci en 2 pages, mais ce n'est rien comparé à la reconnaissance que je porte à toutes les personnes que j'ai eu la chance de rencontrer ces dernières années.

Liste des abbréviations

5-HT :5-hydroxytryptamine
ABC transporteurs : ATP Binding Cassette transporteurs
Ach : Acétylcholine
AI : Auto Inducteur
AJ : Jonctions Adhérentes
AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique
ANTPs : Associated Non Toxic Protein
APUD : Amine Precursor Uptake and Decarboxylation
ARE : Apical Recycling Endosome
Arf : ADP Rybosylation Factor
Arl : Arf Like
ATP : Adénosine Triphosphate
BD : Biding Domain
BoNT : Botulinum NeuroToxin
BoTIM : BoNTA enzymically Inactive Mutant
CBC : Crypt Base Columnar
CCK : Cholécystokinine
CCP : Clathrine Coated Pits
CD : Catalytic Domain
CDC : Center for Disease Control and prevention
CDE : Clathrine Dependant Endocytosis
CgA : Chromogranine A
ChAT : Acetylcholin Transferase
CLIC : Clathrine Independant Carriers
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CNRAB : Centre National de Référence des bacteries Anaérobies et du Botulisme
CRE :Commun Recycling Endosome
CRISPR : Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats
DCLK-1 : Double Cortin Like Kinase 1 protein
EE : Early Endosome
ECF : Extracytoplasmic Function
EGF : Epidermal Growth Factor
eNOS : endothelial Nitric Oxide Synthase FACS : Fluorescence-Activated Cell Sorting
FGF : Fibroblast Growth Factor

FI : Filament Intermédiaire
FITC : Fluorescein IsoThioCyanate
GALT : Gut-Associated Lymphoid Tissue
GAP : GTPases Activating Protein
GBL : Ganglioside Binding Loop
GDI : Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor
GDP : Guanosine DiPhosphate
GEEC : GPI anchored protein enriched Early Endosomal Compartiments
GEF : Guanin nucleotide Exchange Factor
GFP : Green Fluorescent Protein
GLP : Glucagon Like Peptid
GMP : Guanosine MonoPhosphate
GPI-APs : Glycosylphosphatidylinositol- Anchored Proteins
GRAF : GTPase Regulator Associated with Focal adhesion kinase 1
GTP : Guanosine TriPhosphate
HA : Hemagglutinin
HC : Heavy Chain
HcC : Partie C terminale de HC
HcN : Partie N terminale de HC
HES-1 : Hairy and Enhancer of Split-1
HPV : Human papillomavirus
IELs : IntraEpithelial Lymphocytes
IFAN : Intestinofugal Afferent Neurons
InVS : Institut national de Veille Sanitaire
IPAN : Intrinsic Primary Afferent neurons
JAM : Junctionnal Adhesion Molecules
LC : Light Chain
LDL : Low Density Lipoprotein
LE : Late Endosome
MALT : Mucosa-Associated Lymphoid Tissue
m-IC*indicecl2* : mouse Intestinal Crypts cell ligne 2
NAP : Non toxic Associated Protein
Neurog3 : Neurogenin 3
NF : NeuroFilament
NO : Nitric Oxide
NTNH : Non Toxic Non Hemagglutinin
NFS : N-éthylmaléimide Sensitive Factor

OMS : Organisation Mondiale de la Santé
pIgR : polymeric Immunoglobulin Receptor
PMT : PhotoMulTiplicateur
PTC : Progenitor Toxin Complex
Rab : Ras-related in Brain
Ras : Rat Sarcoma
RCPG : Recepteur Couplé aux Protéines G
Rho : Ras homolog
Rol : Repressor Of LuxS
Rot : Repressor of toxins
RR : Response Regulator
SAM : S-AdénosylMéthionine
SDS : Sodium dodecyl sulfate
SHK : Senseur Histidine Kinase
siRNA : small interfering RNA
SNAP : Soluble NFS attachment Protein
SNARE : Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor
SNC : Système Nerveux Central
SNE : Système Nerveux Entérique
SOM : SOMatostatine
sRNA : small RNA
SV : Synaptic Vesicle
Syt : Synaptotagmine
TCS : Two Component System
TFR : TransFerrin Receptor
TA : Transit Amplifying region
TEER : Trans Epithelial Electrical Resistance
TEM : Tetraspanin-Enriched Microdomains
TD : Translocation domain
TENT : TEtanus NeuroToxin
TJ : Tight Junction
TLR : Toll Like Receptor
UEA1 : Ulex Europeus Agglutinin-1
UFC : Unite Formant Colonie
VAMP : Vesicle Associated Membrane Protein
VR-RNA : VirR-regulated RNA
WGA : Wheat Germ Agglutinin

YFP : Yellow Fluorescent Protein

ZO : Zonula Occludens

Partie 1 : Introduction

Généralités sur le botulisme

Sommaire

I.1	<i>Clostridium botulinum</i> et le Botulisme	13
I.1.1	Aspects historiques : du poison à l'outil pluripotent	13
I.1.2	<i>Clostridium botulinum</i> : aspects bactériologiques	14
I.1.2.1	Découverte des souches neurotoxigènes et classification	14
I.1.2.2	Diversité génétique	17
I.1.2.3	Caractéristiques morphologiques	17
I.1.2.4	Habitats	18
I.1.2.5	Caractéristiques physiologiques	19
I.1.3	Le Botulisme : données épidémiologiques	21
I.1.3.1	Voies de contamination	21
I.1.3.2	Formes cliniques et traitements	22
I.1.3.3	Les chiffres du botulisme en France	23
I.2	Les toxines botuliques	24
I.2.1	Les neurotoxines botuliques	24
I.2.1.1	Organisation génétique des loci botuliques	24
I.2.1.2	Localisation génomique des loci botuliques	26
I.2.1.3	Transferts horizontaux, recombinaisons et diversité génétiques	26
I.2.1.4	Caractéristiques biochimiques et structurales des neurotoxines botuliques	27
I.2.1.5	Les complexes botuliques	29
I.2.1.6	Mode d'action des neurotoxines botuliques	30
I.2.1.6.1	Dissémination dans l'organisme	32
I.2.1.6.2	Translocation de la chaîne légère	34
I.2.1.6.3	Le clivage des protéines SNAREs	35
I.2.2	Autres toxines produites par <i>C. botulinum</i>	37
I.2.3	Utilisation des neurotoxines et des clostridies	38

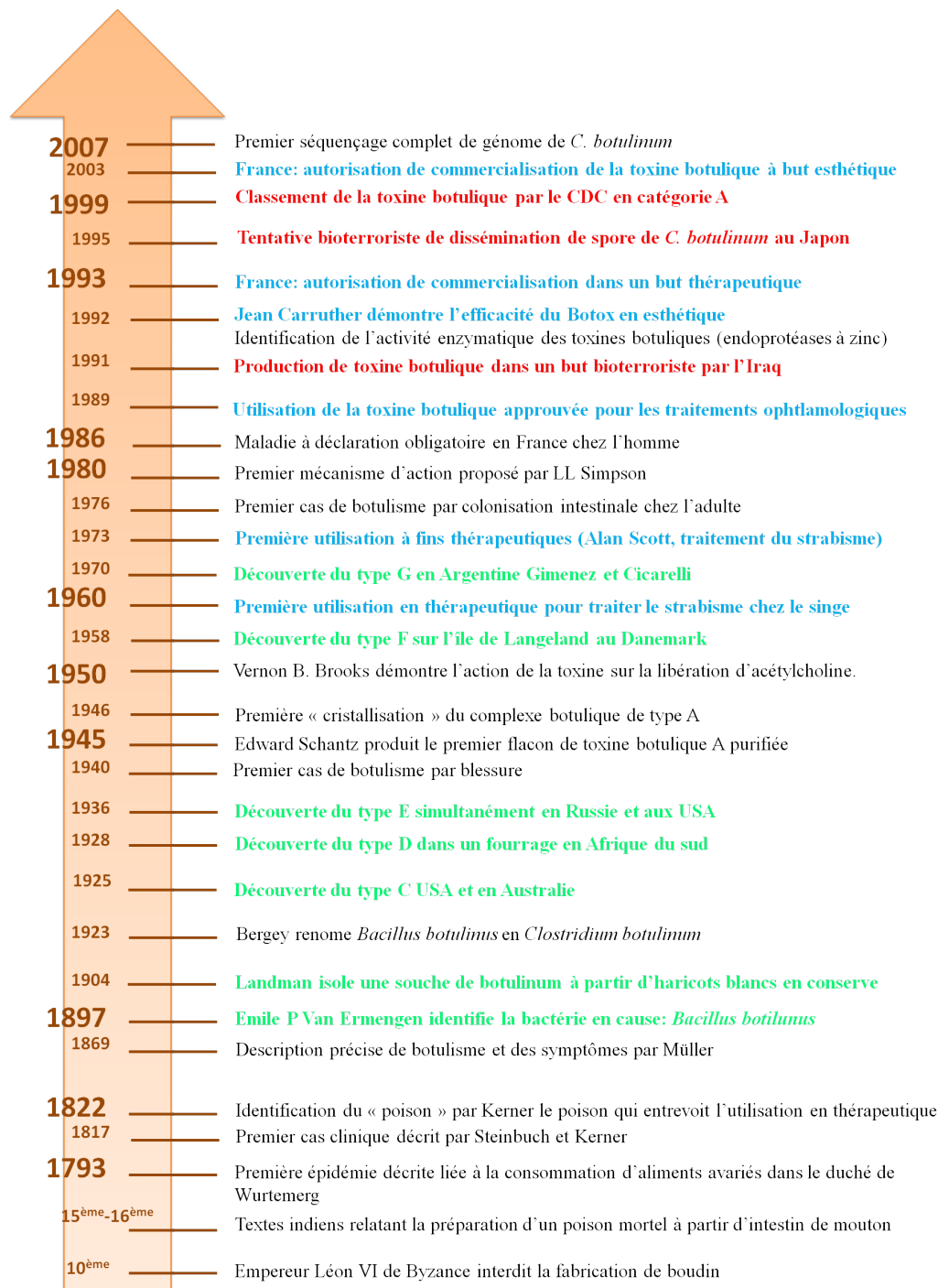


FIGURE I.1 – Frise chronologique représentant les moments clés de l'histoire des neurotoxines botuliques et du botulisme (noter que la flèche n'est pas à l'échelle). Les découvertes des types sont notées en vert, les utilisations en thérapeutique en bleu et les tentatives de bioterrorisme et les préventions appliquées en rouge.

I.1 *Clostridium botulinum* et le Botulisme

I.1.1 Aspects historiques : du poison à l'outil pluripotent

Contrairement au tétanos dont les symptômes sont facilement reconnaissables, le botulisme a longtemps été confondu avec des pathologies issues de troubles neurologiques. Quelques récits ont été retrouvés, mais un lien direct entre les symptômes décrits et le botulisme est difficile à établir. Les plus anciens documents, indiens, datent du XV/XVI^{ème} siècle et relatent la préparation d'un poison mortel à partir d'intestin de mouton [Popoff 2012]. En 1928, Meyer suggéra l'apparition du botulisme sous le règne de l'empereur VI de Bysance (886-911) qui interdit la fabrication de boudin.

Le premier foyer de botulisme fut identifié en Allemagne en 1793 et serait relié à la consommation de boudins préparés à partir de sang de porc produit localement. Cette épidémie impliqua 13 personnes dont 6 de façon mortelle.

Par la suite, Justinus Kerner, médecin et poète, publia des rapports sur plus de 230 cas d'empoisonnement, incriminant tous des saucisses contaminées. Il fut le premier à étudier de façon expérimentale les effets de cette toxine et à entrevoir son utilisation en thérapeutique. La maladie associée fut alors appelée la maladie de Kerner. Il faudra attendre plus d'un siècle pour que Emile P. Van Emergen identifie en 1897 le poison et la bactérie en cause qu'il nomma *Bacillus botulinus*. Depuis, 7 toxinotypes ainsi que de nombreux sous-types ont été décrits.

Ce n'est qu'en 1945 avec la première purification de toxine botulique (BoNT, Botulinum NeuroToxin) de type A, que les études et les avancées thérapeutiques se sont accélérées. Une première utilisation de la toxine en thérapeutique pour le traitement du strabisme a été réalisée en 1960 sur le singe et en 1973 sur l'homme. En 1987, une étude en double aveugle apporte la preuve de l'action de la toxine botulique sur la dystonie cervicale. L'utilisation de la toxine botulique en esthétique date de 1992 et découle de l'observation des patients traités en ophtalmologie pour lesquels les rides autour des yeux semblent avoir diminuées. L'autorisation de commercialisation de la toxine botulique à des fins thérapeutiques en France fut délivrée en 1993 et celle à des fins esthétiques en 2003.

Au cours du temps, la toxine botulique est passée d'un statut de poison mortel à un outil puissant que ce soit dans le domaine médical ou en esthétique (Fig I.1). Cependant, son extrême toxicité en fait une arme potentielle en bioterrorisme et justifie son classement en catégorie A par le « Center for Disease Control and prevention » (CDC).

I.1.2 *Clostridium botulinum* : aspects bactériologiques

Les Clostridies font partie de la famille des firmicutes. Ce sont des bacilles à Gram+, anaérobies obligatoires, capable de former des endospores. Ubiquitaires dans l'environnement, ces bactéries ont un métabolisme fermentatif sans réduction des sulfates et sécrètent de nombreuses enzymes hydrolytiques. Chimio-organotrophes, elles participent à la dégradation des matières organiques végétales et animales. Bien que certaines espèces soient pathogènes, ces bactéries sont non invasives et ne peuvent envahir que les cellules nécrotiques.

La formation d'une spore ovale de grande taille à l'extrémité terminale de la cellule lui confère une forme caractéristique en "raquette de tennis" et lui permet de résister à de nombreux stress environnementaux, ce qui lui valut son premier nom *Bacillus botulinus*. La bactérie fut ensuite renommée *Clostridium botulinum* en 1924 afin de le distinguer des bacilles aéro-anaérobies du genre *Bacillus* [Pellett 2012].

Les souches de *C. botulinum* sont hétérogènes à la fois phénotypiquement, physiologiquement et génétiquement. En 1953, Prevost définit les *C. botulinum* comme l'espèce comprenant tous les organismes connus pouvant produire une toxine induisant des paralysies flasques.

I.1.2.1 Découverte des souches neurotoxigènes et classification

A la suite d'une épidémie à Darmstadt (Allemagne) en 1904, Landman isole un organisme produisant une toxine à l'action très proche de celle isolée par Emile P. Van Emergen. Cependant, des anti-toxines préparés contre les 2 souches ne se neutralisent pas l'un l'autre, indiquant qu'il existe au moins 2 types de toxine. En 1919, Burke détermine pour la première fois qu'il existe au moins 2 types de *Bacillus botulinus* qu'il nomma A et B.

Depuis, plus de 180 souches de *Clostridium botulinum* sont décrites, réparties en 7 sérotypes basés sur leurs propriétés antigéniques (nommés de A à G) Tableau I.2. A partir de 1980, la classification s'est complexifiée avec la découverte de souches phénotypiquement éloignées de *C. botulinum* capables de produire les toxines botuliques de type E et F. De plus, d'autres souches, appelées bivalentes, sont capables de produire 2 types de toxines en proportions différentes (Bf qui produit plus de type B que de type F, ou Ab, Ba et Af). D'autres souches, appelées mosaïques (C/D ou D/C), contiennent dans leur génome une partie de la toxine de type C et une partie de la toxine de type D. Enfin, certaines souches contiennent 2 loci botuliques, mais seul un des deux est fonctionnel. C'est le cas de la souche A1(B) silencieuse qui résulte d'une mutation dans le gène botulique de la souche produisant le type B5 [Popoff 1995]. Récemment, une souche de type Af contenant 3 loci botuliques correspondant aux types A2, F4 et F5, a également été décrite [Dover 2013]

Date	1897	1904	1924/1926	1929	1936/1938	1958	1970	
Type	B	A	C	D	E	F	G	Af
Pays de découverte	Belgique	Allemagne	Etats Unis Australie	Afrique du Sud	Etats Unis Russie	Danemark	Argentine	
Sources	Jambon	Salade de pois	Bétaills Poulet Larve de mouche	Bétail	Saumon Anchois de Norvège	Paté de foie de canard	Sol	

Date	1980	1983	1985	1986	1994		1996
Type	Bf	Ab	F <i>C. baratii</i>	E <i>C. butyricum</i>	(B)	Ba	C/D D/C
Pays de découverte	Etats Unis Angleterre						Japon

FIGURE I.2 – Historique de la découverte des différents types de souches de *C. botulinum* (d'après [Hill 2013]).

En 1988, Louis DS. Smith propose une classification des souches de *C. botulinum* à partir des propriétés phénotypiques et biochimiques [Louis DS. Smith 1988].

L'espèce est alors divisée en 4 groupes physiologiques distincts :

- Le groupe I : comprend les souches de type A et les souches protéolytiques de type B et F
- Le groupe II : comprend les souches de type E et les souches glucidolytiques de type B et F
- Le groupe III : comprend les souches de type C et D
- Le groupe IV : comprend les souches de type G et les souches non toxiques de *C. subterminale* et *C. hastiforme*, assimilées à *C. argentinense*.

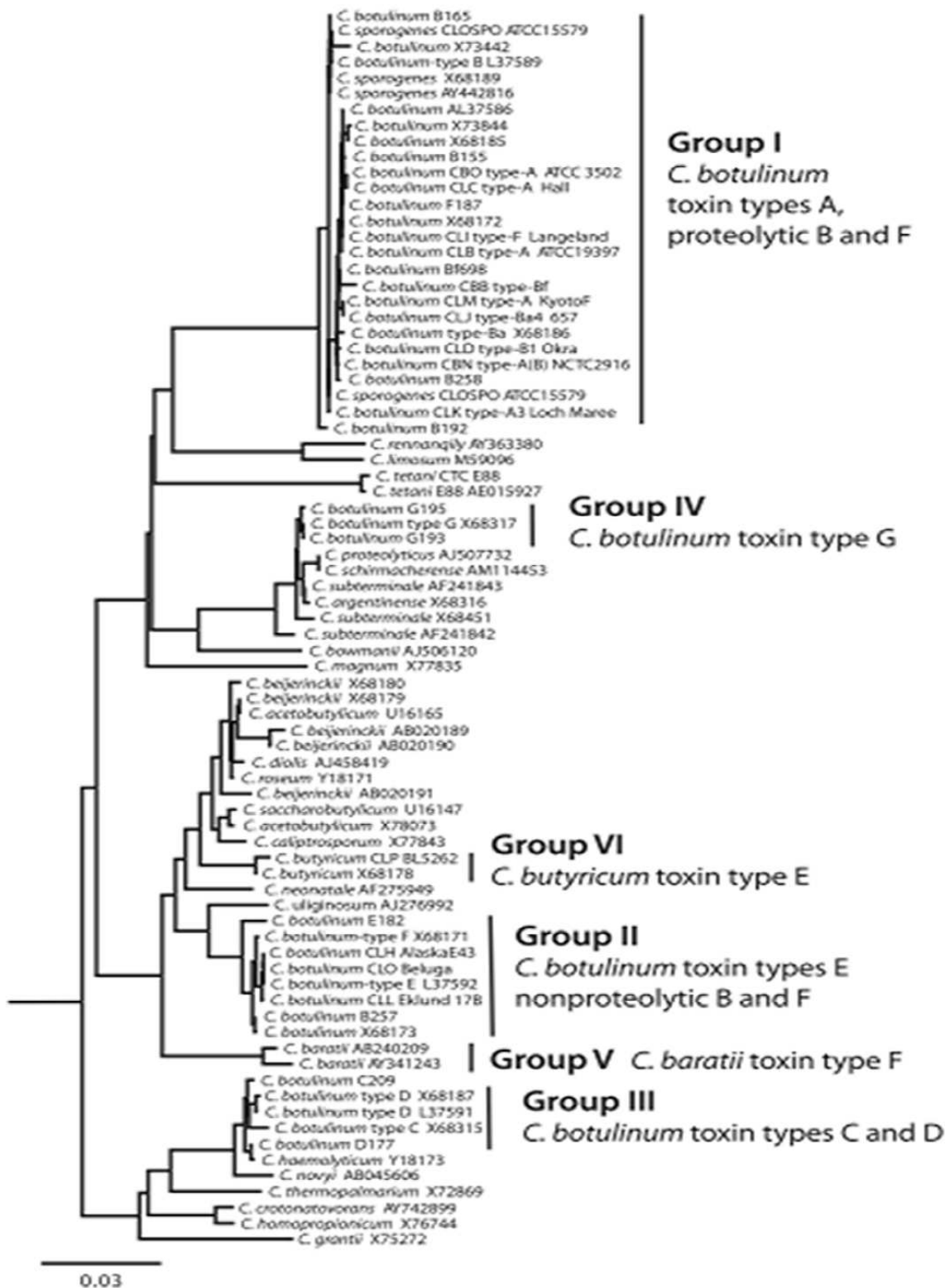


FIGURE I.3 – Dendrogramme de la classification des différentes souches de Clostridies au sein des groupes I à IV des souches de *C. botulinum*, V de *C. baratii*, et VI de *C. butyricum* (d'après [Hill 2013])

Depuis peu, 2 autres groupes ont été ajoutés à la classification historique, pour inclure les souches éloignées de *C. botulinum* produisant les neurotoxines botuliques :

- Le groupe V : comprend le sérotype F produit par les souches de *C. baratii*
- Le groupe VI : comprend le sérotype E produit par *C. butyricum*.

L'analyse génétique des gènes des neurotoxines indique une grande variabilité entre les types mais également au sein des types allant de 0,9% à 36% (Fig I.3). Une classification en sous-types a alors été instaurée avec une règle : les séquences en acides aminés des souches appartenant à un sous-type doivent différer d'au moins 2,5% par rapport aux autres souches du même groupe [Smith 2005]. Jusqu'à aujourd'hui, 31 sous-types ont pu être identifiés, dont 5 sous-types pour le type A (A1-A5), 3 sous-types pour le type B (B1-B3), 6 sous-types pour le type E (E1-E6) et 6 sous-types pour le type F (F1 à F7), où le sous-type F7 correspond à la souche toxigène de *C. baratii*. À ce jour, le faible nombre de souches de type C, D et G disponible ne permet pas d'identifier les variabilités au sein de ces types.

I.1.2.2 Diversité génétique

Avec l'essor des technologies de séquençage, le premier génome entier de *Clostridium* a pu être séquencé en 2007 [Sebahia 2007] et la classification de Louis D.S confirmée au niveau génétique. Les *C. botulinum* sont caractérisées par un faible taux de GC (compris entre 26 et 28%) et l'analyse 16s RNA ainsi que les comparaisons ADN/ADN révèlent que les différentes souches ont évolué séparément. Les résultats de séquençage ont également permis de mieux comprendre les relations phylogénétiques existantes au sein de ce groupe Fig I.3.

Les souches produisant les toxines de type A, B et F sont proches les unes des autres mais également d'une souche non toxigène, *C. sporogenes*, indiquant que ces souches ont certainement un ancêtre commun. Les génomes des souches produisant les toxines de types C, D, E et G sont quant à elles apparentées à des *Clostridium* plus éloignés comme *C. novyi*, ou *C. haemoliticum*.

Les souches de *C. baratii* et *C. butyricum* produisant les neurotoxines F et E respectivement, reflètent l'importance des transferts horizontaux de gènes inter et intra-spécifiques [Hill 2007].

I.1.2.3 Caractéristiques morphologiques

Les caractéristiques morphologiques sont communes aux Clostridies. Ce sont des bacilles allongés ou légèrement courbés de 0,6 μm à 2 μm de large et entre 20 et 22 μm de long. La plupart des souches sont motiles et péritriches, à l'exception de *C. baratii* qui est immobile.

La spore est ovale, subterminale et déforme la cellule sauf dans le cas des spores de *C.*

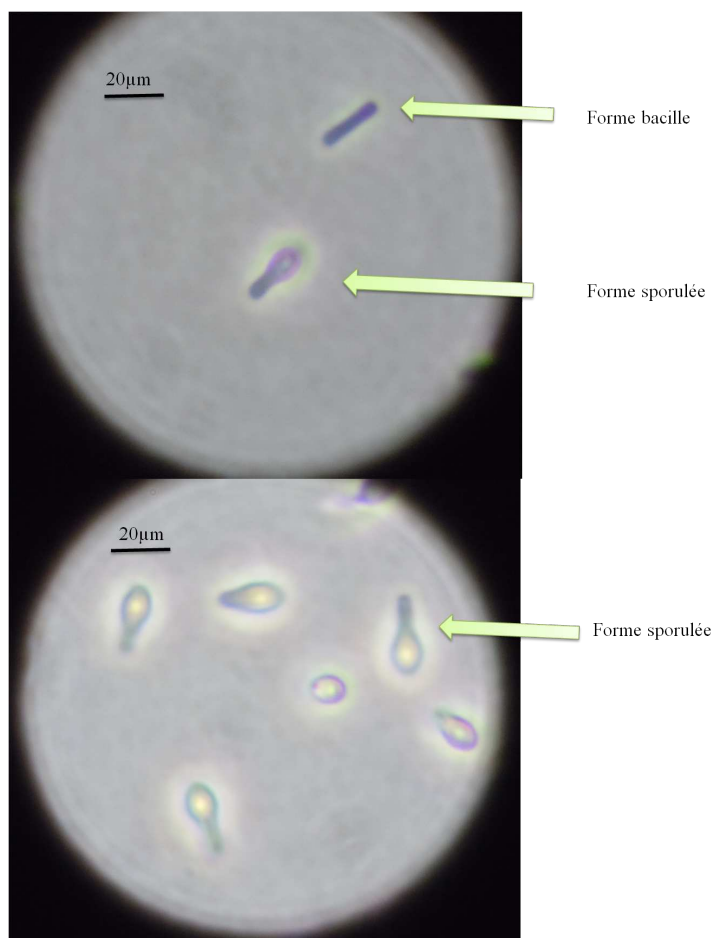


FIGURE I.4 – Photos en contraste de phase de la forme végétative (bacille) et sporulée d’une souche de type A1 isolée d’un patient en 2013. Noter la réfringence importante de la spore et sa localisation terminale (Connan, non publié)

butyricum qui sont centrales et ne gonflent pas la cellule (Fig I.4). Les spores formées par les bactéries appartenant au groupe I sont les plus résistantes et posent de nombreux problèmes de sécurité notamment en industrie agroalimentaire.

Sur boîte de gélose (agar plus sang), les colonies sont circulaires (1 à 6 mm de diamètre ou irrégulière), translucides à semi opaques, et entourées d’une fine zone d’hémolyse partielle à l’exception des colonies de *C. butyricum* [Popoff 1995].

I.1.2.4 Habitats

De part leur capacité à sporuler, les *C. botulinum* sont capable de résister aux conditions climatiques ou chimiques extrêmes et sont donc largement répandues dans l’environnement. Cependant leur caractère anaérobie les contraint dans des zones de faibles tensions en

oxygène.

La répartition dans la nature des différents groupes physiologiques dépend des caractéristiques physiologiques de chaque souche (température, pH du sol) et de la disponibilité en nutriments dans l'environnement. La sol ainsi que les sédiments marins et d'eau douce sont les habitats principaux des *C. botulinum* de types A, B, E, F et G (Fig I.5) [Marvaud 2002].

Toxinotype	A	B	C	D	E	<i>C. baratii</i> et <i>C. butyricum</i>
Réservoir principal	Sol (pauvres en composants organiques)	Sol	Cadavres d'animaux morts de botulisme ou porteurs de <i>C. botulinum</i> dans leur tube digestif		Sédiments marins et d'eau douce, contenu intestinal des poissons	Sol, sédiments, surface de végétaux, végétaux en décomposition, contenu intestinal de l'homme et des animaux sains
Localisation géographique	Ouest des États-Unis, Amérique du Sud et Chine	Est des États-Unis et Europe	Régions tropicales, régions tempérées en saison chaude		Alaska, Canada, Scandinavie, Nord de l'Europe, de l'Asie et du Japon	Répartition mal connue

FIGURE I.5 – Réservoirs principaux et localisations géographiques des différents types de *C. botulinum*. (d'après [Marvaud 2002]).

I.1.2.5 Caractéristiques physiologiques

Les *C. botulinum* sont des organismes chimio-organotrophes, saprophytes, capables de dégrader des molécules organiques en acides gras et autres composants organiques volatiles très odorants, caractéristiques qui leur confèrent un fort potentiel en bioingénierie [Tracy 2012]. Les cultures sont gazogènes et les *C. botulinum* fermentent de grandes variétés de carbohydrates (amygdalin, dextrin, fuctose, galactose, glucose, glycogène, maltose, ribose, sorbitol, sucrose ...) et peuvent être protéolytiques et/ou lipolytiques. Cependant, les souches appartenant au groupe IV ne fermentent pas les carbohydrates usuels. L'absence de catalase permet de distinguer les Clostridies des autres Gram + du genre *Bacillus*. Un récapitulatif des principales caractéristiques physiologiques est représenté Tableau I.6.

Certaines espèces de *Clostridium* sont pourtant aérotolérantes et les spores peuvent supporter une longue exposition à l'oxygène. La thermorésistance de la spore est un des caractères physiologiques les plus importants. Elle est variable d'un groupe à l'autre, et

Groupes	Groupe I	Groupe II	Groupe III	Groupe IV <i>C. argentinense</i>	Groupe V <i>C. butyricum</i>	Groupe VI <i>C. baratii</i>
Type de toxine	Souches protéolytiques A, B et F	E et souches non protéolytiques de B et F	C, D	G	E	F
Sous-types	A1-A5, B1-B3, Ba, Bf, Ab, et souches protéolytiques de F	E1-E3, E6	C, D, C/D, D/C	G	E4, E5	<i>C. baratii</i> F
Capacité protéolytique	+	-	-	+	+	-
Capacité lipolytique	+					
Fermentation du glucose		+	+		+	
Fermentation du maltose	+/-	+	+/-		+	
Fermentation du sucrose	-	+	-		+	
Température optimale de croissance	37°C	25°C	40°C	37°C	30-45°C	30-37°C
Température minimale de croissance	10-12°C	2,5-3°C	15°C		10-15°C	12°C
pH minimum nécessaire à la croissance	4,8	5	5,1			4,8
Concentration NaCl inhibitrice de croissance	10%	5%		6,50%		
Thermorésistante de la spore (en tampon phosphate 0,1M)	$D_{121}^{\circ C} = 0,21 \text{ min}$	$D_{82,2}^{\circ C} = 2,4 \text{ min}$	$D_{100}^{\circ C} = 0,9 \text{ min}$	$D_{100}^{\circ C} = 1,1 \text{ min}$		$D_{100}^{\circ C} = 0,1 \text{ min}$
Type de botulisme	Humain	Humain	Animal	Animal et humain?		
Clostridies non toxigènes apparentées	<i>C. sporogenes</i>		<i>C. novyi</i> <i>C. hemolyticum</i>	<i>C. subterminalis</i> <i>C. proteolyticus</i> <i>C. schimacherense</i>	<i>C. butyricum</i>	<i>C. baratii</i>

FIGURE I.6 – Récapitulatif des caractéristiques physiologiques des différents types et sous-types, le type de botulisme provoqué et les souches apparentées (d'après [Popoff 2012]).

peut également différer entre les souches toxigéniques et non toxigéniques d'un même groupe. Par exemple les souches toxigènes de *C. butyricum* sont moins résistantes à la chaleur ($D_{100^{\circ}\text{C}} < 0,1$ min) que les souches non toxigènes ($D_{100^{\circ}\text{C}} = 4,7$ min). Les spores formées par les *C. botulinum* du groupe I sont les plus thermorésistantes et la souche la plus résistante nécessite 121°C pendant 0,21 min pour diminuer le nombre de spore de 10^{12} . Ces souches servent donc de référence pour la stérilisation en agroalimentaire (121°C pendant 3').

La concentration inhibitrice minimale en NaCl est également une donnée importante en agroalimentaire et permet de déterminer le taux minimum de sel à apporter pour limiter au mieux le développement de *Clostridium* toxigènes.

Les températures optimales de croissance varient également entre les groupes (entre 30 et 40°C). Les organismes appartenant au groupe II ont une température optimale de croissance plus faible que les organismes des autres groupes (entre 25 et 30°C) et peuvent produire la toxine à faible température (entre $3-3,3^{\circ}\text{C}$ pendant 5 à 7 semaines). A l'inverse, les organismes du groupe III poussent à une température plus élevée que les autres groupes (entre 40 et 45°C) [Popoff 2012]. Ces souches sont liées phénotypiquement à d'autres Clostridies non toxigéniques comme *C. sporogenes* pour le groupe I, ou toxigéniques. Par exemple, *C. perfringens* et *C. baratii* sont phénotypiquement très proches et se différencient par la capacité de *C. perfringens* à hydrolyser la gélatine.

I.1.3 Le Botulisme : données épidémiologiques

I.1.3.1 Voies de contamination

Selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), il existe 5 différents types de botulisme.

Le botulisme alimentaire ou intoxication alimentaire est la forme la plus communément rencontrée. Cette forme survient après ingestion d'aliments contenant la toxine préformée. Elle est en grande partie due à des conditions insuffisantes de stérilisation.

La toxi-infection botulique ou encore appelé botulisme infantile, apparaît après ingestion de spores ou de formes végétatives de *C. botulinum* neurotoxigènes. Une flore digestive déséquilibrée ou immature, comme c'est le cas chez les enfants en bas âge (moins d'un an) permet la multiplication de *C. botulinum* et la production de neurotoxine dans le tube digestif. La plupart des souches impliquées dans le botulisme infantile appartient au groupe I. La toxi-infection botulique peut également survenir chez l'adulte.

Les chirurgies intestinales, antibiothérapies, inflammations chroniques ou lésions chroniques de la muqueuse intestinale, peuvent perturber la flore intestinale et permettre

la croissance de *Clostridium* neurotoxigènes dans le tube digestif.

Une troisième forme, plus rare, est le botulisme par inoculation ou par blessure, décrite pour la première fois en 1951. Les tissus nécrosés assurent un apport nutritionnel stimulant la germination et la croissance de souches toxigènes présentes dans des plaies profondes. Le botulisme par blessure est en recrudescence aux États-Unis et en Europe chez les toxicomanes soit par l'utilisation de matériel contaminé lors des injections, soit par la présence de spores de *C. botulinum* dans les drogues injectées. Cependant, l'incidence du botulisme par blessure est beaucoup moins importante que celle du tétanos [Marvaud 2002].

Le botulisme par inhalation est peu décrit et seuls quelques rares cas ont été recensés chez les personnels de laboratoires lors de préparation de toxines. Toutefois, la dissémination de spore de *C. botulinum* par voie aérienne a fait l'objet de 5 tentatives d'attentats infructueuses au Japon entre 1990-1995 [Arnon 2001].

Avec l'essor des traitements par la toxine botulique en thérapeutique ou en esthétique, une nouvelle forme de botulisme, le botulisme iatrogène, à la prévalence encore inconnue, est décrit [Ghasemi 2012]. Les doses injectées dans les indications de spasticité des membres inférieurs par exemple, peuvent provoquer des symptômes caractéristiques du botulisme. Les doses recommandées en cosmétologie sont trop faibles pour avoir des effets systémiques et la plupart des cas décrits dans la littérature sont reliés à des cas de surdosage, ou d'injection de préparations de toxines botuliques non approuvées par les instances sanitaires internationales.

I.1.3.2 Formes cliniques et traitements

Le botulisme est de plus en plus pris en compte dans le diagnostic différentiel de paralysies flasques survenant à la suite d'accidents vasculaires, ou observées dans les neuropathies auto-immunes comme le syndrome de Guillain Barré, de Miller-Fisher ou la myasthénie.

Le temps d'incubation varie généralement entre 12 h et 72 h. Le tableau clinique est caractérisé par une paralysie flasque descendante sans atteinte de la sensibilité, débutant par des troubles oculaires (notamment un défaut d'accommodation), mais aussi diplopie, ptôse ou une combinaison de ces signes. Puis, le système nerveux autonome est atteint engendrant des symptômes tels que sécheresse buccale et oculaire, mydriase, difficulté de déglutition, atonie intestinale et constipation. Les formes plus graves se traduisent par une faiblesse des membres et des difficultés respiratoires pouvant conduire à la mort Fig I.7.

Les troubles digestifs (nausée, douleurs abdominales, vomissement ou diarrhée) présents chez 50% des patients en début d'intoxication (durant les 24 premières heures), sont causés par d'autres bactéries et toxines présentes dans l'aliment incriminé.

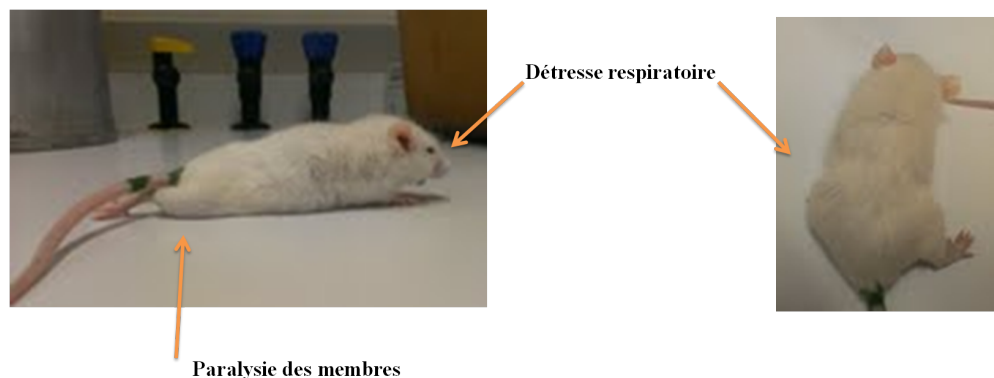


FIGURE I.7 – Photo de souris prise 18h après injection en intrapéritonéale d’un sérum issu d’un patient atteint de botulisme. Noter la détresse respiratoire de l’animal indiquée par la bouche ouverte et la silhouette efflanquée. Noter également la paralysie des membres inférieurs reflétant l’état avancé de la maladie.

Au début des années 1930, des vaccins réalisés à partir d’extraits bruts de *C. botulinum* traités au formol, ont commencé à voir le jour. Bien qu’efficaces, ces vaccins provoquent de nombreux effets secondaires locaux et systémiques, justifiant le développement de vaccins moins allergisants. De vaccins à formulation pentavalente, dirigés contre BoNT/A/B/C/D et BoNT/E ont pu être produits et validés comme étant efficaces et peu allergisants. Leur accessibilité reste toutefois limitée aux personnes les plus exposées [Karalewitz 2012a].

Le traitement est le plus souvent symptomatique (assistance respiratoire ou antibiothérapie dans les cas de toxi-infections) et le diagnostic est confirmé par la recherche de la toxine botulique et/ou de *C. botulinum* dans le sérum ou les selles du patient. De nouvelles thérapies, basées sur l’administration d’anticorps et d’anti-sérums sont en cours de développement pour neutraliser les toxines circulantes.

I.1.3.3 Les chiffres du botulisme en France

Le botulisme humain, tout comme le botulisme animal, est à déclaration obligatoire (depuis 1986 pour l’homme) et le nombre de cas humains par an en France varie entre 10 et 45.

Chaque année, le Centre National de référence des Bactéries Anaérobies et du Botulisme (CNRAB) en relation avec l’Institut de Veille Sanitaire (INVS), assure le diagnostic et la surveillance du botulisme humain et animal en France.

En 2012, 7 foyers incluant 8 cas de botulisme humain dont un cas de botulisme infantile, ont été identifiés contre 9 foyers et 11 cas déclarés en 2011, avec une prédominance pour les botulismes de type A.

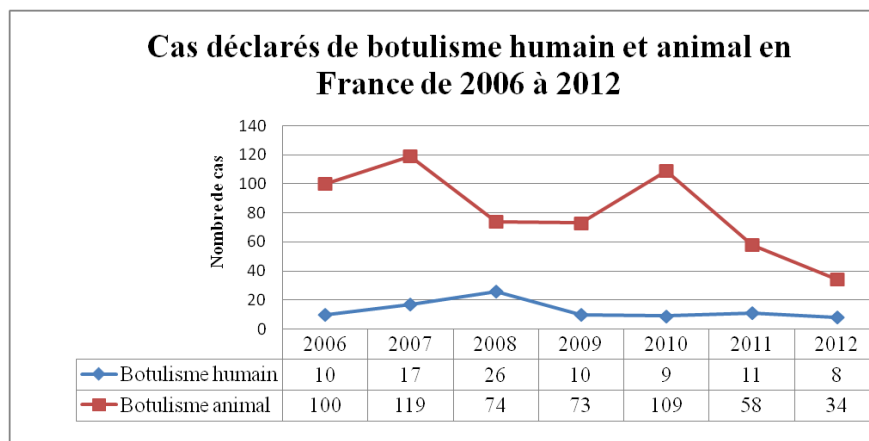


FIGURE I.8 – Evolution du nombre de cas déclarés de botulisme humain et animal au sein du CNRAB depuis 2006 (données recueillies à partir des rapports annuels d’activité du CNRAB).

Les cas de botulisme animal sont également très nombreux et posent, au-delà d’un problème économique important, un problème de santé publique. Depuis 1980, le botulisme bovin est endémique dans l’ouest de la France. Le botulisme chez les oiseaux sauvages et d’élevage est également fréquent en France et dans toute l’Europe occidentale. En 2012, 29 cas de botulisme aviaire ont été identifiés, de type C, D ou mosaïque. Le nombre de cas de botulisme humain et animal depuis 2006 est recensé dans le Tableau I.8

I.2 Les toxines botuliques

I.2.1 Les neurotoxines botuliques

I.2.1.1 Organisation génétique des loci botuliques

Les gènes codant les neurotoxines botuliques (*bonts*) sont associés à des gènes (entre 3 et 7) codant des protéines non toxiques (NAP, Non toxic Associated Protein) et forment, ensemble, le locus botulique Fig I.9.

Le locus botulique est organisé en opéron bicistronique. La partie 3’, très conservée, est constituée du gène *ntnh* codant la protéine Non Toxic-Non Hemagglutinin (NTNH) suivi d’un *bont* (3, 8kb). La partie 5’ de l’opéron, transcrite en sens inverse, est variable en fonction des types. L’opéron peut être constitué de gènes codant les protéines HAs aux propriétés hémagglutinantes, ou OrfX dont la fonction reste encore inconnue. Ces protéines s’associent à BoNT et NTNH pour former des complexes botuliques de différentes tailles.

Les opérons qui contiennent les *orfXs* (*orfX1*, *orfX2* et *orfX3*) contiennent également un

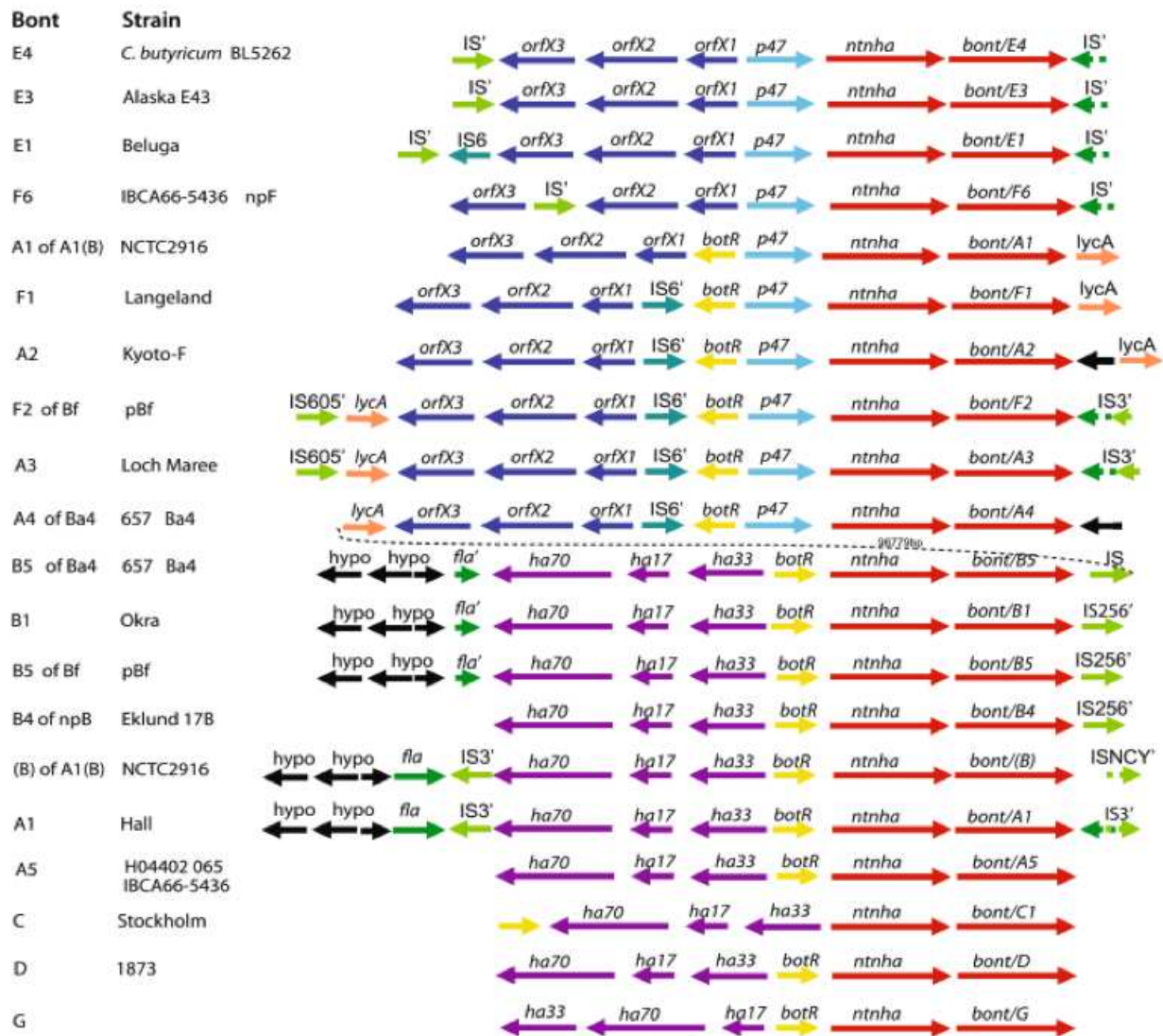


FIGURE I.9 – Organisation des loci botuliques pour les différents types de souches de *C. botulinum*.

gène codant la protéine P47, également de fonction inconnue, et sont dépourvus du gène *botR* qui code une protéine régulatrice importante dans la toxinogénèse.

Les opérons qui contiennent les *has* (*ha70*, *ha17* et *ha33* ou *ha1*, *ha2* et *ha3* respectivement) peuvent également varier mais en moindre proportion que les opérons contenant *orfXs*.

Les gènes *bonts* codant les types A1, A5, B, C, D et G sont associés à l'opéron contenant les *has* alors que les types A2 à A4, E et F sont associés à l'opéron contenant les *orfXs* [Rummel 2012].

I.2.1.2 Localisation génomique des loci botuliques

Les localisations génomiques des loci botuliques sont différentes et peuvent favoriser les événements de recombinaison et de transferts génétiques. En effet, l'analyse génomique des séquences de *bonts* a montré que ces souches ont des fonds génétiques différents et ont évolué séparément.

Initialement, les gènes codant les neurotoxines A, B, E et F sont localisés sur le chromosome, les gènes des neurotoxines C et D sur des phages et le gène codant BoNT/G, sur un plasmide [Hill 2013].

Depuis l'essor des technologies de séquençage, des différences de localisation génomique des loci botuliques au sein des types sont apparues. Les loci botuliques des sous-types A3, B1, B2, les souches non protéolytiques de B et les souches bivalentes Ab, Ba, et Bf, sont localisés sur des plasmides, dont la taille varie entre 47,6 et 970 Kb. [Johnson 2009] [Franciosa 2009] [Hill 2009]. Une récente étude vient également de rapporter que le locus botulique des souches de type E1 est porté par un plasmide de grande taille 146 Kb [Zhang 2013].

De nombreuses études se sont également portées sur les souches de types C et D. Les gènes codant ces neurotoxines sont portés par des bactériophages à lysogénie instable, engendrant fréquemment leur perte en culture. Le prophage est de grande taille et se propage dans la bactérie sous forme de plasmide [Eklund 1972] [Oguma 1976]. En 2011, H. Skarin et collaborateurs ont analysé le génome de la souche de type C (BKT015925). Cette souche possède 5 plasmides et l'ensemble de ces plasmides, appelé plasmidome, représente 13,5% de la totalité de son génome. De tous les genres bactériens décrits, moins de 5% contiennent 5 plasmides ou plus dans leur génome. Ces plasmides contiennent de nombreux gènes de phages, mais également de nombreux éléments mobiles, qui ont certainement contribué à l'apparition des souches mosaïques C/D et D/C [Skarin 2011].

I.2.1.3 Transferts horizontaux, recombinaisons et diversité génétiques

Les mécanismes exacts de transfert de gènes au sein des Clostridies ne sont pas bien connus mais des séquences d'insertion complètes ou partielles sont néanmoins retrouvées aux régions flanquantes du locus botulique de nombreuses souches [Hill 2009]. Des traces d'événements de duplication indiquent de possibles transferts horizontaux de gènes à l'origine des souches mosaïques C/D ou encore du sous-type A2, issu d'une recombinaison génétique entre les sous-types A1 et A3 [Hill 2007]. De nombreux transposons de classe I (copier coller) ou II (couper coller), sont également retrouvés, et surtout chez les types du groupe III Fig I.10 [Hill 2009]. L'ensemble de ces éléments mobiles contribue à la plasticité du génome des souches *C. botulinum* Fig I.10.

La diversité génétique est également retrouvée dans les *ntnhs* des différents types. L'étude de la souche 7I03-H isolée à partir d'un cas de botulisme infantile au Japon, a permis de montrer que les 2000 premières bases de *ntnh* sont identiques à 99,6% *auntnh* de la souche produisant le type C1 alors que les dernières 1582 bases sont identiques à 99,1% au *ntnh* de la souche produisant le type A2. Le *ntnh* hybride est alors appelé *ntnhC/A ntnh* [Hill 2009].

	Pourcentage d'identité nucléotidique						
	A1	B1	C1	D	E3	F1	G
A1	100,0%	60,2%	55,3%	57,8%	60,7%	62,1%	59,6%
B1	37,5%	100,0%	56,6%	58,0%	59,6%	59,5%	71,8%
C1	30,4%	30,8%	100,0%	68,3%	56,7%	56,8%	56,3%
D	31,2%	32,6%	51,4%	100,0%	57,7%	57,8%	57,8%
E3	37,7%	35,9%	30,9%	31,6%	100,0%	75,5%	59,0%
F1	38,7%	38,4%	30,9%	32,7%	62,8%	100,0%	59,0%
G	38,0%	57,1%	32,5%	34,0%	36,4%	36,8%	100,0%
	Pourcentage d'identité en acide aminés						

FIGURE I.10 – Diversité génétique des neurotoxines entre les souches exprimée en pourcentage d'identité de séquences nucléotidiques et d'acide aminés. Noter que les plus forts pourcentages en acide nucléiques et acides aminés sont retrouvés entre les souches F1 et E3 (d'après [Hill 2013])

I.2.1.4 Caractéristiques biochimiques et structurales des neurotoxines botuliques

Les BoNTs sont produites sous forme de protéines monocaténaires de 150 kDa peu ou pas toxiques. Cette chaîne est clivée par des protéases endogènes ou exogènes en 2 chaînes pour former une toxine bicaténaires composée d'un domaine de liaison et un domaine enzymatique Fig I.11. BoNT/A est facilement dégradée par des protéases digestives comme la trypsine ou la pepsine et complètement inactivée à pH3 ou moins [Gu 2012].

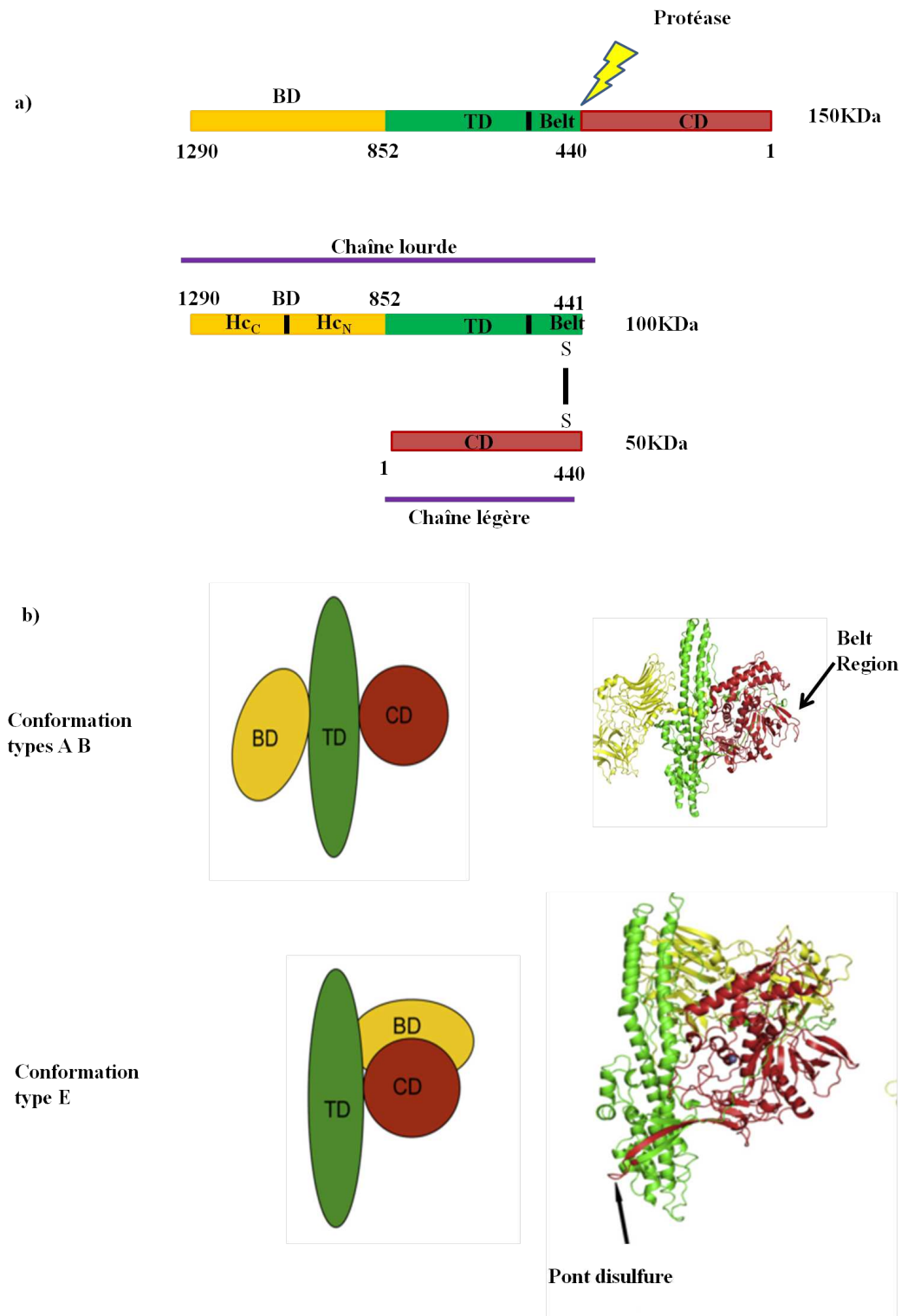


FIGURE I.11 – Architecture moléculaire des BoNTs de types A ou B et du type E. En a) Schéma de la structure de BoNT/A. La chaîne monocaténaire est activée par clivage protéolytique par une protéase endogène ou exogène. En b) représentation schématique et en ruban des BoNT/A BoNT/B et BoNT/E. Il est à noter que pour BoNT/E les domaines BD et le CD sont du même côté (d'après [Kumaran 2009]).

On distingue :

- ◇ La chaîne légère (LC, Light Chain) de 50 kDa qui constitue la partie catalytique de la protéine (Catalytic Domain CD). Ce domaine a une structure en hélice α et feuillet β et contient un motif de liaison au zinc spécifique des endopeptidases (His-Glu-X-X-His).
- ◇ Une chaîne lourde (HC, Heavy Chain) de 100 kDa qui elle-même est divisée en 2 domaines :
 - Le domaine de liaison au récepteur (Binding Domain ou BD), situé dans la partie C-terminal de HC. Il est responsable de la reconnaissance et la liaison aux récepteurs et il est divisé en 2 sous-domaines, le HcN situé en N-terminal et le HcC, partie qui diffère le plus entre les types
 - Le domaine de translocation (Translocation Domain ou TD) est très conservé entre les types. Il est constitué de 2 grandes hélices, d'environ 100Å de long formant un faisceau d'hélices. Les 100 derniers acides aminés situés en N-term, constituent la région ceinture (belt region) qui entoure LC.

Les deux chaînes sont reliées entre-elles par un pont disulfure et de nombreuses interactions non covalentes. Les 3 domaines sont arrangés de façon linéaire avec le domaine de translocation au centre Fig I.11. Les domaines BD et CD des types A et B sont très éloignés et n'ont aucun contact alors que ces 2 domaines sont situés du même côté du TD dans le type E. La partie catalytique est située dans une cavité en partie recouverte par la région ceinture [Kumaran 2009].

La structure de la majorité des types a été déterminée et bien que la structure principale soit conservée, des variations structurelles sur plusieurs boucles exposées sont observées. L'angle de rotation entre les domaines HcN et HcC peut aussi fortement varier (maximum de 17,2° pour le HcC) [Rummel 2012].

I.2.1.5 Les complexes botuliques

Pour faire face à l'acidité de l'estomac, les BoNTs s'associent de façon non covalente aux NAPs qui comprennent le NTN_H et les HAs pour former des complexes progéniteurs ou PTC (Progenitor Toxin Complex). Ces PTCs s'associent à pH acide et se dissocient à pH alcalin (>7.5) et peuvent être de différentes tailles [Gu 2012]. Trois types de complexes sont décrits : le complexe 12s, 16s et 19s. Les types A₂, E, et F n'ont pas de HAs et ne produisent que le type 12s. Les types B, C, et D produisent les complexes 12s et 16s, et le type A₁ produit les complexes 12s, 16s, et 19s. Le complexe 12s est le plus petit PTC décrit. BoNT s'associe avec un NTN_H pour former un complexe de 300 kDa.

NTN_H est une protéine de 140 kDa et sa séquence en acides aminés est très conservée

entre les types (76 à 83,5% d'identité). NTN_H est clivée en 2 chaînes polypeptidiques de 125 KDa et 15 KDa qui restent liées de façon covalente [Gu 2013].

Une analyse détaillée de la structure du 12s de BoNT/A1 a été réalisée et a permis de mettre en évidence plusieurs points.

- Bien que BoNT/A1 et NTN_H ont une faible identité de séquence (20%), elles sont structurellement très proches Fig I.12. NTN_H peut être divisée en 3 domaines nL, nHN et nHC (n pour NTN_H) par analogie avec les domaines des BoNTs. Le site de liaison de BoNT/A aux gangliosides de type GT1b est conservé sur NTN_H, y compris le motif de liaison aux gangliosides qui est conservé chez tous les types indiquant que BoNT/A et NTN_H ont évolué à partir d'un ancêtre commun par duplication génique [Gu 2012].

- BoNT/A1 adopte un arrangement quaternaire différent lorsqu'elle est sous forme de complexe. HC est incliné de 140 ° par rapport à sa configuration libre ce qui permet de rapprocher le BD et le TD. Cette réorientation du domaine HC semble être cruciale dans la translocation de la LC. HC est protégé au centre de la structure, entouré des 3 domaines de NTN_H. Il est également important de noter que le CT n'a pas de liaison avec NTN_H [Gu 2012].

Le complexe 16s est composé d'un PTC 12s (1 BoNT + 1 NTN_H) associé aux HAs (HA1, HA2, HA3 aussi appelés HA33 HA17 et HA70 respectivement). En cristallisation, on observe une structure trimérique de HA70 et un complexe HA17/HA33 résistant à de fortes concentrations d'hydrochlorure de guanidine. Cependant, la conformation physiologique prise par ces protéines en solution n'est pas certaine [Gu 2013].

Benfield et collaborateurs ont récemment donné une représentation de la structure des complexes 16s de BoNT/A1 et BoNT/B mais également du complexe 12s de BoNT/E grâce à une reconstitution en 3D d'images obtenues en microscopie électronique Fig I.13 [Benfield 2013].

Le complexe 16s de BoNT/A1 a une structure ovoïde avec 3 bras flexibles se projetant à distance du centre. Il est composé de BoNT :NTN_H :HA1 :HA2 :HA3 avec une stœchiométrie de 1 :1 :6 :3 :3. La structure du PTC de BoNT/B est similaire au PTC de BoNT/A1 alors que la structure du PTC de BoNT/E qui ne peut former que le complexe 12s, est dépourvue de ces bras.

Les bras peuvent pivoter les uns par rapport aux autres via un lien hélicoïdal montrant une importante plasticité conformationnelle. Le complexe 19s quant à lui, est un dimère de 16s reliés par un HA33 (900 KDa). Il n'est produit que par le type A1.

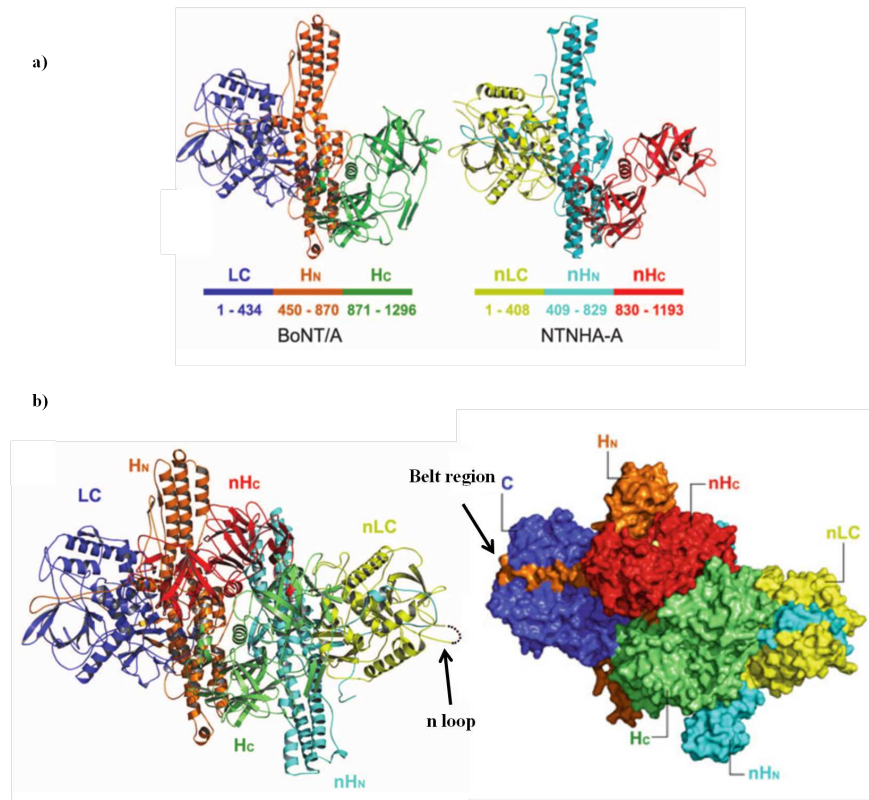


FIGURE I.12 – Représentation en ruban de BoNT/A, NTNHA-A et du complexe 12s. En a) comparaison des structures de BoNT/A et NTNHA. Noter la ressemblance dans la structure. En b) représentation en ruban et de surface du complexe 12s. On observe un emboîtement à la manière d’une poignée de main (d’après [Gu 2012] [Gu 2013]).

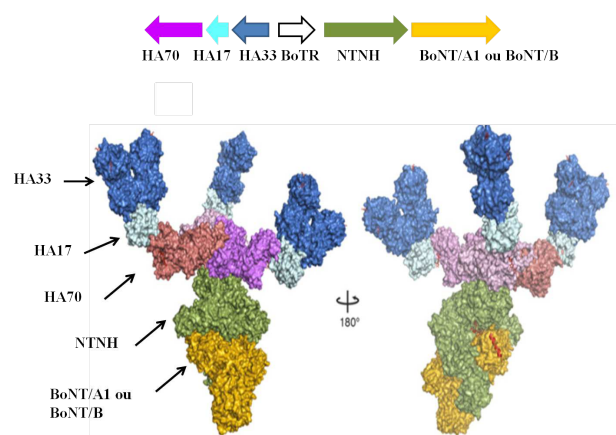


FIGURE I.13 – Structure du complexe 16s de BoNT/A et BoNT/B. Noter l’orientation des 3 bras que forment les HA33 HA17 et HA70. L’hélice en rouge présente sur BoNT/A1 ou BoNT/B correspond au site de liaison aux gangliosides de type GD1b. Les domaines en dégradé de rose représentent les 3 HA70 (d’après [Benfield 2013]).

I.2.1.6 Mode d'action des neurotoxines botuliques

Les neurotoxines botuliques ont pour cible les cellules neuronales et on peut diviser l'intoxication en 6 grandes étapes Fig I.14 :

- 1) Passage des neurotoxines à travers la barrière intestinale, voir chapitre III
- 2) Dissémination de la toxine dans l'organisme
- 3) Liaison aux récepteurs sur les cellules neuronales voir chapitre IV
- 4) Internalisation de la neurotoxine par endocytose voir chapitre IV
- 5) Translocation du LC dans le cytosol
- 6) Clivage des protéines SNARE (Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor).

De nombreuses études ont permis de comprendre les mécanismes moléculaires d'entrée et l'action de ces neurotoxines sur les motoneurones. Toutefois, les étapes de 1, 3, et 4 sont peu décrites et constituent le sujet d'étude de cette thèse.

I.2.1.6.1 Dissémination dans l'organisme

Une première approche de la dissémination des BoNTs dans l'organisme suggère qu'une fois la barrière intestinale franchie, celles-ci gagnent la lymphe et la circulation sanguine pour être disséminées dans l'organisme. Une façon de comprendre le transport des BoNTs est de détecter et de quantifier les toxines dans la lymphe après injection de toxines. Après administration par voie orale, par ultracentrifugation en gradient de sucrose, seuls les complexes 16s de BoNT/A, BoNT/B ainsi que le complexe 12s de BoNT/E sont détectés dans la lymphe [Sugii 1977a] [Kitamura 1969]. Les toxines sont donc transportées à travers la barrière intestinale sous forme de complexe ou de façon dissociées et se réassemblent sous forme de complexe dans la lymphe. Dans les cas de botulisme acquis naturellement, seuls les formes monomériques de BoNT/A ont été identifiées dans le sang [Kobayashi 2003].

Cependant, si l'on considère la voie sanguine comme le mode principal de dissémination, la toxine devrait être distribuée de façon équivalente à toutes les terminaisons nerveuses de l'organisme conduisant ainsi à un botulisme généralisé. Or, les symptômes spécifiques du botulisme sont caractérisés par une paralysie flasque descendante avec en premier lieu une attaque des nerfs crâniens, suggérant une autre voie de dissémination des toxines.

Une seconde approche implique une dissémination par transport axonale comme c'est le cas pour la toxine TeNT. L'équipe d'Antonucci et collaborateurs a montré par 3 expériences distinctes que BoNT/A est transportée de façon rétrograde aux motoneurones et neurones centraux, puis transcytosée aux synapses afférentes [Matak 2012]. Une injection de BoNT/A dans l'hippocampe entraîne un clivage des SNAP-25 (Synaptosomal Associated Protein 25),

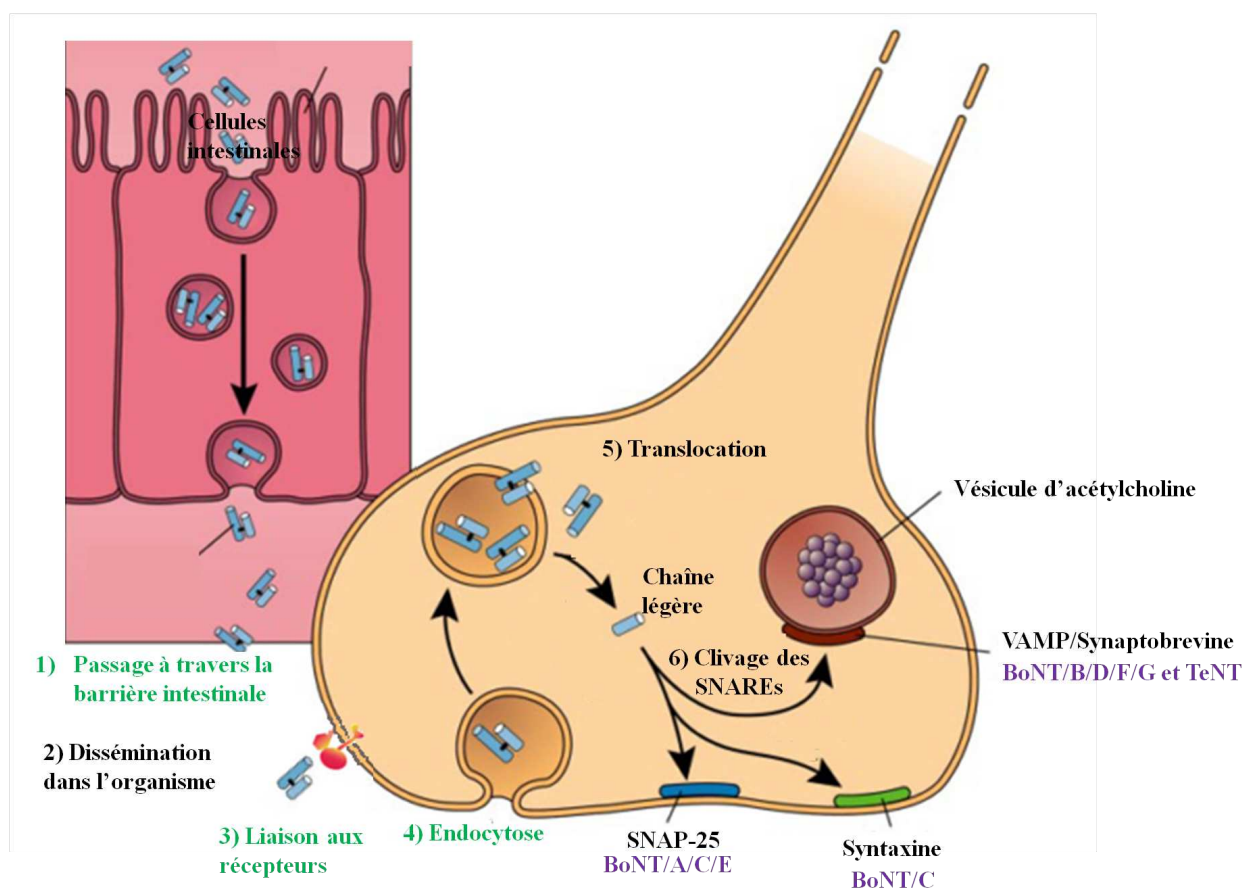


FIGURE I.14 – Schéma des 6 grandes étapes de l'intoxication. En vert sont indiquées les étapes étudiées au cours de cette thèse. Noter que TeNT (Tetanus NeuroToxin) clive également des protéines SNAREs (modifié à partir de [Simpson 2004]).

protéine SNARE cible de BoNT/A (voir partie I.2.1.6.3.2) dans l'hippocampe ipsilatéral 1 jour après injection et dans le controlatéral au bout de 3 jours. Une seconde expérience fut réalisée dans le colliculus supérieur, ou tectum optique (structure située sur le toit du mésencéphale) qui reçoit des projections en provenance de la rétine controlatérale et du cortex primaire visuel ipsilatéral. Trois jours après l'injection, une faible quantité de SNAP-25 clivée est détectée dans la rétine démontrant un transport rétrograde de BoNT/A du tectum optique jusqu'à la rétine. Une dernière expérience a consisté à injecter BoNT/A à la base des vibrisses de souris. Trois jours après l'injection, une quantité de SNAP-25 clivée est détectée dans le noyau somato-moteur du nerf facial ipsilatéral au site d'injection de BoNT/A.

Ces expériences démontrent une dissémination de BoNT/A par transport rétrograde. Cette dissémination par voie axonale est dépendante des microtubules et le transport est bloqué par la colchicine. Depuis, d'autres études ont permis de confirmer ce transport axonal de la toxine de la périphérie à la moelle épinière [Matak 2012] [Restani 2011].

I.2.1.6.2 Translocation de la chaîne légère

La translocation de la chaîne légère dans le cytosol est sans doute l'étape la moins comprise de l'intoxication. Une fois internalisées, les BoNTs sont enfermées dans les vésicules synaptiques et doivent traverser la membrane vésiculaire pour rejoindre leurs cibles situées dans le cytosol. C'est un processus dépendant du pH et un traitement à la chloroquine, neutralisant le pH des endosomes, entraîne une perte d'activité des BoNTs [Simpson 2004].

Deux modèles sont décrits dans la littérature. Un modèle dit "tunnel" dans lequel le TD s'insère dans la membrane et forme un canal par lequel le CD transloque en se dépliant pour rejoindre le cytoplasme. Une fois dans le cytosol où le pH est neutre, le CD se replie pour retrouver sa forme active [Hoch 1985]. Le second modèle, proposé par Montal et collaborateurs est dit en "gouttière", dans lequel la translocation peut être divisée en 6 étapes Fig I.15 :

- 1) Le domaine HcN interagit avec la membrane vésiculaire. Cette interaction est indépendante du pH mais un milieu acide est nécessaire pour que la partie Nterm de HcN s'insère dans la membrane et forme le pore.

- 2) Avec la diminution du pH, le TD se lie à la membrane anionique et perméabilise la bicouche lipidique sans changement notable de structure secondaire ou tertiaire. Le domaine de translocation s'insère progressivement au fur et à mesure que le pH diminue. La région ceinture représente l'unité minimale de formation du pore [Galloux 2008].

- 3) La chaîne légère change de structure pour passer à travers le pore formé par le Hc. Des études en dichroïsme circulaire ont montré que LC passe d'une structure hélicoïdale à

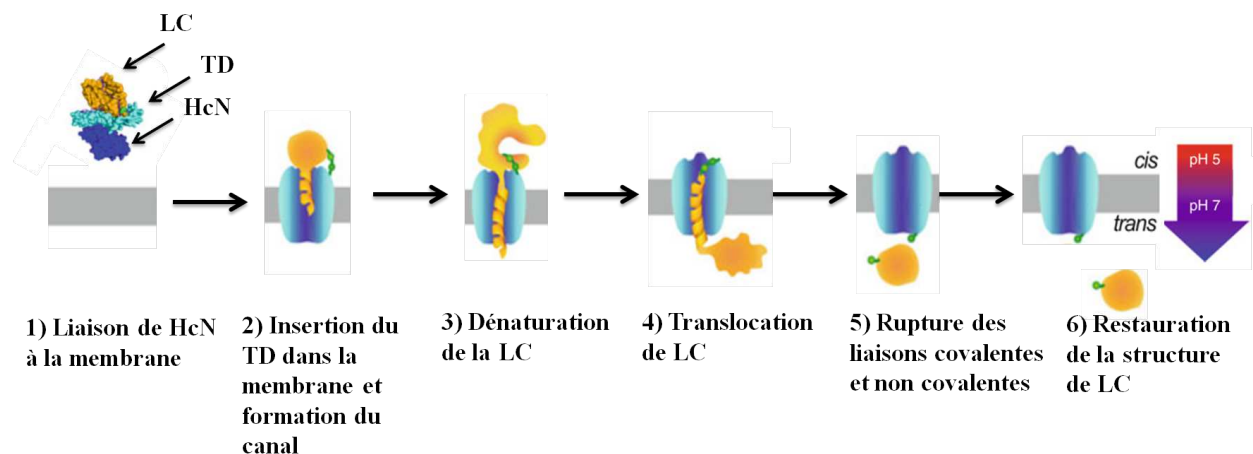


FIGURE I.15 – Modèle dit en "gouttière" proposé par Montal et collaborateurs représentant les 6 étapes de la translocation de la chaîne légère au travers de la vésicule synaptique. Noter que le devenir de Hc inséré dans la membrane n'est pas clair (d'après [Fischer 2008]).

un feuillet β et coude β quand le pH diminue de 7 à 4 permettant ainsi son passage à travers un pore estimé à 15Å. Le domaine HcN pourrait également servir à positionner la chaîne légère pour permettent son insertion dans la membrane [Rummel 2012].

4) La chaîne légère est transloquée dans le cytosol

5) Le pont disulfure est dénaturé et les liaisons non covalentes rompues. La chaîne légère est libérée.

6) La chaîne légère reprend sa conformation active et peut exercer son activité enzymatique sur les protéines SNAREs [Poulain 2008] [Fischer 2013].

Le devenir de HC inséré dans la membrane n'est pas connu.

I.2.1.6.3 Le clivage des protéines SNAREs

I.2.1.6.3.1 Les SNAREs et la neuroexocytose Les protéines SNAREs sont au cœur des processus intracellulaires de fusion membranaire. Ils forment un complexe ternaire qui sert de récepteur aux protéines SNAP (Soluble NFS attachment Protein) et NSF (N-éthylmaléimide Sensitive Facteur). L'implication de ces 2 protéines dans la libération des neurotransmetteurs dans la fente synaptique et plus précisément dans la fusion des vésicules à la membrane, est connue depuis 1988 [Hussain 2011]. Par la suite, les protéines réceptrices appelées SNAREs, pour (SNAP REceptor) ont été isolées à partir de lysats de cerveaux homogénéisés. Trois protéines ont pu être identifiées : SNAP-25 et la syntaxine, situées du côté de la membrane synaptique, et VAMP (Vesicle Associated Membran Protein) ou synaptobrevine, située du côté vésiculaire.

La neuroexocytose peut donc être divisée en 5 étapes Fig I.16 [Südhof 2011]

- 1) Le stade de vésicule libre : les SNAREs sont en conformation fermée,
- 2) Arrimage de la vésicule synaptique aux zones actives : VAMP, SNAP-25 et la syntaxine sont en conformation ouverte et sont vulnérables au clivage par les BoNTs,
- 3) Les SNAREs s'associent pour former un complexe ternaire en trans résistant au SDS (Sodium Dodecyl Sulfate). Les protéines SM (Sec-1 et Munc 18 like) présentes aux zones actives, s'associent à la syntaxine, entourent le complexe formé en trans et catalysent la fusion membranaire. Les forces exercées par ces protéines permettent de maintenir solidement la vésicule synaptique à la membrane,
- 4) Un influx de Ca^{2+} permet la fusion de la vésicule synaptique à la membrane et la formation d'un complexe en cis. Il y a libération des neurotransmetteurs dans la fente synaptique,
- 5) Le complexe en cis est alors dissocié par l'ATPase NSF en association avec SNAP,
- 6) La vésicule est recyclée dans les endosomes précoces.

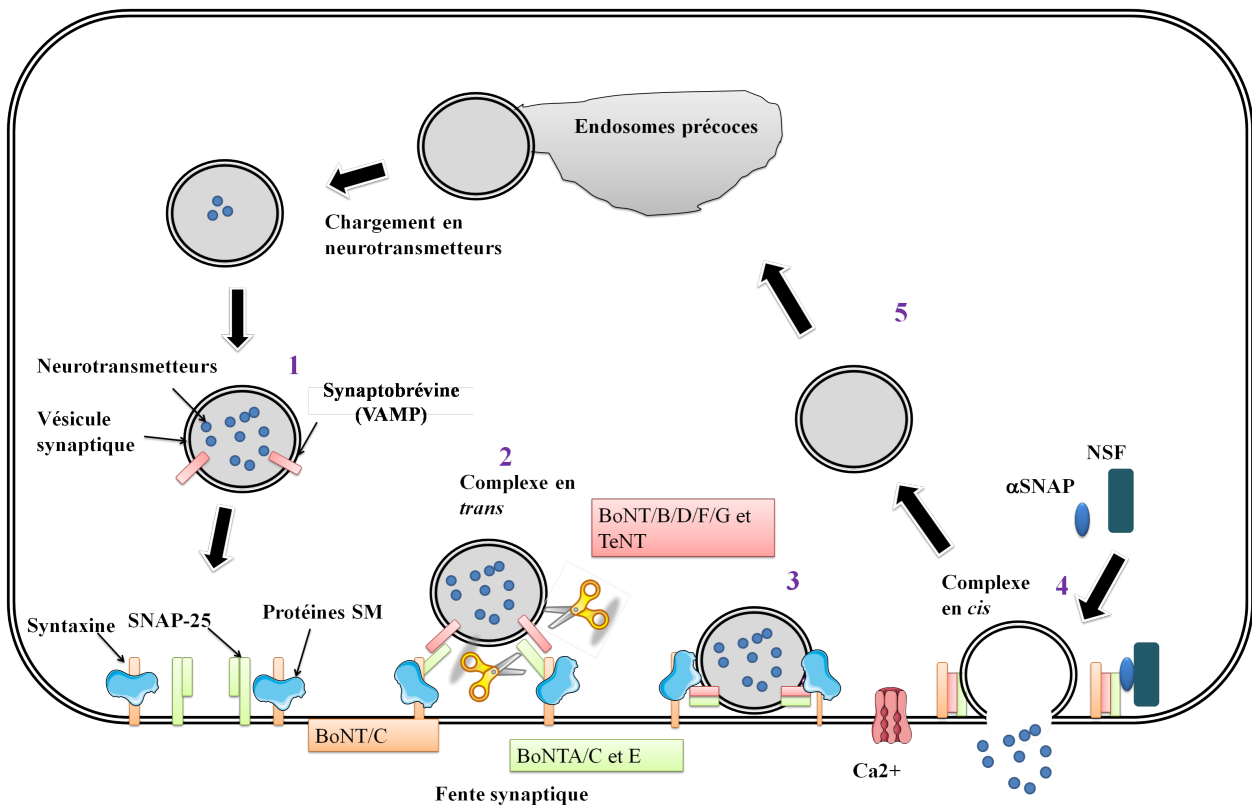


FIGURE I.16 – Schéma représentant l'implication des SNAREs dans la neuroexocytose. Les chaînes légères de BoNT/A, C et E clivent SNAP-25, celles de BoNT/B, D, F, G et de TeNT clivent la syntaxine, et BoNT/C hydrolyse la syntaxine.

I.2.1.6.3.2 Action des BoNTs sur les SNAREs Les BoNTs clivent les protéines SNAREs et empêchent ainsi la fusion des vésicules synaptiques à la membrane et donc la libération d'acétylcholine dans la fente synaptique. Chaque type de neurotoxine clive un substrat au niveau d'un peptide spécifique, à l'exception de BoNT/C qui clive 2 protéines SNAREs :

- o BoNT/A et BoNT/E clivent la SNAP-25
- o BoNT/B, BoNT/D, BoNT/F et BoNT/G clivent VAMP-1 et VAMP-2
- o BoNT/C clive SNAP-25 et hydrolyse la syntaxine.

Toutes les toxines clivent leur cible à différents sites sauf BoNT/B et TeNT qui clivent VAMP au niveau du même lien peptidique (Gln-Phe) [Poulain 2008]. Les différences de site de clivage pourrait également expliquer les différences observées entre les types dans la durée de paralysie.

Cependant, les neurotoxines ne peuvent agir que sur les SNAREs présentes sous forme monomérique, lorsque celles-ci sont en conformations ouvertes (étape 2). En fonction de la protéine clivée et de son site de clivage, la formation du complexe peut être affectée ou abolie à différentes étapes [Humeau 2000] :

- Le clivage de SNAP-25 par BoNT/E et F empêche les interactions avec les SNAREs de la membrane et la formation du complexe à l'étape 2. Il en est de même pour le clivage de VAMP par BoNT/D et F,

- Le clivage de VAMP par BoNT/B/G et TeNT réduit les interactions avec SNAP-25 et la syntaxine. Il n'y a plus assez de force pour lier physiquement la vésicule synaptique à la membrane plasmique ce qui entraîne une instabilité des complexes résistants au SDS. La syntaxine, clivée par BoNT/C, diminue également la stabilité de ces complexes,

- Le clivage de SNAP-25 par BoNT/A ne perturbe pas la formation du complexe résistant au SDS de l'étape 3, mais il est plus facilement dissociable par SNAP et NFS que les complexes formés avec la SNAP-25 non clivée. Ce clivage perturbe l'étape de fusion à la membrane dépendant du Ca^{2+} . Cet effet peut être contré par l'ajout de Ca^{2+} en intracellulaire ou en diminuant la libération de Ca^{2+} dans la fente synaptique.

Le clivage de VAMP affecte également le recyclage des vésicules synaptiques via les endosomes précoces, en empêchant son interaction avec AP3 (Adaptator Protein 3).

I.2.2 Autres toxines produites par *C. botulinum*

Outre les neurotoxines, *C. botulinum* produit d'autres exotoxines aux cibles cellulaires et activités intracellulaires différentes.

La toxine C2 est produite par les souches de type C et D. Cette toxine n'a pas d'activité

neurotoxique, mais elle est impliquée dans des pathologies entériques chez les oiseaux sauvages. La toxine C2 est cytopathogène pour plusieurs types cellulaires et entraîne une perméabilisation vasculaire ainsi que des lésions nécrotiques hémorragiques. A l'inverse des neurotoxines botuliques, les toxines C2 sont synthétisées durant la sporulation. Les premiers travaux sur cette toxine ont été initiés par Ohishi et collaborateurs dans les années 80. Puis, le substrat intracellulaire de la toxine C2 a été identifié en 1986 [Barth 2004]. La toxine C2 est une toxine binaire composée d'un domaine de liaison (C2II) et d'un domaine enzymatique (C2I). La toxine est internalisée dans la cellule par une endocytose dépendante des petites GTPases Rho et de la clathrine [Pust 2010] [Gibert 2010]. Puis, le domaine de liaison C2II s'oligomérisse et s'insère dans les membranes des compartiments endosomaux acides pour former des pores, permettant la translocation de C2I dans le cytosol. Une fois internalisé, le domaine catalytique ADP ribosyle l'actine G à l'Arginine 177 ce qui entraîne une déstabilisation du cytosquelette d'actine. De nombreuses toxines clostridiennes ont pour cible le cytosquelette d'actine. Le fonctionnement des toxines ADP ribosylantes est représenté Fig I.17.

L'exoenzyme C3 est produite par certaines souches de *C. botulinum* de type C et D ainsi que d'autres bactéries comme *C. limosum*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* et *S. aureus*. La toxine C3 ADP ribosyle les petites Rho GTPase de la famille Ras (RhoA, RhoB et RhoC), ce qui conduit à une destruction du cytosquelette d'actine accompagnée d'un arrondissement et d'un détachement des cellules. L'exoenzyme C3 cible également d'autres fonctions non reliées à l'actine comme la régulation du cycle cellulaire. Sur les neurones primaires, l'exoenzyme C3 n'induit pas d'arrondissement, mais entraîne une élongation des neurites. De ce fait, l'exoenzyme C3 constitue une drogue prometteuse pour l'inactivation de Rho dans les neurones [Just 2011] [Popoff 2009].

C. botulinum produit également une hémolysine, appelée botulinolysine, appartenant à la famille des protéines activées par les thiols (Cystéine ou dithiothreitol). La botulinolysine provenant d'une souche de *C. botulinum* de type C a été caractérisée. C'est une protéine monocaténaire de 58 kDA ayant une activité cytolytique sur les érythrocytes et une activité cytotoxique sur de nombreux autres types cellulaires [Haque 1992].

Une nouvelle toxine, la clostridiolysine S, a été identifiée en 2011. Par comparaison génomique, Gonzalez et collaborateurs ont identifié un groupe de 9 gènes orphelins ressemblant à la machinerie de synthèse de la streptolysine S, facteur de virulence majeur des *Streptococcus* de type A aux propriétés hémolytiques. Les 9 gènes sont annotés de *closA* à *closI*. Le prépropeptide ClosA est modifié post traductionnellement en propeptide qui sera ensuite modifié par ClosE en biotoxine mature. La fonction de cette toxine est encore peu connue, mais elle pourrait jouer un rôle majeur dans la virulence des *C. botulinum*

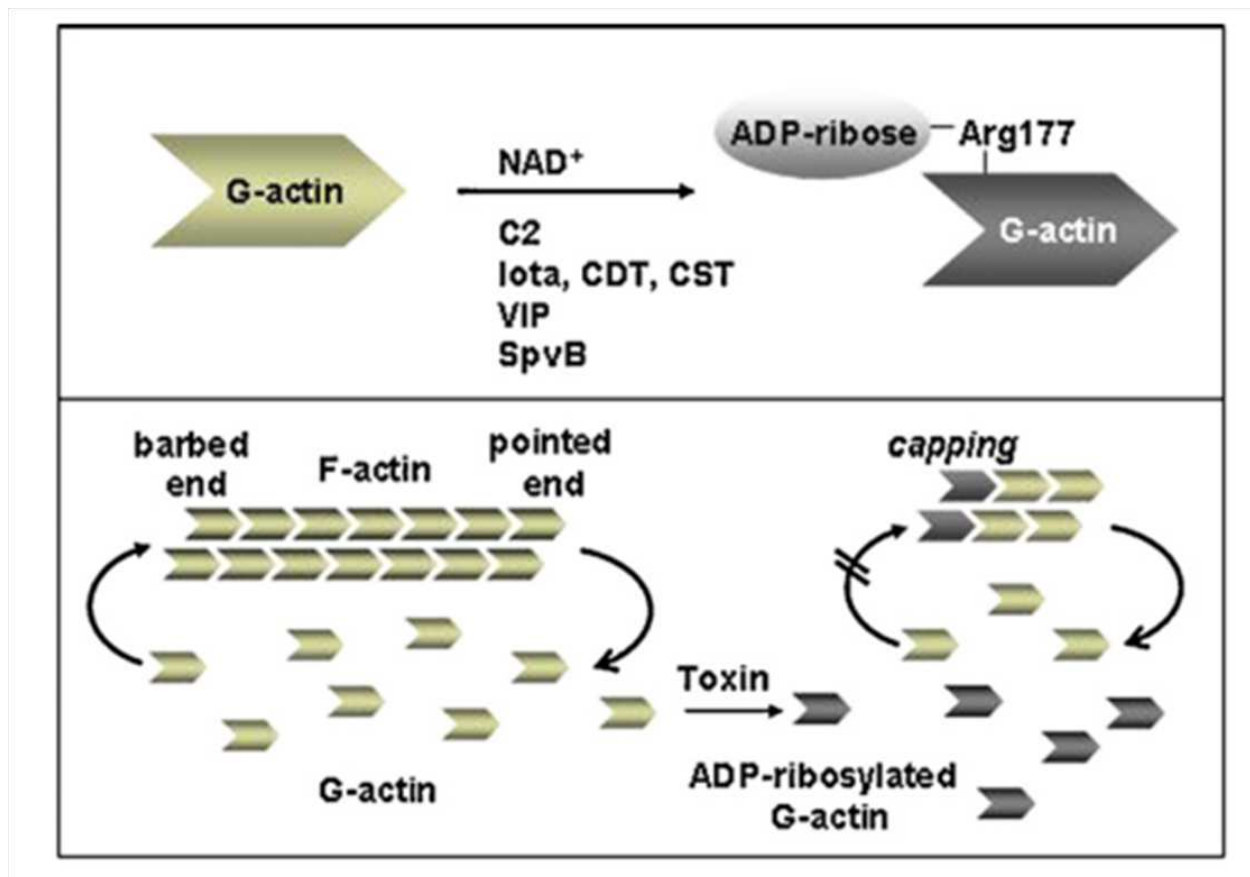


FIGURE I.17 – Schéma représentant le mode d'action des toxines ADP ribosylantes de l'actine. Les toxines agissent sur la forme monomérique et ADP ribosyle l'arginine en position 177 de l'actine et empêche la polymérisation de l'actine G en actine F. CDT : *C. difficile* binary toxin CST : *C. spiroforme* toxin VIP : vegetative interstitial protein SpvB : *S. enterica* virulence factor (d'après [Barth 2011]).

[Gonzalez 2010].

I.2.3 Utilisation des neurotoxines et des clostridies

Les neurotoxines botuliques ont de multiples applications, que ce soit en thérapeutique ou en esthétique, mais constituent également une arme biologique redoutable. La première utilisation en thérapeutique date de 1977. C'est l'ophtalmologiste et physicien Alan Scott qui a entrevu pour la première fois l'utilité des BoNTs dans le traitement du strabisme. Depuis, de nombreuses pathologies résultant d'une hyperactivité cholinergique sont traitées grâce aux neurotoxines botuliques. C'est le cas des dystonies urologiques, neurologiques mais également des pathologies liées à de l'hypersécrétion ou encore la migraine et la dépression.

La première commercialisation date de 1989, et depuis, 7 autres formulations ont vu le jour [Dolly 2012] [Cheng 2012].

Bien qu'efficaces, les traitements nécessitent des injections répétées et peuvent entraîner des résistances immunitaires. De nouvelles technologies se sont développées pour contourner ce problème, basées sur la rapidité d'entrée des toxines mais également sur la durée de leur activité paralytique. Par exemple, il a pu être mis en évidence que le sous-type A2 entre plus vite dans les cellules neuronales que le sous-type A1, initialement utilisé en thérapeutique [Pier 2011]. Ces observations ont donné naissance à des protéines chimères où le fragment HC de BoNT/A est remplacé par le HC de BoNT/B augmentant la durée de paralysie par rapport à la BoNT/A native [Chaddock 2013]. D'autres chimères impliquant BoNT/A et BoNT/E ont également été générées.

Cette approche est fortement développée par Dolly et collaborateurs qui ont mis au point des protéines inactives appelées " BoTIM's " permettant la fusion de 2 types de neurotoxines différentes. Par exemple, LC/E-BoTIM/A est constituée d'une BoNT/A inactivée et du domaine LC de BoNT/E ce qui permet de combiner les spécificités de ces 2 toxines : une entrée rapide conféré par la partie LC de BoNT/E et une durée d'action longue procurée par BoNT/A [Dolly 2012] [Kumaran 2009]. Ces nouvelles protéines représentent un fort intérêt thérapeutique dans le traitement des douleurs chroniques.

Les BoNTs sont extrêmement puissantes et constituent, de ce fait, une arme potentielle en bioterrorisme. Cette extrême toxicité justifie son classement en catégorie A par le CDC signifiant que cet agent a un impact à haut risque sur la population et la sécurité du pays. En effet, BoNT/A est la toxine la plus puissante connue à ce jour et on estime sa dose létale à 1 µg/kg par voie orale, de 1 à 2 ng/kg par voie intraveineuse ou intramusculaire et de 10 à 13 ng/kg par inhalation. Son potentiel est donc important et plusieurs tentatives de dissémination de la toxine ont été répertoriées dans les années 1990 [Balali-Mood 2013].

Les Clostridies ont également un fort potentiel en bioingénierie notamment dans les biocarburants. En effet, ces bactéries ont des capacités biosynthétiques uniques et une bonne tolérance aux substrats et métabolites toxiques. Les Clostridies sont capables de dégrader des carbohydrates simples et complexes, dont la biomasse cellulosique, et participent également à la biorémediation de complexes organiques chimiques [Tracy 2012].

La production des neurotoxines botuliques par *Clostridium botulinum* : un processus hautement régulé

Sommaire

II.1	Cinétique d'expression et de production des complexes botuliques	43
II.2	Les facteurs nutritifs	44
II.3	Les systèmes de régulation	46
II.3.1	Les facteurs sigma	46
II.3.2	Les petits ARN régulateurs	48
II.3.3	Les systèmes à deux composants	49
II.3.4	Le "Quorum sensing"	51

II.1 Cinétique d'expression et de production des complexes botuliques

L'expression des gènes du locus botuliques est un processus hautement régulé impliquant des facteurs environnementaux mais également des facteurs de régulation propre à la bactérie.

Des études réalisées en PCR temps réel mais également en Northern Blot, ont permis de suivre l'expression des gènes du locus botulique. La production des complexes botuliques a également été analysée par Western Blot et ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

A 37°C, tous les gènes du locus botulique suivent la même cinétique d'expression : faible durant la phase exponentielle, puis l'expression augmente pour atteindre son maximum d'expression à la transition entre la fin de la phase exponentielle et le début de la phase stationnaire. En phase stationnaire, l'expression est équivalente à celle observée en phase exponentielle [Couesnon 2006] [Bradshaw 2004].

La quantité de toxines sécrétées a été évaluée biochimiquement et fonctionnellement par le test de létalité sur souris. L'activité létale est plus important Après 24h de culture, soit 12h après le pic d'expression de la toxine, l'activité létale de la toxine est à son maximum, et reste stable au moins 5 jours. Les souches *C. botulinum* du groupe I produisant une forte concentration de toxine, subissent une rapide autolyse ce qui permettant une libération plus importante de toxines [Couesnon 2006].

A l'inverse de la toxine C2 qui n'est produite qu'en condition sporulante, la production de BoNT/A et E ne semble pas être liée à la sporulation. En effet, la production de toxine est comparable entre les 2 conditions pendant 72h [Bradshaw 2004] [Rao 2007] [Couesnon 2006]. Cependant, l'expression des gènes *has* est différente en condition sporulante par rapport à la culture non sporulante indiquant une possible relation entre sporulation et production de toxine [Couesnon 2006]. De plus, des homologues d'*agrB* et *argD* du système *agr* de *S. aureus* ont pu être identifié chez la souche de *C. botulinum* ATCC 3502. Ces homologues semblent avoir des rôles spécifiques où l'homologue de *AgrB* semble contrôler la sporulation alors que l'homologue d'*AgrD* semble contrôler la production de toxines. Une étude plus approfondie de ces systèmes devraient permettre de mieux comprendre la relation entre sporulation et production de toxines chez *C. botulinum* [Cooksley 2010].

II.2 Les facteurs nutritifs

Les facteurs environnementaux et nutritionnels régulant la production de toxines chez les Clostridies sont peu connus Fig II.1. La disponibilité de certains nutriments, en particulier les sources d'azote et de carbone, semble jouer un rôle important dans la toxinogénèse chez *C. difficile*, *C. tetani* et *C. botulinum*. Les *C. botulinum* du groupe I nécessitent pour leur croissance une forte concentration en arginine (> 3g/L) et de phénylalanine (>1 g/L).

Chez *C. botulinum* Okra B et Hall A, un ajout important d'arginine (20 g/l) dans du milieu minimum de culture, réprime la synthèse de BoNT/A et la production de protéase nécessaire à l'activation de la neurotoxine, sans modifier la croissance ou la lyse. Un phénomène semblable mais moins important, est observé en présence de composés azotés dérivés de l'arginine tels que la proline, le glutamate et l'ammoniac. Un supplément de caséine rétablit la production de toxine et l'activité protéolytique chez ces souches [Patterson-Curtis 1989]. De plus, des peptides biologiquement actifs issus d'une protéolyse partielle de la caséine, sont fortement impliqués dans la régulation de la production de la toxine tétanique [Porfirio 1997]. Tout comme l'asparagine, le glutamate et la glutamine, la biotine inhibe la production de toxine chez *C.difficile* [Yamakawa 1998].

La présence de sucres rapidement métabolisables tel que le glucose n'est pas nécessaire mais stimule la croissance de *C. botulinum* et semble être un facteur nutritif important pour la production de BoNTs. Contrairement à *C. difficile* pour lequel la production de TcdA et TcdB est soumise à une répression catabolique par le glucose, une quantité importante de sucres rapidement métabolisables est nécessaire pour une production maximale de BoNTs [Dupuy 1998]. Enfin, le tryptophane diminue la production de neurotoxine chez plusieurs souches de *C.botulinum* type E sans modifier la croissance. Toutefois, ce phénomène semble varier entre les souches et l'ajout de tryptophane ne réprime pas la production de toxine chez la souche *C. botulinum* de type E Beluga qui produit une forte quantité de toxine [Leyer 1990].

D'autres facteurs environnementaux comme le dioxyde de carbone ou la température peuvent également jouer un rôle dans la régulation de production de toxine. Le dioxyde de carbone stimule la production de toxine des souches non protéolytiques de types B et E, mais n'a que très peu d'effets sur *C.botulinum* de type A [Artin 2010] [Lovenklev 2004].

Enfin, bien que la température ne semble pas être un signal inhibiteur pour la production de toxine chez les *C. botulinum* de type E et Hall A, elle semble néanmoins jouer un rôle sur la stabilité des complexes. Entre 37 et 44°, l'expression des gènes du locus botulique reste inchangée mais l'activité létale de la toxine diminue fortement après incubation à 44°C pendant 24-48 h. En effet, à 44°C, NTNH/A et BoNT/A sont sensibles à la protéolyse par la

trypsine et ne sont plus détectées en western blot après 48h. A l'inverse, BoNT/E, NTNH/E et les HAs de *C. botulinum* E ne sont pas sensibles à la température et les surnageants de culture restent stables après incubation à 44°C. On peut donc supposer qu'une protéase dépendante du Ca^{2+} permette à 37°C l'activation protéolytique de BoNT/A et qu'à 44°C, celle-ci dégrade BoNT/A et NTNH/A. Mais comme pour le tryptophane, ce contrôle par la température peut être dépendant des souches étudiés [Couesnon 2006].

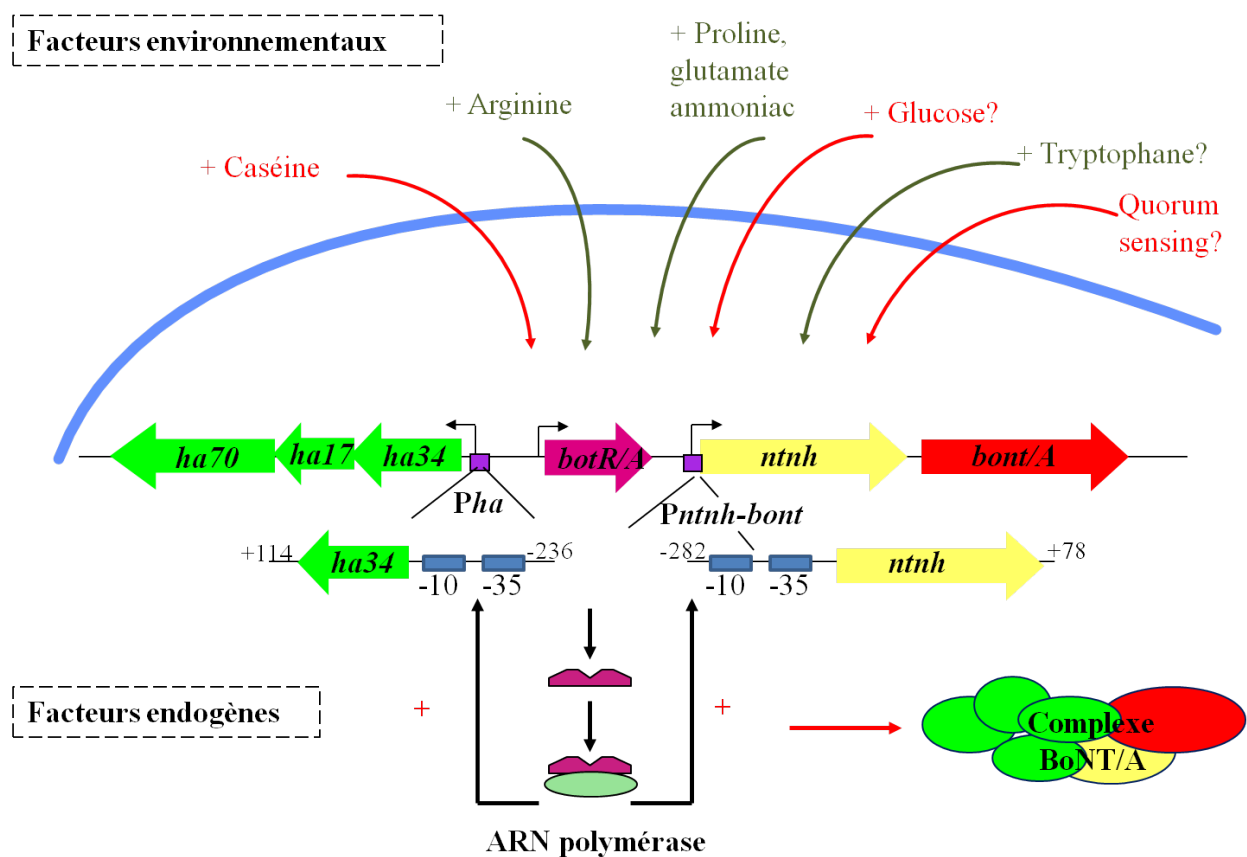


FIGURE II.1 – Schéma de la régulation de l'expression du locus botulique de type A par les facteurs environnementaux et endogènes. Les facteurs identifiés chez les autres types sont suivis d'un point d'interrogation. Les flèches rouges correspondent à une régulation positive de la production de toxine et les flèches vertes à une régulation négative (d'après [Raffestin 2005]).

II.3 Les systèmes de régulation

II.3.1 Les facteurs sigma

Au début de ce travail de thèse, un seul système de régulation de la toxinogénèse chez *C. botulinum* était décrit. Il correspond à un facteur sigma alternatif, appelé BotR, qui régule positivement la production de BoNTs. Les propriétés de liaison à l'ADN de BotR ont été décrites pour la première fois chez une souche *C. botulinum* de type C en 1995 [Hauser 1995]. Puis, des gènes homologues ont été identifiés pour les types A, B, D, F et G mais aucun homologue n'a pu être identifié pour le type E. BotR/A (BotR du type A) a été largement étudié au sein du laboratoire [Raffestin 2005]. Chez *C. difficile*, Mani et Dupuy ont montré que TcdR est un facteur sigma alternatif régulant spécifiquement l'expression des gènes des toxines TcdA et TcdB [Mani 2001]. TcdR possède des similarités de séquences avec BotR (25,5% d'identité), TetR, qui régule positivement la production de TeNT, et UviA, qui régule positivement l'expression de la bactériocine chez *C. perfringens* [Dupuy 2005].

Le mécanisme d'action et les promoteurs cibles de BotR/A et TetR ont été décrits par S. Raffestin et collaborateurs. Des expériences de "footprinting" sur des fragments d'ADN contenant la région promotrice de *ntnh-bont/A* ont montré que BotR/A reconnaît spécifiquement des séquences conservées en position -10 (GTTATA) et -35 (TTTACA). Ces régions sont conservées sur le promoteur *Pntnh-bont/A* et *Pha35* de *C. botulinum* de type A mais également sur les souches de type B, C, D et G ainsi que sur le génome de *C. tetani* [Raffestin 2005].

BotR/A s'associe à l'ARN polymérase et se fixe sur les promoteurs des deux opérons *ntnh-bont/A* et *ha35* du locus botulique pour réguler positivement leur transcription de manière dose dépendante. BotR/A peut également se fixer sur son propre promoteur mais ne semble pas induire de transcription [Raffestin 2005]. Au cours de la croissance bactérienne, *botR/A* est en moyenne 100 fois moins exprimé que les autres gènes du locus botulique [Coesnon 2006] [Connan 2012].

La majorité des facteurs σ bactériens appartient à la famille -70. Cette famille est divisée en 4 groupes fonctionnellement proches (noté de 1 à 4). Les facteurs σ ayant des fonctions extracytoplasmiques (ECF) sont les plus représentés et appartiennent au groupe 4. BotR, TetR, TcdR et UviA fonctionnent biochimiquement comme les facteurs σ alternatif de la famille des ECF Fig II.2, mais diffèrent suffisamment en structure et fonction pour constituer un 5ème groupe appelé sous-famille TcdR [Helmman 2002].

Ces facteurs contrôlent, en réponse à des signaux externes, des fonctions associées à la surface cellulaire et au transport. Par exemple le facteur σ_s (RpoS) de *E. coli* est fortement

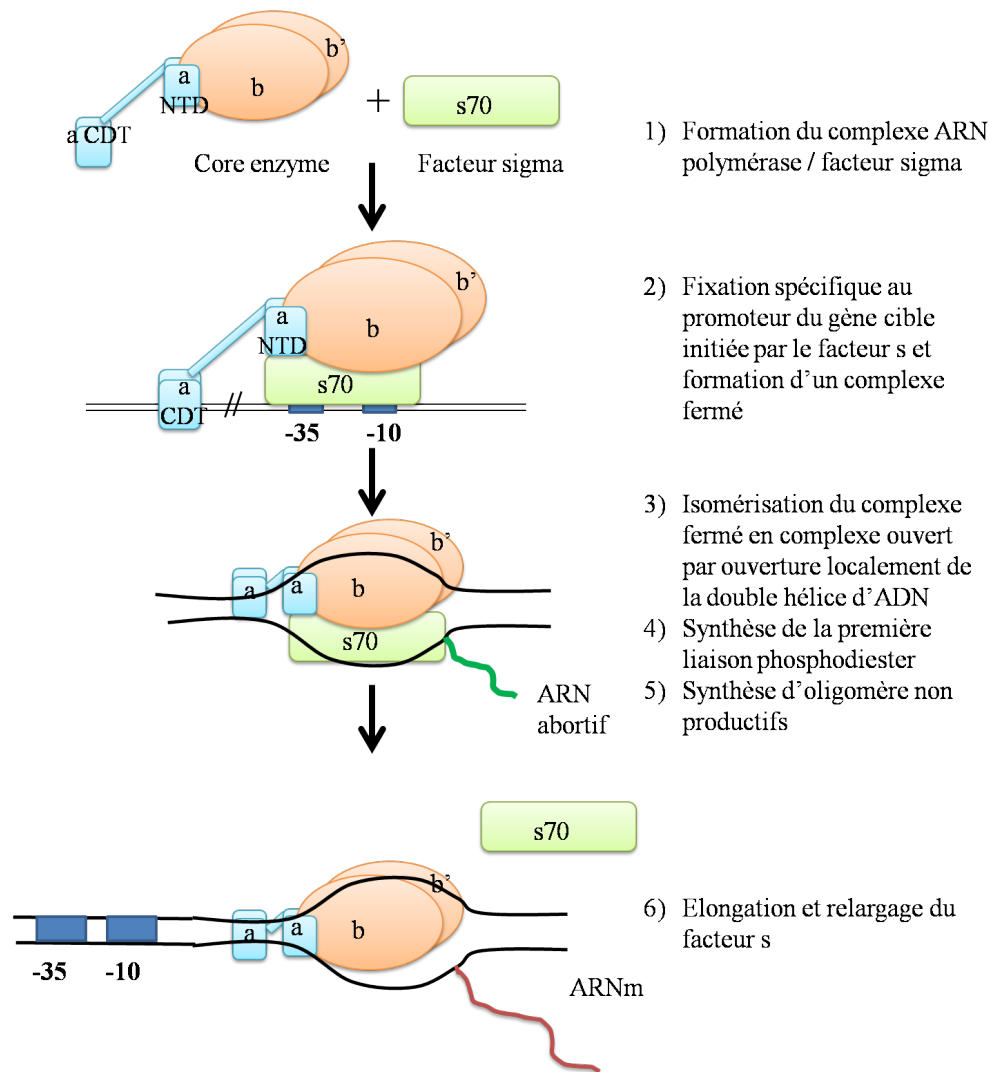


FIGURE II.2 – Schéma des différentes étapes de l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase associée à un facteur σ de la famille 70. Noter que l'ARN polymérase est constituée de plusieurs sous unités : 2 sous-unités α permettant l'association des 2 sous-unités β et la reconnaissance des éléments d'activation en cis et en trans. Les 2 sous-unités β permettent la liaison à l'ADN, la synthèse des ARNs et la reconnaissance du terminateur. Le facteur σ permet la liaison spécifique au promoteur.

exprimé en fin de phase exponentielle en réponse à différents stress comme un pH acide, une baisse de la température, ou encore une densité cellulaire élevée [Hirsch 2005]. BotR, TetR, TcdR et UviA sont fonctionnellement interchangeables *in vitro* et *in vivo* suggérant une évolution de ces facteurs à partir d'un ancêtre commun [Dupuy 2006].

II.3.2 Les petits ARN régulateurs

Entre 10 et 20% du génome bactérien code des ARNs régulateurs, localisés le plus souvent dans les régions intergéniques. Les petits ARNs (appelés small RNAs, sRNAs) ont été découverts en 1970. Ces molécules sont stables (temps de demie vie compris entre 20 et 60 min) et mesurent généralement entre 10 et 500 nucléotides bien que certains peuvent faire jusqu'à 1000 nucléotides, voire couvrir le génome entier [Argaman 2001].

Ces sRNAs peuvent agir en cis, en trans ou les deux, par un mécanisme d'appariement de base [Waters 2009]. Certains peuvent également agir par séquestration de protéines régulatrices. C'est le cas du système CsrA/CsrB (Carbon Storage) de *E. coli*, responsable de la répression de gènes exprimés en phase stationnaire [Gutiérrez 2005] Fig II.3. D'autres peuvent être traduits en protéines.

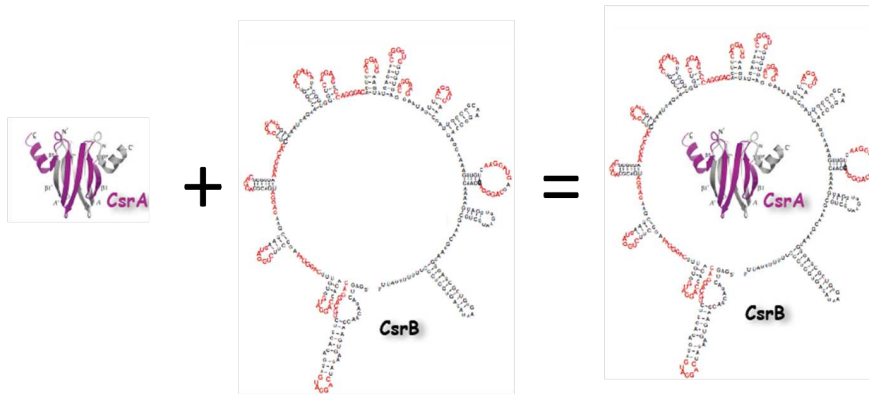


FIGURE II.3 – Modèle prédit de séquestration de CsrA par le petit sRNA CsrB.

Les sRNAs agissent à distance de leur site de production et ont peu de complémentarité avec leur cible. Ainsi, un petit ARN peut réguler plusieurs ARNm (ARN messenger) et un ARNm peut être régulé par plusieurs petits ARNs. Du fait de leur faible complémentarité de séquence, plusieurs sRNAs requièrent une protéine chaperonne appelée Hfq pour interagir avec leur cible [Thompson 2011].

Les sARN sont les régulateurs post traductionnels les plus importants de la réponse adaptative et sont aussi appelés ARNs senseurs. Certains agissent en cis en modifiant leur propre structure en réponse à des facteurs physiques comme la température (c'est le cas de *Yersinia pestis*, *E. coli* ou *Listeria monocytogenes*) ou en se liant à un métabolite (mécanisme du riboswitch) [Klinkert 2009][Narberhaus 2006].

Récemment, un nouveau type de sRNA a été décrit, appelé CRISPR (Clustered

Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats). Ces ARNs interfèrent avec le processus d'infection par les bactériophages mais également avec la conjugaison [Sorek 2008].

De nombreux sRNAs sont impliqués dans la régulation des facteurs de virulence chez les bactéries [Toledo-Arana 2007] de façon directe ou indirecte. Chez *C. perfringens*, un petit ARN appelé VR-RNA (Vir Regulated RNA) contrôle la transcription de la collagénase A et de la toxine (α) [Shimizu 2002].

Un nombre important de sRNAs a été identifié dans le génome de 21 Clostridies. Entre 231 et 249 sRNAs potentiellement régulateurs ont été identifiés chez *C. botulinum* par analyse *in silico*. La plupart sont spécifiques au genre *Clostridium* et ne sont pas retrouvés chez les autres phylums. De façon intéressante, les Clostridies pathogènes semblent avoir des sRNAs régulateurs en commun ce qui indique des mécanismes identiques de productions des facteurs de virulence ou d'adaptation à une niche écologique [Chen 2011]. Le rôle des sRNAs dans le contrôle de la production des neurotoxines reste à déterminer.

II.3.3 Les systèmes à deux composants

Les systèmes à deux composants (TCS, Two Components System) permettent une réponse adaptative de la bactérie à son environnement et sont impliqués dans la régulation de la production de facteurs de virulence chez de nombreuses bactéries. Les TCSs sont des systèmes de phosphorelay où la transduction du signal est assurée par un transfert de groupement phosphate entre au moins deux protéines, un senseur histidine kinase (SHK, Sensor Histidine Kinase) transmembranaire, et une protéine régulatrice (RR, Response Regulator). Le SHK détecte un signal et s'autophosphoryle sur un résidu histidine (H) au dépens de l'ATP, puis transfère son groupement phosphate sur un résidu aspartate (D) de la protéine RR. Une fois phosphorylée, le RR régule l'expression de gènes cibles en se liant à l'ADN [Federle 2003] Fig II.4.

Plusieurs TCS sont impliqués dans la régulation de facteurs de virulences chez les bactéries à Gram+ et Gram-. Le TCS le mieux connu chez les Clostridies est le système VirR/S de *C. perfringens*. Cette bactérie est impliquée dans de nombreuses maladies humaines et animales provoquant des gangrènes gazeuses. Ce système régule de façon transcriptionnelle la production de nombreuses toxines produites par *C. perfringens*, soit de façon directe pour la toxine thêta (θ) ou perfringolysine O, soit de façon indirecte via un ARN régulateur, le VR-RNA, pour les gènes des toxines α et la collagénase A.

Le séquençage du génome de *C. botulinum* Hall A en 2007 par Sebaihia et collaborateurs a permis d'identifier de nombreux systèmes régulateurs potentiels incluant 28 TCSs, 8 HSKs

orphelins, 8 RRs orphelins, (c'est-à-dire des systèmes pour lesquels les partenaires n'ont pas été identifiés), et 15 facteurs σ [Sebahia 2007]. La recherche de TCSs impliqués dans la régulation positive de la production de toxine chez *C. botulinum* Hall A, constitue le premier objectif de cette thèse.

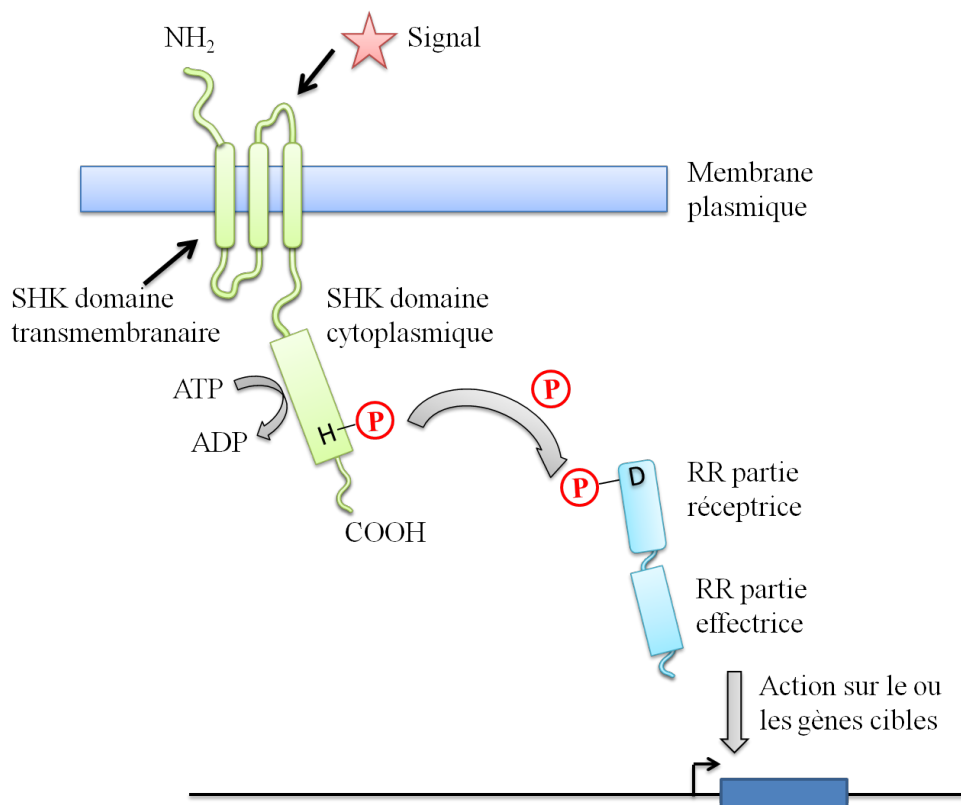


FIGURE II.4 – Schéma de la régulation par les systèmes à deux composants (TCSs). Le signal est détecté par le senseur histidine kinase (SHK) par son domaine senseur transmembranaire, entraînant un changement de conformation. Ceci conduit à une autophosphorylation dépendante de l'ATP sur un résidu Histidine (H) conservé. Ce groupement phosphate est alors transféré sur un résidu aspartate (D) également conservé, sur la partie réceptrice de la protéine régulatrice (RR, Response Regulator) entraînant son activation. Une fois activée, la partie effectrice de RR modifie spécifiquement l'expression des gènes cibles.

Tout récemment, Zhang et collaborateurs ont identifié un TCS impliqué dans la régulation négative de la toxinogénèse chez *C. botulinum*, situé à proximité du locus botulique de plusieurs souches (A2 Kyoto, A5 et F Langeland). Ce TCS régule négativement la production de BotR/A et par conséquent, diminue la production de BoNT. Ce TCS est retrouvé avec 90% d'identité chez les *C. botulinum* du groupe I et pourrait être un régulateur conservé au

sein de ce groupe pour la régulation négative de la production de neurotoxine [Zhang 2013]. Il pourrait également agir comme un facteur anti σ en empêchant la transcription et/ou la traduction du facteur σ , à l'image de TcdC identifié chez *C. difficile* [Carter 2011].

II.3.4 Le "Quorum sensing"

Le "quorum sensing" permet aux bactéries de sentir leur environnement populationnel. Ce mécanisme joue un rôle critique dans les interactions au sein des habitats naturels ainsi que dans le contrôle de la synthèse de facteurs de virulence de certaines bactéries pathogènes. Le "quorum sensing" fait intervenir des mécanismes variés tels les TCSs et les sRNAs.

Les premières descriptions de communication bactériennes datent des années 1970. L'observation de deux bactéries bioluminescentes à Gram-, *Photobacterium fischeri* et *Photobacterium harveyi*, renommées par la suite *Vibrio fischeri* et *Vibrio harveyi*, ont permis de caractériser les communications intra et inter-spécifiques [Eberhard 1972] [Federle 2003].

Le modèle inter-spécifique a été décrit chez *V. harveyi*. Les bactéries mesurent la concentration de petites molécules sécrétées, appelées autoinducteurs (AIs), synthétisées sous forme de précurseurs qui sont clivés puis transportés vers le milieu extérieur par des systèmes de type ABC transporteurs (ATP-Binding Cassette). La détection de ces AIs est réalisée par des TCSs ce qui permet de contrôler, de façon coordonnée, l'expression de nombreux gènes cibles. Un des signaux utilisés pour la communication inter-espèces est l'AI-2 (AutoInducteur 2). C'est un furanosyl borate diester synthétisé par LuxS à partir de SAM (S-adénosylméthionine). De nombreuses espèces bactériennes ont un gène *luxS* dans leur génome et peuvent donc produire AI-2 [Waters 2005]. L'AI-2 peut donc être détecté par de nombreuses bactéries appartenant à des espèces différentes et régule des gènes impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires, dont la virulence.

L'implication de LuxS dans la toxinogénèse a été démontrée chez *C. perfringens*. Le TCSs VirR/VirS a un effet pléiotrope et régule, en plus de l'expression des gènes de toxine, un opéron contenant le gène *luxS*. LuxS stimule la production des toxines α , ι , et κ , en milieu de phase exponentielle de croissance. Les TCSs et le "quorum sensing" sont donc étroitement liés et ces 2 systèmes coopèrent pour une production maximale de toxine [Ohtani 2002].

Chez *C. difficile*, le rôle du quorum sensing dans la régulation de la toxinogénèse est encore mal défini, mais l'AI-2 semble réguler positivement la transcription des gènes des toxines A et B ainsi que le gène *tcdE* qui code une holine (protéine cytolytique responsable de la lyse de son hôte bactérien). On trouve également le TCS RolA/B (Rol, Repressor

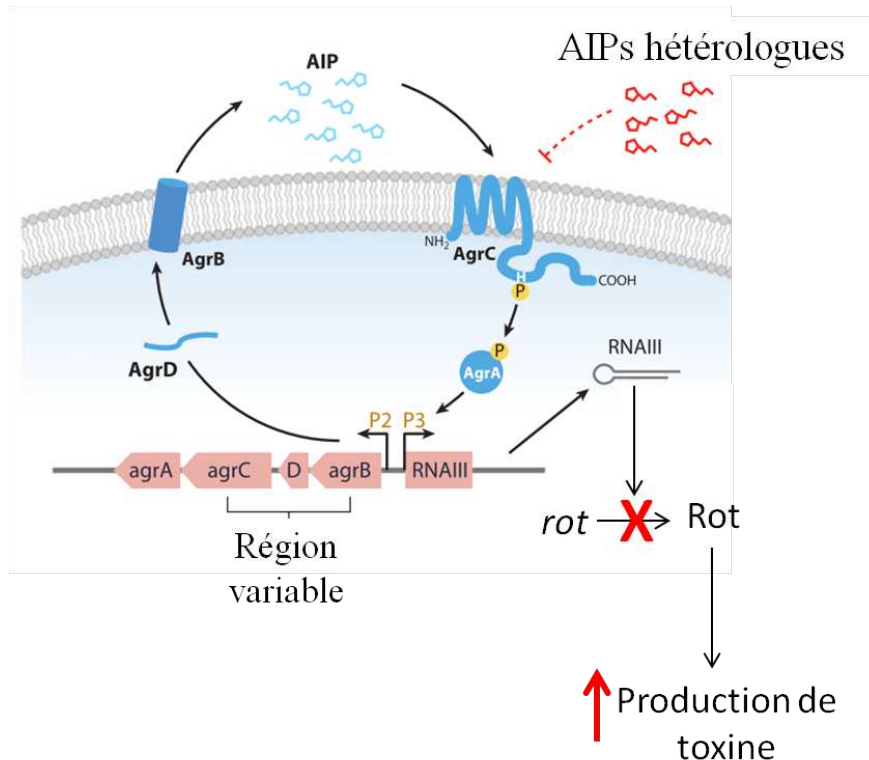


FIGURE II.5 – Exemple de communication intra-spécifique. Schéma de la régulation de la production de toxine par le système Agr chez *S. aureus*. *agrD* code un peptide précurseur de 46aa, hydrolysé par la protéine codé par *agrB* en un octapeptide, l'AIP (Autoinducer Peptid). Cet AIP est alors détecté de façon spécifique par le TCS *agrC/ argA* alors que les AIPs hétérologues produits par d'autres bactéries, ne sont pas détectés. AgrA est la protéine régulatrice qui active la transcription à partir des promoteurs P2 et P3 permettant l'autorégulation et la synthèse de l'ARN III. L'ARN III bloque la traduction de l'ARNm de Rot (Repressor of toxins) et permet la production de toxine (d'après [Novick 2008]).

Of LuxS) qui régule négativement l'expression de *luxS* [Carter 2005] [Lee 2005]. Toutefois, LuxS semble jouer un rôle important dans la formation de biofilms chez *C. difficile*, étape clé dans la colonisation et la persistance de ce pathogène dans l'intestin [Dapa 2013]. Cette communication a également été identifiée chez la souche 56A de *C. botulinum* et pourrait influencer la germination des spores. En effet, des spores mises en contact avec un surnageant de culture en phase de latence, germent plus rapidement que les spores contrôles [Zhao 2006].

La communication intra-spécifique a été découverte chez *V. harveyi*. Les molécules détectées sont des petits peptides appelés AIP (Autoinducer Peptid) permettant une reconnaissance spécifique par des TCSs [Waters 2005]. Un des systèmes bien connu de

communication intra-spécifique est le système Agr de *Staphylococcus aureus*, bactérie responsable de 50% des infections nosocomiales Fig II.5 qui contrôle la synthèse des facteurs de virulence. L'AIPs est synthétisé à partir du peptide codé par *agrD* qui est ensuite hydrolysé par AgrB. L'AIP ainsi produit est libéré dans le milieu extérieur où il est détecté par un TCS qui va réguler positivement la production d'un sRNA, l'ARN III. Cet sARN inhibe la synthèse d'un facteur de transcription pléiotrope majeur, la protéine Rot (Repressor of toxins) ce qui permet la production de toxine [Geisinger 2006]. Des gènes homologues à *agrB* et *agrD* (permettant la transformation du peptide précurseur AgrB en AIP) ont été mis en évidence chez les souches *C. botulinum* du groupe I. Le gène homologue à *agrB*, appelé *agr-1*, semblent réguler la sporulation alors que le gène homologue à *agrD*, appelé *agr-2*, serait quant à lui impliqué dans la production de BoNT/A [Cooksley 2010].

Ainsi, la régulation de la production de facteurs de virulence chez les bactéries est une mécanisme complexe où les acteurs sont souvent interconnectés.

La barrière intestinale

Sommaire

III.1 Anatomie structurale et fonctionnelle de l'appareil digestif	57
III.2 L'intestin : principal organe d'absorption des nutriments	59
III.2.1 Histologie du tube digestif	59
III.2.1.1 La muqueuse intestinale	60
III.2.1.2 La "muscularis mucosae"	62
III.2.1.3 La sous-muqueuse	62
III.2.1.4 La musculuse	62
III.2.1.5 La séreuse	62
III.2.2 Cytologie intestinale	62
III.2.2.1 Les entérocytes	63
III.2.2.2 Les cellules M	64
III.2.2.3 Les cellules caliciformes	64
III.2.2.4 Les cellules de Paneth	65
III.2.2.5 Les cellules entéroendocrines	66
III.2.2.6 Les "tufts cells"	67
III.2.2.7 Les "cup cells"	68
III.2.2.8 Les IELs (IntraEpithelial Lymphocytes)	68
III.2.3 Auto-renouvellement de l'épithélium intestinal	69
III.2.4 Signalisation moléculaire	69
III.3 Le SNE (système nerveux entérique) : un second cerveau	72
III.3.1 Organisation structurale	72
III.3.2 Fonctions du SNE	74
III.3.3 Types neuronaux	74
III.3.3.1 Morphologie	74
III.3.3.2 Définition fonctionnelle des neurones entériques	76
III.3.3.2.1 Les motoneurones	76
III.3.3.2.2 Les interneurones	76
III.3.3.2.3 Les IPANs (Intrinsic Primary Afferent neurons)	77

III.3.3.2.4 Les IFANs (Intestinofugal Afferent Neurons)	77
III.3.4 Relation SNE et cellules entéroendocrines	77
III.3.5 Exemple du reflex péristaltique	78
III.4 Les toxines et la barrière intestinale	80
III.4.1 Microbiote intestinal et régulation par les cellules de Paneth	80
III.4.2 Les entérotoxines	80

III.1 Anatomie structurale et fonctionnelle de l'appareil digestif

L'appareil digestif a trois fonctions principales : réduire les aliments en molécules simples pour leur absorption et leur transport, évacuer les déchets de la digestion et protéger l'organisme contre le passage de pathogènes et de toxines.

Il est composé de 3 parties histologiquement distinctes Fig III.1

- La cavité buccale comprend les dents, les organes du goût, les glandes salivaires et le pharynx. Elle sert à la préhension des aliments, ainsi qu'à leur transformation chimique et mécanique. Elle joue un rôle dans la phonation, la perception du goût et la défense de l'organisme grâce aux propriétés antiseptiques de la salive.

- Le tube digestif est divisé en plusieurs segments :

o L'œsophage est un organe musculueux servant à la propulsion du bol alimentaire

o L'estomac sert à la dégradation enzymatique et mécanique des aliments grâce à la sécrétion d'acide chlorhydrique, du facteur intrinsèque nécessaire à l'absorption de la vitamine B12 anti-anémiant, des enzymes digestives (pepsine, enzyme protéolytique) et d'hormones (gastrine, histamine, sérotonine, somatostatine, CCK (cholécystokinine), et endorphines).

o L'intestin, lui-même divisé en deux parties anatomiquement et physiologiquement distinctes :

- L'intestin grêle qui joue un rôle important dans la dégradation enzymatique et l'absorption des nutriments. Il a également une fonction endocrine importante avec la production d'hormones ayant une action sur la sécrétion et la motricité intestinale. L'intestin joue également un rôle immunitaire important car il constitue une barrière physique entre la lumière et le péritoine, et une barrière chimique de part sa capacité à sécréter des immunoglobulines et des composants antibactériens. Il est constitué d'une partie fixe (le duodénum) et d'une partie mobile (jéjunum-iléon) organisée en anses reliées entre elles par le mésentère.

- Le gros intestin transforme le bol intestinal en matière solide non digestible. C'est le siège de la dégradation de certains composés tels que la cellulose (notamment grâce à la flore bactérienne commensale) et de l'absorption de l'eau et des électrolytes déversés par l'iléon. Il comprend le caecum, le colon (ascendant, transverse et descendant) qui brasse et stocke le bol fécal, suivi par le sigmoïde, le rectum et le canal anal.

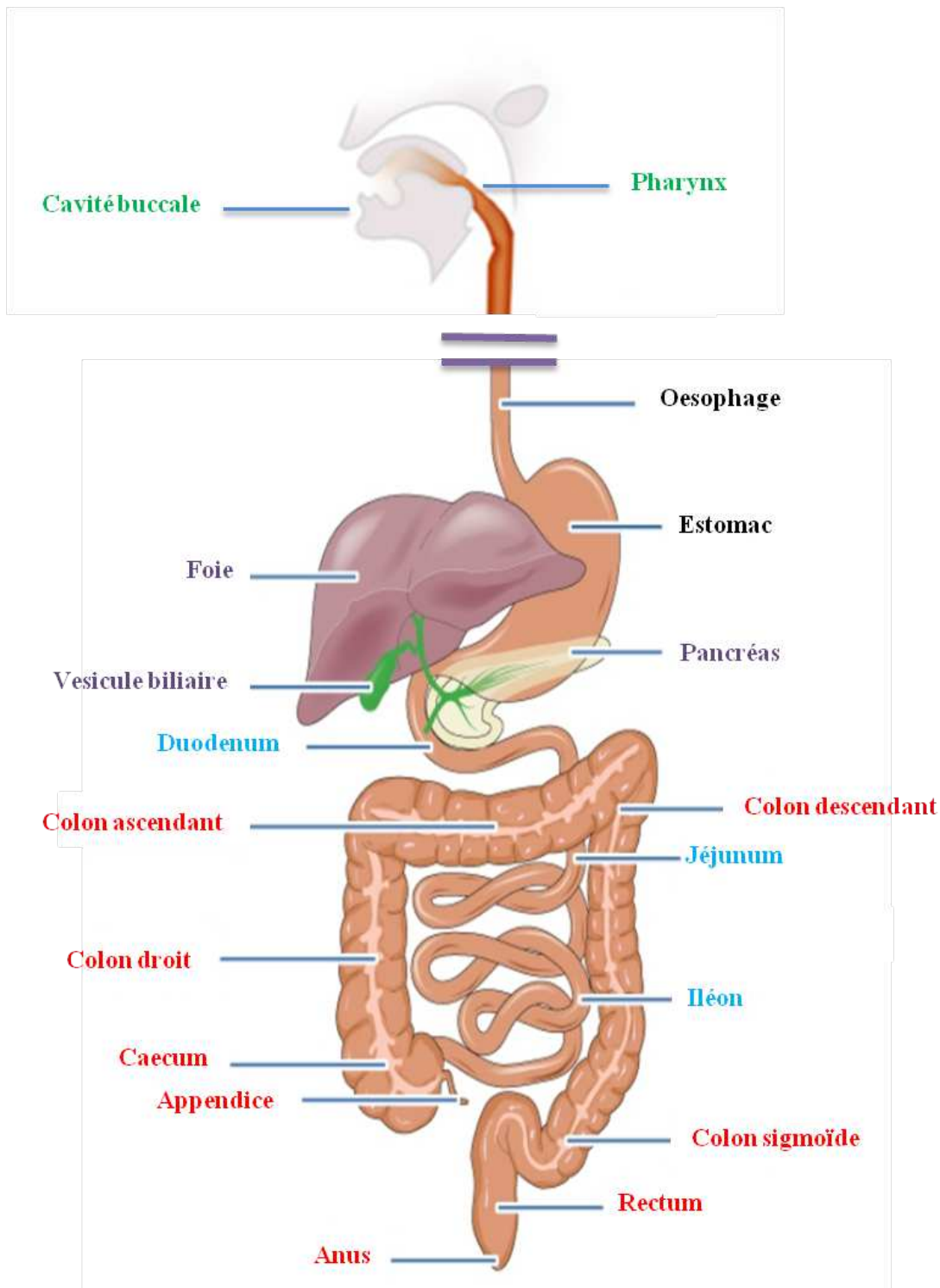


FIGURE III.1 – Schéma de l'appareil digestif comprenant les 3 parties distinctes, la cavité buccale (légendes en vert), le tube digestif en noir avec l'intestin grêle (légendes en bleu) et le gros intestin (légendes en rouge) ainsi que les glandes annexes (en violet).

- Enfin, on distingue les organes glandulaires annexes qui comprennent :
 - o Le foie qui est le viscère le plus volumineux de l'organisme. Il est composé d'hépatocytes qui dégradent de nombreuses molécules chimiques pour épurer le plasma sanguin, il a également une fonction exocrine (sécrète la bile qui est concentrée et stockée dans la vésicule biliaire). Le foie permet le maintien de la glycémie, fabrique les lipides de structure pour son propre fonctionnement ainsi que pour l'organisme, et synthétise des protéines, nécessaires au fonctionnement de l'organisme comme l'albumine ou des facteurs de coagulation.
 - o La vésicule biliaire stocke et concentre la bile produite par le foie
 - o Et enfin le pancréas qui est un organe mixte, exocrine de part les enzymes digestives qu'il produit et endocrine par la production d'hormones régulatrices (insuline et glucagon).

III.2 L'intestin : principal organe d'absorption des nutriments

L'intestin est le principal organe d'absorption de l'organisme. Il représente une surface d'entrée dans l'organisme de 200 à 400 m^2 ce qui en fait la voie d'entrée la plus importante du corps, à la fois pour l'absorption des nutriments mais également pour l'entrée potentielle de pathogènes. L'intestin est équipé de barrières physiques, biologiques et immunologiques pour protéger l'organisme de potentielles attaques et pour remplir les fonctions qui lui sont inhérentes.

III.2.1 Histologie du tube digestif

Structurellement, la surface d'absorption de l'intestin est considérablement augmentée. Anatomiquement par sa constitution en anses intestinales de 6 à 7 m de long (chez l'homme). Puis macroscopiquement, par la formation de valvules conniventes présentes sous forme de replis circulaires ou semi-circulaires (qui disparaissent dans la moitié distale de l'iléon). Et enfin microscopiquement, par la présence des villosités et microvillosités Fig III.2.

Le tube digestif est également le siège des défenses immunologiques grâce au tissu lymphoïde qui lui est associé appelé GALT ("Gut Associated Lymphoid Tissue"). Ce tissu est composé de cellules lymphoïdes dispersées dans le chorion des villosités, appelées les plaques de Peyer. Ces plaques sont retrouvées à partir de la deuxième moitié de l'iléon et sont composées de plusieurs nodules lymphoïdes faisant saillie dans la lumière intestinale.

Le tube digestif est composé de 5 couches concentriques plus ou moins bien individualisées selon les segments étudiés. De la lumière vers le péritoine, on trouve la muqueuse, la

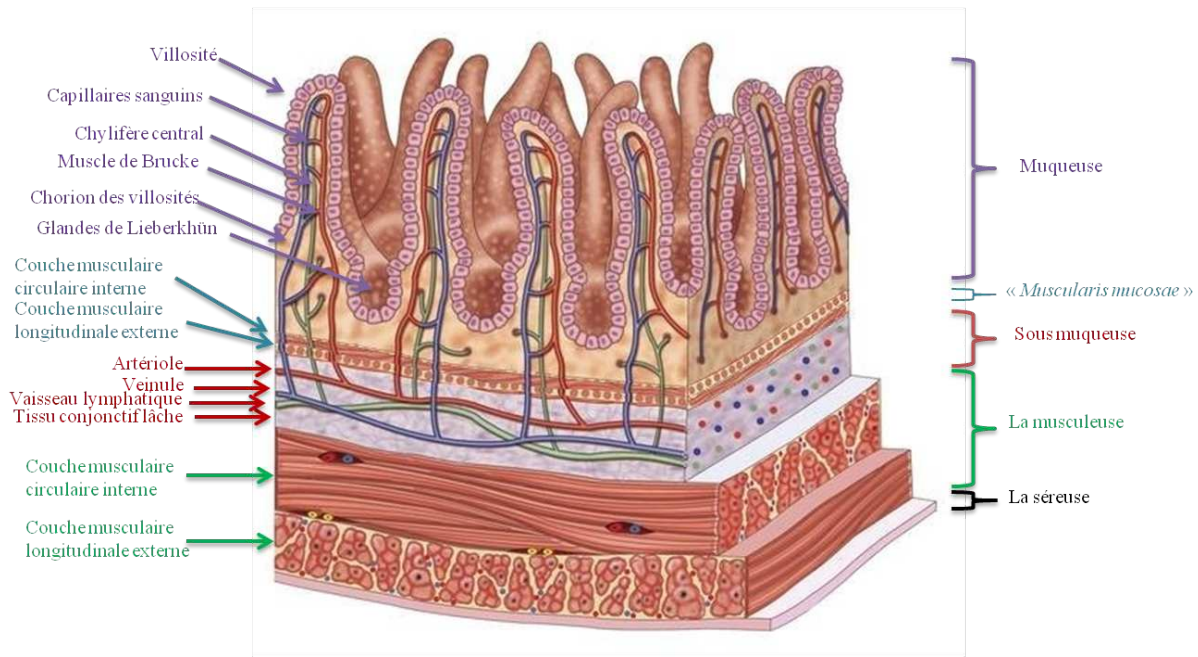


FIGURE III.2 – Schéma représentant la composition histologique de l'intestin grêle.

musculaire muqueuse, la sous-muqueuse, la musculeuse et la séreuse.

III.2.1.1 La muqueuse intestinale

La muqueuse intestinale est composée d'un épithélium reposant sur un tissu conjonctif. Elle dérive de l'endoderme et se forme pendant la gastrulation.

L'épithélium est composé de cellules associées les unes aux autres par des jonctions intercellulaires faisant de l'épithélium intestinal une barrière physiquement étanche. On distingue les villosités, qui sont des évaginations en forme de doigts de 1 mm de haut, et les glandes de Lieberkhün Fig III.3.

À la base des villosités se trouvent les glandes de Lieberkhün aussi appelées cryptes. On recense une vingtaine de cryptes par villosité et elle constitue le siège de la prolifération cellulaire de la villosité. Dans l'axe de la villosité se trouve le chorion (ou lamina propria) qui dérive du mésoderme. La lamina propria est composée d'un tissu conjonctif lâche renfermant des capillaires sanguins, le chylifère central qui est un vaisseau lymphatique se drainant dans le plexus lymphatique sous-muqueux, et des fibres nerveuses provenant du plexus de Meissner (voir plus bas). On y trouve également des fibres musculaires lisses, disposées longitudinalement, provenant de la couche circulaire de la musculaire muqueuse et qui forme le muscle de Brucke. Ce dernier est responsable de la contraction rythmique de la

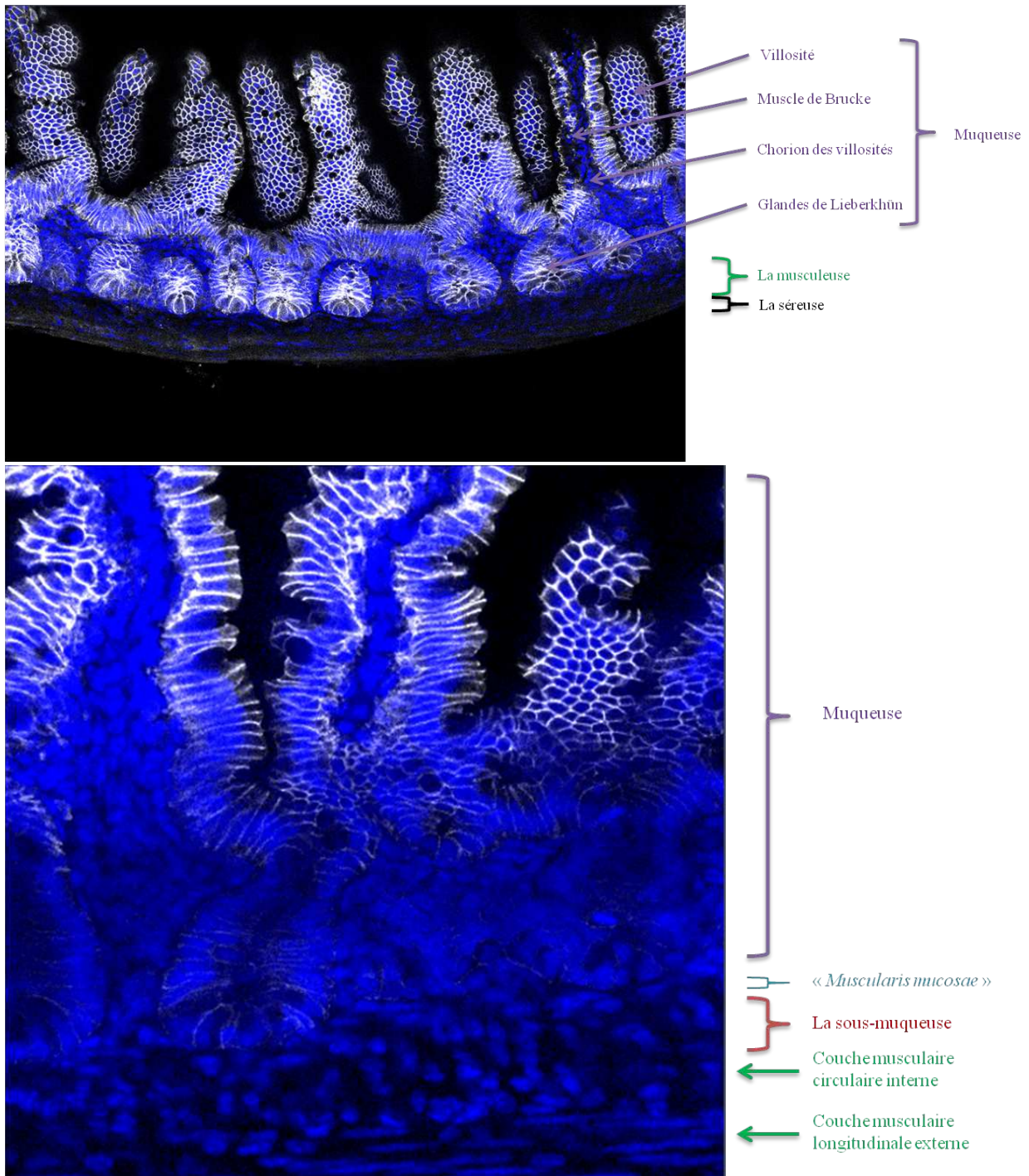


FIGURE III.3 – Image en microscopie à fluorescence des différentes couches histologiques de l'intestin grêle (grossissement X400). Noter la différence d'orientation des noyaux dans les deux couches musculaires. En bleu, les noyaux (Hoechst), et en blanc la cadhérine épithéliale (cadhérine E). (C. Connan, non publié).

villosité favorisant le drainage lymphatique.

III.2.1.2 La "muscularis mucosae"

La "muscularis mucosae" est une mince couche de tissu musculaire lisse comprenant 2 feuillets, un circulaire interne et un longitudinal externe. Il est absent au 1/3 supérieur de l'œophage et au niveau du canal anal.

III.2.1.3 La sous-muqueuse

La sous-muqueuse est un tissu conjonctif lâche qui contient le plexus de Meissner (détaillé plus bas). Au niveau du duodénum, elle est envahie par les glandes de Brünner qui se jettent dans les glandes de Lieberkühn ce qui permet de distinguer le duodénum du jujeno-iléon. Ces glandes de Brünner jouent un rôle dans la neutralisation du suc gastrique et produisent de l'EGF (Epidermal Growth Factor).

III.2.1.4 La musculuse

La musculuse est constituée, comme la musculaire muqueuse, de 2 plans de fibres musculaires lisses, une couche circulaire interne (épaisse) et une longitudinale externe. Entre les 2 couches se trouve le plexus d'Auerbach (ou plexus myentérique d'Auerbach). La couche musculaire longitudinale externe contient les cellules de Cajal qui ont une rythmicité contractile autonome. Elles sont considérées comme un pacemaker et sont associées à une innervation intrinsèque de la paroi par le Système Nerveux Entérique (SNE).

III.2.1.5 La séreuse

La séreuse correspond au feuillet viscéral du péritoine. C'est un tissu conjonctif tapissé sur son versant externe par un épithélium simple, le mésothélium. Cet épithélium, très sécrétoire, permet le glissement des différents organes les uns sur les autres.

III.2.2 Cytologie intestinale

Les différents types cellulaires permettent à l'intestin de remplir les fonctions de digestion, d'absorption des nutriments ainsi que l'élimination des déchets et l'homéostasie métabolique Fig III.4.

Les types cellulaires peuvent être divisés en 2 grands groupes. On distingue des cellules absorbantes (entérocytes et cellules M) et des cellules sécrétrices (cellules caliciformes, cellules de Paneth, cellules entéroendocrines, "tuft cells").

L'épithélium est divisé en deux structures : les cryptes qui contiennent principalement des

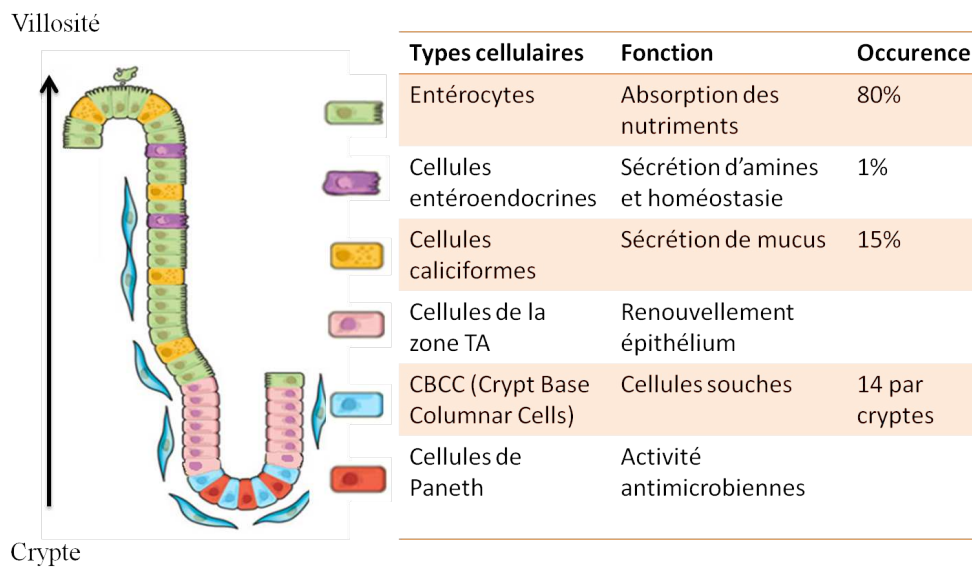


FIGURE III.4 – Localisation, fonction et occurrence des principaux types cellulaires présents dans la muqueuse intestinale. Noter que les cellules M sont absentes de l'axe cryptes/villosités.

cellules indifférenciées qui prolifèrent et les villosités qui contiennent des cellules différenciées qui ne prolifèrent pas. A la jonction de la villosité et des glandes de Lieberkhün se trouve la zone proliférative dite "Transit Amplifying region" (TA). On y trouve des cellules indifférenciées ou intermédiaires qui interviennent dans le renouvellement de l'épithélium (voir chapitre III.2.3).

III.2.2.1 Les entérocytes

Les entérocytes représentent 80% de la population cellulaire de l'épithélium intestinal et sont retrouvés dans tout l'intestin bien qu'en majorité dans le duodénum où les villosités sont les plus longues. Ces cellules sont spécialisées dans l'absorption des nutriments. Les microvillosités présentes au pôle apical des cellules, permettent d'augmenter la surface d'absorption des nutriments et forment, le long de la villosité, la bordure en brosse Fig III.5. Les entérocytes absorbent les glucides et les protides grâce aux hydrolases et peptidases qu'ils produisent. L'absorption des lipides implique des mécanismes d'endocytose et de cyclage membranaire [Balas 2010].

La membrane plasmique des microvillosités de la bordure en brosse est recouverte par un feutrage microfibrillaire, le glycocalyx, qui s'étale vers la lumière intestinale et joue un rôle dans la protection, l'absorption et le transfert transmembranaire.

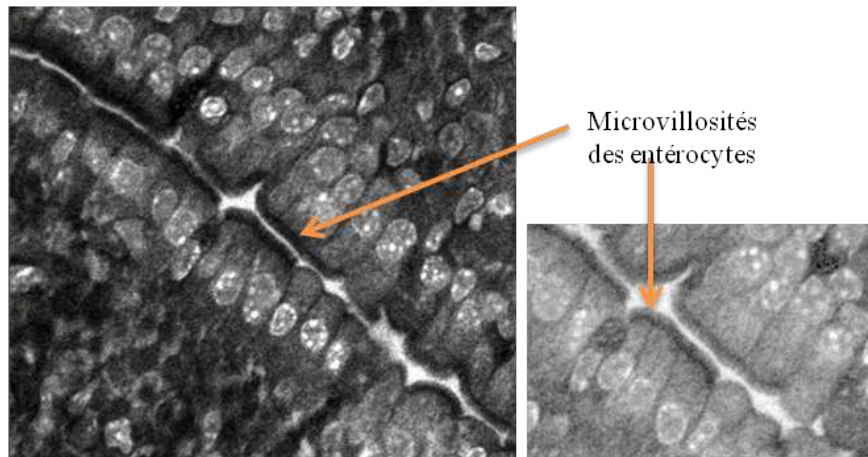


FIGURE III.5 – Microvillosités des entérocytes. Noter la position du noyau dans le tiers basal des cellules (grossissement x400). (C. Connan, non publié).

III.2.2.2 Les cellules M

Les cellules M ("Microfold cells") sont des cellules présentatrices d'antigènes aux macrophages et lymphocytes. Elles ont un noyau basal et de nombreuses vésicules contenant les antigènes captés. Les cellules M permettent l'entrée de macromolécules et micro-organismes de la lumière vers les plaques de Peyer qui contiennent toutes les cellules lymphoïdes nécessaires pour l'induction et la régulation de la réponse IgA spécifique d'un antigène.

Ces cellules sont décrites pour être localisées uniquement au niveau des plaques de Peyer et dans les FAE (follicules associés à l'épithélium). Cependant, en 2004 il a été montré que la réponse IgA pouvait être induite dans des modèles de souris dépourvues de plaques Peyer ("Peyer-null") et dépourvue de GALT ("GALT-null") [Jang 2004]. Les cellules responsables de cette réponse sont morphologiquement semblables aux cellules M mais sont réparties selon l'axe crypte/ villosité. Ces cellules sont alors appelées cellules M des villosités ("M cells villi") et sont capables, tout comme les cellules M retrouvées dans les plaques de Peyer, d'internaliser des bactéries et d'induire une réponse immunitaire spécifique d'un antigène.

III.2.2.3 Les cellules caliciformes

Les cellules caliciformes (ou "gobelet cells"), dites à pôle muqueux ouvert, sont majoritairement retrouvées dans l'iléon et le colon. Elles secrètent du mucus qui sert à la protection de la muqueuse lors du passage des nutriments. Elles sont généralement isolées et représentent 15% des cellules épithéliales. En forme de calice évasé vers la lumière intestinale, les 2/3 apicaux sont occupés par des grains de mucus et le pôle basal par le noyau triangulaire Fig III.6

Il a été démontré que certains pathogènes tel que *Listeria monocytogenes* transcytose au travers de ces cellules pour entrer dans l'organisme [Nikitas 2011].

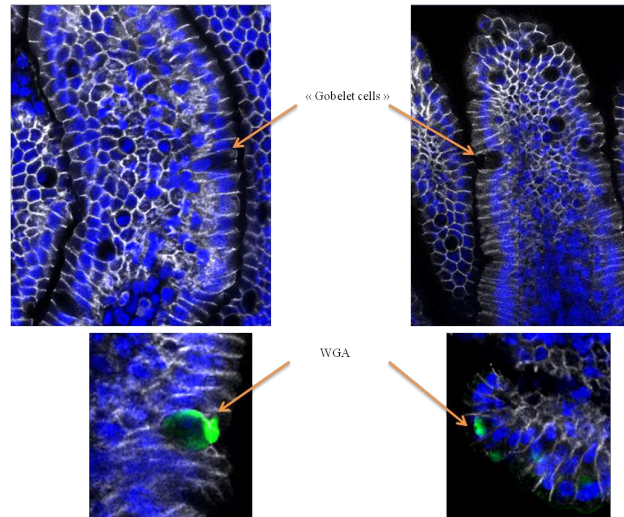


FIGURE III.6 – Image en microscopie à fluorescence permettant de visualiser la forme en calice des cellules caliciformes. (grossissement X400). Bleu : Hoechst, Blanc : cadhérine E, Vert : WGA (Wheat Germ Hemagglutinin), marqueur spécifique des cellules caliciformes. (C.Connan, non publié) .

III.2.2.4 Les cellules de Paneth

Les cellules de Paneth sont situées au fond des cryptes et leur localisation se limite à l'intestin grêle. Découvertes en 1888 par Joseph Paneth, ces cellules sécrètent des peptidases, du lysozyme, et plusieurs peptides de la famille des défensines leur conférant une forte activité antimicrobienne Fig III.7. Elles permettent de compenser les insuffisances pancréatiques en sécrétant des enzymes de type pancréatique (phospholipase, carboxylester, hydrolase etc...) et joue un rôle important dans l'immunité innée en sécrétant de la trypsine, enfermée dans des grains de zymogènes [Bevins 2011].

Elles jouent également un rôle important dans le contrôle du microbiote intestinal et sont impliquées dans l'homéostasie et la prolifération des cellules souches voisines (voir chapitre III.2.3).

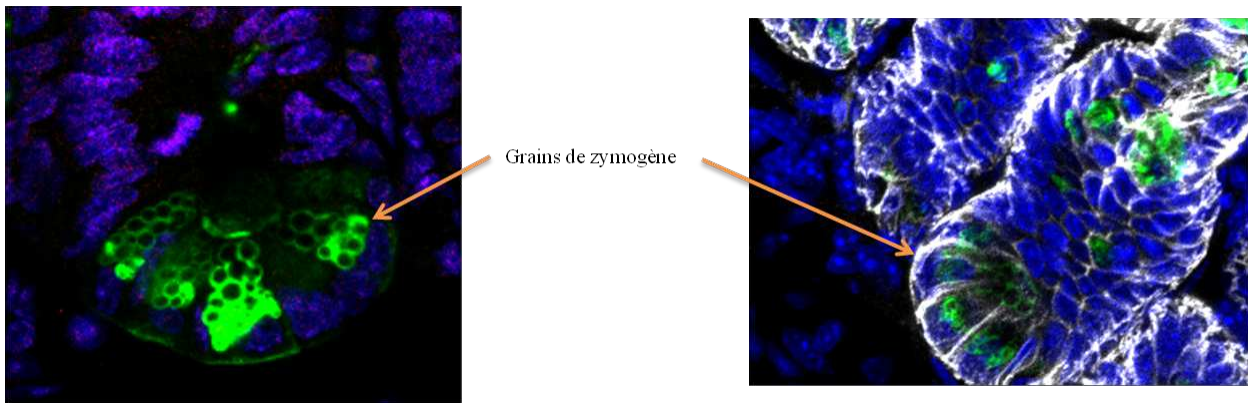


FIGURE III.7 – Image en microscopie à fluorescence représentant les cellules de Paneth situées au fond des cryptes. Noter que ces cellules sont facilement reconnaissables de part leur localisation mais également par les grains de zymogènes qu'elles contiennent. (Grossissement X400). Bleu : Hoechst, Blanc : cadhérine E et Vert : UEA1 (Ulex europaeus agglutinin I) marqueur spécifique des cellules de Paneth (C.Connan, non publié).

III.2.2.5 Les cellules entéroendocrines

Les cellules entéroendocrines sont les cellules endocrines du tube digestif ayant toutes la capacité de fixer et de décarboxyler les précurseurs des amines biogènes (acides aminés : tryptophane pour former la sérotonine, l'histidine pour former l'histamine, la tyrosine pour former la dopamine et la phénylalanine pour former la noradrénaline). Ces cellules sont regroupées sous le terme APUD (AP pour amino acid precursor, U pour Uptake Decarboxyl).

Elles appartiennent à un système endocrinien vaste appelé le SED (Système Endocrinien Diffus), présent au niveau de nombreux organes. Une quarantaine de types cellulaires a pu être identifiée jusqu'à présent et elles représentent 1% des cellules épithéliales de la muqueuse intestinales. Ces cellules contrôlent plusieurs fonctions de l'épithélium intestinal comme l'homéostasie du glucose, l'absorption des nutriments, la sécrétion pancréatique et gastrique ou encore la motilité gastro-intestinale. Elles agissent en tant que senseurs en libérant leur contenu peptidique et en activant les terminaisons nerveuses en réponse aux nutriments. Elles sont classées selon leur principal produit de sécrétion [Beucher 2012] :

- o La GLP-1, "Glucagon Like Peptid 1"
- o La GLP-2, "Glucagon Like Peptid 2"
- o Le peptide YY
- o La "gastric inhibitory peptid", qui inhibe la sécrétion d'HCl par les cellules bordantes et active la sécrétion de bicarbonate pancréatique

- o La somatostatine
- o La cholecystokinine (CCK), qui active la sécrétion pancréatique et la contraction vésiculaire
- o La sécrétine
- o La gastrine
- o La sérotonine, produite par les cellules EC (entérochromaffines) cellules qui contiennent des monoamines.
- o La neurotensine

Le peptide gastrique Ghrelin est aussi décrit dans l'intestin grêle et le colon mais son appartenance à un sous-type différent n'est pas clair.

La chromogranine A (CgA), présente dans les granules de sécrétion des cellules entéroendocrines, sert de marqueur général pour ces cellules [Zatelli 2007].

III.2.2.6 Les "tufts cells"

Les "tuft cells", littéralement cellules touffues, représentent 0,4% de l'épithélium intestinal de souris et sont réparties dans les cryptes et les villosités. La première description par Rhodin et Dlhann, fait état de cellules présentant une bordure en brosse très développée au pôle apical dans la trachée de rat [Rhodin 1956]. Puis, Järvi et Keyriläinen ont décrit le même type de cellules dans l'estomac glandulaire de souris [Järvi 1956]. Jusqu'à présent, ces cellules n'avaient été identifiées qu'en microscopie électronique et l'absence de marqueur spécifique rendait leur caractérisation difficile. Les "tuft cells" ont longtemps été considérées comme des cellules entéroendocrines car elles expriment les composants typiques des chémosenseurs. En 2011, Gerbe et collaborateurs ont mis en évidence une combinaison de marqueurs DCLK-1 (Double Cortin Like Kinase 1 protein) NF (neurofilament) et CK-18 (cytokératine 18) spécifique de ce type cellulaire rendant leur identification et leur caractérisation aisées [Gerbe 2011] Fig III.8.

Leur analyse a permis de déterminer que ces cellules constituent un 4ème type cellulaire de sécrétion dans l'épithélium intestinal qui n'appartient pas à la lignée des cellules entéroendocrines.

Les "tufts cells" réguleraient plusieurs fonctions comme la chémorésistance, la différenciation, la migration, l'inflammation et autres réponses physiologiques intégrées [Gerbe 2012]. Les "tuft cells" sont responsables de la sécrétion d'opioïde (l'endorphine) qui joue un rôle dans la physiologie, incluant la régulation du vidage gastrique, la motilité de l'intestin, la sécrétion intestinale et la douleur. Elles constituent le seul type cellulaire de l'intestin spécifique d'une fonctionnalité. Les "tufts cells" sont également impliquées dans la

maladie de l'"immotile cilia syndrome" où les cellules ciliées de la trachée sont absentes et remplacées par ces cellules.

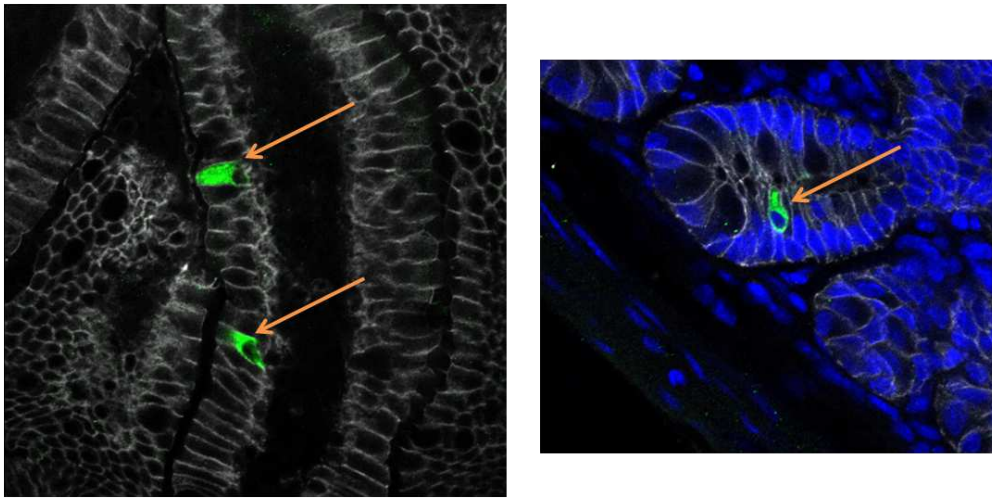


FIGURE III.8 – Image en microscopie à fluorescence permettant de mettre en évidence les " tuft cells ". Noter la répartition à la fois dans les villosités et les cryptes (Grossissement X400). Bleu : Hoechst, Blanc : cadhérine E, Vert : DCLK-1 (double cortin kinase 1 protein) marqueur des " tuft cells " (C.Connan, non publié).

III.2.2.7 Les "cup cells"

Les "cup cells" sont des cellules en forme de verre à vin et représentent 6% des cellules de l'épithélium intestinal. Elles sont plus nombreuses que les cellules entéroendocrines et expriment la vimentine. Leur fonction précise reste à déterminer [Ramirez 2003].

III.2.2.8 Les IELs (IntraEpithelial Lymphocytes)

Les lymphocytes intraépithéliaux, aussi appelés IELs, sont hétérogènes et répartis entre les entérocytes le long du tube digestif (tous les 4 à 10 entérocytes dans l'intestin grêle et 30 à 50 entérocytes dans le colon) [Kunisawa 2007]. Ces cellules appartiennent au système MALT ("Mucosa Associated Lymphoid Tissu") et jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie de la muqueuse intestinale en régulant positivement ou négativement la réponse immunitaire innée et acquise. La majorité de ces cellules sont des cellules T qui expriment constitutivement CD103 (ou intégrine) et des homodimères de CD8. On distingue 2 types d'IELs : les IELs "naturels" qui acquièrent leur phénotype activé pendant leur développement dans le thymus en présence de l'antigène du soi, et les IELs "induits" qui sont activés en dehors du thymus en réponse à des antigènes périphériques. A la différence des cellules T naïves,

ces cellules vont réagir immédiatement à la présence d'antigènes en sécrétant des cytokines ou en provoquant la mort de la cellule infectée [Cheroutre 2011].

III.2.3 Auto-renouvellement de l'épithélium intestinal

L'ensemble de l'épithélium intestinal est renouvelé tous les 4 à 5 jours et il est donc nécessaire d'avoir une dynamique de production cellulaire importante. La durée de vie des entérocytes et des cellules caliciformes est de 5 jours, 2 mois pour les cellules de Paneth et 3 semaines pour les cellules entéroendocrines.

Les cryptes constituent la zone de prolifération mitotique des cellules. Les cellules souches situées à la base des cryptes (14 par cryptes) sont intercalées entre les cellules de Paneth et se divisent de façon asymétrique. Une cellule souche se divise pour donner naissance soit à 2 cellules souches, soit une cellule souche et une cellule progénitrice, soit 2 cellules progénitrices Fig III.9. C'est un équilibre constant, une cellule qui prolifère n'est pas différenciée et vice et versa. [Barker 2010].

Les cellules progénitrices migrent vers le compartiment TA où elles se divisent rapidement (4 à 5 fois) selon l'axe crypte/villosité avant de se différencier en cellules fonctionnelles lors de leur migration vers l'apex des villosités Fig III.10. Les cellules de Paneth quant à elles, achèvent leur différenciation lors de leur migration dans la base des cryptes. A l'apex de la villosité, les cellules meurent par apoptose.

L'identité de cellules souches intestinales n'est pas encore bien définie. Leblond et collaborateurs ont identifié des cellules pluripotentes et capables de s'autorenouveler situées à la base des cryptes [Cheng H 1974]. Ces cellules appelées CBC ("Crypt Base Columnar") expriment Lgr5 qui est un récepteur orphelin à 7 domaines transmembranaires couplé à la protéine G (RCPG, Récepteurs Couplés au protéines G) [Barker 2007]. Une souris déficiente en Lgr5 n'est pas viable, ce qui renforce la caractéristique de cellules souches des CBC. Des études morphologiques et des suivis de prolifération cellulaire à l'aide de marqueurs, ont permis de mettre en évidence que toutes les cellules de l'intestin grêle sont issues de cellules CBC Lgr5+. Ces cellules, une fois divisées, migrent en position +4/+5 cellules juste au dessus du compartiment des cellules de Paneth, où la zone TA débute. [Barker 2010]

Les différents types cellulaires auraient donc une origine commune de différenciation et les mécanismes moléculaires dictant le devenir de ces cellules sont complexes.

III.2.4 Signalisation moléculaire

De nombreuses voies de signalisation moléculaire rentrent en jeu pour la différenciation des types cellulaires épithéliaux de l'intestin. Quand les cellules quittent le compartiment

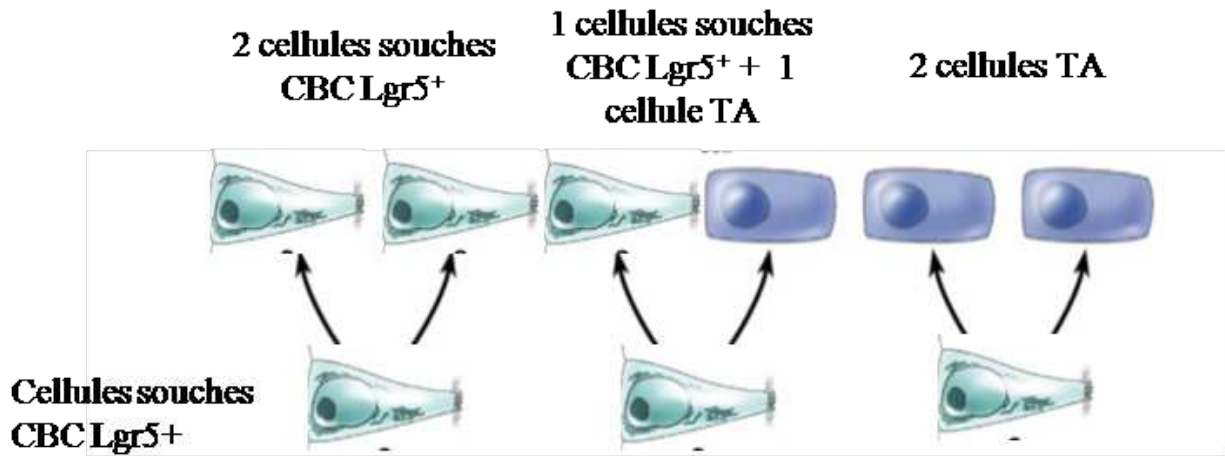


FIGURE III.9 – Schéma représentatif de la division asymétrique des cellules souches **CBC Lgr5+**

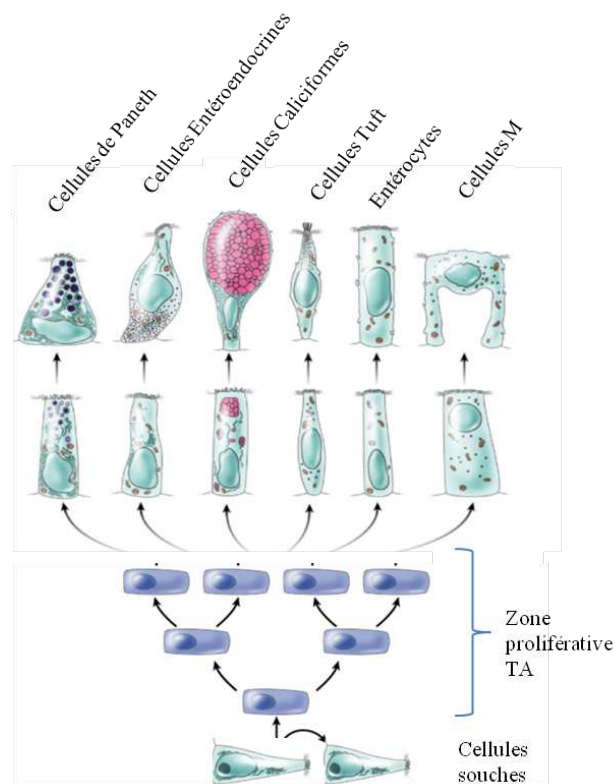


FIGURE III.10 – Schéma du renouvellement de l'épithélium intestinal et de la différenciation cellulaire (modifié à partir de [Barker 2010]).

des cryptes, elles sont reprogrammées grâce à des voies de signalisations hautement régulées Fig III.11. Un dysfonctionnement de cette reprogrammation peut conduire à l'apparition de tumeurs [Wang 2010].

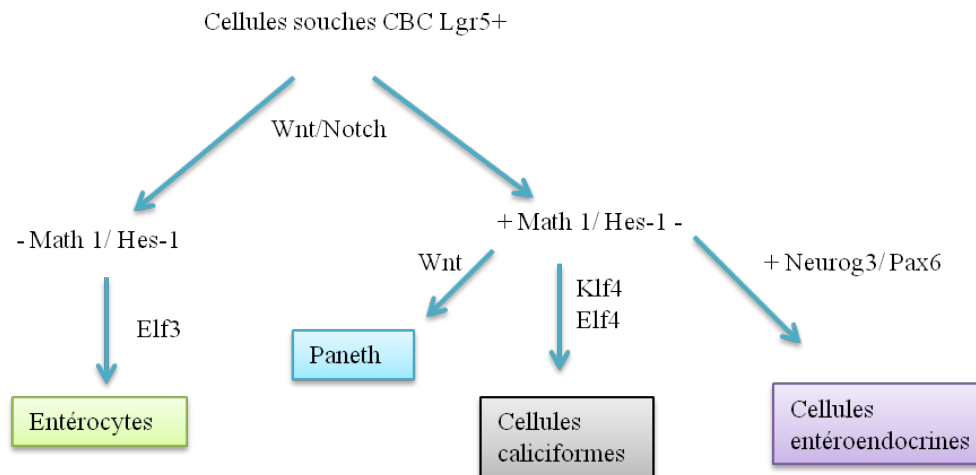


FIGURE III.11 – Schéma simplifié des voies de signalisation entrant en jeu dans le devenir des cellules souches CBC Lgr5+. Les cellules souches CBC Lgr5+ vont rapidement se différencier en cellules sécrétrices ou absorbantes grâce au facteur de transcription Math-1. Puis d'autres facteurs (Wnt, Klf4, Elf4, Neurog3 et Pax6) vont permettre de différencier ces cellules en cellules de Paneth, cellules caliciformes ou cellules entéroendocrines.

Le devenir des cellules de la zone TA se décide tôt. Les cellules se dirigent vers une voie sécrétrice ou vers une voie absorbante. Cette première étape de différenciation est régulée par un facteur de transcription Math-1, composant de la voie Notch. La voie de signalisation Notch est particulièrement importante dans les cryptes puisqu'elle empêche la différenciation par modulation de facteurs de transcription tels que Hes-1 (Hairy and Enhancer of Split-1) et Neurog3 (Neurogenin 3) impliqués dans la différenciation des cellules neuroendocrines et des entérocytes [Heath 2010].

La différenciation en cellules absorbantes ou sécrétrices est contrôlée par Atoh-1, un facteur de transcription contrôlant la transcription de la Neurog3, responsable du devenir des cellules entéroendocrines.

De nombreuses interconnexions sont décrites entre les différents facteurs de transcription.

Le rôle joué par les laminines, très présentes dans l'intestin, n'est peut être pas le plus prépondérant mais elles participent fortement à l'équilibre prolifération/ différenciation des

cellules. Quatre types de laminines sont décrites dans l'intestin :

- La L2 est présente dans les cryptes et agit au niveau de la prolifération et de la différenciation des cellules de Paneth
- Les L1, L5, L10 sont situées dans les villosités pour la différenciation des entérocytes.

Les cellules de Paneth joueraient également un rôle dans le maintien des cellules souches et la différenciation cellulaire. En effet, seules les cellules Lgr5+ localisées au voisinage des cellules de Paneth, maintiennent une voie Notch active. Le devenir des cellules filles issues de la division asymétrique des cellules souches, dépend de leur position relative par rapport aux cellules de Paneth [Schuijers 2012].

Ces voies de signalisation sont donc hautement régulées par des mécanismes complexes qui répondent à des stimuli provenant à la fois de l'écosystème externe, la microflore intestinale, mais également aux signaux internes de l'organisme qui vont pouvoir moduler la composition cellulaire de l'épithélium intestinal.

III.3 Le SNE (système nerveux entérique) : un second cerveau

En 1899, Bayliss et Starling ont mis en évidence que l'intestin grêle est capable de fonctionner indépendamment du système nerveux central (SNC). En effet, des expériences réalisées sur des anses intestinales isolées de chien montrent que les reflexes péristaltiques perdurent *ex vivo* [Hansen 2003]. Cinquante ans auparavant, Meissner en 1857, Billroth en 1858 et Auerbach en 1862/1864, avaient mis en évidence la présence de neurones dans la barrière épithéliale [Furness 2012].

La notion de Système Nerveux Entérique (SNE) est alors apparue, unique système regroupant des neurones hors du SNC et pouvant agir de façon autonome. Chez l'homme, on dénombre entre 400 et 600 millions de neurones dans le SNE, soit plus que la totalité des neurones compris dans les ganglions sympathiques et parasympathiques et comparable au nombre de neurones présents dans la moelle épinière. Le SNE est considéré comme un mini cerveau ou un second cerveau [John Barton Furness 2006].

III.3.1 Organisation structurale

L'organisation du SNE ainsi que le rôle et le fonctionnement du SNE est semblable à ceux du SNC en plusieurs points. Ils contrôlent tous les deux plusieurs systèmes et ont des fonctions complexes intégrées à la fois sensorielles et motrices. Ces deux systèmes sont organisés en ganglions composés de neurones fonctionnels [Hansen 2003]. Les

mécanismes synaptiques sont multiples et font appel à plusieurs formes moléculaires de neurotransmission, neuromodulateurs et neurotransmetteurs [Jackie D. Wood 2011].

Les corps cellulaires du SNE sont regroupés en petits ganglions connectés entre eux par

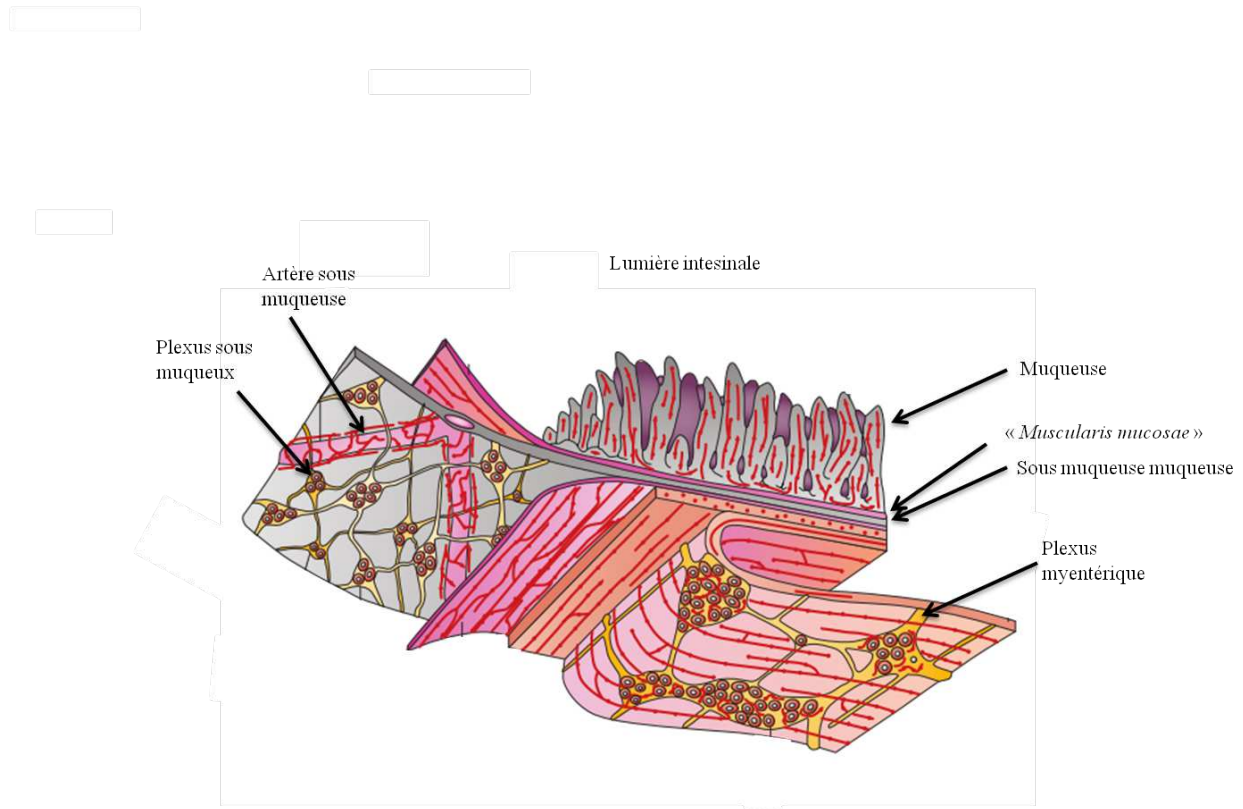


FIGURE III.12 – Schéma représentatif du Système Nerveux Entérique de l'intestin grêle (modifié de [Furness 2012]).

des fibres interganglioniques formant 2 plexi majeurs, le myentérique et le sous muqueux Fig III.12.

- Le plexus myentérique : aussi appelé plexus d'Auerbach, il est organisé en 2 dimensions. Situé entre la couche longitudinale et circulaire de la musculature, il a une forme variable en fonction des espèces et des segments étudiés. On distingue 3 parties entrelacées, le plexus primaire, secondaire et tertiaire. L'innervation intrinsèque de la muqueuse vient en quasi-totalité du plexus myentérique

- Le plexus sous-muqueux : situé dans la sous muqueuse, il est lui-même divisé en 2 plexi :

- o Le plexus de Meissner du côté séreux de la musculature muqueuse

- o Le plexus de Schabadasch, adjacent à la paroi luminale de la couche musculaire

circulaire.

Les 2 systèmes fonctionnent de manière coordonnée grâce à des interconnexions et, chez l'homme, un troisième plexus intermédiaire est décrit. Les villosités et les cryptes de Lieberkhün de la muqueuse sont largement innervées par les neurones myentériques et sous muqueux.

III.3.2 Fonctions du SNE

Le SNE contrôle la motilité intestinale à l'exception de la défécation qui est gérée par le SNC. Il contrôle également les sécrétions exocrines et endocrines ainsi que la microcirculation sanguine. Il est aussi impliqué dans la régulation des processus inflammatoires et immunitaires [Furness 2012] [Jackie D. Wood 2011].

Bien qu'indépendants, le SNC a une action motrice sur le SNE et, en retour, le SNE renvoie un signal sensoriel au SNC. La communication entre le SNE et le SNC est donc bidirectionnelle grâce aux nerfs extrinsèques (vagal et mésentérique) [Epstein 1996].

III.3.3 Types neuronaux

Les types neuronaux sont définis par la morphologie de leur corps cellulaire, leur fonction, leur projection ainsi que les neurotransmetteurs qu'ils produisent Fig III.13.

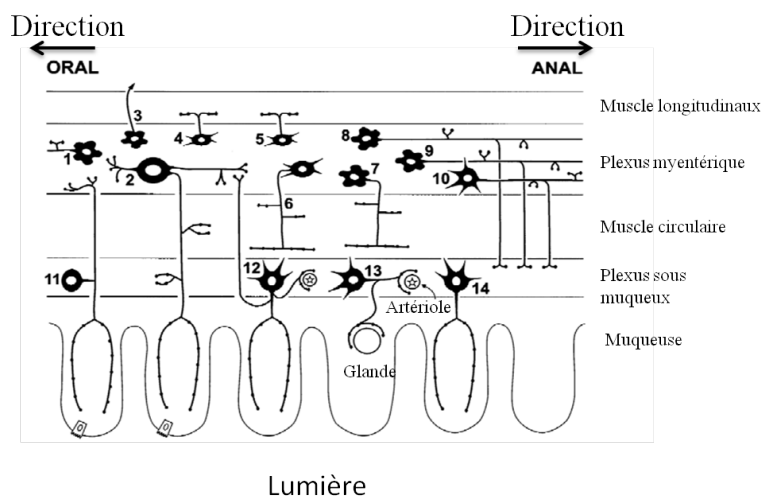


FIGURE III.13 – Schéma représentatif des différents types de neurones existants dans l'intestin grêle du cobaye (modifié [Furness 2000]).

Numéro	Type de neurone	Localisation	Morphologie	Proportion	Type de neurotransmetteurs
	Neurones myentériques				
1	Inteneurone ascendant	MP	I	5%	ChAT/Calret/TK/ (ENK/ NFP/ SP)
2	IPAN myentérique		II	13% à 26%	ChAT/ Calb/ TK /Récepteur Nk ₃ (SP/NMU)
3	Neurone intestino-fugal		I	<1%	VIP/ ChAT/ CGRP/ NPY/ NMU/ CCK/ CGRP/SOM/ Dyno
4	Neurone moteur excitateur des muscles longitudinaux		I	25%	ChAT/ Calret/ (SP)/ TK
5	Neurone moteur inhibiteur des muscles longitudinaux		I	2%	VIP/NOS/(NPY)/GABA
6	Neurone moteur excitateur des muscles circulaires		I	12%	ChAT/ SP/ENK/NFP/GABA/AP/ TK
7	Neurone moteur inhibiteur des muscles circulaires		I	15%	VIP/NOS/NFP/ENK/GRP/AP/ GABA/AP/ NPY/PACAP
8	Inteneurone descendant (reflex local)		I	5%	ChAT/NOS/VIP/NPY/BN
9	Inteneurone descendant (reflex sécrétomoteur)		I	2% à 20%	ChAT/ 5-HT
10	Inteneurone descendant (MMC)		FIL	4%	ChAT/ SOM
	Neurones sous-muqueux				
11	IPAN sous muqueux	SMP	II	4% à 11%	ChAT/ Calb/(SP/NMV)/ TK
12	Neurone non cholinergique sécrétomoteur/ vasodilatateur		FIL	45%	VIP/Gal/(Dyno/NMU)
13	Neurone cholinergique sécrétomoteur vasodilatateur		FIL	12%	ChAT/ Calret
14	Neurone cholinergique sécrétomoteur		FIL	29% à 33%	(Gal)/ Dyno/ ChAT/ NPY/ NMU/ CCK/CGRP/SOM

Liste des abréviations:

AP: endogenous Alcalin Phosphatase
 BN: Bombesin
 Calb: Calbindin
 Calret: Calretinin
 CCK: Cholecystokinine
 ChAT: Choline Acetyltransferase
 Dyno: Dynorphin
 ENK: Enkephalin
 FIL: morphologie filamenteuse

GABA: Gamma Amino Butyric Acid
 Gal: Galanin
 GRP: Gastrine Related Peptid
 MP: Myenteric Plexus
 NFP: Neurofilament protein
 NK: Neurokinin
 NMU: Neuromedin U
 NOS: Nitric Oxyde Synthase
 NMU: Neuromedin U
 NOS: Nitric Oxyde Synthase

NPY: Neuropeptide Y
 PACAP: Pituitary Adenyllyl Cyclase Activating Peptide
 SOM: Somatostatin
 SMP: SubMucosae Plexus
 SP: Substance P
 TK: Tachykinin
 VIP: Vasoactive Intestinal Peptid
 5-HT: 5- Hydroxytryptamine
 I: Dogiel de type I
 II: Dogiel de type II
 () moindre quantité

FIGURE III.14 – Tableau synthétisant les différents types de neurones, leur localisation dans la barrière intestinale, leur morphologie, leur occurrence dans la barrière intestinale, ainsi que les principaux types de neurotransmetteurs qu'ils produisent. Les chiffres correspondent aux neurones identifiés dans le schéma FigIII.13[Broos 2001], [Furness 2004].

III.3.3.1 Morphologie

Selon la classification de Dogiel en 1899, la majorité des neurones présents dans le SNE sont de type I et II.

- Les neurones de type I ont un corps cellulaire, plusieurs petites extensions (neurites) et une longue extension (l'axone) qui peuvent se projeter sur de longues distances (2/3 cm). Les neurones se projetant en direction anale sont des neurones musculomoteurs et ceux en direction orale, sont des neurones excitateurs musculomoteurs qui libèrent la substance P et

l'acétylcholine (Ach) aux jonctions neuromusculaires [Jackie D. Wood 2011].

- Les neurones de type II sont les neurones les plus proéminents dans les ganglions myentériques et sous-muqueux. Ils sont présents dans l'intestin grêle et le colon mais sont peu représentés dans l'estomac. Leurs neurites sont plus longs que les neurites des neurones de type I [Jackie D. Wood 2011]. Majoritaires dans le plexus myentérique, ils ont des extensions dans la muqueuse et la sous-muqueuse. Ils sont impliqués dans le stade précoce de l'information sensorielle et libèrent de la substance P, de l'Ach et de la calbindine.

Durant les 20 dernières années, des neurones de types V, VI, et VII ont été décrits en plus des 3 premiers types décrits par Dogiel mais ne sont que très faiblement représentés dans l'intestin.

III.3.3.2 Définition fonctionnelle des neurones entériques

On distingue les motoneurones, les interneurones, les neurones primaires afférents intrinsèques (IPAN Intrinsic Primary Afferent Neuron) appelés sensoriels, les neurones intestinaux fugaux (IFANs Intestinofugal afferent neurones) et les cellules de Cajal.

III.3.3.2.1 Les motoneurones

Les motoneurones innervent les muscles lisses de l'œsophage, de l'estomac, de l'intestin grêle, du colon et de la vésicule biliaire de façon directe ou indirecte. Ils peuvent être inhibiteurs par libération de transmetteurs de types NO (nitric oxide), VIP (Vasoactive intestinal polypeptide), ATP (Adenosine TriPhosphate), ou excitateurs avec comme neurotransmetteurs l'Ach et la tachykinine. Ils innervent également les muscles lisses longitudinaux et circulaires et la "muscularis mucosae" (numéro 4, 5, 6 et 7 sur Fig III.13 et Fig III.14)

Les motoneurones de la musculaire muqueuse sont excitateurs ou inhibiteurs. Ils sont de 3 types :

- Les neurones sécrétomoteurs/ vasodilatateurs non cholinergiques qui ont des extensions dans les villosités. Ils innervent les glandes de Lieberkhün et les artérioles dans la sous-muqueuse. Ces neurones ont comme neurotransmetteur VIP (numéro 12 sur Fig III.13 et Fig III.14)

- Les neurones sécrétomoteurs/ vasodilatateurs cholinergiques qui n'innervent que la base des villosités, les glandes de Lieberkhün et les artérioles (numéro 13 sur Fig III.13 et Fig III.14)

- Les neurones sécrétomoteurs cholinergiques qui innervent les villosités et les glandes de Lieberkhün mais pas les artérioles (numéro 14 sur Fig III.13 et Fig III.14).

III.3.3.2.2 Les interneurones

Les interneurones entériques sont généralement des neurones Dogiel de type II. On distingue 2 types d'interneurone qui forment des interconnexions importantes entre eux pour la propagation de l'information [Hansen 2003].

- Les interneurones ascendants, impliqués dans les réflexes locaux (numéro 1 sur Fig III.13 et Fig III.14)
- Les interneurones descendants, qui ont comme neurotransmetteurs l'Ach et la SOM (Somatostatine) (numéro 8, 9 et 10 sur Fig III.13 et Fig III.14).

III.3.3.2.3 Les IPANs (Intrinsic Primary Afferent neurons)

Les IPANs appelés sensoriels, sont des neurones Dogiel de types II au corps cellulaire multipolaire. Les IPANs représentent 10 à 30% des neurones dans la glie sous-muqueuse et myentérique de l'intestin grêle et du colon (numéro 2 et 11 sur Fig III.13 et Fig III.14).

Ces neurones sont les initiateurs des réflexes entériques. Ils jouent des rôles de mécanorécepteurs et nocicepteurs et permettent une réponse spécifique aux stimuli en termes d'intensité, durée et de profil du stimulus des contractions des muscles lisses.

Le 5-HT (5- hydroxytryptamine, sérotonine), est un puissant stimulant des terminaisons nerveuses des IPANs ainsi qu'un intermédiaire des réflexes entériques [Furness 2012].

III.3.3.2.4 Les IFANs (Intestinofugal Afferent Neurons)

Les IFANs ont leur corps cellulaire dans le plexus myentérique et se prolongent dans le ganglion pré-vertébral où ils forment des synapses avec les neurones sympathiques post ganglionnaires. Ce sont des inhibiteurs de motilité et des sécrétomoteurs.

Ces neurones gèrent les réflexes entéro-entériques initiés par l'intestin et agissent sur l'estomac ou sur l'intestin en retour (numéro 3 sur Fig III.13 et Fig III.14).

La majorité des IFANs ont une morphologie Dogiel type I, sont cholinergiques et sont immunoréactifs pour VIP. Les neurones activés par les IFANs sont des neurones sympathiques inhibiteurs de l'activité des neurones moteurs et sécrétoires de l'intestin. Ces réflexes sont indépendants du SNC.

III.3.4 Relation SNE et cellules entéroendocrines

Les cellules entéroendocrines ont une place stratégique dans la muqueuse pour percevoir le contenu chimique de la lumière intestinale et sécréter des médiateurs pour l'activation des terminaisons nerveuses afférentes dans la lamina propria. Les neurotransmetteurs majeurs

sont la CCK (cholécystokinine), la sécrétine, la somatostatine et le 5-HT (sérotonine), essentiels dans l'activation des réflexes sécrétoires et du péristaltisme [Jackie D. Wood 2011].

Dans l'intestin grêle, le faisceau de muscle lisse appartenant à la "muscularis mucosae" fait intrusion dans le core de la villosité. Bien que ces fibres passent à proximité des cellules entéroendocrines, la relation entre les cellules entéroendocrines et le SNE n'est pas claire [Furness 2012].

III.3.5 Exemple du reflex péristaltique

Le péristaltisme, ou motricité spontanée, est le résultat d'une série de réflexes locaux en réponse à un stimulus local comme le passage du chyme ou un changement d'acidité. Ce réflexe fait intervenir des neurones excitateurs (neurotransmetteurs Ach, Substance P, Neurokinine A) et inhibiteurs (VIP, NOS...) mais également des interneurons pour relayer l'information. Lors du passage du bol alimentaire, une contraction va s'effectuer au dessus du stimulus intraluminal et les muscles en dessous du stimulus vont se relaxer.

Cette série de contractions/ décontractions est possible grâce aux neurotransmetteurs produits par les différents types des neurones présents dans l'intestin. Le stimulus muqueux va activer les neurones sensoriels en stimulant la libération de 5-HT par les cellules entéroendocrines. Ceci va agir sur les récepteurs 5-HT₄, localisé sur les terminaisons nerveuses sensorielles, et va stimuler les IPANs [Grider 2003].

En direction orale, au dessus du site de stimulus, les interneurons ascendants cholinergiques transmettent le signal aux neurones moteurs excitateurs qui contiennent l'Ach et la substance P. Il en résulte une contraction de la couche musculaire située au dessus du stimulus Fig III.15.

En direction anale, en dessous du stimulus, les interneurons cholinergiques descendants activent les neurones moteurs inhibiteurs qui libèrent NOS, VIP et ATP ce qui entraîne une relaxation des muscles. Les forces résultantes propulsent le bol en direction anale ([Epstein 1996]). Cette force appelée onde péristaltique a une durée de vie de 8 à 9 secondes. Elle permet la progression du bol alimentaire du pharynx jusqu'au rectum.

Associées à l'innervation intrinsèque de la paroi, des cellules musculaires appelées cellules interstitielles de Cajal participent fortement au péristaltisme. Ces cellules sont essentiellement retrouvées au niveau de la musculature, principalement dans la longitudinale externe et ont une rythmicité contractile autonome à la manière d'un pacemaker. Elles permettent de relayer en partie l'information aux muscles grâce à leur récepteurs aux neurotransmetteurs inhibiteurs et excitateurs [Kunze 1999].

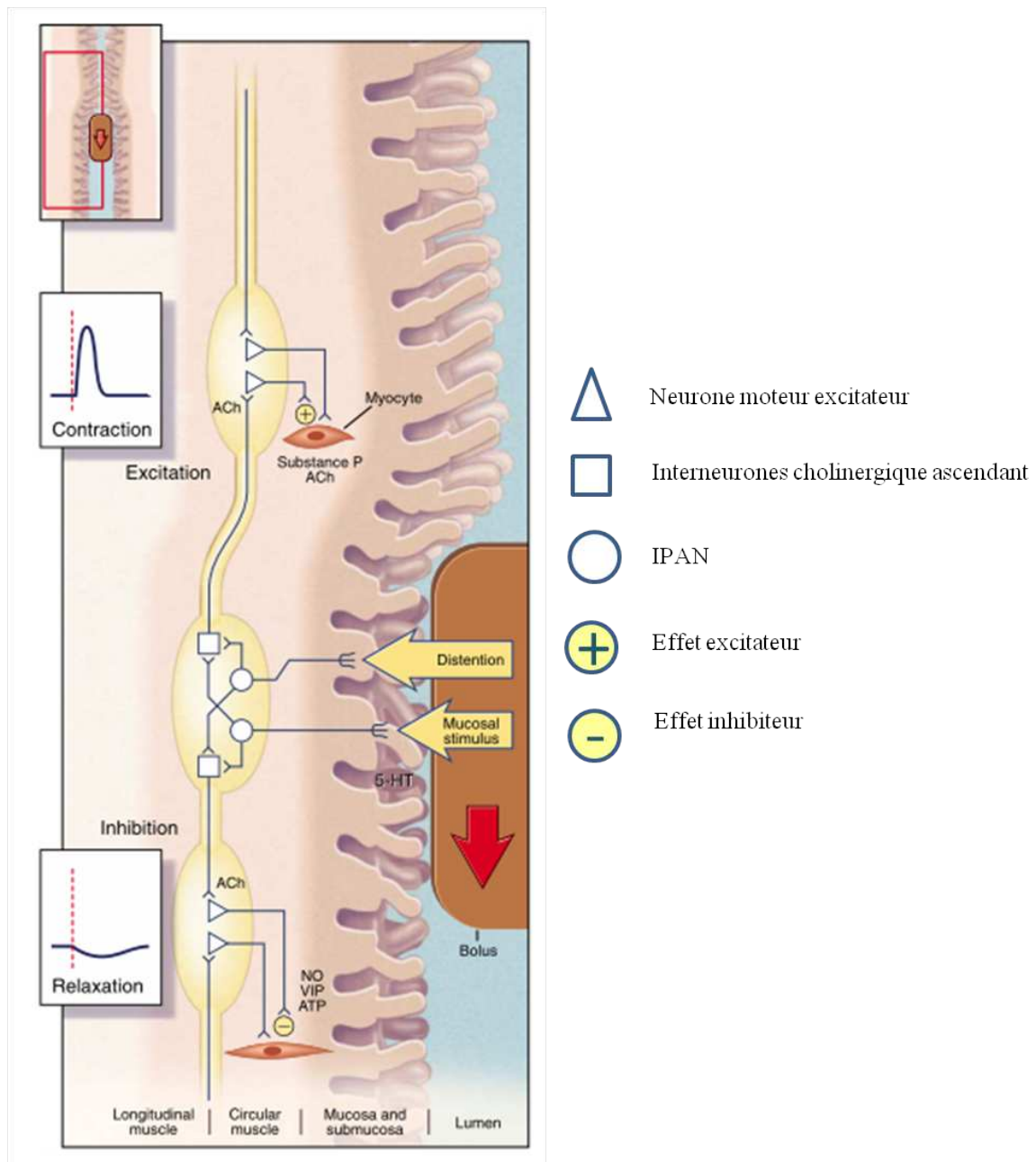


FIGURE III.15 – Schéma du mécanisme d'action du SNE lors du péristaltisme (modifié de [Epstein 1996]).

III.4 Les toxines et la barrière intestinale

III.4.1 Microbiote intestinal et régulation par les cellules de Paneth

Le microbiote intestinal représente 1 trillion de micro-organismes qui colonisent notre tractus digestif, la plupart du temps de façon symbiotique. Il prend une place importante notamment dans la dégradation des nutriments non digérables par les enzymes endogènes, mais également dans l'homéostasie. Il permet également la maturation et la régulation du système immunitaire muqueux et intervient dans la résistance de la microflore résidente face à la colonisation de microorganismes étrangers.

La composition du microbiote intestinal est plus importante que le nombre des micro-organismes qui le compose. Deux phylums dominant. On retrouve le groupe des firmicutes (Gram+) et le groupe des bacteroidètes (Gram-) moins abondant. La composition est très variable durant les premiers mois de la vie mais se stabilise vers la fin de la première année. Malgré cela, la composition génétique bactérienne, le métagénome, varie selon les individus. On retrouve toutefois un "métagénome intestinal minimal" chez tous les individus.

Les cellules de Paneth jouent un rôle clé dans l'homéostasie du microbiote. Elles permettent la mise en place et le maintien du microbiote intestinal. Ces cellules sont responsables de la sécrétion de défensines qui ont une activité antimicrobienne, antifongique ou antivirale et peuvent également agir contre les protozoaires. La production de ces défensines est un processus contrôlé par la voie des Toll Like Receptor (TLR).

Les cellules de Paneth ont un effet trophique sur les cellules CBC de l'intestin. Il est donc possible que la composition du microenvironnement intestinal ait un effet sur la composition et l'abondance relative des types cellulaires dans l'intestin.

III.4.2 Les entérotoxines

Les entérotoxines sont des toxines ayant une activité sélective pour la muqueuse intestinale. Les entérotoxines reconnaissent différentes cibles et agissent de façon variée et développent divers modes d'interaction avec la barrière intestinale et, indirectement, avec le SNE [Fasano 2002].

Compte tenu de la grande diversité des entérotoxines et de leur mode d'action, plusieurs classifications sont possibles Fig III.16. Une première classification se base sur la différenciation des toxines agissant directement au niveau de l'épithélium intestinal de celles utilisant l'épithélium comme voie d'entrée pour rejoindre leurs cellules cibles situées à

Toxine active au niveau de la muqueuse intestinale	Active à la surface de la cellule	Formation de pore	
		Action sur les jonctions intercellulaires	
	Activité intracellulaire	Cytosquelette d'actine	
		Cible la voie GMPc	
		Cible la voie AMPc	
		Cible la voie du calcium	
	Active au niveau de la synthèse protéique	Activation de la synthèse protéique	
Inhibition de la synthèse protéique			
Toxine active à distance de la muqueuse intestinale	Toxines émétiques		
	Neurotoxines		
	Autre		

FIGURE III.16 – Classification générale des entérotoxines et toxines utilisant la barrière intestinale comme cible ou voie d'entrée dans l'organisme. H, Homme, A, Animal.

distance. Certaines neurotoxines telles que l' α toxine de *C. perfringens* ou les neurotoxines botuliques de *C. botulinum*, utilisent la barrière intestinale uniquement comme voie d'entrée dans l'organisme pour rejoindre leur cible neuronale. D'autres agissent *in situ* comme la toxine émétique céréulide de *B. cereus* qui agit soit directement sur les terminaisons nerveuses des neurones afférents sensoriels du nerf vague soit par induction de la libération de 5-HT par les cellules entérochromaffines [Popoff 2010]. Cependant, certaines toxines comme la LLO (listerolysin O) de *L. monocytogenes* peuvent agir *in situ* mais également à distance et produire des effets systémiques sur l'organisme.

Une autre classification consiste à regrouper les toxines en fonction de l'espèce qui la produit. Plusieurs Clostridies sont impliquées dans la production d'entérotoxines à fort pouvoir pathogène et produisent un grand nombre de toxines différentes comme *C. difficile* ou *C. perfringens* à actions variées.

Une classification en fonction de leur cible cellulaire et de leur activité sur ces cibles est également possible. On distingue alors les toxines pouvant agir à la surface cellulaire, par la formation de pore ou en déstabilisant les jonctions intercellulaires, et les toxines ayant une activité intracellulaire par transduction du signal à travers la membrane cellulaire.

Certaines entérotoxines agissant à la surface des cellules, forment des pores, comme la

CPE (*C. perfringens* enterotoxin) de *C. perfringens* ou agissent sur le cytosquelette d'actine pour perturber les jonctions intercellulaires, comme les toxines glycosyltransférases A et B de *C. difficile* (TcdA et TcdB) ou C2 de *C. botulinum*. TcdA et TcdB utilisent l'UDP glucose comme substrat pour inactiver les membres de la famille Rho par monoglycosylation [Jackie D. Wood 2011]. La toxine létale de *C. sordelli* fonctionne aussi comme une UDP glycosyltransférase et inactive Ras, Rap, Rac et Cdc42 qui sont des membres de la famille des petites Rho/ Ras GTPases fortement impliquées dans le maintien et la plasticité du cytosquelette d'actine (voir chapitre IV) .

Il en va de même pour la toxine C2 de *C. botulinum* qui modifie l'actine monomérique et C3 qui inactive Rho. Ces toxines induisent une dépolymérisation de l'actine soit par action directe sur les monomères d'actines (actine G) soit par action sur les protéines qui régulent la polymérisation des filaments d'actine. C'est le cas de la toxine EAST1 produite par les EAaggEC (EnteroAggregative *E. coli*) qui se lie à l' α fodrine. D'autres peuvent remplir les 2 fonctions, c'est le cas de la CDT (*C. difficile* Transferase) de *C. difficile*.

Un des symptômes couramment rencontré dans le cas d'intoxication par des entérotoxines est la diarrhée. En effet, l'intestin est spécialisé dans le contrôle de l'homéostasie de l'eau et des électrolytes grâce aux entérocytes. En effet, chaque jour, plus de 2 volumes du sang traversent la surface épithéliale de la muqueuse et un dérèglement de ces mouvements, notamment dû à la présence de pathogènes et de toxine, peut être fatal. ([Furness 2012]).

Les entérocytes sont les cibles cellulaires privilégiées des entérotoxines et certaines agissent en intracellulaire sur différentes voies de signalisation.

Certaines entérotoxines ciblent la voie AMPc (Adénosine MonoPhosphate cyclase) des entérocytes. C'est le cas de 2 toxines structurellement et fonctionnellement proches, l'entérotoxine CT de *V. cholerae* ou encore les heat Labile Toxin (LT) produites par les ETEC (EnteroToxinogenesis *E. coli*). Ces entérotoxines activent la voie AMPc induisant une sécrétion importante d'eau et d'électrolytes provoquant des symptômes allant de la diarrhée au choléra [Popoff 2010] [Jackie D. Wood 2011]. D'autres stimulent la voie GMPc (Guanosine MonoPhosphate cyclase), ce qui entraîne une ouverture des canaux chlore et une fuite important d'eau et d'électrolytes dans la lumière intestinale. C'est le cas de EAST1 et des STa et STb (heat Stable Toxin) de *E. coli*. La voie du calcium peut être également la cible de ces entérotoxines bien que leur action ne semble être qu'indirecte. C'est le cas des ToxA et ToxB de *C. difficile* ou la TDH (Thermostable Direct Haemolysin) de *Vibrio paraharmolyticus*. Cette dernière induit une augmentation de la quantité de Ca^{2+} dans les érythrocytes produisant un choc osmotique et une lyse de la cellule.

Les entérotoxines peuvent également induire ou inhiber la synthèse protéique. L'exemple le plus connu est l'activation des cellules T présentatrice d'antigènes par les entérotoxines de *S. aureus* qui provoque une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoire. On appelle ces toxines des super antigènes. D'autres à l'inverse, inhibent la synthèse protéique par activité RNase sur l'ARN ribosomal, comme les Shiga toxin ou la cholix de *V. cholerae*. Enfin, certaines bloquent le cycle cellulaire en agissant sur le facteur d'élongation EF2, bloquant ainsi la cellule au stade G2/M. C'est le cas des STX (Shiga like toxin) produites par les EHEC (Entero Hemorragic *E. coli*) ou la CDT (Cytolethal Distending Toxin) des ETEC (EnteroToxigenic *E. coli*) qui a une activité DNase. Un dernier classement en fonction du site de production de ces toxines peut également être établi. Certaines intoxications dites alimentaires, résultent de l'ingestion de toxines préformées dans l'aliment. C'est le cas des neurotoxines botuliques ou des entérotoxines de staphylocoque et la toxine émétique de *B. cereus*. Toutefois, certaines toxines peuvent être produites *in situ* au cours de la multiplication bactérienne dans la lumière intestinale ou après colonisation de la muqueuse intestinale. Certaines bactéries expriment des facteurs d'adhérence (pili, fimbriae) qui permettent l'attachement de la bactérie à la bordure en brosse. Il y a alors éviction de la microflore inhibitrice et colonisation de la surface de la muqueuse (c'est le cas de *V. cholerae* et de quelques *E. coli*). Ces bactéries ne sécrètent pas de toxine mais injectent directement leurs toxines dans les cellules grâce à des systèmes de sécrétion.

Une classification de référence est d'autant plus difficile à établir qu'une espèce bactérienne peut produire plusieurs toxines, et qu'une toxine peut agir en surface et en intracellulaire (par exemple VacA de *H. pylori*). D'autres peuvent avoir différentes site de production, comme les neurotoxines botuliques. Le tableau Fig III.16 non exhaustif, donne une vue d'ensemble des principales entérotoxines et toxines utilisant la barrière intestinale comme voie d'entrée dans l'organisme, depuis leur site de production jusqu'à leur cible cellulaire.

Espèce	Noms de la toxine	Cible cellulaire	Activité	Principal symptôme	Espaces	Site de production de la toxine
<i>Clostridium perfringens</i>	CPE	Entérocytes	Formation de pores après oligomérisation	Douleurs abdominales diarrhéiques	H, A	Lumière intestinale
	Net B	Cellule épithéliale de l'intestin	Nécrose cellulaire	Entérites nécrosantes	A (oiseaux)	
	s toxines	Cellules endothéliales, neuronales et rénale		Symptômes neurologiques (excitation) et entérotoxémie (choc toxique)	A (surtout les moutons)	
	β toxines	Entérocytes et cellules endothéliales		Entérites hémorragiques	H, A	
<i>Vibrio cholerae</i>	Cytolysin	Cellule épithéliale de l'intestin	Augmentation de la perméabilité, vasculisation, nécrose	Gastro-entérite et bactériémie pour les bactéries à G+	H	Lumière intestinale après colonisation de l'épithélium
<i>Clostridium difficile</i>	CDT	Entérocytes	ADP ribosylation de l'actine	Diarrhée associée aux antibiotiques (AAD)	H	Lumière intestinale
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	La toxine TDH (Thermolabile Direct Haemolysin)	Entérocytes et érythrocytes	Nécrose, augmentation de Ca^{2+} dans les érythrocytes	Diarrhée gastro-entérite, douleur abdominale	H	Aliment
<i>Helicobacter pylori</i>	VacA	Cellules gastriques	Forme de vacuoles cytoplasmiques.	Ulcère gastrique	H	Lumière intestinale après colonisation de l'épithélium
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Aerolysin	Entérocytes et autres cellules eucaryotes	Cytolytique par cible les GPI anchored protein	Douleur abdominale diarrhéique	H	Lumière intestinale
<i>C. repticum</i>	α toxin de septicum		Nécrose, cible les GPI anchored protein	Entérites hémorragiques	H	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Listeriolysin O	Entérocytes, cellules endothéliales et lymphocytes	Cytolytique	Symptômes systémiques	H, A	Épithélium intestinal après invasion
<i>Staphylococcus aureus</i>	Toxine δ	Entérocytes		Nausée, douleur abdominale, vomissement	H	Aliment
<i>E. cereus</i>	<i>B. cereus</i> enterotoxine			Douleurs abdominales, diarrhées	H	
<i>Clostridium difficile</i>	Les toxines A et B		Perturbe les filaments d'actines au pôle basal et apical	Diarrhée, colite pseudomembraneuse	H, rarement A	
<i>Clostridium perfringens</i>	CPE	Entérocytes et autres cellules eucaryotes	Altération des jonctions intercellulaires par liaison aux occludines	Douleur abdominale diarrhéique	H, A	Lumière intestinale
<i>Bacteroides fragilis</i>	Fragylisin		Dégradation de la E-cadherine	Diarrhée	A (agneau), H	
<i>V. cholerae</i>	Zot		Augmentation de ZO-1 dépendant de la PKC α et de phosphorylation de la myosine 1C entraînant l'inversion des jonctions serrées	Diarrhée déshydratante	H	Lumière intestinale après colonisation de l'épithélium

		CDT	Entérocytes et autres cellules eucaryotes	ADP-ryboosylation de l'actine G Formation de pronuson	Diarrhée associée aux antibiotiques (AAD)	H	Lumière intestinale
Cytosquélète d'actine	<i>Clostridium difficile</i>		Entérocytes et autres cellules eucaryotes			H	
	<i>E. coli</i>	La CNF 1 et 2 (Cytotoxic necrosing factor 1)	Entérocytes et autres cellules eucaryotes	Activation des RhoGTPases par désamination. Augmentation de la polymérisation de l'actine et multinucléation	Diarrhée, CNF1 entérite	H, A	
	<i>E. coli enterohaégurative EaggEC</i>	EAST1 EnteroAggrégative thermostable	Entérocytes	Protéolyse de la α -fofnin (protéine liée à l'actine)	Diarrhée, entérite	H	Lumière intestinale
	<i>Clostridium difficile</i>	Les toxines A et B		Glucosylation des Rho-GTPases, cdc42 et Rac cytolytique	Diarrhée, colite pseudomembraneuse	H, rarement A	
	<i>Clostridium sordéili</i>	La toxine de LT	Entérocytes et autres cellules eucaryotes	Dépolymérisation de l'actine, activation des rho GTPases par glucosylation (RhoG, Rac, famille Ras). Mort cellulaire. Inhibe la réponse inflammatoire	Entérite, entérite hémorragique, entérotoxiémie, gangrène	H, rarement A	
	<i>Clostridium botulinum</i>	Les toxines C2 et C3 de <i>Clostridium botulinum</i>		Dépolymérisation de l'actine, cytotylique	Entérite nécrotique et hémorragique	H, A	Aliment ou lumière intestinale
	<i>E. coli enterohaégurative EaggEC</i>	EAST1 EnteroAggrégative thermostable				H	
	<i>E. coli</i>	La STa et STb de <i>E. coli</i> (Heat Stable)		Ouverture des canaux chlorures, augmentation d'eau et de sels dans la lumière intestinale	Diarrhée	H	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Les YST I et YST II			Castro-entérite fébrile	H, A	Lumière intestinale
	<i>Vibrio cholerae</i>	ACE	Entérocytes		Diarrhée	H	
Cible la voie AMPc	<i>Vibrio cholerae</i>	La CT (cholera toxin)			Diarrhée, déshydratation	H	
	<i>E. coli (Vibrio, Yersinia)</i>	Heat labile enterotoxin <i>E. coli</i> LT1 LT2		Activation de l'adénylate cyclase, augmentation de cAMP, active la sécrétion d'électrolytes et d'eau	Diarrhée	H	
	Genre Salmonella	Les entérotoxines du genre <i>Salmonella</i>			Diarrhée, déshydratation	A, H	Aliment
	<i>Campylobacter jejuni</i>	L'entérotoxine de <i>Campylobacter jejuni</i>			Maladies extraintestinales	H, A	Lumière intestinale après colonisation de l'épithélium
	<i>Helicobacter pylori</i>	VacA	Cellules gastriques	Provoque la libération de cytochrome c par les mitochondries, induit l'apoptose	Ulcère gastrique	H	
	<i>Clostridium difficile</i>	Les toxines A et B	Entérocytes et autres cellules eucaryotes	Augmentation des protéines calmodulin-like et calcineurin-B-like.	Diarrhée, colite pseudomembraneuse	H, rarement A	Lumière intestinale
Cible la voie du calcium	<i>Vibrio parahaémolyticus</i>	La toxine TDH (Thermostable Direct Haemolysin)	Entérocytes	Augmente la quantité de Ca ²⁺ dans les érythrocytes	Diarrhée, gastro-entérite, douleurs abdominales	H	Aliment
	Toxines marines produites par des dinoflagellés	Les ciguatoxines			Diarrhée, nausées, vomissement	H, A	Aliment (poisson)

Active au niveau de la synthèse protéique	<i>E. coli</i> EAggEC	EAST1 EnteroAggregative thermostable	Entérocytes	Active la synthèse de cytokines pro-inflammatoire	Diarrhée	H	Dans la lumière gastrique ou intestinale après colonisation de l'épithélium	Entérocytes	Cellules T présentatrice d'antigènes, cellules entérochromaffines et nerfs vagues.	Enterotoxine, proapoptotique par activation des cellules T. Activation et sécrétion de cytokine. Entraîne un choc toxique	Gastro-entérite	H, A	Alimentation et production dans lumière intestinale
								Autre SE					
Inhibition de la synthèse protéique	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	SEA, SEC2 et SEC3	Entérocytes	Elongation des cellules et arrêt de la division cellulaire en G2/M (car cdc-42 n'est pas phosphorylé. Agit grâce à un double brin d'ADN et l'activité DNase I)	Entérites	H, A	Dans la lumière gastrique ou intestinale après adhérence aux cellules épithéliales	Cytotoxine distanding toxines CDT					
								Cholix					
	<i>Vibrio cholerae</i> <i>Shigella</i> sp	Shiga toxin STX	Entérocytes et autres cellules eucaryotes	Inhibition de la synthèse protéique par activité RNAase. Mort cellulaire	Entérites? Diarrhée	H	Épithélium intestinal après invasion						
								SLT1 et SLT2 (Shiga Like Toxin) ou Vero toxin					
Toxines émétiques	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus cereus</i>	Les toxines SEA et SEB	Cellules T présentatrice d'antigènes, cellules entérochromaffines et nerfs vagues.	Augmente la libération de 5-HT	Nausée vomissement	H, A	Aliments						
								La toxine Céréulide					
Neurotoxines	<i>Clostridium perfringens</i> <i>Clostridium botulinum</i>	e toxin	Cellules endothéliales, neuronales reinales	Formation de pore et nécrose cellulaire	Symptômes neurologiques (excitation) et entérotoxémie choc toxique	H	Lumière intestinale						
								Neurotoxines botuliques					
Autre	<i>Listeria monocytogenes</i>	Listeriolysin O	Terminaisons nerveuses	Inhibition de la libération d'acétylcholine par protéolyse des protéines SNARE	Symptômes neurologiques, paralysies	H, A	Épithélium intestinal après invasion						
								Entérocytes, cellules endothéliales et lymphocytes					

Passage des neurotoxines botuliques à travers la barrière intestinale

Sommaire

IV.1 Site d'absorption préférentiel des BoNTs	88
IV.2 Effet de la taille des complexes et rôle des NAPs (Non toxic Associated Protein)	88
IV.3 Cibles cellulaires intestinales et neuronales	90
IV.4 Les modèles d'entrée des neurotoxines botuliques	90
IV.4.1 La voie d'entrée para-cellulaire	92
IV.4.1.1 Les jonctions intercellulaires	92
IV.4.1.1.1 Les jonctions serrées (TJ)	92
IV.4.1.1.2 Les jonctions adhérentes (AJ)	92
IV.4.1.1.3 Les desmosomes et hémidesmosomes	94
IV.4.1.2 Modèles d'entrée des neurotoxines botuliques par la voie para-cellulaire	94
IV.4.2 La voie d'entrée intracellulaire et transcytose	95
IV.4.2.1 Implication des protéines G.	96
IV.4.2.2 L'endocytose	98
IV.4.2.2.1 L'endocytose dépendante de la clathrine	98
IV.4.2.2.2 Les voies indépendantes de la clathrine	100
IV.4.2.3 La voie endosomale dans les cellules polarisées	106
IV.5 Comparaison de l'entrée des BoNTs dans les cellules intestinales versus cellules neuronales	109
IV.5.1 Le modèle de double récepteur	109
IV.5.1.1 Les gangliosides	109
IV.5.1.2 Les protéines réceptrices	110
IV.5.2 Les voies d'endocytose	113
IV.5.3 Le trafic intracellulaire et modèle de transcytose des BoNTs	114

De nombreuses études ont été réalisées afin de caractériser au mieux les étapes clés et les mécanismes moléculaires impliqués dans le passage des BoNTs à travers la barrière intestinale.

Dans les cas d'une entrée des BoNTs par voie intestinale et respiratoire, les BoNTs doivent traverser les barrières épithéliales pour rejoindre la circulation sanguine et être disséminées dans tout l'organisme pour rejoindre les terminaisons nerveuses où elles exercent leur activité protéolytique sur les protéines SNAREs.

Vu l'extrême toxicité des BoNTs, la principale difficulté est d'arriver à suivre le trajet emprunté à des doses faibles, correspondant aux doses induisant un botulisme dans les conditions naturelles.

IV.1 Site d'absorption préférentiel des BoNTs

Des études chez le lapin et le rat ont montré que les BoNTs sont absorbées à différents endroits du tractus digestif, incluant l'estomac, l'iléon et le colon. Cependant, il semble que la partie haute de l'intestin grêle, le duodénum, soit le site le plus efficace pour l'absorption des BoNTs [Bonventre 1979].

Des essais de colonisation de *C. botulinum* dans le tractus intestinal, ont mis en évidence que son développement est inhibé par la flore commensale et par les antibiotiques. Toutefois, *C. botulinum* est capable de se développer dans la partie basse de l'intestin et de produire des toxines.

Cependant, le colon n'étant pas un site préférentiel d'absorption, aucun symptôme de botulisme n'a été identifié chez ces animaux colonisés [Moberg 1980].

IV.2 Effet de la taille des complexes et rôle des NAPs (Non toxic Associated Protein)

De nombreux essais de contamination par la voie gastro-intestinale ont été réalisés afin de mieux comprendre les mécanismes intervenant dans l'absorption et la dissémination de la toxine dans l'organisme.

Les niveaux d'activité semblent être différents en fonction de l'état dans lequel se trouve la neurotoxine. En effet, l'injection des toxines par voie intraveineuse sous leur forme complexe ou monomérique, c'est-à-dire non associée aux NAPs, montre des différences de toxicité. Administré par voie orale, le complexe 19s de BoNT/A est 358 fois plus toxique que la forme monomérique, la forme 16s, 43 fois plus toxique, et la forme 12s, 12 fois plus toxique

que BoNT/A sous forme monomérique, indiquant que la toxicité augmente avec la taille des complexes [Ohishi 1977] [Kitamura 1969] [Ohishi 1980] [Sugii 1977a]. Une différence de toxicité est également observée entre les types. Par exemple, le complexe 12s de BoNT/B a une toxicité orale supérieure au complexe 19s de BoNT/A suggérant que d'autres facteurs que la taille des complexes sont impliqués dans la toxicité.

Les NAPs sont associés aux BoNTs de façon non covalente. Le complexe se dissocie à un pH supérieur à 7,5 et sont considérés comme stable à pH=6 [Wagman 1953] [Eisele 2010]. Cependant, les complexes 12s et 16s de BoNT/B sont détectés sous forme non dissociée dans du jus intestinal à pH=7 [Sugii 1977a]. Les caractéristiques biochimiques d'association des complexes sont donc variables en fonction des BoNTs.

NTNH semble stabiliser les complexes alors que les HAs semblent protéger les BoNTs contre l'acidité et les protéases.

Bien que la forme monomérique de BoNT/A soit inactivée par la trypsine ou après incubation à pH 3 ou moins, celle-ci devient très résistante lorsqu'elle est associée à NTNHA [Gu 2012]. Structurellement, BoNT/A et NTNHA s'emboitent parfaitement permettant ainsi une protection optimale contre les protéases et l'acidité. De plus, l'association de NTNHA et BoNT est dépendante du pH grâce à des résidus senseurs de pH situés sur NTNHA et sur le domaine Hc permettant de nombreuses interactions intra-complexes et donc une forte stabilité du complexe [Gu 2013]. NTNHA semble donc jouer un rôle prépondérant à la fois sur la protection et sur la stabilité du complexe.

Il en va de même pour BoNT/D et NTNHA/D qui résistent à de fortes quantités de trypsine et de pepsine lorsqu'ils sont sous forme de complexe, alors qu'ils sont rapidement inactivés individuellement [Miyata 2009]. Cependant, HA35 et HA70 du complexe botulique de type A sont résistants à la digestion par les protéases, alors que NTNHA, HA17 et BoNT/A sont facilement dégradés [Couesnon 2006] [Chen 1998] [Arimitsu 2008]. Il existe donc des degrés de protection différents en fonction des HAs.

Le rôle protecteur des HAs est dépendant de la dose administrée. En effet, des études réalisées *in vivo* par injection dans l'estomac de BoNT/A sous forme monomérique ou complexée aux HAs, ont permis de mettre en évidence une toxicité supérieure des complexes de BoNT/A par rapport à la forme monomérique. Cependant, l'importance de cette différence diminue lorsque la dose administrée augmente [Maksymowych 1998]. De plus, après 120 minutes d'exposition à du jus intestinal de rat, les complexes 16s et 19s gardent 60% à 80% de leur activité alors que BoNT/A et BoNT/B individuellement, sont complètement inactivées après 10 minutes. Ces observations sont en accord avec la différence de dose létale observée par voie orale entre l'administration de BoNT monomérique ou sous forme de

complexe [Sugii 1977a]. Les analyses structurales des complexes 16s de BoNT/A et BoNT/B ne montrent aucun contact direct entre BoNT et les HAs ce qui suggère que ces dernières ne jouent pas un rôle direct dans la protection de la toxine [Benfield 2013].

IV.3 Cibles cellulaires intestinales et neuronales

Une étude comparative de lignée cellulaire intestinale a été réalisée sur monocouche cellulaire. Les résultats montrent que les m-ICcl2 (mouse Intestinal Crypt Cell Line 2)[Bens 1996], cellules qui maintiennent un phénotype de cellules de cryptes, sont plus sensibles à BoNT/A que les Caco2, cellules de colon [Coesnon 2009].

Une étude *ex vivo* réalisée avec un fragment Hc de BoNT/A fluorescent (HcA) a pu mettre en évidence que BoNT/A entre préférentiellement dans la barrière intestinale par des cellules situées au fond des cryptes de Liberkhün et plus exactement, par les cellules neuroendocrines entérochromaffines sécrétant la sérotonine [Coesnon 2012]. Ces résultats confirment donc les résultats obtenus sur monocouche cellulaire. Les cellules permettant l'entrée de BoNT/B et BoNT/E ne sont pas encore connues et leur identification représente un des axes de recherche de ce sujet de thèse.

L'étude *ex vivo* a également permis d'identifier les cibles neuronales préférentielles de BoNT/A dans la barrière intestinale. En effet, après 30 à 60 minutes d'incubation de HcA fluorescent avec la barrière intestinale, la majorité des terminaisons nerveuses marquées par HcA sont immuno-réactives pour ChAT. Un faible pourcentage de terminaisons nerveuses sont immuno-réactives pour VIP et les neurones glutamatergiques ainsi que pour les terminaisons sérotoninergiques (moins de 3% des terminaisons nerveuses observées). Cependant, aucun co- marquage n'a été observé avec les cellules gliales [Coesnon 2012]. Ainsi, BoNT/A semble cibler préférentiellement les neurones acétylcholinergiques de la barrière intestinale.

IV.4 Les modèles d'entrée des neurotoxines botuliques

Deux mécanismes sont décrits pour la voie d'entrée des neurotoxines botuliques à travers la barrière intestinale. Une voie d'entrée para-cellulaire faisant intervenir les HAs et une voie d'entrée intracellulaire par transcytose Fig IV.1.

L'utilisation de monocouches cellulaires et la mesure de la TEER (Trans Epithelial Electrical Resistance) sont des techniques couramment utilisées pour caractériser les voies d'entrée des toxines et/ou bactéries à travers une monocouche cellulaire Fig IV.2. Les molécules d'intérêt sont appliquées au compartiment apical des cellules et le taux de

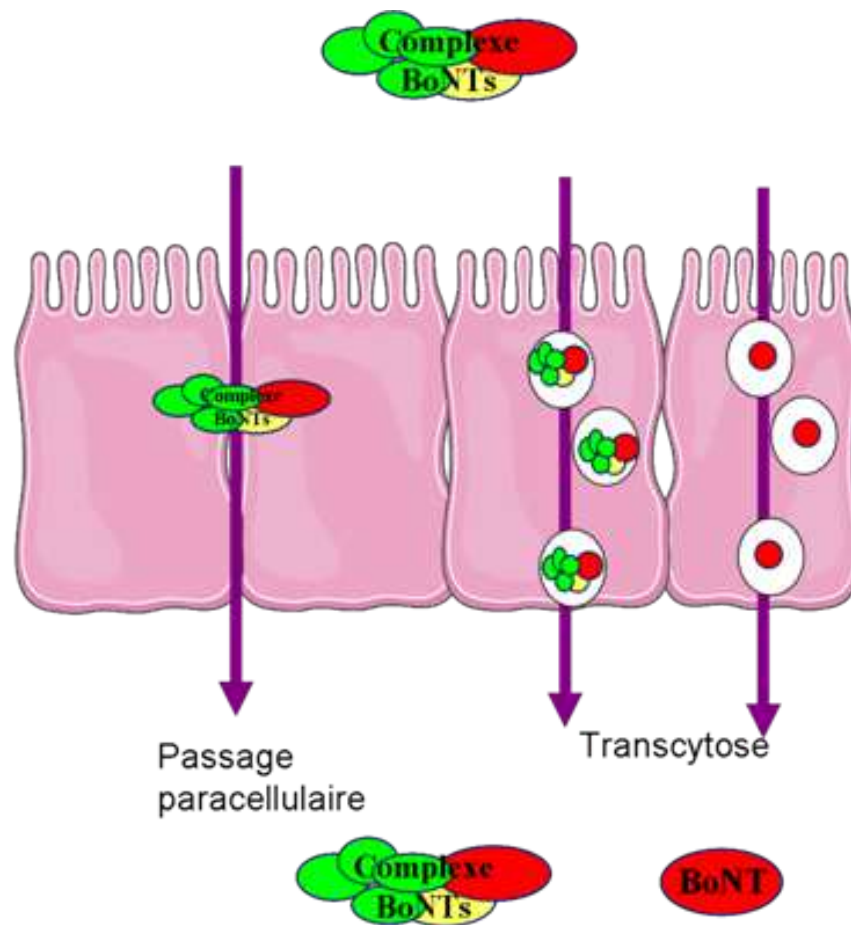


FIGURE IV.1 – Modèles proposés des voies d'entrée des neurotoxines botuliques à travers la barrière intestinale. Il n'est pas encore clairement établi si le complexe transite sous forme de complexe ou si BoNT transite seule à travers la barrière épithéliale.

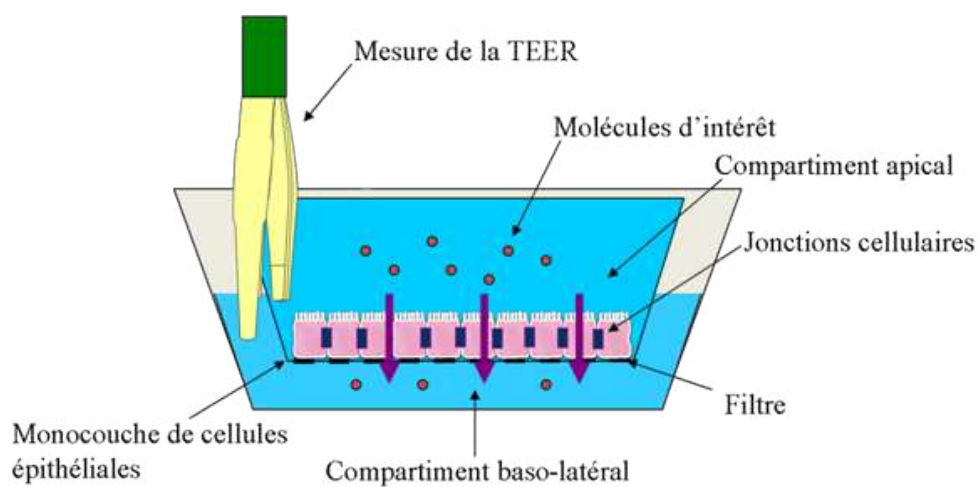


FIGURE IV.2 – Schéma du modèle cellulaire pour l'étude de la transcytose.

transcytose, molécules ayant traversé la monocouche cellulaire, est mesuré après dosage des molécules récupérées au pôle baso-latéral. La TEER permet d'évaluer l'intégrité de la monocouche cellulaire et donc de différencier le passage par voie intracellulaire de la voie para-cellulaire résultant d'une perturbation des jonctions intercellulaires.

IV.4.1 La voie d'entrée para-cellulaire

IV.4.1.1 Les jonctions intercellulaires

L'intégrité de la barrière intestinale est maintenue grâce à la monocouche étanche de cellules permise grâce aux jonctions intercellulaires reliant les entérocytes adjacents. Une augmentation de la perméabilité intestinale peut constituer une voie d'entrée pour les pathogènes et conduire à des inflammations systémiques sévères. Dans les conditions physiologiques, la voie para-cellulaire est imperméable aux grosses molécules de la taille des protéines et constitue ainsi une barrière efficace face aux molécules antigéniques [Keita 2010].

Du pôle basal au pôle baso-latéral, on distingue 4 types de jonctions intercellulaires régulant la perméabilité para-cellulaire Fig IV.3.

IV.4.1.1.1 Les jonctions serrées (TJ)

Les jonctions serrées (TJ, Tight Junction), ou Zonula Occludens, maintiennent l'étanchéité de la couche cellulaire. Elles sont composées d'un réseau de différentes protéines : ZO (Zonula occludens) 1, 2, et 3, d'occludines, de tricellulides, de claudines et de JAM (Junctional Adhesion Molecules). Elles représentent la première barrière entre le milieu externe et interne. Elles ont un rôle important dans la sélectivité des molécules transportées depuis et vers la lumière intestinale (en charge et en taille) mais également dans le maintien de la polarisation des cellules épithéliales empêchant ainsi la diffusion des protéines du pôle apical au pôle baso-latéral.

La CPE de *C. perfringens* est une entérotoxine qui se lie aux claudines 3 et 4, aussi appelées CPE receptors, et aux autres membres de la famille des claudines. CPE se lie par son domaine C terminal, et la partie N terminal forme des pores dans la membrane plasmique diminuant la TEER de plus de 41.3% et entraînant la mort cellulaire [Veshnyakova 2012].

IV.4.1.1.2 Les jonctions adhérentes (AJ)

Les jonctions adhérentes (JA) sont formées de protéines trans-membranaires, les cadhérines E qui s'associent par leur domaine extracellulaire et dont le domaine intracellulaire est relié aux filaments d'actine. Ces jonctions permettent donc de relier les filaments

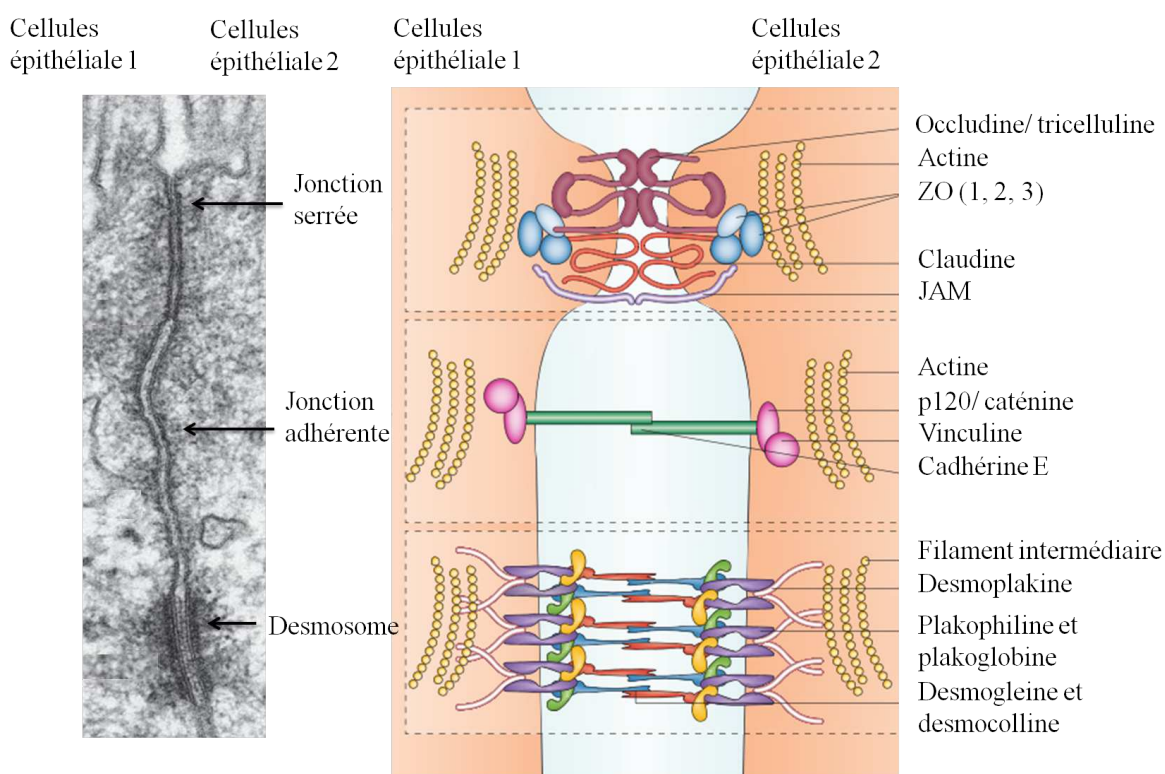


FIGURE IV.3 – Schéma des jonctions intercellulaires intervenant dans le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale (d'après [Neunlist 2013] et [Perez-Moreno 2003]).

d'actine de 2 cellules voisines grâce à un complexe formé de cadherine E, p120, caténine et vinculine. Les cadhérines ont un domaine extracellulaire et intracellulaire qui permet un solide attachement des cellules entre elles. Ce sont des molécules transmembranaires, Ca^{2+} dépendantes, ayant une fonction d'adhérence. Il existe une centaine de cadhérines différentes classées en 5 sous-familles en fonction du nombre de domaines extracellulaires (EC) qu'elles contiennent.

En plus de jouer un rôle important dans l'étanchéité des barrières épithéliales, ces jonctions jouent un rôle dans la prolifération et la différenciation cellulaire le long de l'axe crypte/villosité dans l'intestin [Schneider 2010].

Certaines toxines ont pour cible les AJ. C'est le cas de la toxine produite par *Bacteroides fragilis* qui clive le domaine extracellulaire de la cadherine E ce qui entraîne une dégradation du domaine intracellulaire, une réorganisation des filaments d'actine et donc une augmentation de la perméabilité membranaire [Sears 2001].

Il a été suggéré que les TJ et AJ ne forment qu'une seule unité fonctionnelle [Nusrat 2013].

IV.4.1.1.3 Les desmosomes et hémidesmosomes

Les desmosomes relient les FI (filaments intermédiaires) entre eux et sont concentrés en dessous des AJ. Ces jonctions permettent l'interaction des membranes cellulaires grâce aux glycoprotéines transmembranaires et fonctionnent comme des boutons pression. Les hémidesmosomes sont de même composition que les desmosomes mais sont situées au pôle basal, au contact avec la matrice cellulaire.

Ces 3 types de jonctions sont reliés au cytosquelette d'actine par des protéines adaptatrices comme Zo1 ou la caténine impliquant ainsi le cytosquelette d'actine dans le maintien de la perméabilité para-cellulaire. Les jonctions serrées ont un rôle dans le contrôle du passage des molécules alors que les JA et les desmosomes permettent de lier solidement les cellules adjacentes les unes aux autres.

Un quatrième type de jonction appelé Gap ou jonctions communicantes est décrit. Ces jonctions sont arrangées en tubules cylindriques composés de connexines et permettent le passage des ions et petites molécules entre 2 cellules adjacentes. Elles permettent donc de lier les milieux intracellulaires des cellules adjacentes [Neunlist 2013].

IV.4.1.2 Modèles d'entrée des neurotoxines botuliques par la voie para-cellulaire

Le modèle d'entrée des BoNTs par la voie para-cellulaire a été décrit par l'équipe de Fujinaga et collaborateurs. Dans ce modèle, les NAPs jouent un rôle important mais non indispensables dans l'entrée de la BoNT/B au travers de la barrière intestinale en perturbant les jonctions intercellulaires permettant l'entrée de BoNT/B par la voie para-cellulaire.

La partie N terminale des HA70 a des similarités de séquence avec la partie N terminale de la toxine CPE de *C. perfringens*. Cette toxine perturbe les jonctions serrées et les jonctions adhérentes entraînant une diffusion passive par la voie para-cellulaire des toxines [Fujinaga 1996]. Ainsi, les HAs pourraient agir de la même façon et permettre l'entrée de BoNTs à travers la barrière intestinale.

Des expériences *in vivo* réalisées sur des anses intestinales de souris ont montré que les HAs permettent d'augmenter l'absorption des complexe 12s de BoNT/B, réduisant presque de moitié le temps d'apparition des symptômes de paralysie chez la souris [Matsumura 2008]. Les HAs se lient aux microvillosités de l'intestin grêle en interagissant avec des surfaces glycoconjuguées des entérocytes et seraient donc impliquées dans la liaison et l'absorption du complexe botulique à travers la muqueuse intestinale ([Fujinaga 2000] [Arimitsu 2008] [Fujinaga 2004]).

Il a été démontré que les HA33s agissent spécialement au pôle baso-latéral induisant une

désorganisation des jonctions serrées et adhérentes par liaison spécifique à la cadhérine E, permettant ainsi un passage para-cellulaire des BoNTs 12s [Fujinaga 2009]. Cette liaison à la cadhérine E est dépendante du Ca^{2+} et n'affecte pas la viabilité des cellules en culture mais induit une relocalisation de la cadhérine E à la surface cellulaire où elle est en partie endocytée entraînant une désorganisation du cytosquelette [Sugawara 2010]. Les HAs auraient donc un rôle bien spécifique dans l'entrée des BoNTs dans les cellules épithéliales et ne se lient ni à la cadhérine N (Neurale), ni à la cadhérine VE (Vasculaire)[Fujinaga 2013].

Ceci suggère que les HAs seraient transportées seules par transcytose jusqu'au pôle baso-latéral où elles ont accès à la cadhérine E ou que le complexe entier soit transporté et que les HAs aient accès à la cadhérine E, après dissociation du complexe au pôle baso-latéral [Sugawara 2011] [Sugawara 2010] [Fujinaga 2013].

L'action sur les jonctions localisées en baso-latéral a déjà été mis en évidence chez les bactéries de la famille Shigella, qui envahissent les cellules épithéliales de l'intestin par leur pôle baso-latéral après une entrée à travers les cellules M [Schroeder 2008].

De plus, les HA33s sont espèces spécifiques et les HAs de BoNT/C, retrouvées dans les cas de botulisme animal, n'ont aucun effet sur les cultures de lignées cellulaires humaines (Caco-2 et T84) mais perturbent fortement les cellules de rein d'origine canine MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) [Jin 2009].

Toutefois, le modèle de passage proposé par Fujinaga et collaborateurs est fortement remis en question. En effet, les effets observés sont tardifs (12 à 48h) alors que l'on estime le temps d'entrée des BoNTs à 30-60 min [Matsumura 2008]. De plus, les symptômes généralement rencontrés dans les cas d'intoxication par des toxines perturbant la barrière intestinale (inflammations de la muqueuse ou une augmentation la sécrétion conduisant à des diarrhées) ne sont pas observés dans les cas de botulisme. Il a de plus été montré que les complexes 12s de BoNT/A, dépourvus de Has peuvent traverser une monocouche de cellules intestinales [Couesnon 2009]. Ainsi, les HAs peuvent avoir un rôle dans l'entrée mais ne sont pas nécessaires.

La voie para-cellulaire ne semble pas non plus être la voie préférentielle d'entrée des neurotoxines par voie aérienne [Al-Saleem 2012].

IV.4.2 La voie d'entrée intracellulaire et transcytose

La transcytose est le mécanisme par lequel une molécule est transportée à travers une cellule, du pôle apical au pôle basolatéral ou du pôle baso-latéral au pôle apical.

Cette voie d'entrée implique que le cargo est endocyté, puis transporté à travers des

compartiments intracellulaires endosomaux, pour être délivré par exocytose au pôle opposé à son pôle d'entrée. L'ensemble de ces étapes sollicite fortement le cytosquelette.

IV.4.2.1 Implication des protéines G.

Les protéines G sont des GTPases, enzymes qui lient et hydrolysent la Guanosine Triphosphate (GTP) en Guanosine Diphosphate (GDP). Ces protéines sont fortement impliquées dans la transduction du signal intracellulaire.

Elles peuvent être présentes sous deux formes, une forme active, liée au GTP, et une forme inactive liée au GDP. Le cycle des GTPases Fig IV.4 est régulé par 3 protéines régulatrices [Chi 2013] :

- La GEF (Guanin nucleotide Exchange Factor) qui facilite la libération du GDP et la liaison du GTP
- La GAP (GTPases Activating Protein) qui stimule l'activité catalytique des GTPases
- La GDI (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor) qui stabilise le GDP. Toutes les protéines G ne sont pas régulées par GDI.

Parmi ces protéines G, on distingue les grandes protéines G (comme la dynamine) et les

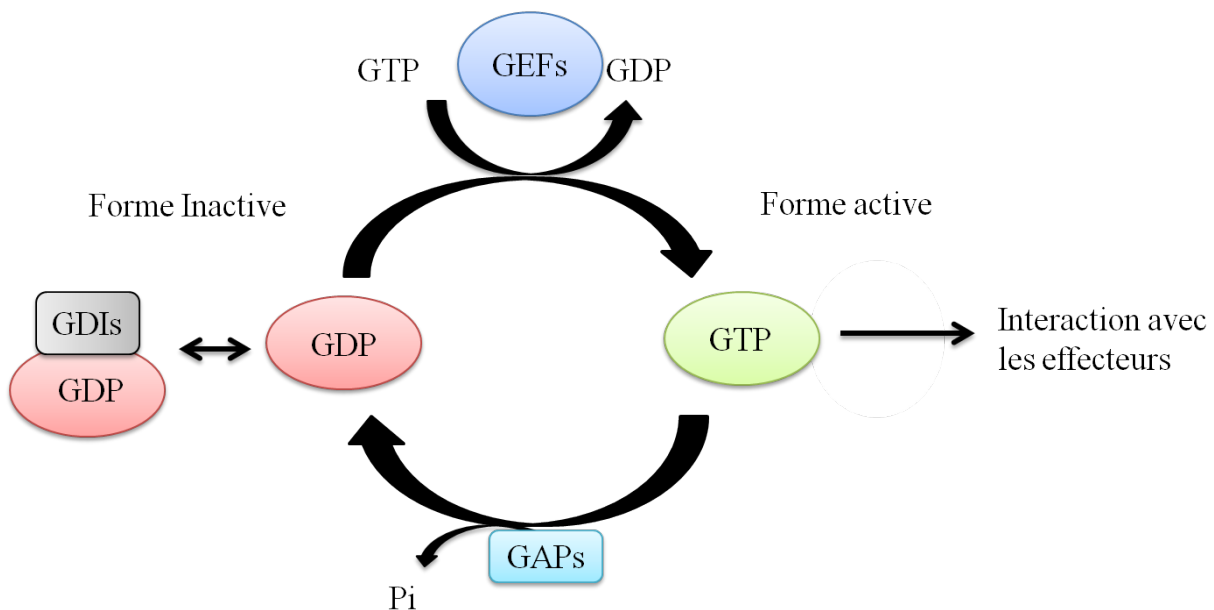


FIGURE IV.4 – Cycle des GTPases. Les GTPases sont inactives sous leur forme liée au GDP et actives lorsqu'elles sont liées au GTP. Ce passage de forme active à inactive est régulé par 3 types de protéines, les GAPs, les GEFs, et les GDIs qui ne régulent pas toutes les GTPases.

petites protéines G (entre 21 et 24 kDa) qui sont fortement impliquées dans les évènements

endocytotiques et dans la régulation de la dynamique du cytosquelette.

La dynamine est une grande GTPase (à peu près 100 kDa) qui s'assemble spontanément pour former un polymère hélicoïdal autour du cou de la vésicule d'endocytose et qui, après hydrolyse du GTP, permet la fission de la vésicule et sa libération dans le compartiment intracellulaire de façon irréversible. En présence de GTP, la dynamine est capable de scinder des liposomes en vésicules et sur cellule son inhibition entraîne la formation de pseudo-vésicules qui restent connectées à la membrane par un long cou recouvert de polymères de dynamine. La dynamine a de multiples fonctions. Elle est impliquée dans la formation du réseau trans golgien pour la biogénèse des organelles, l'étape de cytokinèse de la mitose, dans la régulation de l'exocytose et dans les dynamiques de l'actine [Harper 2013].

On distingue 4 sous-familles de petites protéines G :

- La super famille des Ras, pour Rat Sarcoma. Les membres de cette famille sont fortement impliqués dans la survie, la différenciation et la croissance cellulaire. Une mutation de Ras la rendant constitutivement active, semble un facteur important dans la formation de cancer. En effet, ces mutations de Ras sont retrouvées dans 20 à 25% des cas de cancer humain, faisant de Ras l'oncogène le plus commun [Downward 2003].

- Les Rabs (Ras-related in Brain) qui sont fortement impliquées dans l'endocytose, le trafic vésiculaire, la différenciation et la croissance cellulaire. Les formes actives de Rab recrutent des partenaires de liaison tels que des kinases, des phosphatases ou des protéines adaptatrices et influencent ainsi la formation des vésicules et leur transport. Les Rabs sont également impliquées dans la régulation des fusions dépendantes des SNAREs (par Rab3) en interagissant directement avec ces protéines ou avec des protéines régulatrices [Park 2013].

- Les Arf (ADP Rybosylation Factor), Arl (Arf-like), et Sar (Secretion-associated and Ras-associated) sont regroupées dans une même sous famille. Ces protéines sont fortement impliquées dans la régulation de nombreuses voies d'endocytose.

- Enfin, la famille des Rho (Ras Homologous) GTPases, qui comprend 3 principaux membres, RhoA, Rac1 (Ras related C3 botulinum toxin substrate 1) et Cdc42. Ces protéines régulent la polymérisation de l'actine, l'adhésion cellulaire et l'endocytose. Ces protéines sont largement étudiées et sont impliquées dans la régulation des voies de transport (endocytose, exocytose) et le contrôle des changements du cytosquelette ainsi que dans la signalisation cellulaire. Elles jouent également un rôle important dans la régulation de la perméabilité cellulaire. Il a été démontré que l'activation de ces Rho GTPases par le CNF1 d'*E. coli* augmente la perméabilité cellulaire grâce à une réorganisation du cytosquelette d'actine [Gerhard 1998]. De même, l'inactivation de Rac1 par LT de *C. sordellii* et l'inhibition de RhoA et Rac1 par CdtB de *C. difficile*, diminuent la perméabilité intestinale [Schlegel 2011]. Ainsi, l'activation ou l'inactivation de RhoA augmente la perméabilité alors que l'activation de Rac1 et Cdc42 stabilise l'intégrité des jonctions intercellulaires et donc la barrière

intestinale. RhoA et Cdc42 se lient aux lipides et préférentiellement aux membranes enrichies en cholestérol [Doherty 2009].

Pour résumer :

- o Cdc42 régule le modelage du cytosquelette, aide à l'établissement de la polarisation cellulaire, la migration, la formation de filipodes et la prolifération cellulaire
- o Rac1 régule la formation de lamellipodes, l'endocytose et l'exocytose
- o RhoA modifie la morphologie des membranes pendant l'endocytose et joue un rôle important dans la formation des fibres de stress [Park 2013]. Exprimée constitutivement, RhoA stimule l'endocytose basolatéral et apical.

IV.4.2.2 L'endocytose

L'endocytose correspond à l'entrée dans la cellule de molécules empaquetées dans des vésicules dérivant de l'invagination et de la séparation de fragments de la membrane plasmique [Conner 2003]. L'endocytose consiste en l'internalisation et le transport de substrats de la membrane plasmique vers les compartiments intracellulaires. A l'inverse, l'exocytose est le transport de molécules du milieu intracellulaire vers l'extérieur de la cellule.

Les mécanismes fondamentaux de l'endocytose et du tri endosomal sont conservés chez la plupart des cellules eucaryotes. L'endocytose est fonction de 3 critères fondamentaux : le volume à endocyter, la nature des éléments à endocyter et la présence ou non d'un revêtement sur la surface cytosolique des vésicules. Ainsi on distinguera la phagocytose, qui permet l'endocytose d'organismes de très grande taille tels que les bactéries, de la pinocytose qui sert à l'internalisation de fluides et de solutés, elle-même divisée en macropinocytose et micropinocytose.

Nous ne détaillerons que de la pinocytose puisque le cargo d'intérêt, la toxine botulique, est une protéine. La pinocytose peut être divisée en 2 grandes voies : l'endocytose dépendante de la clathrine (CDE, Clathrine Dependant Endocytosis) et l'endocytose indépendante de la clathrine (CIE, Clathrine Independant Endocytosis).

IV.4.2.2.1 L'endocytose dépendante de la clathrine

La voie dépendante de la clathrine est responsable de 40 à 50% de l'endocytose de la phase fluide, c'est-à-dire des molécules ne nécessitant pas de liaison à des récepteurs pour leur endocytose. Dans la majorité des cas, la CDE implique des récepteurs spécifiques.

Cette endocytose consiste en la formation de puits recouverts de clathrine (CCP, Clathrine Coated Pits) qui s'invaginent pour former des vésicules de 80 à 200 nm de

diamètre. La LDL (Low Density Lipoprotein), la transferrine, ainsi que l'EGF (Epidermal Growth Factor) ou l'insuline sont endocytés par cette voie. Une fusion de la clathrine à la GFP (Green Fluorescent Protein) a permis de mettre en évidence que les CCP se forment à des domaines bien spécifiques de la membrane appelés "hot spots", littéralement points chauds. Il a pu également être mis en évidence que ces puits peuvent également être retrouvés à la surface de plusieurs compartiments intracellulaires jouant ainsi un rôle dans le trafic endolysosomal.

. Le constituant principal est la clathrine. Elle est composée de 3 chaînes lourdes associées

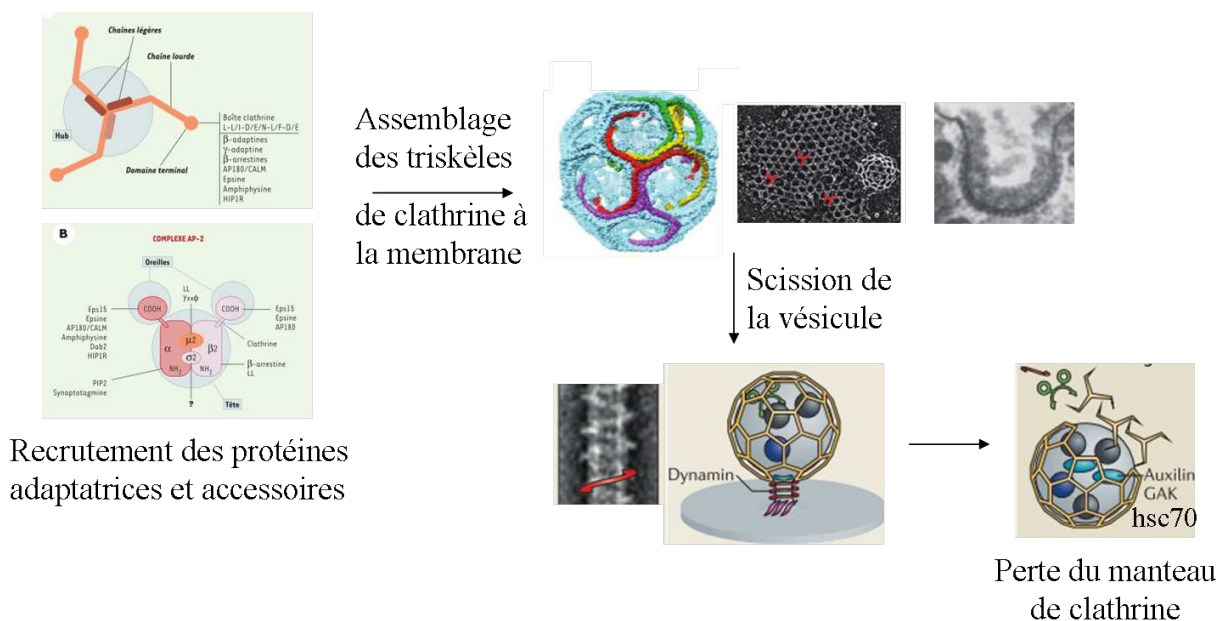


FIGURE IV.5 – Modèle de formation des vésicules de clathrine. Les triskèles de clathrine s'associent les uns aux autres grâce aux protéines accessoires et à la protéine adaptatrice (AP-2) pour former un manteau de clathrine à la membrane plasmique. Puis la vésicule est libérée dans le milieu intra-cellulaire grâce à la dynamine et libérée de son manteau de clathrine grâce à l'ATPase hsc70, recrutée par l'auxiline et GAK. D'après [McMahon 2011] [Benmerah 2002] [Brodsky 2012].

à une chaîne légère formant une structure en triskèle qui peuvent s'auto-assembler *in vitro* pour former des structures complexes appelée "cages", identiques au manteau formé *in vivo* autour des CCV (Clathrin Coated Vesicles) Fig IV.5. Les chaînes lourdes sont suffisantes pour l'assemblage et sont également impliquées par leur domaine terminal dans une série d'interactions protéiques par l'intermédiaire d'un motif consensus appelé boîte clathrine [Brodsky 2012].

La clathrine est également très impliquée dans le réseau trans-golgien pour la biogénèse des organelles et la génération des vésicules synaptiques. Elle joue également un rôle dans la cytokinèse lors de la mitose par interaction avec les microtubules ([Royle 2005]).

Bien que cette propriété d'assemblage spontané *in vitro* suggèrent que la clathrine soit le moteur de la déformation de la membrane, celle-ci recrute à la membrane des protéines adaptatrices et auxiliaires qui coordonnent son assemblage. Ces protéines auxiliaires coordonnent la nucléation de la clathrine, permettent sa polymérisation en maillage courbé, et aident également à la formation et à la scission de la vésicule [Benmerah 2002].

Le complexe adaptateur AP-2 stimule l'assemblage des triskèles et est constitué de 4 sous-unités, 2 de haut poids moléculaire (et 2 adaptines pour AP-2) et 2 petites sous-unités ($\mu 2$ et 2). Ces sous-unités, inactives sous formes de monomère, adoptent une structure en tête de Mickey dans laquelle les oreilles sont reliées à la tête par 2 régions charnières. Ces complexes servent à l'assemblage des triskèles mais ont également une fonction de contrôle qualité en formant des cages de tailles homogènes grâce à la boîte clathrine. La protéine auxiliaire Eps15 est associée de façon constante au complexe AP-2 par interaction directe avec l' adaptine, et joue un rôle d'échafaudage en regroupant l'AP-2 le long d'un appendice flexible en C terminal.

Les protéines accessoires contenant des domaines N-BAR et BAR (Bin/Amphiphysin/RVs) comme la SNX9 et l'amphysine, peuvent générer et stabiliser la courbure de la membrane en se liant à la fois à la clathrine et l'AP-2 pour recruter la dynamine au cou des vésicules bourgeonnantes Fig IV.5. La synaptotagmine VII (Syt-VII) permettrait également le recrutement de complexe AP-2 à la membrane [Doherty 2009].

Une fois la vésicule internalisée, le panier de clathrine est libéré de la vésicule grâce à l'ATPase hsc70 (Heat Shock Cognate 70) recrutée par l'auxiline ou par GAK (cyclin G-Associated Kinase) [McMahon 2011] Fig IV.5.

Cette voie est régulée par des petites protéines G telles que Arf0 qui joue un rôle dans l'assemblage des puits de clathrine en régulant l'invagination de la membrane plasmique, et Cdc42 [Apodaca 2001].

IV.4.2.2.2 Les voies indépendantes de la clathrine

Les inhibiteurs de la voie CDE, dont le premier fut le mutant de la dynamine 1 K44A, ont montré que l'endocytose de la phase fluide est stimulée en réponse à l'inhibition de la clathrine ce qui conduit à la formation de vésicules lisses dépourvues de clathrine. Il a fallu attendre la découverte des protéines accessoires pour avoir d'autres inhibiteurs de la CDE ciblant par exemple l'AP-2. Des voies CIE ont alors pu être identifiées et certaines

peuvent également être dépendantes de la dynamine. Ces CIE recrutent le cholestérol libre des membranes et sont divisées en fonction des protéines et lipides qu'elles transportent.

IV.4.2.2.2.1 Les voies impliquant des microdomaines membranaire : les "lipids rafts" Les "lipid rafts" (radeaux lipidiques) sont des microdomaines de la membrane plasmique enrichis en cholestérol, gangliosides (glycosphingolipides qui contiennent un ou plusieurs domaines acides sialilés), et glycolipides tels que les glycosylphosphatidylinositol (GPI) [Lin 2010]. Ces radeaux lipidiques peuvent influencer la fluidité de la membrane, permettre le regroupement de récepteurs et l'assemblage des molécules de signalisation. Ces microdomaines sont résistants à l'action des détergents anioniques à 4°C, propriété utilisée pour les isoler en gradient de sucrose sous forme de DRM (Detergent Resistant Membrane).

Les composants de ces microdomaines peuvent également servir de récepteurs pour l'entrée de cargos. Les gangliosides sont présents dans les feuillettes externes des membranes de certaines cellules en particulier au niveau des synapses. Ils servent de récepteurs à certaines toxines bactériennes comme la toxine cholérique (GM1) ou la Shiga toxine (Gb3) ou encore la toxine botulique voir IV.5.1.1[Orlandi 1998] [Falguières 2001]. La voie de biosynthèse de ces gangliosides est complexe est fait intervenir de nombreuses enzymes Fig IV.6.

La voie d'endocytose des radeaux lipidiques n'est pas dépendante de la dynamine. Cependant, les récepteurs des IL2 (IL2 R Interleukin 2 Receptor) sont retrouvés en association avec des microdomaines membranaires correspondant à ces radeaux lipidiques et son internalisation est dépendante de RhoA, Rac1 mais également de la dynamine. La voie d'entrée IL2 R constitue donc une voie d'endocytose à part entière [Mayor 2007]. Il a été démontré dans le laboratoire que les toxines binaires Iota de *C. perfringens*, et C2 de *C. botulinum* utilisent la voie IL2 R pour rentrer dans les cellules [Gibert 2010].

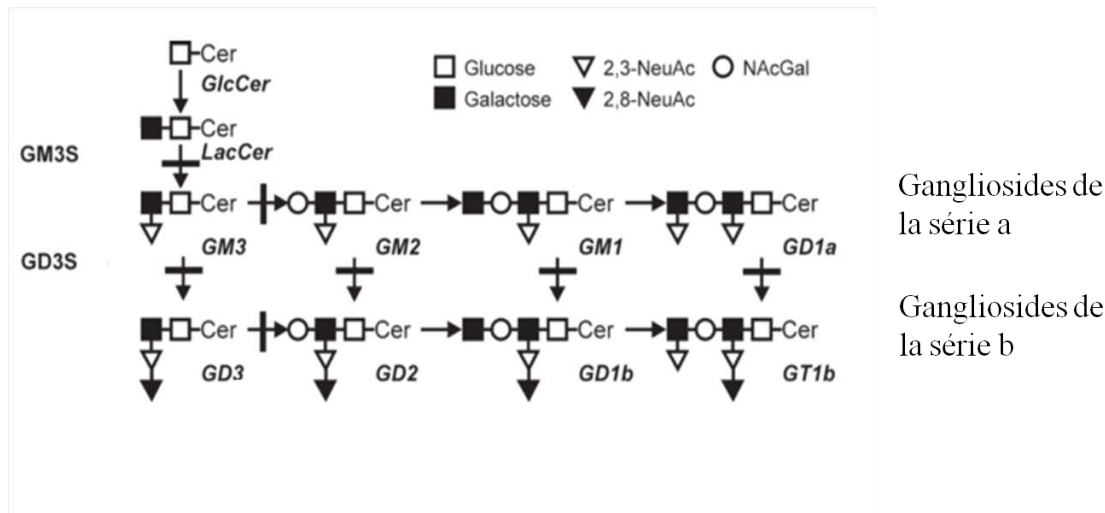


FIGURE IV.6 – Représentation schématique de la voie de biosynthèse des polysialo gangliosides complexes. Le schéma montre le rôle des enzymes GM3-synthase (GM3S), GD3-synthase (GD3S) et N-acétylgalactosamine transférase (NAcGalT), dans la biosynthèse des gangliosides. La GlcCer (glucosyl-céramide synthase) est inhibée par le PPMP (DL-threo-1-Phenyl-2 palmitoyl-amino-3 morpholino-1-propanol). LacCer : lactosylcéramide, NeuAc, acide neuraminique. D'après [Rummel 2009]

IV.4.2.2.2 La macropinocytose Cette voie d'endocytose implique un réarrangement massif du cytosquelette en "ruffles" (ruches) formant des vésicules hétérogènes de grande taille (0,5 à 5mm) ou macropinosomes, par protusion de la membrane formée grâce à la polymérisation de l'actine [Conner 2003].

Cette voie est majoritairement induite par des facteurs de croissance ou des agents mitogènes et semble être contrôlée par la production de PIP2 à la membrane (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ou PtdIns(4,5)P2), et Rac1 ([Honda 1999] [Doherty 2009]). L'amiloride, un inhibiteur du canal de Na⁺/H⁺, est un inhibiteur spécifique de la macropinocytose.

IV.4.2.2.3 La voie des cavéolines C'est certainement la voie CIE la mieux caractérisée. Identifiée par Georges Palade en 1953, cette voie est caractérisée par la formation de petites cavités, appelées cavéoles, de 60 à 80 nm de diamètre, de forme flasque, sans manteau apparent. Ces cavéoles, qui peuvent prendre différentes formes, sont enrichies en sphingolipides, cholestérol et en protéines signal.

La voie des cavéolines est très abondante dans les tissus mous, les pneumocytes de type I, les fibroblastes les adipocytes ainsi que dans les cellules endothéliales [Doherty 2009]. C'est une endocytose lente (t_{1/2} >20minutes), et bien que les cavéoles peuvent représenter jusqu'à

1/3 de la surface membranaire, la fonction active d'endocytose a longtemps été remise en question [Conner 2003].

Ces cavéoles sont composées de cavéolines, protéines contenant une partie insérée à la membrane de 34 aa, formant une épingle à cheveu, qui ne sort pas de la cellule. Le reste de la protéine est cytosolique et contient un domaine d'échafaudage, "scaffolding", très conservé, qui semble jouer un rôle dans l'oligomérisation avec les domaines riches en cholestérol et sphingolipides au travers de résidus basiques hydrophobes ([Parton 2007]). La partie C terminale subit une palmitoylation ce qui permet un ancrage solide à la membrane. De plus, les cavéoles sont attachées à la membrane grâce à des composants du cytosquelette comme la filamine Fig IV.7.

Lors de l'internalisation, ces cavéoles sont séparées de la membrane plasmique grâce à la dynamine, et peuvent soit suivre la voie endolysosomale classique voir paragraphe IV.4.2.3 soit fusionner avec des structures multicavéolaires enrichies en cavéolines appelées cavéosomes. La phosphorylation des cavéolines, le recrutement et l'activation de la dynamine au cou des cavéoles ainsi que la réorganisation du cytosquelette sont nécessaires à l'internalisation des cavéoles [Kiss 2009].

La voie des cavéoles est impliquée dans l'endocytose de toxines comme la toxine cholérique, de virus (le SV40 Simian Virus 40, le polyoma virus ou encore le HIV, Human Immunodeficient Virus) mais joue également un rôle important dans la régulation de voies de signalisation comme la voie eNOS (endothelial nitric synthase) et la voie de signalisation du calcium. Elle semble également impliquée dans certaines maladies comme le diabète.

De plus la cavéoline semble réguler l'activité de Cdc42, fortement impliquée dans la voie CLIC/GEEC voir paragraphe IV.4.2.2.4.2 [Doherty 2009].

IV.4.2.2.4 La voie cavéoline et clathrine indépendante

IV.4.2.2.4.1 La voie des flotilines et des tetraspanines La voie des flotilines et des tetraspanines Ces 2 voies sont moins bien caractérisées mais semblent être la voie d'endocytose empruntée par la toxine cholérique, et par certains virus. Les flotilines s'oligomèrisent au niveau de microdomaines différents des cavéoles et ne semblent pas impliquer la dynamine.

Une déplétion des flotilines par siRNA augmente la toxicité de la toxine Shiga, ce qui indique que ces microdomaines membranaires enrichis en flotilines, contribuent à la régulation de l'entrée de cette toxine dans la cellule par une voie indirecte pour l'instant non identifiée [Pust 2010].

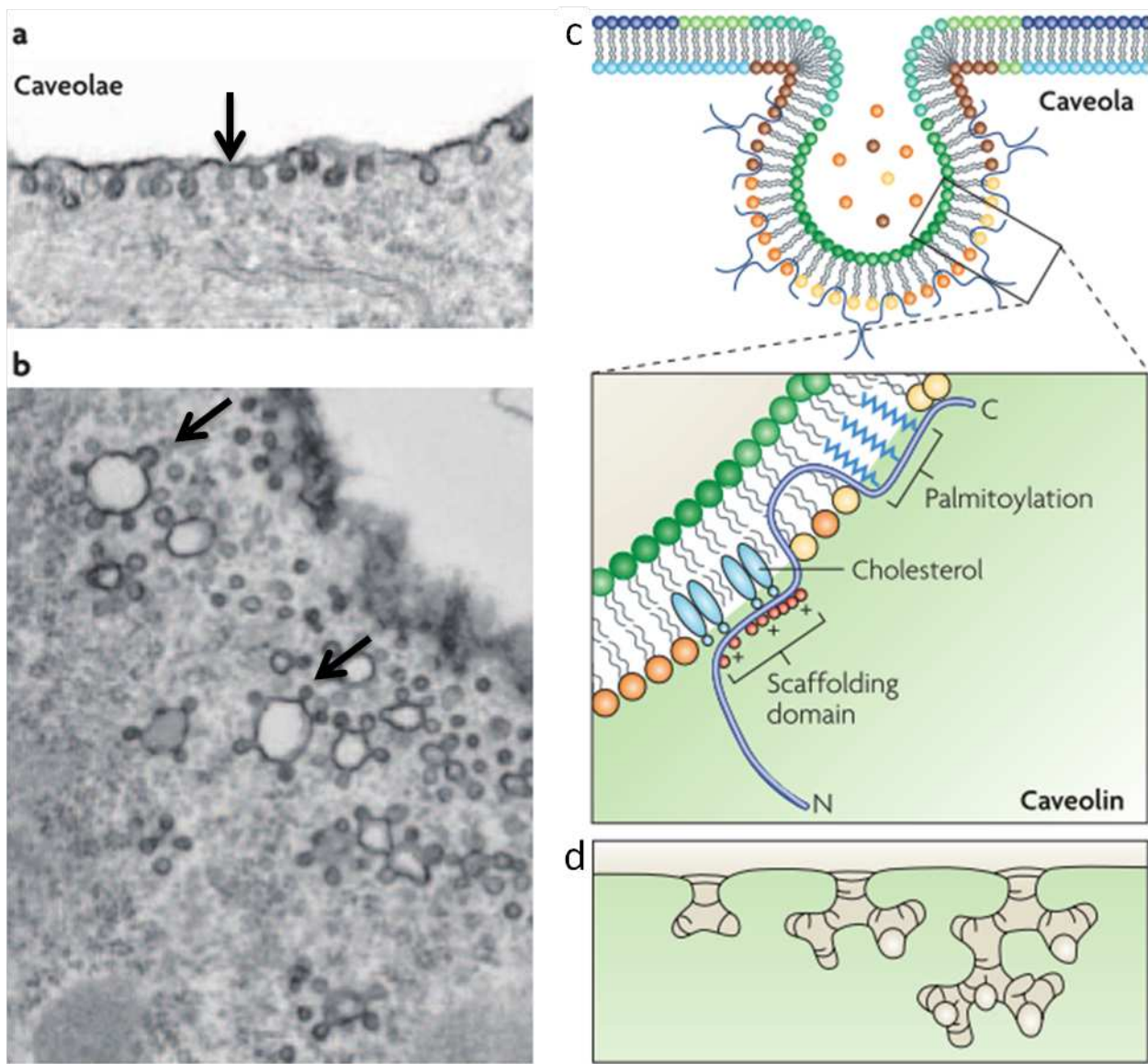


FIGURE IV.7 – Images en microscopie électronique (a et b) et schéma de la structure à la membrane des cavéoles (c). Noter que le cavéoles peuvent prendre différentes formes et plusieurs cavéoles peuvent s’associer ensemble, pour former des structures plus importantes (d) (d’après [Parton 2007]).

Les tetraspanines quant à elles, sont des petites molécules à 4 domaines transmembranaires qui participent à l’attachement d’autres protéines comme les adhésines. Elles génèrent des microdomaines enrichis en tétraspanines (TEM, Tetraspanin-Enriched Microdomains), qui partagent des similarités de composition avec les régions des cavéoles.

Enrichis en cholestérol, ces TEMs sont résistants à une déplétion en cholestérol par

la *Mbeta*CD (Methyl *beta* Cyclodextrine), classant cette voie dans une catégorie unique d'endocytose [Lin 2010]. HPV16 (Human Papillomavirus) utilise la voie des tetraspanines pour entrer dans la cellule [Spoden 2008].

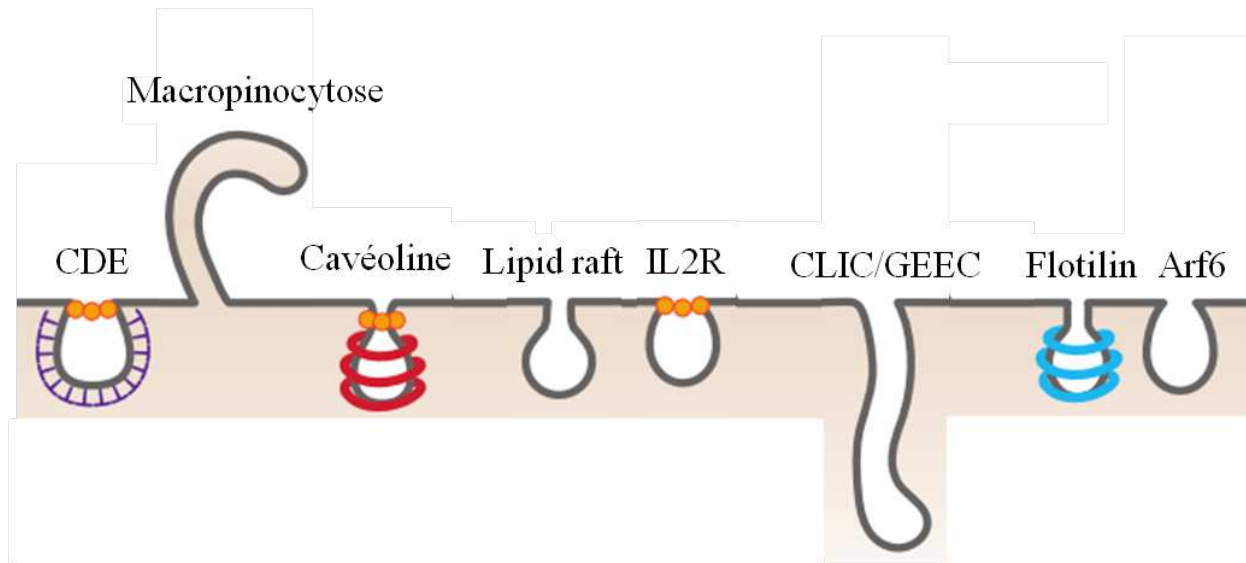
IV.4.2.2.2.4.2 La voie CLIC/GEEC La voie CLIC/GEEC Les CLICs (Clathrine Independent Carriers) sont de forme tubulaire de 40 nm de diamètre. Ces CLICs transitent par des compartiments intracellulaires distincts de la voie endolysosomale classique, appelés les GEECs (GPI anchored protein enriched Early Endosomal Compartiments). A partir des GEECs, les cargos peuvent soit rejoindre la voie endolysosomale classique soit être dirigés vers les compartiments périnucléaires comme l'appareil de golgi [Doherty 2009].

Indépendante de la dynamine, la voie CLIC/GEEC est régulée par la protéine G, Arf1 qui régule Cdc42 localisée à la membrane plasmique [Doherty 2009]. Cette voie est également régulée par GRAF1 (GTPase Regulator Associated with Focal adhesion kinase 1) qui est une protéine contenant un domaine BAR permettant de sculpter la membrane endocytée [Doherty 2009].

Certains virus tels que les AAVs (Adéno Associated Virus) et la toxine cholérique sont endocytés par cette voie [Nonnenmacher 2011].

IV.4.2.2.2.4.3 La voie dépendante de ARF6 La voie dépendante de ARF6 Arf6 est une petite protéine G qui joue un rôle direct dans la régulation du cytosquelette, la production locale du PtdIN (4,5)P2 et la polymérisation de l'actine. Il a été démontré que les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) de classe I sont endocytés par une voie clathrine indépendante, via des endosomes positif pour Arf6 [Doherty 2009]. Toutefois, cette voie d'endocytose reste pour l'instant peu détaillée dans la littérature.

Les voies d'endocytose sont donc nombreuses et font intervenir différents composants cellulaires comme le cytosquelette, des microdomaines membranaires mais également des protéines régulatrices Fig IV.8.



Voie d'endocytose	Protéine de recouvrement	Implication de la dynamine	Implication du cytosquelette	Implication des petites protéines G	Microdomaines plasmidiques
CDE	clathrine	oui	actine, microtubules	Rac1, RhoA, Cdc42, non obligatoires mais régulent l'efficacité d'endocytose	Enrichis en cholestérol
Macropinocytose	aucune	indéterminée	actine, microtubules, myosines	Rac1, Cdc42	
Cavéoline	cavéolines	oui	actine, microtubules	RhoA (les cavéolines semblent réguler Cdc42)	
Lipid raft	aucune	non	actine	RhoA, autres?	Enrichis en cholestérol, gangliosides, glycolipides
IL2βR	aucune	oui	actine	RhoA, Rac1	
CLIC/ GEEC	GRAF1	indéterminée	actine	Cdc42, Arf1	
Flotiline	Flotiline-1	indéterminée	indéterminée	indéterminée	
Arf6	aucune	indéterminée	actine	Arf6	Enrichis en cholestérol

FIGURE IV.8 – Schéma et principales caractéristiques des différentes voies d'endocytose décrites dans la littérature [Mercer 2010] [Qualmann 2003] [Doherty 2009].

IV.4.2.3 La voie endosomale dans les cellules polarisées

La plupart des connaissances concernant le trafic intracellulaire provient d'études réalisées sur des cellules non-polarisées [Taguchi 2013] [Disanza 2009] [Sorkin 2009]. Cependant, chaque type de cellules est différent et exprime des protéines et des effecteurs cellulaires variés. Les cellules polarisées ont une morphologie différente des cellules non polarisées

et impliquent souvent la formation de structures spécialisées au pôle apical comme les microvillosités ou les cils. Ce processus de polarisation cellulaire est dépendant de la polarité des protéines du cytosquelette et du trafic intracellulaire.

Une fois internalisés dans les cellules, les cargos peuvent être soit dégradés dans les lysosomes, soit recyclés à la membrane. L'équilibre entre molécules dégradées et molécules recyclées, contribue à la régulation de nombreux processus cellulaires. Parmi eux, on peut citer l'absorption des nutriments, l'adhésion cellulaire, la formation des jonctions serrées et leur maintenance, mais permet également le maintien de la polarité cellulaire. La majorité des cargos sont recyclés à la membrane ou transportés jusqu'au pôle opposé de la cellule dans le cas de la transcytose. La transcytose peut fonctionner dans les 2 sens, du pôle apical au pôle baso-latéral et inversement Fig IV.9. La transcytose contrôle les fonctions de la barrière épithéliale [Grant 2009].

Quelque soit la voie d'endocytose empruntée, les cargos internalisés pénètrent dans les endosomes précoces (EE, Early Endosome) situés au pôle basal (BEE) ou apical (AEE) qui constituent la première station de tri Fig IV.9 [Thompson 2007]. Ces endosomes sont positifs pour Rab4 (Rab4+) et Rab5 (Rab5+), et sont composés de 2 compartiments, un compartiment de tri et un compartiment de recyclage qui dirige les molécules vers les endosomes de recyclage commun (CRE) aux deux pôles d'entrée [Hsu 2012]. Certains cargos peuvent être recyclés rapidement à la membrane généralement par des compartiments Rab4+ (c'est le cas du récepteur à la transferrine, TFR). Les EE peuvent également être partitionnés en corps multivésiculaires, qui fusionnent avec les endosomes tardifs (LE) généralement Rab7+, qui dirigent les cargos vers les lysosomes où ils seront dégradés.

Au niveau du CRE, un second tri s'opère où les cargos pourront être soit recyclés à la membrane, soit fusionner avec le ARE (Rab11+) pour les cargos destinés à être recyclés au pôle apical.

La transcytose transportant les cargos du pôle baso-latéral au pôle apical est bien connue (voie du pIgR, polymeric Immunoglobulin Receptor). Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans le transport de cargos du pôle apical au pôle baso-latéral sont peu détaillés.

Le cytosquelette est également fortement impliqué dans le transport endolysosomal.

Les microtubules, d'une part, sont de longs éléments filamenteux importants pour la localisation des organelles et dans le transport des cargos entre organelles. Les microtubules permettent un transport rapide $1 \mu m/sec$ sur de longues distances grâce à la dynéine et aux kinésines. Leur activité peut être bloquée par le nocodazole, agent qui dépolymérise les filaments de tubuline

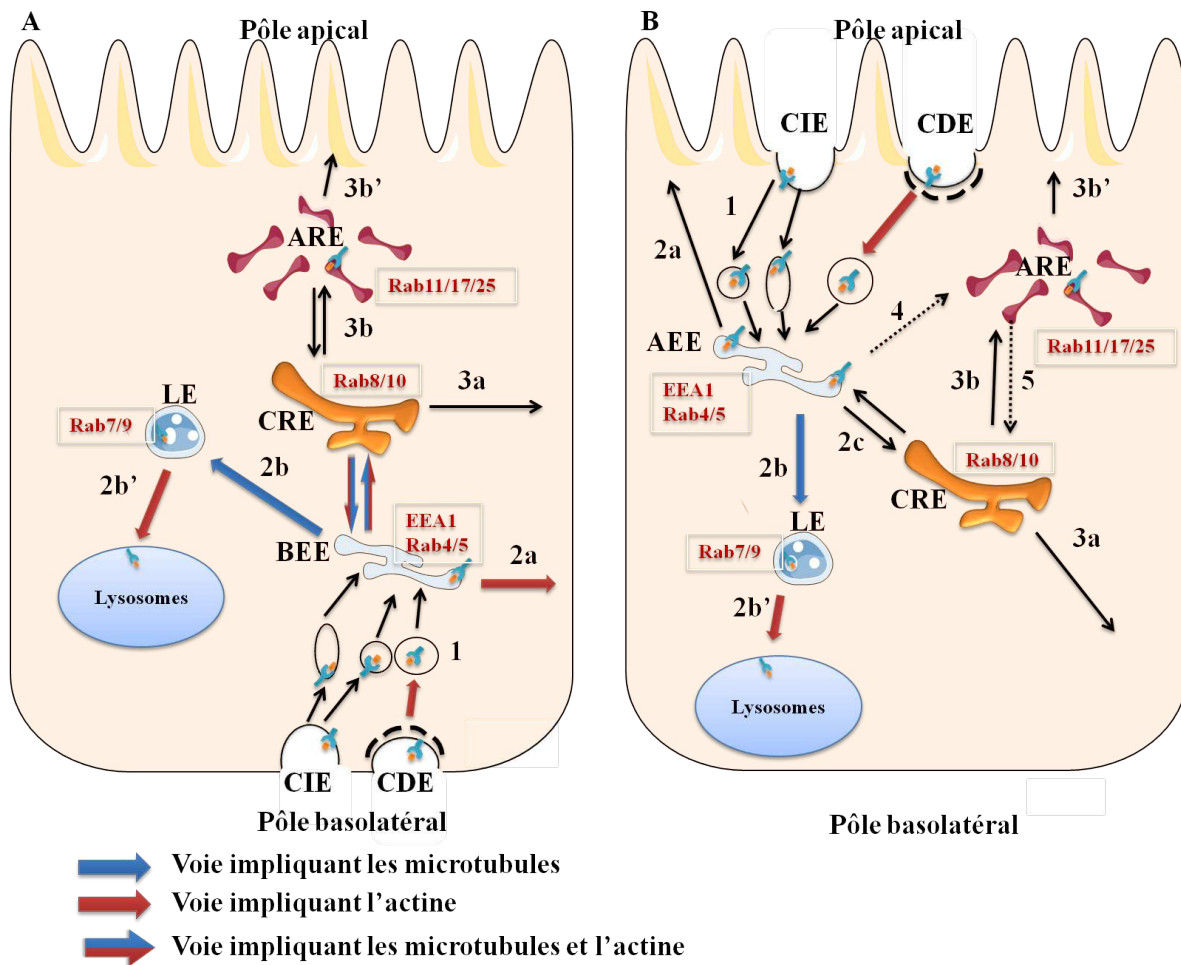


FIGURE IV.9 – Trafic endosomal dans les cellules polarisées. La transcytose peut être réalisée dans les deux sens, du pôle baso-latéral au pôle apical (A) et du pôle apical au pôle baso-latéral (B). 1) Les cargos sont endocytés par une voie CDE ou CIE au pôle apical ou au pôle baso-latéral et rejoignent les endosomes précoces (EE, Early Endosome) du pôle apical (AEE), ou du pôle basal (BEE). Puis les cargos peuvent être dirigés vers plusieurs voies, une voie de recyclage à la membrane (2a), une voie des endosomes tardifs (LE, Late Endosome) (2b) où ils seront dégradés dans les lysosomes (2b'), ou une voie des endosomes de recyclage commun (CRE, Common Recycling Endosome) (2c). Au niveau des CREs, les cargos pourront être soit recyclés à la membrane (3a), soit dirigés vers les endosomes de recyclage apicaux (ARE, Apical Recycling Endosome) (3b) puis être recyclés à la membrane (3b'). Au pôle apical, une voie directe entre AEE et ARE (4) pourrait exister (flèche pointillée). La transcytose du pôle apical au pôle baso-latéral pourrait également impliquer une voie entre ARE et CRE (5). Ce trafic intracellulaire implique le cytosquelette ainsi que les petites protéines G, les Rabs.

Et l'actine, d'autre part, constituée de filaments courts, permettent un transport plus lent ($0,1 \mu\text{m}/\text{sec}$) grâce aux myosines. Son activité est bloquée par la cytochalasine D [Apodaca 2001].

Les voies de trafic intracellulaire dans les cellules non polarisées sont complexes et variées pouvant faire intervenir le réseau transgolgien. Il n'est pas encore bien défini si les voies de recyclage identifiées sont identiques dans les cellules non polarisées et polarisées [Grant 2009].

IV.5 Comparaison de l'entrée des BoNTs dans les cellules intestinales versus cellules neuronales

L'implication du domaine Hc dans l'entrée des BoNTs dans les cellules neuronales est connue depuis les années 1980 [Simpson 1984b][Simpson 1984a]. Il a pu être démontré que ce domaine constitue également la partie nécessaire à l'entrée dans les cellules intestinales [Maksymowych 2004].

IV.5.1 Le modèle de double récepteur

IV.5.1.1 Les gangliosides

Les gangliosides jouent un rôle prépondérants dans l'action des BoNTs. En effet, des cultures cellulaires neuronales traitées à la neuraminidase, qui enlève les résidus d'acides sialiques à la membrane, sont moins sensibles à l'action de BoNT/A et de BoNT/B. De plus, des cellules chromaffines bovines dépourvues de polysialogangliosides, deviennent sensibles à BoNT/A et BoNT/B lorsqu'elles sont traitées avec des gangliosides.

En utilisant des souris transgéniques KO (Knock Out) pour différentes voies de synthèse des gangliosides, les gangliosides reconnus par les BoNTs ont pu être identifiés. Il a également pu être mis en évidence que les HAs sont capables de se lier aux gangliosides appartenant à des familles différentes de ceux reconnus par les BoNTs.

Les BoNTs se lient aux gangliosides grâce à une boucle conservée (Tyr 1235-Ala 1245) chez tous les BoNTs appelée GBL (Ganglioside Binding Loop). Un motif H...SXWY...G est conservé chez les types A, B, E, F et G, mais absent des types C et D [Rummel 2003] [Strotmeier 2010] [Kroken 2011]. Les gangliosides des séries a et b sont fortement impliqués dans l'internalisation des BoNTs. En effet, des souris KO pour les gangliosides de la série a et b sont moins sensibles à BoNT/A et BoNT/B [Kitamura 2005]. Cependant, la sensibilité à BoNT/A est identique dans des souris déficientes en gangliosides de la série b et dans les

souris sauvages indiquant que les gangliosides de la série b ne sont pas essentiels dans l'étape initiale d'intoxination [Kitamura 2005].

Des analyses structurales ont permis d'identifier deux sites de liaison aux GT1b/GD1b pour BoNT/C alors qu'un seul site de liaison au GT1b n'a été identifié pour BoNT/A et BoNT/B. BoNT/A se lie préférentiellement à la moitié NAcGalbeta3-Galbeta de GT1b et GD1a alors que HcB se lie à la partie Galbeta 3-2alpha NACNeu [Karalewitz 2012b].

BoNT/E peut également se lier à GD1a, et BoNT/F à GT1b et GD1b [Benson 2011] [Fu 2009] [Rummel 2009].

Des essais réalisés en FACS (Fluorescence-activated cell cytometry), ont permis de mettre en évidence que la liaison de HcA (Hc de BoNT/A) aux cellules intestinales est fortement diminuée en présence de gangliosides GD1b/GT1b et diminue fortement le passage de BoNT/A biologiquement active à travers une monocouche de cellules intestinales. Toutefois, une pré-incubation des cellules intestinales avec les gangliosides complexes de la famille GD1b/GT1b, augmente la liaison de Hc aux cellules. De plus, la déplétion de ganglioside par ajout de (PPMP) qui est un inhibiteur de la glucosyl céramide synthase, diminue fortement le transport de BoNT/A à travers une monocouche de cellules intestinales [Coesnon 2008]. Les gangliosides GD1b/GT1b sont donc également impliqués dans l'entrée de BoNTs dans les cellules intestinales.

IV.5.1.2 Les protéines réceptrices

Bien que les gangliosides soient impliqués dans l'entrée des BoNTs dans les cellules neuronales et intestinales, les différences d'affinité observées entre les modèles *in vitro* et *in vivo* suggèrent la présence d'un autre récepteur. En effet, alors que l'affinité pour les polysialogangliosides est de l'ordre du 10^{-8} M, l'affinité de l'interaction entre les BoNTs et les récepteurs sur les synaptosomes préparés à partir de tissus neuronaux est de l'ordre de 1,2 nM [Binz 2009].

Un modèle de double récepteurs en 2 étapes a alors été proposé. Les BoNTs se lient d'abord aux gangliosides, avec une faible affinité, puis s'accumulent à la surface de la cellule et interagissent avec un récepteur de forte affinité situé à proximité, ou peuvent diffuser latéralement dans la membrane plasmique pour le rejoindre. La liaison aux gangliosides est de faible affinité, mais la forte densité des gangliosides à la membrane plasmique permet de fixer et concentrer une grande quantité de BoNTs à la surface cellulaire Fig IV.10.

Les récepteurs protéiques impliqués dans l'entrée dans les cellules neuronales ont été identifiés pour la plupart des BoNTs et sont des protéines associées aux vésicules synaptiques. Lors du recyclage des vésicules, après la libération du neurotransmetteur, les protéines

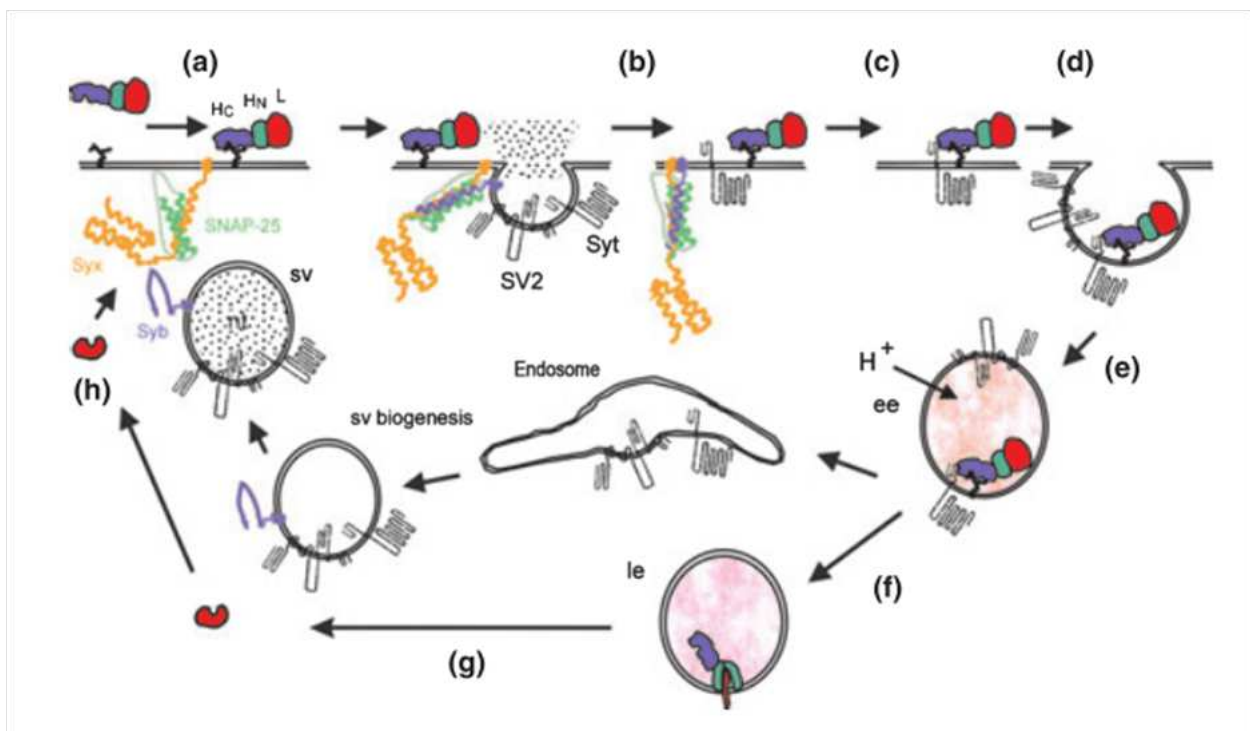


FIGURE IV.10 – Modèle d'entrée des BoNTs dans les cellules neuronales : les BoNTs se lient à un ganglioside à la surface de la cellule (a). A la suite de la libération de neurotransmetteurs, la partie intracellulaire des protéines des vésicules synaptiques est exposée à la membrane plasmique (b). Les BoNTs s'associent alors avec leur protéine réceptrice (exemple ici de la synaptotagmine, Syt) potentiellement par diffusion à la membrane après liaison aux récepteurs gangliosidiques (c). Une fois liées à leur récepteur, les BoNTs sont internalisées grâce au recyclage des vésicules synaptiques (e). La lumière de la vésicule s'acidifie grâce à une pompe à proton vésiculaire (vATP) (f) ce qui provoque un réarrangement structural permettant à la chaîne légère de transloquer dans le cytosol (g) et agir sur les protéines SNARE (h). D'après [Binz 2009]

vésiculaires sont exposées transitoirement à la surface cellulaire et sont accessibles pour les BoNTs. Dans le cas d'une stimulation de l'activité neuronale par ajout de K^+ par exemple, le recyclage des vésicules est augmenté et une plus forte entrée des BoNTs est observée.

Les synaptotagmines (Syt) sont des protéines senseurs de calcium qui synchronisent la libération des neurotransmetteurs avec le potentiel d'action [Geppert 1994]. Deux isoformes sont décrits dans les cellules neuronales, Syt-I et Syt-II Fig IV.11. A partir d'extrait de cerveau de rat, il a pu être mis en évidence que BoNT/B se lie à Syt-I (2,3 nM) et Syt-II avec

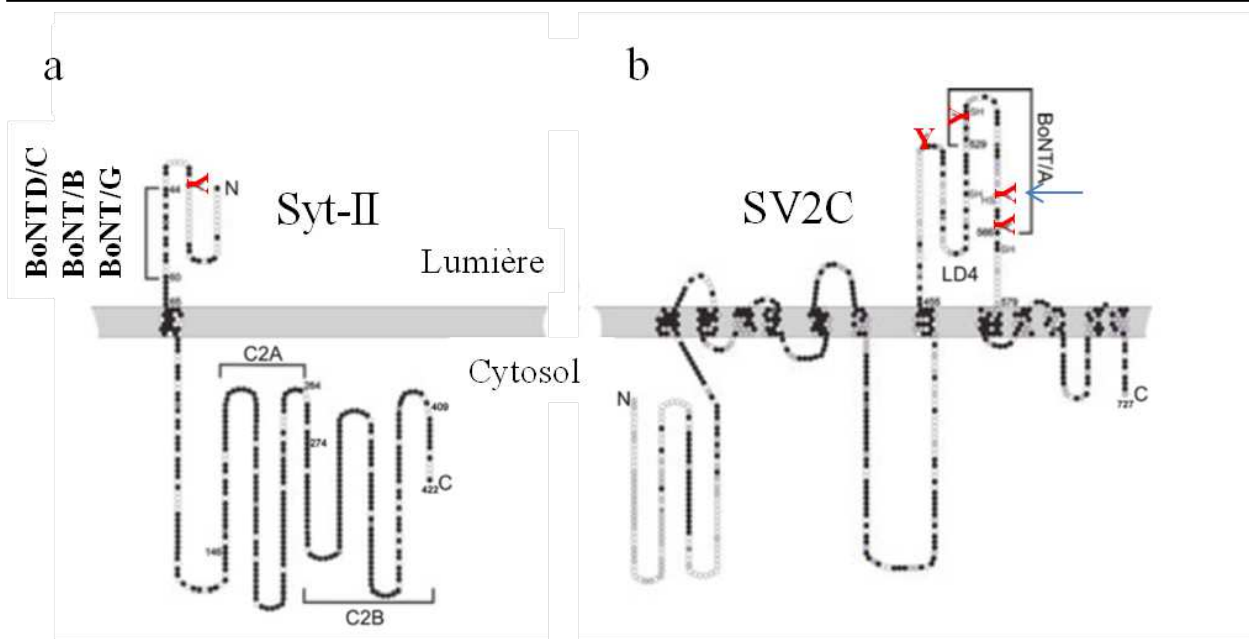


FIGURE IV.11 – Topologie membranaire des protéines réceptrices des BoNTs : la Synaptotagmine (Syt) (a) et SV2C (b). La Syt-II est une protéine de 422 aa, dont les 65 premier aa en N-terminal, sont dans la lumière de la vésicule. La partie C terminal contient deux domaines C2 (impliqués dans le ciblage des protéines à la membrane cellulaire). Les résidus conservés chez Syt-I sont indiqués en noir et les sites de N-glycosylation en rouge (Y). SV2C est une glycoprotéine à 12 domaines transmembranaires putatifs. Les résidus conservés sont en noir, et ceux conservés chez SV2A ou SV2B sont en gris. La grande boucle LD4 (large domaine 4) de 125aa contient 4 site de n-glycosylation (Y en rouge). Noter que l'entrée de BoNT/E dépend de la glycosylation du 3ème résidu (flèche bleue). D'après [Binz 2009].

une plus forte affinité (0,23 nM)[Nishiki 1996] [Dong 2003]. BoNT/G peut également se lier aux Syts avec les mêmes affinités ce qui corrèle avec le fort pourcentage d'identité (43,8%) observé entre ces deux types [Rummel 2004a] [Rummel 2004a] [Dong 2003]. BoNT/E est également capable de se lier à Syt-II mais avec moins d'affinité que BoNT/B. L'implication des Syts dans l'entrée de BoNT/B et G dans les cellules intestinales n'est pas établie.

SV2 (Synaptic Vesicle 2) est une protéine de 82 kDA, présente dans les vésicules de sécrétion des cellules neuronales et endocrines de tous les vertébrés. On distingue 3 isoformes (SV2A, SV2B, et SV2C) contenant 12 régions transmembranaires Fig IV.11. Ces protéines interviennent dans l'exocytose de neurotransmetteurs en couplant les étapes d'attachement et de fusion des vésicules et en stimulant la sensibilité au calcium des vésicules arrimées [Chang 2009]. Il a pu être rapidement mis en évidence que la boucle transmembranaire L4 de SV2C constitue le domaine minimum récepteur de BoNT/A [Dong 2006]. Elle constitue

également la protéine réceptrice pour l'entrée de BoNT/D, BoNT/E et BoNT/F dans les cellules neuronales [Dong 2006] [Peng 2011] [Dong 2008] [Fu 2009]. SV2C est exprimée dans les cellules intestinales et plus fortement dans les cellules m-IC*indicecl2* (mouse Intestinal Crypts cell ligne 2). L'ajout de la protéine recombinante de L4-SV2C diminue fortement la transcytose de BoNT/A à travers une monocouche de cellules Caco-2 ou m-IC*indicecl2* ([Couesnon 2008]. Il semble donc que SV2C ou une protéine apparentée permette également le passage de BoNT/A à travers les cellules intestinales. Cependant, les résultats obtenus par FACS montrent que la liaison aux cellules intestinales est plus faible qu'aux cellules neuronales indiquant que soit l'affinité est moins forte sur ce type cellulaire, soit que la quantité de récepteurs est plus faible sur les cellules intestinales. BoNT/E et BoNT/F peuvent également se lier aux isoformes de SV. BoNT/E se lie à SV2A et SV2B glucosylés (en N573 pour SV2A) mais pas à SV2C et l'entrée de BoNT/F est également liée à la glucosylation de SV2 [Fu 2009][Dong 2008].

Une mutation dans le GBL (W1266L, Y1267S) abolie l'entrée de HcA dans les cellules neuronales mais HcA conserve sa capacité à transcytoser à travers une monocouche de cellules intestinales [Ancharski 2011] [Rummel 2003]. Ainsi, des récepteurs différents sont envisagés pour l'entrée de BoNT/A dans les cellules intestinales et neuronales.

Récemment, une étude a permis de mettre en évidence que HcA est homologue au FGF (Fibroblast Growth Factor) et pourrait constituer un ligand pour les récepteurs de ces FGF (FGFR3, FGF Receptor) [Jacky 2013]. En effet, BoNT/A a une forte affinité pour FGFR3 dans les cellules neuronales et HcA interagit avec les 2 boucles extracellulaires de FGFR3. De plus, une compétition réalisée avec les ligands naturels de FGFR3, bloque l'entrée de BoNT/A dans les cellules neuronales. SV2C ne semble donc pas être le seul récepteur de haute affinité nécessaire pour l'entrée de BoNT/A dans les cellules neuronales.

L'identité des récepteurs impliqués dans l'entrée de BoNT/C ainsi que des BoNTs produits par les souches mosaïques est plus controversée. Il semblerait qu'aucune protéine ne soit nécessaire pour l'entrée de BoNT/C puisqu'après traitement aux protéases, aucune diminution de toxicité n'est observée. Les Syt-I/Syt-II semblent permettre l'entrée de BoNT D/C dans les neurones en utilisant la même interface que BoNT/B et BoNT/G [Peng 2012].

IV.5.2 Les voies d'endocytose

Les voies d'entrée par endocytose des BoNTs sont peu décrites dans la littérature. Toutefois, il a été démontré que BoNT/A entre dans les cellules neuronales par une voie dépendante de la clathrine surtout permise par le recyclage synaptique [Keller 2004] [Verderio 2007] [Petro 2006]. HcA colocalise avec la transferrine qui est un marqueur de la CDE [Couesnon 2009]. La voie d'entrée empruntée par BoNT/A dans les cellules intestinales

n'est pas aussi claire.

Les dominants négatifs de Cdc42 inhibent efficacement l'entrée de HcA dans les cellules intestinales mais ne diminuent par l'entrée dans les cellules neuronales et l'utilisation de dominants négatifs de Rac1 et RhoA n'affectent pas l'entrée dans les 2 types cellulaires [Couesnon 2009].

De plus, un traitement à M β CD, qui empêche l'internalisation de GPI-APs (Glycosylphosphatidylinositol- Anchored Proteins) dans les GEECs, ne perturbe pas l'entrée de HcA [Chadda 2007]. BoNT/A colocalise partiellement avec EEA1 et suivrait donc une voie différente de la voie GEEC empruntée par VacA ou GPI-APs [Gauthier 2005] [Gauthier 2005] [Sabharanjak 2002].

Enfin l'endocytose de BoNT/A est dépendante de la dynamine dans les cellules neuronales et intestinales [Simpson 1999] [Couesnon 2009].

Les voies d'endocytose empruntées par les autres types de BoNT restent à déterminer dans les cellules neuronales et intestinales.

IV.5.3 Le trafic intracellulaire et modèle de transcytose des BoNTs

Des études de transcytose ont été réalisées sur des monocouches de cellules intestinales de types Caco-2 ou T84, lignées caractéristiques des entérocytes, et montrent un faible taux de passage des BoNTs (entre 0,1 et 1% en fonction des lignées cellulaires). Toutefois, BoNT/A semble transcytoser plus facilement dans des cellules m- IC_{cl2} qui maintiennent un phénotype de cellules de crypte [Bens 1996] [Couesnon 2008].

Ces taux corrént avec les résultats obtenus dans les essais réalisés avec des pathogène entériques viraux ou bactériens, mais également avec les taux de BoNTs retrouvés dans la lymphe après administration par voie orale [Kerneis 1997]. Cette transcytose est dépendant de récepteurs et le transport à travers la monocouche de cellules intestinales est saturé au-delà de 30-60 min et inhibé à 4°C [Couesnon 2008] [Ahsan 2005] [Maksymowych 2004]. De plus, un excès de Hc de BoNT/A mais pas de BoNT/B ou de TeNT, empêche la liaison de BoNT/A aux cellules, renforçant l'idée d'une entrée spécifique via un récepteur, permise par le domaine Hc, dans les cellules neuronales et intestinales [Maksymowych 2004].

Ce modèle de transcytose est d'autant plus renforcé qu'aucune modification de la TEER ou de désorganisation des jonctions intercellulaires n'est observée dans les modèles *in vitro* en présence de BoNT/A monomérique. Ceci exclut donc un passage de BoNT/A par la voie paracellulaire.

Le transport de BoNT/A n'est pas inhibé par la Bafilomycine A1 qui est un inhibiteur des ATPases vésiculaire, ou la monensine qui est un agent alcalinisant. Ces 2 drogues empêchent l'acidification des vésicules d'endocytose. BoNT/A transite donc par un compartiment à pH neutre dans les cellules intestinales, alors que le clivage de SNAP-25 dans les cellules PC12 (neuronales) est inhibé en présence de ces drogues [Maksymowych 1998] [Coesnon 2008] [Keller 2004].

Enfin, des co-marquages réalisés sur les m- IC_{cl2} indiquent que HcA est majoritairement localisée dans les endosomes précoces. Ceci indique que BoNT/A est transporté dans un compartiment précoce identique dans les cellules intestinales et neuronales. Puis la toxine suit une voie acide dans les cellules neuronales pour permettre la translocation de la chaîne légère, alors que la voie des endosomes neutres semble être la voie privilégiée pour le trafic dans les cellules intestinale [Coesnon 2009].

Objectifs

Dans sa forme naturelle, le botulisme résulte le plus souvent d'une absorption des toxines botuliques à partir du tube digestif. La toxine botulique est soit produite dans un aliment (intoxication alimentaire ou botulisme alimentaire), soit synthétisée dans la lumière intestinale après colonisation de l'intestin par *C. botulinum*. Le botulisme alimentaire est la forme d'intoxication la plus fréquemment retrouvée.

L'intoxication par les toxines botuliques conduisant au botulisme peut être divisée en 4 grandes étapes : production de toxine par la bactérie, ingestion d'aliment contenant la toxine préformée, passage de la neurotoxine à travers la barrière intestinale et action protéolytique aux niveau des terminaisons nerveuses. Bien que les caractéristiques physiologiques de la bactérie et le mode d'action des neurotoxines aux terminaisons nerveuses soient des étapes bien documentées, les étapes de production des toxines et le passage des neurotoxines botuliques à travers la barrière intestinale sont encore peu comprises.

Dans ce travail de thèse, je me suis dans un premier temps intéressée à la régulation de la production de toxine botulique par *C. botulinum*. Les BoNTs s'associent à des protéines non toxiques, appelées NAP pour former des complexes de différentes tailles. La production de toxines botuliques est un processus hautement régulé impliquant un facteur σ alternatif (BotR) et potentiellement d'autres systèmes de régulation. Un grand nombre de TCSs sont impliqués dans la production de toxines chez de nombreuses bactéries à Gram+ et Gram-. Le séquençage de la souche *C. botulinum* Hall A, a permis d'identifier 30 TCSs dans son génome. Je me suis donc intéressée à l'implication de ces systèmes dans la production de toxine botulique de type A. Pour cela, l'expression des gènes codants les différents TCSs a été réprimée partiellement par la méthode d'ARN antisens, et la production de toxine et des protéines associées a été évaluée par test ELISA et western blot. Puis, des qRT-PCR (quantitative Real Time PCR) ont été réalisées afin de déterminer si cette régulation s'effectue à un niveau transcriptionnel et si elle est dépendante du facteur σ alternatif BotR, voir partie I.

Mieux comprendre les systèmes de régulation impliqués dans la toxinogénèse chez *C. botulinum* devrait permettre d'optimiser la production des toxines botuliques dans un but thérapeutique ou vaccinal ou à l'inverse, d'élaborer des inhibiteurs pour limiter la production en agroalimentaire.

Dans un second temps, j'ai essayé de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans l'entrée des neurotoxines botuliques à travers la barrière intestinale. De nombreux travaux ont permis d'élucider le mécanisme d'action des neurotoxines clostridiennes sur la neurosécrétion mais le passage des neurotoxines botuliques à travers la barrière intestinale est encore très mal connu. J'ai alors tenté de répondre à plusieurs questions. Est-ce que la toxine botulique est capable de traverser la barrière intestinale, et si oui, par quelle voie ?

Quelles sont les cellules impliquées dans ce passage ? Est-ce que les voies et les récepteurs impliqués dans cette entrée sont identiques à ceux impliqués dans l'entrée dans les cellules neuronales cibles ? Afin de caractériser l'interaction des BoNTs avec la barrière intestinale, j'ai utilisé une approche *in vivo* et *in vitro*. Dans les deux modèles, j'ai utilisé le domaine Hc de la toxine botulique de type B, marquée en fluorescence (HcBCy3). Ce domaine permet la liaison et l'internalisation de la toxine dans les cellules neuronales et intestinales.

Dans les expériences *in vivo*, l'entrée de BoNT/B a été suivie à l'aide du fragment HcB marqué en fluorescence et injecté dans des anses intestinales ligaturées de souris, pendant différents temps d'incubation. Des coupes d'intestin ont ensuite été obtenues et marquées à l'aide d'anticorps dirigés spécifiquement contre les différents types cellulaires présents dans la barrière intestinale, et observées en microscopie à fluorescence, voir partie II.

Dans les expériences *in vitro*, j'ai utilisé un modèle de lignées cellulaires neuronales et intestinales. Dans un premier temps, je me suis intéressée à identifier les récepteurs permettant l'entrée de ces BoNTs dans les cellules intestinales en comparaison avec les cellules neuronales, en effectuant des tests de compétition. Puis, les voies d'endocytose et le trafic intracellulaire empruntés par BoNT/B dans les cellules neuronales et intestinales ont été étudiées. Pour cela, j'ai utilisé des plasmides exprimant des dominants négatifs ainsi que des anticorps dirigés contre des protéines impliquées dans les différentes voies d'endocytose et dans le trafic intracellulaire, voir partie II.3.

Une meilleure compréhension des voies de passage et des mécanismes moléculaires intervenant dans le transport des neurotoxines botuliques à travers la barrière intestinale, devrait permettre de développer de nouvelles stratégies de prévention contre le botulisme.

Partie 3 : Résultats

La toxinogénèse chez *C. botulinum*

Sommaire

I.1	Article n°1 :	124
I.1.1	Résumé.	124
I.1.2	Analyse des souches isogéniques pour <i>botR/A</i>	124
I.1.3	Analyse des souches isogéniques pour les systèmes à deux composants	125
I.1.4	Conclusion	126
I.2	Revue n°1 : Régulation de la production des neurotoxines chez <i>C. botulinum</i> et <i>C. tetani</i>.	142
I.2.1	Résumé	142
I.2.2	Introduction	142
I.2.3	Les clostridies producteurs de neurotoxines	143
I.2.4	Organisation des gènes des neurotoxines	143
	I.2.4.1 Le locus botulique	143
	I.2.4.2 Le locus tétanique	144
I.2.5	La régulation de la production de toxines	145
	I.2.5.1 BotR et TetR régulent positivement l'expression des gènes de neurotoxines	145
	I.2.5.2 Les systèmes à deux composants (TCS)	146
	I.2.5.3 Le "quorum sensing"	146
	I.2.5.4 Les petits ARN régulateurs	147
	I.2.5.5 Les signaux environnementaux	147
I.2.6	Conclusion	148

I.1 Article n°1 :

Les systèmes à deux composants sont impliqués dans la régulation de la synthèse de la neurotoxine botulique chez la souche *Clostridium botulinum* Hall de type A, article publié [Connan 2012].

I.1.1 Résumé.

Clostridium botulinum synthétise une neurotoxine puissante, BoNT, qui s'associe à des protéines non toxiques (ANTPs) pour former des complexes de tailles variées. Les gènes codant BoNT et les ANTps sont regroupés sur le locus botulique qui est organisé en deux opérons. Chez *C. botulinum* type A, l'expression de *bont/A* et les gènes des *antps* est régulée par un facteur σ alternatif codé par *botR/A*, situé entre les deux opérons. BoTR/A régule l'expression *debont/A* et des *antps* à fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire. L'analyse génomique de la souche Hall de *C. botulinum* de type A, a permis d'identifier 30 paires de gènes prédits pour coder des TCSs et 9 gènes régulateurs orphelins. Par la méthode d'ARN antisens, nous avons obtenus 34 souches isogéniques pour ces systèmes (29 TCSs, et 5 gènes régulateurs orphelins). Parmi ces souches, deux montrent une cinétique de croissance accélérée par rapport à la souche contrôle et sont fortement diminuées dans la production de BoNT/A. De plus, ces souches sont fortement altérées dans la structure de leur paroi cellulaire. Trois autres souches isogéniques montrent une diminution de production de BoNT/A et des ANTps. Cette régulation s'effectue au niveau transcriptionnel pour les gènes *bont/A* et des *antps* mais aucune diminution de transcription de *botR/A* n'est observée. Ces résultats indiquent que la synthèse de BoNT/A est sous le contrôle d'un réseau complexe de régulateurs incluant au moins 3 TCSs.

I.1.2 Analyse des souches isogéniques pour *botR/A*

Dans un premier temps, 3 souches isogéniques ont été construites.

- Une souche contenant le plasmide vide pAT19, appelée Hall/pAT19 qui a servi à la construction de toutes les souches isogéniques de l'étude
- Une souche réprimant partiellement la transcription de *botR/A* par la méthode ARN antisens, appelée Hall/306
- Et une souche surexprimant *botR/A* pour laquelle une copie de *botR/A* a été insérée dans pAT19 (Hall/309).

Ces souches ont été analysées en cinétique de croissance, pour leur production de BoNT/A et d'ANTps. L'expression des gènes du locus botulique a également été suivie en qRT-PCR

(PCR quantitative en temps réel).

La surexpression de *botR/A* ou sa répression partielle, n'affecte ni la cinétique de croissance ni la morphologie des cellules (voir Fig 1A, et résultats non montrés).

La production de BoNT/A et des ANTPs a été analysée en test ELISA et western blot respectivement. Ces analyses ont montré qu'une surexpression de *botR/A* entraîne une augmentation de production de BoNT/A et d'ANTPs et qu'à l'inverse, une répression partielle de *botR/A* diminue fortement la production de BoNT/A et d'ANTPs (cf figure 1C à 1F).

L'expression des gènes du locus botulique (*bont/A*, *ntnh*, *botR/A* et *ha34*) a été suivie en qRT-PCR toutes les 2 heures jusqu'à 12 h de culture puis au temps 18 h, 24 h, 30 h et 48 h. Ces résultats coïncident avec ceux obtenus en test ELISA et western blot. La souche surexprimant *botR/A* surexprime *bont/A*, *botR/A*, *ntnh* et *ha34* et l'expression des gènes du locus botulique est diminuée pour la souche réprimée partiellement pour *botR/A* par rapport à la souche contenant le plasmide vide (voir Fig 2A à 2D). Ces différences sont toutefois moins marquées aux temps tardifs de culture.

Ces résultats sont donc en accord avec la fonction de BotR/A, qui est un régulateur positif de la production de toxine.

I.1.3 Analyse des souches isogéniques pour les systèmes à deux composants

Parmi les 39 gènes codant des potentiels TCSs, 34 souches isogéniques ont pu être obtenues par la méthode d'ARN antisens, dont 5 gènes régulateurs orphelins et 29 TCSs sur les protéines régulatrices (RR) des TCSs.

Dans un premier temps, des cinétiques de croissance ont été réalisées. Parmi ces 34 souches, 28 maintiennent une cinétique de croissance identique à la souche contrôle. Quatre souches sont faiblement ralenties dans leur croissance, et 1 souche est significativement ralentie dans sa croissance. Enfin, 2 souches montrent une forte accélération de croissance et un aspect visqueux des cultures en fin de phase exponentielle de croissance (cf figure 3A à 3C). Une analyse morphologique ultrastructurale de ces deux dernières souches a été réalisée. Contrairement à la souche contrôle où la paroi est réfringente et bien structurée en couches concentriques, les 2 souches présentant une croissance accélérée ont leur paroi fortement altérée, voire inexistante (cf figure 4).

Ces souches ont ensuite été analysées pour leur production de BoNT/A et d'ANTPs par Western Blot. La production de BoNT/A et des ANTPs est significativement réduite pour

5 souches isogéniques incluant les souches altérées dans leur paroi (voir Fig 3D et 5). Ces résultats sont confirmés fonctionnellement par le test de létalité sur souris et montrent une forte diminution de l'activité létale par rapport à la souche contrôle (cf table 3). Des résultats similaires ont été obtenus pour des souches isogéniques obtenues sur les HSKs correspondants (voir Fig 6B).

Une analyse transcriptionnelle en qRT-PCR a été réalisée sur les gènes du locus botulique des 3 souches montrant une diminution de production de toxine sans modification de la cinétique de croissance. Ces résultats ont permis de mettre en évidence que la répression partielle de l'expression des protéines RR de ces 3 TCSs, diminuent significativement l'expression de *bont/A*, *ntnh* et *ha34*. Toutefois, aucune diminution de l'expression de *botR/A* n'est observée.

I.1.4 Conclusion

Cette étude a permis de mettre en évidence qu'au moins 5 TCSs sont impliqués dans la régulation de la toxinogénèse chez *C. botulinum* Hall A. Deux TCSs ont des effets pleiotropes et agissent à la fois sur le métabolisme général et sur la production de toxine. Trois systèmes agissent de façon directe ou indirecte sur la production des complexes botuliques sans modifier le métabolisme général et ceci indépendamment du régulateur BotR/A.

Ainsi, la synthèse de BoNT/A et des ANTPs est contrôlée par un réseau complexe de régulation impliquant un facteur σ alternatif, BoTR/A et au moins 3 TCSs. De plus amples investigations sont nécessaires afin d'identifier le mécanisme d'action de ces systèmes sur la production des complexes botuliques, et d'identifier les facteurs environnementaux régulant ces systèmes. D'autres systèmes tels que les petits ARNs régulateurs ou le "quorum sensing" pourraient également jouer un rôle dans la régulation de la toxinogénèse chez *C. botulinum*.

Two-Component Systems Are Involved in the Regulation of Botulinum Neurotoxin Synthesis in *Clostridium botulinum* Type A Strain Hall

Chloé Connan¹, Holger Brueggemann², Christelle Mazuet¹, Stéphanie Raffestin¹, Nadège Cayet³, Michel R. Popoff^{1*}

1 Institut Pasteur, Bactéries anaérobies et Toxines, Paris, France, **2** Department of Biomedicine, Aarhus University, Aarhus, Denmark, **3** Institut Pasteur, Plateforme de Microscopie Ultrastructurale, Paris, France

Abstract

Clostridium botulinum synthesizes a potent neurotoxin (BoNT) which associates with non-toxic proteins (ANTPs) to form complexes of various sizes. The *bont* and *antp* genes are clustered in two operons. In *C. botulinum* type A, *bont/A* and *antp* genes are expressed during the end of the exponential growth phase and the beginning of the stationary phase under the control of an alternative sigma factor encoded by *botR/A*, which is located between the two operons. In the genome of *C. botulinum* type A strain Hall, 30 gene pairs predicted to encode two-component systems (TCSs) and 9 orphan regulatory genes have been identified. Therefore, 34 Hall isogenic antisense strains on predicted regulatory genes (29 TCSs and 5 orphan regulatory genes) have been obtained by a mRNA antisense procedure. Two TCS isogenic antisense strains showed more rapid growth kinetics and reduced BoNT/A production than the control strain, as well as increased bacterial lysis and impairment of the bacterial cell wall structure. Three other TCS isogenic antisense strains induced a low level of BoNT/A and ANTP production. Interestingly, reduced expression of *bont/A* and *antp* genes was shown to be independent of *botR/A*. These results indicate that BoNT/A synthesis is under the control of a complex network of regulation including directly at least three TCSs.

Citation: Connan C, Brueggemann H, Mazuet C, Raffestin S, Cayet N, et al. (2012) Two-Component Systems Are Involved in the Regulation of Botulinum Neurotoxin Synthesis in *Clostridium botulinum* Type A Strain Hall. PLoS ONE 7(7): e41848. doi:10.1371/journal.pone.0041848

Editor: Riccardo Manganelli, University of Padova, Italy

Received: December 13, 2011; **Accepted:** June 29, 2012; **Published:** July 26, 2012

Copyright: © 2012 Connan et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Funding was provided by the Institut Pasteur and a DGA fellowship to CC. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: H. Brueggemann and M. Popoff are PLoS ONE Editorial Board members. This does not alter the authors' adherence to all the PLoS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: mpopoff@pasteur.fr

Introduction

Botulinum neurotoxins (BoNTs) are the most potent toxins known, and seven BoNT toxinotypes (A to G) have been recognized based upon their antigenic properties. They are produced by distinct strains of *Clostridium botulinum* and by atypical strains of other *Clostridium* species that display heterogeneous bacteriological characteristics. BoNTs are synthesized as single chain proteins (ap. 150 kDa) and exported outside of the bacteria by an unknown mechanism. Each toxinotype is proteolytically cleaved into a heavy chain (H, ap. 100 kDa) and light chain (L, ap. 50 kDa), which remain linked by a disulfide bridge. The H chain recognizes through its C-terminal part (Hc) a specific cell surface receptor on nerve endings, and then facilitates toxin uptake into cells by receptor-mediated endocytosis. The L chain (Lc) translocates into the cytosol of motoneurons where they gain access to substrate. L chains are zinc dependent proteases which specifically cleave one of the three soluble N-ethylmaleimide sensitive factor (NSF) attachment protein receptors (SNARE), thus blocking evoked acetylcholine release at the skeletal neuromuscular junction [1,2].

BoNTs and associated non-toxic proteins (ANTPs) form complexes of various sizes (300 to 900 kDa). ANTps consist of a

non-toxic non-hemagglutinin component (NTNH), similar in size to BoNT, hemagglutinin components (HAs) or other non-hemagglutinin proteins called OrfX1, OrfX2, OrfX3 or P47 [3–6]. ANTps spontaneously associate with BoNT at low pH by non covalent bonds and form stable complexes that dissociate at high pH (pH 8 and above) (rev in [4]). ANTps are involved in BoNT protection against acidic pH and proteolytic degradation during passage through the stomach and intestine. In addition, HA33/35 and HA50, which bind to distinct carbohydrate structures, have been found to facilitate BoNT transport across the intestinal barrier [7,8]. It has been reported that HAs of type A and type B, but not type C, bind to the extracellular domain of human epithelial E-cadherin and increase the paracellular permeability of the intestinal barrier by a yet unknown mechanism [9].

The *bont* and *antp* genes are clustered in close vicinity and constitute the botulinum locus. According to *bont* sequence and botulinum locus gene organization each botulinum type is divided in subtypes [10]. In *C. botulinum* subtype A1 strain Hall, *bont* and *antp* genes are organized in two operons. The first operon (*ntnh/A-bont/A*), which is located at the 3' end of the *botulinum* locus, encompasses the *bont* gene immediately preceded by the *ntnh/A* gene. Both genes are transcribed in the same orientation, and the organization of this operon is highly conserved in all *C. botulinum*

types. The second operon contains the *ha* genes and differs slightly between various toxinotypes. In strain Hall, the *ha* operon contains successive genes for the 34 kDa (*ha34*), 17 kDa (*ha17*), and 70 kDa (*ha70*) HAs [11].

The *botR/A* gene is localized between the two operons in strain Hall and is transcribed in the same orientation than BoNT/A. BotR/A has been characterized as an alternative sigma factor of RNA polymerase, which positively regulates the transcription of *bont* and *antp* genes [12,13]. BotR/A forms with *Clostridium tetani* TetR, *C. difficile* TxrR (or TcdR) and *Clostridium perfringens* UviA, a new sub-group of the sigma 70 family of RNA polymerase involved in controlling clostridial toxin genes [13]. Transcription of *bont* and *antp* genes in strain Hall is highly regulated at the end of the exponential growth phase and beginning of the stationary phase [14]. This supposes that a complex regulatory network may be involved in the control of toxin synthesis in *C. botulinum*. Bacteria typically sense environmental changes using a phosphorylation system including at least two proteins known as two-component systems (TCSs). TCSs consist in a sensor histidine kinase (SHK), which detects a signal and autophosphorylates on a histidyl residue. The phosphate group is then transferred to a conserved aspartyl residue of the response regulator (RR) protein which is typically a DNA-binding protein that regulates target gene expression [15]. Some TCSs are known to be involved in the regulation of virulence factors in Gram-negative and Gram-positive bacteria. Sequencing of *C. botulinum* genomes has identified numerous potential regulatory systems, including TCSs. According to Sebaihi et al. *C. botulinum* strain Hall genome contains 28 putative TCSs, 8 orphan histidine kinases, 8 orphan response regulators, and 15 sigma factors [11]. In this study we investigated the potential role of 34 regulatory genes in the regulation of toxin synthesis; isogenic antisense strains were constructed using a mRNA antisense approach to silence the response regulator genes.

Results

Analysis of *botR/A* isogenic antisense strains

Investigation of putative regulatory genes of the toxinogenesis in *C. botulinum* Hall was performed with the anti-sense mRNA methodology developed for the study of *botR/A* with some modifications [12]. Partial inhibition of *botR/A* expression was obtained by transfection of Hall strain with the plasmid pMRP306, which contains the 5' end of *botR/A* gene and the ribosome binding site (RBS) region cloned in opposite direction downstream of the iota toxin gene promoter in the pAT19 vector [12]. In contrast, transfection with pMRP309, which harbors the whole *botR/A* gene under its own promoter in pAT19 vector, resulted in an overexpression of *botR/A*. Strain Hall/pAT19 contains the empty pAT19 vector. Cultures of strains Hall/306, and Hall/309 strains showed similar growth kinetics in TGY medium compared to the control strain Hall/pAT19 (Fig. 1A) or wild type strain Hall (data not shown) indicating that the vector alone or containing the anti-sense construct did not significantly modify the main metabolism of *C. botulinum* Hall. As expected, BoNT/A detected in the culture supernatant with ELISA, was drastically repressed in Hall/306 and overproduced in Hall/309 at 24, 30 and 48 h of growth compared to Hall/pAT19 as control (Fig. 1B). The effects of partial repression or overexpression of *botR/A* on ANTP production were checked by quantified western blotting with anti-NTNH and anti-HA34 antibodies. Partial inhibition of *botR/A* induced a significantly lower production of NTNH and HA34, whereas opposite effects were observed when *botR/A* was overexpressed (Fig. 1C–F).

Expression of the target genes was monitored by quantitative reverse transcriptase PCR (qRT-PCR) with the primers listed in Table 1; normalization was based on the expression of the house keeping gene *rpoB*. As shown in Fig. 2, *bont/A*, *ntnh*, and *ha34* genes were significantly repressed in Hall/306, mainly from the mid exponential growth phase (4–8 h) until the early stationary phase (18–24 h). Opposite effects were observed when *botR/A* was overexpressed. However, the effects of *botR/A* overexpression on *bont/A*, *ntnh*, and *ha34* genes were only significant during the exponential growth phase (4–12 h). As monitored by qRT-PCR, *botR/A* was markedly overexpressed during the exponential growth phase (4–12 h) of Hall/309 and to a lower extent during the stationary phase, whereas a decrease in *botR/A* expression was observed only within the exponential growth phase of Hall/306 (Fig. 2B).

Construction of TCS isogenic antisense strains

In further analyses we searched the genome of *C. botulinum* strain Hall for additional regulatory systems, in particular TCSs. 39 proteins could be considered as RRs: they all possessed the signal receiver domain Rec (cd09944) and an additional domain, usually the DNA binding domain HTH_XRE (cl00088) or LytTR (cl04498). This is in agreement with the recent analysis of Galperin et al. [16] showing that bacterial signal transduction proteins retain a conserved protein family profile. Indeed, of the 39 RRs that we have identified in the Hall strain genome, the majority (26) belongs to the OmpR family (COG0745) consisting of RRs with a CheY-like receiver domain and a winged-helix DNA-binding domain, and 4 other RRs were LytR family members (COG3279). Nine RRs were orphan regulators and 30 RR genes were located next to a gene coding for a SHK, as judged by the presence of two domains in the respective gene product, a histidine kinase-like ATPase (HATPase_c, cd00075) and a histidine kinase A (dimerization/phosphoacceptor) domain (HisKA, cl00080). Most TCSs of *C. botulinum* strain Hall have close homologues in other *Clostridia*. Besides *C. sporogenes*, which is phenotypically related to *C. botulinum* but non-toxicogenic, homologs TCSs exist in particular in *C. carboxidivorans*. However, 12 RRs have low similarity to proteins in other clostridia. Two RRs (CLC_0632 and CLC_1105) show homology (38 and 37% protein identity, respectively) to the VirR regulator, which is part of the *Clostridium perfringens* TCS VirR-VirS involved in the regulation of numerous toxins in this bacterium [17–24].

Plasmids able to generate anti-sense mRNA from 34 predicted regulatory genes were constructed similarly to pMRP306 and transfected into strain Hall. DNA segments for anti-sense mRNA production were designed in the RR gene of 25 TCSs, in the SHK gene in 4 other TCSs, as well as in 5 orphan regulatory genes (Table 2).

Growth kinetics of Hall isogenic antisense strains in TGY broth medium supplemented with erythromycin (10 µg/ml) were monitored by spectrometry at 600 nm over a 24 h period. 32 Hall isogenic antisense strains showed similar growth kinetics compared to the control strains (Hall/pAT19 and wild type Hall) (Fig. 3A, 3B and data not shown). However, growth of strain Hall/1001 was drastically delayed, and to a lesser extent that of Hall/652, Hall/716 and Hall/723, whereas two other isogenic antisense strains (Hall/1147 and Hall/1148) grew faster than the control Hall/pAT19 (Fig. 3B). However, the five isogenic antisense strains reached a similar OD than the other isogenic antisense strains at 24 h. Cell counts were performed with three representative strains. Hall/pAT19 and Hall/707 showed similar growth kinetics than those monitored by OD_{600 nm} measurements, which were characterized by an exponential growth curve reaching a plateau

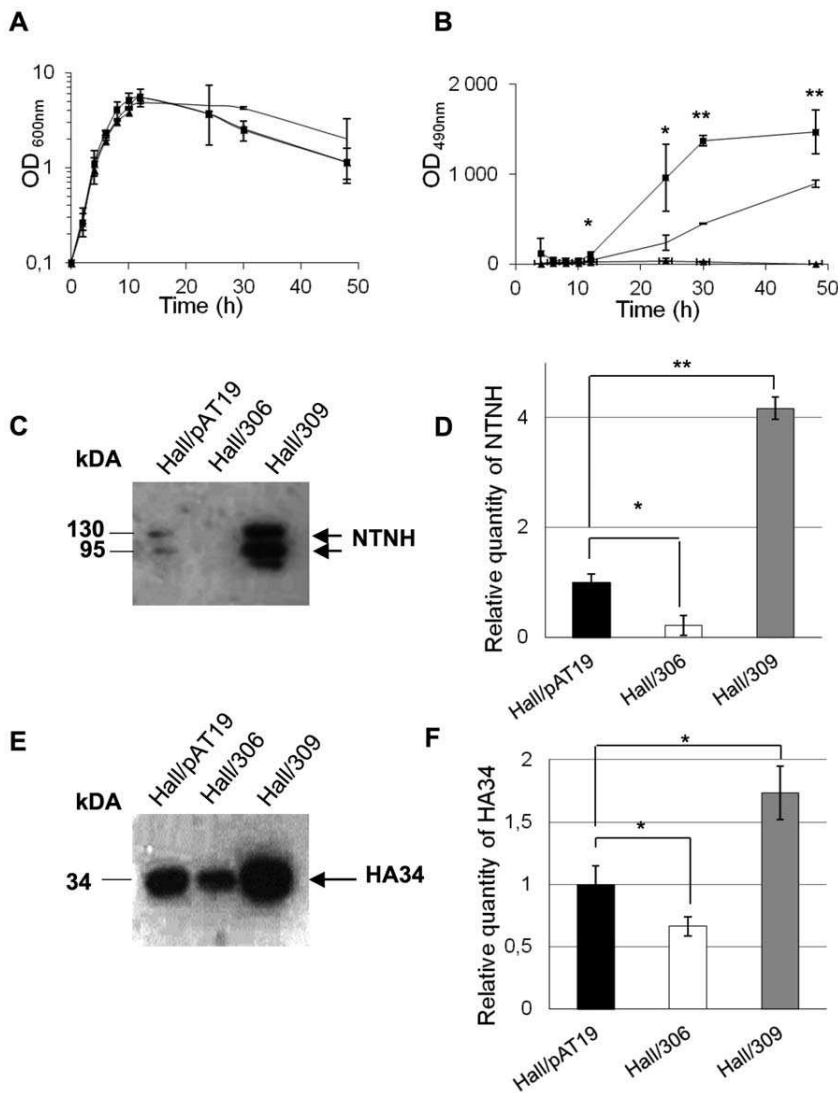


Figure 1. Growth kinetics, BoNT/A, NTNH, and HA34 production in Hall *botR/A* isogenic antisense strains. (A) Growth curves of Hall/pAT19 (empty vector), Hall/306 (antisense *botR/A* mRNA), and Hall/309 (*botR/A* overexpression) were determined by measurement of optical density at 600 nm (OD₆₀₀). (B) BoNT/A was assayed in the culture supernatants by ELISA and expressed as OD at 490 nm. Production of NTNH (C) and HA34 (E) were determined in the supernatant of 12 h cultures by Western blotting with specific antibodies and quantification with ImageJ (D, F) (means \pm SD; n = 3), *P < 0.05 and **P < 0.005. Note that western blotting with anti-NTNH antibodies show native (130 kDa) and partially processed NTNH in its 115 kDa fragment. doi:10.1371/journal.pone.0041848.g001

at 8–12 h followed by a slow decrease in viability (Fig. 3C). However, Hall/1147 exhibited a different pattern characterized by a growth curve plateau at 8 h, which was slightly lower than that of Hall/pAT19 and which was followed by a rapid and drastic decrease in viability (Fig. 3C).

BoNT/A production is reduced in five TCS isogenic antisense strains

Among the 34 Hall isogenic antisense strains, 5 showed reduced BoNT/A production in the culture supernatant in comparison to Hall/pAT19 as tested by ELISA, namely Hall/707, Hall/714, Hall/1146, Hall/1147 and Hall/1148 (Fig. 3D). The lower levels of BoNT/A in the culture supernatants of these isogenic antisense strains were confirmed by the mouse bioassay, indicating reduced amounts of biologically active toxin (Table 3). A TCS was targeted

in these 5 isogenic antisense strains with decreased BoNT/A production. In contrast, the 5 orphan regulatory gene isogenic antisense strains retained the same levels of BoNT/A production than the control strain Hall/pAT19. The five isogenic antisense strains produced a significantly lower level of BoNT/A than Hall/pAT19 and Hall/306 (Fig. 3D). Indeed a 8 to 10 fold decrease of BoNT/A production was measured in the supernatant of these five isogenic antisense strains at 12 and 24 h compared to Hall/306. The strains Hall/1001, Hall/652, Hall/716 and Hall/723 which exhibited a delayed growth kinetic, were also delayed in toxin production but yielded a similar BoNT/A level at 24 h compared to Hall/pAT19 (data not shown). These results indicate that these mutants displayed a delayed BoNT/A synthesis or impaired secretion, but were not affected in the global toxin synthesis rate.

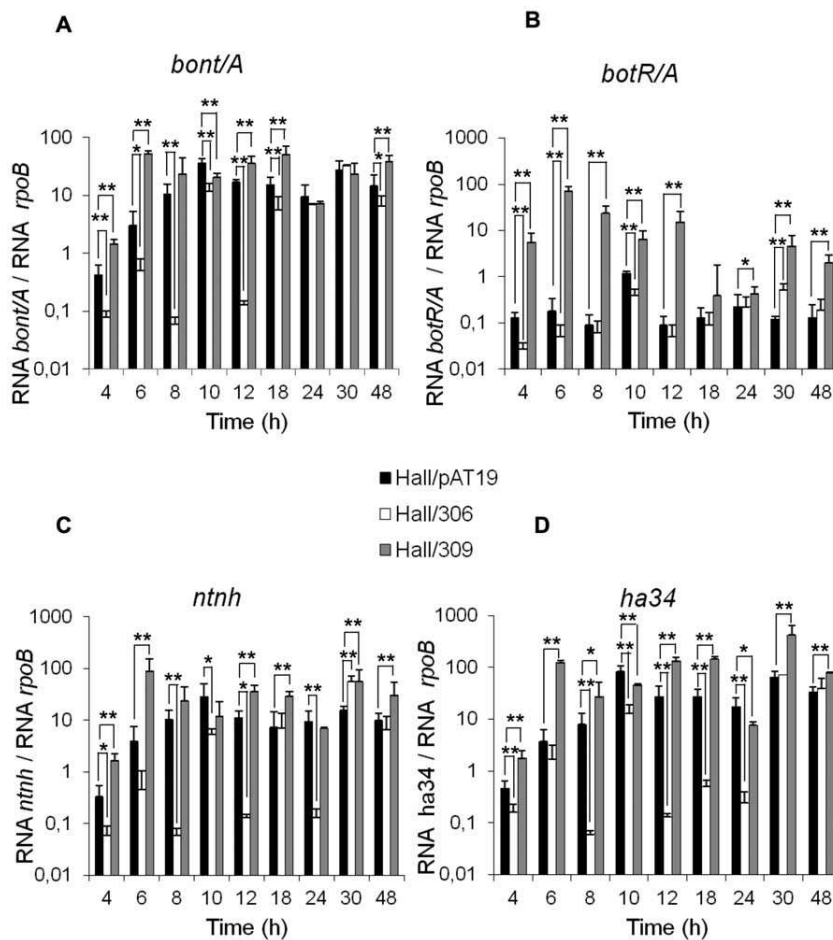


Figure 2. Kinetics of transcript levels of *bont/A*, *botR/A*, *ntnh*, and *ha34* genes in Hall *botR/A* isogenic antisense strains. Transcript levels were quantified by qRT-PCR at 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 30 and 48 h of culture and normalized versus housekeeping *rpoB* gene in Hall/pAT19 (empty vector), Hall/306 (antisense *botR/A* mRNA), and Hall/309 (*botR/A* overexpression). Data are mean values \pm SD from 9 independent experiments, * $P < 0.05$ and ** $P < 0.005$.

doi:10.1371/journal.pone.0041848.g002

Two TCS isogenic antisense strains, Hall/1147 and Hall/1148, show an altered bacterial cell wall/surface layer

Two strains out of the five isogenic antisense strains with a decreased BoNT/A production grew differently compared to control strains. Cultures of the TCS isogenic antisense strains Hall/1147 and Hall/1148, were very viscous at the end of the exponential growth phase, and the OD_{600} was significantly higher than the control strain Hall/pAT19 (Fig. 3B). Cell counting confirmed that Hall/1147 grew rapidly until 8 h similarly to Hall/pAT19, although growth yield of Hall/1147 was one log level reduced compared to the control strain. But Hall/1147 viability decreased rapidly in the stationary growth phase, with over two log differences at 12 h compared to the control strain (Fig. 3B). Hall/1148 showed a similar growth profile than Hall/1147 (data not shown). This growth behavior suggests that Hall/1147 and Hall/1148 lyse readily and early. Therefore, we analyzed the strains by transmission electron microscopy during the mid exponential growth phase (5 h of culture). After high pressure freezing and freeze substitution, the cell wall of the control cells showed a layered organization. The outer part had an electron dense appearance, whereas the inner part next to the plasma membrane was electron lucent (Fig. 4A). The electron dense outer layer was

less developed or absent in the Hall/1147 and Hall/1148 strains (Fig. 4B–C). In addition, the cytoplasm of Hall/1148 bacteria was less homogenous compared to the control cells and showed apparently empty areas of various sizes and shapes (Fig. 4C). This indicates that the TCSs, which were partially repressed in Hall/1147 and Hall/1148, induced pleiotropic effects including the regulation of bacterial cell wall or cell surface synthesis as well as toxin synthesis as shown in Fig. 3C.

Three TCSs control *botR/A*, *bont/A* and *antp* expression at the transcriptional level

Three TCS isogenic antisense strains (Hall/707, Hall/714, Hall/1146) showed reduced BoNT/A levels during the exponential and stationary growth phases, similarly to the isogenic antisense strain repressed in *botR/A* (i.e. Hall/306) (Fig. 3B). No increase in culture viscosity and no microscopic alterations of the bacterial cell wall was observed in these three strains (data not shown).

In addition, the three isogenic antisense strains Hall/707, Hall/714, and Hall/1146 showed also a drastic reduction of ANTP accumulation in the culture supernatant including NTNH and HA34 (Fig. 5). This further supports the assumption that the three

Table 1. Primers used to amplify internal fragments of the target genes by quantitative reverse transcriptase PCR.

Gene	Primer*	Séquence (5'-3')	Product length (bp)	T _m (°C)	PCR efficiency (%)
<i>rpoB</i>	F	TTCTCCATCGCTATCTCGT	175	57.5°C	105.1
	R	AAACATGCAACGTCAAGCAG			
<i>bont/A</i>	F	AATGGTTATGGCTCTACTCAATAC	134	52.7°C	99.6
	R	GCTAATGTTACTGCTGGATCTG			
<i>botR/A</i>	F	TGACAACGAGGAGTTTCAAGA	146	55.1°C	95.6
	R	TGAAATTGCTCAAATCAACTTTTT			
<i>ha34</i>	F	AAGTCGTACAACAAGTGGATATG	148	53°C	105.3
	R	GTTAGAACTCCGTTGAAAAGTATTG			
<i>ntnh/A</i>	F	AATGTTGTAGTAGTTAGAGCTAG	107	45.1°C	96.5
	R	CTCAAAGATTCGCCATAATATC			
CLC_1093	F	CTGCAATGGATGGTGAAGAA	912	60.1°C	89.10
	R	CTTGCCACAAGCTCCCTTAC			
CLC_1094	F	GATGGATTAATTGCGGTGGA	865	60.5°C	106.40
	R	TCATCTCATCCTCTCTCTCTCC			
CLC_0661	F	AGCTAAAGATGCAAAAGATGCT	889	58.7°C	95.30
	R	CACAATATCGTTACGGGCAGT			

PCR efficiencies correspond to the optimized PCR parameters indicated in Materials and Methods (see also Table S1).

F, forward; R, reverse.

doi:10.1371/journal.pone.0041848.t001

isogenic antisense strains were profoundly impaired in BoNT/A and ANTP synthesis. To confirm that the observed phenotype, i.e. decreased BoNT/A and ANTP production, did not result from spontaneous secondary mutations or antisense off-target effects, isogenic antisense strains were constructed that targeted the corresponding SHK gene. The isogenic antisense strains Hall/707K, Hall/714K, and Hall/1146K showed growth kinetics similar to those of the control strain Hall/pAT19 (Fig. 6A). BoNT/A production was reduced in the culture supernatants of the three isogenic antisense strains targeting the SHK gene compared to the control strain as monitored by ELISA (Fig. 6B). The decrease in BoNT/A production was lower in the strains Hall/707K and Hall/714K than in their counterparts Hall/707 and Hall/714 with antisense mRNA targeting the corresponding RR gene. Therefore, repression of the RR gene of some TCSs seems more efficient than that of the SHK gene. In contrast, for the TCS CLC_0661/CLC0663, targeted in the strains Hall/1146 and Hall/1146K, the inhibition of BoNT/A synthesis was significantly more pronounced when the SHK gene was repressed (Hall/1146K) compared to the strain with the repressed RR gene (Hall/1146). This might indicate that this TCS particularly senses an environmental factor critical for BoNT/A synthesis in the applied culture conditions.

To prove whether the repression of TCSs results in a decreased BoNT/A and ANTP production due to transcriptional repression, the expression of *bont/A* and *antp* genes was monitored by qRT-PCR. As shown in Fig. 7, the expression of *bont/A*, *ntnh*, and *ha34* genes was repressed in isogenic antisense strains Hall/707, Hall/714, and Hall/1146 similarly to that observed in the isogenic antisense strain repressed in *botR/A* (Hall/306). However, no alteration or even a slight increase in *botR/A* expression was observed in these isogenic antisense strains (Fig. 7B). In contrast to Hall/309, BoNT/A and ANTP synthesis (Fig. 3 and 5) was reduced in these isogenic antisense strains (Fig. 1). This suggests that the TCSs partially repressed in Hall/707, Hall/714, and

Hall/1146 control the transcription of *bont/A* and *antp* genes independently of *botR/A*.

The expression of the RR genes CLC_1093, CLC_1094, and CLC_0661 (partially repressed in strains Hall/707, Hall/714, and Hall/1146, respectively) was monitored and compared to *rpoB* gene expression (Fig. 8). The levels of expression were similar to that of *botR/A* (Fig. 2B). The three RR genes were expressed at similar levels throughout the exponential and early stationary growth phase concomitantly with *bont/A*, *ntnh* and *ha34* gene expression. Subsequently, at the beginning of the stationary phase (24 h), their expression seemed to diverge. However, the low differences in expression levels, slightly decreased for CLC_1914, and slightly increased for CLC_1093 and CLC_0661, were not statistically significant (Fig. 8).

Discussion

BoNT synthesis in *C. botulinum* has been found to be a highly regulated process. *Antp* and *bont* genes are clustered in the botulinum locus and are transcribed as two polycistronic operons as evidenced by qRT-PCR or Northern blot analysis [25–27]. The *botR* gene, which is located in the botulinum locus in *C. botulinum* A, B, C, D, F and G plays a critical role in the regulation of BoNT and ANTP synthesis. Indeed, BotR/A has been demonstrated to be an alternative sigma factor controlling the transcription of the two operons of the botulinum locus at the transition phase from the exponential to the stationary growth phase [13,14]. However, in *C. botulinum* type E, the transcription of *bont* and *antp* genes is also regulated during the transition phase, although *botR* or a homologous gene has not been identified in the genome of this *C. botulinum* type [14]. This strongly supports that *botR* is not the only regulatory gene controlling the expression of toxin gene in *C. botulinum*. Since at least 39 putative regulatory genes, distributed in TCS or orphan RR genes, have been identified in the genome of

Table 2. Two-component system and orphan response regulator genes in *C. botulinum* strain Hall, homology with regulatory genes in other bacterial species, Hall isogenic antisense strains, and primers used for the construction of recombinant plasmids generating antisense mRNA.

Isogenic antisense strains	Gene Bank accession number ^a	family (RR)	Homologs (RR) in other clostridia ^b	Nucleotide sequence (5'→3')
Hall/651	RR CLC_1229 (SHK CLC_1230)	LytR	<i>C. ljungdahlii</i>	CCGCTGCAGGGAAAAATGTTGTTAGTATTTTTTCATG CCCCATGGTCATTATCCTCACAAATCATTACTC
Hall/652	SHK CLC_0669 (RR CLC_0668)	YcbB domain	/	CCGCTGCAGAAGCTTGATAAGGAGATGAAAATAATG GGCCATGGATACCAAAGATATATTGAAATGATTAAC
Hall/653	SHK CLC_3251 (RR CLC_3250)	LytR	/	CCGCTGCAGGAGAAATTTATGATATATATACAATTATTAG CCCCATGGCAGATTTGTTTTAATAAATTTATTAAGAAG
Hall/660	RR CLC_1431 (SHK CLC_1432)	OmpR	/	CCGCTGCAGCAGGAGTGATATATATGAGTTATAAG GGCCATGGCTACTAGTCTCGTATCC
Hall/661	RR CLC_2236 (SHK CLC_2235)	OmpR	<i>C. sp. 7_2_43FAA C. perfringens C. beijerinckii C. sp. L2-50 C. cellulovorans C. ljungdahlii</i>	CCGCTGCAGGCGGATAAGAATGGTTAAGAT GGCCATGGCCCGTTCTACCATTATTTGCTTTTAC
Hall/662	Orphan RR CLC_2624	CheB	<i>C. carboxidivorans C. novyi NT C. ljungdahlii C. kluveri</i>	CCGCTGCAGGAGTGATTCAATTTGAATAAAAATTAAG GGCCATGGCTGTATCTATTACTTCTAAATCATTTTC
Hall/663	RR CLC_0376 (SHK CLC_0377)	OmpR	<i>C. carboxidivorans C. difficile</i>	CCGCTGCAGCCTATAATGAATAAGGAGAAAAATG GGCCATGGCTATCTTACATCAAAATCCATATTAG
Hall/664	RR CLC_2386 (SHK CLC_2385)	OmpR	<i>C. kluveri C. acetobutylicum C. ljungdahlii C. carboxidivorans C. tetani C. butyricum C. cellulovorans C. sp. 7_2_43FAA C. beijerinckii C. perfringens</i>	CCGCTGCAGGAGGGTACCATGGCTATGGAA GGCCATGGCCATTCAAAGCACAAATACAGTTATAAC
Hall/666	RR CLC_1871 (SHK CLC_1870)	OmpR	/	CCGCTGCAGAGGTGTTTATATGCGAGAAAA GGCCATGGCTTCTCTACCATTACTAGCTGAATAAC
Hall/667	RR CLC_0842 (SHK CLC_0843)	OmpR	/	CCGCTGCAGGGGATTTTGACAAAAATATTATTAG GGCCATGGCTCTTTAACTTCATAATTTCTTGTT
Hall/673	SHK CLC_0306 (RR CLC_0307)	NarL	<i>C. butyricum</i>	CCGCTGCAGGTGAGAATATGAGAAAAGCAATGAAGC GGCCATGGTTCCAGTCAATCCATGAAACAACAAAAG
Hall/706	RR CLC_1640 (SHK CLC_1639)	OmpR	<i>C. carboxidivorans C. novyi NT C. tetani C. bartlettii C. difficile C. papyrosolvans</i>	CCGCTGCAGAAAGGATGGGACAAGTATGATTG GGCCATGGCCATCTTTAGCTTTAAAAACAGTTATACC
Hall/707	RR CLC_1093 (SHK CLC_1094)	OmpR	<i>C. carboxidivorans C. beijerinckii</i>	CCGCTGCAGGAGAGAAGATGAAGAAACTC GGCCATGGCCATCCATTGCAGTTATCACTTCATAATC
Hall/707k	SHK CLC_1094 (RR CLC_1093)			CCGCTGCAGATTTGGAGGAAAAAATTAATG GGCCATGGATCCTCTTTATACATATCTTC
Hall/708	RR CLC_0423 (SHK CLC_0424)	OmpR	<i>C. carboxidivorans C. tetani C. acetobutylicum C. ljungdahlii C. sp. 7_2_43FAA C. butyricum C. cellulovorans C. beijerinckii</i>	CCGCTGCAGGAGATGATAAGAAATGTGACGAG GGCCATGGATGCCTTAAAGTTATATAACCTTCATTG
Hall/714	RR CLC_1914 (SHK CLC_1913)	OmpR	/	CCGCTGCAGGAGATGGATTACAATGCCAAAGAG GGCCATGGCCACCTCCACTAAATATCCACTTTCC
Hall/714k	SHK CLC_1913 (RR CLC_1914)			CCGCTGCAGTAAGGGGAGTGGGGTATAAAA GGCCATGGATTATATCTAATTTAGG
Hall/716	RR CLC_2079 (SHK CLC_2078)	OmpR	<i>C. ljungdahlii C. carboxidivorans C. beijerinckii C. bartlettii C. butyricum C. perfringens C. sp. 7_2_43FAA</i>	CCGCTGCAGGAGGTAGAGTAAGTAAATGAAAAAATTC GGCCATGGCTCTACAGGTGCATTACTCTGTATCC
Hall/717	RR CLC_1415 (SHK CLC_1414)	NarL	<i>C. acetobutylicum C. sp. 7_2_43FAA C. difficile</i>	CCGCTGCAGGGGAAAAATAAATGAATAAACTAATA GGCCATGGCCGCAAGACCTACAACCTCAATATCAATTG
Hall/720	RR CLC_0354 (SHK CLC_0355)	OmpR	<i>C. acetobutylicum C. kluveri</i>	CCGCTGCAGGGGTGATAAATATGGGAAGAAAAATC GGCCATGGTTACTTCATACCCTTCACGTTGTAGATAC
Hall/722	RR CLC_3521 (SHK CLC_3520)	OmpR	<i>C. carboxidivorans C. kluveri C. novyi NT C. ljungdahlii C. tetani C. sp. 7_2_43FAA C. beijerinckii C. butyricum C. acetobutylicum C. perfringens C. cellulovorans C. thermocellum</i>	CCGCTGCAGGAGGATATACCAATGGAAGG GGCCATGGTGTCTGATCCTGAATTTTCCAATAC
Hall/723	RR CLC_1024 (SHK CLC_1025)	OmpR	<i>C. phytofermentans C. difficile</i>	CCGCTGCAGAGGGATTAATATGGATGCAATATCTTT GGCCATGGCTCTTTTTAAGTACTGTTCTTATTAATC
Hall/724	RR CLC_1088 (SHK CLC_1089)	OmpR	<i>C. sp. 7_2_43FAA C. carboxidivorans C. acetobutylicum C. ljungdahlii C. beijerinckii C. tetani C. cellulovorans</i>	CCGCTGCAGAAGTGAAATAAATGAGTAACATTTTAAAT GGCCATGGTAGTGAATATACTTTATATCTCTCTTTC
Hall/1001	Orphan RR CLC_0632	LytR	/	CTGCAGAACTAATAAAGGGAGGACAT CCATGGCTTAAATAATTTTATTAGAT

Table 2. Cont.

Isogenic antisense strains	Gene Bank accession number ^a	family (RR)	Homologs (RR) in other clostridia ^b	Nucleotide sequence (5'→3')
Hall/1002	RR CLC_1105 (SHK CLC_1104)	LytR	<i>C. carboxidivorans</i> <i>C. ljungdahlii</i>	CTGCAGTACTTACTTTGGAGGTGATTC CCATGGTTTTTAAATCGTAAAGCTTC
Hall/1003	RR CLC_0665 (SHK CLC_0666)	OmpR	<i>C. sp. 7_2_43FAA</i> <i>C. beijerinckii</i> <i>C. difficile</i> <i>C. bartlettii</i>	CTGCAGATATAATTGGAGGAAAATATG CCATGGTTAAACACATTATACCCCTCA
Hall/1004	RR CLC_0331 (SHK CLC_0232)	OmpR	<i>C. tetani</i> <i>C. acetobutylicum</i> <i>C. carboxidivorans</i> <i>C. ljungdahlii</i>	CTGCAGTATTAGAGGAGATTTTCTA CCATGGTATACAAAATTATCAACACC
Hall/1140	RR CLC_0323 (SHK CLC_0324)	OmpR	/	CCGCTGCAGGTACCTATATGGAGGTATAATTTTATG GGCCATGGCCTCATTCTTAAATACAAATTTATAAC
Hall/1141	Orphan RR CLC_0958	OmpR	<i>C. cellulovorans</i> <i>C. beijerinckii</i> <i>C. sp. M62/1</i> <i>C. symbiosum</i>	CCGCTGCAGAACCTATTAAGAGGAGGTCTAGATAATG GGCCATGGCCATTTTATTAAGTACTGTAC
Hall/1142	RR CLC_2212 (SHK CLC_2211)	OmpR	/	CCGCTGCAGATATAAGGTGATATTATGGAAAGG GGCCATGGCGTATCCTCTTTTATCAAGG
Hall/1143	Orphan RR CLC_0577	WspR	/	CCGCTGCAGTTAAATATGAGAGTGATAAGCGTGC GGCCATGGTTTATGTCTTTTCTCTAAAGATCo
Hall/1144	Orphan RR CLC_0580	Pas_4 and / Hpt domains	/	CGCTGCAGTAGGGAAGGATAAAAATTTATGGTAAAG GGCCATGGCTTTATCCAAAATGAATATGGAAACG
Hall/1145	SHK CLC_1867 (RR CLC_1866)	OmpR	<i>C. beijerinckii</i> <i>C. bartlettii</i> <i>C. butyricum</i> <i>C. novyi</i> <i>C. tetani</i>	CCGCTGCAGATGGGGGGAATAGTTTGGC GGCCATGGGCTTCTACTTCTAAATATATTTTC
Hall/1146	RR CLC_0661 (SHK CLC_0663)	OmpR	<i>C. tetani</i> <i>C. carboxidivorans</i> <i>C. sp. 7_2_43FAA</i>	CCGCTGCAGAAGCAATAGGAGGAATTTATAATGG GGCCATGGATCCATCCGCTCTTAGAGCAG
Hall/1146k	SHK CLC_0663 (RR CLC_0661)			CCGCTGCAGAGGAATTCAGAAGCATAAC
GGCCATGGTAACT-ATAAATGTTCC				
Hall/1147	RR CLC_0410 (SHK CLC_0411)	OmpR	<i>C. perfringens</i> <i>C. sp. 7_2_43FAA</i> <i>C. ljungdahlii</i>	CCGCTGCAGTGAGGTGAAGCCATGG GGCCATGGCTGCTTCTATTACATCAAATTTGTTTCATC
Hall/1148	RR CLC_3294 (SHK CLC_3293)	OmpR	/	CCGCTGCAGAGGGGAGTGCTAATTGAG GGCCATGGACATCATATCCTCTTTTAAT

^aIn bold the accession number of the gene which has been targeted in the isogenic antisense strains and in bracket the associated gene of the corresponding TCS.

^bProtein identity >60% (*C. sporogenes* is omitted due to its high similarity to *C. botulinum*).

doi:10.1371/journal.pone.0041848.t002

C. botulinum strain Hall, we have investigated their possible role in the control of BoNT/A synthesis.

A total of 34 Hall isogenic antisense strains have been generated with the antisense mRNA method targeting 29 regulatory genes predicted to be part of TCSs and 5 putative orphan RR genes. Among the 34 Hall isogenic antisense strains, 31 retained similar growth kinetics compared to the control strain, whereas 2 strains showed a more rapid growth and one isogenic antisense strain had a significantly delayed growth (Fig. 3B). BoNT/A was detected in a delayed manner in the culture supernatant of the isogenic antisense strain with a delayed growth kinetic (Hall/1001), but reached a similar OD than the control strain at 24 h, indicating that the repressed corresponding orphan RR (CLC_0632) is involved in global metabolism but does not directly control toxin synthesis. Interestingly, CLC_0632 shares sequence similarity with VirR (38% protein identity), which regulates the production of toxins in *C. perfringens* including prefringolysin, alpha-toxin and collagenase [17,18,28]. VirR belongs to a complex regulatory network controlling more than 147 genes such as genes for catalytic enzymes, transporters and energy metabolism and thus controlling multiple cellular functions [19,20]. CLC_0632 does not have closer homologs (protein identity >60%) in other clostridia (Table 2). CLC_1105 also shows similarity to VirR (37% on protein level). However, Hall/1002 targeting CLC_1105 showed no alteration in growth kinetics and toxin production.

The VirR homologs in *C. botulinum* Hall probably regulate basic functions but not specifically BoNT production.

The two isogenic antisense strains with a more rapid growth (Hall/1147 and Hall/1148) showed drastic changes in the bacterial cell wall or surface structure, which is probably the reason for the observed cell lysis. Reduced toxin levels were measured in the lyzed culture supernatant of both isogenic antisense strains reflecting lower BoNT synthesis rather than an impaired secretion. The corresponding RRs (CLC_0411 and CLC_3293), members of the OmpR family (Table 2), are probably part of regulatory cascades, which control multiple functions including bacterial surface polysaccharide synthesis and/or assembly and indirectly BoNT production. Besides the HATPase_c and the HisKA domains, the SHK CLC_0411 possesses a partial VicK domain (COG5002). Interestingly, VicK of *Streptococcus mutans* has been identified as a TCS sensor involved in the regulation of several virulence-associated genes affecting synthesis and adhesion to polysaccharides [30]. SHK CLC_3293 shows similarity to the BaeS family (COG0642) of sensors. Interestingly, the BaeS sensor in *E. coli* is involved in envelope stress response [31]. Taken together, it can be hypothesized that CLC_0410/CLC_0411 and CLC_3294/CLC_3293 are TCSs involved in regulating cell surface properties, e.g. surface polysaccharide synthesis and integrity.

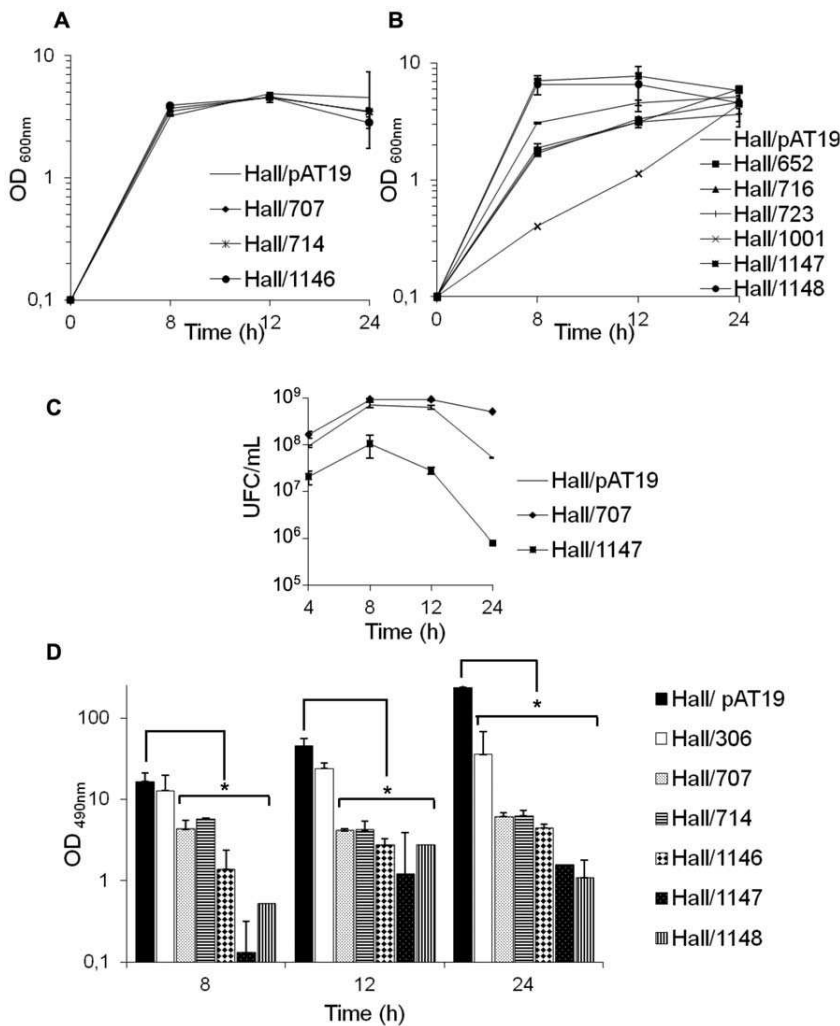


Figure 3. Growth kinetics and BoNT/A production in representative Hall isogenic antisense strains. (A) Hall/707, Hall/714, and Hall/1146 showed a similar growth curve monitored at OD₆₀₀ than the Hall/pAT19 strain. (B) Hall/1147 and Hall/1148 grew more rapidly than the control Hall/pAT19 strain, whereas Hall/1001 displayed a slower growth curve. Hall/652, Hall/716, and Hall/723 show a similar kinetics compare to Hall/pAT19. (C) Monitoring of growth kinetics of Hall/pAT19, Hall/707 and Hall/1147 by bacterial counting on TGY agarose and expressed as unit forming colony (UFC)/ml. (D) BoNT/A production assayed by ELISA was significantly reduced in the culture supernatants of Hall/707, Hall/714, Hall/1146, Hall/1147, and Hall/748, versus the control Hall/pAT19 strain. BoNT/A production was significantly reduced in Hall/306 at 24 h culture. Data are mean values +/- SD from 3 independent experiments, *P<0.05. doi:10.1371/journal.pone.0041848.g003

Table 3. BoNT/A production tested by mouse bioassay in 12 h culture supernatants of the control strain Hall/pAT19 and isogenic antisense strains.

Recombinant strains	Mouse bioassay (DL100/ml)
Hall/pAT19	2.10 ³
Hall/306	20
Hall/309	2.10 ⁵
Hall/707 (CLC_1093)	<2
Hall/714 (CLC_1914)	<2
Hall/1146 (CLC_0661)	<2
Hall/1147 (CLC_0410)	<2
Hall/1148 (CLC_3294)	<2

doi:10.1371/journal.pone.0041848.t003

Interestingly, a quorum sensing system related to that of *Staphylococcus aureus* and consisting of two *agr* loci has been identified in the group I of *C. botulinum* strains, which controls both sporulation and BoNT production. Each *agr* locus seems to have a specific function, *agr-1* regulating sporulation and *agr-2* regulating BoNT synthesis [29]. We have also identified homologous genes to *agrA* and *agrC* from *S. aureus* in the Hall genome. The isogenic antisense strain Hall/651 targeting the *agrA* homolog was not impaired in BoNT production. Thus, the quorum sensing-dependent regulation pathway and its effects on the control of toxin production in *C. botulinum* remain to be defined.

We showed that three TCSs, CLC_1093/CLC_1094, CLC_1914/CLC_1913 and CLC_0661/CLC_0663 (were involved in the regulation of e BoNT/A and ANTP production. BoNT/A, NTNH and HA34 levels in the culture supernatants of the corresponding isogenic antisense strains Hall/707, Hall/707K, Hall/714, Hall/714K, Hall/1146, Hall/1146K were repressed

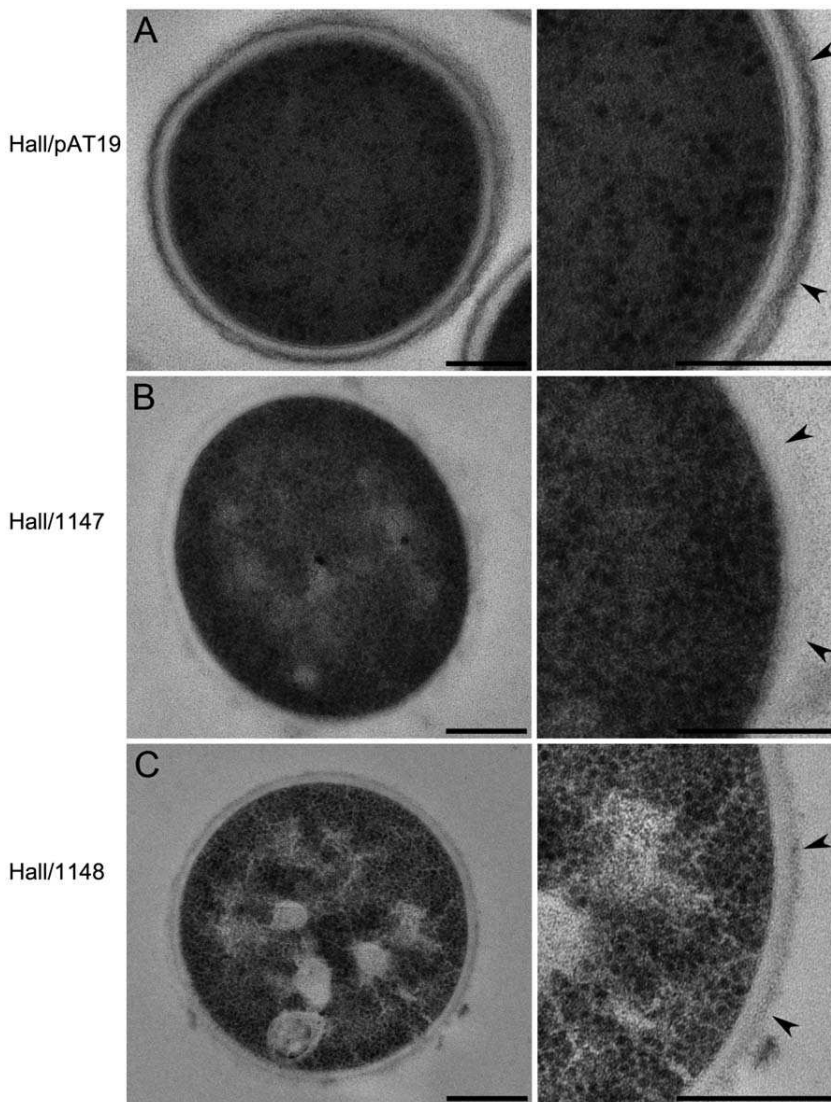


Figure 4. Ultrastructural morphology of Hall/pAT19, Hall/1147, and Hall/1148. Bacteria from a 5 h culture in TGY were treated by high pressure and freeze substitution and then observed by electron microscopy. Hall/pAT19 (A) showed a well delineated wall, whereas in Hall/1147 (B) and Hall/1138 (C) the bacterial wall is transparent, almost invisible. In addition, Hall/1148 (C) showed numerous transparent inclusions. All scale bars represent 200 nm.
doi:10.1371/journal.pone.0041848.g004

similarly to that observed in the *botR/A* isogenic antisense strain (Hall/306). Expression of *bont/A*, *ntnh*, and *ha34* genes was reduced throughout the 24 h growth period, as also observed in Hall/306. However, *botR/A* expression was not affected or even slightly increased in the three Hall isogenic antisense strains. These results argue that the corresponding TCSs, CLC_1093/CLC_1094, CLC_1914/CLC_1913 and CLC_0661/CLC_0663, control, directly or indirectly, the expression of the botulinum locus genes independently of *botR/A*. Other regulatory genes, notably from the AraC family, and genes encoding for transporters are distributed in the vicinity of these TCSs (Fig. 9). This suggests that the TCSs could be part of a complex regulatory network in response to external signals. However, the TCS might interact with other genes, which are distantly located on the genome. The biological role of the TCS CLC_0661/CLC_0663 remains to be investigated. The TCS is homologous to TCSs of the PhoP/PhoR family involved in, but not restricted to, sensing and reacting to

phosphate starvation. It is homologous to CTC00411/CTC00412 of *C. tetani* (65% and 53% protein identity, respectively), and CPE2098/CPE2099 of *C. perfringens* (50 and 40% identity, respectively). In the latter organism, the system has been designated VirI/VirJ, and it has been described as “a novel two-component regulatory system involved in the shutdown of extracellular toxin production in *C. perfringens*”, although further data is not available (EMBL/GenBank/DDBJ databases: BAA78773.1 and BAA78774.1).

Albeit *C. botulinum* and *C. tetani* synthesize related neurotoxins, a specific regulatory network based on TCSs seems to control BoNT production in *C. botulinum* type A. The 5 orphan regulatory genes tested in strain Hall (Table 2) seem not to be involved in the regulation of the botulinum locus genes. Interestingly, the 5 TCSs, which directly or indirectly are involved in the regulation of toxin synthesis in strain Hall, are conserved in the known genomes of *C. botulinum* from group I including the subtypes A2, A3, Ba4, B1 and

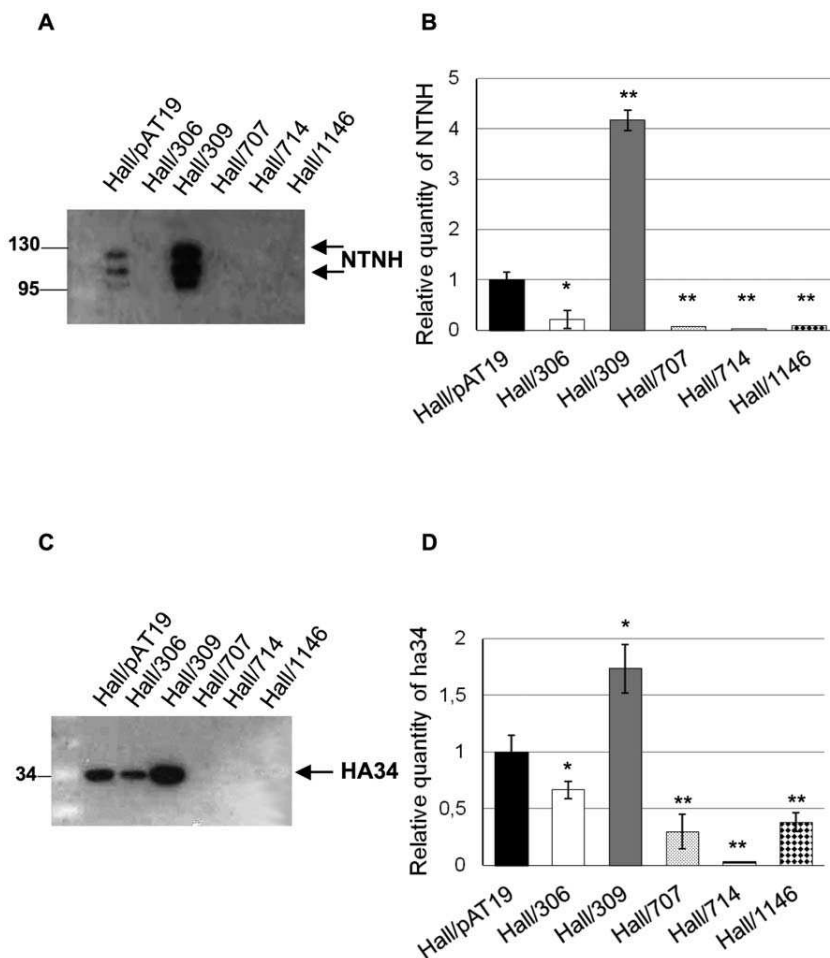


Figure 5. NTNH and HA34 production in Hall *botR/A* and 3 TCS isogenic antisense strains. Production of NTNH (A) and HA34 (B) was assayed by western blotting in 12 h culture supernatants of Hall/pAT19, Hall/306, Hall/309, Hall/707, Hall/714, and Hall/1146. Western blots were quantified by ImageJ (B and D) with normalization of NTNH and HA34 production in Hall/pAT19 to 1. Data are mean values \pm SD from 3 independent experiments, * $P < 0.05$ and ** $P < 0.005$. doi:10.1371/journal.pone.0041848.g005

F, but not in the genomes of group II strains such as *C. botulinum* type E or group IV (*C. botulinum* C and D). These results suggest that group I *C. botulinum* strains might share a regulatory network distinct from that in the other *C. botulinum* groups.

This raises the question about the external signals governing the toxin production via TCS regulation. The environmental factors controlling toxin gene expression in *C. botulinum* are still poorly known. Carbon dioxide has been reported to stimulate toxin gene expression and toxin formation in non-proteolytic *C. botulinum* strains type B and E despite a growth rate reduction [32,33], in contrast to proteolytic *C. botulinum* type A, which seems insensitive to carbon dioxide [34,35]. High temperature did not control the transcription of *bont* gene but influences the stability of the toxin in *C. botulinum* A [14]. A better understanding of the regulation of toxin synthesis in *C. botulinum* would permit the development of novel strategies to prevent botulism by counteracting the toxin production in food and/or in the digestive tract.

In summary, BoNT/A and ANTP synthesis in *C. botulinum* strain Hall seems to be under the control of a complex regulatory network. In addition to the alternative sigma factor BotR/A, which regulates *bont/A* and *antp* transcription at the transition phase between the exponential and stationary growth, we have

found that at least three TCSs also control BoNT/A and ANTP synthesis at the transcriptional level independently of BotR/A. Two other TCSs seem to retain various pleiotropic effects including the control of BoNT/A synthesis as well as the regulation of bacterial cell wall or cell surface synthesis and/or assembly and granule accumulation in the cytoplasm. Further investigations of the regulatory network controlling toxin production in *C. botulinum* would allow the identification of environmental factors triggering BoNT/A synthesis.

Materials and Methods

Bacterial strains and culture conditions

The recombinant strains are presented in figure 1. pat19 vector was used for the construction of the recombinant ARNm antisense strains [12]. *Escherichia coli* strains were grown in Luria-Bertani (LB) broth and *Clostridium botulinum* strains in TGY broth (pH 7.5) containing trypticase (Trypticase-Glucose Yeast Peptone BBL, BD Biosciences; 30 g/L), yeast extract (Bacto Yeast Extract, BD Biosciences; 20 g/L), glucose (5 g/L) and cysteine, HCl (0.5 g/L) under anaerobic conditions (N₂/CO₂/H₂; 90 : 5 : 5, vol/vol. at

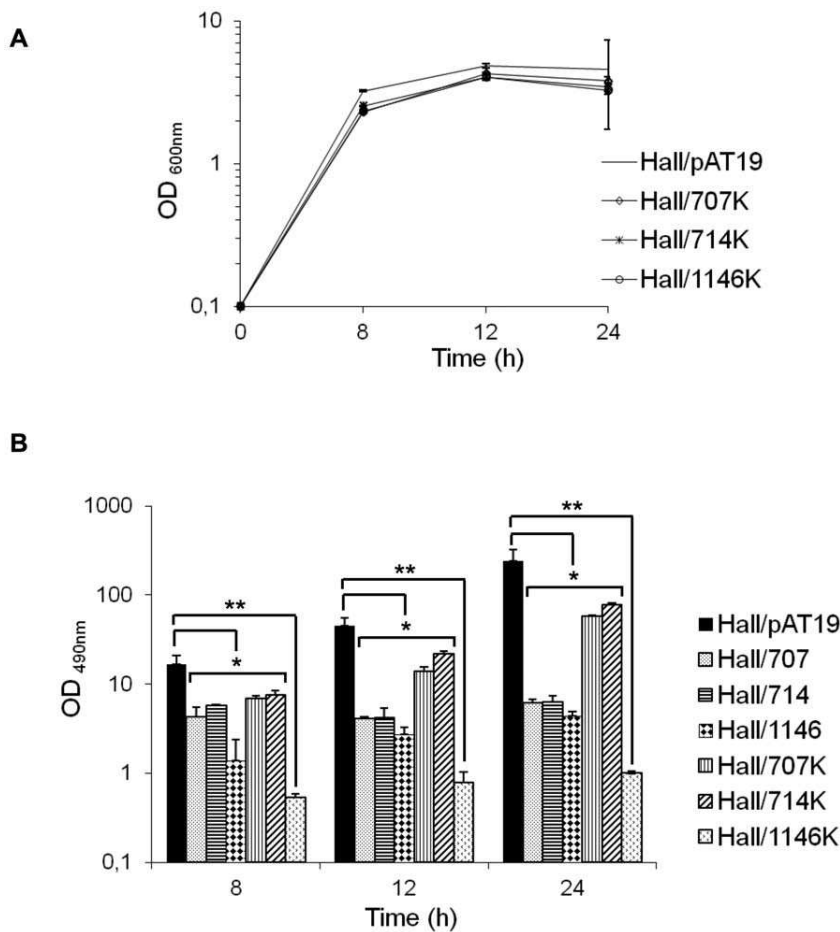


Figure 6. BoNT/A production in isogenic antisense strains targeting the SHK gene from three TCSs. (A) Growth kinetics of Hall/707K, Hall/714K, and Hall/1146K were similar to that of the control Hall/pAT19 strain as monitored by OD₆₀₀ measurement. (B) BoNT/A production assayed by ELISA was significantly reduced in the culture supernatants of Hall/707K, Hall/714K, and to a higher extent of Hall/1146K. Data are mean values \pm SD from 3 independent experiments, * $P < 0.05$ and ** $P < 0.005$. doi:10.1371/journal.pone.0041848.g006

37°C). When necessary, erythromycin was added to culture media at 20 $\mu\text{g/ml}$ for *C. botulinum* and 300 $\mu\text{g/ml}$ for *E. coli*.

Kinetic experiments of *C. botulinum* recombinant strains were performed by incubating 10 ml TGY inoculated with 0.3 to 0.6 ml of an overnight preculture to obtain a starting culture of 0.1 OD₆₀₀. Bacterial growth was monitored as OD₆₀₀ every two hours until 12 h, then at 24 and 48 hours of culture for the control strains and at 8, 12 and 24 hours for isogenic antisense strains. Bacterial counting was performed in agarose TGY medium supplemented with erythromycin (5 $\mu\text{g/ml}$). Serial ten-fold dilutions of cultures were plated on agarose-TGY (0.1 ml on each plate, 3 plates for each dilution) and incubated at 37°C in anaerobic chamber.

Construction of vectors encoding antisense mRNA for the different two-component systems

A DNA fragment of each TCS gene studied containing the Ribosome Binding Site (RBS) region was amplified by PCR and inserted in reverse orientation into pAT19 as already described in [12].

Botulinum neurotoxin and associated protein assay

At 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 and 48 hours culture, 10 ml of culture were removed. The cells were harvested at 15000 rpm for 5 minutes, and the supernatants were removed and stored at -20°C . The pellets were stored at -80°C for quantitative RT-PCR analysis.

The toxin content of the supernatants was assessed using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Ninety-six-well microtitre plates (Maxisorp, Nunc Roskilde, Denmark) were sensitized with 100 μl of monoclonal anti Hc BoNT/A antibody Mab G14-3 raised against HcBoNT/A1 as previously described [36] (5 $\mu\text{g/ml}$ in carbonate buffer 0.05 M pH 9.6) and incubated at 4°C over night. Plates were washed 3 times with PBS-Tween (0.1%) (PBST) with an automatic plate washer (Bio-Tek, Washer 120) and saturated with 100 μl of BSA (2% in carbonate buffer) during 30 min under agitation. Three washes were performed and 100 μl of supernatant were added and dilute by half with PBST. After 30 minutes of incubation under agitation, three washes were performed, and 100 μl of polyclonal rabbit antibody raised against HcBoNT/A1 diluted at 1/1600 in PBST, and incubated for an hour under agitation. Three new washes were performed and

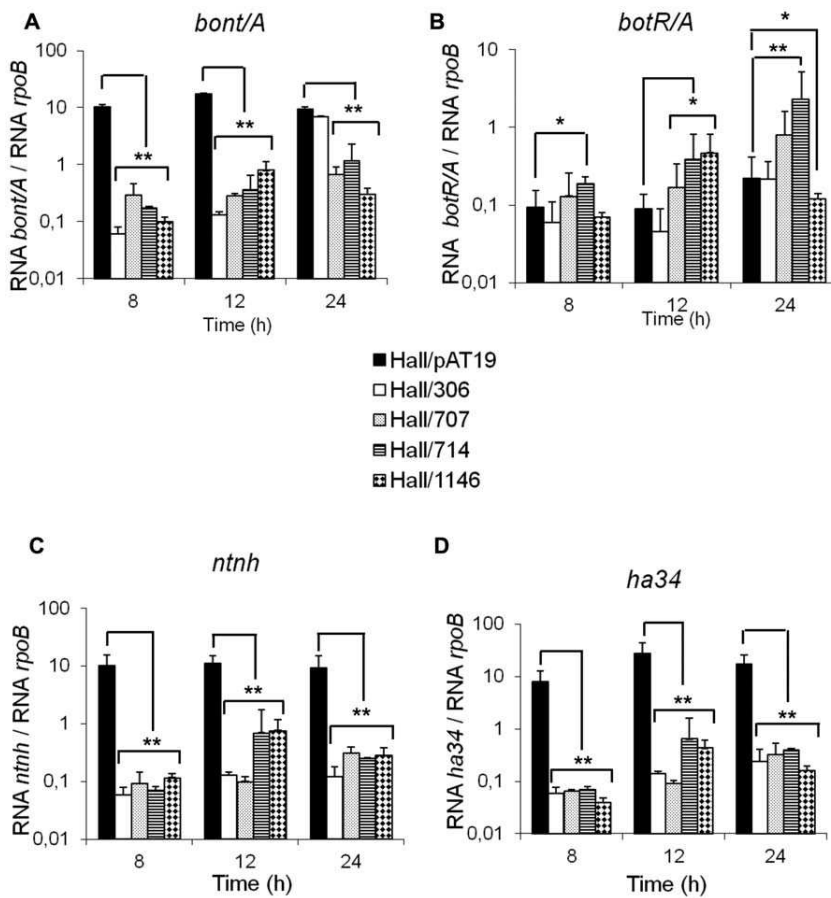


Figure 7. Kinetics of transcript levels of *bont/A*, *botR/A*, *ntnh*, and *ha34* genes in Hall/707, Hall/714, and Hall/1146 versus Hall/pAT19 and Hall/306. Transcript levels were quantified by qRT-PCR and normalized versus *rpoB* gene. Data are mean values \pm SD, from 9 independent experiments where * $P < 0.05$ and ** $P < 0.005$. doi:10.1371/journal.pone.0041848.g007

100 μ l of goat peroxidase-linked antibody anti-rabbit Ig (111-035-006, Jackson ImmunoResearch) diluted at 1/5000 in PBST was added and plate were incubated 1 h under agitation. After the last three washes, detection of toxin was performed by adding 100 μ l

of OPD in citrate buffer (0.05 M, 0.06% H₂O₂, 1 mg/mL of ortho-phenylen-diamin, Sigma) and incubated seven minutes. Optical density was measured at 490 nm with a spectrophotometer microplate reader (Biorad, model 680).

The amounts of associated protein HA34 and NTNH in the supernatants were assessed using a Western blot assay. Total proteins of 800 μ l of a 12 hours culture supernatant were precipitated with sulfuric acid (pH 3.5) and harvested 5 minutes at 15000 rpm. Pellets were resuspended in 200 μ l of Laemmli buffer and 15 μ l were loaded on a 10% SDS PAGE. The antibodies used and the immunoblotting procedure were the same as previously described [12]. Bound antibodies were detected using an anti rabbit IgG antibody coupled to alkaline phosphatase, ECFTM Substrate for Western Blotting supplied by Ge Healthcare and a Storm fluorescent scanning. Western blots were quantified using Image J software.

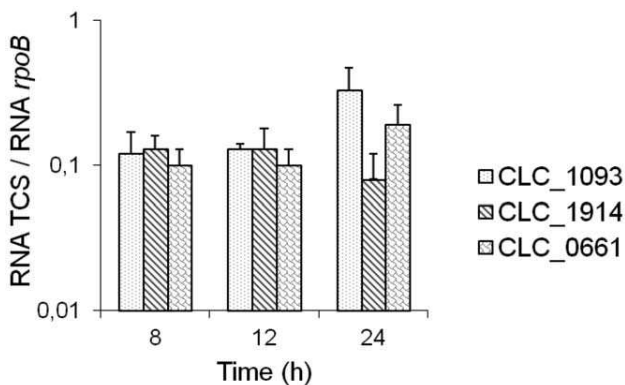


Figure 8. Kinetics of transcript levels of CLC_1093, CLC_1914, and CLC_0661 in Hall strain. Transcript levels were quantified by qRT-PCR and normalized versus *rpoB* gene. Data are mean values \pm SD, from 3 independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0041848.g008

Mouse bioassay

In vivo mouse lethality tests were performed for each isogenic antisense strains showing a manifest decrease in toxin production by ELISA compared to the control strain. Ten-fold serial dilution of 24 h culture supernatants in 50 mM phosphate buffer pH 6.5 containing 1% gelatin (PB-G) were done. 0.5 mL was injected intraperitoneally (i.p) into Swiss mice weighing 20–22 g (Charles

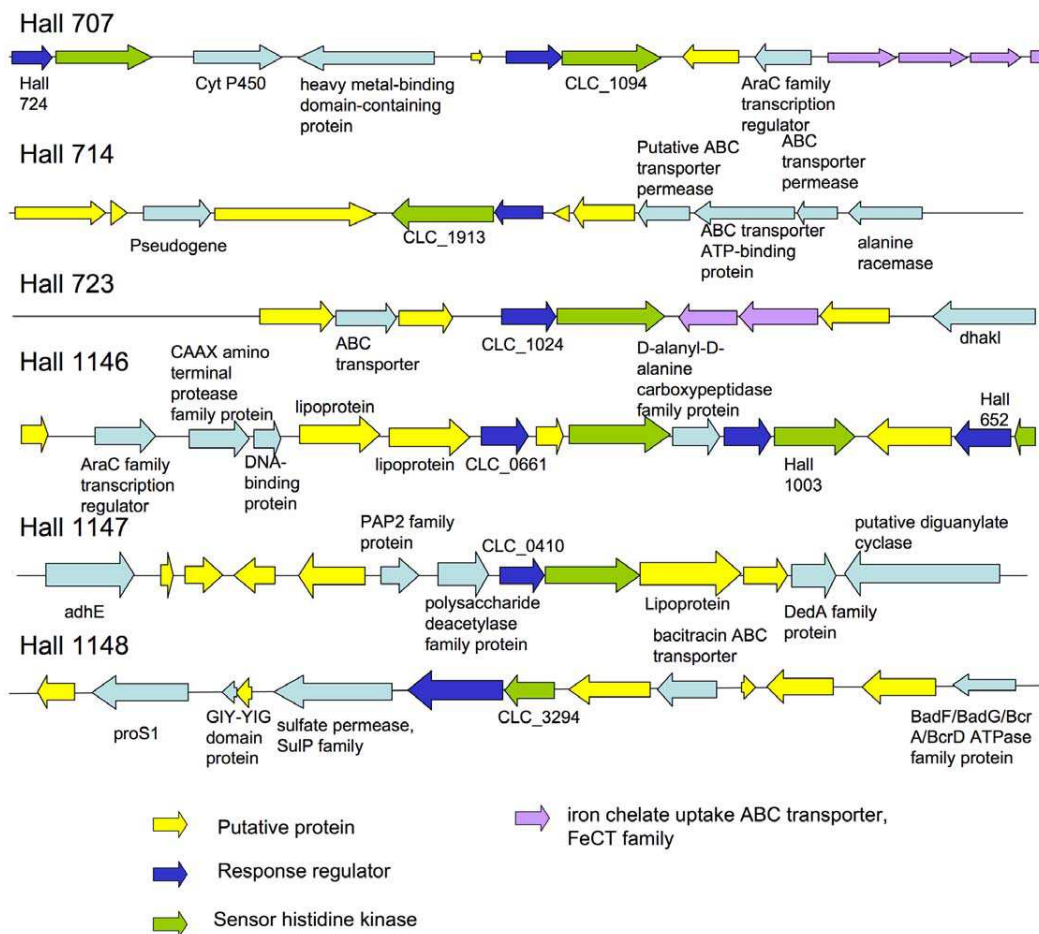


Figure 9. Genetic environment of the TCS genes involved in the regulation of toxin synthesis in strain Hall.
doi:10.1371/journal.pone.0041848.g009

River). Mice were observed and any deaths recorded every day for 4 days.

Ethics statement

All experiments were performed in accordance with French and European Community guidelines for laboratory animal handling. The protocols of experiments were approved by the Pasteur Institut (Agreement of laboratory animal use n° 75–279).

Total RNA extraction, Reverse Transcription and Quantitative real-time PCR assay

A phenol-chloroform extraction of total RNA was performed from pellets of each recombinant strains at 8, 12 and 24 hours, and at each kinetic point for the Pat19, Hall306 and Hall309 strains. Cells were mechanically broken by shaking with a FastPrep apparatus (MP Biomedicals) and RNA was extracted with Trizol reagent, and chloroform-isoamylalcohol. The extracted RNAs were precipitated with isopropanol and the pellet was resuspended in a 10 mM Tris pH = 8, 0.1 mM EDTA buffer. A DNase treatment with TURBO DNase (Ambion) was performed on each extract following the manufacturer's instructions. The total RNA quantity was measured using a NanoDrop ND-100 Spectrophotometer and cDNA were synthesized from 5 µg of total RNA with M-MLV Reverse Transcriptase kit (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. Hexamer

oligonucleotide primers (pdN6 5 µg/µL), deoxynucleoside triphosphates (dNTP; 10 mM each), and RNase OUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor are provided from Roche, Amersham Biosciences and Invitrogen respectively. Each extract was analysed at least once with Agilent 2100 Biolanalyser with RNA 6000 Nano Reagents & Supplies (Roche).

Reverse-transcribed cDNA samples (30 ng) were subjected to PCR amplification in 24 µl ready-to-use iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, 2X; 1,25 U iTaq DNA polymerase, 0,4 mM each dNTP, 6 mM MgCl₂, 20 nM fluorescein, SYBR Green I) containing 0,5 mM each primer. The reactions were cycled in an iQ iCycler apparatus (Bio-Rad) using the following parameters: Taq polymerase activation at 95°C for 3 minutes then 39 cycles at 95°C for 10 s, 51°C for 30 s for *ha34* and *botR/A* genes and 65°C for *rpoB ntnh* and *bont/A* genes for the annealing and the extension with fluorescence measurement at the end. A temperature gradient was performed for each primer pair with serial 10-fold dilutions of Hall chromosomal DNA (1.5 pg to 150 ng) to determine the optimal annealing temperature giving the maximal PCR efficiency (supplementary Table 1). Each cDNA sample was PCR amplified in parallel to serially diluted Hall chromosomal DNA. cDNA quantity of gene was normalized to the quantity of cDNA of the *rpoB* gene. The relative cDNA quantity of each sample was determined with threshold cycle [$\Delta\Delta C_T$] method

(Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2\Delta\Delta CT$ method) [37].

The identity and specificity of PCR products were verified by high resolution agarose gel electrophoresis and a single PCR product migrating at the expected size was observed for each primer pair. In addition, an iQ iCycler melting curve (55°C to 95°C with a heating rate of 0, 5°C per 10 s and continuous fluorescence measurement) confirmed the presence of a unique peak for the negative first derivative of the temperature versus fluorescence plotted against temperature (melt curve) with single product-specific melting temperatures (T_m).

Transmission electron microscopy

All bacterial strains were pelleted using a tabletop centrifuge and afterwards resuspended in a small amount of medium. The concentrated suspension was taken up in a cellulose capillary tube (Leica microsystems, Vienna, Austria). The tube was cut into closed pieces not longer than 2 mm with a modified scalpel [38] and placed into planchettes of 200 μm depth fill with 1-hexadecan. Cryo-immobilisation was done using a HPM 010 high-pressure freezer (BaTeC, now Abra Fluid AG, Widnau, Switzerland) and samples transferred under liquid nitrogen for freeze substitution in 1% osmium tetroxide (Merck, Darmstadt, Germany) containing 0.5% glutaraldehyde (EMS, Hatfield, USA) and 0.2% uranyl acetate (SPI, West Chester, USA) in acetone containing 2% water in an AFS (Leica microsystems, Vienna, Austria). Substitution was performed for 48 hours at -90°C , samples were warmed up (2°C/hour) to -30°C (8 hours) and then warmed up to 0°C before removal of the substitution medium and embedding in EPON. After heat polymerization thin sections were cut with an Ultracut UCT microtome (Leica Microsystems, Vienna, Austria). Sections were collected on 200 mesh formvar coated copper grids. After poststaining with 4% uranyl acetate and Reynold's lead

citrate, the sections were observed with a Jeol 1010 at 80 kV and equipped with a KeenView camera (Olympus, Soft imaging systems, Münster, Germany).

Statistics

Values throughout are expressed as means \pm standard deviation (SD). Differences in the different isogenic antisense strains were assessed using unpaired Student's t-test where statistical significance is assumed for * $P < 0.05$ and ** $P < 0.005$.

Supporting Information

Table S1 Optimization of quantitative PCR amplification. PCR efficiencies were calculated from a standard curve performed with a serial 10-fold dilution of chromosomal Hall DNA and a temperature gradient ranging from 51 to 68°C for each primer pair targeting *bont/A*, *ntnh*, *rpob*, *botR/A*, and *ha34* genes. Annealing temperature of 51°C was used in qRT-PCR for *ha34* and *botR/A* genes, and 65°C for *bont/A*, *ntnh*, and *rpob* genes. These annealing temperatures yielded a PCR efficiency close of 100% in the largest range of DNA detection. (DOC)

Acknowledgments

We thank Martin Sachse for electron microscopy assistance and Laura Grange for statistic analysis assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MRP HB CC. Performed the experiments: CC SR CM NC. Analyzed the data: MRP HB CC. Contributed reagents/materials/analysis tools: CM NC. Wrote the paper: MRP CC HB.

References

- Poulain B, Popoff MR, Molgo J (2008) How do the botulinum neurotoxins block neurotransmitter release: from botulism to the molecular mechanism of action. *Botulinum J* 1: 14–37.
- Brunger AT, Rummel A (2009) Receptor and substrate interactions of clostridial neurotoxins. *Toxicol* 5: 550–560.
- Oguma K, Inoue K, Fujinaga Y, Yokota K, Watanabe T, et al. (1999) Structure and function of *Clostridium botulinum* progenitor toxin. *J Toxicol* 18: 17–34.
- Popoff MR, Marvaud JC (1999) Structural and genomic features of clostridial neurotoxins. In: Alouf JE, Freer JH, editors. *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*. 2 ed. London: Academic Press. pp. 174–201.
- Quinn CP, Minton NP (2001) Clostridial neurotoxins. In: Bahl H, Dürre P, editors. *Clostridia*. Weinheim: Wiley-VCH. pp. 211–250.
- Sharma SK, Ramzan MA, Singh BR (2003) Separation of the components of type A botulinum neurotoxin complex by electrophoresis. *Toxicol* 41: 321–331.
- Fujinaga Y, Inoue K, Nomura T, Sasaki J, Marvaud JC, et al. (2000) Identification and characterization of functional subunits of *Clostridium botulinum* type A progenitor toxin involved in binding to intestinal microvilli and erythrocytes. *FEBS Lett* 467: 179–183.
- Fujinaga Y, Inoue K, Watanabe S, Yokota K, Hirai Y, et al. (1997) The haemagglutinin of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin plays an essential role in binding of toxin to the epithelial cells of guinea pig intestine, leading to the efficient absorption of the toxin. *Microbiol* 143: 3841–3847.
- Sugawara Y, Matsumura T, Takegahara Y, Jin Y, Tsukasaki Y, et al. (2010) Botulinum hemagglutinin disrupts the intercellular epithelial barrier by directly binding E-cadherin. *J Cell Biol* 189: 691–700.
- Hill KK, Smith TJ, Helma CH, Ticknor LO, Foley BT, et al. (2007) Genetic diversity among Botulinum Neurotoxin-producing clostridial strains. *J Bacteriol* 189: 818–832.
- Sebaihia M, Peck MW, Minton NP, Thomson NR, Holden MT, et al. (2007) Genome sequence of a proteolytic (Group I) *Clostridium botulinum* strain Hall A and comparative analysis of the clostridial genomes. *Genome Res* 17: 1082–1092.
- Marvaud JC, Gibert M, Inoue K, Fujinaga V, Oguma K, et al. (1998) *botR* is a positive regulator of botulinum neurotoxin and associated non toxic protein genes in *Clostridium botulinum* A. *Mol Microbiol* 29: 1009–1018.
- Raffestin S, Dupuy B, Marvaud JC, Popoff MR (2005) BotR/A and TetR are alternative RNA polymerase sigma factors controlling the expression of the neurotoxin and associated protein genes in *Clostridium botulinum* type A and *Clostridium tetani*. *Mol Microbiol* 55: 235–249.
- Couesnon A, Raffestin S, Popoff MR (2006) Expression of botulinum neurotoxins A and E, and associated non-toxin genes, during the transition phase and stability at high temperature: analysis by quantitative reverse transcription-PCR. *Microbiol* 152: 759–770.
- Federle MJ, Bassler BL (2003) Interspecies communication in bacteria. *J Clin Invest* 112: 1291–1299.
- Galperin MY, Higdon R, Kolker E (2010) Interplay of heritage and habitat in the distribution of bacterial signal transduction systems. *Mol Biosyst* 6: 721–728.
- Ba-Thein W, Lyristis M, Ohtani K, Nisbet IT, Hayashi H (1996) The *virR/virS* locus regulates the transcription of genes encoding extracellular toxin production in *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol* 178: 2514–2520.
- Ohtani K, Kawars HI, Okumura K, Hayashi H, Shimizu T (2003) The VirR/VirS regulatory cascade affects transcription of plasmid-encoded putative virulence genes in *Clostridium perfringens* strain 13. *FEMS Microbiol Lett* 222: 137–141.
- Okumura K, Ohtani K, Hayashi H, Shimizu T (2008) Characterization of genes regulated directly by the VirR/VirS system in *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol* 190: 7719–7727.
- Ohtani K, Hirakawa H, Tashiro K, Yoshizawa S, Kuhara S, et al. (2009) Identification of a two-component VirR/VirS regulon in *Clostridium perfringens*. *Anaerobe* 16: 258–264.
- Cheung JK, Awad MM, McGowan S, Rood JI (2009) Functional analysis of the VirSR phosphorelay from *Clostridium perfringens*. *PLoS One* 4: e5849.
- Cheung JK, Keyburn AL, Carter GP, Lanckriet AL, Van Immerseel F, et al. (2010) The VirSR two-component signal transduction system regulates NetB toxin production in *Clostridium perfringens*. *Infect Immun* 78: 3064–3072.
- Hassan S, Ohtani K, Wang R, Yuan Y, Wang Y, et al. (2010) Transcriptional regulation of hemO encoding heme oxygenase in *Clostridium perfringens*. *J Microbiol* 48: 96–101.
- Ma M, Vidal J, Saputo J, McClane BA, Uzal F (2011) The VirS/VirR two-component system regulates the anaerobic cytotoxicity, intestinal pathogenicity, and enterotoxemic lethality of *Clostridium perfringens* type C isolate CN3685. *MBio* 2: e00338–00310.

25. Hauser D, Gibert M, Marvaud JC, Eklund MW, Popoff MR (1995) Botulinum neurotoxin C1 complex, Clostridial neurotoxin homology and genetic transfer in *Clostridium botulinum*. *Toxicon* 33: 515–526.
26. Dincean SS, Bradshaw M, Karasek CE, Johnson EA (2004) Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the type A2 neurotoxin gene cluster in *Clostridium botulinum*. *FEMS Microbiol Lett* 235: 9–16.
27. Henderson I, Whelan SM, Davis TO, Minton NP (1996) Genetic characterization of the botulinum toxin complex of *Clostridium botulinum* strain NCTC2916. *FEMS Microbiol Lett* 140: 151–158.
28. Shimizu T, Ba-Thein W, Tamaki M, Hayashi H (1994) The *virR* gene, a member of a class of two-component response regulators, regulates the production of perfringolysin O, collagenase, and hemagglutinin in *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol* 176: 1616–1623.
29. Cooksley CM, Davis IJ, Winzer K, Chan WC, Peck MW, et al. (2010) Regulation of neurotoxin production and sporulation by a Putative agrBD signaling system in proteolytic *Clostridium botulinum*. *Appl Environ Microbiol* 76: 4448–4460.
30. Senadheera MD, Guggenheim B, Spatafora GA, Huang YC, Choi J, et al. (2005) A VicRK signal transduction system in *Streptococcus mutans* affects *gtfBCD*, *gcbB*, and *ftf* expression, biofilm formation, and genetic competence development. *J Bacteriol* 187: 4064–4076.
31. Raffa RG, Raivio TL (2002) A third envelope stress signal transduction pathway in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 45: 1599–1611.
32. Artin I, Carter AT, Holst E, Lovenklev M, Mason DR, et al. (2008) Effects of carbon dioxide on neurotoxin gene expression in nonproteolytic *Clostridium botulinum* Type E. *Appl Environ Microbiol* 74: 2391–2397.
33. Lövenklev M, Artin I, Hagberg O, Borch E, Holst E, et al. (2004) Quantitative interaction effects of carbon dioxide, sodium chloride, and sodium nitrite on neurotoxin gene expression in nonproteolytic *Clostridium botulinum* type B. *Appl Environ Microbiol* 70: 2928–2934.
34. Artin I, Mason DR, Pin C, Schelin J, Peck MW, et al. (2010) Effects of carbon dioxide on growth of proteolytic *Clostridium botulinum*, its ability to produce neurotoxin, and its transcriptome. *Appl Environ Microbiol* 76: 1168–1172.
35. Artin I, Mason DR, Pin C, Schelin J, Peck MW, et al. (2010) Effects of carbon dioxide on growth of proteolytic *Clostridium botulinum*, its ability to produce neurotoxin, and its transcriptome. *Appl Environ Microbiol* 76: 1168–1172.
36. Volland H, Lamourette P, Nevers MC, Mazuet C, Ezan E, et al. (2008) A sensitive sandwich enzyme immunoassay for free or complexed *Clostridium botulinum* neurotoxin type A. *J Immunol Methods* 330: 120–129.
37. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402–408.
38. McDonald K, Schwarz H, Muller-Reichert T, Webb R, Buser C, et al. (2010) “Tips and tricks” for high-pressure freezing of model systems. *Methods Cell Biol* 96: 671–693.

I.2 Revue n°1 : Régulation de la production des neurotoxines chez *C. botulinum* et *C. tetani*.

Article publié [Connan 2013].

I.2.1 Résumé

Les neurotoxines botuliques (BoNTs) et tétanique (TeNT) sont structurellement et fonctionnellement proches. Elles ont la capacité d'inhiber la neuroexocytose et conduisent au botulisme et au tétanos. Les gènes des neurotoxines botuliques, appelés *bonts*, sont situés sur le locus botulique, localisé sur différents segments génomiques en fonction des types et sous-types de *C. botulinum* (plasmides, phages, chromosomes). Ce locus est organisé en deux opérons polycistroniques où les *bonts* sont étroitement associés avec des gènes codant des protéines non toxiques associées (ANTPs) que sont les Has, Orfxs et NTNH. Les BoNTs s'associent aux ANTPs pour former des complexes de différentes tailles alors que TeNT ne forme aucun complexe. Un gène appelé *botR* est situé entre les deux opérons de *C. botulinum* de type A et code pour un facteur σ alternatif (BotR/A) qui régule positivement la production de BoNTs et des ANTPs à la transition entre la fin de la phase exponentielle et le début de la phase stationnaire. Un gène homologue à *botR*, appelé *tetR*, situé en amont du gène *tent*, régule positivement la production de TeNT. Chez *C. botulinum* type A, 4 TCSs sont impliqués dans la régulation de la production de BoNT/A et des ANTPs. La synthèse des neurotoxines botuliques semblent donc être régulée par un réseau complexe de régulateurs.

I.2.2 Introduction

Parmi les nombreuses espèces appartenant au genre *Clostridium*, certaines produisent de puissantes neurotoxines à l'origine de désordres neurologiques chez l'homme et l'animal. Les neurotoxines botuliques (BoNTs), produites en majorité par *C. botulinum*, inhibent la libération d'acétylcholine aux terminaisons nerveuses entraînant une paralysie flasque, caractéristique du botulisme. A l'inverse, la neurotoxine tétanique (TeNT) bloque la libération des neurotransmetteurs aux synapses du SNC conduisant à la paralysie spastique caractéristique du tétanos.

De nombreux travaux se sont attachés à comprendre la structure et les mécanismes d'action de ces neurotoxines, mais également à caractériser l'organisation génétique des loci botuliques et la régulation de leur production. La synthèse de BoNT et TeNT est régulée par un réseau complexe de régulateurs comprenant des facteurs σ alternatifs, des TCSs, des

sRNAs, ainsi que des signaux environnementaux pouvant impliquer le "quorum sensing".

I.2.3 Les clostridies producteurs de neurotoxines

Les Clostridies ont des caractéristiques bactériologiques variées et sont divisées en plusieurs espèces et groupes en fonction des neurotoxines qu'elles produisent. Les BoNTs sont classées en 7 types notés (de A à G), classification basée sur leur propriétés antigéniques. Cependant, il existe une grande variabilité en séquence d'acides aminés entre ces types (entre 34 et 64%) et une classification en sous-types a été instaurée.

Les souches toxigéniques peuvent être classées en 4 groupes physiologiquement distincts :

- Le groupe I comprenant les souches de *C. botulinum* A et les souches protéolytiques de B et F
- Le groupe II comprenant les souches de *C. botulinum* E, et les souches glycidolytiques de *C. botulinum* B et F
- Le groupe III, les souches de *C. botulinum* C et D
- Et le groupe IV contenant les souches de *C. botulinum* G (ou *C. argentinense*).

La classification s'est complexifiée avec la découverte de souches atypiques de *C. butyricum* et *C. baratii*, capables de produire les type E et F respectivement.

A l'inverse, TeNT est produite par un groupe phylogénique uniforme formé par les espèces de *C. tetani*, contenant des souches toxinégiques et non toxigéniques.

I.2.4 Organisation des gènes des neurotoxines

I.2.4.1 Le locus botulique

Le locus botulique est organisé en deux opérons polycistroniques où les gènes codant les BoNTs, *bonts*, sont étroitement associés aux gènes codant les ANTPs que sont les *has*, *orfxs* et *ntnh*.

Le premier opéron, en 3', est très conservé chez toutes les souches toxigéniques. Il est composé d'un *bont* et du gène, *ntnh*, codant la protéine associée NTNH.

En amont de cet opéron, se trouve un opéron, transcrit en sens inverse de l'opéron *ntnh-bont*, contenant les gènes codants les autres protéines associées (HAs ou Orfx en fonction des types et sous-types). L'opéron HA (*ha33*, *ha17* et *ha70*) est associé aux *C. botulinum* de types B, C, D et G alors que l'opéron Orfx (*orfx1*, *orfx2* et *orfx3*) est associé aux sous-types A2, A3, A4 et aux types E et F. Le sous-type A1 est unique car il peut contenir l'opéron

HA ou Orfx.

Un gène additionnel, *p47* codant une protéine de 47 kDA, est situé en amont de l'opéron *ntnh-bont* dans les loci contenant l'opéron OrfX.

Le gène *botR/A*, localisé à différents endroits du locus botulique en fonction des souches, code le facteur σ alternatif BoTR/A. Un gène homologue, situé en amont de *tent*, a été identifié sur le génome de *C. tetani*, et fut appelé *tetR*. Cependant, *botR* n'est pas présent sur toutes les souches toxinogéniques de *C. botulinum* et aucun homologue est retrouvé pour les souches *C. botulinum* de type E ou les souches de *C. butyricum* produisant le type E, ni pour les souches non protéolytiques de *C. botulinum* type F.

De manière générale, les souches toxinogéniques ne produisent qu'un seul type de neurotoxine et ne possèdent qu'une copie du locus botulique dans leur génome. Toutefois, certaines souches peuvent produire deux types différents de BoNTs (BoNT/A et BoNT/B ou BoNT/B et BoNT/F) et sont appelées souches bivalentes. Cependant, les deux types de BoNTs ne sont pas produits en proportions égales et les souches produisant les types A et B sont appelées Ab et produisent une plus grande quantité de toxine de type A que de type B. Cette nomenclature est conservée pour les autres souches bivalentes (Af, Bf etc).

Les loci botuliques peuvent être localisés sur le chromosome ou sur des plasmides de différentes tailles, fréquemment retrouvés chez les souches neurotoxigéniques de *C. botulinum*. Chez les souches appartenant au groupe III, ces loci sont portés par des phages de grande taille. Chez *C. tetani* et *C. argentinense*, les gènes des neurotoxines sont portés par de grands plasmides.

Ces différentes localisations génomique en particulier les plasmides et les phages, jouent un rôle direct dans les variabilités génétiques observées entre les différentes souches de *C. botulinum*. Ces variabilités génétiques sont renforcées par la présence d'éléments mobiles tels que les transposons.

La transcription des gènes du locus botulique peut être monocistronique ou tricistronique, en fonction des souches étudiées et des conditions de culture.

I.2.4.2 Le locus tétanique

Le génome de *C. tetani* est composé d'un chromosome et d'un large plasmide (E88) sur lequel se trouve le gène codant TeNT (*tent*), ainsi que 7 gènes codant pour de potentiels régulateurs. Aucun gène homologue pour les ANTPs a pu être trouvé sur le génome de *C. tetani*, et de ce fait, TeNT ne forme pas de complexe.

Peu d'éléments mobiles ont été identifiés sur le génome de *C. tetani* et la faible variation

du taux de G+C indique une grande stabilité du génome et exclu l'apparition d'événement récent d'acquisition de gène.

I.2.5 La régulation de la production de toxines

I.2.5.1 BotR et TetR régulent positivement l'expression des gènes de neurotoxines

BotR fut identifié pour la première fois dans une souche *C. botulinum* de type C. Cette protéine de 22 kDA a des propriétés de liaison à l'ADN et le gène codant BotR (*botR*) est conservé chez toutes les souches toxinogéniques de *C. botulinum* excepté les souches de *C. botulinum* de type E et les souches non protéolytiques de type F. Le gène *tetR* localisé sur le génome de *C. tetani*, code une protéine, TetR, homologue à BotR.

BotR et TetR sont des facteurs σ alternatifs reconnaissant des régions spécifiques en -10 (GTTATA) et -35 (TTTACA) de la région promotrice. Ces séquences sont conservées dans les régions promotrices de *bont*/ A/B/C/D et G, mais également sur le promoteur de *ha35*, ainsi que sur la région promotrice de *tent* chez *C. tetani*. TetR et les BotRs des différentes souches de *C. botulinum* ont un fort pourcentage d'identité et sont également reliés à d'autres protéines régulatrices telles que UviA, qui régule la production de bactériocine chez *C. perfringens*, ou TcdR qui régule la production des toxines A et B (*tcdA* et *tcdB*) chez *C. difficile*. Cependant ces gènes ne semblent pas jouer un rôle uniquement sur la régulation de la toxinogénèse puisqu'une surexpression ou une inhibition partielle de l'expression de *botR/A*, modifie l'expression de gènes codants pour des enzymes, des transporteurs ou des protéines membranaires. BotR/A, TetR, TcdR et UviA diffèrent structurellement et fonctionnellement des autres facteurs σ alternatifs et forment un nouveau groupe de facteurs fonctionnellement interchangeables *in vitro* et *in vivo*.

L'expression des gènes du locus botuliques de *C. botulinum* Hall A a été suivie en qRT-PCR. L'expression de *botR/A* suit la même cinétique d'expression que les autres gènes du locus botulique que ce soit en conditions sporulante ou non sporulante, contrairement à la production de la toxine C2, qui est dépendante de la sporulation. Cette expression est faible en phase exponentielle, et atteint son maximum à la transition entre la phase exponentielle et la phase stationnaire, puis diminue en phase stationnaire. Toutefois l'expression de *botR/A* est approximativement 100 fois moins élevée que l'expression des autres gènes du locus. Une surexpression de *botR/A* ou de *tetR*, augmente la transcription et la production de BoNT/A et ANTPs, et de TeNT respectivement. Inversement, une inhibition partielle de l'expression de *botR/A* et *tetR* diminue la production de toxines. La régulation de la transcription des gènes *bonts* et *tent* est donc conservée entre ces 2 espèces apportant des

preuves additionnelles concernant l'origine commune des deux loci. Ces résultats confirment que BotR est un facteur σ alternatif spécifique de la phase de transition du moins chez les types A, B, C et D.

Bien que chez *C. botulinum* de type E, aucun gène homologue à *botR* n'ait pu être trouvé, la régulation de la transcription des gènes du locus botulique suit la même cinétique d'expression que chez *C. botulinum* Hall A.

I.2.5.2 Les systèmes à deux composants (TCS)

Les TCSs sont composés d'au moins 2 protéines, une protéine SHK Sensor Histidine Kinase qui détecte un signal, s'autophosphoryle sur un résidu histidyl et transfère le groupement phosphate à une RR. Cette RR est capable de se lier à l'ADN pour réguler l'expression de gènes cibles. Plusieurs TCSs sont décrits pour réguler la production de toxines chez les bactéries à G+ et G-.

Le séquençage de la souche de *C. botulinum* Hall A a permis d'identifier 28 TCSs putatifs, 8 SHKs orphelins, 8 RRs orphelins et 15 facteurs σ . Les RRs sont structurellement composés de deux parties, une partie réceptrice conservée et une partie effectrice variable. La plupart de ces RRs ont des homologues proches chez d'autres clostridies. Parmi ces TCSs, deux sont homologues au régulateur VirR de *C. perfringens*.

Chez *C. botulinum* Hall A, 2 TCSs modifient le métabolisme général et semblent jouer un rôle indirect dans la production de BoNT et des ANTPs. Trois autres TCSs régulent positivement la production des BoNT et ANTPs de façon directe ou indirecte et ceci indépendamment de BoTR/A. Un autre TCS est impliqué dans la régulation négative de la production de toxine par liaison aux promoteurs des 2 opérons empêchant la liaison de BotR/A sur les promoteurs du locus botulique.

Ainsi l'expression des gènes du locus botulique semble être régulée par un réseau complexe de systèmes impliquant des facteurs σ et des TCSs.

I.2.5.3 Le "quorum sensing"

Le "quorum sensing" permet aux bactéries de sentir la densité cellulaire et de coordonner leur réponse face à un changement de densité. Ce mécanisme est impliqué dans le contrôle de la synthèse de nombreux facteurs de virulence chez plusieurs bactéries pathogènes.

Les bactéries peuvent sentir leur environnement en détectant et en mesurant la concentration de petites molécules appelées autoinducteurs (AIs) qui peuvent être produits

par des bactéries de même espèce, ou d'espèces différentes.

La communication interspécifique implique une protéine LuxS permettant la synthèse d'AI-2 à partir de SAM. De nombreuses bactéries ont une copie du gène *luxs* dans leur génome et l'AI-2 peut être détecté par différentes espèces bactériennes. LuxS joue un rôle dans la régulation des toxines α et la perfringolysine la protéase κ de *C. perfringens*. Chez *C. difficile* le rôle de LuxS dans la production des toxines TcdA et TcdB n'est pas clairement établi, mais il semble jouer un rôle dans la formation de biofilm qui est l'une des étapes cruciales de la colonisation et de la persistance de *C. difficile* dans l'intestin. La production d'AI-2 semble influencer la germination de la spore chez *C. botulinum* mais ne semble pas impliquée dans la production de toxine.

La communication intraspécifique implique la détection de peptide, les AIPs par des TCSs spécifiques. Ce système est fortement impliqué dans la production de toxine chez *S. aureus* à travers l'opéron *agr* et d'un petit ARN régulateur (l'ARN III). Des homologues des gènes de l'opéron *agr* ont été identifiés chez les souches *C. botulinum* du groupe I et semblent impliqués dans la sporulation ainsi que la régulation de la production de BoNTs. Un TCS homologue au TCS *agrA/agrC* de *S. aureus* a également été identifié mais ne modifie pas la production de BoNTs chez la souche *C. botulinum* Hall A.

I.2.5.4 Les petits ARN régulateurs

Les petits sARNs sont des régulateurs transcriptionnels et post transcriptionnels pouvant agir en cis ou en trans et certains peuvent être traduits en protéines.

De nombreux sRNAs sont impliqués dans la régulation de facteurs de virulence chez les bactéries de façon directe, ou de façon indirecte en participant à d'autres mécanismes de régulation tel que l'ARN III de *S. aureus* relié au système *agr*. Chez *C. perfringens*, un sARN appelé VR-ARN contrôle la transcription de la collagénase A et de la toxine α .

Un grand nombre de sRNAs putatifs a été identifié chez *C. botulinum*, *C. difficile*, *C. perfringens* et *C. tetani*. La plupart sont uniques au genre *Clostridium* et ne sont pas retrouvés chez d'autres bactéries. Il est intéressant de noter que certains sRNAs sont conservés chez les clostridies pathogènes suggérant un mécanisme commun de régulation des facteurs de virulence ou d'adaptation à une niche écologique.

I.2.5.5 Les signaux environnementaux

Certains facteurs environnementaux comme les sources d'azote et de carbone ainsi que la température, semblent jouer un rôle dans la production de toxines mais leur mode d'action

n'est pas connu.

Chez *C. botulinum*, un fort taux d'arginine en milieu de culture minimum réprime la production de BoNT/A alors qu'un ajout de caséine l'augmente. La température est un signal important pour la régulation des facteurs σ et donc des gènes qu'ils régulent. Chez *C. difficile*, une température de 42°C prévient la transcription de *tcdR* et donc la production de TcdA et TcdB mais aucune différence est observée pour la transcription de *botR/A* chez *C. botulinum*.

Chez *C. difficile*, on observe une répression catabolique par le glucose entraînant la diminution de l'expression de *tcdA* et *tcdB* alors qu'une quantité suffisante de glucose est nécessaire pour une production optimum de BoNTs. De même, le dioxyde de carbone stimule l'expression et la formation des BoNTs des souches non protéolytiques de *C. botulinum* de type B et E mais n'a pas influence sur les souches protéolytiques de type A.

I.2.6 Conclusion

BoNT et TeNT ont de grandes similarités de séquences et de structure ce qui suggère que les gènes codant ces toxines ont évolué à partir d'un ancêtre commun. Leur transcription et production sont régulées par un réseau complexe de régulateurs impliquant des facteurs σ et des TCSs. L'implication d'autres systèmes comme le quorum sensing ou les sARNs, reste encore à déterminer.

Une meilleure compréhension des mécanismes régulant la production de ces toxines permettrait d'optimiser leur production pour la préparation de vaccins ou dans un but thérapeutique, mais également de développer de nouvelles stratégies pour le contrôle du botulisme et du tétanos.

Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Toxicon

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicon

Regulation of toxin synthesis in *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani*

Chloé Connan, Cécile Denève, Christelle Mazuet, Michel R. Popoff*

Institut Pasteur, Unité des Bactéries Anaérobies et Toxine, 25 rue du Dr Roux, Paris cedex15, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 November 2012
 Received in revised form 25 May 2013
 Accepted 4 June 2013
 Available online xxxx

Keywords:

Clostridium botulinum
Clostridium tetani
 Botulinum neurotoxin
 Tetanus toxin
 Regulation

ABSTRACT

Botulinum and tetanus neurotoxins are structurally and functionally related proteins that are potent inhibitors of neuroexocytosis. Botulinum neurotoxin (BoNT) associates with non-toxic proteins (ANTPs) to form complexes of various sizes, whereas tetanus toxin (TeNT) does not form any complex. The BoNT and ANTP genes are clustered in a DNA segment called the botulinum locus, which has different genomic localization (chromosome, plasmid, phage) in the various *Clostridium botulinum* types and subtypes. The botulinum locus genes are organized in two polycistronic operons (*ntnh-bont* and *ha/orfX* operons) transcribed in opposite orientations. A gene called *botR* lying between the two operons in *C. botulinum* type A encodes an alternative sigma factor which regulates positively the synthesis of BoNT and ANTPs at the late exponential growth phase and beginning of the stationary phase. In *Clostridium tetani*, the gene located immediately upstream of *tent* encodes a positive regulatory protein, TetR, which is related to BotR. *C. botulinum* and *C. tetani* genomes contain several two-component systems and predicted regulatory orphan genes. In *C. botulinum* type A, four two-component systems have been found that positively or negatively regulate the synthesis of BoNT and ANTPs independently of BotR/A. The synthesis of neurotoxin in Clostridia seems to be under the control of complex network of regulation.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Among the large number of *Clostridium* species, which are bacteria from the environment, a few produce potent neurotoxins and are responsible for neurological disorders in human and animals. Botulinum neurotoxins (BoNTs) inhibit the release of acetylcholine at peripheral cholinergic nerve terminals causing the flaccid paralysis characteristic of botulism, whereas tetanus neurotoxin (TeNT) blocks neurotransmitter release at synapses at the central nervous system causing the spastic paralysis of tetanus. In the past several decades, numerous works have been performed to elucidate the structure and mechanism of action of the clostridial neurotoxins as well as their genetic organization

and regulation (Brunger and Rummel, 2009; Lacy and Stevens, 1999; Montal, 2010; Poulain et al., 2008, 2006). BoNT and TeNT synthesis are under the control of a complex regulation process involving alternative sigma factors, two-component systems (TCSs), quorum sensing, small regulatory RNAs (sRNAs), and environmental signals.

2. Clostridia producing neurotoxins

Clostridia capable of producing BoNT display heterogeneous bacteriological characters and are divided into several species and groups. The taxonomic position of the *Clostridium botulinum* species was originally based on only one phenotype, the production of a BoNT, and non-toxic variant strains, although genetically related to *C. botulinum*, were assigned to different species such as *Clostridium sporogenes* and *Clostridium subterminale*. The BoNTs are divided into seven different neurotoxin types, which are

* Corresponding author.

E-mail address: mpopoff@pasteur.fr (M.R. Popoff).

immunologically distinct and are termed with letters from A to G. They exhibit 34–64% identity at the amino acid sequence level. Sequence analysis of a large number of *bont* genes permits the distinguishing of subtypes varying from 2.6 to 31.6% at the amino acid sequence level within each BoNT type (Carter et al., 2009; Chen et al., 2007; Hill et al., 2007; Raphael et al., 2012; Smith et al., 2005). However, all of them cause the typical flaccid paralysis of botulism in experimental animals, similar to that observed in human patients suffering from botulism. Physiological differences between *C. botulinum* strains have been identified, but the production of the different BoNT types produced do not necessarily correlate with the *C. botulinum* strain phenotypes. The species was divided into 4 physiological groups (Smith, 1975).

- Group I : *C. botulinum* A, and proteolytic strains of *C. botulinum* B and F.
- Group II : *C. botulinum* E, and glucidolytic strains of *C. botulinum* B and F.
- Group III : *C. botulinum* C and D.
- Group IV : *C. botulinum* G (or *C. argentinense*).

The latter group which also includes non-toxic strains previously identified as *C. subterminale* and *Clostridium hastiforme*, is metabolically distinct from the other groups and has been assigned to a different species called *Clostridium argentinense* (Suen et al., 1988). The taxonomic position of *C. botulinum* became more ambiguous since it has been found that BoNTs can be produced by *Clostridium* strains clearly distinct from already defined *C. botulinum*, and biochemically and genetically related to different species. Thereby, atypical strains of *Clostridium butyricum* and *Clostridium baratii* produce a BoNT related to type E and F, respectively (Hall et al., 1985; McCroskey et al., 1986, 1991). In each group of *C. botulinum* or other *Clostridium* species, the toxigenic strains regardless of toxin type, are closely related according to their phenotypic and genetic properties.

In contrast, tetanus neurotoxin (TeNT) is produced by a uniform group of bacteria belonging to the *Clostridium tetani* species. The *C. tetani* species contains toxigenic and non-toxigenic strains and is similar culturally and biochemically to *Clostridium cochlearium* and *Clostridium tetanomorphum*, but it can be distinguished from the two latter species by DNA comparison (Nakamura et al., 1979; Wilde et al., 1989). Ten neurotoxic and three non-toxic *C. tetani* strains studied by Nakamura et al. were homogeneous in DNA/DNA hybridization (85–93% similarity) (Nakamura et al., 1979). A genome sequence is available for only one *C. tetani* strain.

3. Neurotoxin gene organization

3.1. The botulinum toxin locus

BoNTs associate with non-toxic proteins (ANTPs) at acidic pH by non-covalent bonds to form botulinum complexes of various sizes. ANTps include hemagglutinins (HAs), non-toxic and non-hemagglutinin (NTNH), and

proteins with still unknown function that are called OrfX. In contrast, TeNT does not form any complex (Popoff and Marvaud, 1999; Poulain et al., 2006). The genes encoding the BoNTs and ANTps have been cloned and sequenced in representative clostridial strains of each BoNT type. The BoNT and ANTP genes are clustered in close vicinity and constitute the botulinum toxin locus. They are organized in two operons. The *bont* gene is immediately preceded by the gene of the NTNH component. Both genes form an operon located in the 3' part of the botulinum toxin locus, which is well conserved in the different types of BoNT-producing Clostridia. The HA or OrfX genes, which are upstream to the *ntnh-bont* genes, are transcribed in the opposite orientation and form the second operon (Dineen et al., 2004; Hauser et al., 1994; Henderson et al., 1996; Yang et al., 1996). The HA operon (*ha33*, *ha17*, *ha70*) is associated with *bontB*, *bontC*, *bontD*, *bontG*, whereas the OrfX operon (*orfX1*, *orfX2* and *orfX3*) is linked to *bontA2*, *A3*, *A4*, *E* and *F*. An additional gene (*p47*) encoding a 47 kDa protein lies immediately upstream of the *ntnh* gene in the botulinum loci containing an OrfX operon. The cluster of *p47-ntnh-bont* genes are transcribed in the same orientation and are organized in an operon (Brüggemann et al., 2011; Dineen et al., 2004; East et al., 1998; Jacobson et al., 2008; Kubota et al., 1998; Li et al., 1998; Lin et al., 2010). *bontA1* is the only neurotoxin gene which has been found in either the HA or OrfX botulinum toxin locus (rev in Brüggemann et al. (2011); Hill and Smith (2013)).

A gene, *botR*, which encodes an alternative sigma factor involved in the regulation of botulinum locus gene expression (Raffestin et al., 2005), is present in different positions in different strains of *C. botulinum*. In *C. tetani*, a gene (*tetR*) equivalent to *botR* (Marvaud et al., 1998a; Raffestin et al., 2005) is present upstream of the tetanus toxin (*tent*) gene. No *antp*-like genes have been identified in *C. tetani* (Brüggemann et al., 2003). It is noteworthy that *botR* is not present in botulinum locus containing the *bont/E* gene, in *C. botulinum* or *C. butyricum* type E (Kubota et al., 1998), as well as in nonproteolytic *C. botulinum* type F (Dover et al., 2011).

Usually, one clostridial strain produces only one type of neurotoxin and the botulinum locus is present in a single copy on the genome as suggested by Southern blotting of DNA fragments separated by pulse-field gel electrophoresis (Hutson et al., 1996; Lin and Johnson, 1995). However, some strains synthesize two different BoNTs such as BoNT/A-BoNT/B, BoNT/A-BoNT/F, and BoNT/B-BoNT/F (Henderson et al., 1996; Hutson et al., 1996; Luquez et al., 2009; Raphael et al., 2010; Rodriguez Jovita et al., 1998; Santos-Buelga et al., 1998). The bivalent strains contain two botulinum loci. For example, the Ab strains contain two *botulinum* loci including OrfX-BoNT/A1 and HA-BoNT/B, which are 60 kbp distant on the chromosome (Hutson et al., 1996; Jacobson et al., 2008; Luquez et al., 2009). In such strains, the two neurotoxins are usually produced in different proportions. Thus, in Ba and Bf strains, BoNT/B is produced ten times more, than BoNT/A and BoNT/F (Henderson et al., 1996; Hutson et al., 1996; Sakaguchi et al., 1986). However, the relative amounts of the two toxins greatly vary from almost equivalent to 100–1000:1 proportion depending of culture conditions. Indeed, bivalent BF strains produce

mainly BoNT/B at 37 °C and principally BoNT/F at 30 °C (Barash and Arnon, 2004). Some clostridial strains contain silent neurotoxin genes. Indeed, several *C. botulinum* A strains isolated from food borne and infant botulism contain a silent *bont/B* gene and are noted A(B). The *bont/B* nucleotide sequence is related to that of *C. botulinum* B strains (97% identity), but it has a stop mutation in position 128 and base deletions resulting in reading frameshifts and multiple stop codons (Dineen et al., 2004; Henderson et al., 1996; Hutson et al., 1996; Rodriguez Jovita et al., 1998). Silent *bont/B* has also been evidenced in non toxigenic *C. subterminale* strains (Franciosa et al., 1994; Jovita et al., 1998).

3.2. Genomic localization of the botulinum locus

Based on genome sequencing of 10 *C. botulinum* strains from group I and II, *C. botulinum* genomes consist of a circular DNA chromosome (3 659 644 to 4 155 278 bp). Genomes of group I strains share a high similarity and are strongly distant from those of group II strains. There is almost no genome-wide synteny between group I and group II strains, except a region around the origin of replication. Genomic synteny of one representative type C strain and one representative type D strain indicates a related chromosome organization between these two strains from group III. Their genetic organization is distinct from that of group I and II strains. Plasmids are common in *C. botulinum* with sizes ranging from 16344 to 270346 bp and containing 19–329 genes. In addition, strains of group III contain phages, which harbor the neurotoxin gene. The main metabolism feature of *C. botulinum* genomes is the lack of many genes for aerobic respiratory chain, amino acid biosynthesis, and sugar utilization. In contrast, *C. botulinum* contains numerous genes for hydrolytic enzymes and transport systems (rev in Brüggemann and Gottschalk (2004); Brüggemann et al. (2011); Hassan et al. (2013); Luquez et al. (2012); Skarin et al. (2011)).

The genes encoding for the different types of BoNT are present on different genetic elements, including phage, plasmid or chromosome depending on the species and strain of Clostridia. In *C. tetani* and *C. argentinense*, the neurotoxin gene is present within large plasmids (51 and 76 MDa respectively). Plasmids of various sizes and bacteriophages have been found in *C. botulinum* A, B, E, and F and previous works have shown that toxigenicity was not associated with the presence of these genetic elements (Eklund et al., 1989; Strom et al., 1984; Weickert et al., 1986). Therefore, the genes encoding these neurotoxins were assumed to be located on the chromosome. However, it has been recently found that in some strains such as Loch Maree strain (subtype A3), 657Ba (type Ba and subtype A4), Okra (type B1), and Eklund 17B (type Bnp) the botulinum neurotoxin genes are harbored by large plasmids (47–270 kb) (Marshall et al., 2007; Smith et al., 2007). Plasmid location of neurotoxin genes seems common in *C. botulinum* type B strains, mainly in subtype B1, bivalent, and non proteolytic strains (Franciosa et al., 2009). In the bivalent strain Ba657 the two botulinum loci, locus A and locus B, are located on the same plasmid and are separated by approximately 97 kbp. Similarly, the neurotoxin genes,

bontB and *bont/f*, from one Bf strain are located on the same plasmid (pBf), which is highly related to pCLJ from 657Ba strain (Hill et al., 2009). Interestingly, none of botulinum plasmid show synteny to *C. tetani* plasmid pE88, which contains the *tent* gene (Hill et al., 2009). In *C. botulinum* type E and neurotoxigenic *C. butyricum* strains, the BoNT/E encoding gene is located on the chromosome. In *C. botulinum* C and D, it has been clearly evidenced that BoNT is encoded by bacteriophages (reviewed in Poulain et al. (2006)).

The location of botulinum loci within chromosome or plasmid seems to occur not at random but at specific sites. Indeed, in strains from group I or II, whose genome sequencing is available, three specific sites of botulinum locus integration have been identified. OrfX-BoNT/A2, OrfX-BoNT/A1, and OrfX-BoNT/F loci are located in the *ars* operon, which contains 3 to 5 genes involved in arsenic reduction. The OrfX-BoNT/A1 and OrfX-BoNT/F loci share a similar integration site at the 5' end of the *ars* operon, whereas the OrfX-A2 locus is inserted between two copies of *arsC* gene. The HA-BoNT/A1 and HA-BoNT/B loci, which contain a recombinant *ntnh* gene from type A and type B strains, are found in the *oppA/brnQ* operon encoding an extracellular solute binding protein and branched chain amino acid transport proteins, respectively. This operon is lacking in non-proteolytic *C. botulinum* type B, *C. botulinum* type E, and *C. butyricum* type E strains. The third integration site is the *rarA* gene, which contains the OrfX-BoNT/E locus in *C. botulinum* type E and *C. butyricum* type E strains. *rarA* encodes a resolvase protein involved in recombination or insertion events of transposons. Interestingly, the botulinum E locus is inserted in the same codon (102) of *rarA* gene in both *C. botulinum* type E and *C. butyricum* type E strains, and the inserted botulinum toxin locus contains an additional intact *rarA* gene (Hill et al., 2009). Horizontal gene transfer and gene mobilization between the different genomic structures (chromosome, plasmid, phage) seem to be the main mechanisms of the diversity in *C. botulinum* strains. The specific genomic locations of the botulinum toxin loci probably represent hot spots of recombination events and/or insertion of mobile genetic elements such as transposons (Hill and Smith, 2013; Hill et al., 2009). It is not known whether these specific locations provide an advantage in toxin gene expression.

Two specific sites of botulinum locus location have been identified on plasmids from group I strains, one contains OrfX-BoNT/A3, OrfX-BoNT/A4 from Ba strain, or OrfX-BoNT/F from Bf strain, and the second harbors the HA-BoNT/B locus from *C. botulinum* B1 strain or bivalent Ba4 or Bf strains. The HA-BoNT/non-proteolytic(np)B locus is located on a plasmid different from those of group I strains. The downstream flanking region of the HA-BoNT/npB locus contains an IS element, a transposon-associated resolvase, and a site specific recombinase (Hill et al., 2009). The localization of the botulinum locus on plasmid or phage in numerous strains, and the presence of insertion sequences in *C. botulinum* genomes, some of them flanking the botulinum locus, as well as transposon associated genes suggest horizontal transfer of the neurotoxin genes between Clostridium strains and subsequent evolution in each strain, notably by recombination events (Hill et al., 2009; Skarin and Segerman, 2011).

3.3. The tetanus locus

The complete genome sequence of a toxigenic *C. tetani* strain has been determined (Brüggenmann et al., 2003). It consists of a 2799250 bp chromosome containing 2372 putative genes, and of a 74082 bp plasmid (E88) containing 61 genes. *C. tetani* possesses many genes for peptidases, amino acid and lipid degradation, whereas genes for sugar utilization are lacking. It contains numerous transport-related genes, in particular 35 genes for sodium ion-dependent systems indicating that the sodium gradient is a major driving force in membrane transport. The TeNT encoding gene and seven putative regulatory genes are localized on the plasmid, whereas the tetanolysin (a hemolysin) gene and putative adhesin genes are located on the chromosome. In contrast to *C. botulinum*, the *tent* gene is preceded by *tetR*, which is analogous to *botR*. But, no gene analogous to *C. botulinum antp* genes lies in the flanking regions of *tent* or in another localization in the *C. tetani* genome. Therefore, TeNT differs from BoNT as it does not form any complexes with non-toxic proteins.

A few mobile elements are present that no longer appear to be functional because of mutations, and the low G + C variation indicate a high stability of the *C. tetani* genome without recent gene acquisition by horizontal transfer. Indeed, foreign sequences can be usually evidenced by their G + C content different from that of the genome, but they are more difficult to identify when they share with the host genome a similar G + C content. However, a few genes of the E88 plasmid show similarity with coding sequences from other bacterial species but provide no clues to the mystery of the origin of this plasmid harboring neurotoxin gene (Brüggenmann et al., 2003).

4. Toxin gene regulation

C. botulinum strain Hall contains 28 two-component systems, 8 orphan histidine kinases, 8 orphan response regulators, and 15 sigma factors (Sebaihia et al., 2007). However, little is known about the regulation mechanisms in *C. botulinum*. The most studied regulation systems concern those involved in the control of the neurotoxin synthesis.

4.1. Bont and antp genes are transcribed as two operons

Transcriptional analysis has been investigated in several *C. botulinum* type A, C, D and E strains (Chen et al., 2008; Dineen et al., 2004; Hauser et al., 1994; Henderson et al., 1996; Kouguchi et al., 2006). In *C. botulinum* C, a transcription start site was mapped 113 nucleotides upstream of the ATG of *ntnh/C*, and another one 100 nucleotides upstream of the initial codon of *bont/C1*. Both genes are preceded by a consensus ribosome binding site (GGAGG). The analysis of mRNA by reverse transcriptase PCR (RT-PCR) showed that a mRNA overlaps *bont/C1* and *ntnh/C1* genes, possibly encoding both genes (Hauser et al., 1994, 1995). Similar results were found in *C. botulinum* A NCTC 2916 (Henderson et al., 1996). Two transcripts have been identified for the *bont/A* gene. The longer (7.5 kb) encompasses the *ntnh-bont/A* genes, and the shorter (4 kb) corresponds to *bont/A* alone. In *C. botulinum* A1 (strain A62), *bont/A* has been reported to be transcribed in a

monocistronic manner (Binz et al., 1990). This indicates that *bont/A* and *bont/C1* are transcribed as a mono or a bicistronic messenger in association with the corresponding *ntnh* gene. Transcriptional analysis in *C. botulinum* KyotoF type A2 showed that neurotoxin genes are transcribed only as a tricistronic operon, *p47-ntnh-bont/A2*, with a transcriptional origin 28 nucleotides upstream of the ATG of *p47*, and no RNA messenger specific of *bont/A2* alone was evidenced (Dineen et al., 2004). Using RT-PCR, it was found that at least one mRNA overlaps the 3 *ha* genes in *C. botulinum* C (Hauser et al., 1995). By Northern blots in *C. botulinum* A NCTC2916, a single 3.2 kb transcript encompasses *ha35*, *ha17* and *ha70* genes (Henderson et al., 1996). A transcriptional start site was mapped 34 nucleotides upstream of the ATG of *ha35*. Therefore, *has* seem to form a tricistronic operon. However, the HA35 or HA33 components in *C. botulinum* A and C respectively, were found to be produced in higher amount than the other HA components (Inoue et al., 1996). This suggests that the relative levels of synthesis of the 3 HA components are controlled at the translational level as it was found for other toxins such as cholera toxin (Hirst, 1995). In *C. botulinum* with a subtype A2 locus organization, the transcriptional analysis also revealed that *orfX1*, *orfX2* and *orfX3* genes are transcribed as a tricistronic operon. A 5.5 kb transcript encompassing the three genes was detected and a transcriptional start site was mapped 1179 nucleotides upstream of the ATG of *orfX1* (Dineen et al., 2004).

The genetic organization in the other *C. botulinum* types shows that *bont* and *antp* genes are localized in two clusters which can be considered as polycistronic units in comparison with the findings reported in *C. botulinum* A and C. In *C. botulinum* D strain 4947, equivalent amounts of *bont/D* and *ntnh* mRNAs as monitored by quantitative reverse transcription-(RT)-PCR and Northern analysis support a bicistronic transcription of both genes (Kouguchi et al., 2006). Albeit a tricistronic mRNA encompassing the *ha* genes has been identified by Northern blot, the different proportions of mRNAs by RT-PCR suppose that several mRNA species might be involved in the *ha* transcription (Kouguchi et al., 2006). Therefore, the botulinum toxin locus gene transcription seems variable (monocistronic or polycistronic) according to the strains and culture conditions. Growth temperature is an environmental factor, which can influence the transcription of toxin genes. Indeed, in *C. botulinum* E strain CB11/1-1 grown at 30 °C, *p47-ntnh-bont/E* and *orfX1-orfX2-orfX3* have similar patterns of relative expression, with 4-fold more expression of *p47-ntnh-bont/E* than *orfX* genes, whereas at 10 °C the genes are more differently expressed, *p47-ntnh* being more expressed than *bont/E* and *orfX1* less expressed than *orfX2-orfX3*. This suggests that high temperature induces the expression of two separate tricistronic operons (*p47-ntnh-bont/E* and *orfX1-orfX2-orfX3*) and that low temperature results in a more disconnected gene expression, *bont/E* and *orfX1* being monocistronically transcribed (Chen et al., 2008).

4.2. BotR and TetR positively regulate neurotoxin gene expression

It was first reported that in *C. botulinum* C, a gene (*botR/C*) encodes a 22 kDa protein having the features of a DNA

binding protein: basic pI (10.4) and the presence of a helix-turn-helix motif (Hauser et al., 1995). This gene is conserved in proteolytic and non proteolytic *C. botulinum* A, B, D, F and G, and in *C. tetani* (*tetR*) (Bhandari et al., 1997; East et al., 1996; Henderson et al., 1996; Li et al., 1998). However, it has not been detected in *C. botulinum* E or nonproteolytic F. *tetR* is the only gene related to a gene from the botulinum locus which is conserved in *C. tetani*. *tetR* is localized immediately upstream of the *tent* gene.

BotRs from the different toxinotypes and TetR have 51–97% identity and are related to other known regulatory proteins such as UviA (25–28% identity), which regulates the bacteriocin production in *Clostridium perfringens*, MsmR protein (21–26%) which regulates the sugar transport in *Streptococcus mutans*, and TcdR (20–24%) in *Clostridium difficile* (previously named TxrR), a positive regulator of Toxin A and Toxin B genes (*tcdA* and *tcdB*). Interestingly, *tcdR* and *uviA* have a similar localization to that of *botR* and *tetR*, since they lie upstream of the loci of *tcdA* and *tcdB*, as well as the bacteriocin gene (*bcn*), respectively. We have analyzed the function of *botR/A* by overexpressing this gene in *C. botulinum* A. *botR/A* was cloned under the control of its own promoter in a high copy number shuttle vector which was transferred into *C. botulinum* A by electroporation. Overexpression of *botR/A* increases the production of BoNT/A and ANTPs and of the corresponding mRNA levels. Inversely, partial inhibition of the *botR/A* expression by antisense mRNA results in a lower production of BoNT/A and ANTPs. It was concluded that BotR/A is a transcriptional activator of *bont* and *antp* genes (Marvaud et al., 1998b). Interestingly, overexpression of *botR/A* and to a lesser extent *botR/C* in *C. tetani* enhances TeNT synthesis (Marvaud et al., 1998a), thus indicating that BotR and TetR share a similar *in vivo* mechanism of action. This also indicates that the regulation of the *bont* and *tent* genes is conserved in *C. botulinum* and *C. tetani*, constituting a further evidence that *bont* and *tent* gene loci derive from a common ancestor (Marvaud et al., 1998a).

4.3. BotR and TetR are alternative sigma factors controlling the expression of the neurotoxin and associated protein genes

BotR/A binds to *ntnh-bont/A* and *ha35* promoters, the two operon promoters, in a dose dependent manner only when associated with *Escherichia coli* RNA polymerase core enzyme (Core) (Raffestin et al., 2005). BoR/A binds to the Core in a DNA-independent manner and then the complex BotR/A-Core interacts specifically with the operon promoters and also with the putative promoters of the other botulinum locus genes (*bont/A*, *botR/A*, *ha17*, *ha70*). In *in vitro* transcription, transcripts were observed when BotR/A-Core was incubated only with DNA templates containing *ntnh-bont/A* and *ha35* promoters. Thereby, BotR/A is an alternative sigma factor that is required for specific expression of the botulinum locus operons (Raffestin et al., 2005).

Footprinting experiments with DNA fragment containing *ntnh-bont/A* promoter indicate that the conserved –10 (GTTATA) and –35 (TTTACA) promoter sequences, are the motif signatures recognized specifically by the sigma factor BotR/A. Sequences of the –35 and –10 regions of the *ntnh-*

bont/A promoter are conserved in the *ha35* promoter of *C. botulinum* A, and also in the corresponding promoters of *C. botulinum* B, C, D and G, as well as in the *tent* promoter in *C. tetani*. The consensus promoter site sequences are ATTT-TagGTTTACAAAA for the –35 and ATGTTATATataa for the –10 regions (Popoff and Marvaud, 1999). The –35 box contains the hexa-motif TTTACA which has also been found in the corresponding promoter sequence recognized by TcdR and UviA.

The role of BotR/A is probably not restricted to the control of the *botulinum* locus genes but has a pleiotropic effect in *C. botulinum*. Indeed, when *botR/A* is overexpressed in *C. botulinum* A (Marvaud et al., 1998b), 22 genes were overexpressed at least 4 fold and 67 decreased compared to the wild type strain as monitored by a transcriptomic analysis, and when *botR/A* is partially repressed by an antisense RNA system (Marvaud et al., 1998b), 15 genes were overexpressed and 6 were underexpressed. FTCS (unpublished data). The target genes included *bont/A*, *antps*, many enzyme genes, and to a lower extent transporter and membrane genes. Interestingly when *botR/A* was overexpressed, the RR gene of the TCS CLC_0668/CLC_0669 was overexpressed, whereas the orphan putative sensory transduction histidine kinase was repressed. But these data remain to be confirmed.

4.4. BotR and TetR belong to a new subgroup of the σ -70 family of RNA polymerase sigma factors (group 5)

It has also been demonstrated that UviA is required, as an alternative sigma factor, for transcription of the UV-inducible bacteriocin gene in *C. perfringens* (Dupuy et al., 2005). The majority of the sigma factors in eubacteria belong to the σ -70 family, which can be divided in four structurally and functionally related groups. BotR, TetR, TcdR and UviA have some similarities with the extra cytoplasmic function (ECF) group (group 4). Because they differ sufficiently in structure and function, it was suggested that they should form a new group (group 5) that is distantly related to the σ -70 family (Helmann, 2002).

Interchangeability between BotR/A, BotR/C and TetR was first demonstrated *in vivo* in *C. tetani* (Marvaud et al., 1998a). Then, the four sigma factors, BotR/A, TetR, TcdR and UviA were found to be functionally interchangeable *in vitro* and *in vivo* (Dupuy et al., 2006). The functional conservation of sigma factors of group 5 suggests the idea that the members of group 5 were derived from a common ancestor. A common molecular mechanism is involved in the regulation of synthesis of potent *Clostridium* toxins (BoNT, TeNT, TcdA, and TcdB) and bacteriocin.

4.5. The expression of *botR/A* and other botulinum locus genes occurs during the transition from the exponential to the stationary growth phase

Expression of *botR/A*, *bont/A* and *antps* genes in *C. botulinum* A strain Hall and NCTC2916 have been monitored by reverse transcription and real-time PCR analysis (Couesnon et al., 2006). Expression of *botR/A* is concomitant with that of *bont/A* and *antps*. All botulinum locus genes follow the same kinetics of expression in sporulated or nonsporulated

cultures. However, the relative expression of *botR/A* in both strains was approximately 100 fold less than those of the other botulinum locus genes. Expression of botulinum locus genes is low during the exponential growth, increases at a maximum level (100 fold increase) at the transition phase between late exponential and stationary growth phase, and then decreases during the stationary phase. After 24 h incubation, relative gene expression decreases to levels found in the early growth phase. The highest toxin concentration (monitored by mouse lethal activity) is observed at 24 h (12 h after the maximal gene expression), and is stable for a period of at least 5 days. These results are in agreement with previous reports for *C. botulinum* A strains A62, Hall and NCTC2916 using analysis of mRNA transcripts by Northern hybridization (Bradshaw et al., 2004). Moreover, in strain NCTC2916, in sporulated or nonsporulated conditions, the relative expression of *bont/A* is approximately twice than that of *ntnh/A*, and *ha35* transcripts are about twofold higher than those of *ha17* and *ha70*. In contrast, in nonsporulated cultures of the Hall strain, the relative levels of expression of *bont/A* and *antps* are similar, whereas, in sporulated cultures each *ha* gene is expressed twofold higher than *bont/A* and *ntnh/A* (Coesnon et al., 2006). In contrast to C2 toxin, the synthesis of which is dependent of sporulation, the BoNT production is not linked to spore formation. The highest levels of toxins in group I strains are generally obtained in cultures which undergo rapid autolysis and which do not sporulate (Bradshaw et al., 2004; Nakamura et al., 1978; Rao et al., 2007; Schantz and Johnson, 1992). However, it is not excluded that sporulation can directly or indirectly modulate BoNT and ANTP synthesis. This is supported by the differential *ha* expression levels in sporulating and non-sporulating conditions (Coesnon et al., 2006), and the dual effect of quorum sensing systems (*agr-1* and *agr-2*) on sporulation and toxin production of *C. botulinum* group I strains (Cooksley et al., 2010) (and see below).

In *C. botulinum* E, where no *botR* gene has been found, the kinetics of BoNT/E production and the relative expression of *bont/E* and *p47* are the same as in *C. botulinum* A. The *bont/E* and *p47* genes are also expressed during the transition phase (Coesnon et al., 2006). All of these results support the fact that BotR is an alternative sigma factor specific to the transition phase at least in *C. botulinum* type A, B, C and D, like TcdR in *C. difficile* (Dupuy and Sonenshein, 1998; Hundesberger et al., 1997; Mani et al., 2002) and other alternative sigma factors. The time correlation between the expression of BotR and the other botulinum locus genes suggests that BotR is a key regulatory factor.

4.6. Two-component systems are involved in the regulation of BoNT synthesis

TCSs consist of a sensor histidine kinase (SHK) and a response regulator (RR). SHK detects a signal and auto-phosphorylates on a histidyl residue. The phosphate group is then transferred to a conserved aspartyl residue of RR protein, which is typically a DNA-binding protein that regulates target gene expression (Federle and Bassler, 2003). Some TCSs are known to be involved in the regulation of virulence factors in Gram-negative and Gram-

positive bacteria. Sequencing of *C. botulinum* genomes has identified numerous potential regulatory systems, including TCSs. According to Sebahia et al. *C. botulinum* strain Hall genome contains 28 putative TCSs, 8 orphan histidine kinases, 8 orphan response regulators, and 15 sigma factors (Sebahia et al., 2007). Further analyses showed that 39 proteins could be considered as RRs: they all possessed the signal receiver domain Rec (cd09944) and an additional domain, usually the DNA binding domain HTH_XRE (cl00088) or LytR (cl04498) (Connan et al., 2012). This is in agreement with the recent analysis of Galperin et al. (2010) showing that bacterial signal transduction proteins retain a conserved protein family profile. Indeed, of the 39 RRs that we have identified in the Hall strain genome, the majority (26) belongs to the OmpR family (COG0745) consisting of RRs with a CheY-like receiver domain and a winged-helix DNA-binding domain, and 4 other RRs were LytR family members (COG3279). Nine RRs were orphan regulators and 30 RR genes were located next to a gene coding for an SHK, as judged by the presence of two domains in the respective gene product, a histidine kinase-like ATPase (HATPase_c, cd00075) and a histidine kinase A (dimerization/phosphoacceptor) domain (HisKA, cl00080). RRs share a structurally conserved receiver domain and a variable effector domain. Phosphorylation of a conserved aspartate in the receiver domain induces a subtle conformational change resulting in activation of the effector domain. Different interactions between the receiver and effector domains and diverse regulatory strategies of the effector domains have been identified based on the different structures of the effector domains. RRs from the OmpR family are characterized by a winged helix-turn-helix (HTH) DNA binding motif in the effector domain which binds to direct repeat half-sites, whereas RRs from the LytR family contains β -strands instead of a HTH motif. RRS from OmpR and LytR families are widespread in bacteria and control many adaptive responses to environmental stimuli, notably LytR RRs, such as *Staphylococcus aureus* AgrA, regulate the production of virulence factors in various pathogens (Galperin, 2010; Gao et al., 2007). Most TCSs of *C. botulinum* strain Hall have close homologues in other *Clostridia*. Besides *C. sporogenes*, which is phenotypically related to *C. botulinum* but non-toxigenic, TCS homologs exist particularly in *Clostridium carboxidivorans*. However, 12 of the RRs have low similarity to proteins in other clostridia. Two RRs (CLC_0632 and CLC_1105) show homology (38 and 37% protein identity, respectively) to the VirR regulator, which is part of the *C. perfringens* TCS VirR-VirS involved in the regulation of numerous toxins in this bacterium (Ba-Thein et al., 1996; Cheung et al., 2009, 2010; Hassan et al., 2010; Ma et al., 2011; Ohtani et al., 2009, 2003; Okumura et al., 2008).

A total of 34 Hall isogenic antisense strains targeting 29 regulatory genes predicted to be part of TCSs and 5 putative orphan RR genes have been generated with the antisense mRNA method to investigate their potential participation in the control of toxin synthesis. Among the 34 Hall isogenic antisense strains, 31 retained similar growth kinetics compared to the control strain, whereas 2 strains showed a more rapid growth and one isogenic antisense strain had a significantly delayed growth. In this last strain,

BoNT/A production was delayed but eventually reached the same level as the wild type strain. This indicates that the corresponding orphan RR (CLC_0632) is involved in global metabolism but does not directly control toxin synthesis (Connan et al., 2012). Despite their relatedness, the two regulatory genes, CLC_0632 and VirR, are involved in distinct regulation pathways in *C. botulinum* and *C. perfringens*, which are general metabolism and toxinogenesis, respectively. Another TCS (CBO0366/CBO0365, equivalent to CLC_0423/CLC_0424) has been found to be involved in the adaptation of growth of *C. botulinum* type A to low temperature. Indeed, this TCS is expressed when bacteria are incubated at 15 °C and only at a low level at 37 °C. Its role in toxin synthesis has not yet been reported (Lindstrom et al., 2012).

Three TCSs, CLC_1093/CLC_1094, CLC_1914/CLC_1913 and CLC_0661/CLC_0663 have been found to be involved in the regulation of BoNT/A and ANTP production. BoNT/A and ANTPs were repressed in the corresponding antisense isogenic strains similarly to that observed in the *botR/A* isogenic antisense strain. However, *botR/A* expression was either not affected or was slightly increased in the three Hall isogenic antisense strains. These results argue that these three TCSs, control, directly or indirectly, the expression of the botulinum locus genes independently of *botR/A* (Connan et al., 2012). Thereby, BoNT/A and ANTPs appear to be under the control of a complex regulatory network involving an alternative sigma factor and at least three TCSs which are positive regulators. The regulatory pathways encompassing these three TCSs and toxin regulation in other *C. botulinum* types remains to be identified.

In addition, another TCS (CBO0787/CBO0786, equivalent to CLC_0842/CLC_0843) has recently been reported to negatively regulate the production of BoNT/A and ANTP in *C. botulinum* A. The regulator of this TCS binds to the promoter of the two operons, *ntnh-bont/A* and *ha*, and prevents BotR/A interaction with these same promoters, thus impairing the transcription of *bont* and *antp* genes (Zhang et al., 2013).

4.7. Quorum sensing

Quorum sensing allows bacteria to sense cell population density and to coordinate their response to a change in cell number. This mechanism plays an important role in bacterial interactions and in the control of virulence factor synthesis by many pathogenic bacteria. It was first discovered in the 70's in two bioluminescent bacteria first called *Photobacterium fischeri* and *Photobacterium harveyi* and then renamed *Vibrio fischeri* and *Vibrio harveyi*, respectively. Bacteria sense their cell density by measuring the concentration of small molecules called autoinducers (AIs) first synthesized as precursor then cleaved and exported in the environment through an ABC transport system. The detection is performed by a TCS, which regulates specific genes. Two models have been described: one permitting the communication within species (*V. fischeri* model) and another one for inter-species communication (*V. harveyi* model) (Eberhard, 1972; Federle and Bassler, 2003; Waters and Bassler, 2005).

AI-2 is a furanosyl borate diester synthesized by LuxS from SAM (S-adenosylmethionine). Numerous bacteria

contains *luxS* in their genome and thus AI-2 can be detected by different species, allowing interspecies communication (reviewed in Waters and Bassler (2005)). The role of LuxS in toxinogenesis has been evidenced in *C. perfringens*. The TCS VirR/VirS has a pleiotropic effect and regulates not only toxin genes but also an operon containing *luxS*. LuxS acts in the mid exponential growth phase and upregulates the production of alpha toxin, perfringolysin and kappa protease (Ohtani et al., 2002). In *C. difficile*, AI-2 seems to positively regulate the transcription of Toxin A and Toxin B genes as well as that of *tcdE*. But the role of quorum sensing in the control of toxinogenesis has not been clearly evidenced in *C. difficile* (Carter et al., 2005; Lee and Song, 2005). However, quorum sensing via LuxS appears to be a key regulator of *C. difficile* biofilm formation, which is possibly a crucial step in gut colonization and persistence of this pathogen in the intestinal tract (Ethapa et al., 2013). Quorum sensing with production of AI-2, which might influence spore germination, has been evidenced in a *C. botulinum* type A strain (Zhao et al., 2006). A *luxS* related gene has been found in *C. botulinum* A strain Hall genome and an isogenic antisense strain targeting *luxS* has been generated. However, only a short delay in *bont/A* transcription and toxin production was observed in our growth condition compared to the wild type strain (unpublished). The role of this *luxS* gene in *C. botulinum* remains to be determined.

Intra-species communication has been described in Gram-positive bacteria, in which the autoinducers are peptides (AIP) recognized by specific TCSs (Waters and Bassler, 2005). A quorum sensing system related to that of *S. aureus* and consisting of two *agr* loci has been identified in group I *C. botulinum* strains, which controls both sporulation and BoNT production. Each *agr* locus seems to have a specific function, *agr-1* regulating sporulation and *agr-2* regulating BoNT synthesis (Cooksley et al., 2010). We have also identified homologous genes to *agrA* and *agrC* from *S. aureus* in the Hall genome. The isogenic antisense strain Hall/651 targeting the *agrA* homolog was not impaired in BoNT production (Connan et al., 2012). Thus, quorum sensing-dependent regulation pathways and their effects on the control of toxin production in *C. botulinum* remain to be defined.

4.8. Small regulatory RNA

Ten to twenty percent of bacterial genome DNA, most often located in intergenic regions, encode regulatory RNAs. Small RNAs (sRNAs), which were first discovered in the 70's, are usually 10–500 nucleotides long, but they can reach 1000 nucleotides or cover an entire gene, and they are considered to be stable molecules (20–60 min half live times) (Argaman et al., 2001). sRNAs are major transcriptional or posttranscriptional regulators of the adaptive response and thus are also called sensor RNAs. Some of them act in *cis* by changing their own conformational structure in response to physical factors such as temperature (for example in *Yersinia pestis*, *E. coli* or *Listeria monocytogenes*), or by binding to a metabolite (riboswitch) (Klinkert and Narberhaus, 2009; Narberhaus et al., 2006). In addition, *cis*-encoded sRNAs, which are transcribed from

the non-coding DNA strand, so they exhibit perfect sequence complementary with the target mRNA permitting a regulation by an antisense base-paired mechanism (Waters and Bassler, 2005). However, most sRNAs are active *in trans*. A few act by a protein sequestration mechanism, like the CsrA/CsrB system (Gutierrez et al., 2005), but most of them use a base pairing mechanism with mRNAs, thus regulating the translation and/or stability of target mRNAs. They act at distance from their production site and exhibit a low complementarity with their targets. Thereby, one sRNA might target different mRNAs and one mRNA can be regulated by different sRNAs. Considering the low sequence complementarity between sRNAs and mRNA targets, many sRNAs require a chaperone protein, called Hfq, to interact with their targets (reviewed in Thomason and Storz (2010)). It is noteworthy that an sRNA can act in *cis* or *trans*, or both and some of them can be transcribed into proteins. Recently, a new type of sRNA has been described, termed clustered regulatory interspaced short palindromic (CRISPR) repeats, which interferes with bacteriophage infection and plasmid conjugation (Sorek et al., 2008).

Numerous sRNAs are involved in the regulation of virulence factor synthesis in bacteria (Toledo-Arana et al., 2007) and also participate in the quorum sensing mechanism, such as RNA III, which plays a significant role in the Agr quorum sensing system in *S. aureus* (Novick and Geisinger, 2008). In *C. perfringens*, an sRNA, called VR-RNA, controls the synthesis of collagenase A and alpha toxin at the transcriptional level (Shimizu et al., 2002). A large number of potential sRNAs have been identified in the genomes of 21 *Clostridium* species including *C. botulinum* (231–249), *C. difficile* (264), *C. perfringens* (131–193) and *C. tetani* (137) using a computational approach. Most of these sRNAs are unique to the *Clostridium* genus and are not found in bacteria from other phyla. Interestingly, pathogenic *Clostridia* seem to share common sRNAs, which could reflect common regulatory mechanisms of virulence factor production or adaptation to an ecological niche (Chen et al., 2011). The role of sRNAs in the control of neurotoxin production remains to be defined.

4.9. Environmental signals

It is not known whether BotR and TetR are the only regulatory genes or whether they are part of a regulatory cascade and which environmental signals trigger the production of the neurotoxins and ANTPs. In *C. difficile*, a catabolic repression of the expression of Toxin A and Toxin B genes by rapidly metabolizable sugars such as glucose has been evidenced (Dupuy and Sonenshein, 1998). No such regulation has been identified in *C. botulinum* and *C. tetani*. Carbon source, amino-acids, biotin, and growth temperature have been found to regulate the production of Toxin A and B in *C. difficile* (Dupuy and Sonenshein, 1998; Karlsson et al., 1999, 2003; Yamakawa et al., 1998). In contrast to *C. difficile*, *C. botulinum* requires glucose for high toxin production. CO₂ seems to stimulate *bont/B* expression and subsequent BoNT/B production (Lövenklev et al., 2004). Indeed, carbon dioxide has been reported to stimulate toxin gene expression and toxin formation in non-proteolytic *C. botulinum* strains type B and E despite a

growth rate reduction (Artin et al., 2008; Lövenklev et al., 2004). This is in contrast to proteolytic *C. botulinum* type A, which seems insensitive to carbon dioxide (Artin et al., 2010). Availability of certain nutrients, in particular nitrogen and carbon sources, is important for toxinogenesis in *C. botulinum* and *C. tetani*. A high level of arginine in minimal medium represses BoNT/A and protease production, whereas casein complementation increases both toxin and protease synthesis (Patterson-Curtis and Johnson, 1989). Moreover, specific short peptides from media containing pancreatic digest of casein are essential for toxin production in *C. tetani* (Porfirio et al., 1997).

Temperature is a common signal involved in the control of alternative sigma factors and subsequent regulated genes expression. In *C. difficile*, a temperature of 42 °C prevents transcription of *tcdR* and subsequent expression of *tcdA* and *tcdB* (Karlsson et al., 2003). In *C. botulinum*, high temperature is not an inhibitory signal for toxin gene regulation (Coesnon et al., 2006). Indeed, expression of *botR/A* and other botulinum locus genes was not temperature sensitive, within the 37–44 °C range, but BoNT/A lethal activity decreases in cultures incubated at 44 °C for 24–48 h. Analysis of temperature-dependent stability of BoNT/A and ANTPs showed that NTNH/A and BoNT/A are sensitive to proteolysis at 44 °C, in contrast to HA proteins. A Ca⁺⁺-dependent protease produced by *C. botulinum* A is probably activated at 44 °C leading to BoNT/A and NTNH/A degradation, whereas at 37 °C this protease only promotes the proteolytic activation of BoNT/A (Coesnon et al., 2006). In contrast, *C. botulinum* E produces no protease that is activated at 44 °C, and BoNT/E, as well as NTNH/E are stable in culture supernatant incubated at 44 °C (Coesnon et al., 2006). However, only a few type A and E strains have been investigated, and the role of temperature could be strain-dependent.

5. Concluding remarks

Homologies at the amino acid and protein structure levels between BoNTs and TeNT suggest that their genes have evolved from a common ancestor. Neurotoxin gene localization on mobile structures and/or mobile DNA elements accounts for gene transfer between strains from intra and inter *Clostridium* species. It is noteworthy that TeNT is unique and is produced by a homogeneous *Clostridium* species, whereas *bont* genes show a high degree of variability and are harbored by various *Clostridium* species and strains.

The production of the clostridial neurotoxins is a regulated process, in which BotR and TetR are required. BotR and TetR are alternative RNA polymerase σ factors from group 5 of the σ^{70} family, containing also TcdR and UviA from *C. difficile* and *C. perfringens*, respectively. Therefore, *C. botulinum* and *C. tetani* probably share a common mechanism of toxin gene expression, which is probably related to that of toxin and bacteriocin synthesis in *C. difficile* and *C. perfringens*, respectively. Additional regulatory factors such as TCSs responding to unknown signals, and/or environmental or nutritional factors are also possibly involved in toxinogenesis. Unraveling the mechanism of toxin regulation is essential to optimize the

neurotoxin production for vaccine preparation or for therapeutic use, and to develop new strategies to control botulism and tetanus.

Conflict of interest

None.

References

- Argaman, L., Hershberg, R., Vogel, J., Bejerano, G., Wagner, E.G., Margalit, H., Altuvia, S., 2001. Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli*. *Curr. Biol.* 11, 941–950.
- Artin, I., Carter, A.T., Holst, E., Lovenklev, M., Mason, D.R., Peck, M.W., Radstrom, P., 2008. Effects of carbon dioxide on neurotoxin gene expression in nonproteolytic *Clostridium botulinum* Type E. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2391–2397.
- Artin, I., Mason, D.R., Pin, C., Schelin, J., Peck, M.W., Holst, E., Radstrom, P., Carter, A.T., 2010. Effects of carbon dioxide on growth of proteolytic *Clostridium botulinum*, its ability to produce neurotoxin, and its transcriptome. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1168–1172.
- Ba-Thein, W., Lyrstis, M., Ohtani, K., Nisbet, I.T., Hayashi, H., 1996. The *virR/virS* locus regulates the transcription of genes encoding extracellular toxin production in *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* 178, 2514–2520.
- Barash, J.R., Arnon, S.S., 2004. Dual toxin-producing strain of *Clostridium botulinum* type Bf isolated from a California patient with infant botulism. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1713–1715.
- Bhandari, M., Campbell, K.D., Collins, M.D., East, A.K., 1997. Molecular characterization of the clusters of genes encoding the botulinum neurotoxin complex in *Clostridium botulinum* (*Clostridium argentinense*) type G and nonproteolytic *Clostridium botulinum* type B. *Curr. Microbiol.* 35, 207–214.
- Binz, T., Kurazono, H., Wille, M., Frevert, J., Wernars, K., Niemann, H., 1990. The complete sequence of botulinum neurotoxin type A and comparison with other clostridial neurotoxins. *J. Biol. Chem.* 265, 9153–9158.
- Bradshaw, M., Dineen, S.S., Maks, N.D., Johnson, E.A., 2004. Regulation of neurotoxin complex expression in *Clostridium botulinum* strains 62A, Hall A-*hyper*, and NCTC2916. *Anaerobe* 10, 321–333.
- Brüggemann, H., Bäumer, S., Fricke, W.F., Wiez, A., Liesegang, H., Decker, I., Herzberg, C., Martinez-Arias, R., Henne, A., Gottschalk, G., 2003. The genome sequence of *Clostridium tetani*, the causative agent of tetanus disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 1316–1321.
- Brüggemann, H., Gottschalk, G., 2004. Insights in metabolism and toxin production from the complete genome sequence of *Clostridium tetani*. *Anaerobe* 10, 53–68.
- Brüggemann, H., Wolher, A., Mazuet, C., Popoff, M.R., 2011. *Clostridium botulinum*. In: Fratamico, P., Liu, Y., Kathariou, S. (Eds.), *Genomes of Food- and Water Borne Pathogens*. ASM, Washington DC, pp. 185–212.
- Brunger, A.T., Rummel, A., 2009. Receptor and substrate interactions of clostridial neurotoxins. *Toxicon* 54, 550–560.
- Carter, A.T., Paul, C.J., Mason, D.R., Twine, S.M., Alston, M.J., Logan, S.M., Austin, J.W., Peck, M.W., 2009. Independent evolution of neurotoxin and flagellar genetic loci in proteolytic *Clostridium botulinum*. *BMC Genomics* 10, 115.
- Carter, G.P., Purdy, D., Williams, P., Minton, N.P., 2005. Quorum sensing in *Clostridium difficile*: analysis of a *luxS*-type signaling. *J. Med. Microbiol.* 54, 119–127.
- Chen, Y., Indurthi, D.C., Jones, S.W., Papoutsakis, E.T., 2011. Small RNAs in the genus *Clostridium*. *MBio* 2, e00340-00310.
- Chen, Y., Korkeala, H., Aarnikunnas, J., Lindstrom, M., 2007. Sequencing the botulinum neurotoxin gene and related genes in *Clostridium botulinum* type E strains reveals *orfX3* and a novel type E neurotoxin subtype. *J. Bacteriol.* 189, 8643–8650.
- Chen, Y., Korkeala, H., Linden, J., Lindstrom, M., 2008. Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis reveals stable and prolonged neurotoxin cluster gene activity in a *Clostridium botulinum* type E strain at refrigeration temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6132–6137.
- Cheung, J.K., Awad, M.M., McGowan, S., Rood, J.I., 2009. Functional analysis of the VirSR phosphorelay from *Clostridium perfringens*. *PLoS One* 4, e5849.
- Cheung, J.K., Keyburn, A.L., Carter, G.P., Lanckriet, A.L., Van Immerseel, F., Moore, R.J., Rood, J.I., 2010. The VirSR two-component signal transduction system regulates NetB toxin production in *Clostridium perfringens*. *Infect. Immun.* 78, 3064–3072.
- Connan, C., Brueggemann, H., Mazuet, C., Raffestin, S., Cayet, N., Popoff, M.R., 2012. Two-component systems are involved in the regulation of botulinum neurotoxin synthesis in *Clostridium botulinum* type A strain hall. *PLoS One* 7.
- Cooksley, C.M., Davis, I.J., Winzer, K., Chan, W.C., Peck, M.W., Minton, N.P., 2010. Regulation of neurotoxin production and sporulation by a putative agrBD signaling system in proteolytic *Clostridium botulinum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 4448–4460.
- Couesnon, A., Raffestin, S., Popoff, M.R., 2006. Expression of botulinum neurotoxins A and E, and associated non-toxin genes, during the transition phase and stability at high temperature: analysis by quantitative reverse transcription-PCR. *Microbiology* 152, 759–770.
- Dineen, S.S., Bradshaw, M., Karasek, C.E., Johnson, E.A., 2004. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the type A2 neurotoxin gene cluster in *Clostridium botulinum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 235, 9–16.
- Dover, N., Barash, J.R., Hill, K.K., Dettler, J.C., Arnon, S.S., 2011. Novel structural elements within the nonproteolytic *Clostridium botulinum* type F toxin gene cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1904–1906.
- Dupuy, B., Mani, N., Katayama, S., Sonenshein, A.L., 2005. Transcription activation of a UV-inducible *Clostridium perfringens* bacteriocin gene by a novel sigma factor. *Mol. Microbiol.* 55, 1196–1206.
- Dupuy, B., Raffestin, S., Matamouros, S., Mani, N., Popoff, M.R., Sonenshein, A.L., 2006. Regulation of toxin and bacteriocin gene expression in *Clostridium* by interchangeable RNA polymerase sigma factors. *Mol. Microbiol.* 60, 1044–1057.
- Dupuy, B., Sonenshein, A.L., 1998. Regulated transcription of *Clostridium difficile* toxin genes. *Mol. Microbiol.* 27, 107–120.
- East, A.K., Bhandari, M., Hiem, S., Collins, M.D., 1998. Analysis of the botulinum neurotoxin type F gene clusters in proteolytic and non-proteolytic *Clostridium botulinum* and *Clostridium baratii*. *Curr. Microbiol.* 37, 262–268.
- East, A.K., Bhandari, M., Stacey, J.M., Campbell, K.D., Collins, M.D., 1996. Organization and phylogenetic interrelationships of genes encoding components of the botulinum toxin complex in proteolytic *Clostridium botulinum* types A, B, and F: evidence of chimeric sequences in the gene encoding the nontoxic nonhemagglutinin component. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 1105–1112.
- Eberhard, A., 1972. Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis. *J. Bacteriol.* 109, 1101–1105.
- Eklund, M.W., Poysky, F.T., Habig, W.H., 1989. Bacteriophages and plasmids in *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani* and their relationship to production of toxins. In: Simpson, L.L. (Ed.), *Botulinum Neurotoxin and Tetanus Toxin*. Academic Press, San Diego, pp. 25–51.
- Ethapa, T., Leuzzi, R., Ng, Y.K., Baban, S.T., Adamo, R., Kuehne, S.A., Scarselli, M., Minton, N.P., Serruto, D., Unnikrishnan, M., 2013. Multiple factors modulate biofilm formation by the anaerobic pathogen *Clostridium difficile*. *J. Bacteriol.* 195, 545–555. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.01980-01912>. (Epub 2012 Nov 01912).
- Federle, M.J., Bassler, B.L., 2003. Interspecies communication in bacteria. *J. Clin. Invest.* 112, 1291–1299.
- Franciosa, G., Ferreira, J.L., Hatheway, C.L., 1994. Detection of type A, B, and E botulinum neurotoxin genes in *Clostridium botulinum* and other *Clostridium* species by PCR: evidence of unexpressed type B toxin genes in type A toxigenic organisms. *J. Clin. Microbiol.* 32, 1911–1917.
- Franciosa, G., Maugliani, A., Scalfaro, C., Aureli, P., 2009. Evidence that plasmid-borne botulinum neurotoxin type B genes are widespread among *Clostridium botulinum* serotype B strains. *PLoS One* 4, e4829.
- Galperin, M.Y., 2010. Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Curr. Opin. Microbiol.* 13, 150–159. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2010.1001.1005>. (Epub 2010 Mar 1011).
- Galperin, M.Y., Higdon, R., Kolker, E., 2010. Interplay of heritage and habitat in the distribution of bacterial signal transduction systems. *Mol. Biosyst.* 6, 721–728.
- Gao, R., Mack, T.R., Stock, A.M., 2007. Bacterial response regulators: versatile regulatory strategies from common domains. *Trends Biochem. Sci.* 32, 225–234. (Epub 2007 Apr 2012).
- Gutiérrez, P., Li, Y., Osborne, M.J., Pomerantseva, E., Liu, Q., Gehring, K., 2005. Solution structure of the carbon storage regulator protein CsrA from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 187, 3496–3501.
- Hall, J.D., McCroskey, L.M., Pincomb, B.J., Hatheway, C.L., 1985. Isolation of an organism resembling *Clostridium baratii* which produces type F botulinum toxin from an infant with botulism. *J. Clin. Microbiol.* 21, 654–655.
- Hassan, K.A., Tetu, S.G., Elbourne, L.D., Johnson, E.A., Paulsen, I.T., 2013. Genome sequence of the group III *Clostridium botulinum* strain Eklund-c. *Genome Announc.* 1, e0004413. doi:0004410.0001128/genomeA.0000044-0004413.

- Hassan, S., Ohtani, K., Wang, R., Yuan, Y., Wang, Y., Yamaguchi, Y., Shimizu, T., 2010. Transcriptional regulation of hemO encoding heme oxygenase in *Clostridium perfringens*. J. Microbiol. 48, 96–101.
- Hauser, D., Eklund, M.W., Boquet, P., Popoff, M.R., 1994. Organization of the botulinum neurotoxin C1 gene and its associated non-toxic protein genes in *Clostridium botulinum* C468. Mol. Gen. Genet. 243, 631–640.
- Hauser, D., Gibert, M., Marvaud, J.C., Eklund, M.W., Popoff, M.R., 1995. Botulinum neurotoxin C1 complex, Clostridial neurotoxin homology and genetic transfer in *Clostridium botulinum*. Toxicon 33, 515–526.
- Helmann, J.D., 2002. The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. Adv. Microbiol. Physiol. 46, 47–110.
- Henderson, I., Whelan, S.M., Davis, T.O., Minton, N.P., 1996. Genetic characterization of the botulinum toxin complex of *Clostridium botulinum* strain NCTC2916. FEMS Microbiol. Lett. 140, 151–158.
- Hill, K.K., Smith, T.J., 2013. Genetic diversity within *Clostridium botulinum* serotypes, botulinum neurotoxin gene clusters and toxin subtypes. Curr. Top Microbiol. Immunol. 364, 1–20. http://dx.doi.org/10.1007/978-1003-1642-33570-33579_33571.
- Hill, K.K., Smith, T.J., Helma, C.H., Ticknor, L.O., Foley, B.T., Svensson, P.T., Brown, J.L., Johnson, E.A., Smith, L.A., Okinaka, R.T., Jackson, P.J., Marks, J.D., 2007. Genetic diversity among Botulinum Neurotoxin-producing clostridial strains. J. Bacteriol. 189, 818–832.
- Hill, K.K., Xie, G., Foley, B.T., Smith, T.J., Munk, A.C., Bruce, D., Smith, L.A., Brettin, T.S., Detter, J.C., 2009. Recombination and insertion events involving the botulinum neurotoxin complex genes in *Clostridium botulinum* types A, B, E and F and *Clostridium butyricum* type E strains. BMC Biol. 7, 66.
- Hirst, T.R., 1995. Biogenesis of cholera toxin and related oligomeric toxins. In: Moss, J., Iglewski, B., Vaughan, M., Tu, A.T. (Eds.), Bacterial Toxins and Virulence Factors in Disease. Marcel Dekker, New York, pp. 123–184.
- Hundsberger, T., Braun, V., Weidmann, M., Leukel, P., Sauerborn, M., von Eichel-Streiber, C., 1997. Transcription analysis of the genes *tcdA-E* of the pathogenicity locus of *Clostridium difficile*. Eur. J. Biochem. 244, 735–742.
- Hutson, R.A., Zhou, Y., Collins, M.D., Johnson, E.A., Hatheway, C.L., Sugiyama, H., 1996. Genetic characterization of *Clostridium botulinum* type A containing a silent type B neurotoxin gene sequences. J. Biol. Chem. 271, 10786–10792.
- Inoue, K., Fujinaga, Y., Watanabe, T., Ohya, T., Takeshi, K., Moriishi, K., Nakajima, H., Inoue, K., Oguma, K., 1996. Molecular composition of *Clostridium botulinum* type A progenitor toxins. Infect. Immun. 64, 1589–1594.
- Jacobson, M.J., Lin, G., Raphael, B., Andreadis, J., Johnson, E.A., 2008. Analysis of neurotoxin cluster genes in *Clostridium botulinum* strains producing botulinum neurotoxin serotype A subtypes. Appl. Environ. Microbiol. 74, 2778–2786.
- Jovita, M.R., Collins, M.D., East, A.K., 1998. Gene organization and sequence determination of the two botulinum neurotoxin gene clusters in *Clostridium botulinum*. Cur. Microbiol. 36, 226–231.
- Karlsson, S., Burman, L.G., Akerlund, T., 1999. Suppression of toxin production in *Clostridium difficile* VPI10463 by amino acids. Microbiology 145, 1683–1693.
- Karlsson, S., Dupuy, B., Mukherjee, K., Norin, E., Burman, L.G., Akerlund, T., 2003. Expression of *Clostridium difficile* toxins A and B and their sigma factor TcdD is controlled by temperature. Infect. Immun. 71, 1784–1793.
- Klinkert, B., Narberhaus, F., 2009. Microbial thermosensors. Cell Mol. Life Sci. 66, 2661–2676.
- Kouguchi, H., Suzuki, T., Hasegawa, K., Mutoh, S., Watanabe, T., Niwa, K., Yoneyama, T., Katoh, Y., Ohya, T., 2006. Quantitative detection of gene expression and toxin complex produced by *Clostridium botulinum* serotype D strain 4947. J. Microbiol. Methods 67, 416–423. (Epub 2006 May 2024).
- Kubota, T., Yonekura, N., Hariya, Y., Isogai, E., Isogai, H., Amano, K., Fujii, N., 1998. Gene arrangement in the upstream region of *Clostridium botulinum* type E and *Clostridium butyricum* BL6340 progenitor toxin genes is different from that of other types. FEMS Microbiol. Lett. 158, 215–221.
- Lacy, D.B., Stevens, R.C., 1999. Sequence homology and structural analysis of the clostridial neurotoxins. J. Mol. Biol. 291, 1091–1104.
- Lee, A.S., Song, K.P., 2005. LuxS/autoinducer-2 quorum sensing molecule regulates transcriptional virulence gene expression in *Clostridium difficile*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 335, 659–666.
- Li, B., Qian, X., Sarkar, H.K., Singh, B.R., 1998. Molecular characterization of type E *Clostridium botulinum* and comparison to other types of *Clostridium botulinum*. Biochim. Biophys. Acta 1395, 21–27.
- Lin, G., Tepp, W.H., Pier, C.L., Jacobson, M.J., Johnson, E.A., 2010. Expression of the *Clostridium botulinum* A2 neurotoxin gene cluster proteins and characterization of the A2 complex. Appl. Environ. Microbiol. 76, 40–47.
- Lin, W.J., Johnson, E.A., 1995. Genome analysis of *Clostridium botulinum* type A by pulsed-field gel electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. 61, 4441–4447.
- Lindstrom, M., Dahlsten, E., Soderholm, H., Selby, K., Somervuo, P., Heap, J.T., Minton, N.P., Korkeala, H., 2012. Involvement of two-component system CBO0366/CBO0365 in the cold shock response and growth of group I (Proteolytic) *Clostridium botulinum* ATCC 3502 at low temperatures. Appl. Environ. Microbiol. 78, 5466–5470.
- Lövenklev, M., Artin, I., Hagberg, O., Borch, E., Holst, E., Radström, P., 2004. Quantitative interaction effects of carbon dioxide, sodium chloride, and sodium nitrite on neurotoxin gene expression in nonproteolytic *Clostridium botulinum* type B. Appl. Environ. Microbiol. 70, 2928–2934.
- Luquez, C., Raphael, B.H., Joseph, L.A., Meno, S.R., Fernandez, R.A., Maslanka, S.E., 2012. Genetic diversity among *Clostridium botulinum* strains harboring bont/A2 and bont/A3 genes. Appl. Environ. Microbiol. 78, 8712–8718.
- Luquez, C., Raphael, B.H., Maslanka, S.E., 2009. Neurotoxin gene clusters in *Clostridium botulinum* type Ab strains. Appl. Environ. Microbiol. 75, 6094–6101.
- Ma, M., Vidal, J., Saputo, J., McClane, B.A., Uzal, F., 2011. The VirS/VirR two-component system regulates the anaerobic cytotoxicity, intestinal pathogenicity, and enterotoxemic lethality of *Clostridium perfringens* type C isolate CN3685. MBio 2, e00338–00310.
- Mani, N., Lyras, D., Barroso, L., Howarth, P., Wilkins, T., Rood, J.I., Sonenshein, A.L., Dupuy, B., 2002. Environmental response and autoregulation of *Clostridium difficile* TxeR, a sigma factor for toxin gene expression. J. Bacteriol. 184, 5971–5978.
- Marshall, K.M., Bradshaw, M., Pellet, S., Johnson, E.A., 2007. Plasmid encoded neurotoxin genes in *Clostridium botulinum* serotype A subtypes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 361, 49–54.
- Marvaud, J.C., Eisel, U., Binz, T., Niemann, H., Popoff, M.R., 1998a. *tetR* is a positive regulator of the Tetanus toxin gene in *Clostridium tetani* and is homologous to *botR*. Infect. Immun. 66, 5698–5702.
- Marvaud, J.C., Gibert, M., Inoue, K., Fujinaga, V., Oguma, K., Popoff, M.R., 1998b. *botR* is a positive regulator of botulinum neurotoxin and associated non toxic protein genes in *Clostridium botulinum* A. Mol. Microbiol. 29, 1009–1018.
- McCroskey, L.M., Hatheway, C.L., Fenicia, L., Pasolini, B., Aureli, P., 1986. Characterization of an organism that produces type E botulinum toxin but which resembles *Clostridium butyricum* from the feces of an infant with type E botulism. J. Clin. Microbiol. 23, 201–202.
- McCroskey, L.M., Hatheway, C.L., Woodruff, B.A., Greenberg, J.A., Jurgenson, P., 1991. Type F botulism due to neurotoxicogenic *Clostridium baratii* from an unknown source in an adult. J. Clin. Microbiol. 29, 2618–2620.
- Montal, M., 2010. Botulinum neurotoxin: a marvel of protein Design. Annu. Rev. Biochem. 79, 591–617.
- Nakamura, S., Okado, I., Abe, T., Nishida, S., 1979. Taxonomy of *Clostridium tetani* and related species. J. Gen. Microbiol. 113, 29–35.
- Nakamura, S., Serikawa, T., Yamakawa, K., Nishida, S., Kozaki, S., Sakaguchi, S., 1978. Sporulation and C2 toxin production by *Clostridium botulinum* type C strains producing no C1 toxin. Microbiol. Immunol. 22, 591–596.
- Narberhaus, F., Waldminghaus, T., Chowdhury, S., 2006. RNA thermometers. FEMS Microbiol. Rev. 30, 3–16.
- Novick, R.P., Geisinger, E., 2008. Quorum sensing in staphylococci. Annu. Rev. Genet. 42, 541–564.
- Ohtani, K., Hayashi, H., Shimizu, T., 2002. The *luxS* gene is involved in cell-cell signalling for toxin production in *Clostridium perfringens*. Mol. Microbiol. 44, 171–179.
- Ohtani, K., Hirakawa, H., Tashiro, K., Yoshizawa, S., Kuhara, S., Shimizu, T., 2009. Identification of a two-component VirR/VirS regulon in *Clostridium perfringens*. Anaerobe 16, 258–264.
- Ohtani, K., Kawsar, H.I., Okumura, K., Hayashi, H., Shimizu, T., 2003. The VirR/VirS regulatory cascade affects transcription of plasmid-encoded putative virulence genes in *Clostridium perfringens* strain 13. FEMS Microbiol. Lett. 222, 137–141.
- Okumura, K., Ohtani, K., Hayashi, H., Shimizu, T., 2008. Characterization of genes regulated directly by the VirR/VirS system in *Clostridium perfringens*. J. Bacteriol. 190, 7719–7727.
- Patterson-Curtis, S.I., Johnson, E.A., 1989. Regulation of neurotoxin and protease formation in *Clostridium botulinum* Okra B and Hall by arginine. Appl. Environ. Microbiol. 55, 1544–1548.
- Popoff, M.R., Marvaud, J.C., 1999. Structural and genomic features of clostridial neurotoxins. In: Alouf, J.E., Freer, J.H. (Eds.), The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins, second ed. Academic Press, London, pp. 174–201.

- Porfirio, Z., Prado, S.M., Vancetto, M.D.C., Fratelli, F., Alves, E.W., Raw, I., Fernandes, B.L., Camargo, A.C.M., Lebrun, I., 1997. Specific peptides of casein pancreatic digestion enhance the production of tetanus toxin. *J. Appl. Microbiol.* 83, 678–684.
- Poulain, B., Popoff, M.R., Molgo, J., 2008. How do the botulinum neurotoxins block neurotransmitter release: from botulism to the molecular mechanism of action. *Botulinum J.* 1, 14–87.
- Poulain, B., Stiles, B.G., Popoff, M.R., Molgó, J., 2006. Attack of the nervous system by clostridial toxins: physical findings, cellular and molecular actions. In: Alouf, J.E., Popoff, M.R. (Eds.), *The Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, third ed. Elsevier, Academic Press, Amsterdam, pp. 348–389.
- Raffestin, S., Dupuy, B., Marvaud, J.C., Popoff, M.R., 2005. BotR/A and TetR are alternative RNA polymerase sigma factors controlling the expression of the neurotoxin and associated protein genes in *Clostridium botulinum* type A and *Clostridium tetani*. *Mol. Microbiol.* 55, 235–249.
- Rao, S., Starr, R.L., Morris, M.G., Lin, W.J., 2007. Variations in expression and release of botulinum neurotoxin in *Clostridium botulinum* type A strains. *Foodborne Pathog. Dis.* 4, 201–207.
- Raphael, B.H., Choudoir, M.J., Luquez, C., Fernandez, R., Maslanka, S.E., 2010. Sequence diversity of genes encoding botulinum neurotoxin type F. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 4805–4812.
- Raphael, B.H., Lautenschlager, M., Kalb, S.R., de Jong, L.I., Frace, M., Luquez, C., Barr, J.R., Fernandez, R.A., Maslanka, S.E., 2012. Analysis of a unique *Clostridium botulinum* strain from the Southern hemisphere producing a novel type E botulinum neurotoxin subtype. *BMC Microbiol.* 12, 245.
- Rodriguez Jovita, M., Collins, M.D., East, A.K., 1998. Gene organization and sequence determination of the two botulinum neurotoxin gene clusters in *Clostridium botulinum* type A(B) strain NCTC 2916. *Curr. Microbiol.* 36, 226–231.
- Sakaguchi, G., Sakaguchi, S., Kozaki, S., Takahashi, C., 1986. Purification and some properties of *Clostridium* type Ab toxin. *FEMS Microbiol. Lett.* 33, 23–29.
- Santos-Buelga, J., Collins, M.D., East, A.K., 1998. Characterization of the genes encoding the botulinum neurotoxin complex in a strain of *Clostridium botulinum* producing type B and F neurotoxins. *Curr. Microbiol.* 37, 312–318.
- Schantz, E.J., Johnson, E.A., 1992. Properties and use of botulinum toxin and other microbial neurotoxins in medicine. *Microbiol. Rev.* 56, 80–99.
- Sebaihia, M., Peck, M.W., Minton, N.P., Thomson, N.R., Holden, M.T., Mitchell, W.J., Carter, A.T., Bentley, S.D., Mason, D.R., Crossman, L., Paul, C.J., Ivens, A., Wells-Bennik, M.H., Davis, I.J., Cerdono-Tarraga, A.M., Churcher, C., Quail, M.A., Chillingworth, T., Feltwell, T., Fraser, A., Goodhead, I., Hance, Z., Jagels, K., Larke, N., Maddison, M., Moule, S., Mungall, K., Norbertczak, H., Rabinowitsch, E., Sanders, M., Simmonds, M., White, B., Whithead, S., Parkhill, J., 2007. Genome sequence of a proteolytic (Group I) *Clostridium botulinum* strain Hall A and comparative analysis of the clostridial genomes. *Genome Res.* 17, 1082–1092.
- Shimizu, T., Yaguchi, H., Ohtani, K., Banu, S., Hayashi, H., 2002. Clostridial VirR/VirS regulon involves a regulatory RNA molecule for expression of toxins. *Mol. Microbiol.* 43, 257–265.
- Skarin, H., Hafstrom, T., Westerberg, J., Segerman, B., 2011. *Clostridium botulinum* group III: a group with dual identity shaped by plasmids, phages and mobile elements. *BMC Genomics* 12, 185.
- Skarin, H., Segerman, B., 2011. Horizontal gene transfer of toxin genes in *Clostridium botulinum*: involvement of mobile elements and plasmids. *Mob Genet. Elem.* 1, 213–215.
- Smith, L.D.S., 1975. *Clostridium tetani*. In: Smith, L.D.S. (Ed.), *The Pathogenic Anaerobic Bacteria*. Charles C. Thomas Publisher, Springfield Ill, pp. 177–201.
- Smith, T.J., Hill, K.K., Foley, B.T., Detter, J.C., Munk, A.C., Bruce, D.C., Doggett, N.A., Smith, L.A., Marks, J.D., Xie, G., Brettin, T.S., 2007. Analysis of the neurotoxin complex genes in *Clostridium botulinum* A1–A4 and B1 strains: BoNT/A3/Ba4 and/B1 clusters are located within plasmids. *PLoS ONE* 2, e1271.
- Smith, T.J., Lou, J., Geren, I.N., Forsyth, C.M., Tsai, R., Laporte, S.L., Tepp, W.H., Bradshaw, M., Johnson, E.A., Smith, L.A., Marks, J.D., 2005. Sequence variation within botulinum neurotoxin serotypes impacts antibody binding and neutralization. *Infect. Immun.* 73, 5450–5457.
- Sorek, R., Kunin, V., Hugenholtz, P., 2008. CRISPR—a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 181–186.
- Strom, M.S., Eklund, M.W., Poysky, F.T., 1984. Plasmids in *Clostridium botulinum* and related species. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 956–963.
- Suen, J.C., Hatheway, C.L., Steigerwalt, A.G., Brenner, D.J., 1988. *Clostridium argentinense* sp. nov.: a genetically homogeneous group composed of all strains of *Clostridium botulinum* toxin type G and some non-toxicogenic strains previously identified as *Clostridium subterminale* or *Clostridium hastiforme*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38, 375–381.
- Thomason, M.K., Storz, G., 2010. Bacterial antisense RNAs: how many are there, and what are they doing? *Annu. Rev. Genet.* 44, 167–188.
- Toledo-Arana, A., Repoila, F., Cossart, P., 2007. Small noncoding RNAs controlling pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 182–188.
- Waters, C.M., Bassler, B.L., 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 319–346.
- Weickert, M.J., Chambliss, G.H., Sugiyama, H., 1986. Production of toxin by *Clostridium botulinum* type A strains cured of plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 52–56.
- Wilde, E., Hippe, H., Tosunoglu, N., Schallehn, G., Herwig, K., Gottschalk, G., 1989. *Clostridium tetanomorphum* sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39, 127–134.
- Yamakawa, K., Karasawa, T., Ohta, T., Hayashi, H., Nakamura, S., 1998. Inhibition of enhanced toxin production by *Clostridium difficile* in biotin-limited conditions. *J. Med. Microbiol.* 47, 767–771.
- Yang, G.H., Rhee, S.D., Jung, H.H., Yang, K.H., 1996. Organization and nucleotide sequence of genes for hemagglutinin components of *Clostridium botulinum* type B progenitor toxin. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 39, 1141–1146.
- Zhang, Z., Korkeala, H., Dahlsten, E., Sahala, E., Heap, J.T., Minton, N.P., Lindstrom, M., 2013. Two-component signal transduction system CB00787/CB00786 represses transcription from botulinum neurotoxin promoters in *Clostridium botulinum* ATCC 3502. *PLoS Pathog.* 9, e1003252. doi:10.1371/journal.ppat.1003252, (Epub 1002013 Mar 1003228).
- Zhao, L., Montville, T.J., Schaffner, D.W., 2006. Evidence for quorum sensing in *Clostridium botulinum* 56A. *Lett. Appl. Microbiol.* 42, 54–58.

Passage des neurotoxines à travers la barrière intestinale.

Sommaire

II.1	Revue : Absorption et transport des Neurotoxines botuliques . . .	163
II.1.1	Abstract	166
II.1.2	Introduction	166
II.1.3	Botulinum neurotoxin versus Botulinum complexes	167
II.1.4	Naturally acquired botulism	171
II.1.4.1	Botulism by intoxication or food borne botulism	171
II.1.4.2	Botulism by intestinal colonization	171
II.1.4.3	Wound botulism	172
II.1.4.4	Inhalational botulism	172
II.1.4.5	Iatrogenic botulism	172
II.1.4.6	Clinical manifestations of botulism	173
II.1.4.7	BoNT dissemination in naturally acquired botulism	173
II.1.5	Experimental animal botulism	175
II.1.5.1	Experimental botulism by gastrointestinal route	175
II.1.5.2	Experimental intestinal colonization with <i>C. botulinum</i>	177
II.1.5.3	Experimental botulism by inhalation	178
II.1.6	Passage of BoNT/botulinum complexes through cultured epithelial cell monolayers	179
II.1.6.1	BoNT passage through intestinal epithelial cell barrier	179
II.1.6.2	BoNT passage through pulmonary epithelial cell barrier	182
II.1.6.3	Role of ANTPs in BoNT passage through an epithelial barrier	183
II.1.7	BoNT/botulinum complexes entry into intestinal epithelial cells	185
II.1.8	BoNT dissemination	188
II.1.9	Concluding Remarks	191
II.2	Résultats expérimentaux modèle <i>in vivo</i>	195
II.2.1	Cinétique d'entrée des BoNTs dans la paroi intestinale de souris	195

II.2.2	L'entrée de HcB dans la barrière intestinale est dépendante de l'endocytose	200
II.2.3	Identification des cellules de l'épithélium intestinal marquées par HcBCy3	204
II.2.4	Analyse en microscopie à fluorescence	204
II.2.5	Analyse en immunohistochimie	210
II.2.6	Analyse en microscopie électronique	212
II.2.7	Nature des structures filamentaires reconnues par HcB	216
II.2.8	Types de neurones reconnus par HcB	222
II.2.9	Récepteurs cellulaires impliqués dans l'entrée de HcB	230
II.2.10	Discussion	233
II.3	Résultats expérimentaux modèle <i>in vitro</i> : Caractérisation des mécanismes moléculaires d'entrée des BoNTs dans les cellules intestinales	237
II.3.1	Les lignées cellulaires comme modèle d'étude	237
II.3.2	Effet des gangliosides sur l'entrée de HcB	240
II.3.3	Effet des Syt-I et Syt-II sur l'entrée de HcB	242
II.3.4	HcB entre dans les cellules intestinales et neuronales par une endocytose dépendante de la dynamine	247
II.3.5	Voies d'endocytose dépendantes des RhoGTPases	249
II.3.6	Le trafic intracellulaire	251
II.3.7	Discussion	255
II.3.7.1	Les récepteurs impliqués dans l'entrée de HcB dans les cellules neuronales et intestinales sont différents	255
II.3.7.2	HcB entre dans les cellules intestinales et neuronales par une voie dépendante de la dynamine et indépendante des RhoGTPases	257
II.3.7.3	HcB est transporté dans des endosomes précoces et tardifs	258

II.1 Revue : Absorption et transport des Neurotoxines botuliques

Chapitre de livre : Botulinum Neurotoxins : Molecular Understanding and its Application. Editor, Keith Foster (Michel R. Popoff and Chloe Connan, à paraître).

Les neurotoxines botuliques (BoNTs) sont de puissantes toxines capables de bloquer la libération des neurotransmetteurs aux jonctions neuromusculaires. On distingue différents mode de contamination, la voie digestive (par intoxication alimentaire ou par colonisation de l'intestin par *C. botulinum*), la voie respiratoire (botulisme par inhalation), ou encore la voie cutanée (botulisme par blessure). Les BoNTs s'associent à des protéines non toxiques (ANTPs) pour former des complexes de différentes tailles. Ces ANTPs ont pour principal rôle de protéger la toxine contre l'acidité et les protéases, surtout dans le tractus gastro-intestinal. Dans le cas des voies digestives et par inhalation, les BoNTs traversent les barrières épithéliales par transcytose et sont délivrées au pôle baso-latéral des cellules. Certaines ANTPs, les hémagglutines (HAs), peuvent également jouer un rôle dans l'altération des jonctions intercellulaires permettant un passage des BoNTs par la voie paracellulaire. Une fois transportées, les BoNTs sont disséminées localement et à distance par la circulation sanguine ou lymphatique et potentiellement par un transport axonal rétrograde. La toxine est alors endocytosée aux terminaisons nerveuses des motoneurones et la chaîne légère, qui constitue la partie catalytique de la protéine, est libérée dans le cytosol de la cellule où elle clive les protéines SNAREs responsable de l'exocytose des neurotransmetteurs.

De nombreuses études ont été réalisées afin de mieux comprendre les voies d'entrée empruntées par les BoNTs pour atteindre leurs cellules cibles. Cette revue résume les différents essais réalisés chez l'animal suite à une contamination par la voie gastro-intestinale ou respiratoire. Les différentes voies de dissémination des BoNTs dans l'organisme sont également discutées. Vu l'extrême toxicité des BoNTs, la principale difficulté est de pouvoir suivre le trajet de la dissémination de la toxine aux faibles concentrations où elle induit un botulisme dans les conditions naturelles.

Ces expériences ont permis d'éclaircir de nombreux points concernant les mécanismes d'entrée des BoNTs à l'échelle de l'organisme et de la cellule. Tout d'abord la toxicité orale est corrélée à la taille des complexes. En effet, plus la taille des complexes augmentent plus les complexes sont stables et plus la toxicité orale est importante. Cette augmentation de toxicité semble être attribuée à l'effet protecteur que jouent les ANTPs contre la dégradation des BoNTs par les protéases et l'acidité du milieu. Le composant NTNH stabilise le complexe botulique et les HAs semblent faciliter la liaison des complexes botuliques de type C à la

muqueuse intestinale.

Cependant le rôle protecteur semble être dépendant de la dose et la protection n'est observée que pour de faibles quantités de toxine administrée. De plus, les HAs sont capables d'altérer les jonctions serrées et adhérentes par liaison directe à la cadhérine E située au pôle baso-latéral. Cependant, les effets observés n'apparaissent que tardivement et les expériences *in vivo* de contamination par voie orale ou par inhalation ne montre pas de différence de toxicité entre les formes complexées aux HAs et celles dépourvues de HA.

La taille des complexes n'est pas le seul critère et la stochiométrie et/ ou la configuration des complexes semble également jouer un rôle important dans la toxicité. En effet, le complexe 12s de BoNT/B a une toxicité orale plus importante que le complexe 16s de BoNT/A.

Ces expériences ont également permis de mettre en évidence que la colonisation intestinale de *C. botulinum*, est réprimée par la flore commensale et par les antibiotiques. Cependant *C. botulinum* est capable de se développer dans le colon sans induire de botulisme. En effet, il a été décrit que les BoNTs sont absorbées préférentiellement dans la partie haute de l'intestin, et le colon ne constitue pas une zone d'absorption efficace. Le type cellulaire permettant le passage des BoNTs n'est pas connu. Seul l'entrée de BoNT/A a été décrite et semble être transportée à travers de cellules neuroendocrines sérotoninergiques, localisées dans le fond des cryptes.

L'efficacité de passage des BoNTs à travers la barrière intestinale est faible (moins de 0,01% de la concentration intestinale administrée). En effet, une petite quantité de BoNT est détectée dans la lymphe et la circulation sanguine après administration par voie orale. Toutefois, cette quantité semble suffisante pour induire un botulisme. Les expériences réalisées sur monocouche de cellules intestinales confirment ces résultats et l'efficacité de passage est évaluée à moins de 1%. De plus, ces expériences ont permis de mettre en évidence que BoNT/A est capable de traverser une monocouche de cellules intestinales par un mécanisme de transcytose dépendant de récepteurs, et ceci sans altérer les jonctions intercellulaires. L'identité des récepteurs impliqués dans cette entrée n'est pas clairement définie mais ils semblent être identiques pour l'entrée de BoNT/A dans les cellules intestinales et neuronales.

Les voies d'endocytose ainsi que le trafic intracellulaire ont également été étudiés. L'endocytose de BoNT/A est dépendante de la dynamine pour l'entrée dans les cellules neuronales et intestinales. Cependant, l'entrée dans les cellules neuronales est dépendante de la clathrine alors que BoNT/A entre par une endocytose indépendante de la clathrine mais dépendante de Cdc42 dans les cellules intestinales. Le trafic intracellulaire est également différent dans les cellules neuronales et intestinales. En effet, BoNT/A suit une voie

endosomale acide dans les cellules neuronales pour permettre à la chaîne légère de transloquer dans le cytosol et l'ajout de drogues empêchant l'acidification des endosomes, inhibe le clivage de SNAP-25. A l'inverse, ces drogues n'inhibent pas le transport de BoNT/A à travers une monocouche de cellules intestinales. BoNT/A semble donc suivre un trafic endosomal différent de celui emprunté dans les cellules neuronales.

Le mode de dissémination des BoNTs dans l'organisme sont peu compris. Deux modèles sont proposés, un modèle de dissémination systémique par la circulation sanguine et un modèle de transport axonal rétrograde. Le premier modèle suppose que les BoNTs traverse au moins 2 fois des barrières endothéliales (intestinales et vasculaires). Le second modèle, peu décrit à ce jour, semble correspondre plus à la chronologie d'apparition des symptômes de paralysie flasque descendante observés dans les cas de botulisme. De plus, BoNT/A peut interagir avec les neurones de la barrière intestinale pour diminuer les contractions des muscles lisses de l'intestin, sans passer par la circulation sanguine.

Les BoNTs sont les seules molécules, connues à ce jour, absorbées par le tractus digestif ou respiratoire qui ciblent spécifiquement les cellules neuronales. Bien que de nombreuses données existent concernant le mode d'action des ces toxines sur les cellules neuronales, la voie d'entrée et la dissémination de ces toxines dans l'organisme restent encore mal compris.

II.1.1 Abstract

Botulinum neurotoxin (BoNT) is a potent toxin, which blocks the neurotransmitter release at neuromuscular junctions. BoNT can be acquired from the digestive tract (food-borne botulism, *C. botulinum* intestinal colonization), respiratory tract (inhalational botulism), or wound (wound botulism). BoNT associates to non-toxic proteins (ANTPs), which have a main role in toxin protection against acidic pH and proteases, especially in the gastrointestinal tract. BoNT which enters through the digestive or respiratory tract, has first to cross the epithelial barrier. This is achieved by a receptor-mediated transcytosis, which delivers the whole and active toxin at the basolateral side of epithelial cells. ANTps containing hemagglutinins may have an additional role in altering the intercellular junctions and facilitating a toxin passage through the paracellular way. Then, BoNT disseminates locally and at distance via the blood/lymph circulation and possibly via a retrograde axonal transport to the target motoneuron endings, where the toxin uses an endocytic pathway permitting the release of the light chain into the cytosol and its subsequent proteolytic activity towards the SNARE proteins involved in the neurotransmitter exocytosis.

II.1.2 Introduction

Botulism is a severe and often fatal disease in man and animals, which is characterized by a descending flaccid paralysis. The disease is due to a neurotoxin (botulinum neurotoxin, BoNT), which is produced by an environmental bacterium, *Clostridium botulinum*. BoNT is the most poisonous substance known and it is responsible for all the symptoms of botulism. For this reason, BoNT is considered as a potential powerful bio-weapon. But, since 1980, BoNT is also a therapeutic agent with multiple increasing indications. In the natural conditions, botulism is most often acquired by ingesting preformed botulinum neurotoxin in contaminated food or after intestinal colonization by *C. botulinum* under certain circumstances such as in infant botulism and subsequent toxin production in the intestine. Regarding the biological threat, BoNT could be used by contamination of water or food, but also by aerosol. In these circumstances, the first step of the disease consists in the passage of the botulinum neurotoxin through an epithelial barrier of the gastrointestinal or respiratory tract. In the medical application, the toxin is directly injected into the diseased muscle, but it can disseminate and trigger distant effects. BoNT passage through epithelial/endothelial barriers and dissemination in the organism are still poorly understood. In this chapter we will discuss what we know about these important aspects of BoNT, absorption and dissemination.

II.1.3 Botulinum neurotoxin versus Botulinum complexes

Botulinum neurotoxins (BoNTs) are divided into 7 toxinotypes (A to G) according to their main immunological properties and are subdivided into several subtypes according to amino acid sequence variations (see chapter 11). BoNTs are synthesized as a precursor protein (about 150 kDa), which is inactive or weakly active. The precursor which does not contain signal peptide, is released from the bacteria possibly by a yet misunderstood cell-wall exfoliation mechanism [Call 1995]. The precursor is proteolytically activated in the extra-bacterial medium either by *Clostridium* proteases or by exogenous proteases such as digestive proteases in the intestinal content. The active neurotoxin consists of a light chain (L, about 50 kDa) and a heavy chain (H, about 100 kDa), which remain linked by a disulfide bridge. The structure of BoNTs shows three distinct domains : L-chain containing α -helices and β -strands and including the catalytic zinc binding motif, the N-terminal part of the H-chain forming two unusually long and twisted α -helices, and the C-terminal part of the H-chain consisting of two distinct subdomains (HCN and HCC) involved in the recognition of the receptor. The 100 N-terminal amino acids of the H chain constitute a belt that unwraps the L chain and might facilitate the unfolding of the L chain during the translocation process. While the three domains are arranged in a linear manner in BoNT/A and BoNT/B, both the catalytic domain and the binding domain are on the same side of the translocation domain in BoNT/E. This domain organization in BoNT/E might facilitate a rapid translocation process [Breidenbach 2005], [Emsley 2000], [Fotinou 2001], [Fu 2006], [Kumaran 2009],[Lacy 1999], [Stenmark 2008], [Swaminathan 2000], [Umland 1997]. Indeed, BoNT/E translocates more rapidly than BoNT/B into the cytosol of neurons, and in contrast to BoNT/B, BoNT/E requires only GT1b and no low pH in the translocation process [[Sun 2012]]. The three structural domains have defined roles but act in concert, including interdomain chaperone function, to achieve an efficient translocation and intracellular activity [Fischer 2013], [Montal 2010].

The overall sequence identity at the amino acid level between BoNTs ranges from 34 to 97%. Several domains are highly conserved which account for the common mode of action of these toxins. Thereby, the central domains of L chains are related in all the clostridial neurotoxins and contain the consensus sequence (His-Glu-X-X-His) characteristic of zinc-metalloprotease active site. The half N-terminal domain of the H-chains is also highly conserved, and it is involved in the translocation of the L-chain into the cytosol. Thus, a similar mechanism of internalization of the intracellular active domain into target cells is shared by all the clostridial neurotoxins. In contrast, the half C-terminal parts of H-chain, mainly the HCC subdomains, are the most divergent [Popoff 2006], [Poulain 2008]. This

accounts for the different receptors recognized by the clostridial neurotoxins.

BoNTs are associated with non-toxic proteins (ANTPs) to form large complexes (botulinum complex), also known as progenitor toxins. ANTps encompass a non-toxic and non-hemagglutinin component (NTNH), as well as several hemagglutinin components (HAs) or other non-hemagglutinin proteins called OrfX1, OrfX2, OrfX3 or P47 [Oguma 1999], [Popoff 2006], [Quinn 2001], [Sharma 2003] (Fig. 1). Botulinum complexes, in which proteins are not covalently linked, are formed in cultures and naturally contaminated food, they are stable at acidic pH, and dissociate at alkaline pH (<pH 7.5). The genes encoding the neurotoxins and ANTps have been cloned and sequenced in representative clostridial strains of each BoNT type. The neurotoxin and ANTP genes are clustered in close vicinity and constitute the botulinum locus. The organization of the botulinum locus is conserved in the 3' part but differs slightly in the 5' part in the different types of BoNT-producing Clostridia. The *bont* genes are at the 3' part of the locus and are preceded by the genes of the non-toxic-non-hemagglutinin (NTNH) components. *ntnh* and *bont* genes are transcribed in the same orientation and form an operon, whereas the hemagglutinin (HA) genes (*ha33*, *ha17*, and *ha70*), which are upstream to the *ntnh*-*bont* genes, are organized in a second operon transcribed in the opposite orientation. The *has* genes are missing in the non-hemagglutinating toxinotypes A2, E, and F. The *has* genes of *C. botulinum* G only comprise *ha17* and *ha70*. In the toxinotype A2, E and F, a gene (*p47*) encoding a 47 kDa protein is immediately upstream of the *ntnh* gene, and both genes are transcribed in the same orientation. In addition two genes (*orfX1* and *orfX2*), which are not related to *ha* genes, lie upstream of *p47* in the opposite orientation. An additional gene, *orfX3*, was characterized in *C. botulinum* A2 strain kyotoF, downstream the gene *orfX2* and in the same orientation [Dineen 2004]. *p47* and the *orfX* operon are also associated with *bont* subtype A1, A3 or A4 [Jacobson 2008]. Indeed, two main types of botulinum locus can be distinguished, the HA locus containing *ntnh* and *has* genes and the OrfX locus containing *orfX*, *p47*, and *ntnh* genes in addition to *bont* gene (Fig. 1). Interestingly, the same *bont* gene can be inserted in a HA or OrfX locus. However, *bont/A1* is the only gene, which has been found in either of the two types of botulinum locus. Therefore, BoNT/A1 can form two different types of complex by association with Ha or OrfX proteins, which can influence its stability, as well as its absorption and dissemination in the organism.

C. botulinum A produces three types of botulinum complex designated LL (19S, 900 kDa), L (16S, 500 kDa), and M (12S, 300 kDa). The 12S complex results from a BoNT/A plus NTNH association, and does not possess any hemagglutinating activity. NTNH has a cleavage site within the N-terminus and is separated into 13 and 106 kDa fragments as assessed by SDS-PAGE. The 16S complex respectively consists of BoNT/A, NTNH, and HAs (HA35, HA17, and HA70) at a presumed 1 :1 :2 ratio. HA70 is proteolytically cleaved into

HA50 and HA20. The 19S complex has the same protein composition as the 12S complex, but the ratio of HA35 is about twice that found in the 12S complex. The 19S complex is likely a dimer of the 16S complex cross-linked by HA35 [Oguma 1999], [Sharma 2003]. The composition and organization of botulinum complex types A2 and A1, which contains different proteins like P47, OrfX1, OrfX2, and OrfX3, remain undetermined [Dineen 2003]. *C. botulinum* A2, E, and F only produce M complexes devoid of hemagglutinating activity, and *C. argentinense* produces only L complex [Oguma 1999]. M botulinum complex type A2 only contains BoNT/A2 and NTNH, although P47, OrfX2 and OrfX3 are produced in the culture supernatant but not OrfX1 or in very low amount [Lin 2010]. OrfX botulinum complexes are possibly unstable and can easily dissociate. OrfX1 has been detected in botulinum complex type E but not type F, whereas OrfX2 and P47 have not been evidenced in both toxinotypes [Hines 2005].

C. botulinum B, C, and D yield two complex types, L and M, the composition of which is equivalent to those of *C. botulinum* A [Arimitsu 2003], [Oguma 1999]. The complete subunit structure of *C. botulinum* D strain 4947 L complex (650 kDa) was determined as one BoNT/D, two HA70, four HA33, and four HA17 molecules, with intermediate complexes (540 and 610 kDa) constituted of various HA subunits. In addition, an intermediate M complex (410 kDa) contains BoNT/D, NTNH, and two molecules of HA70 [Kouguchi 2002], [Mutoh 2003].

Overall, the 12S complex results from association of a BoNT together with a NTNH at a 1 : 1 ratio. The 16S complex respectively consists of a BoNT, a NTNH, and several HAs (HA70, HA17, and HA33) at a presumed 2 : 4 : 4 ratio, thus forming a dodecamer. However, transmission electron microscopy studies suggest an ellipsoidal-shaped structure with 3 arms at a 1 : 1 : 3 : 3 : 6 ratio [Hasegawa 2007]. An elegant negative stain electron microscopy and single particle averaging study showed that BoNT/A and BoNT/B complexes share a similar structure. BoNT/A and BoNT/B 16s complexes adopt an ovoid structure with 3 flexible appendages whereas the 12s BoNT/E complex is devoid of these arms. It is deduced that the 16s BoNT/A and BoNT/B complexes result of the assembly of BoNT/A or BoNT/B, NTNH, HA33, HA17, HA70 at a presumed 1 : 1 : 6 : 3 : 3 ratio [Benefield 2013]. The HA33 are likely to be at the periphery of the complex. The 19S complex produced only by serotype A looks like a dimer of the 16S complex ; importantly, it contains two molecules of BoNT/A. However, a more refined stoichiometry of the 19S complex (925 +/- 45 kDa) indicates 1 BoNT/A, 1 NTNH/A, 5-6 HA17, 4-5 HA23, 3-4 HA48, and HA 8-9 HA34 [Lietzow 2008].

NTNHs from different *C. botulinum* types possess a high identity level (76-83.5%), and are the most conserved proteins in various Botulinum complex [Popoff 2006]. NTNH/A, NTNH/C, and NTNH/D contain a cleavage site within their N-terminus, yielding 15 kDa N-

terminal and 115 kDa C-terminal fragments. NTNH/A is split into 13 and 106 kDa fragments by cleavage between Pro144/Phe145 [Fujita 1995]. NTNH/C and NTNH/D are cleaved at Lys127 by a trypsin-like protease with 7-13 amino acids removed from the N-terminus of the 115 kDa fragment that subsequently results in three proteins starting at Leu135, Val139, or Ser141 [Sagane 2000]. NTNH is only cleaved in the 12S (M) complexes from *C. botulinum* types A, C, and D, but not in the L (16S) or LL (19S) complexes. The cleaved NTNH molecules constituted a nicked structure since the two fragments still remain together after NTNH purification [Sagane 2000]. In contrast, NTNH/E and NTNH/F show an identical deletion of 33 residues in the corresponding region of NTNH/A, NTNH/C, and NTNH/D encompassing the cutting site, and NTNH/G possesses a slightly different sequence in this region. It is presumed that the processing and additional sequence of NTNH in *C. botulinum* A, C, and D are responsible for forming 12S-, 16S-, and 19S-sized complexes. The inability of *C. botulinum* E and F to form L complexes may result from the absence of HA or other related proteins that bind to NTNH, and from the absence of a putative binding site in NTNH/E and NTNH/F [Oguma 1999], [Popoff 2006].

HA33-35 is the most abundant hemagglutinin component of the botulinum complex. Type A HA35 binds to oligosaccharides containing galactose β 1-4glucose-N-acetyl-D-neuraminic acid (Gal β 1-4GlcNAc) [Inoue 2001]. Thereby, hemagglutination induced by 16S and 19S type A botulinum complex is mainly mediated through HA35 binding to erythrocyte membrane glycolipids and glycoproteins containing Gal β 1-4GlcNAc, such as paragloboside and glycophorin A [Inoue 1999], [Inoue 2001]. Similarly, HA33 from types C and D botulinum complex binds to paragloboside on Gal β 1-4GlcNAc and also sialylglycolipids (GM3), as well as sialoglycoproteins (sialosylparagloboside) on the N-acetyl-D-neuraminic acid- α 2-3-galactose- β 1 motif [Fujinaga 2004]. The importance of HA33-35 in hemagglutination is also supported by monoclonal antibody studies. Type C-specific monoclonal antibodies against HA33 inhibit hemagglutination, contrary to those against HA50 and HA17 [Mahmut 2002]. However, type C HA70 and its derivative HA50 recognize sialosylparagloboside and GM3 at the N-acetyl-D-neuraminic acid- α 2-3-galactose β 1 motif in erythrocyte membranes, like the corresponding 16S botulinum complex. Thus, HA50 could also be involved in hemagglutination [Fujinaga 2004]. HA35 purified from *C. botulinum* A is predominantly a dimeric, β -sheet protein in aqueous solutions. In *C. botulinum* A, five N-terminal amino acids are removed from HA35, but similar posttranslational modification has not been observed in HA33 from *C. botulinum* C. The significance of HA35 processing on its biological activity is not known [Sharma 1999]. It was first discovered that the 31 C-terminal amino acids, which contain a predicted carbohydrate recognition site, play an essential role in hemagglutination [Sagane 2001]. Structure of type C HA33 shows two β trefoil domain consisting of a six stranded, antiparallel β -barrel capped on one side by three β -hairpins. Related β trefoil

structures bind to oligosaccharides and are found in other proteins, including various lectins like the ricin B-chain, cytokines, trypsin inhibitor, xylanase, as well as the C-terminal part of BoNTs. Type A HA35 retains a similar structure related to the carbohydrate binding site of ricin, a plant toxin. It is noteworthy that Asp263 and Asn285 of HA35, which are conserved in the lactose-binding site for ricin B chain, are critical for carbohydrate binding [Arndt 2005], [Inoue 2003].

II.1.4 Naturally acquired botulism

Three main forms and two occasionally forms of human botulism are recognized according to the mode of acquisition.

II.1.4.1 Botulism by intoxication or food borne botulism

Food borne botulism results from ingestion of preformed BoNT in food contaminated by *C. botulinum*. Most of botulism outbreaks are due to home canned, home fermented or home processed low-acid vegetables. But, commercial products like preserved food with insufficient heat treatment and storage at temperature permitting *C. botulinum* growth, are also responsible of some botulism outbreaks.

C. botulinum spores are heat resistant and can develop in food in anaerobic conditions like canned or vacuum-sealed food. Proteolytic group I *C. botulinum* strains (type A, B and F) grow between 10-40°C with an optimum temperature around 37°C, whereas non-proteolytic group II *C. botulinum* strains (type E and non-proteolytic B and F) can develop and produce toxin at low temperature (minimum temperature 3°C), implying that botulism can occur with refrigerated food. BoNTs are synthesized during the late exponential growth phase and beginning of the stationary phase [Coesnon 2006]. Even a limited multiplication of *C. botulinum* in food can release a sufficient amount of BoNT able to cause the disease.

II.1.4.2 Botulism by intestinal colonization

Ingested *C. botulinum* spores can lead, under certain circumstances, to the development of *C. botulinum* and toxin production in the intestine. This is the case of infant botulism, which is an important problem in babies from birth to 6 months in some countries such as in USA, and in certain adults [Sobel 2005]. *C. botulinum* is not an invasive bacterium and its proliferation in the digestive tract is impaired by the resident bacterial microflora or microbiota. But in young infants, the microbiota is not yet fully developed or not yet functional, and it is estimated that ingestion of a low number of *C. botulinum* spores (10 to 100) is enough to permit an intestinal colonization and to cause the disease [Arnon 1986]. In adults, predisposing factors which induce a perturbation of the microbiota equilibrium,

including intestinal surgery, antibiotherapy, chronic inflammation, necrotic lesions of the intestinal mucosa, and anatomical or functional abnormalities of the intestine, can promote *C. botulinum* intestinal colonization from ingested spores.

II.1.4.3 Wound botulism

Wound can be colonized by *C. botulinum* resulting in the onset of botulism. Profound wounds with low exposition to air and presence of necrotic tissues can support the germination of clostridial spores such as those of *C. botulinum* or *C. tetani*, and subsequent multiplication in anaerobic conditions. However, the occurrence of wound botulism is much lower than that of tetanus. BoNT is released locally and diffuses to neuronal endings.

II.1.4.4 Inhalational botulism

In addition, botulism can be acquired by inhalation. Very few cases of botulism by inhalation have been reported. Three cases of laboratory intoxications subsequently to inhalation of dust containing *C. botulinum* type A have been described [Holzer 1966]. This indicates that the respiratory system constitutes a portal for BoNT entry into the organism and aerosol dissemination represents a likely way for BoNT use as a biological weapon [Arnon 2001]. Indeed, BoNT is considered by the Center of Disease Control as a serious potential threat and has been listed in the category A of the highest-risk threat agent for bioterrorism [Arnon 2001], [Smith 2006].

II.1.4.5 Iatrogenic botulism

Iatrogenic botulism is a rare complication of therapeutic use of BoNT/A and BoNT/B. BoNT is commonly used for the treatment of focal dystonia and localized muscle spasticity. Although BoNT therapeutic doses are relatively safe and effective, some patients develop localized or more rarely generalized symptoms of botulism including dysphagia, dysphonia, muscle weakness, dyspnea, and/or respiratory distress. Indeed, 187 cases of iatrogenic botulism have been reported to the Food and Drug Administration, among them 87 people have been hospitalized and 16 died [Ault 2008]. The symptoms occur several days until 3 weeks after BoNT injection. Toxin overdoses have been responsible for some fatal generalized botulism, but adverse effects might be induced by a wide range of BoNT doses including the lowest recommended doses [Coban 2010]. Various factors might mediate the onset of adverse effects, notably those that influence the toxin diffusion such as toxin preparation characteristics (pure BoNT or botulinum complexes, heterogeneity and size of botulinum complexes), dosing and injection technique, properties of the formulation (protein load or other additive) and muscle injected. Host susceptibility might also be involved. Thereby,

women rather than men develop complications following BoNT injection [Chertow 2006], [Jankovic 1991].

II.1.4.6 Clinical manifestations of botulism

The clinical manifestations of botulism are characterized by a symmetric, descending, flaccid paralysis of autonomic nerves followed by that of motor-neurons, beginning with the cranial nerves. The initial symptoms usually concern dysautonomic disorders including blurred vision, diplopia, followed by a dry mouth, swallowing difficulty, and then constipation. Additional dysautonomic dysfunctions include loss of vagal cardiac control, hypothermia, and urinary retention. Dysautonomic symptoms can sometimes be the only manifestation of botulism and corresponds to benign forms of the disease. They also support that BoNTs act upon both cholinergic and catecholaminergic neurotransmission. In the more severe forms of the disease, the descending paralysis affects first striated muscles innervated by cranial nerves producing drooping eyelid or ptosis, followed by a depressed gag reflex, dysphagia, dysarthria, facial paralysis, tongue weakness, and several neuro-ophthalmological signs. Then, general paralysis extends from proximal, to distal, muscles of the neck and limbs. When the diaphragm is attacked, respiration is depressed requiring a mechanical ventilation [Low 1998], [Poulain 2008], [Tacket 1989]. The gastro-intestinal symptoms like nausea, vomiting, and diarrhea, which are reported in about half of the cases of naturally acquired botulism are not due to BoNTs, but to other enterotoxins or food contaminants. Indeed, these clinical manifestations are neither observed in wound botulism, nor in experimental animals with BoNT administration.

II.1.4.7 BoNT dissemination in naturally acquired botulism

Except iatrogenic botulism, which results from parenteral injection of BoNT, the other forms of botulism requires a prerequisite step consisting in toxin passage through an epithelial barrier, the epithelium of digestive or respiratory system. In food borne botulism, BoNT could be absorbed at one or more sites of the digestive tract from mouth to colon, whereas in botulism by intestinal colonization, the intestinal epithelium is likely the main entry portal. In most of patients with food-borne botulism (about 70-80 %), BoNT is demonstrable in the serum from the second day after the onset of symptoms to several days or weeks [Lindström 2006], [Sebald 1973]. In contrast, toxemia is infrequent in infant botulism, whereas BoNT and *C. botulinum* are usually found in feces [Arnon 1989], [Brook 2007], [Cox 2002], [Hatheway 1987], [Paton 1983]. In addition, constipation is a major sign in infant botulism and this symptom is more rarely observed in food-borne botulism. Similar findings have been reported in botulism by intestinal colonization in older infants or adults. For example, a 12 years old girl developed an intestinal colonization by *C. botulinum* type Ab and

suffered from obstinate constipation for more than half a year. *C. botulinum* and toxin were detected in stools more than 122 days after the beginning of the disease [Kobayashi 2003]. This suggests that BoNT uses a different trafficking and possibly distinct absorption sites in food-borne botulism compared to botulism by intestinal colonization. BoNT absorbed from the small intestine during *C. botulinum* intestinal colonization probably targets directly neurons from the enteric nervous system leading to intestinal muscle paralysis.

Interestingly, whatever the origin of botulism, food-borne botulism, intestinal colonization, or wound botulism, the clinical signs develop in the same order with attack of cranial nerves and then spinal motoneurons. BoNT dissemination through the blood circulation would suppose that BoNT affect rapidly all the nerve endings yielding directly a generalized paralysis and not a descending paralysis. Possibly some neurons like cranial nerves are more sensitive to BoNTs than other, or BoNTs use a more specific transport way to the target neurons. In iatrogenic botulism, BoNT/A used at therapeutic doses can affect neuromuscular junctions at distant sites of the local injection. One explanation could be that BoNT is locally trapped and transported in a axonal retrograde manner to spinal motoneurons [Bhatia 1999], [Garner 1993], [Kobayashi 2003]. Injection of BoNT/A into the cat extraocular muscles changes the activity of motoneurons innervating both lateral and contro-lateral eye muscles [Moreno-López 1997]. A more recent work in rat shows unambiguously that BoNT/A is retrogradely transported. BoNT/A catalytic activity was observed in synaptic terminals within the retina after toxin injection into the optic tectum, or in the facial nucleus following a toxin injection in whisker muscles. This demonstrates that the toxin can not be transported by simple diffusion but only by an axonal retrograde migration by motoneurons and central neurons and then transcytosis to afferent synapses [Antonucci 2008].

The lethal dose of BoNT/A in human is estimated to 1 µg/kg by oral route, 10-13 ng/kg by inhalation, and 1 to 2 ng/kg by intravenous or intramuscular injection [Arnon 2007], [Middlebrook 1986], [Smith 2006]. Thus, passage trough an epithelial barrier is less efficient than the direct toxin delivery to target neurons by blood circulation or dissemination in muscle tissue. This suggests that only a part of BoNT (0.1 to 1 % when compared parenteral inoculation to oral and respiratory route, respectively) is transported trough an epithelium. The epithelial barrier of the respiratory tract is seemingly more permissive than that of the digestive tract, unless BoNT is partially degraded in the digestive tract depending of the toxin type (complex or dissociated BoNT form, size of complexes) since no information on toxin conformation is available in these reports.

II.1.5 Experimental animal botulism

Many attempts have been done in experimental animals to understand the absorption and dissemination of the toxin into the organism. Since the extreme potency of BoNT, the major difficulty is to monitor minute amounts of toxin as those involved in natural conditions.

II.1.5.1 Experimental botulism by gastrointestinal route

Oral toxicity of BoNTs was assayed in several animal species and the activity levels were found to be variable according to the molecular form of toxin. Thereby, BoNT/A in LL complex form orally administrated in mice was 358 fold more toxic than pure BoNT/A, whereas pure BoNT/A was 43 fold more potent by intravenous route. BoNT/A L complex form was about 20 fold more and M complex form about 12 fold more active than pure BoNT/A by oral route [Ohishi 1977]. Overall, the highest oral toxicities correlate with the larger molecular sizes of toxin complexes. The same findings were observed with BoNT/B, BoNT/E, BoNT/C and BoNT/D [Kitamura 1969], [Ohishi 1977], [Ohishi 1980], [Sugii 1977c]. BoNT/B L complex showed the highest oral toxicity compared to the pure toxin (about 16,000 fold more), even more than the largest LL complex form of BoNT/A. Other factor(s) than the complex molecular size might be involved in oral toxicity. Stoichiometry and/or configuration of BoNT complexes could play also an important role (see below). The higher oral toxicity of BoNT complexes versus pure BoNT is mostly attributed to a higher toxin stability. BoNT/A, BoNT/B, and their complex forms of various sizes have been tested for resistance to peptic digestion at pH 2, gastric juice at pH 1.4, pancreatic digestion at pH 6.5, intestinal juice at pH 7. The largest complex forms (LL type A and L type B complex) showed the highest stability and retained 60 to 80 % of activity after 120 min exposure to the proteolytic treatments, whereas pure BoNT/A and BoNT/B were almost or completely inactivated after 10 min [Sugii 1977c]. Dissociated botulinum complexes type A or E are much more unstable than the corresponding undissociated forms, particularly below pH 4 [Kitamura 1969], [Sugii 1977c]. Therefore, not only the presence of all ANTPs accompanying the BoNT, but also a strict organization or conformation of botulinum complexes seem to be required to yield the most stable and active molecules. Are all ANTPs equipotent to confer the stability of botulinum complexes or which play the most important role? HA35 and HA52 from botulinum complex type A are resistant to protease digestion, whereas NTNH/A and BoNT/A are rapidly degraded [Chen 1998], [Couesnon 2006], [Fu 1998], [Sharma 1999]. But, NTNH, which is structurally related to BoNT, associates with BoNT in a pH-dependent manner to form a medium size botulinum complex highly resistant to acidic pH and protease degradation [Gu 2012], [Gu 2013]. HA34 and HA52 from botulinum complex type B seem to encase HA17, which is sensitive

to protease digestion, and likely have an important protective function [Arimitsu 2008]. However, although BoNT/D and NTNH/D are individually easily degraded by pepsin or trypsin treatment, the complexes resulting from association of BoNT/D and NTNH/D are highly resistant [Miyata 2009]. Thus, NTNH has probably also a crucial role in the stability of botulinum complexes. This further supports the importance of botulinum complex conformation in the protection of BoNT against low pH and protease degradation.

The toxin absorption sites from the digestive tract have been investigated in rabbits and rats. Albeit BoNT can be absorbed from the different digestive segments including stomach, ileum, and colon, the most efficient absorption site was identified in the upper small intestine [Bonventre 1979]. However in mice, the uptake of pure BoNT/A or botulinum complex with or without hemagglutinins was equivalent from the stomach and intestine. Interestingly the protective effect of ANTPs in botulinum complex was found to be dose dependent. Indeed, low BoNT/A concentration (equivalent to 25 ng of pure BoNT/A/mouse) was totally inactivated when administrated in the stomach, whereas the same BoNT/A dose in complex form with hemagglutinins was fully active. In contrast, higher BoNT/A dose (1 µg/mouse) as pure toxin or in complex form yielded the same toxicity when injected into the stomach or intestine. In addition, the stability of pure BoNT/A was found to be greater in the intestine versus the stomach [Maksymowych 1998]. Therefore, the stomach represents the most offensive environment for the stability of BoNT versus the intestine and the association of BoNT with ANTPs in an optimal stoichiometry and conformation affords toxin protection mainly at low BoNT concentration.

BoNT administrated in rat duodenum is found in the lymph, then in the blood, but to a lower extent [Bonventre 1979], [Sugii 1977b]. When L botulinum complex type B was injected into the duodenum, which was tested as the most efficient digestive segment from the stomach to the rectum for toxin uptake, a maximum level of active toxin was recovered 6 h later in the lymph. The rate of toxin absorption in the lymph ranged from 0.01 to 0.1 % of the intraduodenally administrated dose, and about 100 fold less in the blood. Injection of an equivalent dose of M botulinum complex type B or pure BoNT/B in rat duodenum yielded a much lower toxin recovery in the lymph (about 50 to 100 fold less) [Sugii 1977b]. Comparable absorption rate was found with LL botulinum complex type A [Lamanna 1959], [May 1958], whereas another report mentions a recovery of 1.5 % or more in the blood of rabbits orally inoculated with M botulinum complex type E (cited in [Sugii 1977b]). Experimental differences regarding laboratory animals, toxin preparations, methods of titration greatly influence the results and make difficult comparison between the different reports. However, it can be concluded that BoNT recovery in the lymph and blood following oral administration in experimental animals is very low but sufficient to induce a

fatal disease, in agreement with the observations in naturally cases of botulism.

Is only BoNT or the whole botulinum complex absorbed from the digestive tract? ANTPs are non-covalently associated to BoNT and proteins dissociated at pH 7.5 and above. However, L and M botulinum complexes type B were found to be undissociated in intestinal juice at pH 7 [Sugii 1977c]. This indicates that additional factors such as ionic strength control the assembly of botulinum complexes and further accounts for the toxin stability in the intestinal content since it is protected in the complex form. Using a reversed passive hemagglutination assay, ANTPs have been detected in the lymph of rats inoculated intraduodenally, suggesting that the botulinum complexes, in their associated or undissociated form, can pass through the intestinal barrier. The status of BoNT and botulinum complexes in the lymph has been monitored by ultracentrifugation in gradient sucrose. Thereby, L botulinum complex type B appeared in the undissociated form in the lymph, whereas M botulinum complex type B did not [Sugii 1977b]. Botulinum complexes Type A and E orally administrated also have been found in their undissociated form in the lymph [Kitamura 1969]. This not excludes that ANTPs and BoNT can cross the epithelial barrier in the undissociated form and reassembled in the lymph. In a natural case of type A botulism by intestinal colonization, monomeric BoNT/A was identified in the blood. The detection of ANTPs has not been reported, thus making difficult to know whether only BoNT/A has been translocated in the blood circulation or the whole complex with subsequent dissociation [Kobayashi 2003]. The amount of toxin in the intestine might greatly influence the passage of BoNT alone or botulinum complexes in their associated or undissociated form into the lymph and blood. Additional experiments with more accurate and sensitive methods are required to clarify the status of BoNT, which is transported from the digestive tract to the internal medium.

II.1.5.2 Experimental intestinal colonization with *C. botulinum*

Attempts to reproduce botulism by intestinal colonization have been performed in mice and rats. Conventional adult mice and rats administrated intragastrically with a high number of *C. botulinum* type A spores (until 10^9) rarely develop a toxicoinfection. In contrast, germ-free mice or rats orally inoculated with only 10 *C. botulinum* spores show signs of botulism within 4 to 6 days. *C. botulinum* growth was evidenced in the cecum, colon, and ileum, and BoNT/A accumulates in the gut reaching 1.3 - 1.8 10^5 mouse intraperitoneal lethal doses (LD) 50% mainly in the cecum, and to a lower extent in the colon and the lower ileum. Susceptible axenic mice or rats exposed to conventional animals for 3 or 6 days become resistant to an oral challenge of 10^5 spores and they do not contain any detectable toxin in the gut. Therefore, the intestinal microflora, which is the only difference between axenic and conventionalized animals, is the main factor involved in the resistance to colonization of the

digestive tract by *C. botulinum* [Moberg 1979], [Moberg 1980]. The composition of intestinal microflora responsible for the *C. botulinum* colonization resistance has not been determined. Not all intestinal bacteria but a complex association of specific bacteria are involved in the prevention of *C. botulinum* growth [Wells 1982]. The role of intestinal microflora in *C. botulinum* colonization resistance is also supported by conventional mice orally treated with antibiotics (erythromycin and kanamycin), which show a much higher susceptibility to multiplication of this pathogen in the digestive tract [Burr 1982].

Intestinal colonization with *C. botulinum* has also been investigated in young conventional mice and rats. When intragastrically challenged with 10^5 spores, only animals from 7 to 12 days old were colonized, but did not become ill. The 9 day-old animals were the most susceptible. The 50% infecting dose in 9-day-old mice has been estimated to 700 spores (170 to 3000) per animal and the toxin was present in the large intestine, but not in the small intestine, from 1 day to 4 days and in some cases 7 days after challenge. Toxin amounts (60 to 1920 mouse intraperitoneal LD50) in the colon of suckling mice intragastrically inoculated with *C. botulinum* spores reached at least a 10 fold more level than the minimum need to kill them by intraperitoneal route, despite no apparent sign of botulism. In contrast, axenic adults monoassociated with *C. botulinum* showed a higher toxin titer (2300 to 215000 mouse intraperitoneal LD50) in the cecum, colon, and lower small intestine and became ill. Suckling mice might be less sensitive than adults to BoNT, but also the toxin, which is only present in the colon, is not as efficiently absorbed compared to the small intestine. This also argues that BoNT passage through the intestinal barrier is not an efficient process. The resistance of very young mice and rats less than 5 to 6 days, which showed neither *C. botulinum* multiplication nor toxin production in the digestive tract, can not be explained by an absence of an intestinal microflora preventing the multiplication of *C. botulinum*. Possibly other factors such as milk factors could be involved [Moberg 1979], [Moberg 1980], [Sugiyama 1978].

II.1.5.3 Experimental botulism by inhalation

Botulism by inhalation route has been investigated in experimental animals in order to better understand the disease through this inoculation way, although toxin dissemination by aerosol is not a common source of naturally acquired botulism, but represents the most likely use of BoNT as a biological weapon. Mouse is susceptible to inhalational botulism [Park 2003]. The BoNT/A LD50 is estimated to 21 ng/kg [Taysse 2005], which is higher than that by intraperitoneal route : 0.3 ng/kg [Middlebrook 1986] to 1.2 ng/kg [Gill 1982] for BoNT/A, 0.5-0.6 ng/kg for M complex, and 0.8-1 ng/kg for L complex of BoNT/A or BoNT/B [Sugiyama 1980]. Mice inoculated by the respiratory route develop all the characteristic symptoms of botulism [Taysse 2005]. Rhesus macaques are also susceptible to botulism by inhalation. The LD50 was calculated to be 17 ng/kg (550 mouse intraperitoneal

LD50) for BoNT/A1, which is comparable to that estimated in human, and 280 ng/kg (21600 mouse intraperitoneal LD50) for BoNT/B1 [Arnon 2001], [Sanford 2010]. The onset and the severity of the symptoms in mouse or monkey are toxin dose-dependent [Sanford 2010], [Taysse 2005]. In addition, to the common symptoms of botulism, monkeys develop abnormal sign like anorexia when challenged with low doses. Other abnormal clinical findings including ataxia, lethargy, coughing and dysphagia occur more frequently at middle doses of BoNT/A1 or BoNT/B1. All monkeys inoculated with BoNT/A1 by the respiratory route, even with high dose until 5,275 mouse intraperitoneal LD50, did not show any detectable circulating toxin, whereas toxin was evidenced in the blood of most but not all the monkeys challenged with BoNT/B1 doses from 25000 to 82000 mouse intraperitoneal LD50 [[Sanford 2010]]. All monkeys with detectable BoNT/B1 in the blood and some monkeys without detectable circulating toxin died [Sanford 2010]. This indicates that BoNT dissemination through the blood circulation is not an obligate pathway to transport the toxin to target neurons, unless blood transport of effective toxin molecules is not detectable. Albeit no specific lesions are attributable to BoNT, monkeys and mice treated by the respiratory route, manifest a suppurative inflammation of the lungs accompanied by a variable degree of perivascular and generalized interstitial edema, moderate intra-alveolar/intrabronchiola hemorrhage, and polynuclear infiltration. It is not clear whether BoNT can directly trigger an inflammatory response, or whether the pulmonary histological changes result from an aspiration pneumonia secondary to paralysis of muscles responsible for swallowing and thus permitting the entry of food or stomach content through the larynx [Sanford 2010], [Taysse 2005].

II.1.6 Passage of BoNT/botulinum complexes through cultured epithelial cell monolayers

II.1.6.1 BoNT passage through intestinal epithelial cell barrier

There is evidence that BoNT undergoes a receptor-mediated transcytosis to cross the intestinal barrier. Indeed, BoNT/A transport through polarized intestinal cell monolayers is inhibited at 4°C and occurs at 37°C in a saturable manner over a 30-60 min period [Ahsan 2005], [Couesnon 2008], [Maksymowych 2004], which is compatible with previously reported receptor-mediated transcytosis through epithelial cells [Mostov 2000], [Ouzilou 2002]. This is further supported by the fact that BoNT/A is transported through epithelial cells within 2 h without neither trans electrical epithelial resistance (TEER) alteration nor any organization disturbance of tight and adherens junctions, thus excluding a paracellular passage of BoNT/A. In addition, the competition experiments showing that BoNT/A transport through intestinal cell monolayers was significantly prevented by an excess of recombinant BoNT/A Hc, but not by Hc from BoNT/B or tetanus neurotoxin

(TeNT), strongly argue for a specific receptor-mediated transcytosis. This is in agreement with the fact that iodinated BoNT/A H chain as well as Hc domain are able to bind and cross epithelial cells [Maksymowych 2004]. Among the cell lines that have been tested, the mouse intestinal crypt cells m-IC_{cl2} showed the highest level of BoNT/A passage, whereas the colon carcinoma cells Caco-2 or T84, which retain a phenotype of enterocyte [Bens 1996], showed a lower passage rate. Since many pathogens preferably use M cells to enter the intestinal barrier [Kernéis 2000], [Ouzilou 2002], Caco-2 cells cocultured with murine lymphocytes differentiated in M cells have been tested [Kerneis 1997]. No significant difference in BoNT/A passage was observed through Caco-2 cell monolayers containing or not M-like cells [Coesnon 2008]. This strongly suggests that BoNT can pass more efficiently through certain cell types of the intestinal mucosa and that intestinal crypt cells may represent a preferential site of BoNT/A absorption. Indeed, using a mouse intestinal loop test, fluorescent BoNT/A Hc has been found to preferentially localize into neuroendocrine intestinal crypt cells, mainly serotonergic cells [Coesnon 2012].

The rate of transcytosed BoNT/A through an intestinal cell monolayer is low, about 1% with m-IC_{cl2} and 0.1% with Caco-2 cell monolayers after 2 h incubation [Coesnon 2008]. These transport rates are in agreement with the translocation efficiency through epithelial cells of bacterial or viral enteric pathogens ranging from 0.1 to 10% of the inoculum within 2 h [Kerneis 1997], [Ouzilou 2002], and also with that of BoNT/B from rat duodenum to the lymphatic circulation (0.01 to 0.1%) [Sugii 1977b] (see above). Therefore, the passage of BoNT through an epithelial barrier is a weakly efficient process in the same range of that of enteric pathogens.

The receptor-mediated transcytosis process raises the question whether BoNT receptors on intestinal cells are the same than those on neuronal cells? As for neuronal cells, the same toxin domain, Hc, is involved in the recognition of receptors on intestinal cell surface. Thereby, BoNT/A Hc is able to bind and cross epithelial cells [Maksymowych 2004]. Moreover, BoNT/A transport through intestinal cell monolayers is significantly prevented by an excess of recombinant BoNT/A Hc, but not by Hc from BoNT/B or TeNT [Coesnon 2008]. Gangliosides GD1b/GT1b are also part of BoNT receptor on intestinal cells. Indeed, addition of GD1b/GT1b impair the binding of fluorescent BoNT/A Hc to neuronal cells as well as to intestinal cells as assayed by fluorescence-activated cytometry (FACS), and significantly decreases the transport of biologically active BoNT/A through intestinal cell monolayers. Furthermore, ganglioside depletion by DL-threo-1-Phenyl-2-palmitoyl-amino-3-morpholino-1-propanol (PPMP), an inhibitor of glucosyl ceramide synthase, strongly decreases BoNT/A transport through intestinal cells, and loading PPMP-treated cells with GD1b/GT1B reverses the effect [Coesnon 2008]. SV2C the protein part of BoNT/A receptor on neuronal cells is also expressed in intestinal cells such as CaCo-

2 or m-IC_{cl2} cells. Recombinant intraluminal domain (L4) of SV2C was found to decrease BoNT/A transcytosis through CaCo-2 or m-IC_{cl2} cell monolayers suggesting that SV2C or a SV2C-related protein might be involved in the BoNT/A receptor on intestinal cells. Thus, BoNT receptors might be the same or consist of related molecules on neuronal and intestinal cells. However, BoNT/A Hc binding to intestinal cells is much lower than to neuronal cells as monitored by FACS, indicating that the affinity is weaker or the number of BoNT receptors is possibly smaller on intestinal cells when compared to neuronal cells [Couesnon 2008]. A different type of BoNT/A receptor on the colon carcinoma T84 cells has been suggested, based on the fact that a recombinant BoNT/A Hc mutated on the ganglioside binding site (W1266L, Y1267S) was impaired in binding to neuronal cells, but retained the ability to cross the intestinal cell monolayer [Elias 2011], [Rummel 2004c]. Based on the dual nature of BoNT receptor, a ganglioside associated to a membrane protein, mutation on the ganglioside binding site does not preclude that the receptor protein part or the global receptor organization is different on intestinal cells. A difference between BoNT receptors on neuronal and intestinal cells might be a distinct distribution in membrane subdomain or different exposition of the site(s) accessible to the toxin.

Distribution of BoNT receptor on cell membrane is not fully understood. Considering the lipid BoNT receptor moiety, BoNT receptor is presumed to be localized in distinct lipid microdomains, but the protein moiety (SV2 for BoNT/A, BoNT/E, and BoNT/F, synaptotagmin for BoNT/B and BoNT/G) [Dong 2003], [Dong 2006], [Dong 2008], [Fu 2009], [Mahrhold 2006], [Nishiki 1996], [Rummel 2004b], [Rummel 2009] supposes a distribution on synaptic vesicle membrane, but these proteins have a wider membrane repartition. Lipids are heterogeneously distributed in plasma cell membrane and the most well known lipid organization is the lipid microdomains which are enriched in cholesterol and sphingolipids [Mayor 2004]. Using the C-terminal domain of *Clostridium perfringens* Perfringolysin (PFO), an extensively characterized cholesterol-binding cytolysin, [Ramachandran 2002], fused to GFP (GFP-PFO), only a partial colocalization was observed with BoNT/A Hc on neuronal and intestinal cells. This correlates with the absence of colocalization between BoNT/A Hc and probe of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins (GPI-APs), which are also localized in lipid rafts, such as *Clostridium septicum* α toxin receptor or the decay-accelerating factor (DAF), as well as with the distribution of BoNT/A receptor on soluble fractions of membrane treated with Triton X100 rather than in detergent-resistant microdomains. In addition, depletion of plasma membrane cholesterol by a high concentration of methyl- β -cyclodextrin (M β CD;15 mM) only partially prevented BoNT/A Hc binding to neuronal and intestinal cells. But incubation of cells first with GFP-PFO for 5 min, prevented further binding of fluorescent BoHT/A Hc [Couesnon 2009]. Thus, BoNT/A receptor seems to have a distinct membrane distribution, since it does not

localize directly on cholesterol-enriched microdomains but in a subset of microdomains from detergent soluble fractions closely connected to the cholesterol-enriched microdomains.

The nature and membrane localization of receptors are critical to drive a specific intracellular ligand trafficking [Lamaze 2006]. Indeed, cholera toxin binds to ganglioside GM1 localized on lipid rafts and is transported until the endoplasmic reticulum, whereas *E. coli* LTIIb, which is structurally and functionally related to cholera toxin, binds to GD1a, a ganglioside not associated with lipid rafts, and it is not routed to the endoplasmic reticulum [Fujinaga 2003]. Lipid rafts seem not to be required for the BoNT/A entry into neuronal cells. Despite BoNT binding was greatly decreased to cells deficient in ganglioside synthesis [Kozaki 1998], [Rummel 2007], [Yowler 2002], disruption of lipid rafts with MCD or filipin does not prevent, but on the contrary enhances BoNT/A activity on N2a cells [Petro 2006]. In addition, knockout mice lacking b-series gangliosides show a similar sensitivity to BoNT/A than wild type mice, indicating that b-series gangliosides may not be essential in the initial steps of BoNT/A intoxication [Kitamura 2005]. This suggests that BoNT receptors containing gangliosides GD1b / GT1b are not restricted to lipid rafts but have a wider distribution, possibly on distinct microdomain structures within the cell membrane. Interestingly, such a heterogeneous localization on membrane is supported by the finding that a same glycosphingolipid is distributed on distinct and contiguous membrane microdomains according to its concentration, low or high [Sharma 2003]. But the accurate localization of BoNT receptor on neuronal and intestinal cell membranes remains to be determined.

II.1.6.2 BoNT passage through pulmonary epithelial cell barrier

A transcytosis-mediated passage of BoNT/A has also been evidenced through human pulmonary adenocarcinoma (Calu-3) cell monolayer. BoNT/A transport was significantly higher through Calu-3 cell monolayers than through Madin Darby canine kidney (MDCK) cell monolayers suggesting a specific BoNT passage according to the epithelial barrier. A transcytosis mechanism instead of a paracellular BoNT passage across pulmonary cell monolayers was based on 1) no modification of the TEER of the cell monolayer, 2) no alteration of tight junctions as monitored by the absence of passage of small molecules, such as inulin, which are not endocytosed and which can only diffuse upon disruption of intercellular junctions, 3) prevention of BoNT passage at low temperature compared to 37°C indicating that an active process rather than a passive diffusion is involved, and 4) inhibition of BoNT passage with specific antibodies. Transcytosed BoNT/A molecules were found to be in their active undissociated form, L and H chains linked by a disulfide bridge, like the native toxin [Park 2003].

II.1.6.3 Role of ANTPs in BoNT passage through an epithelial barrier

HA components bind to carbohydrate structures (see above) and thus mediate agglutination of red blood cells. A binding function has been assigned to HAs, which seems to facilitate the binding of botulinum complexes to intestinal mucosa or directly to intestinal epithelial cells. In a guinea pig *in vivo* model, only L form of botulinum complex type C (16s), which contains HAs, binds to epithelial cells of the upper small intestine prior to be absorbed from the intestine and then released into the serum, whereas botulinum complex type C lacking Has (12s) or BoNT/C alone are poorly absorbed into the serum [Fujinaga 1997]. Among HA components from type C, type A, or type B, HA33/35 and HA50 recognize distinct carbohydrate structures on erythrocytes and intestinal cells. HA33/35 binds to galactose moieties and HA50 to sialic acid moieties and are considered to be involved in botulinum complex binding and absorption through the intestinal mucosa [Arimitsu 2008], [Fujinaga 2000], [Fujinaga 2004]. HA33 and HA50/70 also facilitate the binding and transport of botulinum complexes type C or D through rat intestinal epithelial cell monolayers in a sialic acid-dependent manner. HA50/70 might bind to sialic acid on mucin and/or sialic acid-dependent receptor on cell surface, and it is speculated that HA33 might also interact with sialic acid on cell membrane [Inui 2010], [Ito 2011], [Niwa 2010]. Hence, sialic acid derivative molecules seem to be important motifs for the binding of botulinum complexes on intestinal cells and/or mucin. Botulinum complex type A binds to Intestine-407 cells, which derived from human intestinal epithelium, via N-acetyl-lactosamine [Kojima 2005]. In human colon carcinoma cells (HT-29), type C 16S botulinum complex binds to surface glycoproteins like mucin [Nishikawa 2004]. But, HA components are not absolutely required, since BoNT/C or D alone display binding and transport through intestinal cells, albeit to a lower extent [Inui 2010], [Ito 2011], [Niwa 2010].

A novel function has been attributed to HA components consisting in the disruption of intercellular junctions between intestinal epithelial cells. Such evidence has been shown with HA from type B and type A that alters tight and adherens junctions of Caco-2, T84 or MDCK cell monolayers, and enhances BoNT transport. HAs act specifically on the basolateral side of cultured intestinal cells and induce a disorganization of molecules of the tight junctions (occludin, ZO1) as well as those of adherens junctions (E-cadherin, catenin). HA-dependent alteration of the intercellular junctions result in a paracellular passage of BoNT, 12s botulinum complex (lacking HAs) as well as other macromolecules without inducing cytotoxicity. In contrast, HAs from type C are ineffective in disrupting human intestinal cell barrier, although they are able to alter cell monolayer integrity from canine (MDCK cells) or rat origin via a cytotoxic mechanism [Fujinaga 2009], [Jin 2009], [Matsumura 2008]. It has been evidenced that HAs type A and type B, but not type C, directly bind to the extracellular domain of human (epithelial) E-cadherin, but not (neural)

N-cadherin, nor (vascular endothelial) VE-cadherin. The combination of Has (HA33, HA17, and HA50/70) is required for the optimum binding to E-cadherin, whereas the association of HA33 and HA50/70 is poorly effective and individual HA does not interact with E-cadherin. Type B HAs specifically bind to human, bovine, and mouse E-cadherin but not to that of rat and chicken [Sugawara 2010]. Tight junction disruption is apparently mediated by HA complex binding to E-cadherin. Indeed, MDCK cells expressing rat E-cadherin, which acts as dominant negative, maintain their intercellular junction integrity, although HA complex applied basolaterally binds to endogenous E-cadherin as in control cells [Sugawara 2010]. The HA mechanism of action on tight junction alteration via binding to E-cadherin is not yet known. First, how HA can have access to E-cadherin from the apical side? It is suggested that HAs bind to the apical surface and subsequently are endocytosed in early endosomes and then transcytosed through the basolateral side [Sugawara 2010], [Sugawara 2011]. This supposes that HA recognize specific receptor(s) on the apical side and it is not clear whether the carbohydrates recognized by HAs are involved. It has been hypothesized that HA mediates the transcytosis of whole botulinum complexes through intestinal epithelial cells, which are delivered on the basolateral side allowing the access of HA to E-cadherin [[Fujinaga 2013]]. E-cadherin is the major player of adherens junction but its role in controlling tight junctions is controversial [[Capaldo 2007], [Chen 2006], [Gumbiner 1996], [Hartsock 2008], [Popoff 2009]]. HAs bind to E-cadherin in a Ca⁺⁺ dependent manner without exerting a protease activity towards this substrate, but in changing its cellular localization. E-cadherin in HA treated cells is redistributed from the cell-cell contacts to clusters on cell surface and it is partially endocytosed [Sugawara 2010]. Other bacterial toxins or virulence factors target E-cadherin. For example, *Bacteroides fragilis* enterotoxin proteolytically cleaves the extracellular domain of E-cadherin, which subsequently induces a degradation of the intracellular domain probably by ATP-dependent cellular proteases, reorganization of actin filaments, and increase in cell barrier permeability [Sears 2001], [Sears 2006]. Interestingly, the N-terminal part of HA70 shows sequence similarity with *Clostridium perfringens* enterotoxin, which binds to claudins, forms pores, and alters the intestinal barrier integrity [Fujinaga 1994], [McClane 2006]. But HA70 does not retain *C. perfringens* enterotoxin activity on intestinal cells.

Which is the significance of HAs in BoNT intestinal or pulmonary absorption *in vivo*? HA effects are late, since in cultured cells an increase in barrier permeability is observed only after several hours, 12 to 48 h [Fujinaga 2009], [Matsumura 2008], whereas BoNT transcytosis occurs in 30-60 min [Couesnon 2008]. Another question concerns how HAs have access to the baso-lateral side of intestinal epithelial cells? Do HAs, alone or associated with BoNT, undergo a transcytosis through epithelial barrier *in vivo*? HAs are not indispensable, as BoNT alone can cross intestinal or pulmonary epithelial barrier in

in vitro or *in vivo* models [Couesnon 2008], [Maksymowych 2004], [Park 2003]. A more recent study shows that BoNT/A and BoNT/E, have an equivalent absorption rate and toxin potency when administrated by inhalation route in mice as pure neurotoxin or complex form [Al-Saleem 2012] It has been reported that HAs enhance the passage of BoNT through intestinal cell monolayers by about 10 fold [Matsumura 2008], and thus presumably increase BoNT absorption in food borne botulism. Disruption of the intestinal epithelial barrier usually results in digestive symptoms like, increased secretion, diarrhea, mucosal inflammation, which are not observed in botulism. Hence, HAs might have a limited activity on the intestinal barrier, just enough to mediate a BoNT paracellular passage. HAs might be involved in botulism with classical type A or B strains. But in *C. botulinum* strains type E, F, and some type A, BoNT forms complexes lacking HA components. Botulinum complexes type A, E, or F encompassing OrfX and P47 proteins, are responsible for food borne botulism, which is as severe as the classical type A and B botulism. The role of OrfX and P47 in BoNT absorption is not known.

II.1.7 BoNT/botulinum complexes entry into intestinal epithelial cells

Do BoNTs enter intestinal cells via a same pathway than in neuronal cells? It is assumed that BoNT endocytosis to the apical side of intestinal cells and subsequent transcytosis deliver the whole active toxin through the basolateral surface in the extracellular medium. Tetanus neurotoxin (TeNT), which is structurally and functionally related to BoNTs, undergoes an equivalent cellular transport from the local site of infection and toxin production until target neurons in the central nervous system. TeNT enters motoneuron endings via clathrin-coated pits and it is sorted into organelles successively controlled by Rab5 and then Rab7 GTPase, which move retrogradely along the axon. TeNT shares a retrograde transport mediated by neutral pH compartments, with neurotrophic factors such as nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. Transcytosis through motoneurons releases undissociated TeNT in the spinal cord or brain, where the toxin enters inhibitory interneurons via endosomes, which are acidified. Low pH is required to trigger a conformational change of toxin molecules facilitating their membrane insertion and the translocation of the L chain into the cytosol [Bohnert 2005], [Bohnert 2006], [Caleo 2009], [Montal 2010]. In a similar way, transcytosis of BoNT/A through intestinal cell monolayers delivers active toxin at the basolateral side. This transport is not prevented by Bafilomycin A1, an inhibitor of vesicular ATPase, or monensin, an alkalinising agent. Both drugs prevent acidification of endocytosis vesicles indicating that BoNT/A transits through a neutral pH compartment in intestinal cells [Couesnon 2008], [Maksymowych 1998]. In contrast, BoNT/A entry into target neuronal cells requires an endosome acidification

which facilitates translocation of L chain into the cytosol and its subsequent intracellular enzymatic activity. Indeed, Bafilomycin A1 inhibits SNAP25 proteolytic cleavage in PC12 cells treated with BoNT/A by preventing L chain release into the cytosol [Coffield 1999], [Keller 2004], [Simpson 1994]. In addition, Brefeldin A, which disrupts the Golgi apparatus, does not also impair BoNT/A transcytosis, indicating a toxin trafficking via an intracellular pathway not involving this cellular compartment [Coesnon 2008], [Maksymowych 1998].

A differential intracellular trafficking pathway of BoNT/A in intestinal cells versus neuronal cells has been identified based on distribution and morphology of endocytic vesicles carrying the toxin and on activity modulation of molecules involved in the main cell entry pathways. In neuronal cells, BoNT/A Hc entered endocytic vesicles, which progressively migrated to the perinuclear area, whereas endocytic vesicles containing BoNT/A Hc were more scattered in the cytoplasm of intestinal cells, supporting a different trafficking in both cell types. BoNT/A enters neuronal cells via a clathrin-dependent pathway, mostly mediated by the synaptic vesicle recycling but not exclusively [Keller 2004], [Verderio 2007]. BoNT/A Hc markedly colocalizes with transferrin, a marker of the clathrin-dependent endocytosis [Coesnon 2009]. In addition, potassium depletion, which prevents assembly of clathrin-coated vesicles, significantly inhibits BoNT/A Hc uptake into neuronal cells [Coesnon 2009], [Petro 2006]. In contrast, BoNT/A Hc does not significantly colocalize with transferrin in intestinal cells and the potassium depletion does not prevent its entry into these cells. The BoNT/A entry pathway into intestinal cells is also caveolin-independent, based on a non-significant colocalization between BoNT/A Hc and caveolin [Coesnon 2009]. The different entry route of BoNT/A into neuronal and intestinal cells is further supported by microscopic electronic analysis. BoNT/A Hc is distributed in coated vesicles in neuronal cells, whereas it is shown in smooth vesicles, which likely correlate with caveolae endosomes [Aurelie Coesnon, Cesare Colasante, Jordi Molgo 2010]. Therefore, clathrin-dependent pathway seems to be a preferential entry route of BoNT/A into neuronal cells and only an accessory entry pathway into intestinal cells.

A significant part of BoNT/A Hc was found in early endosomes, as evidenced by colocalization with (early endosome antigen) EEA1 in neuronal and m-IC_{d2} cells [Coesnon 2009]. Early endosomes labeled with EEA1 are a common compartment reached by clathrin-dependent and several clathrin-independent routes [Lamaze 2006]. This indicates that BoNT/A is transported in a common early compartment in neuronal and intestinal cells. Then, the toxin is sorted in distinct pathways according to the cell type, since BoNT/A passes through an acidic compartment which facilitates the translocation of the L chain into the cytosol of target neurons, and it is transcytosed in a neutral compartment in intestinal cells

as TeNT in retrograde transport along motoneurons [Lalli 2003].

Rho-GTPases, which are involved in the control of the actin cytoskeleton, differentially regulate several endocytic pathways. Thereby, Cdc42 controls the endocytosis of GPI-APs, fluid phase markers, and *Helicobacter pylori* VacA toxin into GPI-anchored protein enriched early endosomal compartments (GEECs), whereas RhoA is involved in the internalization of interleukin-2 receptor [Mayor 2007]. Dominant-negative mutant of Cdc42 efficiently inhibited BoNT/A Hc entry into intestinal cells, and to a lower extent into neuronal cells, whereas dominant-negative mutant of Rac1 or RhoA did not affect the entry pattern of BoNT/A Hc into both cell types [Coesnon 2009]. Thus, BoNT/A enters neuronal and intestinal cells by two distinct regulated endocytosis mechanisms. BoNT/A Hc probably follows a similar Cdc42-dependent endocytic route in intestinal cells than GPI-APs or VacA. However, the Cdc42-dependent pathway in intestinal cells delivers BoNT/A Hc in a different compartment than GEECs. Indeed, GEECs have been found to be devoid of transferrin and EEA1 markers [Gauthier 2005], [Sabharanjak 2002], and BoNT/A Hc partially colocalizes with transferrin and EEA1 [Coesnon 2009]. In addition, cholesterol depletion with low concentration of M β CD (2 mM) which has been found to prevent GPI-AP uptake into GEECs [Chadda 2007] did not impaired BoNT/A Hc entry. Thereby, a distinct endocytic pathway than GEEC and controlled by Cdc42 seems to be involved in BoNT/A Hc entry into intestinal cells.

An important step in endocytosis is the fission process which permits the individualization of endocytic vesicle from invaginated membrane containing a cargo and its subsequent migration. The GTPase dynamin is a key molecule implicated in the pinching mechanism of endocytic vesicle [Roux 2006], [Takei 2005]. Dynamin was first described to be part of the clathrin-dependent pathway, but it was subsequently found to be involved in several clathrin-independent endocytosis pathways such as those mediated by caveolae or RhoA [Mayor 2007]. We observed that BoNT/A Hc endocytosis in both neuronal and intestinal cells was dynamin-dependent indicating a similar mechanism of endocytic vesicle formation in both cell types [Coesnon 2009]. Intersectin, a major binding partner of dynamin, was first involved in clathrin-dependent endocytosis [Simpson 1999], but it also regulates caveolae-mediated transcytosis in endothelial cells. Indeed, intersectin recruits dynamin through its SH3 domains to the caveolae neck [Predescu 2003]. Overexpression of the intersectin SH3A domain efficiently inhibits BoNT/A Hc entry into neuronal cells as well as in intestinal cells, indicating a same mechanism of entry in both cell types [Coesnon 2009]. However, several isoforms of intersectin have been described.

Intersectin isoform 1 is neuron specific and is involved in synaptic vesicle formation, whereas isoform 2 is widely distributed in the different tissues [Evergren 2007]. In endothelial cells, intersectin 2 associates with dynamin and SNAP23 in the fission of caveolae and

transcytosis mechanism [Predescu 2003]. Interestingly, the long isoform of intersectin 1 or 2 contains a DH (Dbl homology) domain which functions as a GEF (guanyl nucleotide exchange factor) for Cdc42 and a SH3 domain interacting with N-WASP [Evergren 2007]. This suggests a possible intersectin-mediated Cdc42 activation in the entry process of BoNT/A Hc into intestinal cells. A different regulation of entry mechanism might be involved in neuronal cells, in which BoNT/A Hc entry is dynamin- and intersectin-dependent, but not or only partially Cdc42-dependent. This not rules out that several BoNT/A Hc entry pathways might coexist.

Does botulinum complex enter intestinal cells? It seems unlikely that so large protein complexes are efficiently absorbed into cells. Only a few reports have addressed this question. It is presumed that botulinum complex type C consisting of BoNT/C, NTNH and HA components, binds to HT29 intestinal cell surface via O-linked sugar chain of mucin-like glycoproteins but not ganglioside, and enters cells via both clathrin and caveolae pathways [Nishikawa 2004], [Uotsu 2006]. Only a small fraction of botulinum complex type C receptor localizes in lipid rafts and most part in soluble membrane fractions, whereas M β CD strongly inhibits internalization of the complex [Uotsu 2006]. Thus, it is not clear whether the functional receptor is only the fraction localized in lipid rafts. BoNT/C apparently dissociates from ANTPs in endosomes and it is transported to the Golgi apparatus. BoNT/C and ANTPs are not apparently routed to lysosomes or endoplasmic reticulum [Uotsu 2006]. It is supposed that ANTPs are secreted via re-cycling endosomes, but it remains to determine how toxin and non toxic proteins are exported as well as how and where they reassociate to form a whole active toxin complex or whether only BoNT/C is transcytosed.

II.1.8 BoNT dissemination

BoNT dissemination after entry through an epithelial barrier until the target neurons is poorly understood. Only few reports have addressed this question. The main difficulty resides in the minute amounts of toxin, which have to be monitored. It is presumed that the major way of BoNT dissemination is the blood circulation. This supposes that the toxin has to pass twice through an endothelial barrier to enter the blood circulation and then to be delivered to the neurons. Assuming that the efficiency of BoNT transport through an endothelial barrier is in the same range than that through an epithelial barrier (less than 1%), only a very small fraction of the ingested or inhaled toxin might attain the target neuron endings. When injected into the lumen of an *ex vivo* mouse intestinal loop, BoNT/A reduces the frequency of spontaneous contractions and inhibits the smooth muscle contractions evoked by electric field stimulation. As monitored by fluorescent BoNT/A Hc in this experimental model, BoNT/A Hc crosses the intestinal barrier and targets cholinergic neurons of both submucosal and myenteric plexuses. This supports that BoNT/A is able

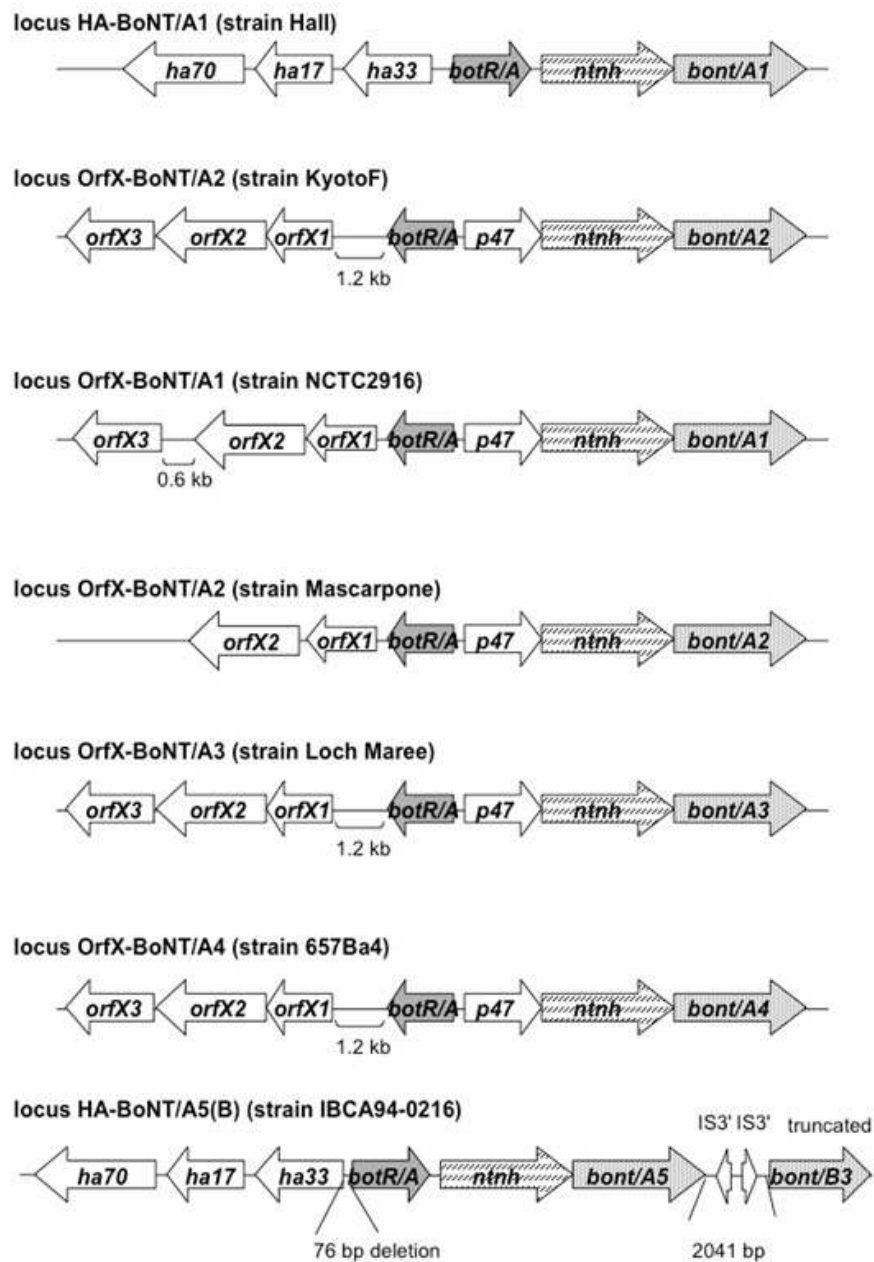


Figure 3.1A

FIGURE II.1 – Genome organization of botulinum loci in *C. botulinum* type A and subtypes strains.

to pass through the intestinal epithelium, to diffuse through the extracellular space, and to interact with intestinal neurons independently of the blood circulation, thus inducing local intestinal effects characterized by a constipation [Couesnon 2012].

Does BoNT recognize the same receptors on endothelial cells than in epithelial cells and undergo an equivalent transcytotic passage? Large botulinum complex type D and to a lower extent BoNT/D have been found to bind to bovine aortic endothelial cells via sialic acid [Yoneyama 2008] similarly to that reported for epithelial cells [Fujinaga 2006], [Niwa 2007], [Niwa 2010]. HA33 from botulinum complex type D seems to be the main molecule mediating the binding of botulinum complex to sialic acid [Yoneyama 2008]. The mode of passage of the other BoNT types in the endothelial compartment has not been fully investigated. However, ANTPs play no role in BoNT diffusion in the organism, since BoNT dissociates from ANTPs at neutral pH or higher [Wohlfarth 2009]. Indeed, in physiological conditions, BoNT is not linked to ANTPs in the lymph and blood [Sakaguchi 1982], [Sugii 1977c]. Moreover, investigations on local injections of botulinum complex for a therapeutic purpose have confirmed that BoNT/A dissociates virtually immediately from ANTPs under physiological conditions [Eisele 2011], [Pickett 2009]. Moreover, although BoNT remains relatively localized at the site of injection by binding to the local nerve endings, side effects of BoNT therapy have been observed due to toxin diffusion [Carli 2009]. Most often, the undesired effects are related to local toxin diffusion to the adjacent muscles, but in rare cases, adverse effects occur in distant muscles or result in central effects or generalized intoxication [Abbruzzese 2006], [Garner 1993], [Girlanda 1992], [Gracies 2004], [Kim 2006], [Roche 2008], [Wohlfarth 2001]. Systemic spreading and autonomic side effects including mouth dryness and also blurred vision, swallowing difficulties, and constipation, are more often observed with BoNT/B than BoNT/A [Dressler 2002]. The difference between both toxins in inducing systemic autonomic disturbances is not known. Several factors can influence BoNT diffusion such as volume of injection, toxin formulation, amount and concentration of toxin. The mode of BoNT diffusion to distant neuromuscular junctions is still under debate. Two hypothesis have been proposed, systemic distribution by the blood circulation and diffusion by a retrograde axonal transport [Garner 1993]. Experimental findings support the second hypothesis. Injection of iodinated BoNT intrasubcutaneously injected in cat is retrogradely transported to the ipsilateral spinal anterior horn cells [Wiegand 1976]. A more demonstrative evidence of BoNT/A retrograde transport has been brought by Antonucci et al. [Antonucci 2008]. Intrahippocampal BoNT/A injection led to the cleavage of SNAP25 in the ipsilateral hippocampus 1 day after administration, and in the contralateral side 3 days later. Moreover, BoNT/A injection into the optic tectum induced SNAP25 cleavage as well as reduction of cholinergic-driven wave activity in the retina, that can not be explained by a systemic spread of the toxin [Antonucci 2008], [Restani 2011], [Restani 2012].

In addition, it has been evidenced that BoNT/A, BoNT/E and their recombinant Hc domains can undergo a fast axonal retrograde transport in primary spinal cord motor neurons [Restani 2012]. As mentioned above, fluorescent BoNT/A Hc administrated into a mouse intestinal loop preferentially targets cholinergic neurons in the submucosa and musculosa, but also to a lower extent other neuronal cells including glutamatergic and serotonergic neurons. The BoNT/A effects in these non-cholinergic neurons are not known. One possibility is that BoNT/A might use the non-cholinergic neurons to be retrogradely transported to other target neurons [Couesnon 2012].

Blood circulation offers the possibility to rapidly spread the toxin in the organism if the toxin is free and not modified. Most part of BoNT (85-95%) remains free in the serum or plasma and does not accumulate in blood cells. Only a small proportion (24%) is bound to albumin. Moreover, BoNT is not metabolized in blood and its biological activity is unchanged [Al-Saleem 2008], [Ravichandran 2006]. Therefore, free and stable form of BoNT in the serum permits a systemic distribution of the toxin. The general circulation can be considered as a "holding compartment" from where small but sufficient amounts of toxin are delivered to target neuron endings [Al-Saleem 2008]. Indeed, in food borne botulism, most of the patients show the presence of toxin in the serum and the toxemia can persist until 25 days after symptom onset [Sheth 2008]. However, in some cases of food borne botulism (20-30%) and in the majority of infant botulism, BoNT is not detectable in the serum. Whatever the origin of botulism, food-borne botulism, *C. botulinum* intestinal colonization, or wound botulism, the sequence of symptom onset is the same with attack of cranial nerves and then spinal motoneurons, which is representative of a descending flaccid paralysis. This does not support dissemination by the blood circulation, which would distribute the toxin to all neuron endings leading to a generalized botulism. Thus, the exact pathway of BoNT distribution remains to be determined.

II.1.9 Concluding Remarks

BoNTs are highly sophisticated toxins which only exert an enzymatic activity towards specific neuronal proteins involved in neuroexocytosis. This raises the intriguing question how such a toxin from an environmental bacterium has emerged to recognize specific targets of the most differentiated cells of higher organisms? Is it the result of an evolution convergence or which are the evolutionary pressures driving such a differentiation pathway leading from a bacterial enzyme to a neuronal cell specific toxin? Consequently, have BoNTs also acquired a sophisticated mode of entry and dissemination into the organism to have access to the target neurons? Many bacterial toxins have the ability to specifically enter target cells and to deliver an intracellularly active domain into the cytosol, most commonly by using a

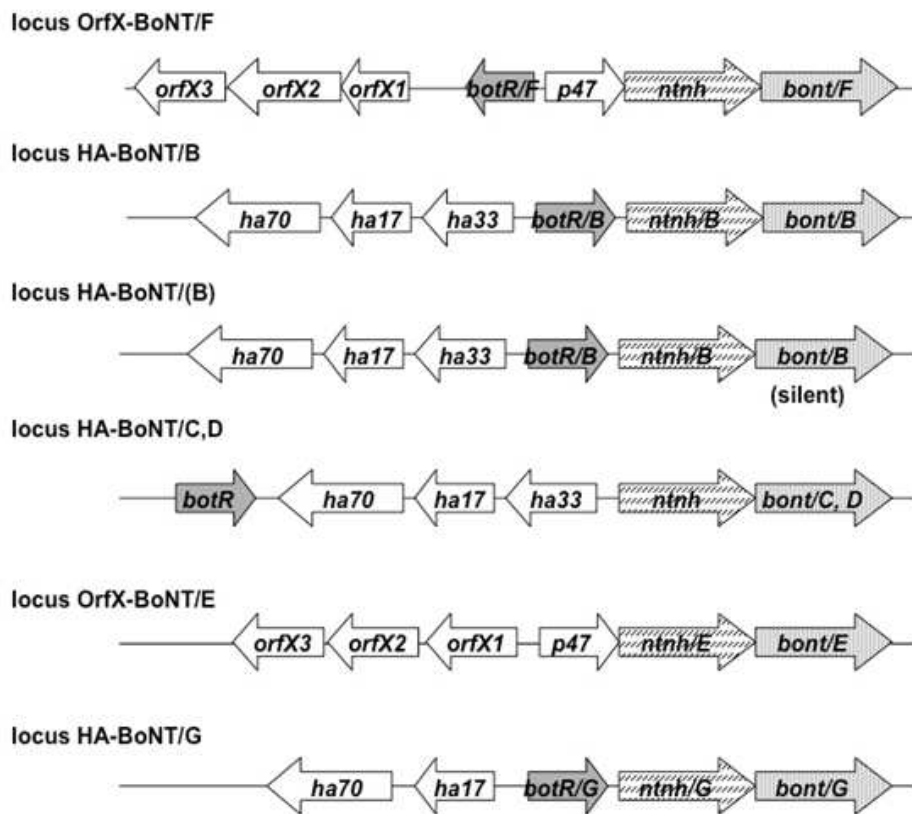


Figure 3.1B

FIGURE II.2 – Genome organization of botulinum loci in *C. botulinum* type B to G strains

physiological entry pathway. It has been evidenced that BoNTs enter epithelial cell by a receptor-mediated transcytosis mechanism, which delivers the undissociated active toxin to the baso-lateral side. Then, the toxin is transported by the blood/lymph circulation and possibly by a retrograde axonal trafficking until the target motoneuron endings, where it uses a distinct entry pathway via acidified endosomes facilitating the translocation of the light chain into the cytosol.

Do BoNTs recognize distinct receptors to drive a transcytosis through epithelial cells and a productive endocytosis in motoneurons? BoNTs, at least BoNT/A, seemingly recognize a same set of receptors including a ganglioside and a synaptic vesicle membrane protein or related protein in both cell types. But, this does not preclude that another molecule in the receptor platform or a distinct receptor distribution in membrane might drive the specific entry pathways. Does this entry through an epithelial barrier and routing to motoneurons hijack a physiological process? Until now, no molecule is known to be absorbed from the digestive or respiratory tract and then specifically directed to neuronal cells. ANTPs have a role in the protection of BoNT against low pH and intestinal proteases. Their implication in the passage of BoNT through an epithelial barrier is still unclear. Botulinum complexes containing HAs have been shown to alter the integrity of epithelial barrier via E-cadherin and to facilitate a paracellular passage of BoNT. Their accessory role in the absorption of BoNT in natural conditions remains to be clarified, and also the eventual role of botulinum complexes lacking HA proteins. Albeit most of detailed molecular and structural mechanisms of BoNT activity at the neuronal cell level have been unraveled, toxin dissemination and trafficking through the organism until the target cells remain still poorly understood.

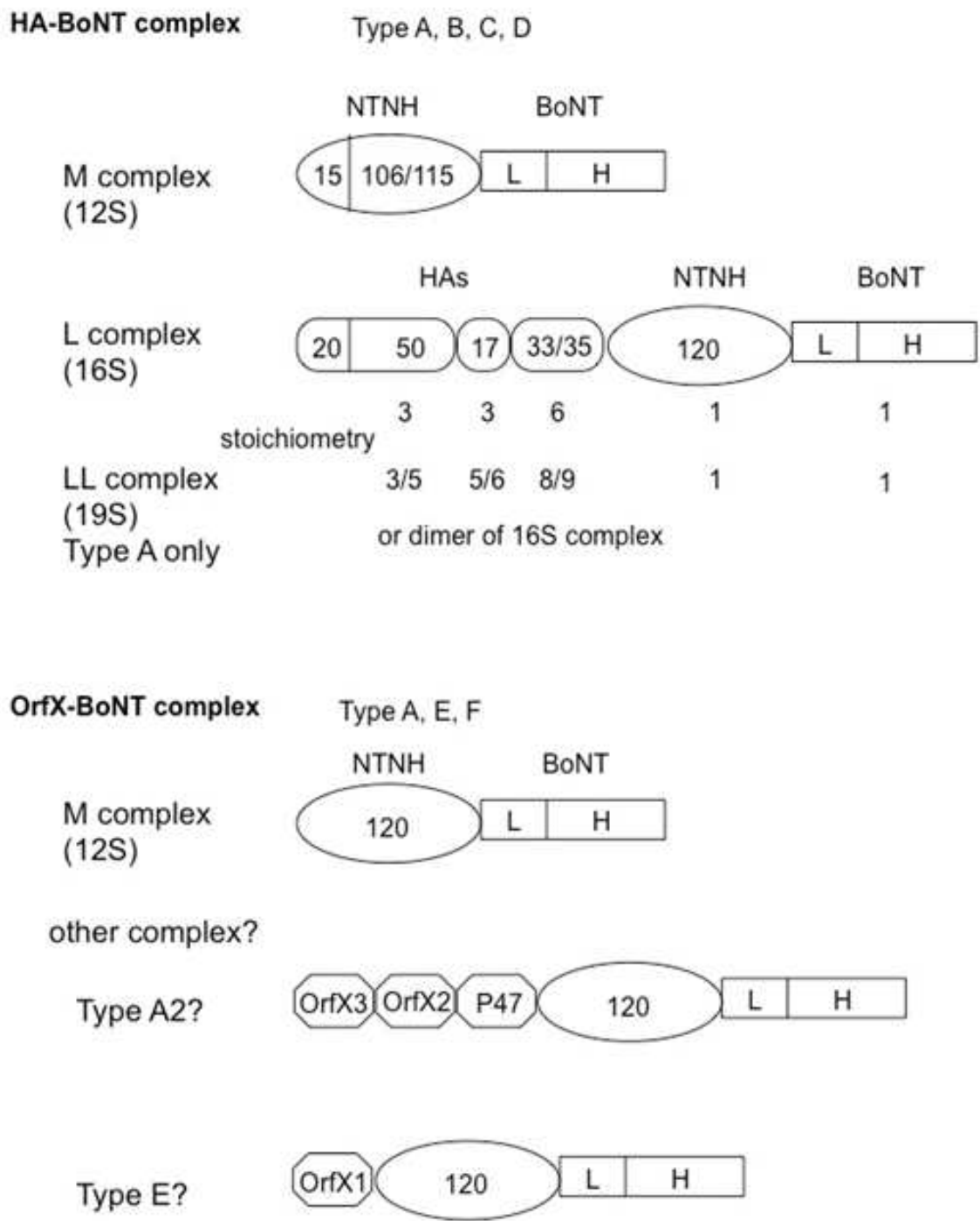


Figure 3.1C

FIGURE II.3 – Composition of the main botulinum complex forms. Numbers inside the boxes indicate protein sizes in kDa. L, light chain; H, heavy chain; NTNH, non-toxic non-hemagglutinin; HA, hemagglutinin and Genome organization of botulinum loci and botulinum toxin organization.

II.2 Résultats expérimentaux modèle *in vivo*

Dans cette partie de ma thèse, je me suis intéressée à comprendre et à identifier les mécanismes moléculaires intervenant dans le passage des BoNTs à travers la barrière intestinale.

Dans cette partie, je détaillerai les résultats obtenus sur le modèle *in vivo*.

II.2.1 Cinétique d'entrée des BoNTs dans la paroi intestinale de souris

Dans cette partie, je me suis attachée à caractériser la cinétique d'entrée de BoNT/B à travers la barrière intestinale de souris. Pour cela, le fragment Hc de BoNT/B a été produit sous forme de protéine recombinante (HcB), puis marqués à la Cyanine 3 (HcBCy3), qui émet dans le rouge (excitation à 540 nm et émission à 570 nm). La protéine a été injectée *in vivo* dans des anses ligaturées de souris (partie jujénum iléon) préalablement anesthésiées (voir A).

En fonction des essais, les souris ont été sacrifiées au bout 5, 10 ou 20 min. L'anse intestinale est ensuite retirée, lavée et ouverte longitudinalement pour avoir accès à la lumière de l'intestin. De coupes d'intestins (150 μm d'épaisseur) sont obtenues à l'aide d'un vibratome et marquées avec différents anticorps fluorescents (voir A tableau ??). Les coupes sont réalisées dans le plan longitudinal afin de visualiser l'ensemble des couches histologiques de la paroi intestinale. Certaines coupes ont été réalisées dans le plan transversal pour visualiser la lumière des cryptes. Chaque temps d'incubation a été réalisé dans des souris indépendantes afin d'éviter une possible dissémination de HcB à distance du site d'injection.

Après 5 min d'incubation de HcBCy3 dans l'anse intestinale de souris, un faible marquage est observé au niveau de la bordure en brosse (Fig. II.4A et Fig. II.4B flèches blanches). Un fort marquage est observé sur certaines cellules de l'épithélium des villosités. Ces cellules présentent une forme pyramidale ou allongée (Fig. II.4B et II.4C flèche bleue).

Un fort marquage de structures filamenteuses est également observé dans la lamina propria, principalement dans le tiers supérieur de la villosité (Fig. II.4A, B et C flèches oranges).

Après 10 min d'incubation, le marquage est accentué au niveau de la bordure en brosse, où HcBCy3 s'accumule à la surface des villosités (Fig. II.5A, flèche blanche). On observe, comme à 5 min, un marquage des cellules de l'épithélium villositaire (Fig. II.5B et II.5C, flèche bleue).

Le marquage des structures filamenteuses de la lamina propria est également accentué

et présent sur toute la longueur de la villosité, et autours des cryptes (Fig. II.5B et II.5C, flèches oranges). HcBCy3 semble s'accumuler dans le fond des cryptes, mais aucune cellule marquée n'a pu être détectée (Fig. II.5B et D, flèches blanches).

La sous-muqueuse et la musculature sont également marquées avec HcBCy3 (Fig. II.5A et II.5B) surtout au niveau de structures filamenteuses pouvant correspondre à des plexus nerveux de la sous-muqueuse ou de la musculature (Fig. II.5E).

Après 20 min d'incubation de HcBCy3 dans l'anse intestinale de souris, le marquage de l'épithélium villositaire au niveau de la bordure en brosse est nettement plus faible que le marquage observé aux temps 5 et 10 min (II.6A flèches blanches). On observe cependant toujours un marquage des structures filamenteuses au niveau de la lamina propria, sur toute la longueur des villosités et autours des cryptes (Fig. II.6A et II.6B flèches oranges). Sur une coupe transversale, on observe une accumulation de HcBCy3 dans la lumière des cryptes, correspondant au marquage observé en coupe longitudinale (Fig. II.6B).

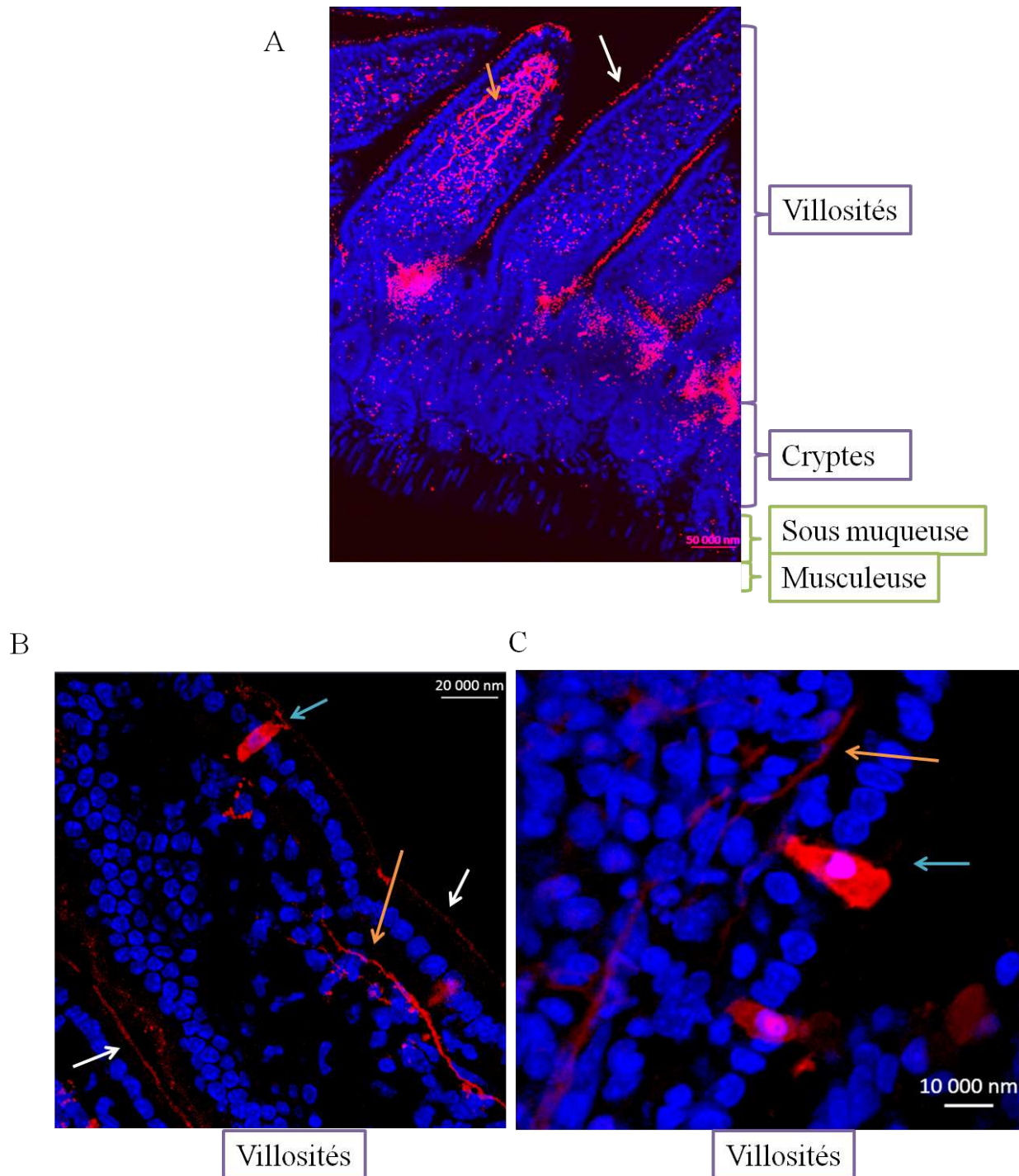


FIGURE II.4 – Image en microscopie à fluorescence de la liaison de HcB avec la barrière intestinale après 5 min d'incubation (échelle indiquée sur chaque image). Les noyaux sont marqués au Hoechst (bleu). Un faible marquage de HcBCy3 (rouge) est observé à la surface des villosités (A et B flèches blanches). Certaines cellules, de forme pyramidale ou allongée, sont marquées à la surface des villosités (B et C flèches bleues). Enfin, on observe également un marquage de structures filamenteuses dans la lamina propria (A, B et C flèches oranges). Les différentes couches structurales sont encadrées en violet pour la muqueuse, et en vert pour la sous-muqueuse et la musculature.

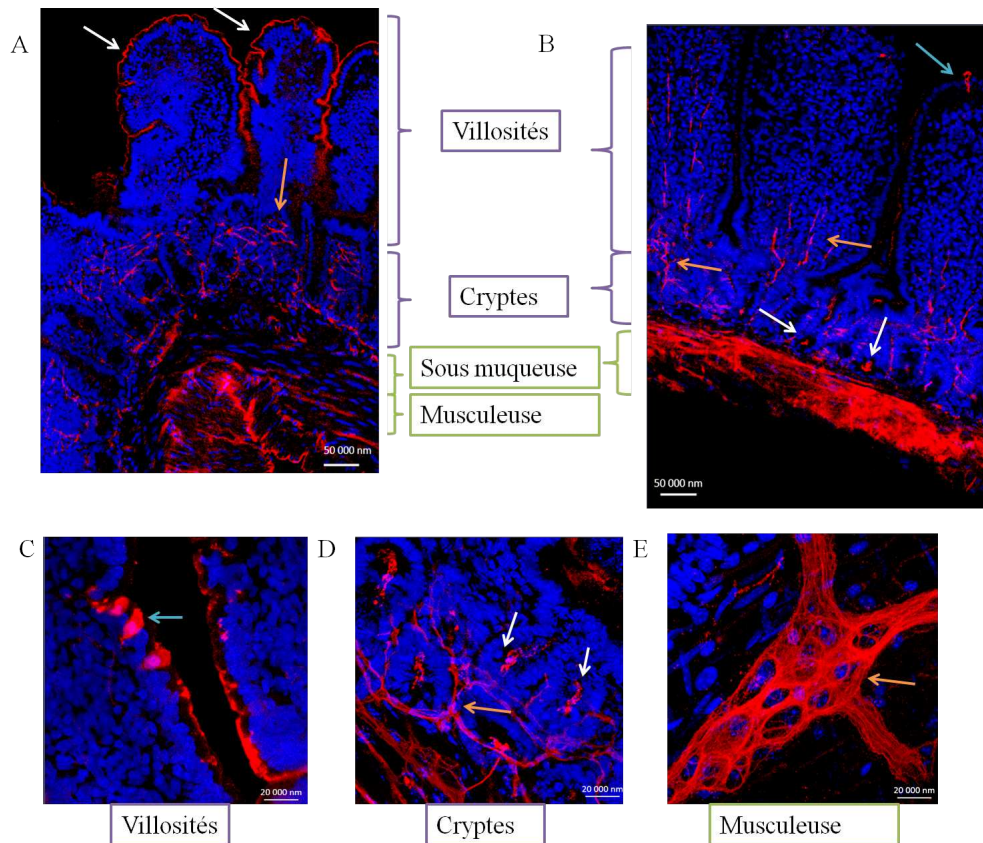


FIGURE II.5 – Image en microscopie à fluorescence de la liaison de HcBCy3 avec la barrière intestinale après 10 min d'incubation (échelle indiquée sur chaque image). Les noyaux sont marqués au Hoechst (bleu). Les flèches blanches indiquent l'accumulation de HcBCy3 à la surface des villosités (A) et au fond des cryptes (B et D). Les flèches bleues indiquent les cellules marquées de l'épithélium villositaire (B et C). Les flèches oranges signalent les marquages des structures filamenteuses dans la muqueuse (A, B et D) dans la sous-muqueuse et la musculeuse (E) .

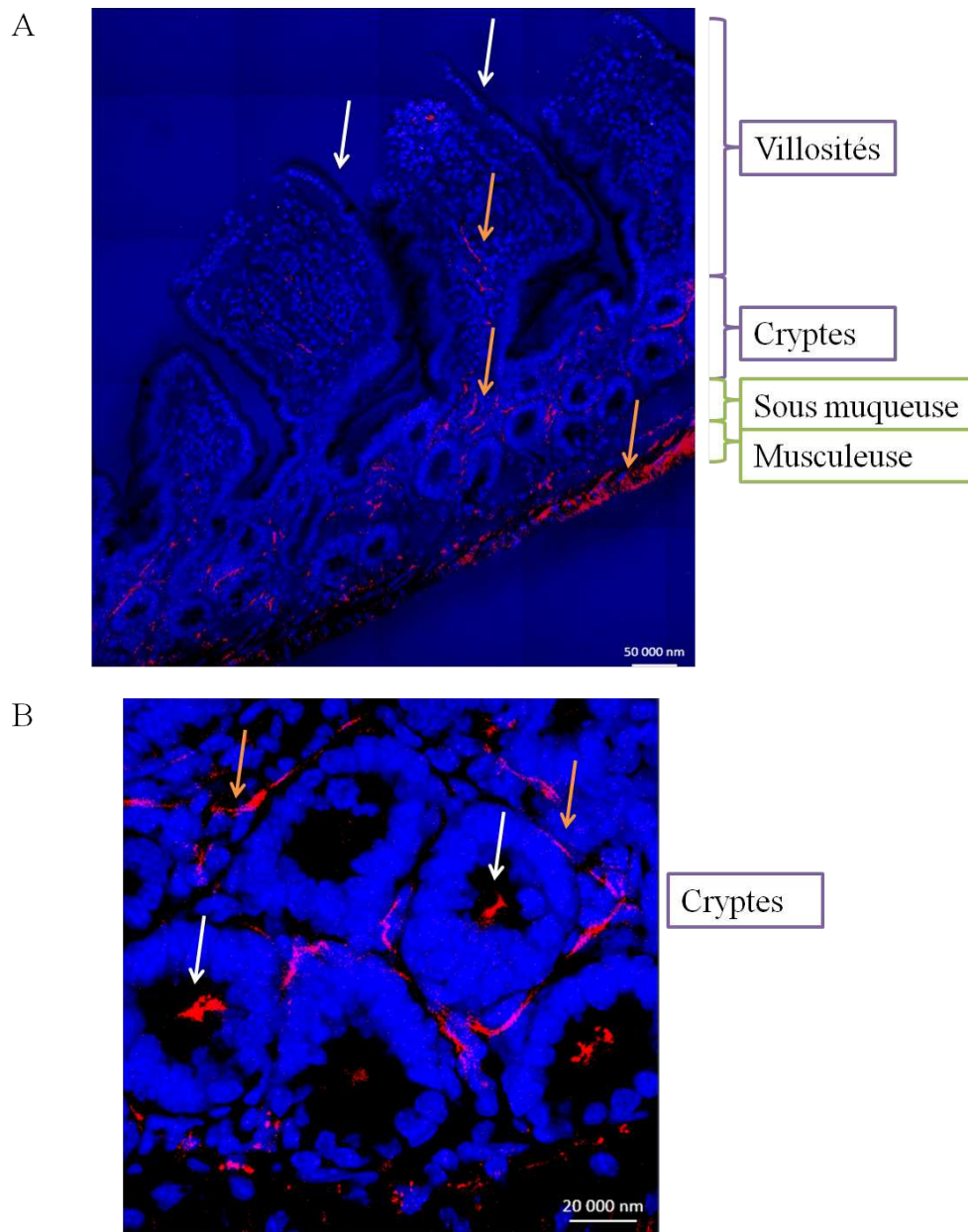


FIGURE II.6 – Image en microscopie à fluorescence de la liaison de HcBCy3 (en rouge) avec la barrière intestinale après 20 min d'incubation (échelle indiquée sur chaque image). L'image A est une coupe longitudinale de la barrière intestinale où un faible marquage est observé à la surface des villosités (flèches blanches) alors qu'un fort marquage de type filamentaire est observé autour des cryptes, dans la sous-muqueuse et la musculeuse (flèches oranges). L'image B réalisée à partir d'une coupe transversale, permet de visualiser l'accumulation du HcBCy3 au fond des cryptes (flèches blanches). Les noyaux ont également été marqués au Hoechst (bleu).

II.2.2 L'entrée de HcB dans la barrière intestinale est dépendante de l'endocytose

Il a été précédemment montré dans le laboratoire que BoNT/A est capable de traverser une monocouche de cellules intestinales de souris par transcytose, sans perturber les jonctions intercellulaires [Coesnon 2008]. Les voies d'endocytose impliquées dans l'entrée de BoNT/A dans les cellules intestinales et neuronales ont été partiellement identifiées. BoNT/A semble préférentiellement entrer dans les cellules neuronales par une voie dépendante de la clathrine, et dans les cellules intestinales, par une voie indépendante de la clathrine mais dépendante de la petite RhoGTPase Cdc42 [Coesnon 2008].

Les voies d'endocytose décrites dans la littérature sont nombreuses et peuvent être classées de multiples façons en fonction de leur dépendance vis à vis des protéines régulatrices, ou la présence ou non d'un recouvrement protéique des vésicules d'endocytose, voir IV.4.2.2. De nombreuses voies d'endocytose nécessitent la présence de protéines de scission pour libérer la vésicule d'endocytose dans le milieu intracellulaire. La dynamine-2 est une grande GTPase impliquée dans la voie dépendante de la clathrine, la voie des cavéolines ou la voie des flotilines [Doherty 2009].

Afin de déterminer si l'entrée de HcB est dépendante de l'endocytose, la dynamine a été inhibée à l'aide d'une drogue, le Dynasore ([Macia 2006]). Le Dynasore est une petite molécule capable d'inhiber la dynamine-1, la dynamine -2 ainsi que la dynamine mitochondriale Drp1 de manière réversible. Cette inhibition est fonctionnelle sur les cellules neuronales et intestinales.

Le Dynasore a été incubé pendant 30 min dans une anse intestinale de souris préalablement anesthésiée. Puis, HcBCy3 a été injecté en quantité égale dans une anse contrôle et une anse pré-incubée avec le Dynasore.

Dans un premier essai, l'expérience contrôle, c'est-à-dire sans Dynasore et l'expérience en présence de Dynasore, ont été réalisées dans une même souris. Les résultats obtenus ne montraient qu'une faible diminution de marquage de HcBCy3 à la barrière intestinale. Toutefois, il est possible que le Dynasore, une fois internalisé dans les cellules, puisse disséminer à distance du site d'injection. Pour nous affranchir de cette potentielle dissémination du Dynasore, les expériences ont été réalisées sur 2 souris indépendantes.

Alors que HcBCy3 est détecté le long de la bordure en brosse des villosités, dans la sous-muqueuse et la musculuse (figure 4A et 4B et 2), la quantité de HcBCy3 détectée dans la paroi intestinale après incubation avec le Dynasore est quasiment nulle. HcB s'accumule au niveau de la bordure en brosse des villosités (figure 4D), mais seul un faible marquage est

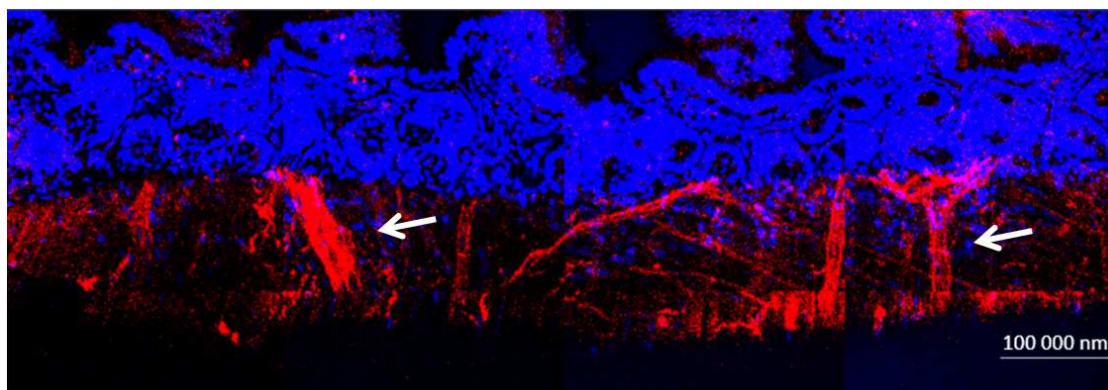
déecté dans la sous-muqueuse et la musculuse (figure 4C et 4D). Il est important de noter qu'aucune altération morphologique de la barrière intestinale n'est observée en présence du Dynasore.

Ces expériences ont permis de soulever plusieurs questions. Les cellules fortement marquées au temps 5 min et 10 min constituent-elles une voie d'entrée pour HcB et quelles sont-elles? Quelle est la nature des structures filamenteuses marquées avec HcCy3 observées dans la lamina propria, la sous-muqueuse et la musculuse? Est-ce que HcB utilise les mêmes récepteurs cellulaires pour entrer dans la barrière intestinale que ceux impliqués pour l'entrée dans les cellules neuronales?

Pour répondre à ces questions, les mêmes expériences d'anses intestinales ligaturées ont été réalisées après 10 min d'incubation de HcBCy3, temps qui semble le plus approprié pour la visualisation des cellules et des structures marquées.

Contrairement aux expériences de cinétiques, les coupes intestinales ont été marquées en immunofluorescence avec des anticorps spécifiques dirigés contre les différents types cellulaires présents dans la barrière intestinale.

A



B

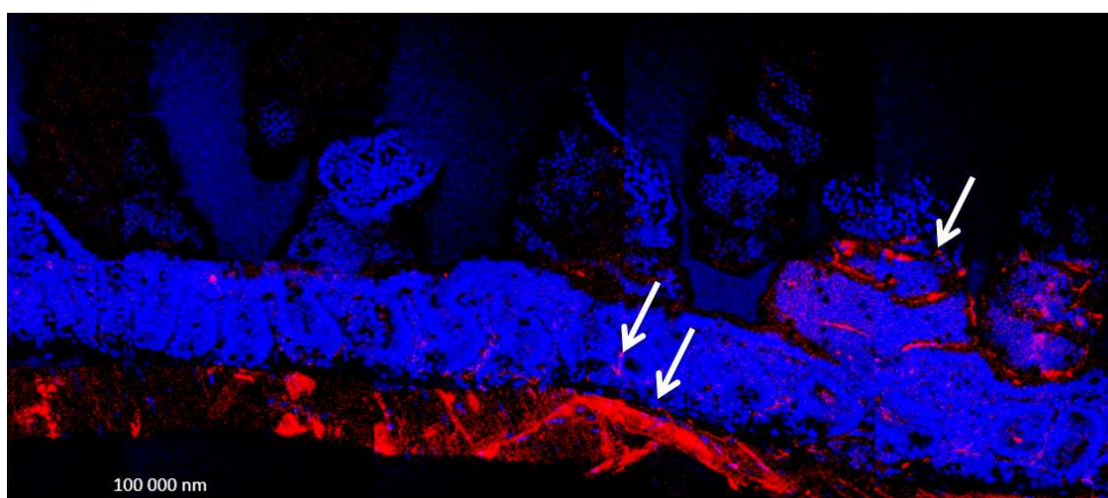
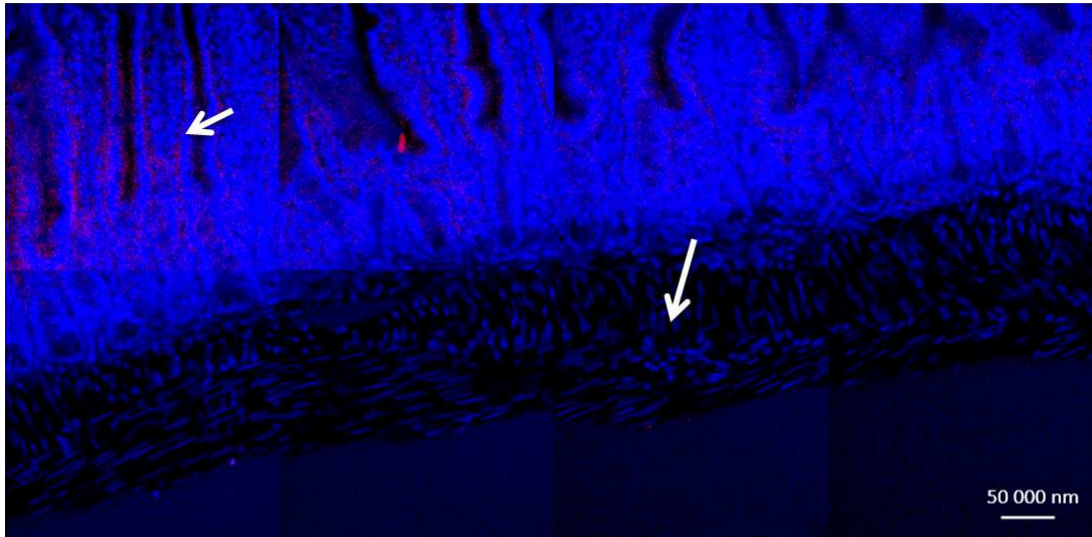


FIGURE II.7 – Image en microscopie à fluorescence de la liaison de HcBCy3 avec la barrière intestinale après 10 min d’incubation (Figure A et B) et en présence de Dynasore (figure C et D) (échelle indiquée sur chaque image). Les noyaux sont marqués au Hoechst (bleu). Les figures A et B sont des mosaïques d’images réalisées à partir de deux expériences indépendantes.

C



D

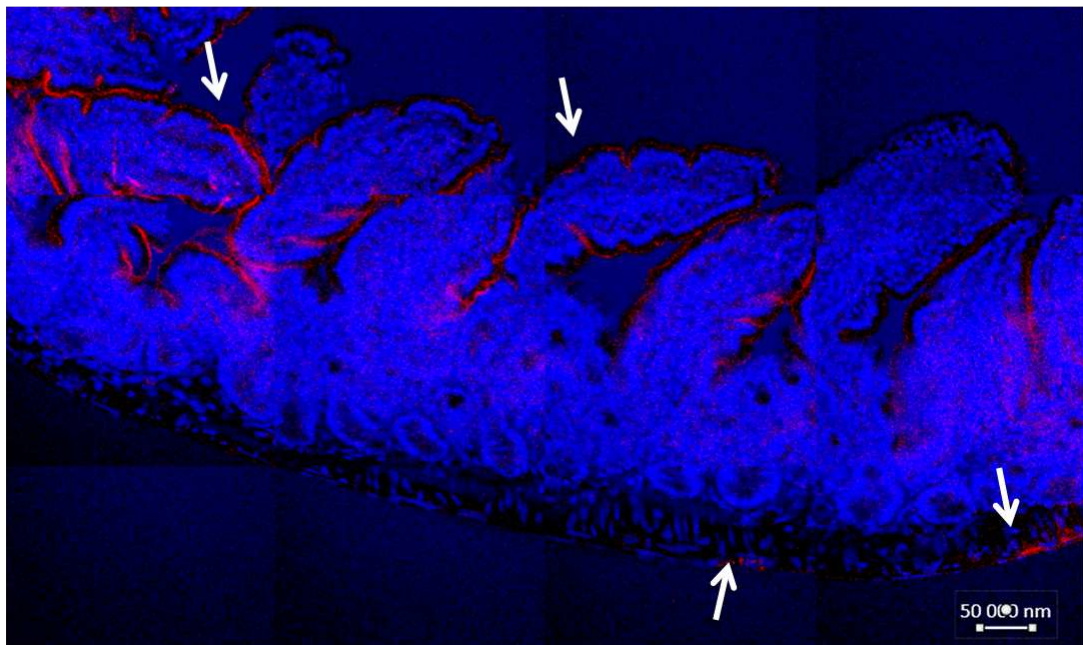


FIGURE II.8 – Image en microscopie à fluorescence de la liaison de HcBCy3 avec la barrière intestinale après 10 min d’incubation (Figure A et B) et en présence de Dynasore (figure C et D). Voir légende Fig. II.7.

II.2.3 Identification des cellules de l'épithélium intestinal marquées par HcBCy3

Il a été précédemment montré au sein du laboratoire que BoNT/A à travers une monocouche de cellules intestinales de souris par transcytose, sans perturber les jonctions intercellulaires et que HcA semble être préférentiellement transportée via des cellules neuroendocrines de cryptes préférentiellement les cellules sécrétant la sérotonine [Coesnon 2012] [Coesnon 2008].

L'ensemble des expériences réalisées précédemment ont permis d'observer que seules certaines cellules de l'épithélium, localisées au niveau des villosités, sont marquée avec HcBCy3. Afin d'identifier ces cellules, les différents types cellulaires présents dans les villosités ont été étudiés.

Plusieurs types cellulaires ont été décrits dans l'épithélium intestinal. Les entérocytes sont les cellules les plus représentées (80% de la totalité des cellules de l'épithélium intestinal) suivies par les cellules caliciformes, ou "Goblet cells" (15%). Les cellules entéroendocrines ne représentent que 1% de la totalité des cellules de l'épithélium intestinal (voir III.2.2). Les cellules marquées avec HcBCy3 semblent correspondre à un type cellulaire précis, présent en moindre quantité que les entérocytes.

II.2.4 Analyse en microscopie à fluorescence

Dans un premier temps, un marquage a été réalisé afin de distinguer les cellules neuroendocrines des autres types cellulaires de la muqueuse intestinale. Il a été démontré dans le laboratoire, que HcA traverse la barrière intestinale préférentiellement par des cellules neuroendocrines sérotoninergiques localisées dans les cryptes [Coesnon 2012]. Ces cellules semblent être de bons candidats pour l'entrée des BoNTs dans la paroi intestinale. Elles ont des caractéristiques communes avec les cellules neuronales et dérivent toutes deux de la crête neurale. De plus, ces cellules, bien que majoritairement présentes dans les cryptes, sont également localisées le long de l'axe crypte villosité

La CgA est une protéine localisée dans les granules de sécrétion des cellules neuroendocrines et sert donc de marqueur général pour ce type cellulaire. La CgA a deux rôles majeurs : elle intervient dans la régulation du stockage et de la sécrétion d'hormones et de peptides et une fois sécrétée dans le milieu extracellulaire, et elle est le précurseur de différents composés hormonaux (la CgA est clivée pour donner la pancréastatine, hormone inhibitrice de l'insuline) [Zatelli 2007].

Ainsi, un premier marquage a été réalisé avec un anticorps dirigé contre la CgA sur des

anses intestinales de souris après 10 min d'incubation de HcBCy3. Aucune cellule co-marquée avec HcBCy3 et la CgA, a pu être détectée dans les villosités (Fig. II.9A) ou dans les cryptes (Fig. II.9B).

Pour aller plus loin dans notre comparaison des voies d'entrée empruntées par HcA et HcB, les coupes intestinales ont été marquées avec des anticorps dirigés contre la sérotonine. Les cellules sécrétant la sérotonine sont des cellules entéroendocrines et les cellules immunoréactives pour la sérotonine ont la même répartition le long de l'axe crypte/ villosité que les cellules neuroendocrines immunoréactives pour la CgA. Ici encore, aucune cellule co-marquée avec HcBCy3 et la sérotonine a pu être identifiée dans les villosités (Fig. II.10A) ou dans les cryptes (Fig. II.10B).

Par la suite, des coupes d'intestin ont été soumises au WGA-FITC (Fluorescein isothiocyanate). Le WGA est capable de se lier aux glycoprotéines telles que la mucine, sécrétée par les cellules caliciformes et permet donc de différencier les cellules caliciformes des autres types cellulaires. De plus, ces cellules sont facilement reconnaissables par leur forme de calice évasé vers le haut. Aucune corrélation entre les cellules marquées avec HcBCy3 et les cellules caliciformes a été observée (Fig. II.11).

De la même façon, les autres types cellulaires décrits dans la muqueuse intestinale ont été étudiés pour leur rôle potentiel dans l'entrée de HcB. Des anticorps dirigés contre les cellules M des villosités (Fig. II.12A), les "cup cells" (anticorps dirigé contre la vimentine, résultats non montrés), les "tufts cells" (anticorps dirigés contre DCLK1, double cortin like kinase 1 protein) (Fig. II.12B), ainsi que les lymphocytes intraépithéliaux (résultats non montrés) ont été utilisés pour marquer les coupes intestinales de souris obtenues après 10 min d'incubation avec HcBCy3. Aucune cellule co-marquée avec HcBCy3 et les marqueurs spécifiques de ces types cellulaires a pu être détectée.

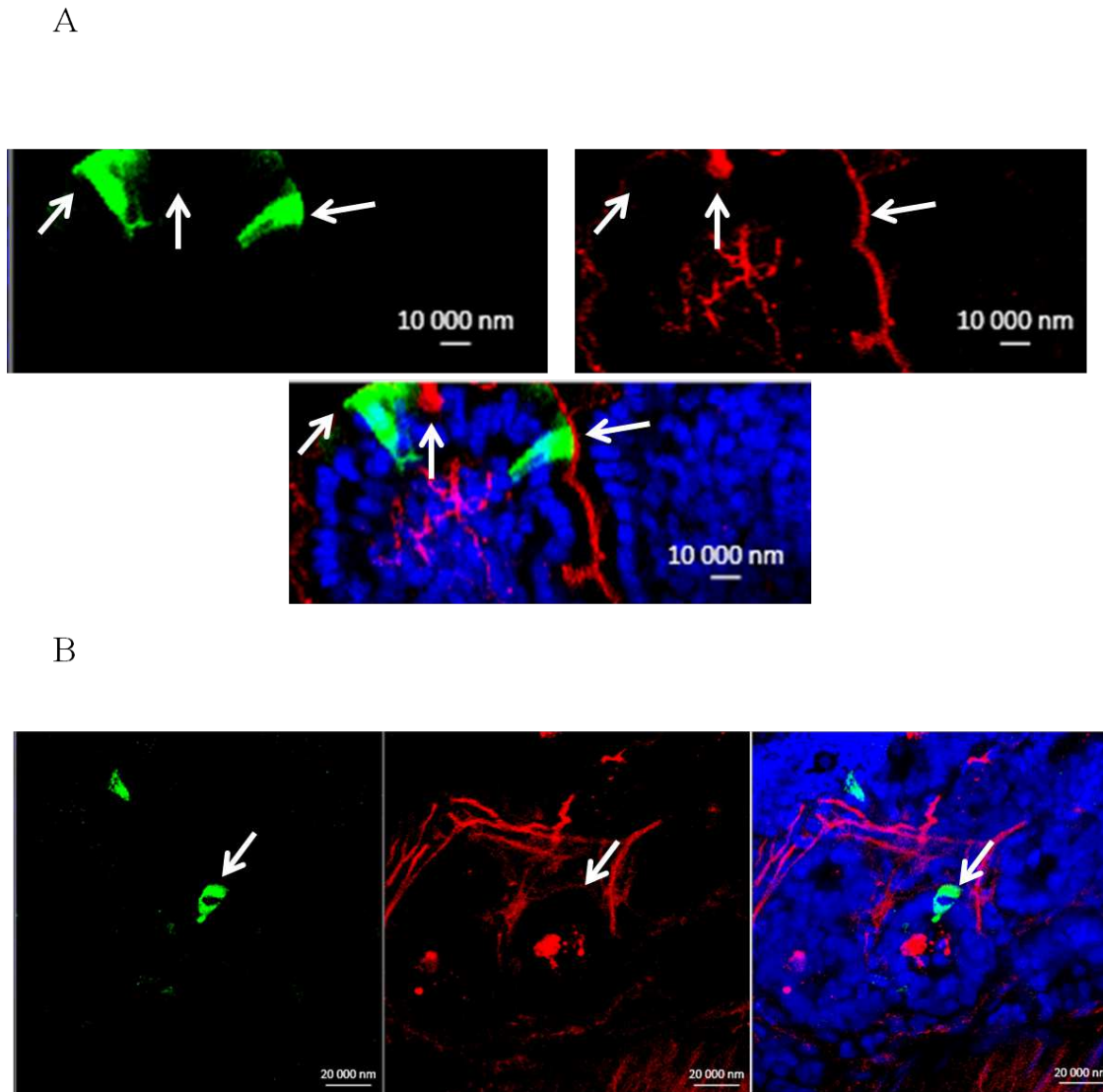


FIGURE II.9 – Image en microscopie à fluorescence des cellules marquées par HcBCy3 (rouge) et des cellules immunoréactives pour la CgA (vert) dans les villosités et les cryptes après 10 min d’incubation (échelle indiquée sur chaque image). Les figures sont des projections en Z de plusieurs tranches optiques (environ 20 tranches à 0,3 μm d’épaisseur) afin de visualiser la cellule en entier. La figure A correspond au marquage obtenu au niveau des villosités et la figure B au marquage obtenu dans les cryptes. Les noyaux ont également été marqués au Hoechst.

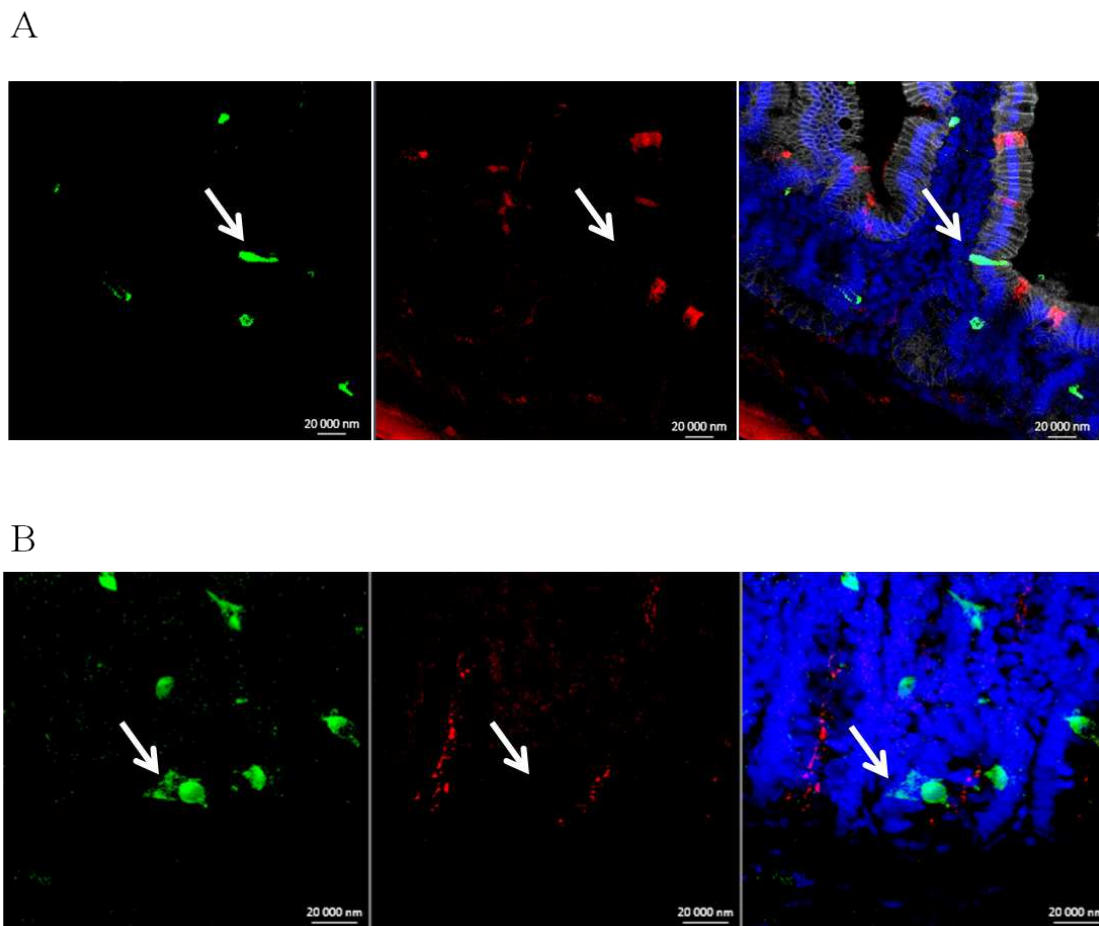
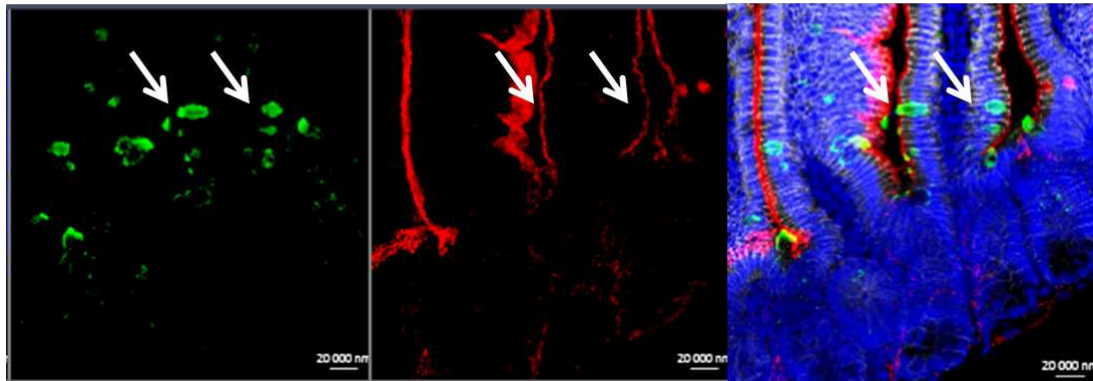


FIGURE II.10 – Image en microscopie à fluorescence des cellules marquées par HcBCy3 (rouge) et des cellules immunoréactives pour la sérotonine (vert) dans les villosités et les cryptes après 10 min d'incubation (échelle indiquée sur chaque image). Voir légende Fig. II.9.

A



B

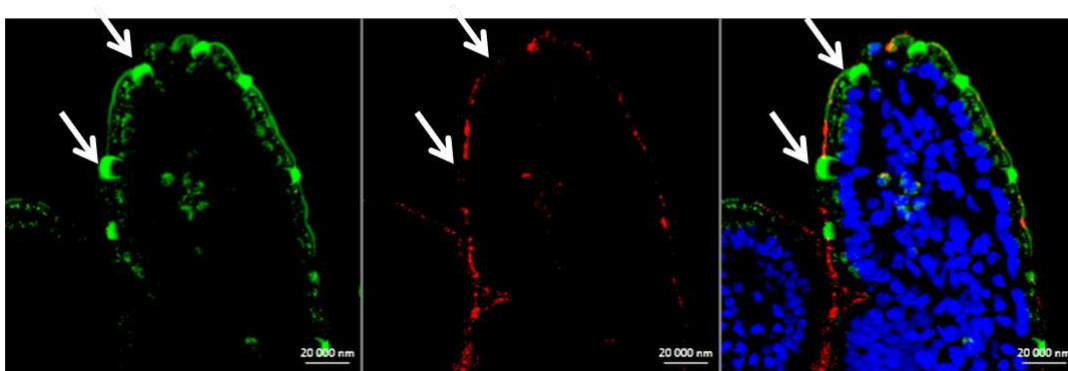


FIGURE II.11 – Image en microscopie à fluorescence des cellules marquées par HcBCy3 (en rouge) et des cellules caliciformes (WGA-FITC, vert) dans les villosités et les cryptes après 10 min d'incubation (échelle indiquée sur chaque image). Les figures sont des projections en Z de plusieurs tranches optiques (environ 20 tranches à 0,3 μm d'épaisseur) afin de visualiser la cellule en entier. Les figures A et B sont issues de deux expériences indépendantes. Les noyaux ont également été marqués au Hoechst et les membranes cellulaires avec un anticorps anti-cadhérine (ECCD2, blanc).

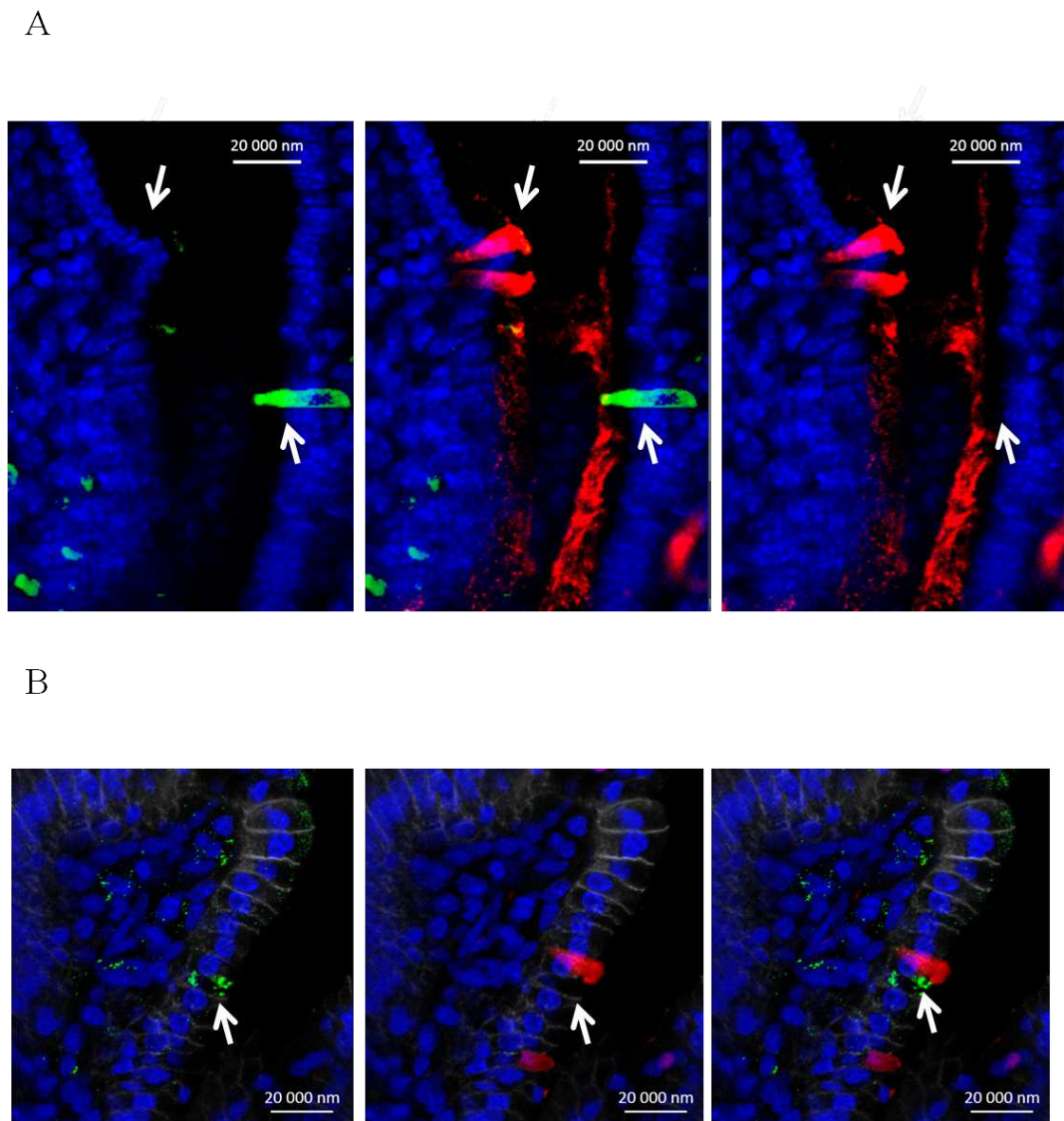


FIGURE II.12 – Image en microscopie à fluorescence des cellules marquées par HcBCy3 (rouge) et des cellules M des villosités (vert, figure A) ou les lymphocytes intra-épithéliaux (DCLK1, vert, figure B) dans les villosités après 10 min d’incubation (échelle indiquée sur chaque image). Les figures sont des projections en Z de plusieurs tranches optiques (environ 20 tranches à $0,3 \mu\text{m}$ d’épaisseur) afin de visualiser les cellules en entier. Les noyaux sont marqués au Hoechst (bleu) et les membranes cellulaires avec un anticorps anti-cadhérine (ECCD2, en blanc).

II.2.5 Analyse en immunohistochimie

Afin de mieux comprendre la répartition de HcB dans les cellules intestinales, une analyse complémentaire en immunohistochimie a été réalisée par le Professeur Jean Michel Goujon (CHU Poitiers). Les expériences ont été réalisées avec la protéine HcB non fluorescente après 10 min dans une anse intestinale ligaturée, et la détection a été réalisée à l'aide d'anticorps polyclonaux immunopurifiés dirigés contre HcB (voir A).

Sur les Fig. II.13A et Fig. II.13D, HcB est détectée dans des cellules localisées au niveau de l'épithélium des villosités (flèches noires). Les cellules marquées s'étendent jusqu'au 5/6 de la villosité et aucun marquage est détecté dans les cryptes. Le marquage cellulaire détecté sous forme de granules majoritairement localisées au pôle basal des cellules (Fig. II.13B). Certaines cellules du chorion des villosités sont également marquées mais sont en moindre quantité que les cellules épithéliales (figure 9D). Aucun marquage est détecté dans les intestins contrôle sans HcB (Fig. II.13C et Fig. II.13F).

Un marquage des plexus nerveux est également observé dans la sous-muqueuse et la musculature. La sous-muqueuse est facilement différenciable de la musculature par la morphologie allongée des noyaux des cellules du tissu musculaire (flèche verte, Fig. II.14B). Dans les deux cas, un fort marquage est observé au niveau des corps cellulaires de cellules regroupées correspondant à des plexus sous-muqueux (Fig. II.14A) et musculaire (Fig. II.14B).

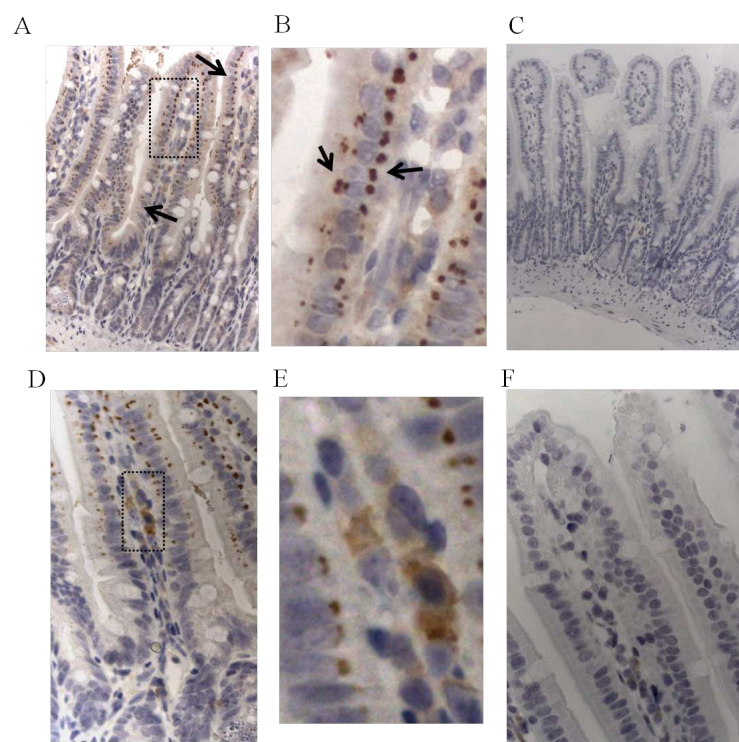


FIGURE II.13 – Analyse en immunohistochimie réalisée sur des coupes longitudinales d’anses intestinales de souris après 10 min d’incubation d’HcB. Les figures B et E sont les agrandissements des figures A et D au niveau des rectangles noirs. Les figures C et F sont les intestins contrôles sans HcB. La détection de HcB est réalisée à l’aide d’anticorps dirigés contre HcB.

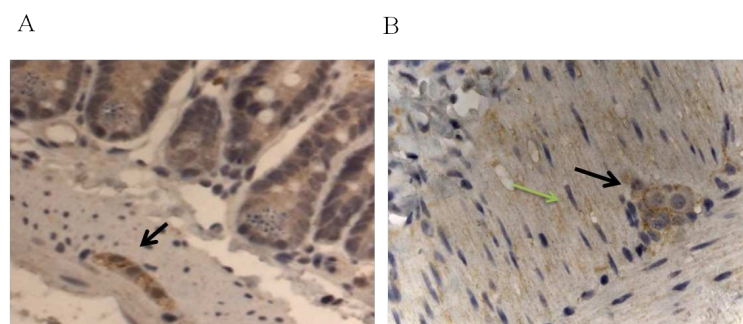


FIGURE II.14 – Immunohistochimie de la sous-muqueuse et musculature réalisées à partir de coupes longitudinales d’anses intestinales de souris après 10 min d’incubation de HcB. La détection de HcB est réalisée à l’aide d’anticorps dirigés contre HcB.

II.2.6 Analyse en microscopie électronique

Afin de localiser plus précisément les compartiments cellulaires empruntés par HcB durant son transport, des analyses en microscopie électronique ont été réalisées à partir d'anse intestinale de souris obtenues après 10 min d'incubation de HcB. La détection est ensuite réalisée à l'aide d'anticorps dirigés contre HcB couplés à des billes d'or colloïdales, qui apparaissent en noir sur les images.

La Fig. II.15A montre la surface d'une cellule de la bordure en brosse. Les microvillosités des entérocytes, situées au pôle apical des cellules, sont facilement identifiables de par leur forme allongée cylindrique. On observe également de nombreuses vésicules d'endocytose à l'interface entre les microvillosités et la membrane cellulaire mais également en intracellulaire (Fig. II.16A) flèches bleues.

Un marquage HcB est observé à la surface (Fig. II.16A flèches noires) et à l'intérieur des microvillosités (Fig. II.16A flèches vertes). Des coupes sagittales réalisées au niveau de la flèche en pointillée de la Fig. II.16A, ont permis de visualiser l'intérieur des microvillosités (Fig. II.16B). HcB est détectée à la surface des microvillosités (flèches noires, Fig II.16B) mais également à l'intérieur de celles-ci (flèches vertes, Fig II.16B).

HcB est également détectée à l'extérieur de la cellule, à proximité des vésicules d'endocytose en formation (figure 11B) et en intracellulaire (figure Fig. II.15A et Fig. II.15B). Il est intéressant de noter que HcB est détectée à la fois à l'intérieur de vésicules lisses d'endocytose (flèche orange, Fig. II.15A et Fig. II.17) mais également de manière libre dans le cytoplasme de la cellule (flèches noires, Fig. II.15A et Fig. II.17). HcB est détectée de façon majoritaire à la périphérie des vésicules d'endocytose et seule une faible quantité est détectée dans la lumière de la vésicule.

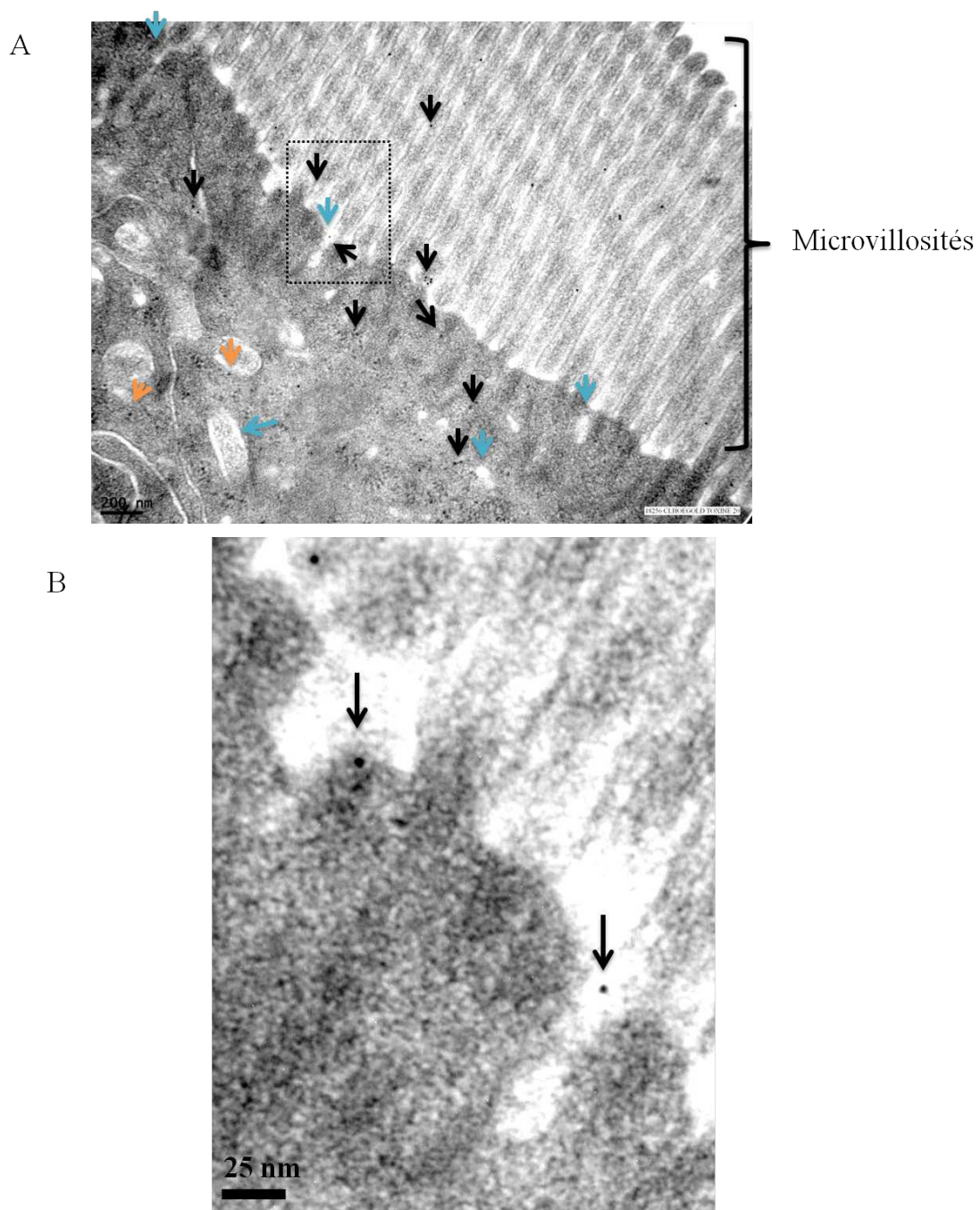


FIGURE II.15 – Liaison de HcB à la barrière épithéliale en microscopie électronique. La détection est réalisée à l'aide d'anticorps dirigés contre HcB couplés à des billes d'or. Les flèches bleues indiquent la localisation des vésicules d'endocytose de la cellule. Les flèches noires indiquent la présence de HcB détectée au niveau des microvillosités et dans le cytoplasme. Les flèches orange indiquent HcB détectée dans les vésicules d'endocytose. La figure B est un agrandissement de la figure A au niveau du rectangle.

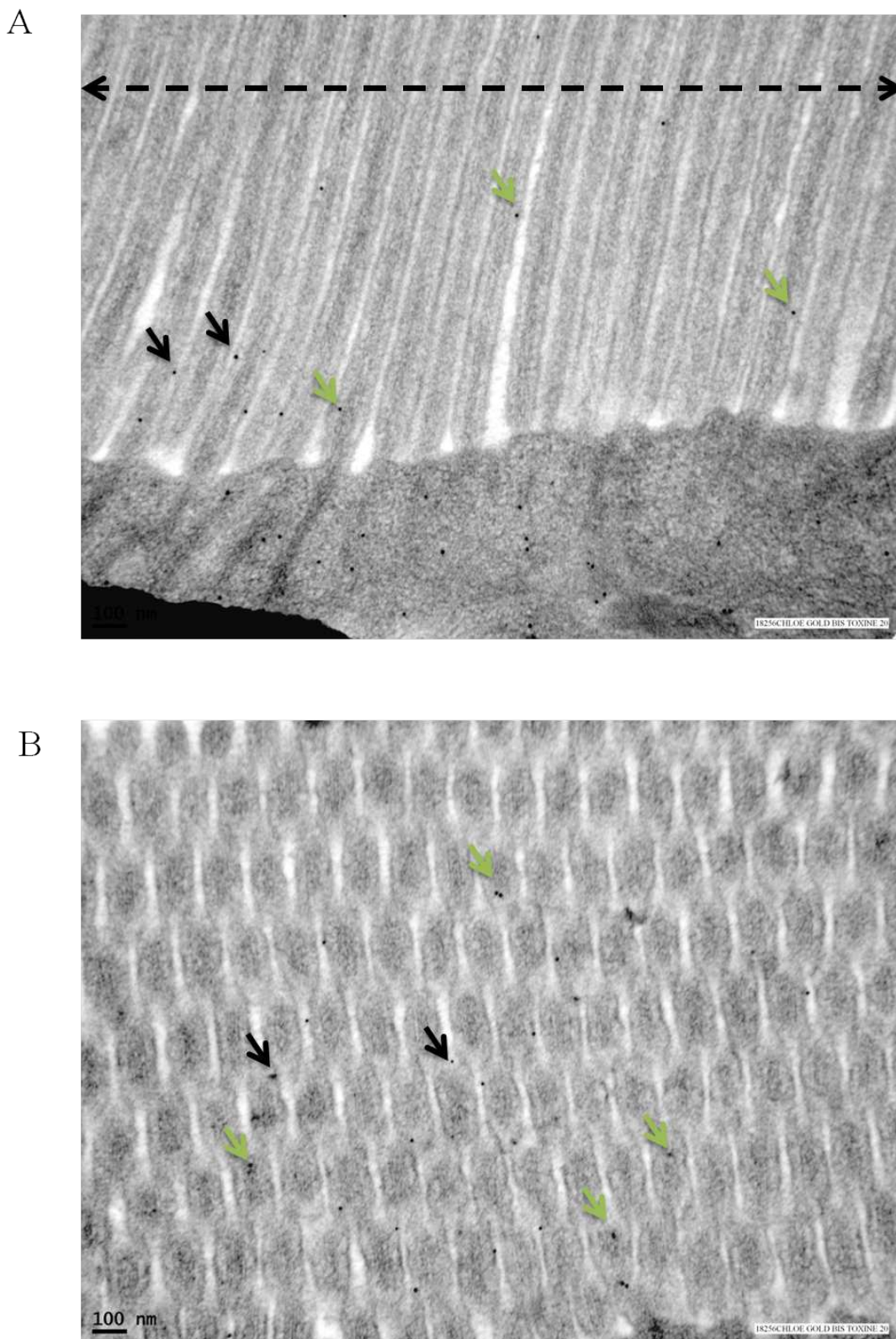


FIGURE II.16 – Liaison de HcB à la barrière épithéliale en microscopie électronique. La détection est réalisée à l'aide d'anticorps dirigés contre HcB couplés à des billes d'or. Les flèches noires indiquent les HcB détectés à la surface des microvillosités et les flèches vertes, ceux détectés à l'intérieur des microvillosités. La figure B est une image d'une coupe transverse (flèches noires) des microvillosités.

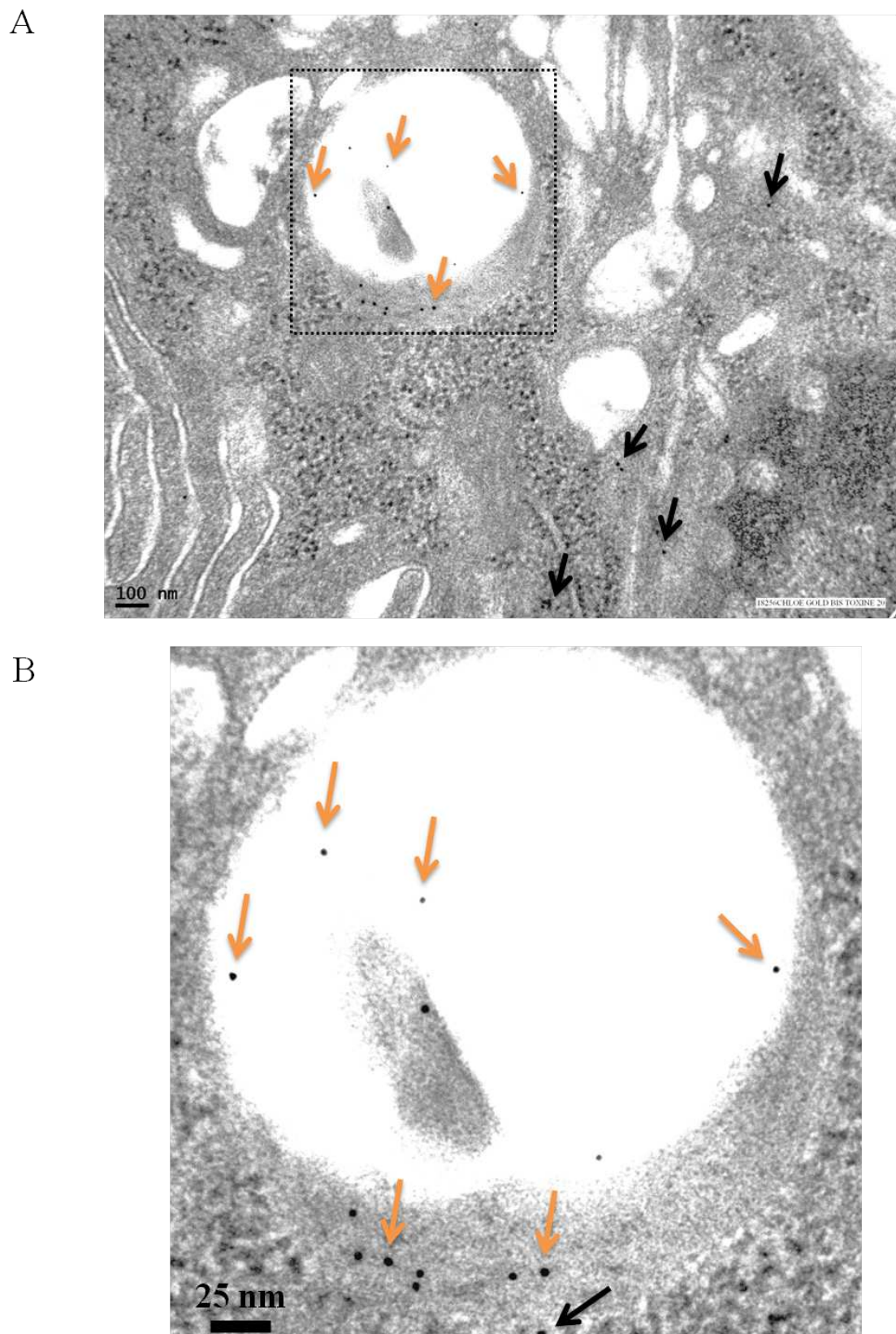


FIGURE II.17 – HcB est localisée dans des vésicules d'endocytose. La détection est réalisée à l'aide d'anticorps dirigés contre HcB couplés à des billes d'or. Les flèches noires indiquent les HcB détectés dans le cytoplasme. Les flèches orange, le HcB détecté dans les vésicules d'endocytose. La figure B est un agrandissement de la figure A au niveau du rectangle.

II.2.7 Nature des structures filamentaires reconnues par HcB

La seconde question porte sur la nature des structures filamentaires marquées par HcBCy3 observées dans la lamina propria, la sous-muqueuse et la musculature.

Comme décrit précédemment, les structures marquées dans la sous-muqueuse et la musculature ressemblent fortement à des plexus nerveux. Pour tester notre hypothèse, des coupes longitudinales d'intestin ont été marquées avec des anticorps dirigés contre les neurofilaments (NF) qui sont les filaments intermédiaires retrouvés spécifiquement dans les neurones.

Les structures marquées par le HcBCy3 corrélaient avec les structures marquées par les anticorps dirigés contre les NF (Fig. II.19A Fig. II.18). Une projection en Z permet d'avoir une vue d'ensemble de cette structure, située juste en dessous des cryptes dans la sous-muqueuse (Fig. II.18) et dans la musculature (Fig. II.19A). Les neurites peuvent être très longs et s'étendre horizontalement le long de la sous-muqueuse et de la musculature sur plusieurs micromètres, et verticalement en direction des cryptes. Les corps cellulaires des neurones ne sont pas immunoréactifs pour les NF.

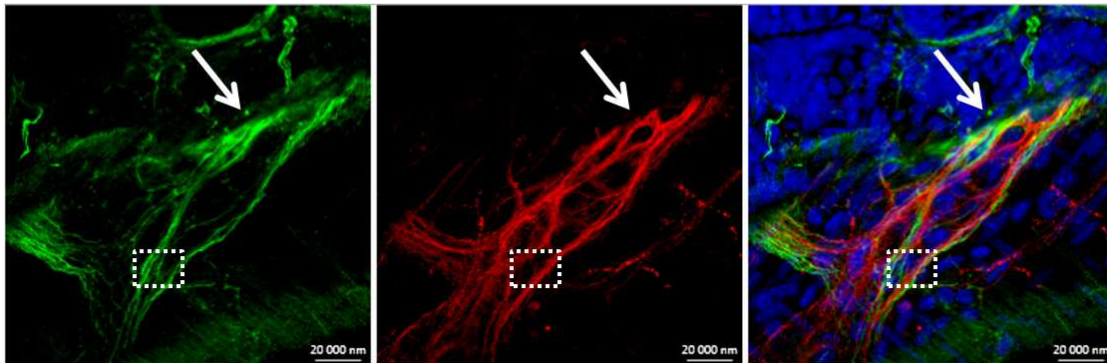
Un zoom numérique, réalisé sur la partie encadrée de ces images, permet de mieux identifier les structures marquées par HcBCy3 (Fig. II.19B et Fig. II.20B). HcBCy3 ne semble colocaliser que partiellement avec les structures immunoréactives pour les NF (Fig. II.18B et Fig. II.19B, flèches blanches). De plus, le marquage de HcBCy3 est diffus le long des neurites, (Fig. II.18B et Fig. II.19B). HcBCy3 cible donc des structures neuronales et ne colocalise que partiellement les marqueurs des NF (coefficient de Pearson 0,38 +/-0,06, JaCoP ImageJ, obtenu à partir de 10 échantillons).

Un autre marqueur spécifique des terminaisons axonales matures a également été étudié. Thy-1 (ou CD90) est une petite protéine (25-37 kDa) ancrée à la membrane par le GPI (Glycosylphosphatidylinositol). Cette protéine est impliquée dans de nombreux processus cellulaires dont la différenciation cellulaire, la migration et l'adhésion. Thy-1 est fortement impliquée dans la maturation des neurones et peut donc être utilisée comme marqueur des neurones matures [Kemshead 1982].

Des souris transgéniques pour Thy-1 nous ont été généreusement fournies par Jordi Molgo, dans lesquelles Thy-1 est fusionnée à la YFP (Yellow Fluorescent Protein) qui émet dans le vert (excitation à 514 nm, émission à 527 nm). Les expériences d'anses intestinales ligaturées ont été réalisées sur ces souris YFP en présence de HcBCy3 pendant 10 min. Les Fig. II.20A et Fig. II.21A montrent des projections de différents plans réalisées à partir d'images obtenues sur des coupes longitudinales d'intestin. Les structures marquées avec Thy-1 sont filamentaires et un marquage est détecté le long des neurites et au niveau des

corps cellulaires des neurones (Fig. II.21A). Le marquage de HcBCy3 ne colocalise que partiellement (coefficient de Pearson 0,2416 +/- 0,11, JaCoP ImageJ, obtenu à partir de 10 échantillons) avec les structures neuronales marquées par Thy-1 (Fig. II.20B et Fig. II.21B). Ceci indique que HcB cible certaines cellules neuronales, et son site de liaison est distinct des molécules de neurofilaments ou de Thy-1.

A



B

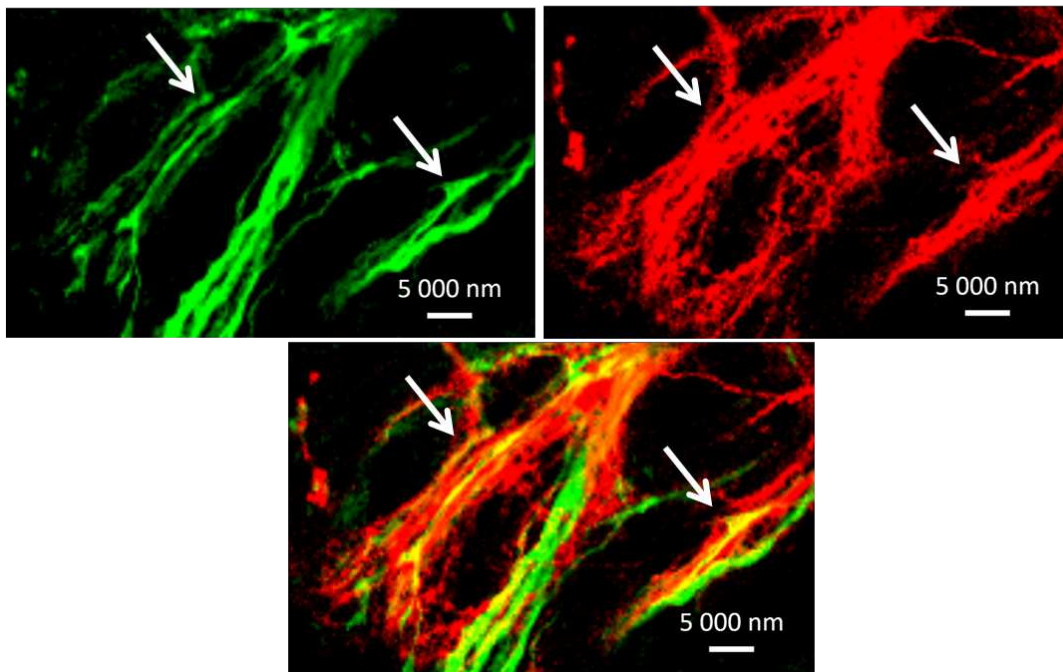


FIGURE II.18 – Image en microscopie à fluorescence des structures marquées par HcBCy3 (rouge) et immunoréactives pour les NF (vert) dans la sous-muqueuse après 10 min d’incubation (échelle indiquée sur chaque image). La figure A est une projection en Z de plusieurs tranches optiques (environ 20 tranches à 0,3 μm d’épaisseur) d’une fibre nerveuse. Les structures marquées par HcBCy3 et les NF sont corrélées mais ne colocalisent que partiellement. La figure B est un zoom numérique réalisé sur une tranche optique de la partie encadrée dans la figure A montrant la colocalisation partielle observée entre HcBCy3 et les structures immunoréactives pour les NF. Les noyaux ont également été marqués au Hoechst (bleu).

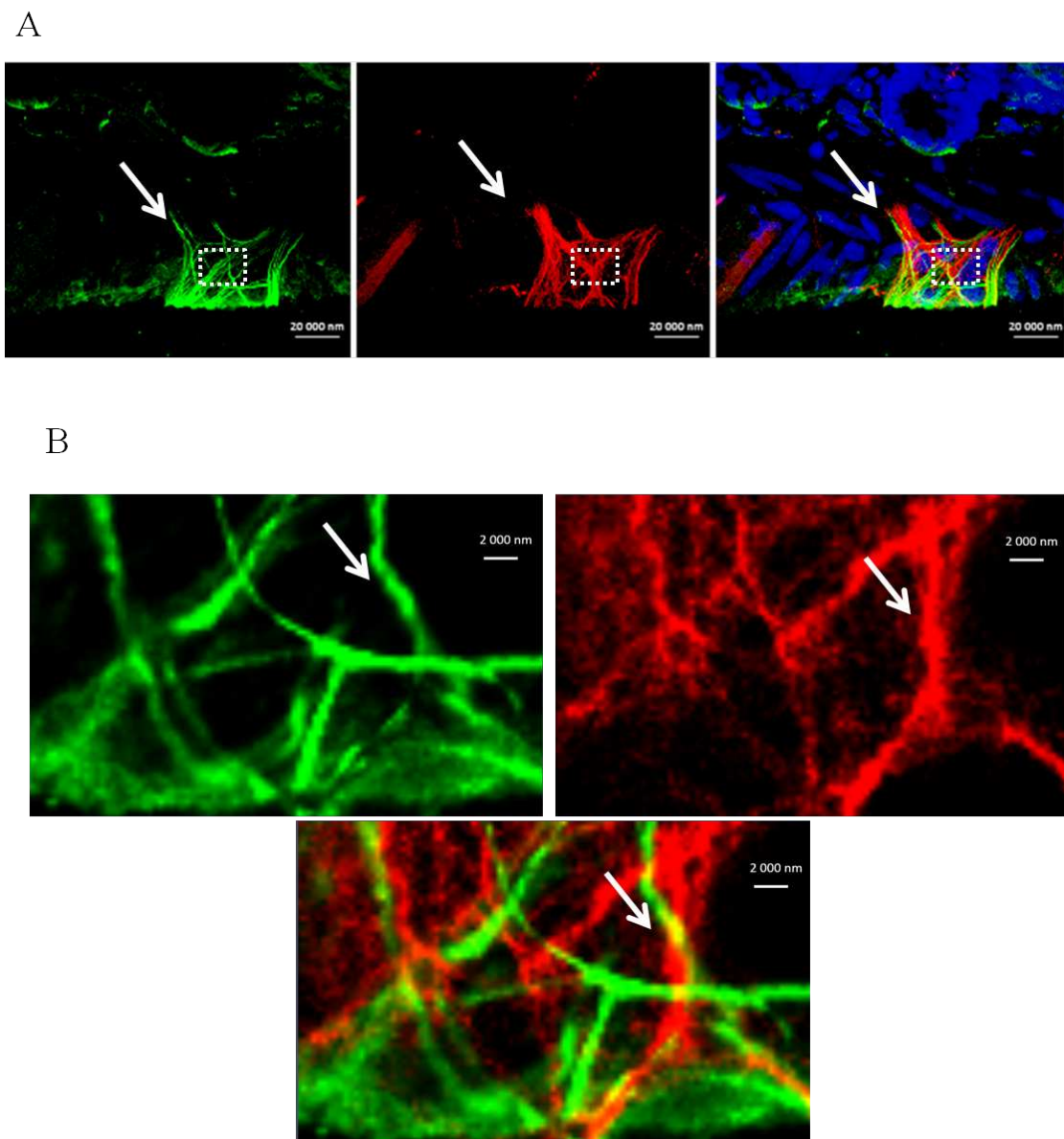
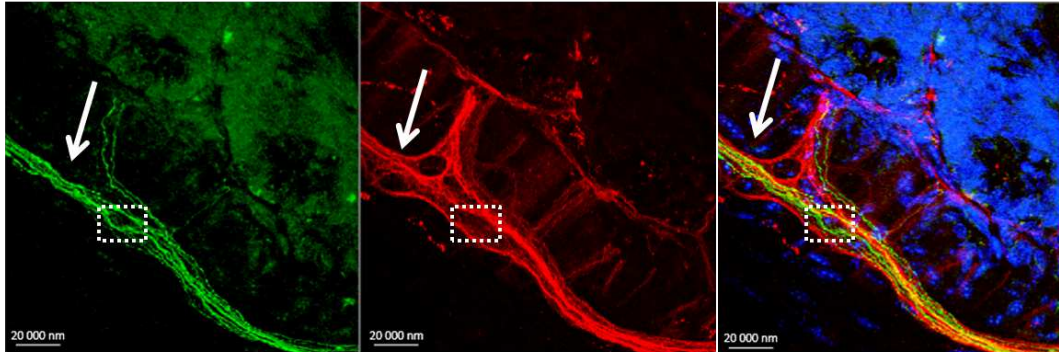


FIGURE II.19 – Image en microscopie à fluorescence des structures marquées par HcBCy3 (rouge) et des structures immunoréactives pour les NF (vert) dans la musculature après 10 min d'incubation (échelle indiquée sur chaque image). Voir légende Fig. II.18.

A



B

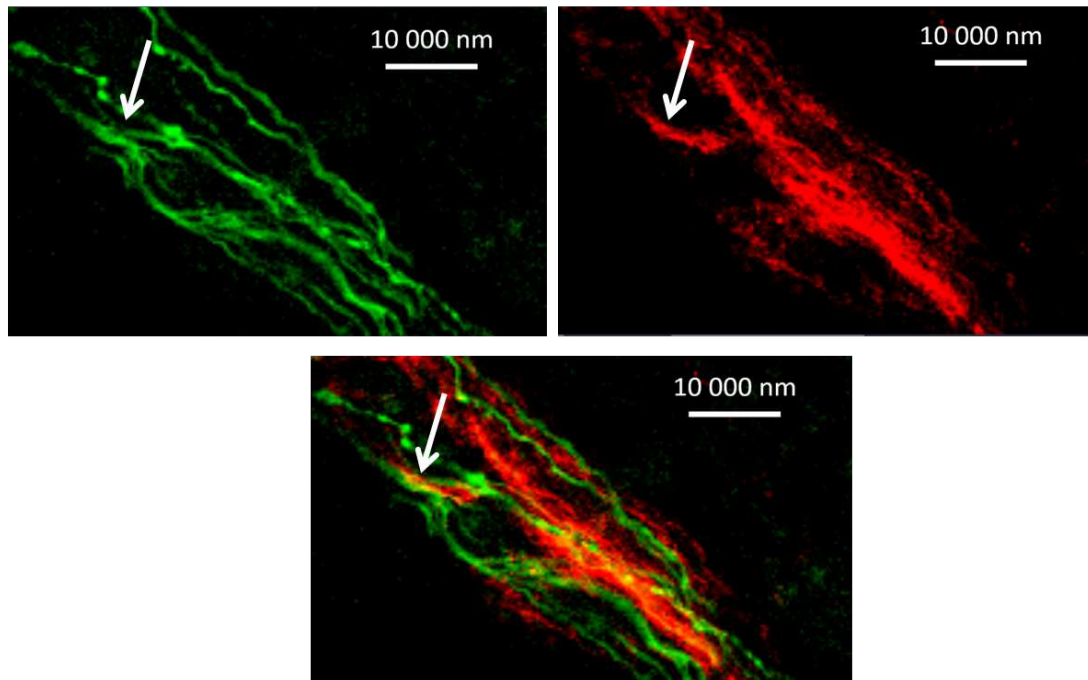
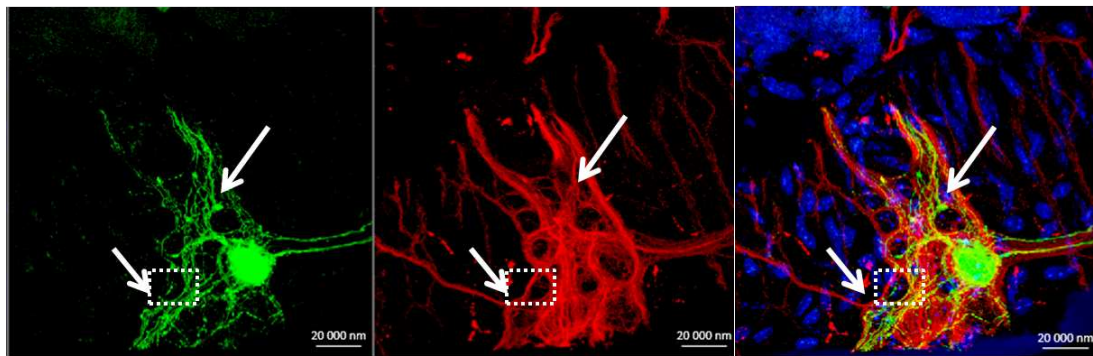


FIGURE II.20 – Image en microscopie à fluorescence des structures marquées par HcBCy3 (rouge) et des structures marquées par Thy-1 (vert) dans la sous-muqueuse et la musculature après 10 min d'incubation (échelle indiquée sur chaque image). La figure A est une projection en Z de plusieurs tranches optiques (environ 20 tranches à $0,3 \mu\text{m}$ d'épaisseur) et la figure B est un zoom numérique réalisé sur une tranche optique au niveau de la partie encadrée dans la figure A. Les noyaux ont également été marqués au Hoechst (bleu).

A



B

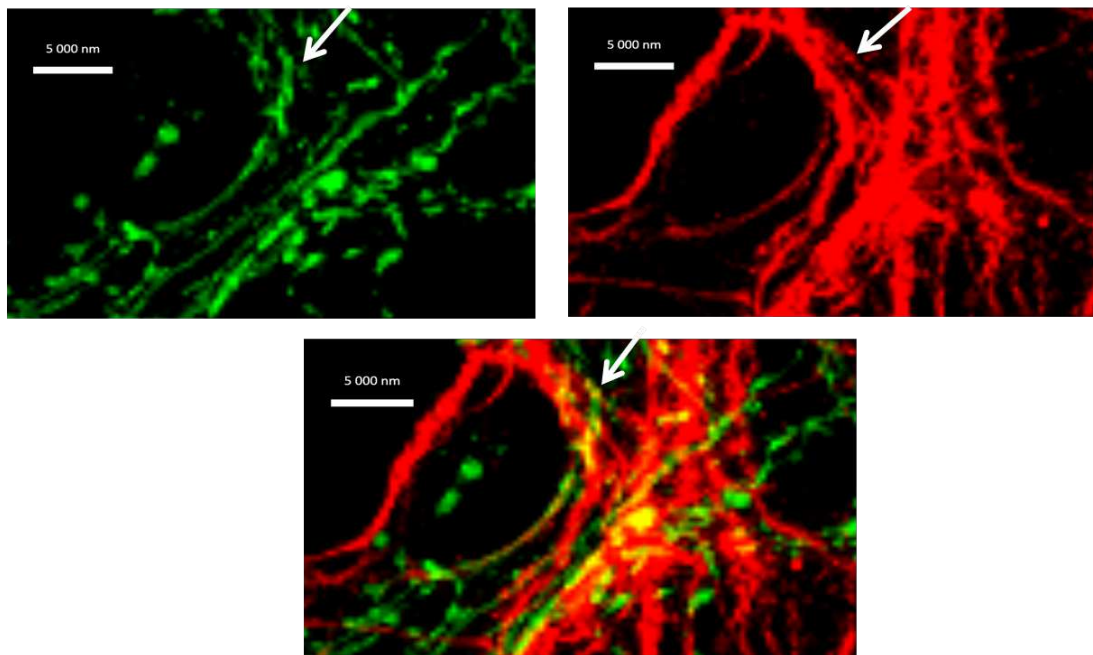


FIGURE II.21 – Image en microscopie à fluorescence des structures marquées par HcBCy3 (rouge) et des structures marquées par Thy-1 (vert) dans la sous-muqueuse et la musculuse après 10 min d'incubation (échelle indiquée sur chaque image). Voir figure légende figure 16.

II.2.8 Types de neurones reconnus par HcB

Le système nerveux entérique est constitué de neurones morphologiquement et fonctionnellement différents. Ces neurones sécrètent également des neurotransmetteurs variés (VIP, NOS, ChAT) et un type de neurone produit plusieurs neurotransmetteurs (voir III.3). Les neurones les plus représentés dans l'intestin sont les neurones non cholinergiques secrétomoteurs/ vasodilatateurs et les neurones cholinergiques secrétomoteurs qui représentent 45% et entre 29% et 33% respectivement de la totalité des neurones sous-muqueux. Le second groupe de neurones les plus représenté est constitué des IPANs myentériques (13% à 26% des neurone myentériques) et des neurones moteurs excitateurs des muscles longitudinaux (25% des neurones myentériques). Tous sauf les neurones non cholinergiques secrétomoteurs/ vasodilatateurs sécrètent la choline acétyltransférase (ChAT), enzyme qui permet la production d'acétylcholine à partir d'acétyl Co-A [Erickson 1994].

Dans un premier temps, des marquages ont été réalisés avec des anticorps dirigés contre ChAT. Comme attendu, une grande quantité de neurones sécrétant ChAT est détectée dans la sous-muqueuse et la musculuse. La totalité des neurones immunoréactifs pour ChAT a été comptabilisée et environ 80% des neurones immunoréactifs pour ChAT sont également marqués avec HcBCy3 (82,2% +/- 3,8%, résultats obtenus à partir de 10 échantillons). Ces neurones ont une morphologie filamentaire et sont regroupés en plexus dans la musculuse (Fig. II.22 et Fig. II.23), mais également dans la sous-muqueuse à proximité des cryptes (figure 18). Contrairement au marquage observé avec Thy-1 ou avec les anticorps dirigés contre les NF, un marquage plus diffus des structures immunoréactives pour ChAT à la fois sur les corps cellulaires des neurones mais également sur les neurites (Fig. II.22B et Fig. II.23B). Comme pour Thy-1 et les NF, HcBCy3 ne colocalise que partiellement avec le ChAT (Coefficient de Pearson 0,31 +/- 0,07, obtenu à partir de 10 échantillons).

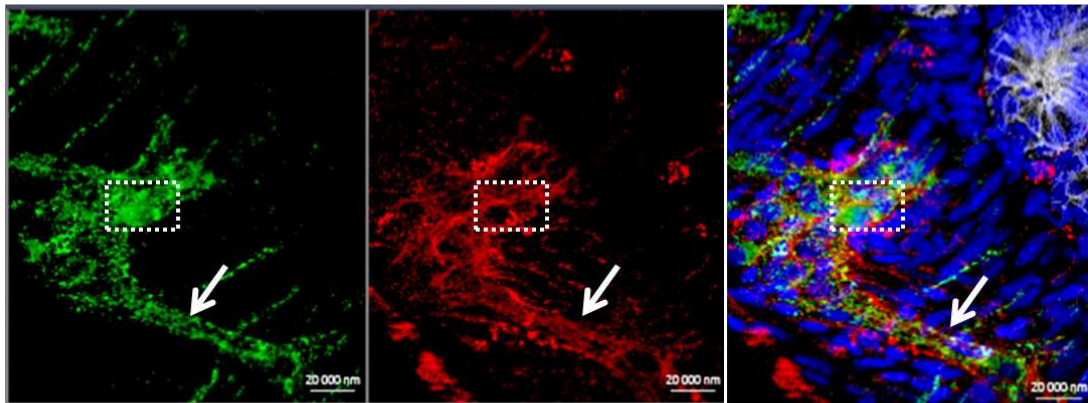
Des structures immunoréactives pour ChAT sont également observées dans la lamina propria et HcBCy3 colocalise partiellement avec ces structures (coefficient de Pearson 0,31 +/- 0,11, JaCoP Image J résultats obtenus à partir de 10 échantillons) (Fig. II.24 et Fig. II.25).

Les interneurones descendants (reflexes secréto-moteurs) sont des neurones qui sécrètent à la fois ChAT et la sérotonine. Ces interneurones représentent entre 2% et 20% de la totalité des neurones de l'intestin selon les études (voir tableau III.14 du chapitre III). La sérotonine ou 5-HT (5-hydroxytryptamine) est une monoamine qui joue un rôle de médiateur des fonctions sensorielles et motrices du tractus digestif. C'est également un puissant stimulateur intervenant dans la propagation des réflexes entériques.

Des marquages ont été réalisés avec des anticorps dirigés contre la sérotonine.

Contrairement aux neurones sécrétant la ChAT, un plus faible pourcentage des neurones immunoréactifs pour la sérotonine est marqué avec HcBCy3 (25,8% +/- 5,4%, résultats obtenus à partir de 10 échantillons). Une fois de plus, le même profil de marquage est observé. Les neurones ont une morphologie filamentaire et sont situés dans la musculature où ils sont regroupés en plexus (figure Fig. II.26A et Fig. II.27A) et présentent des extensions dans la sous-muqueuse (Fig. II.27A). La colocalisation avec HcB est également partielle avec un coefficient de Pearson de 0,259 +/- 0,09 (JaCoP Image J résultats obtenus à partir de 10 échantillons).

A



B

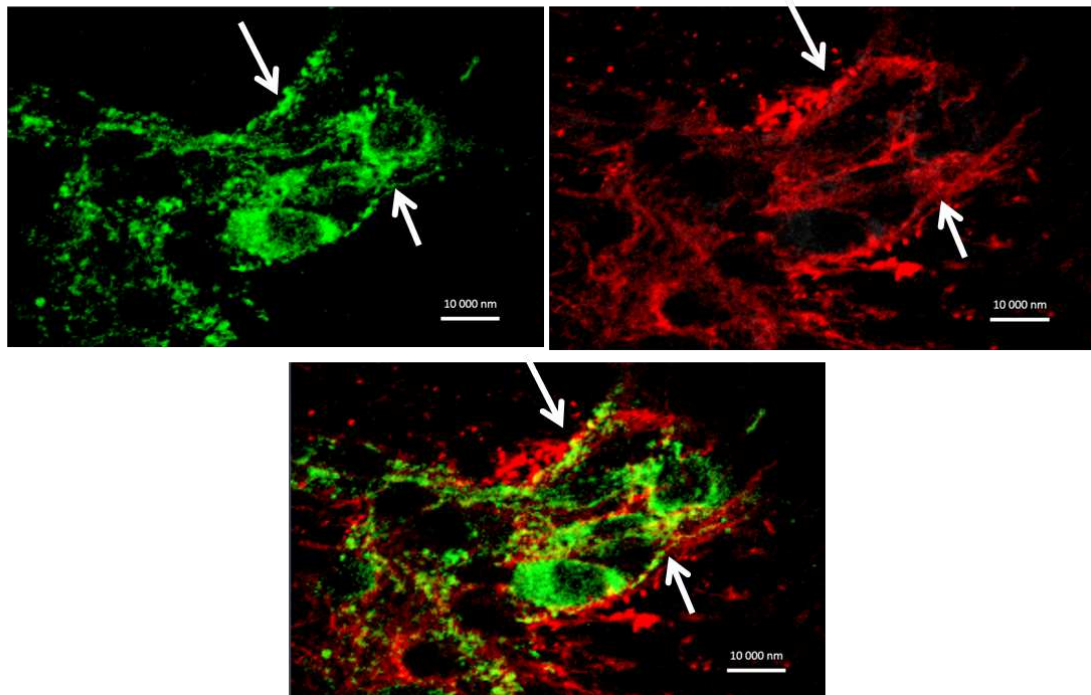


FIGURE II.22 – Image en microscopie à fluorescence des structures marquées par HcBCy3 (rouge) et des structures immunoréactives pour ChAT (vert) dans la sous-muqueuse et la musculature après 10 min d'incubation (échelle indiquée sur chaque image). La figure A est une projection en Z de plusieurs tranches optiques (environ 20 tranches à 0,3 μm d'épaisseur) et la figure B est un zoom numérique réalisé sur une tranche optique au niveau de la partie encadrée dans la figure A. Les noyaux sont marqués au Hoechst (bleu) et les membranes cellulaires, avec un anticorps dirigé contre la cadhérine E (ECCE2, blanc).

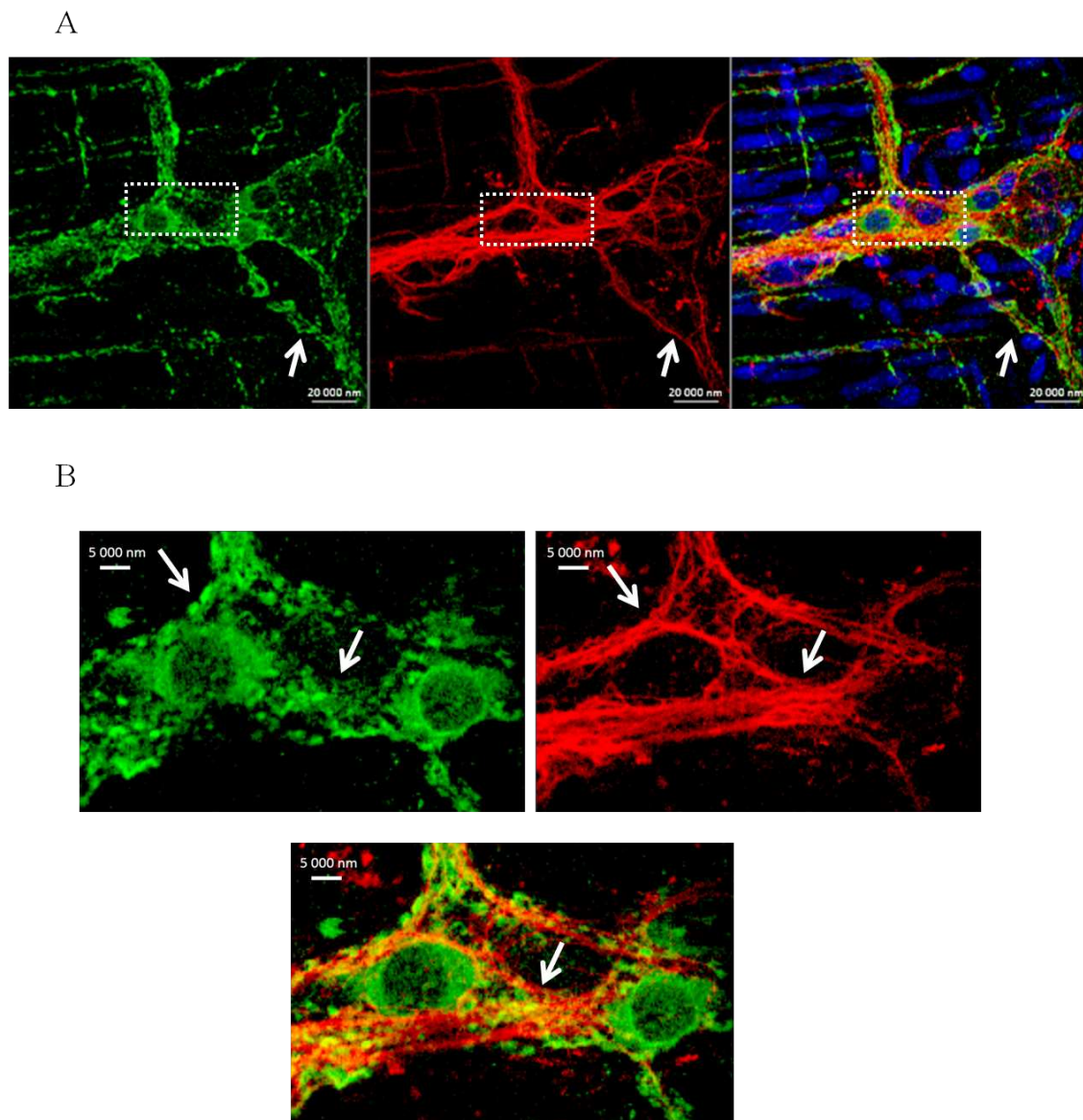
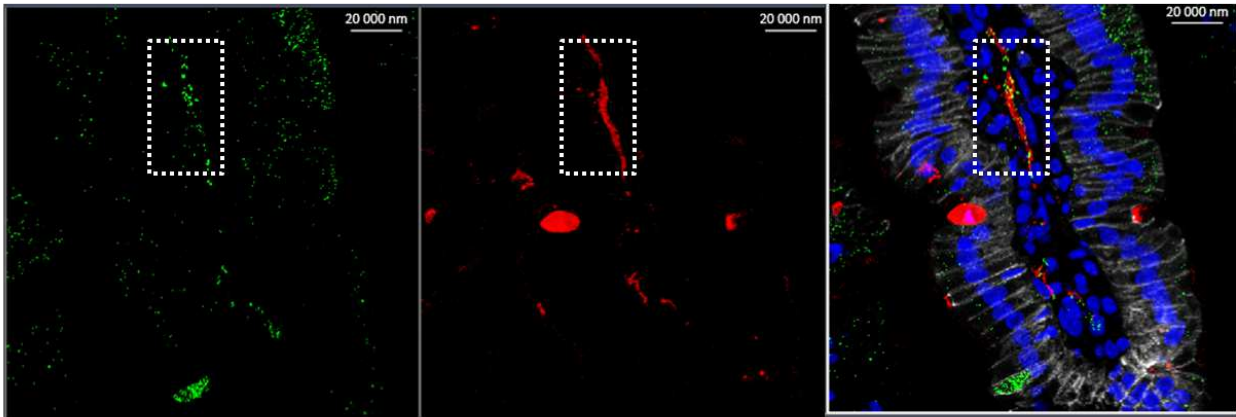


FIGURE II.23 – Image en microscopie à fluorescence des structures marquées par HcBCy3 (rouge) et des structures immunoréactives pour ChAT (vert) dans la sous-muqueuse et la musculature après 10 min d’incubation (échelle indiquée sur chaque image). Voir légende Fig II.22.

A



B

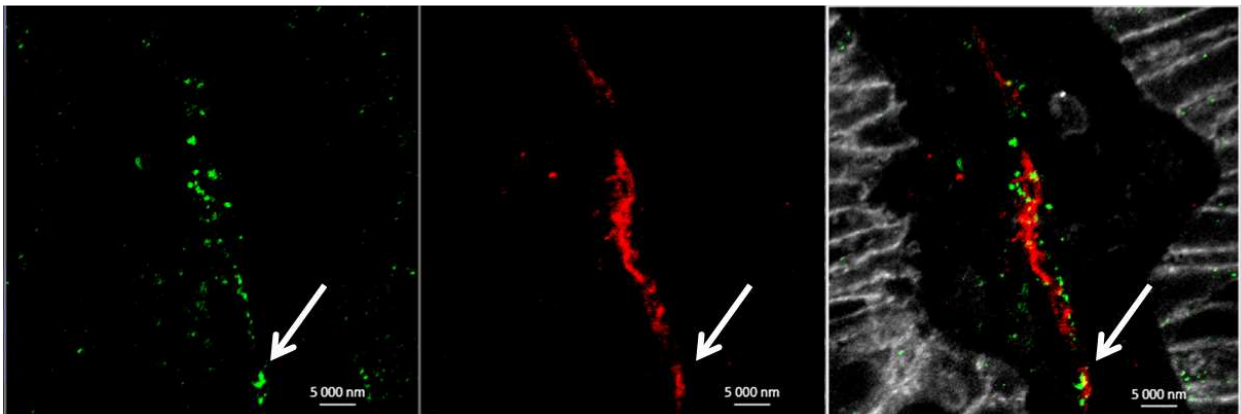


FIGURE II.24 – Image en microscopie à fluorescence des structures marquées par HcBCy3 (rouge) et des structures immunoréactives pour ChAT (vert) dans la lamina propria après 10 min d'incubation (échelle indiquée sur chaque image). La figure A est une projection en Z de plusieurs tranches optiques (environ 20 tranches à 0,3 μm d'épaisseur) et la figure B est un zoom numérique réalisé sur une tranche optique au niveau de la partie encadrée dans la figure A. Les noyaux ont également été marqués au Hoechst et les membranes cellulaires avec un anticorps dirigé contre la cadhérine E (ECCD2, blanc).

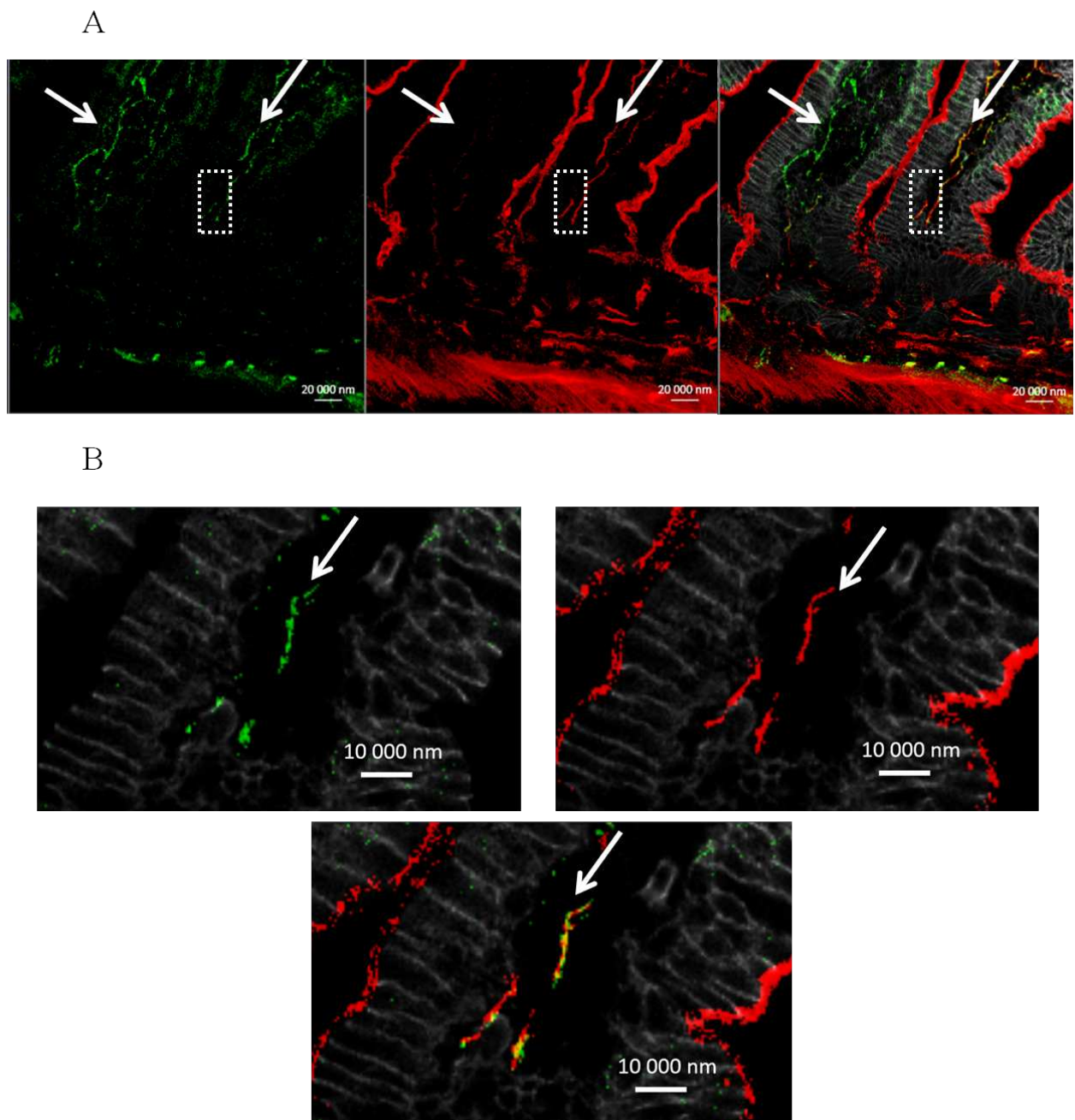
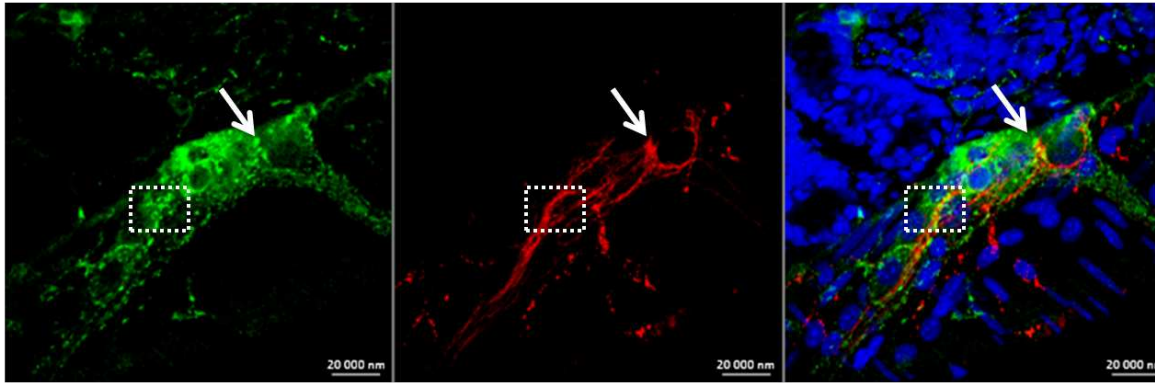


FIGURE II.25 – Image en microscopie à fluorescence des structures marquées par HcBCy3 (rouge) et des structures immunoréactives pour ChAT (vert) dans la lamina propria après 10 min d'incubation (échelle indiquée sur chaque image). Voir légende Fig. II.27.

A



B

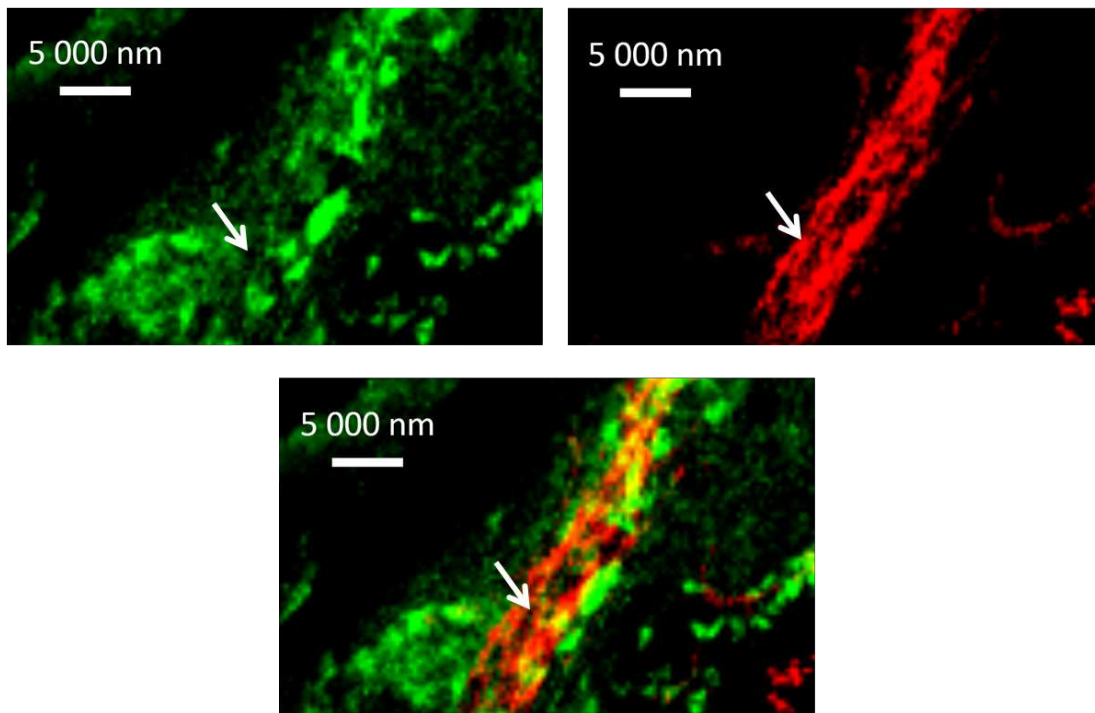


FIGURE II.26 – Image en microscopie à fluorescence des structures marquées par HcBCy3 (rouge) et des structures immunoréactives pour la sérotonine (vert) dans la sous-muqueuse après 10 min d'incubation (échelle indiquée sur chaque image). La figure A est une projection en Z de plusieurs tranches optiques (environ 20 tranches à $0,3 \mu\text{m}$ d'épaisseur) et la figure B est un zoom numérique réalisé sur une tranche optique au niveau de la partie encadrée dans la figure A. Les noyaux ont également été marqués au Hoechst.

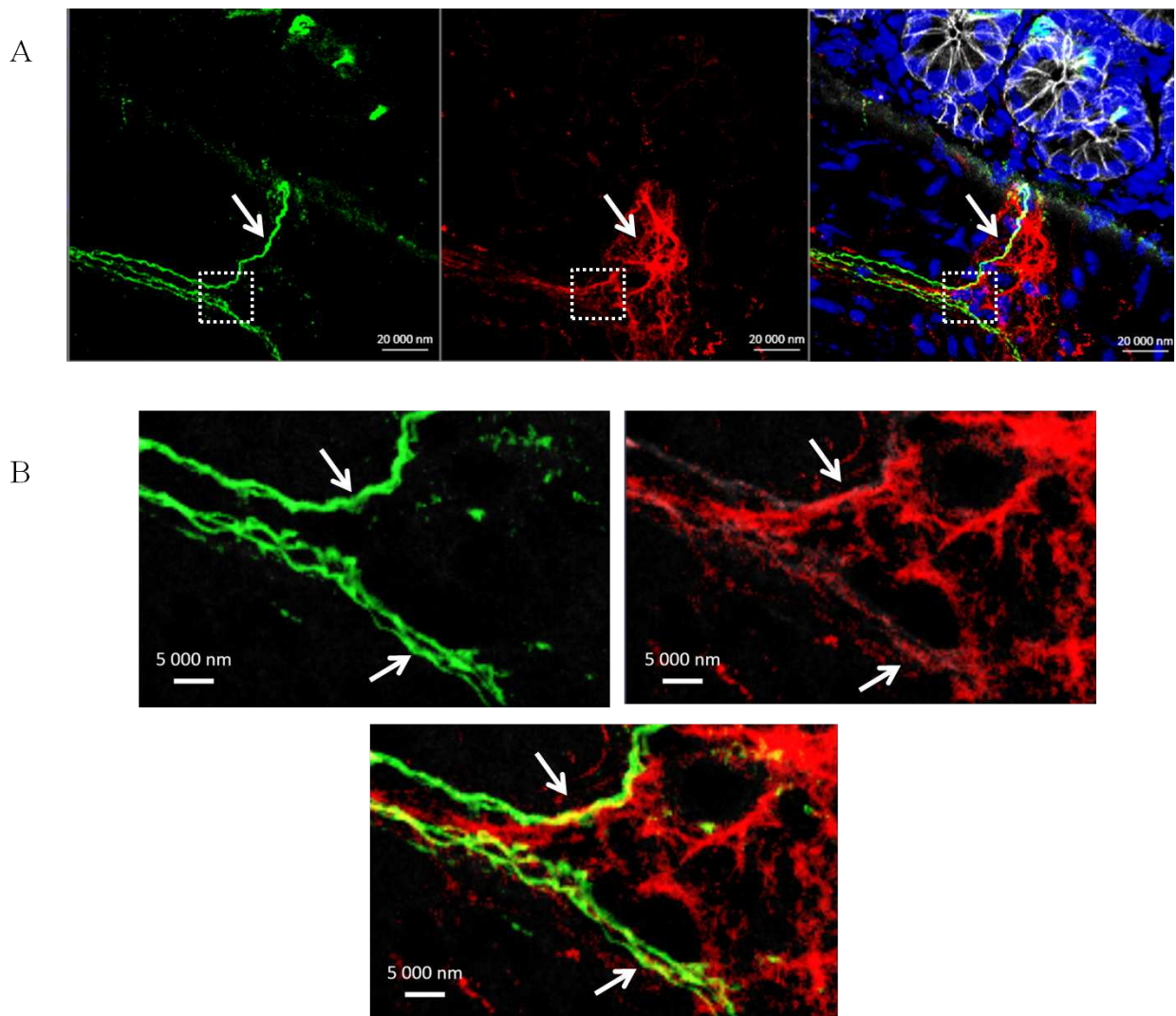


FIGURE II.27 – Image en microscopie à fluorescence des structures marquées par HcBCy3 (rouge) et des structures immunoréactives pour la sérotonine (vert) dans la musculature après 10 min d'incubation (échelle indiquée sur chaque image). Voir légende Fig. II.26.

II.2.9 Récepteurs cellulaires impliqués dans l'entrée de HcB

Les Syts sont des protéines senseurs de calcium transmembranaire servant de récepteurs protéiques aux BoNT/B, G et D/C. Il a été démontré que les Syt-I et II couplées aux gangliosides, permettent l'entrée de BoNT/B dans des cellules neuronales [Dong 2003] [Dong 2007]. Cependant, les récepteurs impliqués dans l'entrée de BoNT/B dans les cellules intestinales ne sont pas connus.

Les coupes intestinales de souris ont été marquées avec des anticorps dirigés contre Syt-II. Aucun marquage des cellules de villosité a pu être observé. Cependant, un fort marquage est détecté dans la sous-muqueuse et la musculuse au niveau des terminaisons nerveuses co-marquées avec Thy-1 (Fig. II.28 et Fig. II.29).

Les structures co-marquées avec HcBCy3 et la Syt-II semblent fortement colocaliser (Fig. II.28B et Fig. II.29B). Le coefficient de corrélation a été calculé et indiquent une forte corrélation entre ces deux marqueurs (coefficient de Pearson 0,511 \pm 0,11, obtenu à partir de 10 échantillons indépendants).

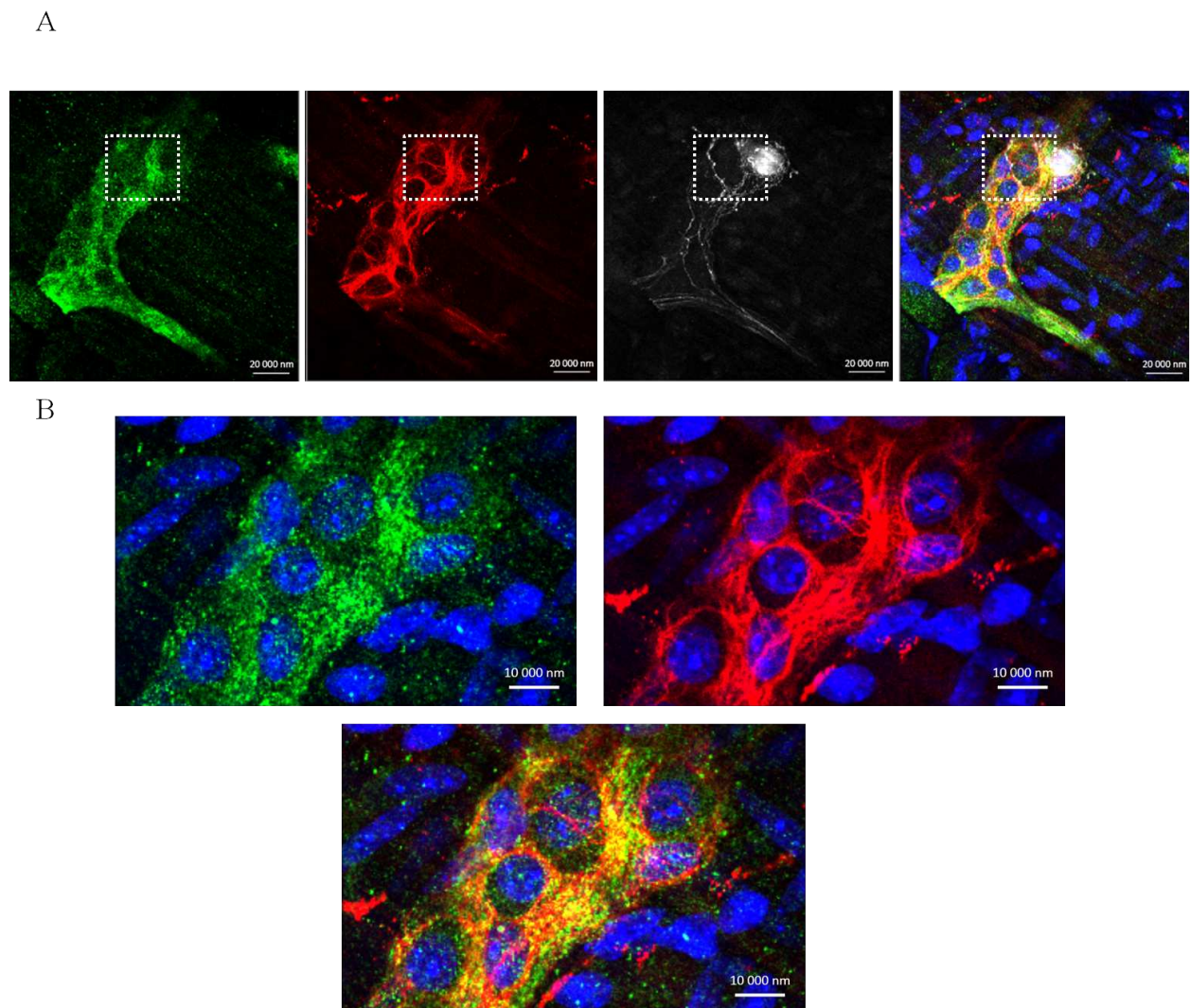


FIGURE II.28 – Image en microscopie à fluorescence des structures marquées par HcBCy3 (rouge), Thy-1 (en blanc) et des structures immunoréactives pour Syt-II (vert) dans la musculature après 10 min d'incubation (échelle indiquée sur chaque image). La figure B est un zoom numérique de la zone encadrée dans la figure A. Les noyaux ont également été marqués au Hoechst.

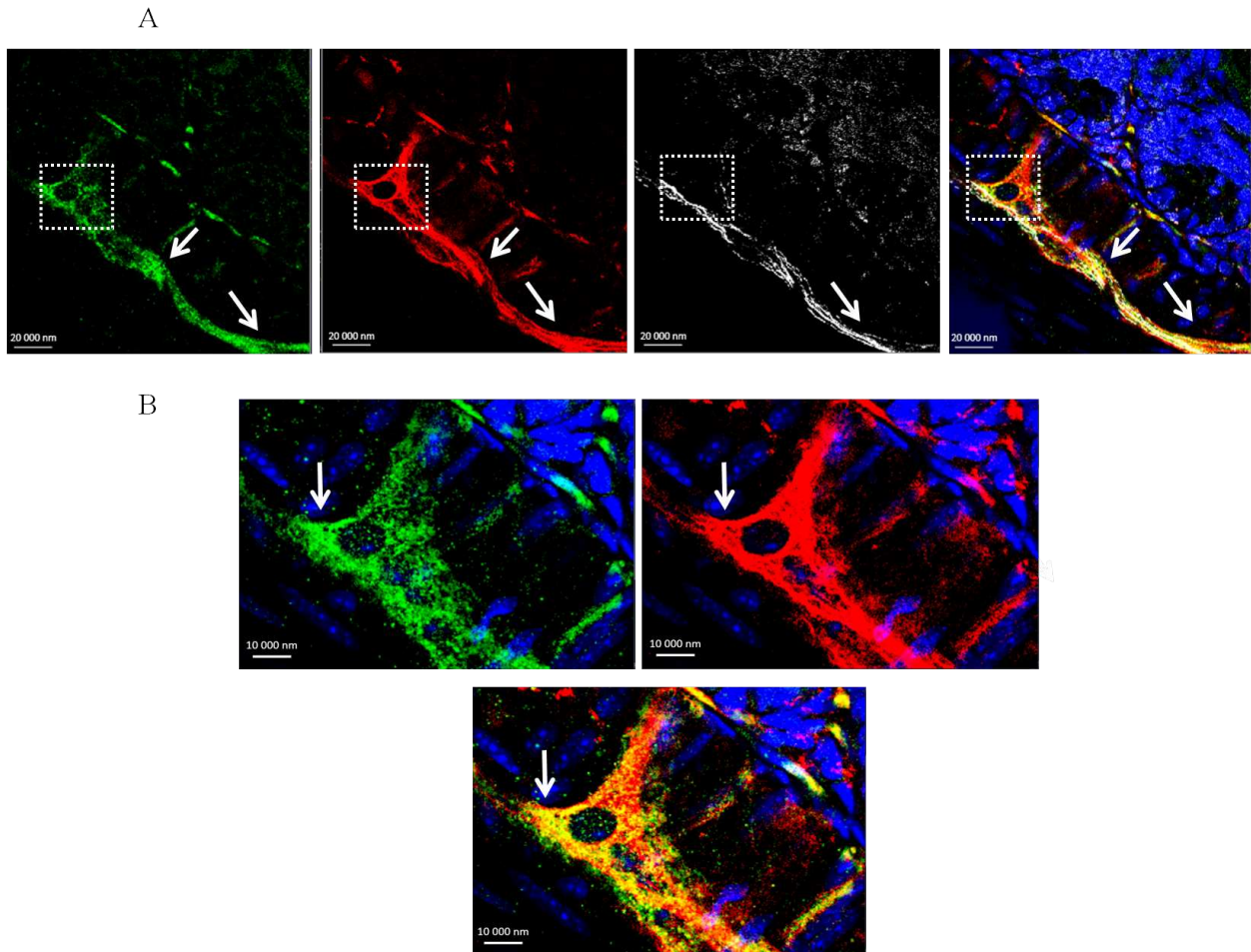


FIGURE II.29 – Image en microscopie à fluorescence des structures marquées par HcBCy3 (rouge), Thy-1 (en blanc) et des structures immunoréactives pour Syt-II (vert) dans la musculature après 10 min d'incubation (échelle indiquée sur chaque image). Voir légende Fig. II.28.

II.2.10 Discussion

Dans la plupart des formes naturelles de botulisme, la neurotoxine botulique transite par la voie digestive avant d'atteindre les cellules cibles qui sont les motoneurons. De nombreux travaux ont permis d'élucider le mécanisme d'action des neurotoxines clostridiennes sur la neurosécrétion [Poulain 2008]. Cependant, le passage de la barrière intestinale par les neurotoxines botuliques qui correspond à la première étape de l'intoxication, est encore très mal connu.

Les différentes techniques utilisées au cours de ce projet, microscopie en fluorescence, immunohistochimie et microscopie électronique, ont permis de caractériser une partie du trafic et des mécanismes impliqués dans l'entrée de BoNT/B dans la barrière intestinale. Dans cette étude, seul le fragment Hc de BoNT/B, responsable de la liaison et l'internalisation, a été utilisé.

Dans un premier temps, l'entrée de HcB dans la barrière épithéliale a été suivie en cinétique. HcBCy3 a été incubée pendant différents temps (5, 10 et 20 min) dans une anse intestinale ligaturée de souris et les résultats analysés en microscopie à fluorescence. Ces cinétiques ont permis de mettre en évidence que HcBCy3 s'accumule au niveau de la bordure en brosse des villosités et dans le fond des cryptes, puis pénètre dans la barrière intestinale pour rejoindre la sous-muqueuse et la musculuse (Fig. II.4 II.5 et II.6). L'entrée de HcB dans la barrière intestinale est un processus rapide (10 min), et pourrait expliquer la rapidité d'apparition des symptômes dans les cas d'intoxication alimentaire.

Il a été démontré que BoNT/A entre dans les cellules neuronales et intestinales par une voie dépendante de l'endocytose [Couesnon 2008]. Afin de déterminer si l'entrée de HcB est également dépendante de l'endocytose, la dynamine qui est impliquée dans de nombreuses voies d'endocytose, a été inhibée par l'ajout d'une drogue (Dynasore). Après 10 min d'incubation de HcBCy3 et en présence de Dynasore, seul un faible marquage est observé dans la sous-muqueuse et dans la musculuse indiquant que HcB traverse la barrière épithéliale intestinale par une voie d'endocytose dépendante de la dynamine (Fig. II.7 et II.9).

Toutefois, BoNT/A, une fois injectée dans une anse intestinale ligaturée de souris, est capable d'induire des effets locaux sur l'intestin, diminuant les contractions spontanées et évoquées de 50% en 2 h [Couesnon 2012]. Ainsi, les mêmes expériences devront être réalisées avec BoNT/B afin de déterminer si l'inhibition de l'entrée de HcB par le Dynasore est confirmée à un niveau fonctionnel et abolie les symptômes de paralysie.

L'endocytose est le processus par lequel une cellule internalise des cargos du milieu extérieur vers le milieu intracellulaire. Nous avons donc cherché à identifier les cellules

impliquées dans l'entrée de HcB dans la barrière intestinale. A 5 et 10 min d'incubation de HcB dans l'anse intestinale ligaturée de souris, seules quelques cellules localisées au niveau de l'épithélium des villosités sont fortement marquées avec HcBCy3 (Fig. II.4 et II.5). Ces cellules pourraient permettre l'entrée de HcB dans la barrière intestinale et nous avons donc cherché à identifier le type cellulaire auquel appartiennent ces cellules. Pour cela, des marquages ont été réalisés pour détecter les différents types cellulaires de la muqueuse intestinale. Des marqueurs des cellules de Paneth, des cellules caliciformes ainsi que des autres types cellulaires décrits dans la littérature localisés dans la muqueuse ont été testés pour leur co-marquage avec HcB (Fig. II.10 II.11 II.12 et II.13). Aucun de ces marqueurs n'a permis d'identifier le type cellulaire auquel appartiennent ces cellules et pour lesquelles HcB semble avoir un fort tropisme. A la différence de HcB, il a été démontré que HcA rentre dans la barrière intestinale préférentiellement par des cellules neuroendocrines localisées dans les cryptes [Coesnon 2012]. Il semble donc que HcA et HcB entrent dans la barrière intestinale par des cellules différentes.

De façon complémentaire, la répartition de HcB dans les cellules intestinales a été analysée en immunohistochimie. Pour cette expérience, le fragment HcB non marqué a été injecté dans une anse intestinale ligaturée de souris. La détection a ensuite été réalisée à l'aide d'un anticorps polyclonal immunopurifié dirigé contre HcB. Cette technique, plus sensible, a permis de détecter HcB dans de nombreuses cellules de l'épithélium des villosités, répartis le long de la villosité et pouvant correspondre à des entérocytes, cellules spécialisées dans l'absorption (Fig. II.14). Pour étayer notre hypothèse, des analyses en microscopie électronique ont été également réalisées. Cette étude a permis de mettre en évidence que HcB est capable de rentrer dans des cellules présentant à leur pôle apical des microvillosités qui est la caractéristique morphologique principale des entérocytes.

Les analyses réalisées en microscopie électronique ont également permis de mettre en évidence que HcB est localisée en intracellulaire de façon libre, ou enfermée dans des vésicules d'endocytose lisse (Fig. II.16 et II.18). De plus, HcB est observée à la surface et à l'intérieur des microvillosités (Fig. II.17). Il est donc possible que HcB soit endocytée dans des vésicules d'endocytose desquelles une partie serait libérée dans le cytoplasme. Une autre hypothèse serait qu'une partie de HcB soit endocytée au pôle apical de la cellule et qu'une autre partie transite par les microvillosités pour atteindre le milieu intracellulaire sans passer par une voie d'endocytose, ce qui pourrait expliquer la présence de HcB dans le cytoplasme.

Une fois la barrière épithéliale franchie, HcB rejoint la sous-muqueuse et la musculature rapidement, après seulement 10 minutes d'incubation, et cible des terminaisons nerveuses présentes dans ces deux structures (Fig. II.21 et II.24). Ce marquage dans la sous-muqueuse

et la musculature a également été observé dans les expériences réalisées avec HcA après une heure d'incubation dans un anse intestinale [Coesnon 2012]. Cette différence dans la cinétique d'entrée des Hcs peut s'expliquer par les différences de modèles expérimentaux utilisés. En effet, les expériences réalisées avec HcA ont été réalisées *ex vivo*, et ne reflètent peut être pas la cinétique d'entrée des BoNTs dans les conditions physiologiques. Toutefois, un possible effet des anesthésiants ne peut pas non plus être négligé dans le modèle expérimental utilisé dans cette étude.

Les BoNTs agissent spécifiquement sur les protéines SNAREs des terminaisons nerveuses des motoneurons et inhibent la libération de neurotransmetteurs. Les types neuronaux sont variés dans la barrière intestinale, et diffèrent morphologiquement et fonctionnellement en fonction des neurotransmetteurs qu'ils libèrent [Jackie D. Wood 2011]. Nous avons donc cherché à identifier les cibles neuronales préférentielles de HcB dans la barrière intestinale.

L'acétylcholine est un neurotransmetteur qui joue un rôle majeur dans l'activité musculaire. Exceptés les neurones moteurs inhibiteurs des muscles longitudinaux et circulaires, ainsi que les neurones non cholinergiques sécrète-moteurs/ vasodilatateurs, tous les autres types neuronaux du SNE sécrètent l'acétylcholine [Furness 2004]. Afin de savoir si HcB cible des neurones acétylcholinergiques dans la barrière intestinale, des anticorps dirigés contre la ChAT ont été utilisés sur les coupes intestinales. Environ 80% des neurones marqués avec HcBCy3 sont également immunoréactifs pour ChAT. Des résultats similaires ont également été obtenus avec HcA (Fig. II.25 et II.26) [Coesnon 2012]. De plus, des terminaisons nerveuses immunoréactives pour ChAT, observées dans la lamina propria, sont également marquées avec HcBCy3 (Fig. II.27 et II.28). Ces terminaisons nerveuses peuvent correspondre à des extensions des IPANs sous-muqueux ou myentériques, neurones initiateurs des réflexes entériques, ou aux neurones cholinergiques sécrétomoteurs [John Barton Furness 2006].

Toutefois, toutes les terminaisons nerveuses marquées par HcB ne sont pas immunoréactives pour ChAT. Un autre neurotransmetteur important dans le fonctionnement du tractus digestif est la sérotonine ou 5-HT. Ce neurotransmetteur est fortement impliqué dans les réflexes entériques et joue un rôle majeur dans la propagation du péristaltisme. Ce neurotransmetteur est sécrété par une faible population de neurones du SNE (entre 2 et 20%) [Epstein 1996]. L'un des symptômes couramment rencontré dans les cas de botulisme est un ralentissement du transit digestif. Environ 25% des neurones immunoréactifs pour la sérotonine était marqué avec HcB (Fig. II.26 et II.27) alors que seule une très faible quantité de neurones immunoréactifs pour la sérotonine était marquée avec HcA [Coesnon 2012]. Le ciblage des neurones sérotoninergique pourrait être à l'origine des symptômes de constipation rencontrés dans les cas de botulisme. Toutefois, il est possible que

les neurones sérotoninergiques joue un rôle dans la dissémination des BoNTs dans l'organisme en servant de transporteur.

L'effet de BoNT/B sur les neurones sérotoninergiques n'est pas connu. Les neurones sérotoninergiques représentent-ils des cellules cibles pour BoNT/B ou jouent-ils un rôle de relais favorisant le transport de BoNT/B aux neurones cibles cholinergiques ?

HcB pourraient également cibler d'autres types de neurones tels que les neurones inhibiteurs des muscles longitudinaux et circulaires. Ces neurones secrètent d'autres neurotransmetteurs que ceux analysés dans cette étude (GABA et VIP entre autres). Des expériences complémentaires seront donc nécessaires afin d'évaluer les cibles neuronales préférentielles de HcB.

L'entrée des BoNTs dans les cellules neuronales implique, pour la majorité des types, un double récepteur comprenant un récepteur de faible affinité, les gangliosides, et un récepteur de forte affinité, une protéine des vésicules synaptiques. La Syt-II est la protéine réceptrice pour l'entrée de BoNT/B dans les cellules neuronales mais le ou les récepteurs impliqués dans l'entrée de BoNT/B dans les cellules intestinales n'est pas connu. [Dong 2003] [Dong 2006]. Afin de déterminer si l'entrée de HcB dans la barrière intestinale est dépendante de la Syt-II, un marquage à l'aide d'anticorps dirigés contre la Syt-II a été réalisé sur des coupes intestinales. Alors qu'aucun marquage n'a été observé dans les cellules des villosités, un fort marquage des terminaisons nerveuses est observé dans la sous-muqueuse et la musculuse (Fig. II.28 et II.29). La Syt-II ne semble donc pas être le récepteur impliqué dans l'entrée de HcB dans les cellules épithéliales de la muqueuse, mais est bien impliquée dans l'entrée dans les cellules neuronales compte tenu du fort taux de colocalisation observé entre ces 2 marqueurs dans ces structures (coefficient de Pearson 0,511).

Ainsi, ces résultats montrent que HcB, une fois endocytée au niveau de l'épithélium des villosités, certainement par des entérocytes, rejoint le pôle baso-latéral de la cellule pour être délivrée à la lamina propria. HcB pénètre alors dans les terminaisons nerveuses acétylcholinergiques, de type IPAN ou secrétomoteurs, de la lamina propria et transite jusqu'au terminaisons nerveuses acétylcholinergiques et sérotoninergiques présentes dans la sous-muqueuse et la musculuse. Ce processus est rapide, 10 min, et pourrait expliquer la rapidité d'apparition des symptômes du botulisme.

Des expériences préliminaires sont en cours afin de déterminer les caractéristiques d'entrée de HcA et de HcE dans ce modèle d'étude. Une comparaison des mécanismes impliqués dans l'entrée des différents types de BoNTs induisant le botulisme humain, devrait permettre de comprendre les différences observées dans l'épidémiologie de cette maladie.

II.3 Résultats expérimentaux modèle *in vitro* : Caractérisation des mécanismes moléculaires d'entrée des BoNTs dans les cellules intestinales

II.3.1 Les lignées cellulaires comme modèle d'étude

Pour la suite de notre étude, des mécanismes moléculaires impliqués dans la voie d'entrée d'HcB, un modèle *in vitro* de lignée cellulaire a été utilisé. Un grand nombre de techniques moléculaires mais également de drogues sont disponibles pour inhiber (siRNA, dominant négatif) ou augmenter l'expression de protéines impliquées dans différentes voies de signalisation cellulaire, telles que les protéines impliquées dans les voies d'endocytose ou le trafic intracellulaire. Ainsi contrairement au modèle *in vivo*, l'utilisation de lignées cellulaires permet d'accéder et de modifier les mécanismes moléculaires propres de la cellule.

Deux types de lignées cellulaires sont disponibles pour notre étude. Une lignée cellulaire neuronales (NG108-15), issue d'une fusion entre un neuroblastome de souris et un gliome de rat, et une lignée cellulaire intestinale (m-IC_{cl2}) qui maintient un phénotype de cellules de cryptes (voir Fig II.30).

Des expériences comparatives ont été réalisées précédemment au sein du laboratoire afin de déterminer la lignée cellulaire intestinale la plus appropriée pour étudier l'entrée des BoNTs. Cette étude, réalisée sur monocouche de cellules, a montré que le taux d'entrée de BoNT/A était plus important dans les m- IC_{cl2} que dans les cellules Caco-2 (cellules épithéliales de colon). Nous avons choisi d'effectuer les expériences sur l'entrée de HcB sur les m- IC_{cl2} afin de faciliter la comparaison des voies d'entrée entre ces deux types de toxines.

L'entrée de HcB a également pu être testée sur des neurones primaires provenant du cortex de souris généreusement fournies par Sandrine Vitry. La Fig II.30 montre des images obtenues sur des neurones primaires après incubation de HcBCy3 pendant 10 min à 37°C. Le marquage HcBCy3 est détecté de façon homogène au niveau des neurites et des corps cellulaires (Fig II.30, flèches blanches). Bien que ces cellules constituent un bon modèle d'étude pour l'entrée des BoNTs, leur isolement est difficile à réaliser et leur maintien en culture impossible.

Pour la suite de l'étude, nous utiliserons les deux lignées cellulaires, NG108-15 et m-IC_{cl2}.

Les récepteurs permettant l'entrée de BoNT/A, BoNT/B et BoNT/E dans les cellules neuronales ont été identifiés. Ils impliquent des gangliosides de la famille GT1b/GD1b ainsi

que des protéines des vésicules synaptiques, SV2 pour BoNT/A et BoNT/E et Syt-I et, en plus forte proportion, Syt-II pour BoNT/B [Dong 2008][Dong 2003].

L'entrée de BoNT/A dans les cellules intestinales semble également nécessiter SV2C et les gangliosides de la famille GT1b et GD1b [Coesnon 2012]. Cependant, aucune donnée n'est disponible concernant l'entrée de BoNT/B et des autres types de toxines dans les cellules intestinales.

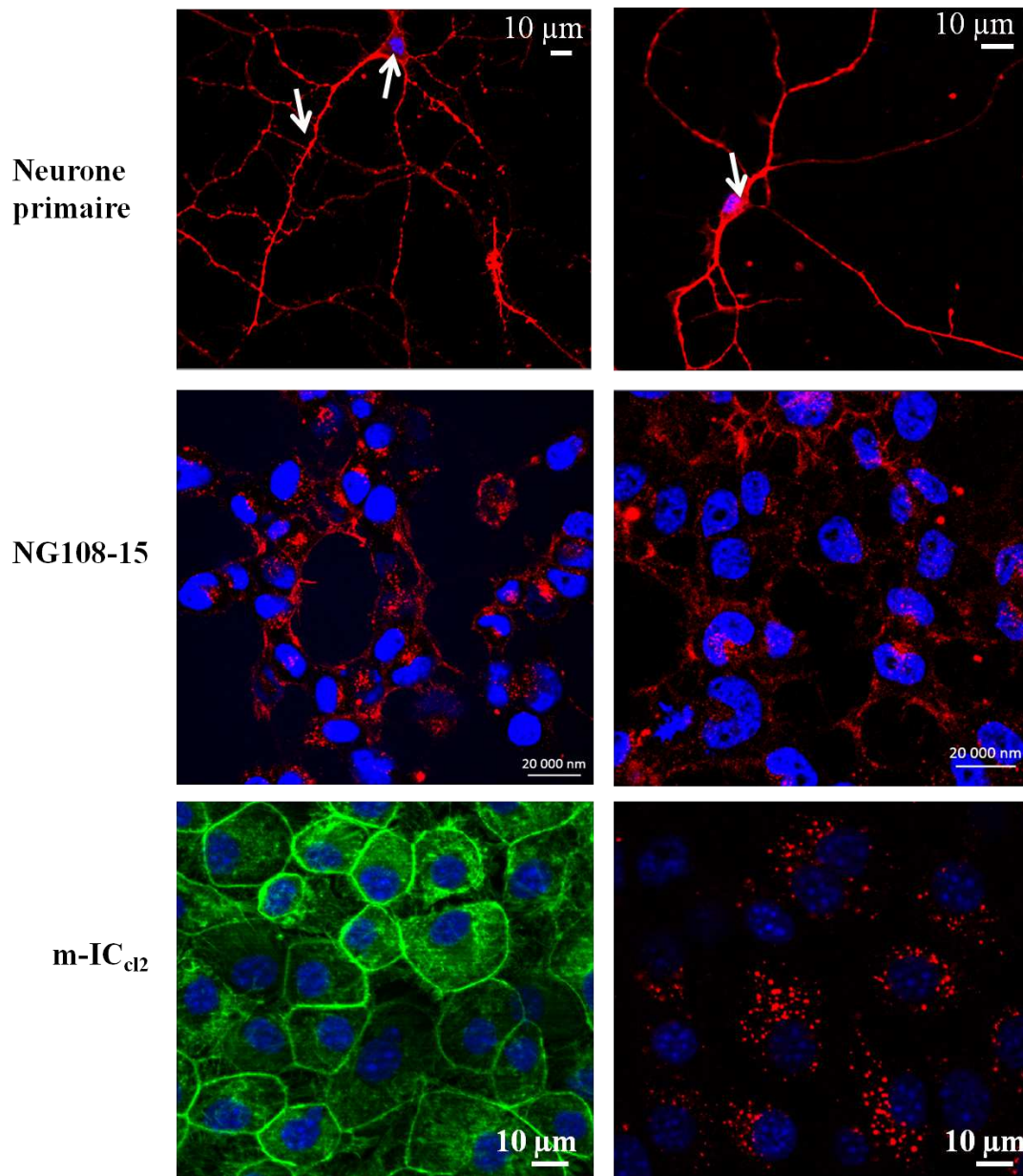


FIGURE II.30 – Image en microscopie à fluorescence de neurones primaires de cortex de souris, de cellules NG108-15 et m-IC_{cl2} traitées avec HcBCy3 (rouge), après 10 min d'incubation à 37°C. HcBCy3 marque de manière homogène les neurites et les corps cellulaires des neurones primaires alors que HcBCy3 est majoritairement localisé en périnucléaire dans les NG108-15 et les m-IC_{cl2}. Les images sont des projections en Z de plusieurs tranches optiques afin de visualiser l'intégralité de la cellule. Un marquage à la phalloïdine (vert) des m-IC_{cl2} a été réalisé afin de mieux visualiser la morphologie de ces cellules.

II.3.2 Effet des gangliosides sur l'entrée de HcB

Dans un premier temps, des essais de compétition ont été réalisés entre un mélange de gangliosides et HcBCy3. Le rôle des gangliosides a été évalué en pré-incubant HcBCy3 pendant 30 min à température ambiante en présence d'un mélange de gangliosides comprenant 18% GM1, 55% GD1a, 15% GD1b, 10% GT1b et 2% d'autres gangliosides (Calbiochem). Puis, les cellules m-IC_{cl2} et NG108-15 ont été incubées avec le mélange pendant 10 min à 37°C.

En présence de HcBCy3 seul et après 10 min d'incubation des cellules, un fort marquage est observé en périnucléaire pour les deux types cellulaires (Fig II.31A). Un marquage est également observé à la surface membranaire des NG108-15 mais pas ou plus faiblement, à la surface des m-IC_{cl2} (Fig II.31A). En présence du mélange de gangliosides enrichis en GD1b/GT1b et de HcBCy3, aucun marquage est observé en périnucléaire dans les 2 types cellulaires. Toutefois, un faible marquage est détecté à la membrane plasmique des NG108-15 (Fig II.31A).

Des quantifications ont été réalisées pour chaque expérience (Image J). La quantification est basée sur la détection du nombre d'objets, et non sur l'intensité de fluorescence. Dans le cas des m-IC_{cl2}, une quantification globale du nombre d'objets détectés dans un champ contenant entre 10 et 20 cellules en moyenne a été réalisé. Pour les NG108-15, la quantification a été réalisée sur 3 cellules indépendantes pour chaque essai, et limitée aux objets localisés dans la région intracellulaire (Fig II.31B). Dans les deux cas, la compétition réalisée entre HcBCy3 et le mélange de gangliosides enrichis en GD1b/GT1b, diminue fortement l'entrée de HcBCy3 dans les cellules, de 50% pour les NG108-15 et de plus de 80% dans le cas des m-IC_{cl2}.

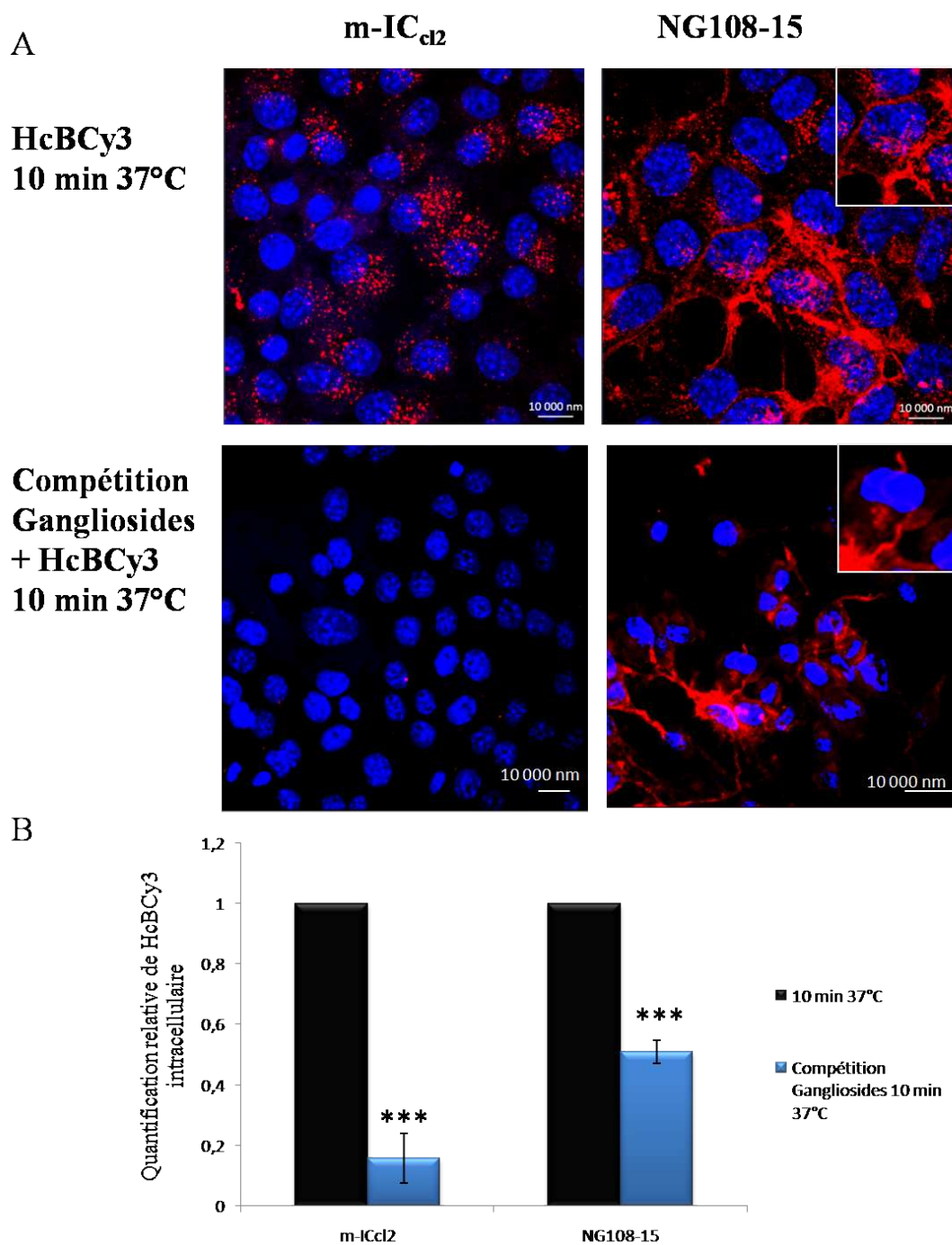


FIGURE II.31 – Image en microscopie en fluorescence de l'entrée de HcBCy3 (rouge) dans les m-IC_{cl2} et les NG108-15 avec et sans compétition en présence d'un mélange de gangliosides enrichis en GD1b/GT1b. Les quantifications de fluorescence et les écart types ont été réalisés au minimum à partir de 5 expériences indépendantes. Les tests de significativité ont été réalisés par t-test avec *** $P < 0.0001$.

II.3.3 Effet des Syt-I et Syt-II sur l'entrée de HcB

BoNT/B est capable de se lier à Syt-II et à Syt-I avec une plus faible affinité [Nishiki 1996] [Dong 2003]. Dans un second temps, l'implication de Syt-I et Syt-II a donc été évaluée pour leur capacité à inhiber l'entrée de HcB dans les cellules neuronales et intestinales.

De la même manière que pour les compétitions réalisées en présence du mélange de gangliosides, HcBCy3 a été pré-incubée avec Syt-I ou Syt-II (10 fois en excès par rapport à HcBCy3) pendant 30 min à température ambiante.

En présence de Syt-I, l'entrée de HcBCy3 dans les NG108-15 est diminuée de 30% (Fig II.32), et de 50% en présence de Syt-II (Fig II.33). Ces résultats correspondent donc aux données de la littérature indiquant que l'affinité de BoNT/B pour Syt-II est plus importante que pour Syt-I. Cette diminution n'est pas totale, et l'ajout des Syts ne prévient que partiellement la liaison et l'entrée de HcBCy3 dans les cellules neuronales.

Si les Syts semblent clairement impliquées dans l'entrée de HcBCy3 dans les cellules neuronales, aucune diminution significative de fluorescence n'est observée pour les m-IC_{cl2} que ce soit dans le cas des compétitions réalisées avec la Syt-I (Fig II.32) ou la Syt-II (Fig II.33).

Le modèle proposé pour l'entrée de BoNT/B dans les cellules neuronales implique la liaison à un double récepteur impliquant des gangliosides de la famille GD1b/GT1b et la Syt-II [Dong 2003]. Ainsi, des compétitions ont été réalisées en pré-incubant HcBCy3 avec la Syt-I (Fig II.34) ou Syt-II (Fig II.35), présentes 10 fois en excès, et en présence d'un mélange de gangliosides enrichis en GD1b/GT1b.

Dans le cas des cellules NG108-15, les compétitions réalisées en présence de la Syt-I et du mélange de gangliosides enrichis en GD1b/GT1b induit une inhibition de liaison et d'entrée de HcBCy3 plus importante (80%) que celle observée en présence de gangliosides enrichis en GD1b/GT1b (50%) ou en présence de Syt-I seul (30%) (Fig II.33). La même diminution est observée en présence de Syt-II et du mélange de gangliosides enrichis en GD1b/GT1b (20%) par rapport à Syt-II seule ou en présence seulement de gangliosides enrichis en GD1b/GT1b (II.34).

Dans le cas des cellules m-IC_{cl2}, aucune différence significative de fluorescence est observée en présence de Syt-I ou de Syt-II (Fig II.32 et II.33). Cependant, lorsque Syt-I ou Syt-II est associée à la préparation de gangliosides, on observe une diminution de la liaison et de l'entrée de 80%, correspondant à l'inhibition observée en présence du mélange de gangliosides seul (Fig II.34 et II.35).

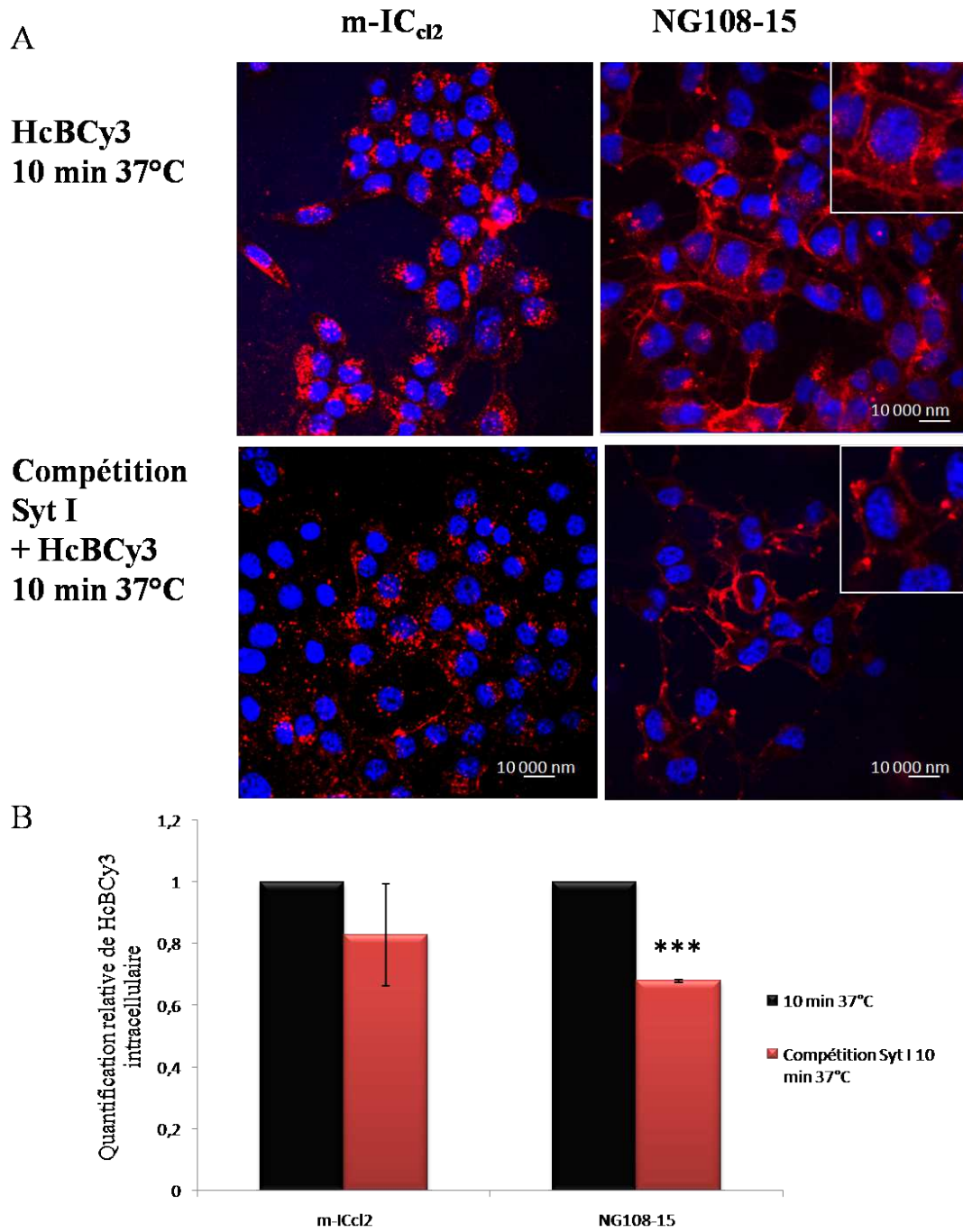


FIGURE II.32 – Image en microscopie en fluorescence de l'entrée de HcBCy3 (rouge) dans les m-IC_{cl2} et les NG108-15 en présence et en absence de Syt-I. Les quantifications de fluorescence et les écart types ont été réalisés au minimum à partir de 5 expériences indépendantes. Les tests de significativité ont été réalisés par t-test où *** $P < 0.0001$.

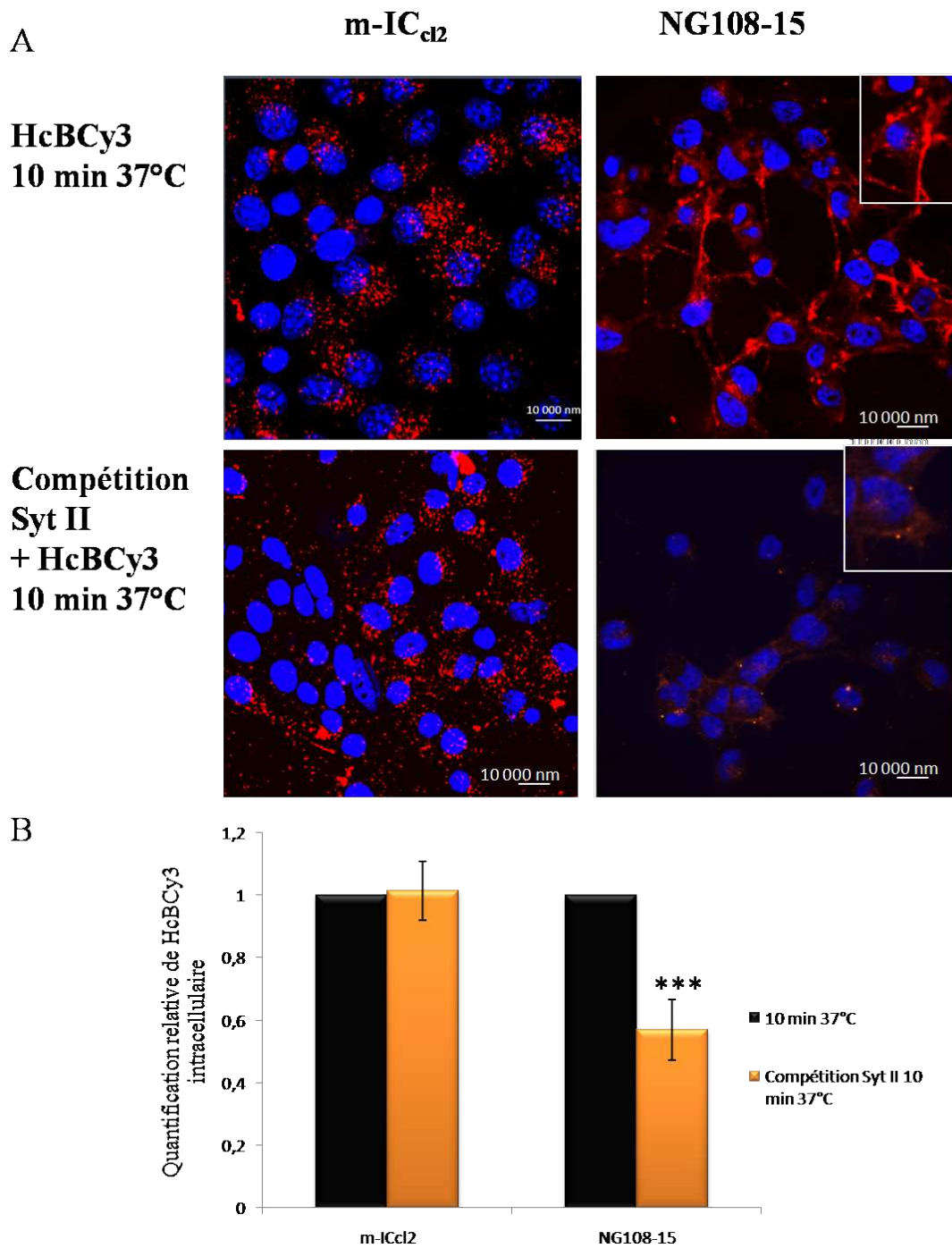


FIGURE II.33 – Image en microscopie en fluorescence de l’entrée de HcBCy3 (rouge) dans les m-IC_{cl2} et les NG108-15 en présence et absence de Syt-II. Les quantifications de fluorescence et les écart types ont été réalisés au minimum à partir de 5 expériences indépendantes. Les tests de significativité ont été réalisés par t-test où *** $P < 0.0001$.

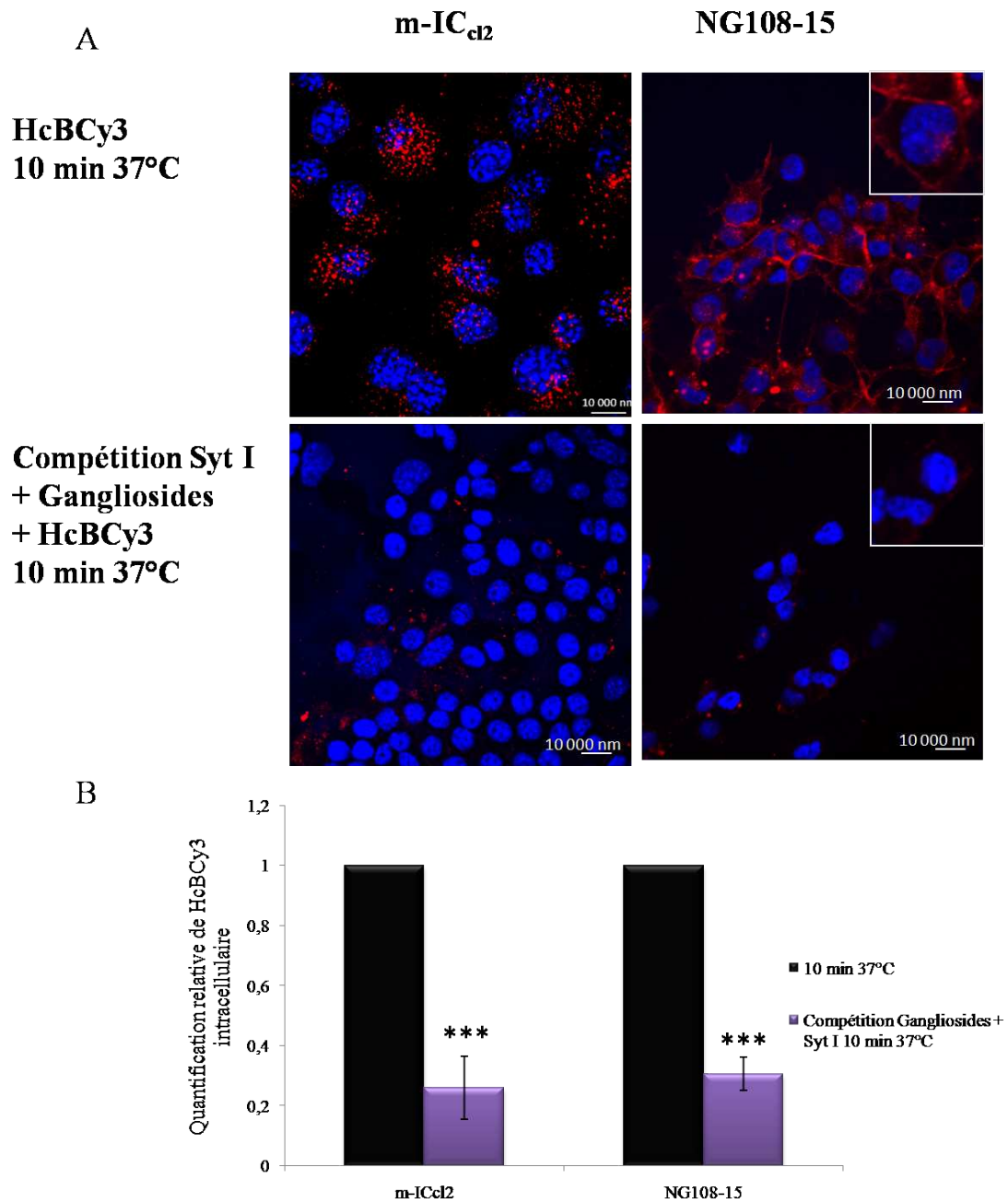


FIGURE II.34 – Image en microscopie en fluorescence de l'entrée de HcBCy3 (rouge) dans les m-IC_{cl2} et les NG108-15 en présence et en absence de Syt-I et du mélange de gangliosides enrichis en GD1b/GT1b. Les quantifications de fluorescence et les écart types ont été réalisés au minimum à partir de 5 expériences indépendantes. Les tests de significativité ont été réalisés par t-test où *** $P < 0.0001$.

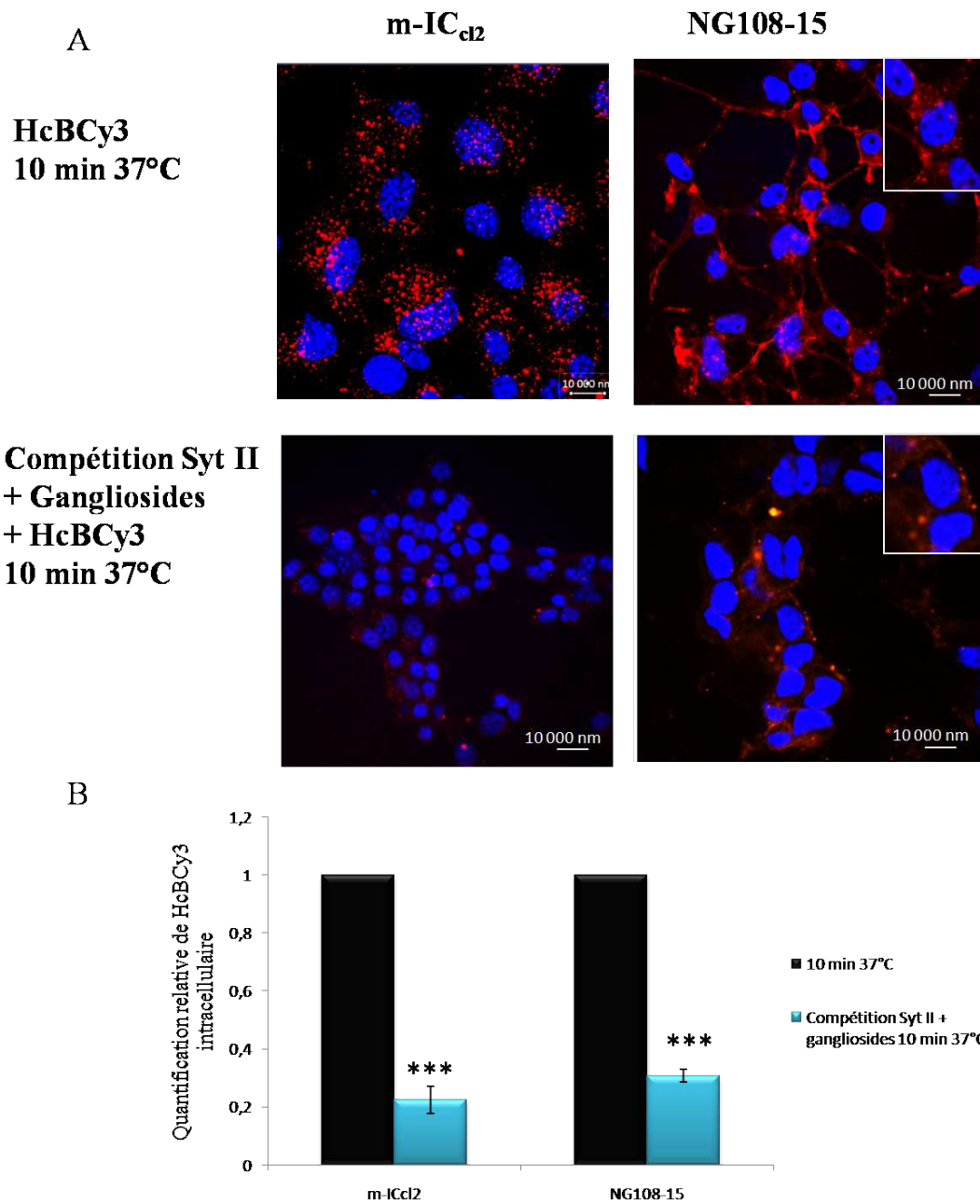


FIGURE II.35 – Image en microscopie en fluorescence de l'entrée de HcBCy3 (rouge) dans les m-IC_{cl2} et les NG108-15 en présence et en absence de Syt-II et les gangliosides enrichis en GD1b/GT1b. Les quantifications et les écart types ont été réalisés au minimum à partir de 5 expériences indépendantes. Les tests de significativité ont été réalisés par t-test où *** $P < 0.0001$.

II.3.4 HcB entre dans les cellules intestinales et neuronales par une endocytose dépendante de la dynamine

Les voies d'endocytose décrites dans la littérature sont multiples et ont des caractéristiques variées (voir IV). Il a été précédemment démontré dans le laboratoire, que HcA entre dans les cellules neuronales en culture par une voie dépendante de la clathrine, et dans les cellules intestinales par une voie indépendante de la clathrine mais dépendante de Cdc42 [Couesnon 2009].

Afin de déterminer si HcB entre dans les cellules par une voie d'endocytose dépendante de la dynamine, le Dynasore [Macia 2006], un inhibiteur de la dynamine, a été évalué pour sa capacité à inhiber l'entrée de HcB dans les cellules neuronales (NG108-15) et intestinales (m-IC_{cl2}). Pour cela, le Dynasore (80 μ M) a été pré-incubé pendant 30 min à 37°C sur des cellules cultivées sur lamelle, puis incubées en présence de HcBCy3.

Après traitement au Dynasore, le marquage de HcBCy3 en intracellulaire est fortement diminué, de 80% pour les m-IC_{cl2} et de 90% dans les NG108-15 (Fig II.35). Un marquage à la surface membranaire est toutefois détecté dans les NG108-15 indiquant que la liaison aux récepteurs n'est pas affectée. Le Dynasore bloque de la même façon l'entrée de HcA et HcE marquées à la Cy3, dans les 2 types cellulaires étudiés (résultats non montrés).

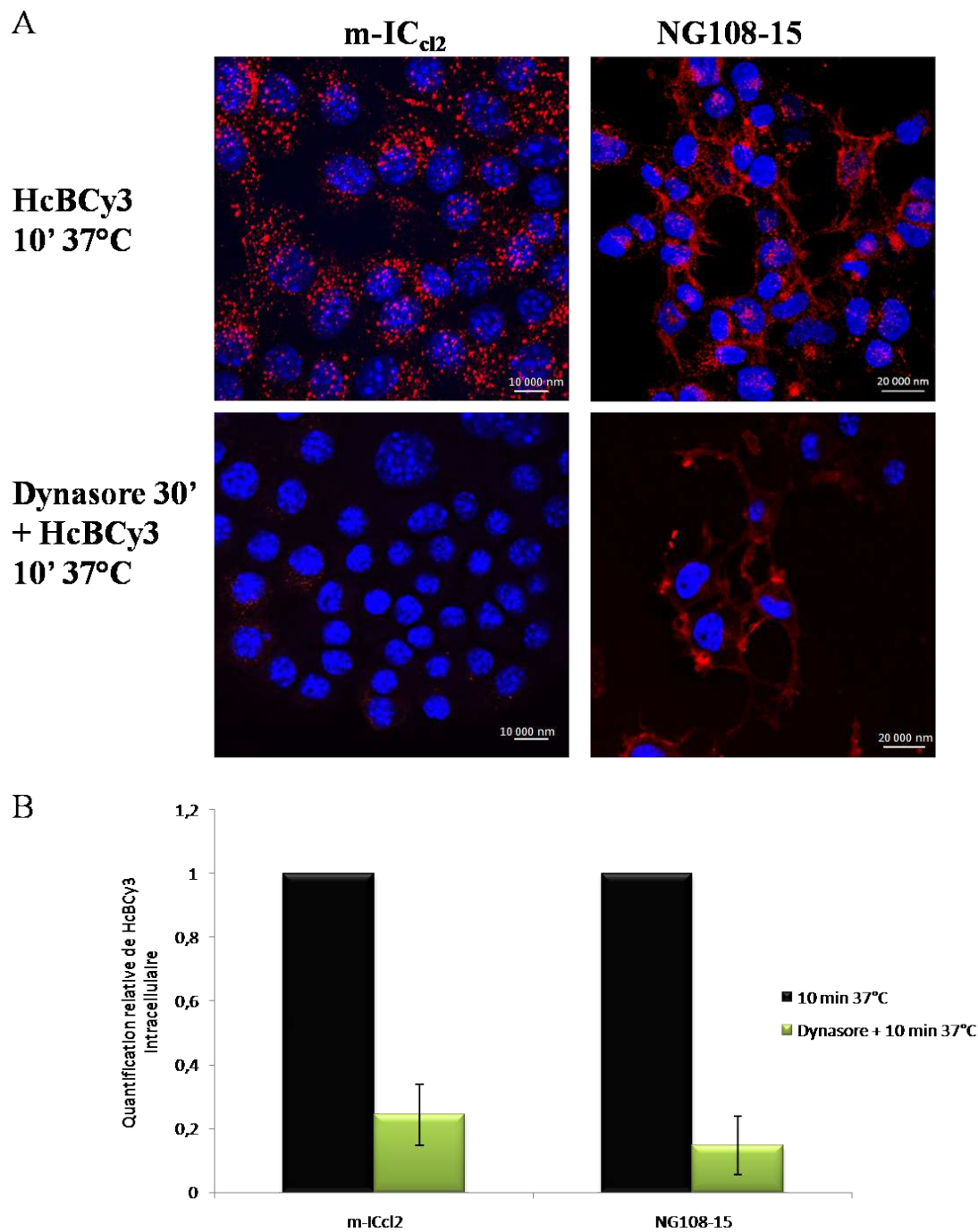


FIGURE II.36 – Image en microscopie en fluorescence de l'entrée de HcBCy3(rouge) dans les m-IC_{cl2} et les NG108-15 après et sans traitement au Dynasore (80 μ M). Les quantifications de fluorescence et les écart types ont été réalisés au minimum à partir de 5 expériences indépendantes. Les tests de significativité ont été réalisés par t-test où $***P < 0.0001$.

II.3.5 Voies d'endocytose dépendantes des RhoGTPases

Comme décrit précédemment, il a pu être mis en évidence au sein du laboratoire que l'entrée de HcA dans les cellules intestinales est dépendante de Cdc42 qui est une petite RhoGTPase [Couesnon 2009]. La voie d'endocytose empruntée par HcB n'est pas connue.

Les petites protéines G sont impliquées dans la régulation du cytosquelette mais également dans l'endocytose et l'exocytose. Cdc42 est impliquée dans la voie d'endocytose des CLIC/GEEC et la voie dépendante de la clathrine. RhoA permet de modifier la morphologie de la membrane plasmique lors de l'endocytose et joue un rôle important dans les voies d'endocytose dépendantes des radeaux lipidiques. Enfin, Rac1 est impliquée dans la micropinocytose et la voie d'endocytose dépendante de la clathrine. Ainsi, ces 3 protéines sont fortement impliquées dans des voies d'endocytose distinctes et leur analyse à l'aide de dominants négatifs pour ces protéines permet de préciser la voie d'endocytose empruntée par la molécule d'intérêt [Park 2013].

Afin de déterminer si l'entrée de HcB dans les cellules intestinales suit la même voie que HcA, des transfections ont été réalisées avec des plasmides exprimant des dominants négatifs pour Cdc42 (GFP-Cdc42T17N), RhoA (His6-Rho T19N) et Rac1 (Rac1 T17N) (voir A). L'entrée a été étudiée après 10 min d'incubation de HcBCy3 sur les cellules neuronales et intestinales.

Les résultats obtenus sont présentés Fig II.37, II.38 et II.39. Aucune différence d'entrée de HcBCy3 a pu être observée entre les cellules transfectées avec les plasmides exprimant les différents dominants négatifs et les cellules non transfectées. Aucun des 3 dominants négatifs utilisés semble bloquer l'entrée de HcBCy3 que ce soit dans les cellules neuronales ou intestinales (flèches blanches, Fig II.37, II.38, II.39).

Toutefois, ces expériences ne sont que préliminaires et nécessitent d'être réitérées afin de valider statistiquement les résultats obtenus.

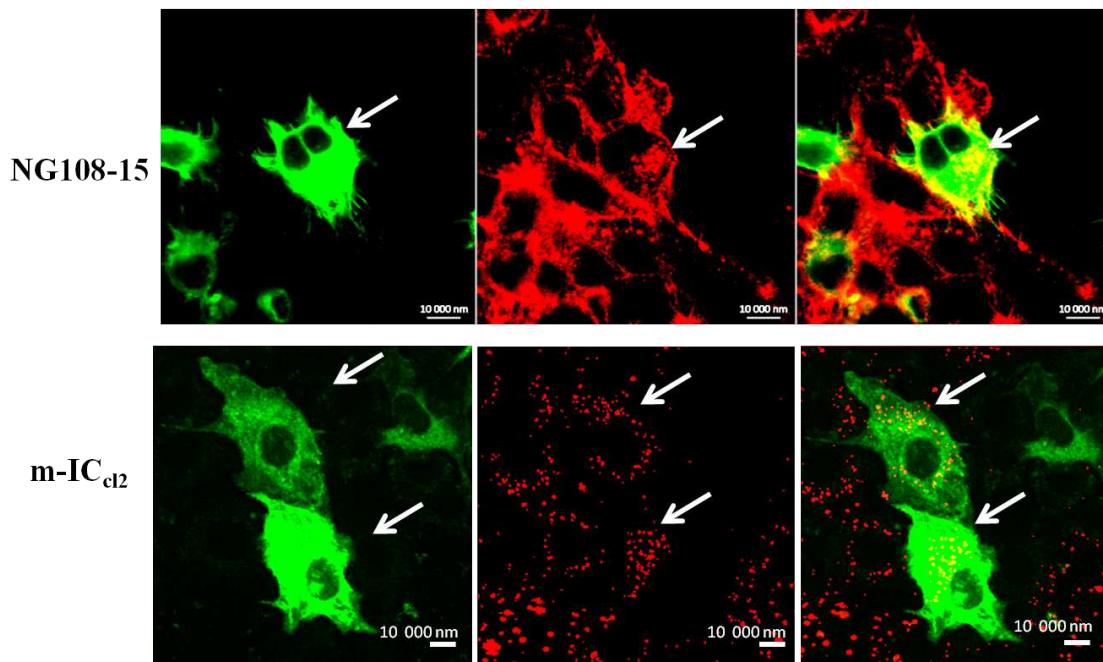


FIGURE II.37 – Image en microscopie en fluorescence de l'entrée de HcBCy3 (rouge) dans les cellules mIC_{cl2} et NG10815 transfectées avec un plasmide exprimant le dominant négatif de Cdc42 (vert).

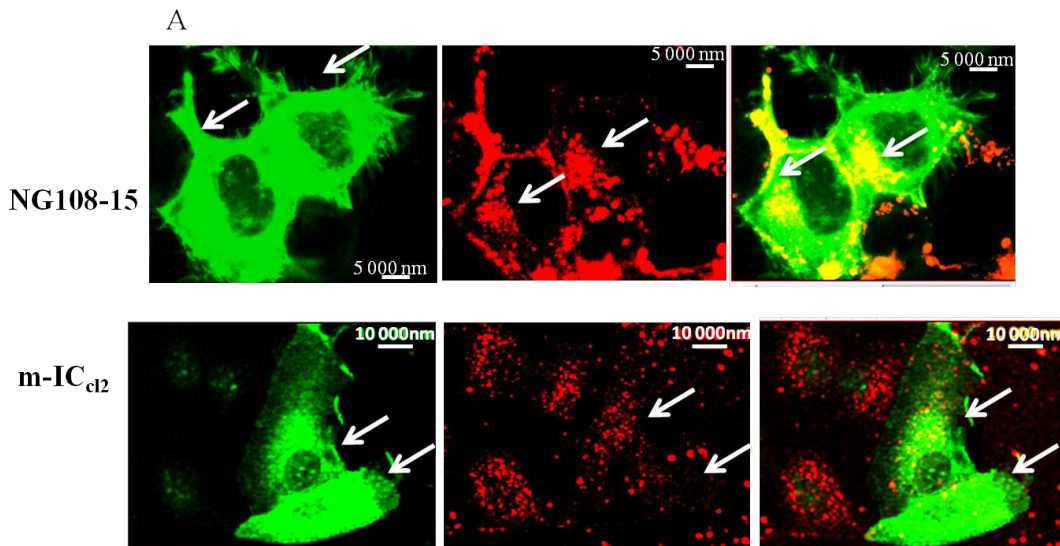


FIGURE II.38 – Image en microscopie en fluorescence de l'entrée de HcBCy3 (rouge) dans les cellules mIC_{cl2} et NG10815 transfectées avec un plasmide exprimant le dominant négatif de Rac1 (vert).

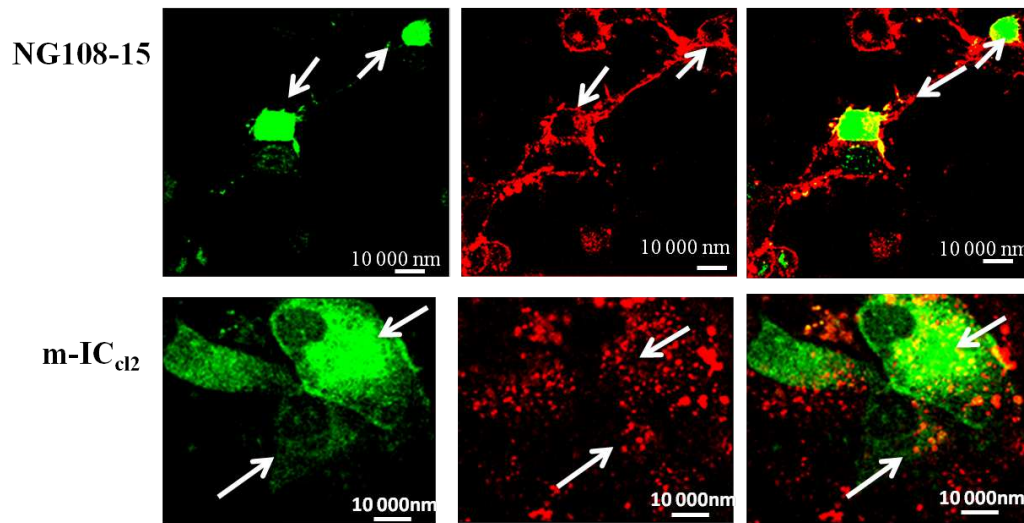


FIGURE II.39 – Image en microscopie en fluorescence de l'entrée de HcBCy3 (rouge) dans les cellules mIC_{c12} et NG10815 transfectées avec un plasmide exprimant le dominant négatif de RhoA (vert).

II.3.6 Le trafic intracellulaire

Une fois internalisées, les BoNTs peuvent suivre 2 principales voies différentes, une voie dite "pH acide" dans les cellules neuronales, qui permet la translocation de la chaîne légère, ou une voie dite "pH neutre" dans les cellules intestinales pour permettre la transcytose.

Dans les cellules neuronales, le transport de BoNT/A est inhibé par des agents empêchant l'acidification des vésicules d'endocytose tels que la Bafilomycine A1 ou la monensine. Cependant, ce transport n'est pas inhibé dans les cellules intestinales, indiquant que BoNT/A transite par des compartiments à pH neutre dans les cellules intestinales [Coesnon 2008].

Des études en fluorescence ont permis de mettre en évidence que HcA est majoritairement retrouvée dans les endosomes précoces des cellules intestinales et neuronales. Puis, la toxine suit une voie acide dans les cellules neuronales pour permettre la translocation de la chaîne légère, alors que la voie des endosomes neutres semble être la voie privilégiée pour le trafic de HcA dans les cellules intestinales.

Afin de déterminer le trafic endolysosomal emprunté par HcB dans les cellules neuronales et intestinales, des co-marquages ont été réalisés à l'aide d'anticorps dirigés contre EEA1, qui est un marqueur des endosomes précoces (pH neutre), et Rab7, spécifique des endosomes tardifs (pH acide). La corrélation entre les deux marqueurs, HcBCy3 et le marqueur spécifique d'un type d'endosome, est évaluée par le coefficient de Pearson (Image J).

Après 10 min d'incubation de HcBCy3 à 37°C, un fort taux de colocalisation est observé

entre le marqueur des endosomes précoces, EEA1, et HcBCy3 (Fig II.40). Ce coefficient est plus important dans les cellules intestinales que neuronales (0,45 dans les cellules intestinales, 0,3 dans les cellules neuronales) (Fig II.40B).

Toutefois, un fort coefficient de corrélation (0,4) est également obtenu entre HcBCy3 et le marqueur des endosomes tardifs, Rab7 (Fig II.41). Ce coefficient de corrélation est comparable pour les deux types cellulaires étudiés.

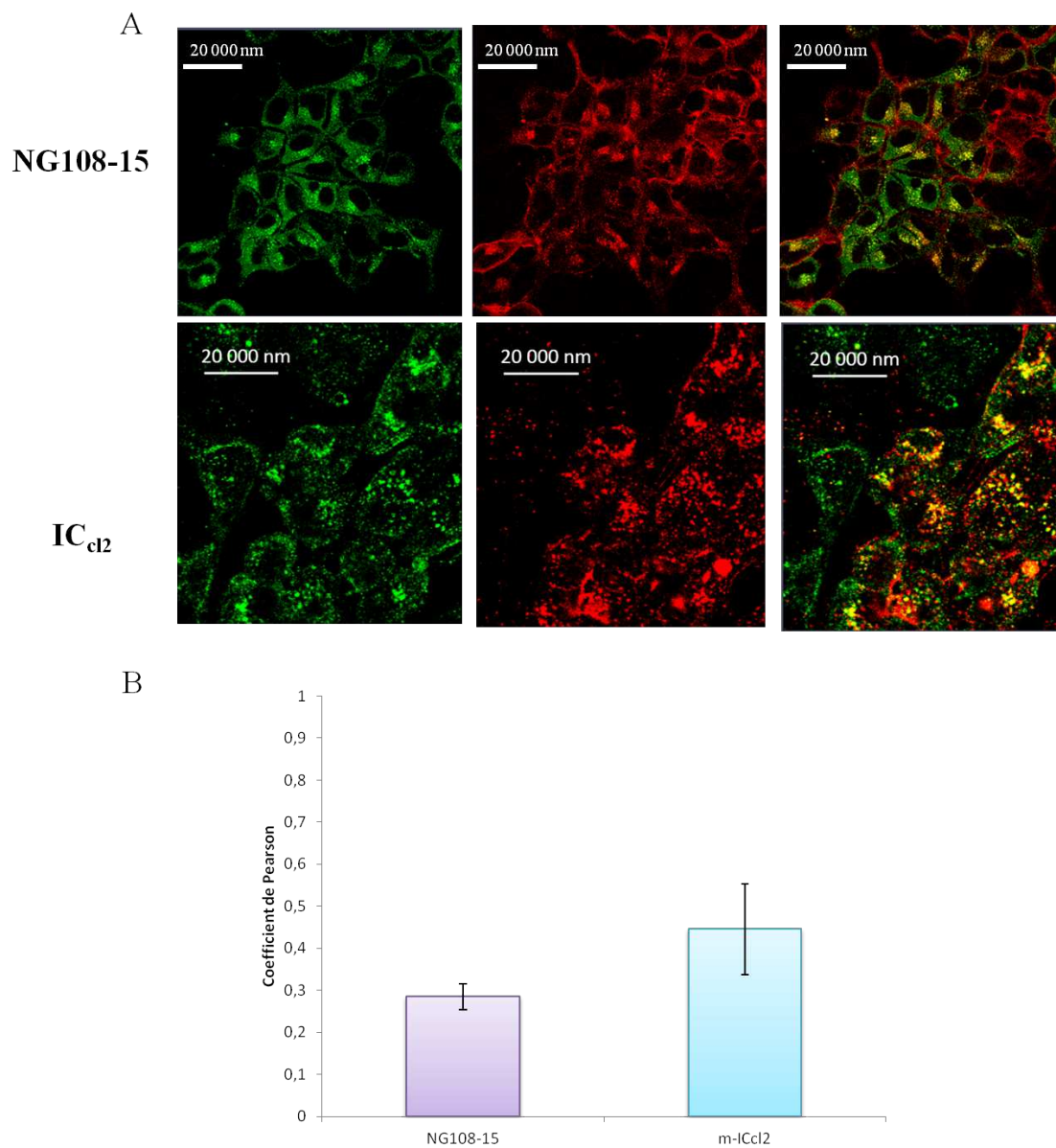


FIGURE II.40 – Image en microscopie en fluorescence de cellules m-IC_{cl2} et NG108-15 marquées avec HcBCy3 (rouge) et des endosomes immunoréactifs pour EEA1 (vert). Les quantifications et les écart types ont été réalisés à partir de 3 expériences indépendantes.

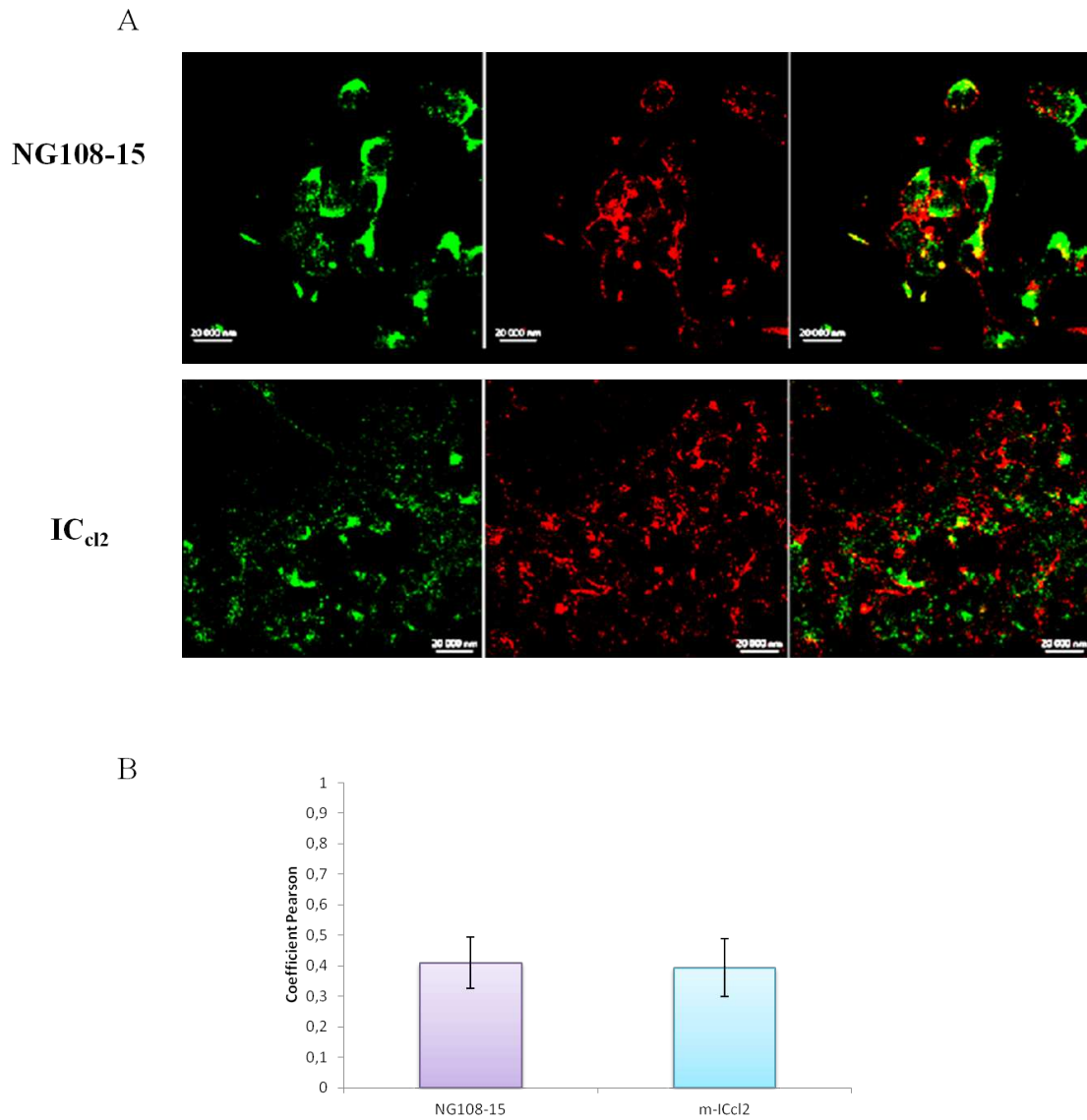


FIGURE II.41 – Image en microscopie en fluorescence de cellules m-IC_{cl2} et NG108-15 marquées avec HcBCy3 (rouge) et des endosomes immunoréactifs pour Rab7 (vert). Les quantifications et les écart types ont été réalisés à partir de 3 expériences indépendantes.

II.3.7 Discussion

II.3.7.1 Les récepteurs impliqués dans l'entrée de HcB dans les cellules neuronales et intestinales sont différents

Bien qu'un certain nombre de données soient disponibles pour la voie d'entrée empruntée par les BoNTs dans les cellules neuronales, peu de travaux ont été réalisés concernant la voie d'entrée dans les cellules intestinales. Le modèle proposé d'entrée des BoNTs dans les cellules neuronales, suggère que BoNT se lie à un double récepteur, incluant des gangliosides GD1b/GT1b et une protéine des vésicules synaptiques (SV2 ou Syt). Une fois liée à ses récepteurs, BoNT est internalisée via le recyclage des vésicules synaptiques. Les récepteurs impliqués dans l'entrée des BoNTs dans les cellules neuronales ont pu être identifiés pour la plupart des types et certains sous-types. Les types B et G impliquent les Syts et les types A, D, E et F impliquent les SV2 [Dong 2006] [Peng 2011] [Dong 2008] [Fu 2009] [Dong 2003]. Cependant, les récepteurs impliqués dans l'entrée des BoNTs dans les cellules intestinales ne sont pas connus.

Certaines données sont disponibles pour l'entrée de BoNT/A dans les cellules intestinales. La boucle L4 de SV2C constitue le domaine minimum récepteur de BoNT/A pour l'entrée dans les cellules neuronales, et l'ajout de cette protéine recombinante, diminue fortement la transcytose à travers une monocouche de cellules intestinales [Dong 2006] [Couesnon 2008].

Afin de déterminer si, comme pour l'entrée dans les cellules neuronales, l'entrée dans les cellules intestinales impliquent des gangliosides, des compétitions ont été réalisées en présence d'un mélange de gangliosides enrichis en GD1b/GT1b et HcBCy3. En présence du mélange de gangliosides, l'entrée de HcBCy3 est diminuée de plus de 80%, alors que l'entrée de HcBCy3 dans les cellules neuronales n'est diminuée que de 50% (Fig II.31). Ceci suggère que les gangliosides sont plus fortement impliqués dans l'entrée de HcBCy3 dans les cellules intestinales que dans les cellules neuronales. De plus, dans le cas des cellules neuronales, l'ajout du mélange de gangliosides enrichis en GD1b/GT1b ne diminue que faiblement la liaison à la membrane (Fig II.31), indiquant que HcBCy3 est toujours capable de se lier à la surface membranaire, alors que cette liaison à la membrane n'est pas observée dans le cas des cellules m-IC_{cl2}.

Les récepteurs gangliosidiques impliqués dans l'entrée de BoNT/B appartiennent aux séries a et b. Le mélange de gangliosides utilisé est enrichi en ganglioside Gd1b/GT1b mais également en GM1. Il sera donc intéressant de regarder de manière indépendante l'implication de chaque type de ganglioside afin de déterminer le types de gangliosides le plus affiné pour HcB.

Comme décrit précédemment, l'entrée de BoNT/B dans les cellules neuronales impliquent

des récepteurs gangliosidiques et les Syts. Deux isoformes de Syt sont décrits et sur les cellules neuronales, et BoNT/B se lie avec plus d'affinité à Syt-II qu'à Syt-I [Nishiki 1996] [Dong 2003]. En effet, en présence de Syt-I, l'entrée de HcBCy3 est diminuée de 30% contre 40% en présence de Syt-II (Fig II.32 et II.33). De plus la liaison à la membrane est plus faible en présence de Syt-II (Fig II.33) par rapport à l'ajout du mélange de gangliosides enrichis en GD1b/GT1b (Fig II.31) ou de la Syt-I (Fig II.32). Ces résultats sont en accord avec les résultats décrits dans la littérature indiquant que les gangliosides constituent un récepteur de faible affinité et que les Syts constituent le récepteur de forte affinité [Binz 2009].

De plus, Syt-I ou Syt-II associée au mélange de gangliosides, diminue l'entrée de HcBCy3 de plus de 70% (Fig II.34 et II.35), soit une inhibition plus importante que celle observée en présence des Syts seuls (Fig II.32 et II.33) ou en présence du mélange de gangliosides seul (Fig II.31). Ces résultats corrént donc avec le modèle de double récepteur proposé où l'association des gangliosides et de la Syt est nécessaire pour une entrée maximale de BoNT/B [Dong 2003].

Bien que ce modèle soit vérifié pour l'entrée de HcBCy3 dans les cellules neuronales, l'implication des Syts dans l'entrée de HcBCy3 dans les cellules intestinales n'est pas claire. En effet, en présence de Syt-I ou Syt-II, aucune diminution d'entrée de HcBCy3 est observée dans les cellules intestinales (Fig II.32 et II.33). Toutefois, après ajout du mélange de gangliosides, l'entrée de HcBCy3 est diminuée de près de 80%, indiquant que les gangliosides sont fortement impliqués dans l'entrée (Fig II.31). Contrairement aux cellules neuronales où l'inhibition de l'entrée de HcBCy3 est accentuée en présence du mélange de gangliosides et de Syts, aucune diminution supplémentaire d'entrée de HcBCy3 est observée dans les cellules intestinales.

Il est également intéressant de remarquer que les niveaux d'inhibition d'entrée d'HcB dans les cellules intestinales en présence de gangliosides et en présence du mélange de gangliosides associés à la Syt-I ou Syt-II sont équivalents (à peu près 70%) (Fig II.34 et II.35). Les gangliosides GD1b/GT1b pourraient donc être soit les seuls récepteurs impliqués dans l'entrée de HcB dans les cellules intestinales, soit être associés à un autre récepteur protéique que les Syts, pour l'instant non identifié. Des résultats similaires ont été obtenus par FACS montrant que la liaison de BoNT/A est plus faible sur les cellules intestinales que sur les cellules neuronales [Couesnon 2008]. Ceci indique que soit l'affinité de BoNT/A pour ce type cellulaire est moins forte, soit que la quantité de récepteurs disponibles à la surface cellulaire est plus faible dans les cellules intestinales que dans les neuronales .

Ainsi, les résultats obtenus montrent que l'entrée de HcB dans les cellules neuronales est dépendante des gangliosides GD1b/GT1b associé à la Syt-II et dans une moindre mesure à la Syt-I, alors que seuls les gangliosides GD1b/GT1b semblent impliqués pour l'entrée dans

les cellules intestinales. Toutefois, il est possible qu'une autre protéine pour l'instant non identifiée, soit également impliquée dans cette entrée.

II.3.7.2 HcB entre dans les cellules intestinales et neuronales par une voie dépendante de la dynamine et indépendante des RhoGTPases

Les voies d'endocytose empruntées par les BoNTs pour entrer dans les cellules neuronales et intestinales sont peu référencées. Le modèle proposé suggère qu'une fois liées à leur récepteurs, les BoNTs sont internalisées par recyclage des vésicules synaptiques. Il a été précédemment démontré dans le laboratoire, que HcA entre dans les cellules neuronales par une voie dépendante de la clathrine et par une voie indépendante de la clathrine mais dépendante de Cdc42 dans les cellules intestinales [Couesnon 2009].

De nombreuses protéines G sont impliquées dans les voies d'endocytose. Certaines, comme la dynamine, participent à la fission et la libération de la vésicule d'endocytose dans le cytosol. D'autres régulent l'endocytose en régulant la dynamique du cytosquelette [Harper 2013] [Park 2013].

La dynamine est une grosse protéine G (100 kDa) impliquée dans la voie d'endocytose dépendante de la clathrine, la voie des cavéolines, et la voie IL2 R, mais n'est pas impliquée dans la voie des radeaux lipidiques. Son implication dans les autres voies d'endocytose n'est pas encore déterminée [Mercer 2010] [Qualmann 2003] [Doherty 2009].

Afin de déterminer si la dynamine est impliquée dans la voie d'entrée de HcB dans les cellules intestinales et neuronales, un inhibiteur de la dynamine, le Dynasore, a été évalué pour sa capacité à inhiber l'entrée de HcB [Kirchhausen 2008]. En présence de Dynasore l'entrée de HcBCy3 est diminuée de 80% dans les m-IC_{d2} et de plus de 80% dans les NG108-15 indiquant que la dynamine est nécessaire pour l'entrée de HcB dans ces 2 types cellulaires (Fig II.36). Ces résultats indiquent donc que HcB entre dans les cellules neuronales et intestinales par une endocytose dépendante de la dynamine.

Il est intéressant de remarquer que le taux d'inhibition d'entrée de HcB est équivalent à ceux observés en présence du mélange de gangliosides enrichis en GD1b/GT1b pour les cellules intestinales et en présence de gangliosides associés à Syt-I ou Syt-II pour les cellules neuronales. On remarquera également que la liaison de HcBCy3 à la membrane n'est pas affectée dans les cellules NG108-15 alors que ce marquage membranaire n'est pas, ou très faiblement, observé sur les m-IC_{d2} (Fig II.36). Cette différence de profil de marquage est également observée en présence de gangliosides et appuie l'hypothèse d'une plus faible affinité de HcB pour ces récepteurs protéiques, ou de la plus faible abondance de ces récepteurs sur

les cellules intestinales par rapport aux cellules neuronales [Coesnon 2008].

Les petites protéines G sont également impliquées dans de nombreuses voies d'endocytose et leur analyse à l'aide de dominants négatifs a permis de préciser la voie d'endocytose empruntée par HcB. Pour cela, les plasmides exprimant les dominants négatifs de Cdc42 (GFP-Cdc42T17N), RhoA (His6-Rho T19N) et Rac1 (Rac1 T17N) ont été transfectés dans les NG108-15 et les m-IC_{cl2}. Les résultats obtenus indiquent qu'aucune de ces petites protéines G ne semblent impliquées dans l'entrée de HcBCy3 dans les cellules transfectées neuronales ou intestinales (Fig II.37, II.38 et II.39). A la différence de HcA, dont l'entrée dans les cellules intestinales est dépendante de Cdc42 [Coesnon 2009], ces résultats indiquent que HcBCy3 entre dans les cellules neuronales et intestinales par une voie indépendante de Cdc42, RhoA et Rac1.

Jusqu'à présent, seules 2 voies d'endocytose n'impliquent pas ces 3 petites protéines G : la voie des flotilines et la voie dépendante de ARF6 [Doherty 2009] [Pust 2010]. Ces voies pourraient donc être impliquées dans l'entrée de HcB dans les cellules intestinales et neuronales. Cette hypothèse est renforcée par le fait que l'implication de la dynamine pour ces deux voies n'a pour l'instant pas été déterminée.

Toutefois, ces résultats ne sont que préliminaires et les mêmes expériences devront être réalisées afin de valider de manière statistique ces observations. D'autres inhibiteurs de voies d'endocytose devront donc également être étudiés afin de préciser la ou les voies d'endocytose empruntées par HcB.

II.3.7.3 HcB est transporté dans des endosomes précoces et tardifs

Une fois internalisées dans les cellules neuronales via le recyclage des vésicules synaptiques, les BoNTs sont transportées dans des vésicules acides ce qui permet la translocation de la chaîne légère dans le cytosol où elle clivent les protéines SNARE [Binz 2009]. A l'inverse, les BoNTs semblent être transportées dans des compartiments à pH neutre dans les cellules intestinales, ne permettant pas la translocation de la chaîne légère dans le cytosol. En effet, le transport de BoNT/A à travers une monocouche de cellules intestinales n'est pas inhibé par les agents qui empêchent l'acidification des endosomes. Ainsi, les cellules intestinales ne serviraient que de transit pour les BoNTs afin de rejoindre les cellules neuronales cibles [Maksymowych 1998] [Coesnon 2008] [Keller 2004].

Des marquages ont été réalisés à l'aide d'anticorps dirigés contre EEA1, qui est un marqueur des endosomes précoces, et Rab7, qui est un marqueur des endosomes tardifs. Les coefficients de corrélation ont été évalués entre HcBCy3 et les structures marquées avec EEA1 dans les deux types cellulaires étudiés. Après 10 min d'incubation de HcBCy3, un fort

II.3. Résultats expérimentaux modèle *in vitro* : Caractérisation des mécanismes moléculaires d'entrée des BoNTs dans les cellules intestinales 259

coefficient de corrélation est observé pour les NG108-15 (coefficient de Pearson 0,3) et pour les m-IC_{cl2} (coefficient de Pearson 0,45) (Fig II.40). Ceci suggère que HcB transite par des endosomes précoces dans les deux types cellulaires.

Dans le cas des marquages réalisés avec des anticorps dirigés contre Rab7, un fort coefficient de corrélation est également observé entre HcBCy3 et Rab7 après 10 min d'incubation dans les cellules neuronales (coefficient de Pearson 0,4) (Fig II.41). Ainsi, HcB est retrouvé à la fois dans les endosomes précoces et dans les endosomes tardifs après 10 min d'incubation dans les cellules neuronales.

Dans le modèle expérimental ainsi réalisé, il est difficile de visualiser de façon séquentielle l'entrée de HcB dans les cellules et donc de déterminer la proportion de HcB présente dans les endosomes précoces et celle présente dans les endosomes tardifs à 10 min. Les mêmes expériences devront donc être réalisées en cinétique afin de suivre l'entrée d'HcB dans les cellules neuronales de manière plus précise.

Le trafic endolysosomal suivi par HcB dans les cellules intestinales est moins évident. En effet, un fort coefficient de corrélation est également observé entre HcBCy3 et les structures immunoréactives pour Rab7 et EEA1 indiquant, comme pour les cellules neuronales, que HcB transite à la fois dans des endosomes précoces et tardifs dans les cellules intestinales. Ces résultats ne correspondent donc pas au modèle proposé où les BoNTs transitent pas des endosomes neutres pour être libérées au pôle opposé de la cellule et rejoindre ses cibles neuronales.

Toutefois, il faut noter que les cellules m-IC_{cl2} sont des cellules épithéliales capables de se spécialiser en monocouche de cellules polarisées et que les expériences de cette étude ont été réalisées sur cellules non polarisées. Ainsi, le trafic endolysosomal emprunté par HcB dans ces cellules peut être différent en fonction de leur condition de culture et les mêmes marquages sur monocouche cellulaires devront être réalisés afin de tester cette hypothèse.

De même, puisque les BoNTs sont données pour transcytoser à travers les cellules intestinales, la voie impliquant les endosomes de recyclage devra également être étudiée.

Partie 4 : Discussion

Le botulisme est une pathologie neurologique grave, affectant l'homme et l'animal, due à l'action des neurotoxines botuliques produites par *C. botulinum* et par d'autres espèces apparentées. Ces toxines agissent aux jonctions neuro-musculaires en inhibant la libération d'acétylcholine conduisant à une paralysie flasque. Le plus souvent, le botulisme survient à la suite d'une absorption des toxines botuliques à partir du tube digestif. On distingue alors le botulisme alimentaire, qui résulte de la consommation d'aliment contaminé par *C. botulinum* et sa toxine, du botulisme infantile ou certaines formes de botulisme chez l'adulte, où *C. botulinum* se multiplie dans la lumière de l'intestin grêle et produit la toxine *in situ*. Toutefois, le botulisme alimentaire est la forme d'intoxication la plus fréquemment retrouvée [Popoff 2009].

Du fait de sa sévérité et la possibilité d'apparition de foyers plus ou moins étendus à la suite de consommation de préparations familiales ou industrielles, le botulisme fait l'objet d'une surveillance attentive et renforcée de la part des Organismes de Santé Publique. La toxine botulique A est la toxine la plus puissante connue à ce jour et constitue une arme potentielle en bioterrorisme justifiant son classement en catégorie A par le CDC (Center For Disease Control and Prevention). Des menaces réelles d'utilisation de toxine botulique comme arme biologique ont été rapportées [Arnon 2001]. De ce fait, la plupart des gouvernements occidentaux mettent en place des programmes de prévention et de lutte contre ces agents biologiques.

Dans la plupart des formes naturelles de botulisme, la toxine botulique transite par la voie digestive avant d'atteindre les cellules cibles que sont les motoneurons. On peut alors diviser l'intoxication en 4 grandes étapes : production de toxine par la bactérie, ingestion d'aliment contenant la toxine préformée, passage de la neurotoxine à travers la barrière intestinale et action protéolytique aux terminaisons nerveuses. Bien que le mode d'action des BoNTs aux terminaisons nerveuses ait été analysé en détail, la régulation de la production des toxines et le passage des neurotoxines botuliques à travers la barrière intestinale, restent des étapes encore peu comprises [Poulain 2008].

Au cours de mon travail de thèse, je me suis donc attachée à identifier les mécanismes impliqués dans la régulation de la production des neurotoxines botuliques mais également à mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le passage des neurotoxines à travers la barrière intestinale. Une meilleure connaissance du mode de passage des BoNTs dans la muqueuse digestive, devrait permettre de développer de nouveaux moyens de prévention efficaces contre le botulisme par blocage de l'absorption digestive.

La toxinogénèse chez *C. botulinum* est régulée par des TCSs

Lors de la production, les BoNTs s'associent à des protéines non toxiques, les NAPs, pour former des complexes de différentes tailles. Les gènes codant BoNT et les NAPs sont regroupés dans le locus botulique qui est organisé en deux opérons. La production des BoNTs et des NAPs est un processus hautement régulé, impliquant un facteur σ alternatif (BotR) et potentiellement d'autres systèmes de régulation, comme les petits ARN régulateurs ou des TCSs [Raffestin 2005] [Chen 2011]. De nombreux TCSs sont impliqués dans la régulation de la production de facteurs de virulence chez plusieurs bactéries à Gram+ et Gram- [Beier 2006]. Le séquençage du génome de *C. botulinum* Hall A en 2007 par Sebahia et collaborateurs a permis d'identifier de nombreux systèmes régulateurs potentiels incluant 28 TCSs, 8 HSKs orphelins, 8 RRs orphelins, (c'est-à-dire des systèmes pour lesquels les partenaires n'ont pas été identifiés), et 15 facteurs σ [Sebahia 2007].

Dans cette première partie, je me suis intéressée à évaluer l'implication des TCSs dans la production de toxine chez *C. botulinum*. Par la méthode d'ARN antisens, qui permet une répression partielle de l'expression des gènes, 34 souches isogéniques pour ces systèmes (29 TCSs, et 5 gènes régulateurs orphelins) ont pu être générées. L'expression des gènes *bonts* et des gènes codant les NAPs ainsi que la production ont été analysées en qRT-PCR, ELISA et Western Blot. Cette étude a permis d'identifier 5 TCSs impliqués dans la toxinogénèse chez *C. botulinum* Hall A. Parmi ces 5 TCS, 2 semblent avoir des effets pleiotropes et agissent à la fois sur le métabolisme général et sur la production de toxine. Trois autres régulent positivement la production de BoNT/A et des NAPs à un niveau transcriptionnel et ceci indépendamment du régulateur connu BoTR/A [Connan 2012]. Ainsi, la synthèse de BoNT/A et des NAPs est contrôlée par un réseau complexe de régulation impliquant un facteur σ alternatif et au moins 3 TCSs.

Un autre TCS a également été identifié et régule négativement la production de toxine chez *C. botulinum* en régulant négativement la production de BotR/A. Ces gènes sont conservés chez les *C. botulinum* du groupe I, et pourrait être un régulateur négatif de la production de neurotoxine commun aux bactéries de ce groupe [Zhang 2013].

Ces systèmes de régulation ont des effets pléiotropes et peuvent également réguler d'autres

gènes que les gènes du locus botulique. C'est le cas de BoTR/A, donné pour réguler spécifiquement les gènes du locus botulique. Des analyses en transcriptomique ont montré qu'une surexpression de *botR/A* induit une surexpression de 22 gènes d'au moins un facteur 4 alors que 67 autres sont réprimés. De même, si on réprime partiellement *botR/A* par la méthode d'ARN antisens, 15 gènes sont surexprimés et 6 réprimés (données non publiées). Le rôle de BotR/A n'est donc pas limité à la production de toxine. Des analyses en transcriptomique pourront être réalisées sur les TCSs impliqués dans la production de toxine afin de déterminer si ces TCS agissent uniquement sur les gènes du locus botulique.

De même, l'implication directe ou indirecte de ces TCSs sur la transcription des gènes de neurotoxines devra être étudiée. En effet, les TCSs peuvent agir directement sur les gènes cibles, ou indirectement en passant par des petits ARN régulateurs par exemple [Shimizu 2002]. Ainsi, des expériences de retard sur gel ou EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) pourront être réalisées afin de déterminer si une liaison directe existe entre la protéine régulatrice (RR) du TCS et les régions promotrices des opérons du locus botulique.

La plupart des TCSs identifiés dans la souche *C. botulinum* Hall A, ont des homologues chez d'autres Clostridies. Deux RRs chez *C. botulinum* Hall A ont une homologie de séquence avec le TCS VirR-VirS de *Clostridium perfringens*. VirR-VirS est impliqué dans la régulation transcritptionnelle de la production de nombreuses toxines, soit de façon directe pour la toxine θ ou la perfringolysine O, soit de façon indirecte via un ARN régulateur, le VR-RNA, pour les toxines α et la collagénase A [Ma 2011]. Cependant, ce TCS semble impliqué dans des voies de régulation différentes chez *C. botulinum* et *C. perfringens*. En effet, la souche isogénique réprimant le gène homologue de VirR chez *C. botulinum* Hall A par ARN antisens, ne montre pas de différence dans la production de toxine, mais semble être affectée dans son métabolisme général puisqu'elle présente un retard de croissance important [Connan 2012]

Les TCSs permettent une réponse adaptative de la bactérie à son environnement et les facteurs environnementaux et nutritifs impliqués dans le contrôle de la toxinogénèse sont pour l'instant largement inconnus. Une quantité importante d'arginine réprime la synthèse de BoNT/A et BoNT/B, de même que l'ajout de tryptophane diminue la production de toxine de plusieurs souches de *C. botulinum* type E [Patterson-Curtis 1989][Leyer 1990]. Le dioxyde de carbone stimule la production de toxine dans les souches non protéolytiques B et E mais n'a pas d'effet sur la toxinogénèse de BoNT/A [Artin 2010] [Lovenklev 2004]. Les signaux environnementaux détectés par les TCSs impliqués dans la toxinogénèse chez *C. botulinum* Hall A n'ont pas encore été identifiés mais leur caractérisation devrait permettre une meilleure maîtrise de la production de toxine notamment en agro-alimentaire.

Un autre mécanisme impliqué dans la régulation de la production de toxine de nombreuses bactéries à Gram + et Gram - est le "quorum sensing". Le "quorum sensing" permet aux bactéries de sentir leur environnement populationnel et régule la production de toxines en faisant intervenir des TCSs et des sRNAs. Le "quorum sensing" peut exister à l'intérieur d'une espèce, mais également entre espèces éloignées.

Le signal utilisé dans la communication inter-espèce est l'AI-2, un furanosyl borate diester synthétisé par LuxS, présent chez de nombreuses espèces bactériennes [Waters 2005]. Le TCS VirR/VirS de *C. perfringens* a un effet pléiotrope et régule, en plus des gènes des toxines, la production de LuxS qui stimule la production des toxines α , ι , et κ , en milieu de phase exponentielle de croissance [Ohtani 2002]. Un homologue de LuxS a été identifié chez la souche *C. botulinum* Hall A. L'expression du gène *luxS* a été réprimée partiellement par la méthode d'ARN antisens, mais aucune modification de production de toxine a pu être observée (données non publiées). Toutefois, le "quorum sensing" contrôle l'expression d'un certain nombre de gènes, de manière coordonnée, surtout en fin de phase exponentielle, lorsque la population bactérienne augmente et que la disponibilité en nutriments diminue [Waters 2005]. Ainsi, bien que les *C. botulinum* du groupe I soient exigeants en terme nutritionnel, l'effet de la répression partielle de *luxS* sur la production de toxine botulique devra être analysé en condition de culture minimum afin d'évaluer précisément l'implication de la communication inter-espèce dans la toxinogénèse.

Dans le cas de la communication intraspécifique, le signal utilisé est un peptide appelé AIP qui est reconnu de manière spécifique par des TCS [Waters 2005]. Un des systèmes de communication intraspécifique bien connu est le système Agr de *S. aureus*. Dans ce système, les AIPs sont reconnus par un TCS (AgrA/AgrC) qui régule positivement la production d'un petit ARN régulateur, permettant la production de toxine ([Geisinger 2006]). L'homologue de *agrA* a pu être identifié chez *C. botulinum* Hall A, mais ne semble pas impliqué dans la production de toxine [Connan 2012]. D'autres homologues du système Agr de *S. aureus* ont également été identifiés chez les souches de *C. botulinum* du groupe I. L'homologue de *agrD*, qui permet la transformation du peptide précurseur AgrB en AIP, semble impliqué dans la production de BoNT/A alors que l'homologue de *agrB* semble impliqué dans la sporulation [Cooksley 2010].

Ainsi, BoNT/A et les NAPs semblent être sous le contrôle d'un réseau complexe de régulateurs impliquant un facteur σ alternatif, au moins 3 TCSs régulant positivement la production de toxine, et 1 TCS régulant négativement la production de toxine. Les petits ARNs régulateurs ainsi que le "quorum sensing" pourraient également faire partie du réseau de régulation de la production de BoNT. Une meilleure compréhension des facteurs environnementaux régulant la production de toxine permettra de limiter la production de

toxine botulique dans les aliments conservés, améliorant ainsi le niveau de sécurité dans le domaine agroalimentaire, ou à l'inverse, d'optimiser sa production pour les préparations de toxines à usage thérapeutique ou vaccinal.

BoNT/B traverse la barrière intestinale à travers les entérocytes et cible les terminaisons de la paroi intestinale

Dans la deuxième partie de ma thèse, je me suis intéressée aux mécanismes moléculaires impliqués dans l'entrée de BoNT/B dans la paroi intestinale. Les toxines botuliques agissent à de très basses concentrations, et la principale difficulté est d'arriver à suivre le trajet de ces toxines aux concentrations physiologiques induisant un botulisme.

Bien que les BoNTs puissent être absorbées à différents segments du tractus digestifs, incluant l'estomac, l'iléon et le colon, il semble que les BoNTs soient préférentiellement absorbées dans la partie haute de l'intestin grêle [Bonventre 1979]. Toutefois, après injection de BoNT/B sous forme de complexe dans une anse duodénale isolée de rat, seul un faible taux (entre 0,01% et 0,1%) est détecté dans la lymphe et environ 100 fois moins dans le sang. De plus, BoNT/B seul est capable de traverser la barrière intestinale mais le taux détecté dans la lymphe est 50 à 100 fois moins important que lorsque BoNT/B est injecté sous forme de complexe [Sugii 1977a].

Des études de transcytose ont été réalisées *in vitro* sur monocouche de cellules intestinales et montrent également un faible passage de BoNT (entre 0,1% et 1%) [Couesnon 2008]. Ces résultats corrélerent avec les premiers essais *ex vivo* réalisés sur des anses intestinales isolées de souris (travaux en cours). Les premiers résultats montrent que BoNT/B injectée sous forme de complexe dans la lumière intestinale, induit une paralysie locale de la musculature intestinale en réponse à l'administration d'une forte dose de BoNT/B (1.10^7 à 1.10^8 LD50/ml).

Bien que l'entrée par la voie digestive soit peu efficace, les quantités traversant la barrière intestinale sont néanmoins suffisantes pour induire un botulisme. Ces résultats soulèvent la principale difficulté de ce projet qui est d'arriver à suivre le trajet empruntée par les BoNTs à de très basses concentrations.

Au cours de ce projet, il a pu être mis en évidence que HcB est capable de traverser la barrière intestinale pour rejoindre les cellules neuronales cibles présentes dans la sous-muqueuses et musculuse, voir chapitre II. Ces expériences, réalisées *in vivo*, ont également permis de déterminer que ce passage est rapide et que HcB traverse la barrière intestinale par une voie d'endocytose dépendante de la dynamine.

Les cellules permettant ce passage ont également pu être identifiées en immunohistochimie et en microscopie électronique et semblent correspondre aux entérocytes. Au contraire, HcA, qui est également capable de passer seule à travers la barrière intestinale, cible préférentiellement les cellules entéroendocrines localisées dans les cryptes [Couesnon 2012]. Cette différence de tropisme cellulaire peut être reliée à la variation de séquence en acides aminés observée entre ces deux types de toxines (39% d'identité entre BoNT/A et BoNT/B). De plus, les récepteurs impliqués dans l'entrée de BoNT/A et BoNT/B sont différents, du moins pour l'entrée dans les cellules neuronales (voir II). Il est donc possible que la disponibilité des récepteurs impliqués dans l'entrée de BoNT/A soit plus importante sur les cellules entéroendocrines alors que ceux impliqués dans l'entrée de BoNT/B sont plus abondants sur les entérocytes. Il sera intéressant de réaliser la même étude avec BoNT/E, qui diffère dans son architecture moléculaire des types A et B, mais qui utilise les mêmes récepteurs protéiques que BoNT/A pour entrer dans les cellules neuronales, afin de déterminer s'il existe un tropisme cellulaire différent pour chaque type de neurotoxine.

HcA et HcB semblent toutefois emprunter la même voie d'endocytose pour entrer dans les cellules intestinales. En effet, HcB est détectée dans le cytosol des entérocytes de manière libre ou enfermée dans des vésicules d'endocytose lisses. Les mêmes résultats sont observés pour l'entrée de HcA dans les cellules intestinales m-IC_{d2} [Aurelie Couesnon, Cesare Colasante, Jordi Molgo 2010].

Les cibles neuronales de la sous-muqueuse et de la musculuse ont également pu être identifiées et correspondent aux cibles neuronales de HcA précédemment identifiées dans le laboratoire [Couesnon 2012]. HcB semble cibler préférentiellement les neurones acétylcholinergiques et en moindre quantité, les neurones sérotoninergiques présents dans la sous-muqueuse et la musculuse (voir II). L'acétylcholine est un neurotransmetteur jouant un rôle majeur dans l'activité musculaire et la sérotonine (5-HT) est impliquée dans les réflexes entériques et la propagation du péristaltisme [John Barton Furness 2006] [Epstein 1996]. Ainsi, BoNT/A et BoNT/B pourraient agir *in situ* sur les terminaisons nerveuses de la paroi intestinale et induire une paralysie locale de l'intestin, entraînant les symptômes de constipation et de diminution de transit souvent observés dans les cas de botulisme.

Une autre fonction pourrait être attribuée aux neurones sérotoninergiques. Le modèle

de dissémination des BoNTs dans l'organisme suggère qu'une fois absorbées à travers la barrière intestinale, celles-ci gagnent la lymphe et la circulation sanguine pour être disséminées dans l'organisme. Cependant, ce mode de dissémination est remis en cause. En effet, les symptômes de paralysie flasque descendante observés dans le cas de botulisme ne correspondant pas à une dissémination par voie systémique. Une seconde approche, mise en évidence par l'équipe d'Antonucci et collaborateurs, montre que BoNT/A est transportée et disséminée par un transport axonal rétrograde aux motoneurons et neurones centraux, puis transcytosée aux synapses afférentes [Matak 2012]. Ainsi, BoNT/B pourrait être transportée jusqu'aux motoneurons et neurones centraux via les neurones sérotoninergiques.

Toutefois, il faut noter que tous les types neuronaux présents dans la barrière intestinale n'ont pas été analysés et que BoNT/B pourrait également cibler d'autres neurones tels que les neurones inhibiteurs des muscles longitudinaux et circulaires qui sécrètent entre autres les neurotransmetteurs GABA et VIP. Des expériences complémentaires devraient permettre d'identifier les autres cibles neuronales de HcB dans la paroi intestinale.

Les expériences *in vivo* sont en générale longues et nécessitent de nombreuses répétitions et un grand nombre d'animaux afin de valider statistiquement les résultats obtenus. De plus, il est très difficile de manipuler les mécanismes moléculaires propres de la cellule *in vivo* sans modification génétique préalable.

Une alternative innovante a été développée par Sato et Clevers basée sur la génération d'intestin *in vitro* à partir de cellules souches intestinales [Sato 2009]. Il est admis qu'il est impossible de maintenir des cultures sur le long terme à partir de tissus primaires adultes, sans induire de transformation génétique. Dans ce système, une cellule souches Lgr5+CBC (voir III) isolée à partir d'un intestin humain ou murin, est capable de se multiplier *in vitro* pour former un organoïde intestinal en 3 dimensions, appelé "mini guts" (mini-intestins). Ces organoïdes épithéliaux peuvent être conservés et étendus pendant au moins 1,5 ans sans changer de phénotype ni de caryotype. La génération de ces "mini-guts" est contrôlée par un mélange minimum de facteurs de croissance et de facteurs de transcription composés de R-spondin, d'EGF et de Noggin [Huch 2013]. Ainsi, en modulant les proportions et quantités de ces facteurs de transcription, il est possible de générer des "mini-guts" enrichis en un type cellulaire particulier (voir III).

De plus, ce système de "mini-guts" permet d'effectuer toutes les manipulations moléculaires couramment utilisées en culture cellulaire, incluant la transfection de SiRNA (small interfering RNA), le suivi en imagerie en temps réel et ils peuvent facilement être amplifiés et conservés à froid. Ce système est donc une alternative à l'expérimentation animale et permet de limiter les grandes variabilités biologiques inhérentes aux expérimentations *in vivo*.

Les récepteurs impliqués dans l'endocytose de BoNT/B dans les cellules neuronales et intestinales sont différents

Les études réalisées *in vivo* ont permis de mettre en évidence qu'HcB passe à travers la barrière intestinale préférentiellement par les entérocytes pour rejoindre ces cibles neuronales localisés dans la sous-muqueuse et la musculuse (voir II). Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans cette entrée, des expériences *in vitro* sur lignées cellulaires ont été réalisées.

Un des points clés est l'identification des récepteurs spécifiques permettant l'entrée des toxines botuliques dans les cellules intestinales. Les récepteurs impliqués dans l'entrée des différents types de BoNT ont été identifiés et impliquent des gangliosides GD1b/GT1b et une protéine des vésicules synaptiques (SV2, pour les types A, D, E et F et la Syt pour les types B et G) [Dong 2006] [Peng 2011] [Dong 2008] [Fu 2009] [Dong 2003].

Bien que l'entrée de BoNT/A dans les cellules intestinales et neuronales semblent impliquer les mêmes récepteurs protéiques, l'entrée de HcB semble quant à elle, impliquer des récepteurs différents [Couesnon 2012]. En effet, l'entrée de BoNT/B dans les cellules neuronales nécessite la reconnaissance des gangliosides GD1/b et GT1/b associés à la Syt-I et en plus forte affinité à la Syt-II. Les analyses *in vitro* ont montré que les gangliosides GD1/b GT1/b semblent également avoir un rôle majeur dans l'entrée de HcB dans les cellules intestinales (voir II). En effet les compétitions réalisées en présence de HcBCy3 et d'un mélange de gangliosides enrichis en GD1/b et GT1/b diminuent de 80% l'entrée dans les cellules mais l'ajout de Syt-I ou Syt-II n'accroît pas cette diminution d'entrée. Les gangliosides jouent donc un rôle prépondérant dans l'entrée de HcB dans les cellules intestinales alors que les Syts ne semblent pas être impliquées. Toutefois, il est possible qu'une protéine, différente des Syts, soit impliquée dans l'entrée dans les cellules intestinales.

Le passage à travers les cellules intestinales est une étape clé de l'intoxication. Il est donc important de connaître au mieux les étapes et les mécanismes moléculaires impliqués dans cette entrée. Une fois liées à leur récepteur, les BoNT/s sont internalisées par une voie d'endocytose dépendante de la dynamine dans les cellules neuronales et intestinales (voir résultats). Toutefois, la ou les voies d'endocytose empruntées restent encore à identifier. HcA entre dans les cellules neuronales par une voie dépendante de la clathrine et par une voie indépendante de la clathrine mais dépendante de Cdc42 dans les cellules intestinales [Couesnon 2009]. Des expériences préliminaires semblent montrer que HcB entre dans les cellules neuronales et intestinales par des voies indépendantes des Rho GTPases Cdc42, RhoA et Rac1, mais ces résultats restent à confirmer. Il semblerait donc que HcA et HcB utilisent des voies d'endocytose différentes pour leur entrée dans les cellules. Il sera intéressant d'analyser les voies d'endocytose empruntées par les autres types de toxines afin de déterminer si un mécanisme commun d'endocytose existe au sein des types structurellement proches.

Une autre question non élucidée est la voie endolysosomale empruntée par les BoNTs dans les cellules intestinales. Le modèle d'entrée des BoNTs dans les cellules neuronales implique une acidification des vésicules d'endocytose conduisant à la translocation de la chaîne légère (partie enzymatique de la toxine) dans le cytosol où elle agit sur les protéines SNAREs [Binz 2009]. Toutefois, la voie endolysosomale empruntée dans les cellules intestinales ne devrait pas permettre la translocation de la chaîne légère dans le cytosol, mais uniquement le transport de la toxine entière non dissociée à l'autre pôle de la cellule. En effet, le transport de BoNT/A à travers une monocouche de cellules intestinales n'est pas inhibé par les agents empêchant l'acidification des endosomes [Maksymowych 1998] [Couesnon 2008] [Keller 2004].

Des co-marquages ont été réalisés sur les cellules intestinales et neuronales en présence de HcB mais n'ont pas permis de déterminer clairement la voie endolysosomale empruntée dans ces types cellulaires (voir résultats). En effet, le modèle expérimental, basé sur l'étude de cellules non polarisées, n'est pas le plus pertinent pour l'étude du trafic endolysosomal dans les cellules épithéliales, et des expériences complémentaires sont en cours afin d'identifier la voie empruntée par HcB dans les cellules intestinales polarisées.

Le trafic intracellulaire a été largement étudié sur les cellules non polarisées, mais peu de données sont disponibles concernant le trafic endolysosomal dans les cellules polarisées [Apodaca 2001] [Leung 1999]. De plus, la transcytose des molécules du pôle apical au pôle baso-latéral est très peu décrite dans la littérature. Il est donc difficile de suivre le trafic empruntés par les BoNTs à l'aide de marqueurs spécifiques des endosomes impliqués dans ce transport.

Comme décrit précédemment, l'efficacité de passage des BoNTs à travers une monocouche de cellules intestinales est faible et l'évaluation de ce passage n'est pas toujours facile à détecter et nécessite l'utilisation de modèles animaux [Coesnon 2009]. Une méthode de détection et de quantification par test ELISA, basée sur l'activité protéolytique des BoNTs est en cours de développement dans le laboratoire. Cette technique devrait permettre de quantifier facilement le passage des BoNTs à travers une monocouche cellulaire et de valider l'implication des récepteurs dans le transport des BoNTs biologiquement actives. De plus, les voies d'endocytose ainsi que les voies endolysosomales empruntées par les BoNTs pourront également être investiguées.

Annexes

Matériel et méthode

A.1 Souches bactériennes, milieux de cultures et antibiotiques

Les souches d' *Escherichia Coli* (TOP 10) utilisées pour les constructions des souches recombinantes ont été cultivées en milieu LuriaBertani (LB) (tryptone 10 g/l, extrait de levure 5 g/l, NaCl 5 g/l) et les souches de *Clostridium botulinum* dérivées de la souche Hall A, en milieu TGY (trypticasepeptone 30 g/l, extrait de levure 20 g/l, glucose 5 g/l, Lcystéine-HCl 0,5 g/l, pH 7,5) sous atmosphère anaérobie (N₂ 90%, CO₂ 5%, H₂ 5% à 37°C).

L'érythromycine est ajoutée aux cultures de *C. botulinum* recombinantes à 20 mg/ml et aux cultures de *E.coli* à 300 µg/ml.

A.2 Plasmides et amorces

Le plasmide utilisé pour les constructions des souches recombinantes est le pMRP306 dérivé du pAT19 qui contient un gène de résistance à l'érythromycine [Trieu-Cuot 1991]. pAT19 est un plasmide de 6,6 kb transférable de bactéries à Gram- à différentes bactéries à Gram+. La région promotrice du gène de la toxine ι de *C. perfringens*, un site unique *NcoI*, l'ADN codant un ARNm antisens de *botR/A*, un site *PstI*, et la région 5' du gène de la toxine ι , ont été insérés dans pAT19 et le plasmide obtenu est appelé pMRP306 (Fig. A.6).

Les amorces pour la construction des souches recombinantes ont été dessinées à l'aide du logiciel Primer 3 à la fois pour l'analyse des gènes du complexe botulique et la construction des souches recombinantes.

Les extractions d'ADN plasmidiques ont été réalisées par la méthode de lyse alcaline [Sambrook 1989] pour *C. botulinum* et par le Kit E.Z.N.A Plasmide Miniprep Kit I (OMEGA) pour *E. coli*.

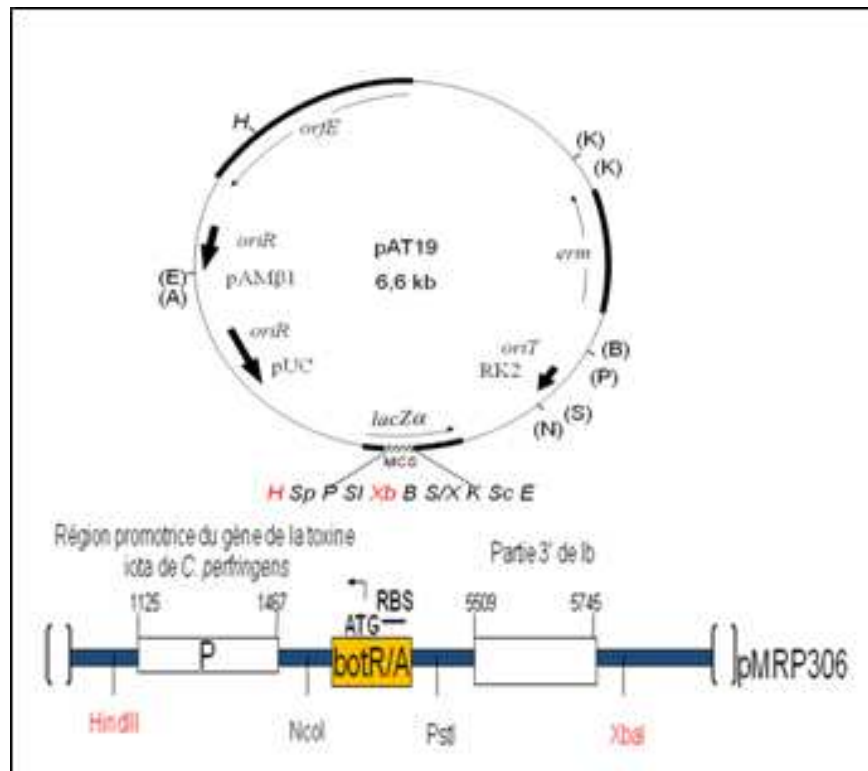


FIGURE A.1 – Structure du vecteur pAT19 et stratégie utilisés pour la construction de pMRP306. Le numéro des séquences proviennent de [Marvaud 1998]. La carte provient du pAT19, [Trieu-Cuot 1991]. Le site de restriction *NcoI* a été ajouté par PCR.

A.3 PCR standards

Les PCR ont été réalisées dans un volume réactionnel de 50 μ l contenant le tampon réactionnel 1X (Invitrogen), 10 mM de dNTP (Invitrogen), 1 μ M de chaque couple d'amorces, 5U de Taq DNA polymérase (Invitrogen) et 10 ng d'ADN chromosomique de la souche Hall A. La réaction de PCR a été réalisée dans un thermocycleur iQ iCycler (Biorad) programmé sur 3 min à 94°C, 30 cycles de PCR (dénaturation 45 s à 94°C, hybridation 45 s à 55°C, élongation 45 s à 72°C), suivis d'une étape finale de 10 min à 72°C.

A.4 Construction des souches recombinantes par la méthode d'ARN antisens

La région contenant le RBS (Ribosome Binding Site) et le début de la phase codante de chaque gène d'intérêt sont amplifiés par PCR avec les couples d'amorces figurant dans le tableau 2 contenant les sites de restriction PSTI (CTGCAG) sur le brin direct et le site de

restriction de *NCOI* (CCATGG) sur le brin indirect Le produit de PCR est digéré par les deux enzymes de restriction *NcoI* et *PstI*, 2H à 37°C et les enzymes inactivées 15' à 65°C. Les produits sont purifiés à l'aide du Kit de purification de PCR QIAquick (Qiagen).

Le plasmide pMRP306 est produit à partir de la souche *E. coli* TOP10/pMRP306 et extrait par lyse alcaline. Après digestion par *NcoI* et *PstI* en présence de RNase dans le tampon 1X NEbuffer 3 (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCL, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7.9, Biolabs), le vecteur a été séparé de l'insert *botR/A* par électrophorèse sur gel d'agarose. La bande correspondant au vecteur (6,6 kb) a été découpée et l'ADN plasmidique extrait à l'aide du kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN). Le plasmide ainsi digéré est ensuite déphosphorylé par ajout d'Antartique Phosphatase (BioLabs) (10µL de phosphatase, 50 µL de buffer 10X et 500 µL de vecteur) et purifié sur colonne QIAquick. Sa concentration est déterminée à l'aide d'un NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Labtech).

L'insert est ensuite cloné dans le vecteur en sens inverse et en aval de la région promotrice (P) du gène de la toxine iota par addition de T4 ligase et de tampon de ligature à 16°C sur la nuit (rapport produit de PCR/vecteur : 4/1). Le mélange de ligature est ensuite introduit dans *E. coli* (cellules compétentes One Shot Top10, Invitrogen) par choc thermique conformément aux instructions du fournisseur. La sélection des clones ayant le plasmide est réalisée sur boîtes LB (agar 15 g/l) contenant 300 µg/ml d'érythromycine incubées une nuit à 37°C.

Les clones ayant récupéré les plasmides sont inoculés dans 5ml de LB en présence de 300 µg/ml d'érythromycine et la culture laissée sur la nuit sous agitation. L'ADN plasmidique est extrait avec le Kit E.Z.N.A Plasmide Miniprep Kit I (OMEGA). La présence de l'insert est vérifiée par PCR puis par séquençage des plasmides à l'aide de l'amorce universelle M13_uni. Les séquences obtenues sont analysées à l'aide du logiciel BioEdit.

Les bactéries compétentes de *C. botulinum* sont préparées à partir d'une culture pendant la nuit. Un total de 10 mL d'une culture phase exponentielle est centrifugé (6000 rpm 5minutes). Le culot est re-suspendu dans 2 mL d'eau ultrapure et l'échantillon est centrifugé à nouveau et repris dans 100 µL d'eau.

L'électroporation est réalisée par ajout de 10 µL de plasmide à 40 µL de bactéries *C. botulinum* Hall A préparées précédemment sur un électroporateur Gene Pulser XCell™ (BioRad) programmée sur 1800V pendant 5ms. Après électroporation, les bactéries sont reprises dans 10 mL de TGY et laissées en culture pendant la nuit en milieu anaérobie. Le lendemain, la culture est centrifugée et les bactéries étalées sur boites TGY contenant 5 µg/mL d'érythromycine pour sélectionner les clones recombinants.

Les clones candidats sont mis en culture en milieu liquide et la présence du plasmide

contenant l'insert est vérifiée par extraction plasmidique par lyse alcaline. La présence de l'insert est vérifiée par PCR avec les amorces utilisées pour la production des ARNm antisens (voir Fig A.3) et visualisé sur gel d'agarose 1,5%.

A.5 Croissance bactérienne et test de viabilité des souches de *C. botulinum*

Les cinétiques de croissance des souches recombinantes de *C. botulinum* Hall A sont réalisées sous atmosphère anaérobie (chambre de Freiter, Jacomex) à 37°C. La cinétique est mesurée toutes les 2 heures jusqu'à 12 h et à 24 h et 48 h pour les souches contrôles (Hall/pAT19, Hall/306, Hall/309) et à 8 h, 12 h, et 24 h pour les souches recombinantes.

La croissance est suivie par mesure d'absorbance à 600 nm grâce à un spectrophotomètre Ultraspec 1000 (Pharmacia Biotech). Après centrifugation, les surnageants de culture sont conservés à -20°C pour les tests de létalité sur souris et les tests ELISA. Les culots bactériens sont conservés à -80°C pour les qRTPCR.

La viabilité des souches recombinantes est évaluée par comptage d'Unités Formants une Colonie (UFC) par dilution à 4 h, 8 h, 12 et 24 h sur gélose TGY (0,1ml sur chaque boîte, 3 boîtes par dilution) et incubé à 37°C en condition anaérobies.

A.6 Microscopie électronique en transmission

Les souches recombinantes présentant une accélération de croissance et une viscosité importante des milieux à 8 h de culture sont analysées en microscopie électronique en transmission par la Plateforme de Microscopie Ultrastructurale (PFMU, Imagopole, Institut Pasteur).

A 12 h de cultures, les culots de souches recombinantes sont obtenus par centrifugation puis sont re-suspendus dans du milieu. La suspension concentrée est aspirée dans un tube capillaire en cellulose (Leica microsystems, Vienne, Autriche). Des tubes de moins de 2 mm sont coupés et fermés à l'aide d'un scalpel modifié puis placés dans des planchettes de 200 µm de profondeur remplies d'exadecen.

Les suspensions bactériennes sont ensuite cryo-immobilisées à l'aide du HPM10 : congélateur haute pression (BalTec, aujourd'hui Abra Fluid AG, Widnaw, Suisse) puis transférées dans l'azote liquide pour être ensuite substituées à froid dans 1% tetroxide d'osmium (Merk, Dramstadt, Allemagne) contenant 0,5% de glutaraldehyde (EMS, Htfield, USA) et 0,2% d'acétate d'Uranyle (SPI, West Cherster, USA) en acétone avec

Souches recombinantes	Numéro d'accension Gene Bank	Séquences des amorces (5' -> 3')
Hall/651	RR CLC_1229 (SHK CLC 1230)	CCGCTGCAGGGAAAAAATGTTGTTAGTATTTTTCATG CCCCATGGTCATTATCCTCACAAATCATTACTC
Hall/652	SHK CLC_0669 (RR CLC 0668)	CCGCTGCAGAAGCTTGATAAGGAGATGAAAAATAATG GGCCATGGATACCAAAAGATATATTGAAATGATTAAC
Hall/653	SHK CLC_3251 (RR CLC 3250)	CCGCTGCAGGAGAAAATTTATGATATATATACAATTATTAG CCCCATGGCAGATTTGTTTTTAATAAATTTATTAAG
Hall/660	RR CLC_1431 (SHK CLC 1432)	CCGCTGCAGCAGGAGTGATATATATGAGTTATAAG GGCCATGGCTACTAGTGCTTCGTATCC
Hall/661	RR CLC_2236 (SHK CLC 2235)	CCGCTGCAGGCGGATAAGAATGGTTAAGAT GGCCATGGCCCGTCTACCATTATTGCTTTTAC
Hall/662	Orphan RR CLC 2624	CCGCTGCAGGAGTGATTCAATTGAATAAAAATTAAG GGCCATGGCTGTATCTATTACTTCTAAATCATTTC
Hall/663	RR CLC_0376 (SHK CLC 0377)	CCGCTGCAGCCTATAATGAATAAGGAGAAAATG GGCCATGGCTATCTTTACATCAAATCCATATTAG
Hall/664	RR CLC_2386 (SHK CLC 2385)	CGCTGCAGGAGGGGTACCATGGCTATGGAA GGCCATGGCCATTCAAAGCACAAATACAGTTATAAC
Hall/666	RR CLC_1871 (SHK CLC 1870)	CCGCTGCAGAGGTGTTTATATGCAGGAAAA GGCCATGGCTTCTCTACCATTACTAGCTGTAATAAC
Hall/667	RR CLC_0842 (SHK CLC 0843)	CCGCTGCAGGGGGATTTTGACAAAAATATTATTAG GGCCATGGCTCTTTAACTTCATAATTTCTTGTT
Hall/673	SHK CLC_0306 (RR CLC 0307)	CCGCTGCAGGTGAGAATATGAGAAAAGCAATGAAGC GGCCATGGTTTCCAGTCATCCATGAAACAACAAAAG
Hall/706	RR CLC_1640 (SHK CLC 1639)	CCGCTGCAGAAAGGATGGGACAAGTATGATTG GGCCATGGCCATCTTTAGCTTTAAAAACAGTTATACC
Hall/707	RR CLC_1093 (SHK CLC 1094)	CCGCTGCAGGGAGAGAAAGATATGAAGAACTC GGCCATGGCCATCCATTGCAGTTATCACTTCATAATC
Hall/707	SHK CLC_1094 (RR CLC 1093)	CCGCTGCAGATTTGGAGGAAAAAATTAATG GGCCATGGATCCTCTTTATACATATCTTC
Hall/708	RR CLC_0423 (SHK CLC 0424)	CCGCTGCAGGAGATGATTAAGAAATGTCAGCAG GGCCATGGATGCCTTTAAAGTTATATAACCTTCATTG
Hall/714	RR CLC_1914 (SHK CLC 1913)	CCGCTGCAGGAGATGGATTACAATGCCAAAGAG GGCCATGGCCACCTCCACTAAATATCCACTTTCC
Hall/714	SHK CLC_1913 (RR CLC 1914)	CCGCTGCAGTAAGGGGAGTGGGGTATAAAA GGCCATGGATTTATATCTAATTTAGG

FIGURE A.2 – Amorces utilisées pour la construction des plasmides recombinants dérivés de Hall/306 et comportant les ADN codants pour les ARN antisens des gènes régulateurs.

Souches recombinantes	Numéro d'accèsion Gene Bank	Séquences des amorces (5' -> 3')
Hall/716	RR CLC_2079 (SHK CLC 2078)	CCGCTGCAGGGAGGTAGAGTAAGTAATGAAAAAAATTC GGCCATGGCTCTACAGGTGCATTTACTTCGTATCC
Hall/717	RR CLC_1415 (SHK CLC 1414)	CCGCTGCAGGGGAAAAATAAAATGAATAAAAACTAATA GGCCATGGCCGGCAAGACCTACAACCTCAATATCATTG
Hall/720	RR CLC_0354 (SHK CLC 0355)	CCGCTGCAGGGGTGATAAATATGGGAAGAAAAGTC GGCCATGGTTACTTCATACCCCTCACGTTGTAGATAC
Hall/722	RR CLC_3521 (SHK CLC 3520)	CCGCTGCAGGAGGATATACCAATGGAAGG GGCCATGGTGTCTGATCCTGAAITTTCCAAATAC
Hall/723	RR CLC_1024 (SHK CLC 1025)	CCGCTGCAGAGGGATTAATATGGATGCAATATCTTT GGCCATGGCCTTCTTTTTTAAGTACTGTTCTTATTAATC
Hall/724	RR CLC_1088 (SHK CLC 1089)	CCGCTGCAGAAGGTGAAATAAATGAGTAAACATTTTAAT GGCCATGGTAGTGCAATATACTTTATATCCTTCTTTC
Hall/1001	Orphan RR CLC_0632	CTGCAGAACTAATAAAAGGGAGGACAT CCATGGCTTTAATAAATTTTTATTAGAT
Hall/1002	RR CLC_1105 (SHK CLC 1104)	CTGCAGTACTTACTTTGGAGGTGATTC CCATGGTTTTTTAATCGTAAAGCTTC
Hall/1003	RR CLC_0665 (SHK CLC 0666)	CTGCAGATATAATTGGAGGAAAATATG CCATGGTTAAACACATTATACCCCTCA
Hall/1004	RR CLC_0331 (SHK CLC 0232)	CTGCAGTATTTAGAGGAGATTTTCTA CCATGGTATACAAAATTATCACAACC
Hall/1140	RR CLC_0323 (SHK CLC 0324)	CCGCTGCAGGTACCTATATGGAGGTATAATTTATG GGCCATGGCCTCATTITTTCTAAATACAATTTATAAC
Hall/1141	Orphan RR CLC_0958	CCGCTGCAGAACCTATTAATAAAAGGAGGTCTAGATAATG GGCCATGGCCATTTTTATTAAGTACTGTAC
Hall/1142	RR CLC_2212 (SHK CLC 2211)	CCGCTGCAGATATAAGGTGATATTATGGAAAGG GGCCATGGCGTATCCTTCTTTTATCAAGG
Hall/1143	Orphan RR CLC_0577	CCGCTGCAGTTAAATATGAGAGTGATAAGCGTGC GGCCATGGTTTATGTCTTTTTCTCTAAAAGATC ₆
Hall/1144	Orphan RR CLC_0580	CGCTGCAGTAGGGAAGGATAAAAATTTATGGTAAAAG GGCCATGGCTTTATCCAAAATGAATATGGAAACG
Hall/1145	SHK CLC_1867 (RR CLC 1866)	CCGCTGCAGATGGGGGGGAATTAGTTTGGC GGCCATGGGCTTCTATACTTCTTAAATATATTTTC
Hall/1146	RR CLC_0661 (SHK CLC 0663)	CCGCTGCAGAAGCAATAGGAGGAATTTATAATGG GGCCATGGATCCATCCGCTCTTAGAGCAG
Hall/1146	SHK CLC_0663 (RR CLC 0661)	CCGCTGCAGAGGAATTCAGAAGCATAAC GGCCATGGTAACTATAAAATGTTCC
Hall/1147	RR CLC_0410 (SHK CLC 0411)	CCGCTGCAGTGAGGTGAAGCCATGG GGCCATGGCTGCTTCTATTACATCAAAAATTGTTTCATC
Hall/1148	RR CLC_3294 (SHK CLC 3293)	CCGCTGCAGAGGGGGAGTGCTAATTGAG GGCCATGGACATCATATCCTTCTTTAAT

FIGURE A.3 – Amorces utilisées pour la construction des plasmides recombinants dérivés de Hall/306 et comportant les ADN codants pour les ARN antisens des gènes régulateurs suite.

2% d'eau, dans l'appareil à substitution à froid (Leica Microsystems, Vienne, Autriche).

La substitution se fait pendant 48 h à - 90°C, les échantillons sont ensuite réchauffés de 2°C par heure jusqu'à - 30°C (pendant 8 h) et ensuite chauffés jusqu'à 0°C avant d'enlever le milieu de substitution et de les enrober dans la résine. Après polymérisation à chaud, de fines coupes (70 nm) sont faites avec un microtome Ultracut UCT (Leica Microsystems, Vienne, Autriche) et sont collectées sur des grilles 200 Mesh en cuivre cotées avec du formvar.

Après contraste à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb (Reynold), les coupes sont observées au microscope électronique à transmission JEM 1010 équipé d'une caméra Keen View (Olympus, Soft Imaging systems, Münster , Germany) à 80KV .

Ces tests ont été réalisés à 12 h de croissance et ont nécessité des échantillons fraîchement préparés, non congelés.

A.7 Détection et quantification de la toxine botulique par test ELISA

Des tests ELISA (Enzyme- Linked Immunosorbent Assay) de type sandwich ont été réalisés avec des surnageants de culture des souches de *C. botulinum* prélevés lors des cinétiques de croissance.

Les puits de plaques de microtitration (96 puits, Maxisorp, Nunc Roskilde, Denmark) ont été sensibilisés avec 100 µL par puits d'anticorps monoclonal Mab G14-3 anti HcBoNT/A (5 µg/ml en tampon carbonate 0,05 M pH 9,6) et incubés pendant la nuit à 4°C. Les cycles de lavages sont réalisés dans un laveur de plaque automatique (Bio-Tek, Washer 120).

Les plaques subissent 3 cycles de lavage en tampon PBS-Tween (0,1%) (PBST), puis sont saturées avec 100 µL par puits de BSA (2% en tampon carbonate) pendant 30 min sous agitation (500-700 rpm). Après 3 nouveaux cycles de lavage en PBST, 100 µl les échantillons sont déposés et dilués en série de 2 en 2 dans 100 µl de tampon PBS-Tween (0,1%)-BSA (1%) puis incubés 1 h à température ambiante sous agitation (500-700 rpm).

Après 3 cycles de lavage en PBST, 100 µl d'anticorps polyclonal de lapin (anticorps secondaire, production interne n°54, 5ème immunisation) dilué au 1/1600 dans du PBS-Tween-BSA ont été déposés par puits et les plaques ont été incubées 1 h à température ambiante sous agitation. Après 3 cycles de lavage, dans chaque puits sont déposés 100 µl d'anticorps de chèvre anti-Ig de lapin couplé à la peroxydase (111-035-006, Jackson Immunoresearch) dilués au 1/5000 en PBS-Tween-BSA et les plaques sont incubées 1 h

sous agitation.

Après 3 nouveaux cycles de lavage en PBST, la révélation a été effectuée par addition de 100 μl d'une solution de citrate 0,05 M pH5 contenant 0,06% d' H_2O_2 et 1 mg/ml du substrat OPD (ortho-phénylène-diamine, Sigma). Les plaques sont maintenues à l'obscurité 7 min et la réaction arrêtée par addition de 50 μL d' HCl 3N. L'absorbance est mesurée à 490 nm à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de microplaques (Biorad, modèle 680).

A.8 Dosage de la toxine botulique par détermination de LD50

Les tests *in vivo* de létalité sur souris sont réalisés par série de 10 dilutions en tampon (50 mM tampon phosphate pH 6,5 contenant 1% de gélatine (PB-G)) d'un surnageant d'une culture de 24 h et 0,5ml sont injectés par voie intrapéritonéale dans des souris Swiss (entre 20 et 22g, Charles River). L'apparition de symptômes ainsi que la mortalité sont observées jusqu'à 4 jours après l'injection.

A.9 Western Blot

Les protéines sont précipitées à partir de 1800 μl d'un surnageant de culture à l'acide sulfurique (pH 3,5) et la solution est centrifugée 20 min à 18000 rpm. Les culots sont re-suspendus dans 200 μl de tampon Laemmli 5X préalablement chauffé à 90°C et les échantillons sont incubés 5 min à 90°C. Un total de 15 μl d'échantillon est déposé sur un gel SDS PAGE 10%.

Les anticorps utilisés pour la détection et les procédures d'immunoblotting sont les mêmes que ceux décrits précédemment [Marvaud 1998]. Les anticorps sont ensuite détectés grâce à un anti-lapin IgG couplé à la phosphatase alcaline. La révélation se fait avec l'ECFTM Substrate pour Western Blotting (Ge Healthcare) et la fluorescence observée grâce à un scanner à fluorescence Typhoon FLA 9500 (Fluoroimager/Phosphoimager, GE Healthcare). Les bandes obtenues sont quantifiées par le logiciel Image J.

A.10 Extraction d'ARN, reverse transcription

A chaque temps de cinétique, 10 ml de la culture sont prélevés et centrifugés 5000 rpm pendant 2 minutes à 4°C. Les culots sont resuspendus dans 460 μl de solution de resuspension + EDTA (glucose 10%, Tris 12.5 mM pH 7,6, EDTA 5mM). Les cellules sont cassées à l'aide du FastPrep (MP biomedical) après ajout de 500 μl de phénol acide (2 cycles de 30 s à vitesse

6,5) et les ARNs ont été extraits par traitements successifs au Trizol et au chloroforme/alcool isoamylique (24V/1V). Les ARNs ont été précipités à l'isopropanol et le culot repris dans 50 µl de Tris 10 mM pH 8, EDTA 0,1 mM.

Après traitement à la TURBO DNase (Ambion), la quantité d'ARN extrait a été dosée par mesure d'absorbance à 260 nm (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer). Les ADNc sont synthétisés par réaction de Reverse Transcription (RT) à l'aide du kit M-MLV Reverse Transcriptase selon les recommandations du fournisseur (Invitrogen). Les amorces hexamères aléatoires (pDN6, 5 µg/µL), les 4 désoxyribonucléotides (10 mM chacun) ainsi que la RNase OUTTM Recombinant Ribonuclease Inhibitor proviennent de Roche Boehringer, Amersham Biosciences, et Invitrogen respectivement. Chaque extrait est dilué en eau traitée au DEPC à 200 ng/µl et analysé par le système Agilent 2100 Bioanalyser, à l'aide du kit RNA 6000 Nano Reagents & Supplies (Roche).

A.11 PCR en temps réel

Pour la RT-PCR quantitative (qRT-PCR), les concentrations en ADN complémentaire (ADNc) utilisées ont été choisies de façon à ce que le cycle seuil (Ct, Cycle threshold) soit compris entre 15 et 30.

Pour chaque couple d'amorces utilisées pour les gènes d'intérêt, un gradient de température à été réalisé sur une gamme de dilution d'ADN chromosomique de la souche *C. botulinum* Hall/A (1,5 pg à 150 ng) afin de déterminer la température optimale d'hybridation donnant la meilleure efficacité de PCR et permettant de détecter le plus de points de gamme.

Le volume réactionnel (25 µl) contient le mélange SYBR Green Supermix (Bio-Rad) (iTaq ADN polymérase 1,25 U, dNTP 0,4 mM chacun, MgCl₂ 6 mM, SYBR Green I 20 nM), 0,5 µM de chaque amorce et l'ADNc cible. Le thermocycleur est programmé sur 8 min 30 s à 95°C, et 40 cycles de PCR (dénaturation 15 s à 95°C, hybridation 15 s à 51°C pour Ha34 et BotR/A et 65°C pour NTNH et *rpoB*, élongation 15 s à 72°C). Une courbe de fusion est réalisée en fin de cycle pour vérifier la spécificité de l'amplification selon le programme suivant : 1 min à 55°C puis une augmentation progressive de la température jusqu'à 95°C à raison de 0,5°C par seconde.

L'amplification est réalisée sur les gènes du locus botulique (*bont/A*, *botR/A*, *ntnh* et *ha34*) ainsi que sur le gène de référence *rpoB*, grâce aux amorces répertoriées dans le tableau 2. La concentration d'ADNc utilisée est de 30 ng. Les résultats sont analysés à l'aide du logiciel iCycler iQ Real-Time PCR Detection System Software Version 3.0 (Bio-Rad) et exprimés en valeur de Ct, qui est défini comme le nombre de cycles d'amplification nécessaires

Gene	Primer*	Séquence (5'-3')	Product length (bp)
<i>rpoB</i>	D	TTCCTCCATCGCTATCTCGT	175
	I	AAACATGCAACGTCAAGCAG	
<i>bont/A</i>	D	AATGGTTATGGCTCTACTCAATAC	134
	I	GCTAATGTTACTGCTGGATCTG	
<i>botR/A</i>	D	TGACAACGAGGAGTTTCAAGA	146
	I	TGAAATTGCTCAAATCAACTTTTT	
<i>ha34</i>	D	AAGTCGTACAACAAGTGGATATG	148
	I	GTTAGAACTCCGTTTGAAAGTATTG	
<i>ntnh/A</i>	D	AATGTTGTAGTAGTTAGAGCTAG	107
	I	CTCAAAGATTGCGCCATAATATC	

FIGURE A.4 – Amorces utilisées pour l'amplification par PCR temps réel des fragments internes des gènes cibles du locus botulique.

50 °C x 65 °C	PCR efficiency (%)	50 °C x 65 °C	PCR efficiency (%)	50 °C x 65 °C	PCR efficiency (%)
<i>bont/A</i>		<i>ntnh</i>		<i>rpoB</i>	
68 °C	95	68 °C	83,2	68 °C	100
67 °C	94,1	67 °C	89,3	67 °C	99
65,1 °C	99,6	65,1 °C	96,5	65,1 °C	105,1
61,7 °C	87,1	61,7 °C	88,4	61,7 °C	94,6
57,6 °C	82,6	57,6 °C	79,9	57,6 °C	89,1
54,4 °C	77,6	54,4 °C	70,3	54,4 °C	93,5
52,1 °C	79,8	52,1 °C	99,6	52,1 °C	87,9
51 °C	74,5	51 °C	174,2	51 °C	79,2
<i>botR/A</i>		<i>ha34</i>			
68 °C	159,5	68 °C	123,7		
67 °C	106,8	67 °C	100,9		
65,1 °C	155,6	65,1 °C	113,5		
61,7 °C	99,1	61,7 °C	120,5		
57,6 °C	108,1	57,6 °C	114,1		
54,4 °C	96,2	54,4 °C	98,2		
52,1 °C	95,8	52,1 °C	107,9		
51 °C	95,6	51 °C	105,3		

FIGURE A.5 – Gradient de température et efficacité de PCR correspondantes pour chaque couple d'amorces des gènes d'intérêt.

pour que la fluorescence dépasse le seuil de détection du fluorimètre. Le Ct est inversement proportionnel au logarithme du nombre initial de molécules. La valeur du Ct a été normalisée par rapport à celle du gène de référence, *rpoB*, choisi pour sa stabilité d'expression au cours du temps et sa présence en monocopie dans le génome. L'expression relative est calculée grâce à la formule suivante : $R = (1 + E_{cible})^{C_{cible}(calibrateur) - C_{cible}(échantillon)} (1 + E_{réf})^{C_{réf}(calibrateur) - C_{réf}(échantillon)}$ E, efficacité de PCR pour chaque couple d'amorce

Calibrateur, condition témoin (souche Hall/pAT19 à 4 h de croissance)

Echantillon, souches recombinantes de Hall A étudiées [9]

Réf, gène de référence *rpoB*

Cible, gène d'intérêt (*bontA*, *botR/A*).

A.12 Analyses statistiques

Les différences entre souches sont évaluées par le t-test de Student où les valeurs sont estimées statistiquement significatives pour $*P < 0,05$ et $**P < 0,005$.

A.13 Production et purification des protéines recombinantes et domaines Hc des toxines botuliques

Pour l'étude sur cellules mais également sur souris, nous n'utilisons que la partie de la toxine décrite pour permettre l'entrée et l'internalisation de la toxine dans les cellules neuronale (fragment Hc) que nous marquons au Cy3.

Les protéines recombinantes HcA, HcB, HcC, HcE et HcTetX sont produites et purifiées à partir du plasmide pET-28a-c(+) contenant l'ADN pour ces différents fragments insérés entre les sites de restriction BamHI et Sall pour les souches contenant les fragments HcB, HcC et HcE; entre BamHI et Hind III pour le fragment HcA et entre BamHI et NotI pour HcTetX. Une pré-culture réalisée sur la nuit des souches est réalisée dans 25 mL de LB contenant 50 µg/mL de kanamycine. Le lendemain, 20 mL de la pré-culture sont ensemencés dans 1 l de LB contenant de la kanamycine (50 µg/mL), L'induction de la production est réalisée à DO 0,8 par ajout d'IPTG (1 M). La culture est incubée sur la nuit à 23°C.

Le lendemain, la culture est centrifugée 10 minutes à 8000 rpm et le culot repris dans 10 mL de tampon Hepès 20 mM NaCl 150 mM pour HcB, C et tetX et 300 mM pour HcA et HcE, contenant des inhibiteurs de protéases 100 U (Complete, Mini, EDTA-free, Roche) et du lysosyme (1 mg/ml, Sigma). Après incubation sous agitation pendant une 1/2 heure

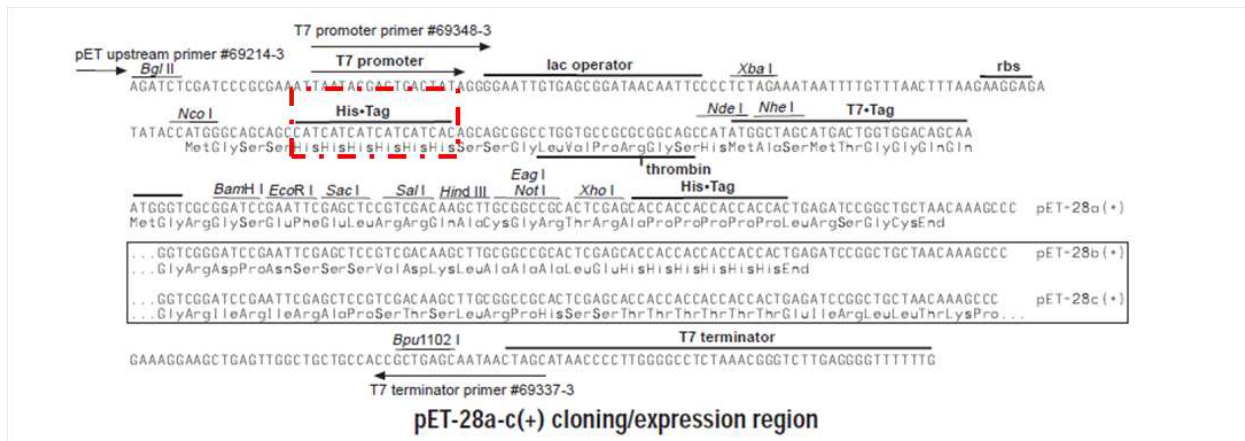
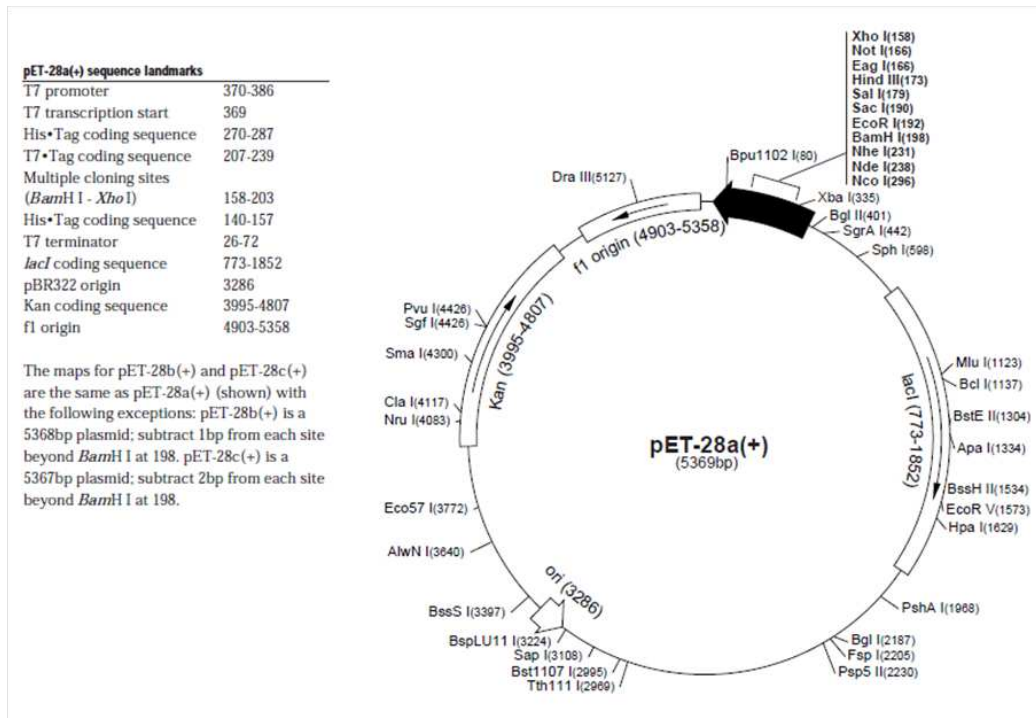


FIGURE A.6 – Le clonage est réalisée dans des souches d’E.Coli BL21 codon + (Stratagene, Agilent technology).

à température ambiante, la solution est ensuite soniquée à froid. Les cellules ainsi cassées, sont transférées dans un falcon (BD Bioscience) 50 ml, centrifugée 15 minutes à 15000rpm et le culot séparé du surnageant.

La purification des protéines se fait sur colonne Talon (BD TALONTM Metal Affinity Resins, BD Biosciences Clontech) selon les recommandations du fournisseur. La colonne est équilibrée avec le surnageant de cellules 1h à 4°C sous agitation. Les lavages sont réalisés en tampon Hepès NaCl et tampon contenant 5mM ou 10 mM d’imidazole. L’élution de la

A.14. Marquage fluorescent des protéines recombinantes des fragments Hc.291

protéine se fait dans 10 ml de tampon à 150 mM d'imidazole et chaque fraction de 1 ml est dosée par la méthode de Bradford et à l'aide d'un NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer. La pureté de la protéine est évaluée sur gel SDS PAGE 10%.

Les ADN codants pour les protéines recombinantes de la partie luminale L4 de SV2C (acide aminés 454 à 579) et les acides aminés 8 à 61 de la Synaptotagmine II sont amplifiés et clonés dans le vecteur pGEX-2T contenant la protéine de fusion GST. Les plasmides sont ensuite clonés dans les souches *E. coli* BL21 et purifiés sur une colonne glutathion sépharose (Glutathione Sepharose High Performance, Ge Healthcare), équilibrée en tampon Tris-HCL 50 mM NaCl 300 mM à pH 7.5 et éluée à 40mM de glutathion réduit dans le même tampon. Les protéines sont ensuite dialysées contre du tampon PBS avant utilisation. Après purification, les fragments Hc obtenus sont dialysés contre du tampon carbonate (0,1M) contenant 0.05M de carbonate de sodium et 0.05M de bicarbonate de sodium sur la nuit en cassette de dialyse (Slide-A-Lyzer dialysis Cassette, Thermo Scientific).

Les protéines sont ensuite dosées et concentrées jusqu'à 1mg/ml en colonne Vivaspinn 2 (Sartorius).

A.14 Marquage fluorescent des protéines recombinantes des fragments Hc.

Le marquage est réalisé sur les résidus lysine avec le kit Amersham Cy3 Mono-Reactive Dye Pack (Ge Healthcare) selon les recommandations du fournisseur. Le marqueur libre est ensuite séparé de la protéine marquée à l'aide d'une colonne de dessalage ZebaTM Desalt Spin Columns (Thermo Scientific). La colonne est préalablement lavée en tampon carbonate et la protéine marquée est récupérée selon les recommandations du fournisseur. En sortie de colonne, la protéine est centrifugée 5 minutes à 18000 rpm et dosée au NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer et le taux de protéine marquée évaluée (programme Protein and Label).

A.15 Anticorps et drogues utilisées

Les anticorps utilisés pour l'étude sont répertoriés Fig.A.7

Anticorps et drogues	Espèce	Provenance	Conditions d'utilisation
<i>Drogues</i>			
Dynasore Hydrate		Sigma-Aldrich	80µM 30'
<i>Anticorps</i>			
WGA alexa 488	<i>primaires</i>	Invitrogen	1/500 sur tissus
UEA1FITC	<i>Ajonc</i>	Sigma	1/500 sur tissus
Anti- Chromogranine	<i>Lapin</i>	abcam	1/250 sur tissus
Anti-Synaptotagmine 1	<i>Lapin</i>	abcam	1/250 sur tissus
Anti-SV2A	<i>Lapin</i>	Synaptic System	1/250 sur tissus
Anti-SV2B	<i>Lapin</i>	Synaptic System	1/250 sur tissus
Anti-SV2C	<i>Lapin</i>	Production interne	1/250 sur tissus
Anti-SNAP-25	<i>Souris</i>	Covance	1/250 sur tissus
Anti-SNAP-25 clivé	<i>Souris</i>	Don Christian	1/250 sur tissus
Anti-Sérotonine	<i>Chèvre</i>	Lévêque	1/1000 sur tissus
Anti-Lysozymes	<i>Lapin</i>	abcam	1/200 sur tissus
Anti-Neurofilament 200	<i>Lapin</i>	DAKO	1/250 sur tissus
Anti-CHAT	<i>Chèvre</i>	Sigma Aldrich	1/100 sur tissus
Anti-M cells Vili	<i>Rat</i>	Millipore	1/200 sur tissus
Anti-E cadherine ECCD2	<i>Rat</i>	MACS Miltenyi	1/250 sur tissus
Anti Lapin Alexa 647	<i>Anticorps</i>	Biotec	1/250 sur tissus
Anti Rat Alexa 647	<i>secondaires</i>	Invitrogen	1/250 sur tissus
Anti Chèvre Alexa 647	<i>Chèvre</i>	Invitrogen	1/250 sur tissus
Anti Chèvre Alexa 488	<i>Chèvre</i>	Invitrogen	1/250 sur tissus
Anti Lapin Alexa 488	<i>Singe</i>	Invitrogen	1/250 sur tissus
Anti Rat Alexa 488	<i>Singe</i>	Invitrogen	1/250 sur tissus
Hoechst	<i>Singe</i>	Invitrogen	1/1000 sur tissus
BisBenzimide H 33342 trihydrochloride	<i>Chèvre</i>	Invitrogen Sigma Aldrich	

FIGURE A.7 – Anticorps et drogues utilisés pour l'étude.

A.16 Types cellulaires et conditions de culture

Deux types cellulaires sont étudiés, un type neuronal utilisé comme contrôle et un type de cellules épithéliales de cryptes utilisé comme modèle d'étude. La lignée cellulaire NG108-15 au départ nommée 108CC15 a été développée en 1971 par Bernd Hamprecht. Cette lignée est issue d'une fusion d'un neuroblastome N18TG2 de cellules de souris et d'un gliome de rat C6-BU-1 en présence du virus Sendai inactivé. Ces cellules sont cultivées en DMEM enrichi en Glutamax contenant 5% de Sérum de Veau Fœtal (SVF, Gibco), 1% d'antibiotique (Pénicilline/Streptomycine, Invitrogen) et 1% d'Acides Aminés Non essentiels (NEAA, Non Essential Amino Acids Sigma).

Le second type cellulaire utilisé est la lignée m-IC_{cl2} (Intestinal Crypt-like Cell Line mICcl2) provenant de la base des villosités de l'intestin grêle d'un fœtus d'une souris transgénique L-PK/Tag1 âgée de 20 jours. Ces cellules maintiennent un phénotype de cellules de cryptes et ont été généreusement données par Alain Vandewalle. Le milieu de culture utilisé est composé de HAMF's 12 (Gibco), Insuline (Sigma, 5 µg/ml), Dexaméthasone (Sigma, 5.10⁻⁸M), Sélénium (Sigma, 60 nM), Transferrine (Sigma, 5 µg/ml), Triiodothyronine (Sigma, 1.10⁻⁹), Epidermal Growth Factor (EGF, Sigma, 10 ng/ml), HEPES (Sigma, 1 mM), Glutamine (Gibco, 2 mM), SVF décomplémenté (Gibco, 2%), et du D-Glucose (Sigma, 11,2 ml pour 500ml de milieu).

Les cellules sont cultivées à 37°C avec 5% de CO₂ en flasque de 25 cm². Les milieux sont changés tous les 2 jours et les cellules passées une fois par semaine. Le passage des m-IC_{cl2} se fait par ajout de Trypsine EDTA (Sigma Aldrich), 2 ml par flasque de 25 cm² et incubées 10' à 37°C. Les cellules sont alors récupérées et lavées dans 10 ml de milieu. Après centrifugation (5 minutes à 400 rpm) le culot est repris dans 1 ml de milieu et diluées au 1/10. Pour les NG108-15, l'ajout de Trypsine EDTA n'est pas nécessaire il suffit de tapoter sur la boîte pour décoller les cellules.

A.17 Préparation des lamelles pour l'étude sur l'entrée des fragments Hc

Les cellules sont préparées la veille de l'expérience. Les cellules sont trypsinisées puis comptées à la cellule de Malassez. Un total de 5.10⁴ cellules/ml est déposé sur lamelle de verre ronde. Dans le cas des NG108-15, les lamelles sont préalablement adsorbées en PLO (Poly-L-Ornithine, Sigma Aldrich).

Les cellules sont incubées pendant la nuit et l'expérience n'est réalisée que le lendemain,

après avoir observé la morphologie et la densité cellulaire au microscope

A.18 Transfections

Les plasmides utilisés pour les transfections des dominants négatifs ont été généreusement donnés par C. Lamaze pour les plasmides codants pour GFP-Cdc42T17N et GFP-RacT17N, et par Dr. G.M Bokoch pour le plasmide His6-Rho T19N. Les séquences codantes les dominants négatifs de RhoA et Rac1 sont clonées dans pCDNA3 et celui pour cdc42 dans EGFP. Les plasmides ainsi obtenus sont introduits dans des *E.coli* Top10 selon les recommandations du fournisseur.

Une pré-culture des souches codant pour ces dominants négatifs est réalisée pendant la nuit et les plasmides extraits à l'aide du kit Endotoxin-free plasmid DNA purification (Machery-Nagel).

Les transfections dans les cellules sont réalisées à l'aide d'un transfectant de type lipidique (X-tremeGene HP, Roche) suivant un protocole modifié. La formation des complexes transfectant/ADN est réalisée selon les recommandations du fournisseur (5 μg d'ADN avec 15 μl de transfectant incubé 30 min à température ambiante) mais les complexes sont mis en contact avec les cellules en suspension (1.10^5 cellules/ml) pendant 6 h à 37°C sur une boîte de culture ne permettant pas l'adhésion des cellules.

A la fin de l'incubation, les cellules sont récupérées, lavées 2 fois en milieux, comptées à la cellule de Malassez et 5.10^4 cellules/ml sont déposées sur lamelle de verre. L'observation se fait après 18 h d'incubation.

Grâce à cette technique, le taux de transfection obtenu est proche de 40% pour cdc42 et de 20% à 30% pour RhoA et Rac1 avec des complexes résiduels facilement éliminés.

A.19 Préparation des lamelles pour l'analyse microscopie

Pour les tests d'internalisation des protéines recombinantes des fragments Hc, un total de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Hc fluorescent est ajouté à chaque lamelle et incubé le temps désiré. Pour les tests de compétition, la même quantité de fragment Hc est pré-incubée en présence du compétiteur présent en excès (10 fois plus que la protéine Hc en molarité) pendant 30 min à température ambiante. Le mélange est ensuite appliqué sur les cellules.

Puis, les cellules sont lavées 3 fois en PBS pour les m-IC_{cl2} et HBSS pour les NG108-15 et fixées au paraformaldéhyde (PFA 4%) pendant 20 min à température ambiante. Les lamelles

sont ensuite lavées en PBS et l'autofluorescence est éteinte par ajout de NH₄Cl (50 mM) pendant 20 min toujours à température ambiante.

Si nécessaire, les anticorps sont incubés pendant 1 h à température ambiante en PBS BSA 0,5%. Le Hoechst est incubé 1 min sur les cellules.

Après 3 lavages en PBS et un lavage en eau, les lamelles sont montées sur lame de verre avec 9 µl de milieu de montage (Fluoromount, FluoProbes). Les lames ne sont analysables au microscope que le lendemain.

A.20 Tests des anses intestinales ligaturées

A.20.1 Types de souris utilisés

Pour l'étude *in vivo*, 2 types de souris ont été utilisés : des souris Swiss (entre 20 et 22 g, Charles River) et des souris transgénique pour Thy-1 généreusement données par Jordi Molgo. Ces souris ont Thy-1 fusionnée à la YFP (Yellow fluorescent protein) qui émet dans le vert (excitation à 488 nm).

Thy-1, aussi appelée CD90 est impliquée de nombreux processus cellulaires tels que la différenciation, la prolifération ou l'adhésion cellulaire mais est également un marqueur de terminaisons nerveuses matures. C'est une protéine GPI de 25-37 kDA ancrée dans la membrane (GPI-anchored protein) contenant un domaine V-like d'immunoglobuline. Elle a d'abord été identifiée comme un antigène de thymocyte. C'est également un marqueur de certaines cellules souches.

A.20.2 Techniques d'anses intestinales

Les souris sont profondément anesthésiées avant l'expérience avec un mélange de kétamine pour ses propriétés analgésiques (50 mg/kg de souris, Imalgene 1000, Merial) et de médétomidine, le plus puissant sédatif de sa classe (0,5 mg/kg de souris, Domitor, Orion Corporation) [Nikitas 2011].

Une fois profondément endormie, une laparotomie est réalisée sur l'animal. L'intestin grêle est exposé et une anse de 3 cm de long est préparée à l'aide de clamps. La protéine (diluée en DMEM préchauffé à 37°C) est injectée à 0.3 mg/ml et laissé dans l'anse intestinale 5, 10, 15 ou 20 min.

A la fin du temps, la souris est sacrifiée et l'anse intestinale prélevée. L'intérieur est lavé en DMEM préchauffé à l'aide d'une seringue et d'une aiguille limée pour ne pas abîmer le

tissu. L'anse est ouverte dans la longueur, l'intérieur est lavé en DMEM, et fixée à plat sur un boîte de Petri contenant de l'agarose à 4% (Sigma-Aldrich) à l'aide de minuties.

A.20.3 Préparation des tissus pour l'immunofluorescence

Le tissu ainsi préparé est fixé en PFA 4% pendant 2h à température ambiante et sous agitation, puis lavé en PBS 3 fois avant d'être englué en Agarose 4% dans des capsules (Polysciences - Bangs Laboratories).

Des coupes d'intestin (150 μm d'épaisseur) sont obtenues à partir du cube d'agarose contenant le tissu à l'aide du vibratome (Micro HM 650V, Thermo Fisher Scientific). Les coupes ainsi obtenues sont perméabilisées au Triton X-100 (Sigma-Alrich) pendant 1 h à température ambiante puis en PBS-BSA 3% pendant 1h à température ambiante.

Les tissus sont ensuite marqués ou non à l'aide d'anticorps incubés 2 h à température ambiante dans le cas des anticorps primaires et 1 h à température ambiante dans le cas des anticorps secondaires et des anticorps conjugués à de l'alexa ou du FITC (voir ??). Le Hoechst est ajouté en même temps que les anticorps secondaires.

Les sections ainsi marquées sont montées entre lame et lamelle à l'aide du milieu de montage (Fluoromount, FluoProbes).

A.20.4 Préparation des tissus pour l'immunohistochimie

Les expériences de immunohistochimie et microscopie électronique ont été gentiment réalisées par le Professeur Jean Michel Goujon (CHU Poitiers). Le tissu préparé est coupé en morceaux de 1 à 2 cm de long puis fixé 4 h dans le formol (10%). L'échantillon est transféré dans un tube contenant du PBS stérile et envoyé pour la suite de l'expérience au Professeur Goujon.

A.20.5 Préparation des tissus pour la microscopie électronique

Le tissu préparé est coupé en morceaux de 1 à 2 cm de long puis fixé en solution de glutaraldéhyde 3% en tampon phosphate 0,1 M pendant 2h à 4°C. Les échantillons sont envoyés au Professeur Goujon pour la suite de l'expérience.

A.21 Analyse microscopique

A.21.1 Microscopes utilisés

Pour l'analyse microscopique des expériences, j'ai eu l'occasion de me former et de maîtriser 3 types de microscopes à fluorescence : l'ApoTome, le LSM700 et le Spinning Disk. Ces microscopes sont disponibles à la PFID (Plateforme d'Imagerie Dynamique) de l'Institut Pasteur.

L'apotome (Zeiss Axioplan 2 imaging) est un microscope à épi fluorescence motorisé en X Y et Z avec une lampe halogène et brûleur à Fluorescence d'intensité modulable (lampe HBO). Ce microscope permet une acquisition en épi fluorescence globale ou en tranche optique en utilisant le bras d'apotome qui est constitué d'une grille. Les lignes opaques de la grille couvrent 1/3 du champ et permettent d'enlever, grâce au logiciel, les photons hors champs. La fusion de 3 images dont les lignes sont décalées permet la reconstruction d'une image débruitée (coupe optique). C'est une acquisition de la zone entière et la résolution en Z est de 1 μm . Le microscope est piloté par le logiciel Axiovision.

La microscopie confocale à balayage laser (LSM700, Zeiss) est une avancée majeure en



FIGURE A.8 – Schéma du fonctionnement de la grille d'apotome (d'après Zeiss)

microscopie optique. En effet, l'un des inconvénients majeur de la microscopie à fluorescence conventionnelle est la perte de résolution due à une émission de fluorescence défocalisée qui se superpose à l'image du plan focal. A la différence de la fluorescence par épi fluorescence, l'acquisition en microscopie confocale se fait par balayage de la zone pixel par pixel grâce à un trou d'aiguille (pin hole) correspondant à la première tâche d'Airy qui ne laisse passer qu'un point lumineux. Les points lumineux en dehors du plan focal ne sont pas détectés et l'image obtenue est ainsi beaucoup plus nette. Les points lumineux sont ensuite détectés par un PMT (PhotoMultiplicateur), qui va amplifier le signal et mesurer les photons en fonction du temps et donc de la coordonnées XY du point à imager. L'image digitale est alors reconstituée par assemblage des monopixels acquis. La resolution en Z est de 0.3 μm .

Le microscope est piloté par le logiciel Zen 2011. Ce type de microscope a été utilisé durant l'étude pour l'acquisition des expériences réalisées sur cellules (permet de faire les tests de colocalisation) mais également sur coupe intestinale.

Enfin le Spinning Disk (Perkin Elmer) et un microscope confocal à disque rotatif. Le

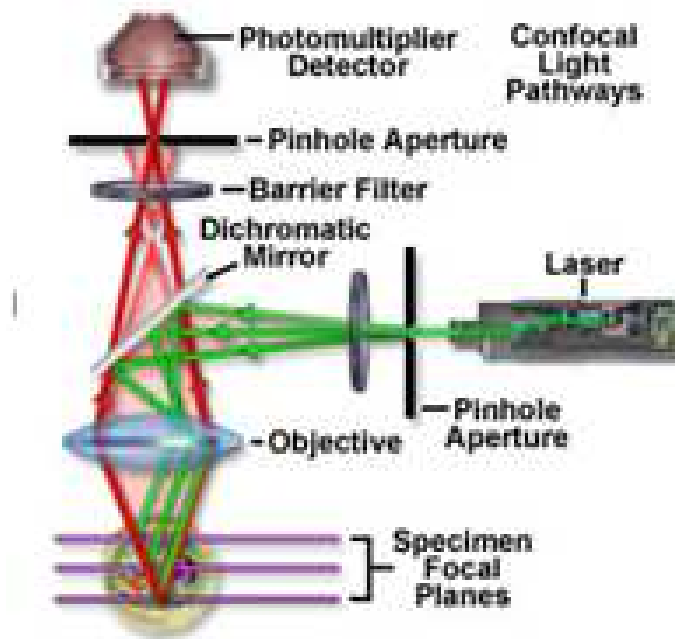


FIGURE A.9 – Schéma du fonctionnement d'un microscope confocal (d'après Olympus).

principe est de placer (et de faire tourner) un disque opaque finement troué par un millier de trous d'aiguilles (pinholes) dans la même configuration de microscopie qu'un confocal à balayage laser, soit la coordination des points source, échantillon et détecteur. Un faisceau lumineux éclaire ce disque pour créer une matrice de points balayant l'échantillon à travers l'objectif à grande ouverture numérique. La rotation du disque permet d'éclairer la totalité du champ par déplacement des mille points focaux et en un tour de roue, chaque portion du champ sera illuminée 12 fois. La rotation du disque à 1800 Hz permet d'illuminer alors la totalité du champ en moins de 3 millisecondes. Le temps d'acquisition est de ce fait beaucoup plus court et ce type de microscopie permet de diminuer nettement la toxicité des lasers permettant une acquisition du vivant pendant une longue période. Ce système permet donc une acquisition rapide de plus de 100 tranches optique en moins d'une minute (en fonction du nombre de canaux utilisés) très appréciable pour imager l'épaisseur entière de la tranche intestinale de 150 μm .

On a donc peu de photoblanchiment de la zone à imager par contre il est impossible de

régler la taille de pinholes et il n'y a pas de PMT. Le microscope est piloté par le logiciel Velocity.

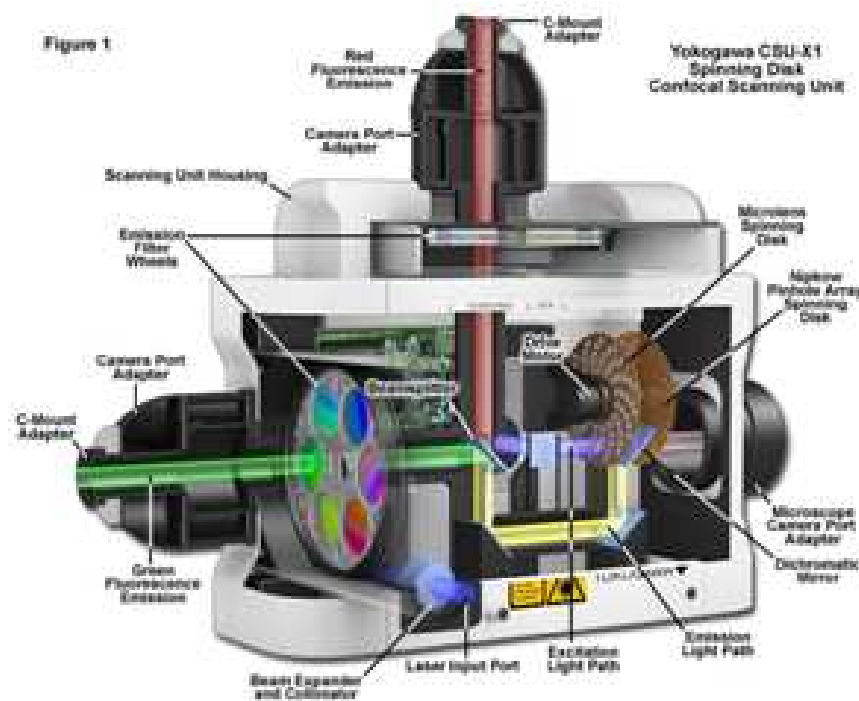


FIGURE A.10 – Schéma du fonctionnement du spinning disk (d'après Zeiss)

A.21.2 Logiciel utilisé pour le traitement des images

Pour les quantifications de fluorescence et pour les tests de colocalisation, des macros sous Image J ont été créées.

Pour les quantifications, les images sont acquises en Z en microscopie confocale avec une épaisseur de $0,3 \mu\text{m}$. Les images ainsi obtenues sont projetées en Z pour n'obtenir qu'une seule image. Puis un filtre bande passe est appliqué pour ne quantifier que les objets compris entre 3 et 10 pixels. Un seuil (threshold) de type Triangle est appliqué. Enfin, les quantifications sont réalisées en termes de nombre de particules détectées.

Pour les tests de colocalisation, une macro pour déterminer le coefficient de Pearson a été réalisée. Sur chaque tranche optique, un masque est réalisé à partir du canal de référence (soit ici le canal de la protéine en question). Puis ce masque est appliqué au canal correspondant à la protéine détectée dans notre cas par des anticorps. L'un des points importants pour le calcul du coefficient de Pearson est d'avoir à peu près le même nombre de pixels dans chacun

des 2 canaux à comparer. La protéine d'intérêt est présente en plus faible quantité que la protéine endogène, il est important de créer un masque à partir du canal de la protéine d'intérêt et de l'appliquer à l'autre canal.

Le coefficient de Pearson est alors calculé à l'aide du logiciel Image J sur l'image ainsi obtenue.

A.22 Statuts éthiques

Toutes les expériences sont réalisées en accord avec les directives de la communauté européenne et française pour la manipulation des animaux de laboratoire. Le protocole utilisé a été validé par l'Institut Pasteur (Numéro 75-279). Les procédures pour la manipulation chirurgicale sur la souris sont en accord avec la charte de la Commission Européenne pour la manipulation d'animaux de laboratoire, directive 86/609/EEC (http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/home_en.htm) et approuvées par le comité d'utilisation des animaux de l'Institut Pasteur.

ANNEXE B

Publication annexe

Preferential Entry of Botulinum Neurotoxin A Hc Domain through Intestinal Crypt Cells and Targeting to Cholinergic Neurons of the Mouse Intestine

Aurélie Couesnon¹, Jordi Molgó², Chloé Connan¹, Michel R. Popoff^{1*}

1 Institut Pasteur, Unité des Bactéries anaérobies et Toxines, Paris, France, **2** CNRS, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard – FRC2118, Laboratoire de Neurobiologie– et Développement UPR3294, Gif sur Yvette, France

Abstract

Botulism, characterized by flaccid paralysis, commonly results from botulinum neurotoxin (BoNT) absorption across the epithelial barrier from the digestive tract and then dissemination through the blood circulation to target autonomic and motor nerve terminals. The trafficking pathway of BoNT/A passage through the intestinal barrier is not yet fully understood. We report that intraluminal administration of purified BoNT/A into mouse ileum segment impaired spontaneous muscle contractions and abolished the smooth muscle contractions evoked by electric field stimulation. Entry of BoNT/A into the mouse upper small intestine was monitored with fluorescent HcA (half C-terminal domain of heavy chain) which interacts with cell surface receptor(s). We show that HcA preferentially recognizes a subset of neuroendocrine intestinal crypt cells, which probably represent the entry site of the toxin through the intestinal barrier, then targets specific neurons in the submucosa and later (90–120 min) in the musculosa. HcA mainly binds to certain cholinergic neurons of both submucosal and myenteric plexuses, but also recognizes, although to a lower extent, other neuronal cells including glutamatergic and serotonergic neurons in the submucosa. Intestinal cholinergic neuron targeting by HcA could account for the inhibition of intestinal peristalsis and secretion observed in botulism, but the consequences of the targeting to non-cholinergic neurons remains to be determined.

Citation: Couesnon A, Molgó J, Connan C, Popoff MR (2012) Preferential Entry of Botulinum Neurotoxin A Hc Domain through Intestinal Crypt Cells and Targeting to Cholinergic Neurons of the Mouse Intestine. *PLoS Pathog* 8(3): e1002583. doi:10.1371/journal.ppat.1002583

Editor: Steven R. Blanke, University of Illinois, United States of America

Received: March 25, 2011; **Accepted:** January 27, 2012; **Published:** March 15, 2012

Copyright: © 2012 Couesnon et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by DGA grant (0034056), Great Horizontal Program from Institut Pasteur, as well as a DGA and CANAM fellowship awarded to AC. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: mpopoff@pasteur.fr

Introduction

Botulinum neurotoxins (BoNTs) are responsible for a severe nervous disease in man and animals known as botulism, characterized by skeletal muscle flaccid paralysis and respiratory arrest, resulting from inhibition of acetylcholine (ACh) release in peripheral cholinergic nerve terminals. BoNTs are produced by *Clostridium botulinum* as single chain proteins (ap. 150 kDa), which are divided into 7 toxinotypes (A to G) according to their immunogenic properties. The toxins are exported outside the bacteria and are proteolytically cleaved into a heavy chain (H; ap. 100 kDa) and a light chain (L; ap. 50 kDa), which remain linked by a disulfide bridge. The di-chain molecule constitutes the active neurotoxin. The half C-terminal domain of the H-chain (Hc) is involved in binding to specific receptors on target neuronal cells and in driving the toxin entry pathway into cells, whereas the N-terminal part permits the translocation of the L chain into the cytosol. The L chain catalyzes a zinc-dependent proteolysis of one or two of the three proteins of the SNARE complex, which play an essential role in evoking neurotransmitter exocytosis. The BoNT/A L-chain cleaves the synaptosomal associated protein SNAP25 at the neuromuscular junction [1–4]. The highly specific binding of BoNTs to target nerve endings involves protein and ganglioside receptors that localize at the neuronal plasma membrane [5]. Gangliosides of GD_{1b} and GT_{1b} series are involved in binding and

functional entry into cells of BoNT/A and BoNT/B [6–9]. The protein receptors on neuronal cells have been identified as synaptotagmin I and II for both BoNT/B and BoNT/G, and synaptic vesicle protein SV2 (isoforms A, B and C) for BoNT/A [8,10–14], BoNT/E [15], and BoNT/F [16,17]. SV2C is the preferred BoNT/A neuronal receptor [14], whereas BoNT/E recognizes glycosylated SV2A and SV2B [15]. BoNT/D also uses SV2 proteins as receptor in association with gangliosides for its entry into neuronal cells, but binds to SV2 via a distinct mechanism than BoNT/A and BoNT/E [18]. In addition, SV2A and SV2B have also been evidenced to mediate the entry of tetanus toxin (TeNT) into the central target neurons including hippocampal and spinal cord neurons [19].

Botulism usually results from the ingestion of preformed neurotoxin in contaminated food, or ingestion of spores or bacteria, which under certain circumstances, may colonize the gut and produce the neurotoxin *in situ* [20]. In either case, BoNT escapes the gastro-intestinal tract to reach the target cholinergic nerve endings, possibly through the blood and lymph circulation [21]. Indeed, previous observations have shown that after oral administration of BoNT in experimental animals, the toxin enters the blood and lymph circulation. The upper small intestine was found to be the primary site of absorption [22–25], but BoNT can also be absorbed from the stomach [21]. Penetration of BoNT through an epithelial cell barrier and its subsequent migration to

Author Summary

Botulism is a severe and often fatal disease in man and animals characterized by flaccid paralysis. *Clostridium botulinum* produces a potent neurotoxin (botulinum neurotoxin) responsible for all the symptoms of botulism. Botulism is most often acquired by ingesting preformed botulinum neurotoxin in contaminated food or after intestinal colonization by *C. botulinum* under certain circumstances, such as in infant botulism, and toxin production in the intestine. The first step of the disease consists in the passage of the botulinum neurotoxin through the intestinal barrier, which is still poorly understood. We investigated the trafficking of the botulinum neurotoxin in a mouse intestinal loop model, using fluorescent HcA (half C-terminal domain of the heavy chain). We observed that HcA preferentially recognizes neuroendocrine intestinal crypt cells, which likely represent the entry site of the toxin through the intestinal barrier, then targets specific neurons, mainly cholinergic neurons, in the submucosa, and later (90–120 min) in the musculosa leading to local paralytic effects such as inhibition of intestinal peristalsis. These results represent an important advance in the understanding of the initial steps of botulism intoxication and can be the basis for the development of new specific countermeasures against botulism.

cholinergic nerve endings are the essential first steps of botulinum intoxication. In *in vitro* models, BoNTs have been found to bind to polarized epithelial cells and to undergo receptor-mediated endocytosis and transcytosis from apical to basolateral sides [24,26–30]. However, little is known about the precise pathway of BoNT migration from the intestinal lumen to the target nerve endings.

The digestive tract contains its own independent nervous system, the enteric nervous system (ENS), which is as complex as the central nervous system, and it is also referred as the “brain of the gut”. ENS controls and coordinates motility, exocrine and endocrine secretions, and blood microcirculation of the gastrointestinal tract. Nerve cell bodies of ENS are clustered into small ganglia which are organized in two major plexuses: the myenteric plexus between the longitudinal and circular muscle layers, and the submucosal plexus associated with the mucosal epithelium between the circular muscles and the muscularis mucosa. Ganglia also contain glial cells and their extensions. ENS neurons can be classified as afferent sensory neurons, interneurons, and motor neurons, which are connected to the central autonomic nervous system through both sensory and motor pathways. More than 20 types of neurotransmitters have been identified in ENS, and most enteric neurons may produce and release several of them. However, neurotransmitter functions have not been fully identified. Secretory and motor neurons are cholinergic, these latter also contain substance P. Myenteric neurons are connected to the cholinergic parasympathetic neurons through nicotinic, and in some areas, muscarinic receptors [31,32]. Vasoactive intestinal protein (VIP) and serotonin are also major neurotransmitters in the regulation of normal gut function and interconnection with the central nervous system [33].

In this study, we used fluorescent Hc fragment from BoNT/A to monitor the trafficking of the toxin into the mouse intestinal mucosa. It has been previously shown that the Hc domain from TeNT, which shares similar structural organization and catalytic activity with BoNTs, is a useful tool to investigate the intracellular trafficking of the neurotoxin [34–36]. Although, it cannot be ruled

out that a cross interplay between the BoNT domains may modify the toxin routing driven by Hc [37], recombinant HcA has been reported to retain the same structure than that of the receptor binding domain of the BoNT/A holotoxin and to enter hippocampal neurons similarly to the whole neurotoxin [16,38]. In addition, HcA has been found to bind and transcytose through intestinal cells as well as the holotoxin [26,39], validating its use to investigate the intestinal trafficking of the toxin.

Results

Effect of BoNT/A on muscle tension from isolated ileum segments

In striated muscle, BoNT/A is known to inhibit ACh release from motor nerve terminals by cleaving the synaptosomal associated protein SNAP-25, leading to the inability of synaptic vesicles containing ACh to undergo transmitter release [for a review, see [3]]. In the gastrointestinal smooth muscle, BoNT/A also impairs cholinergic transmission by inhibiting ACh release from postganglionic cholinergic nerve endings *in vitro* and *in vivo* [40,41]. The first aim of this study was to determine whether BoNT/A affected smooth muscle contractility when applied intraluminally on isolated mouse ileum segments.

In preparations that were equilibrated in the standard oxygenated solution for about 30 min, spontaneous contractile responses were usually observed at a frequency rate of about 6–10 min⁻¹ (n=4). These spontaneous contractions had a peak force that was variable from preparation to preparation, but comprised between 0.5 and 1.2 g (n=4). BoNT/A reduced their frequency after 2, 3 and 4 h of the intraluminal injection (Figure 1A). It is worth noting that for control preparations maintained for 4 h in the same conditions as the ones treated with BoNT/A, not only there was no reduction of the spontaneous contractions, but a small increase in their frequency (10% after 2 and 3 h) (Figure 1A). The contraction pattern changed also after exposure to BoNT/A, from very regular oscillations during the first hour to very irregular contractions after more than 2 h (Figure 1B and 1C).

Electric field stimulation evoked contractile responses that attained a peak force comprised between 2 and 7 mN (n=3) under control conditions (Figure 1E), with little rundown of the responses when stimulations were applied every 50–60 min (Figure 1D). As shown in Figure 1D, BoNT/A reduced the electrically-evoked contractile response in a time-dependent manner. The time to decrease to 50% the evoked tension-time integral response was about 110 min, and the toxin reduced to about 90% electrically-evoked contractions within 240 min. Although it is difficult to exclude the possibility of direct muscle stimulation by the applied field-stimuli, several lines of evidence indicate that this would represent no more than 10–15% of the evoked tension-time integral response in our experimental conditions. Most of this evidence comes from: (i) Data obtained with BoNT/A showing that blockade of the evoked contraction attains a maximum around 86–90% of control values, and was never complete. The remaining tension can be suspected to be due to direct muscle stimulation unaffected by BoNT/A. (ii) If direct stimulation of the muscle would occur, one would expect that tension levels would be sustained and maintained during the field stimulation, which is not the case (Figure 1E). (iii) Spontaneous contractions occurring during the falling phase of the evoked-contraction response were not enhanced in amplitude, which is consistent with the low influence of direct muscle stimulation under the experimental conditions used. Interestingly, after BoNT/A has blocked the evoked response by field stimulation,

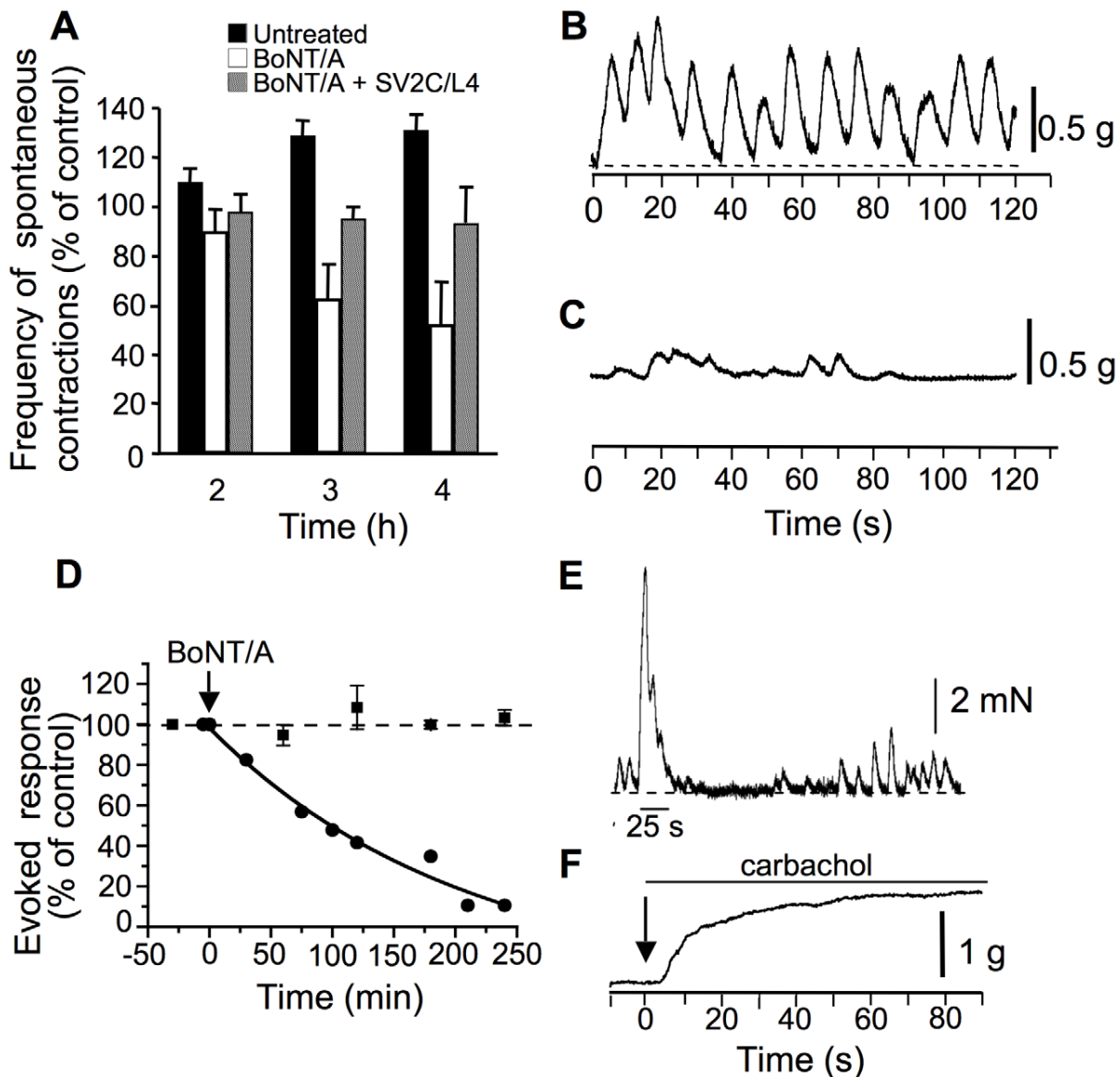


Figure 1. Effect of BoNT/A on longitudinal isometric muscle contraction from mouse ileal segments. (A) Spontaneous ileal contraction frequency as a function of time under control conditions (black columns), and after BoNT/A (10^5 LD₅₀/ml) injection into the lumen of ligated mouse ileal segments (white columns). BoNT/A (10^5 LD₅₀/ml) was preincubated with GST-SV2C/L4 ($20 \mu\text{g}/\text{ml}$) for 30 min at room temperature prior to being inoculated into ligated intestinal loop. Examples of spontaneous contractions before (B), and after 4 h of BoNT/A treatment (C). Note that BoNT/A significantly decreased, but not completely the frequency and amplitude of the spontaneous contractile activity. Data are from 3 independent experiments. (D) Time-dependent reduction of electrically-evoked longitudinal muscle contractions after BoNT/A injection into intestinal lumen. (E) Representative continuous control recording showing spontaneous contractions before and after single electrical field stimulation (30 Hz for 25 s, indicated by the trace below the evoked recording). Note the changes in spontaneous contractions following the evoked one. (F) In ileal segment treated for 4 h with BoNT/A, carbachol ($20 \mu\text{M}$) applied to the external medium (arrow) induced a sustained muscle contraction, indicating that ACh receptors were still functional. The line segment above the tension record indicates the time of carbachol application. doi:10.1371/journal.ppat.1002583.g001

the addition of carbachol ($20 \mu\text{M}$) or ACh (data not shown) to the standard solution evoked a contractile response (Figure 1F). These results suggest that under the conditions used BoNT/A is able to exert an action on cholinergic terminals that leads to a blockade of the contractile responses evoked by electric field stimulation, while spontaneous myogenic contractions were reduced in frequency, but not completely abolished. The fact that carbachol could induce contractile activity after BoNT/A-induced blockade of contraction evoked by electric field stimulation, strongly suggests

that the sensitivity of ACh receptors (muscarinic and nicotinic) is not affected by the toxin (Figure 1F).

In a previous report, we have found that BoNT/A transcytosis through intestinal cell monolayers grown on filters is mediated by SV2C or, at least, an immunologically related protein [30]. To address whether SV2C might be a functional receptor in the *ex vivo* intestinal tract model, BoNT/A was preincubated with the intravesicular domain segment L4 of SV2C prior to injection into ligated intestinal loop. As shown in Figure 1A, preincubation with

SV2C/L4 significantly prevented the BoNT/A inhibitory effects on spontaneous intestinal smooth muscle contractions, suggesting a partially SV2C-dependent BoNT/A uptake through the intestinal mucosa. However, these results do not rule out that SV2C/L4 also passed, independently or associated with BoNT/A, through the intestinal barrier and impaired BoNT/A uptake by nerve terminals.

Distribution of HcA binding sites in the mouse small intestine

We first investigated the potential binding sites for HcA in mouse intestine mucosa and submucosa, as well as in the musculosa. For that, cryosections of mouse small intestine, fixed on glass slides, were incubated with fluorescent HcA and analyzed by confocal microscopy. Since BoNT has been reported to be preferentially absorbed from the upper small intestine [23,24], sections from ileum were analyzed. Only a faint staining was observed in brush border of enterocytes along intestinal villi (Figure 2A). However, a strong HcA binding was observed on intestinal crypt localized at the bottom of villi. Paneth cells, which are characterized by their numerous secretory-granule content, are spatially restricted to intestinal crypts and were used as a marker of these regions. Staining of Paneth cells with the TRITC-labeled lectin *Ulex europaeus* agglutinin type 1 (UEA1) [42] did not significantly colocalize with HcA (Figure 2B). This may indicate that some cells from intestinal crypts, distinct from Paneth cells, exhibit preferential binding sites for HcA. Moreover, small cells scattered along the villi were stained with HcA (Figure 2A) and some of them co-stained with UEA1 (Figure 2B). These UEA1 positive cells likely correspond to goblet cells [43].

It is worth noting that HcA stained neuronal cell bodies and neuronal structures in the submucosa and musculosa. However, only a low proportion of neuronal structures were recognized and labeled by HcA, as revealed by immunolabeling neurofilaments and co-staining with the fluorescent toxin fragment (Figure 2C). Hence, the binding domain of BoNT/A potentially targets epithelial cells in intestinal crypts, and neuronal structures of intestinal plexuses. Note that anti-neurofilament antibodies are not specific of the nerve endings, where BoNT/A is assumed to bind, but recognize neuronal structures all along the neuronal cells. This probably accounts for the irregular co-staining between HcA and anti-neurofilament antibodies. In addition, the irregular pattern of HcA staining might also be related to the variability in orientation and size of the cryosections. Moreover, cryosections might artificially expose certain antigens which are buried in intact tissues. Thus, immunostaining pattern in cryosections has to be considered with caution and confirmed in *ex vivo* experiments with intact tissues as shown in the following figures.

Entry of HcA into mouse intestinal mucosa

To analyze HcA entry into the intestinal mucosa and submucosa, *ex vivo* experiments were performed, as previously described with the whole toxin. For this, excised small intestine loops were washed, ligated at both extremities, and incubated in oxygenated Krebs-Ringer solution at 37°C. Fluorescent HcA was inoculated into the intestinal lumen, and at various time intervals, intestinal loops were washed, fixed and processed for dissection, and immunostaining. A competition assay between HcA-Cy3 and native BoNT/A injected into an ileum loop and monitored by fluorescence analysis of the intestinal mucosa, supported that fluorescent HcA follows the same entry pathway than native BoNT/A (Figure 3A). Fluorescent HcA entered similarly ileum, duodenum or jejunum segments, as tested by mucosal fluorescence analysis (Figure 3A). After 30–60 min incubation, labeled HcA

was detected inside the lumen of intestinal crypts, and in some crypt cells, but not or with a low intensity in enterocytes or other cells in the villi (Figure 3 B and C). HcA also labeled long cell extensions in the submucosa, which correspond to nerve fibers or neuronal extensions (Figure 3D; arrow head) since they were co-stained with antibodies against neurofilaments (not shown). Longer incubation periods (90–120 min) permitted to visualize HcA staining of long filaments in the musculosa, (Figure 3E), which were identified as nerve fibers from the myenteric plexus (see below), but with a weaker intensity. This suggests a progressive entry of HcA from the intestinal lumen through the mucosa, preferentially through intestinal crypts, to certain neuronal cell and extensions in the submucosa, and then in the musculosa.

HcA preferentially targets intestinal neuroendocrine crypt cells

To identify the intestinal crypt cells targeted by HcA, fluorescent HcA was injected into the lumen of an intestinal loop. After an incubation of 15–30 min, the intestinal mucosa was prepared for microscopy observation. Only few numbers (1 or 2) of small cells from each intestinal crypt were stained with HcA (Figure 4). Cells stained with HcA were distinct from Paneth cells, which were easily detectable by their numerous granules (Figure 4), and by their staining with UEA1 (not shown). Chromogranin-A antibodies, a common marker of neuroendocrine cells in the gastrointestinal tract [44], colocalized with HcA (Figure 4A). All cells stained with HcA were also stained with chromogranin-A antibodies, indicating that HcA specifically entered neuroendocrine cells from intestinal crypts. However, not all chromogranin-A positive cells were stained with HcA, but only about 80%. Serotonin-producing cells, which are abundant in the ENS, were investigated for their colocalization with HcA. In the intestinal crypts, all the cells stained with HcA were also immunolabeled with serotonin antibodies (Figure 4B and C). Interestingly, HcA accumulated in the basal pole of neuroendocrine cells, which is wider than the apical pole exposed to the intestinal crypt lumen. This strongly supports that HcA uses neuroendocrine cells, mostly serotonin-producing cells, from intestinal crypts for its transport through the intestinal mucosa.

In addition, we checked whether BoNT/A can be transcytosed through the mouse neuroendocrine intestinal cell line STC-1 [45]. As shown in Figure 5A, the passage of biologically active BoNT/A was monitored from apical to basolateral side of STC-1 cell monolayers. The transcytotic passage of BoNT/A through STC-1 cells was not statistically different from that through Caco-2 enterocytes, but it was lower than through the mouse intestinal crypt cell line m-IC_{c12} as shown in Figure 5A ($p < 0.05$) and [30]. It is noteworthy that the passage yield through STC-1 cells was more difficult to assess (high standard deviation values), since these cells do not form tight junctions as epithelial cells. Since epithelial cells such as Caco-2 and HT29 cells express at the cell surface and secrete from apical and basolateral sides several types of proteases [46–48], we tested whether these proteases degrade BoNT/A, thus impairing or decreasing the transcytosis level. As shown in Figure 5A, a 2 to 4 fold higher level of BoNT/A transcytosis was observed in Caco-2 and m-IC_{c12} cells incubated with a cocktail of anti-proteases. However, even in the presence of anti-proteases, BoNT/A transport was more efficient (20-fold) in m-IC_{c12} than in Caco-2 cell monolayers. Thus, the decreased BoNT/A transcytosis through Caco-2 cells is not likely due to a higher protease degradation of BoNT/A before and/or after transport. STC-1 cells possibly also secrete proteases, and a higher level of BoNT/A transcytosis through this cell type might be expected. However,

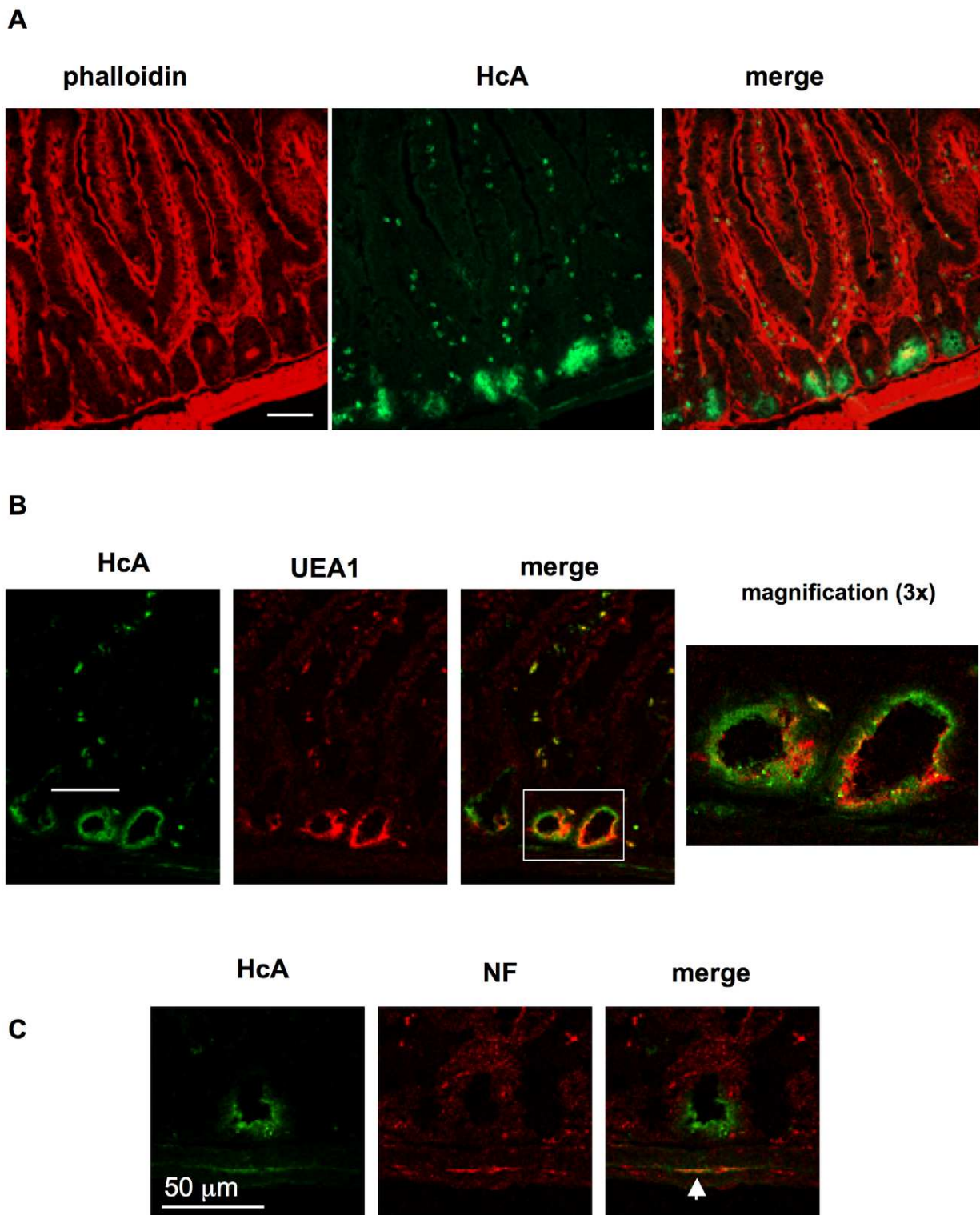
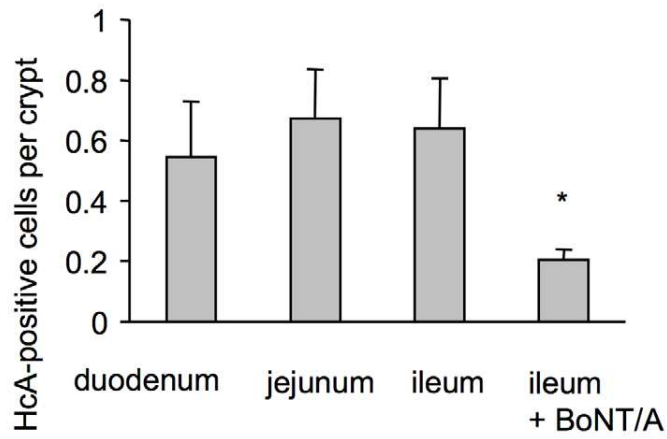


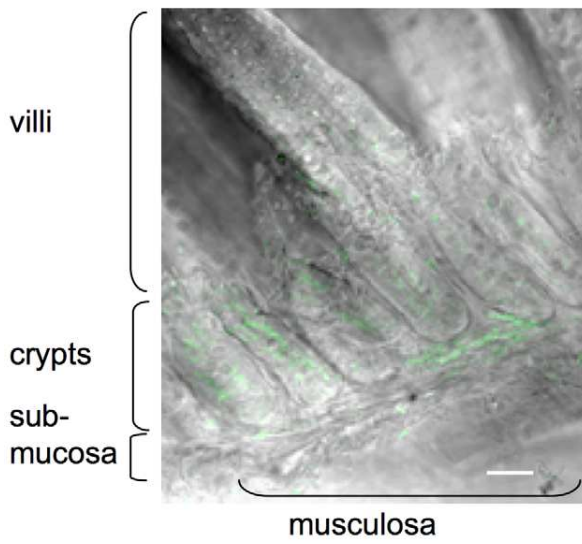
Figure 2. Binding of HcA to frozen sections of the mouse upper small intestine. (A) Sections were overlaid with Alexa488-HcA and were counterstained with TRITC-Phalloidin. HcA staining (green) was observed in intestinal crypts, small cells in intestinal villi beneath the enterocytes, as well as in filaments from the submucosa. (B) Counterstaining with TRITC-UEA1 (red) labeling of Paneth cells in intestinal crypts and small cells in intestinal villi. (C) Counterstaining with anti-neurofilament (NF) antibodies and co-labelling (arrowhead) of neurofilaments with HcA in the submucosa. (scale bars = 50 μ m).

doi:10.1371/journal.ppat.1002583.g002

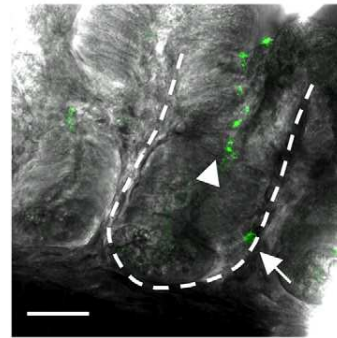
A



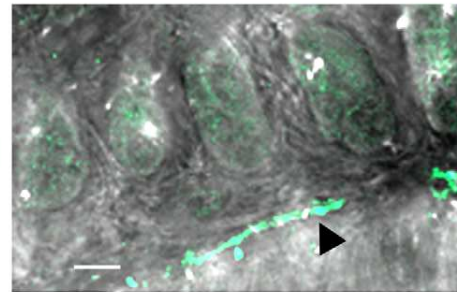
B



C



D



HcA

phase contrast

E

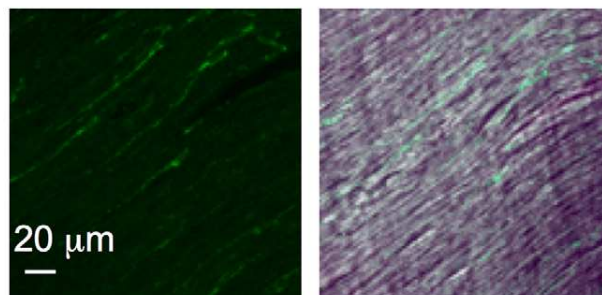


Figure 3. Visualization of HcA in the mouse intestine following inoculation into the intestinal lumen. (A) HcA-Cy3 (0.5 μg) was injected into ligated ileum, duodenum, or jejunum loop. After 30 min of incubation, the samples were fixed and the mucosal fluorescence was measured as the number of HcA-positive cells per crypt. The number of labeled cells was similar between the three intestinal segments, but significantly lower (*) in the competition assay with BoNT/A (2.5 μg) in an ileal loop (Student's t test). (B) Detection of HcA (green) in the intestinal crypts and in some submucosa areas. No or only weak labeling is observed in the intestinal villi. (C) Visualization of HcA in intestinal crypt lumen (arrow-head) and inside some intestinal crypt cells (arrow), and (D) on filaments in the submucosa (black arrow head) after 30 min incubation. (E) HcA labeling of filaments (corresponding to neurofilaments, see Figure 7) in the musculosa after 90 min incubation. (scale bars = 20 μm). doi:10.1371/journal.ppat.1002583.g003

since STC-1 cells do not form tightly organized cell monolayers, the results of experiments with anti-proteases were inconclusive.

As we have previously found that m-IC_{cl2} express SV2C or an immunologically related protein as a putative BoNT/A receptor [30], we investigated the presence of SV2 proteins and chromogranin A in STC-1 and intestinal cells by Western blotting (Figure 5B). Chromogranin A was strongly expressed in STC-1 confirming its neuroendocrine type, and to a lower extent in m-IC_{cl2} and even less in Caco-2 cells, but not in Vero cells used as negative control. Antibodies against SV2A and SV2B showed no protein related to the expected size of SV2 (82 kDa) in intestinal and STC-1 cells. In contrast, specific SV2C antibodies directed against the N-terminal part or the intravesicular loop L4, which is assumed to be the receptor binding domain of BoNT/A [11,14], recognized a protein with the expected size in the intestinal cells and STC-1, but not in Vero cells (Figure 5B). The specificity of SV2 antibodies is shown in Figure S1. Next, we investigated whether SV2C was involved in the entry of HcA into m-IC_{cl2} and STC-1 cells by a competition assay between fluorescent HcA and SV2C/L4. Cells grown on glass cover slides were exposed to HcA-Cy3 or a combination of fluorescent Hc with a 10-fold higher molar concentration of SV2C/L4 for 10 min at 37°C and then processed for microscopic observation. As shown in Figure 5C, HcA entered into m-IC_{cl2} and STC-1 cells, and SV2C-L4 greatly impaired the entry of HcA into both cell types by 97 and 94%, respectively, as determined by counting the number of fluorescent HcA patches per μm^2 of cell area (Figure 5D), supporting the view that SV2C participates in the entry mechanism of HcA into cells.

HcA targets specific neurons in the intestinal submucosa

After 30–60 min incubation of fluorescent HcA into an intestinal loop lumen, HcA was detected in the intestinal submucosa, where it stained certain neuronal structures (Figure 6A and data not shown). Antibodies against neurofilaments allowed visualizing a complex and abundant network of neuronal cell bodies and neuronal extensions in the submucosal plexus immediately underneath intestinal villi and crypts. Only some of these neuronal structures were stained with HcA (Figure 6A).

BoNTs are well known to interact with cholinergic neurons and to specifically block spontaneous and evoked quantal acetylcholine release [4,49]. However, it has been shown that BoNT/A and BoNT/E are also able to enter other neuronal cell types such as glutamatergic and gamma-aminobutyric acid (GABA)-ergic neurons, as well as astrocytes [50,51]. Since ENS contains a large variety of neuronal cell types, we investigated the most representative types as putative targets of HcA in the mouse small intestine.

Cholinergic neurons were monitored by immunostaining with antibodies for choline acetyltransferase (ChAT). ChAT-immunoreactive neurons are abundant (about 55%) in the submucosal plexus, where they are involved in various gut functions including the control of evoked anion secretion by the jejunal and ileal epithelium, and they also interact with Peyer's patch follicles [52,53]. Most of ChAT-immunoreactive nerve terminals from the intestinal submucosa were labeled with fluorescent HcA (Figure 6B and G).

Vasoactive intestinal peptide (VIP)-immunoreactive neurons are known to be located in jejunum and ileum submucosal plexus, as well as in other organs. VIP modulates several basic functions including blood flow, smooth muscle relaxation, and exocrine secretion [54]. VIP-immunoreactive neurons are estimated to represent about 45% of neurons from the submucosal plexus [53,55]. Numerous cells were immunostained with anti-VIP antibodies in mouse intestinal submucosa, but a colocalization between VIP immunoreactivity and HcA staining was only observed in a few of them (less than 3%) (Figure 6C and G). Note that some of the filaments and cell bodies stained with anti-VIP antibodies did not colocalize with neurofilament staining, and may probably represent glial structures.

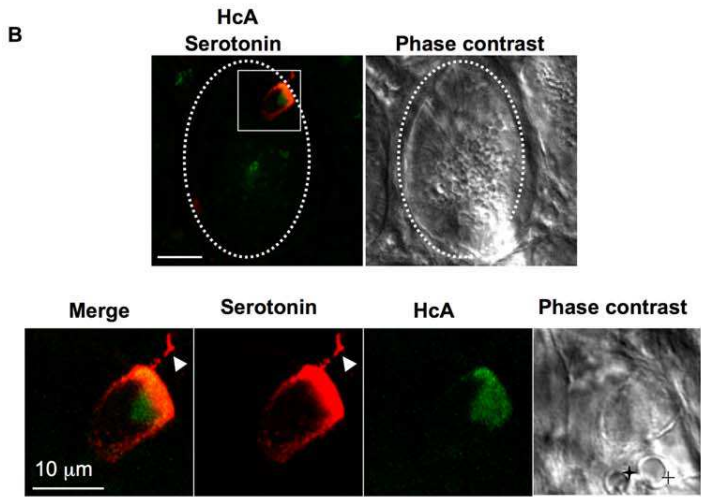
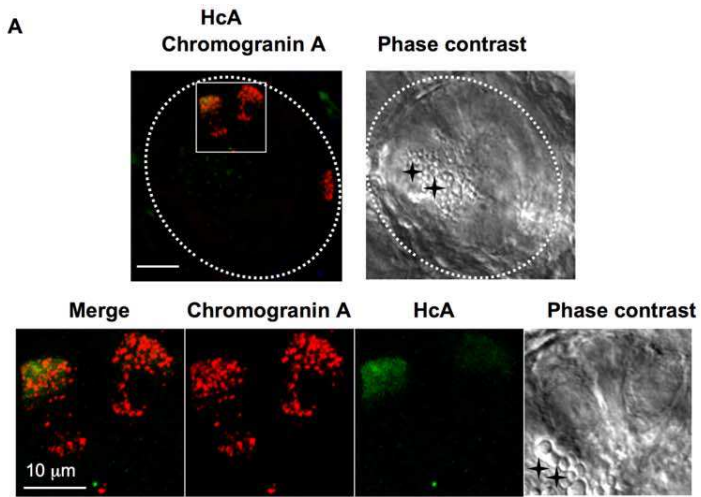
Glutamatergic neurons, which are the major neurons from the central nervous system involved in excitatory responses, are also present in ENS. Glutamate receptors have been detected in enteric neurons and glutamatergic enteric neurons where they have been found to mediate excitatory synaptic transmission, whereas only a subset of them are involved in sensory responses [56]. In mouse intestinal submucosa, only a low number of glutamatergic neurons (less than 1%), as evidenced by anti-glutamate antibodies, colocalized with HcA (Figure 6D and G).

Serotonin is also an important neurotransmitter in ENS, where it is involved in the control of motility, secretion and sensory functions. Serotonin is produced by 2 to 20% of all enteric neurons [33]. In our analysis only a few neuronal cell extensions were stained with anti-serotonin antibodies in the submucosal plexus, and some of them were also labeled with HcA, as shown in Figure 6E.

Glial cells were neither immunostained with anti-neurofilament antibodies nor with HcA, but exhibited a clear immunolabelling with GFAP antibodies (data not shown). These results support the view that HcA binding is mostly specific of nerve endings in the intestinal submucosa.

HcA preferentially targets ChAT-immunoreactive neurons in mouse intestine musculosa

Also, we investigated the intestine musculosa, which is the predicted target tissue of BoNT/A for its inhibitory activity on intestinal motility. No significant HcA staining was observed in the musculosa 30 or 60 min after incubation with the fluorescent probe in the intestinal loop, and only a few cell bodies or extensions were stained after a longer incubation period (90–120 min) in our experimental conditions. Cell extensions stained with HcA colocalized with neurofilament staining (Figure 7). However, only some of the nerve endings were labeled with HcA. Almost all cell bodies labeled with HcA exhibited ChAT-immunoreactivity. Similar results of colocalization with ChAT-immunoreactive neurons were obtained using full length BoNT/A injected into the intestinal loop lumen and detected with anti-HcA antibodies (Figure S2). This is consistent with the fact that a large majority of neurons in the myenteric plexus are immunoreactive for ChAT, albeit many of them produce additional neurotransmitters [55]. No significant colocalization was observed between



C (duodenum)

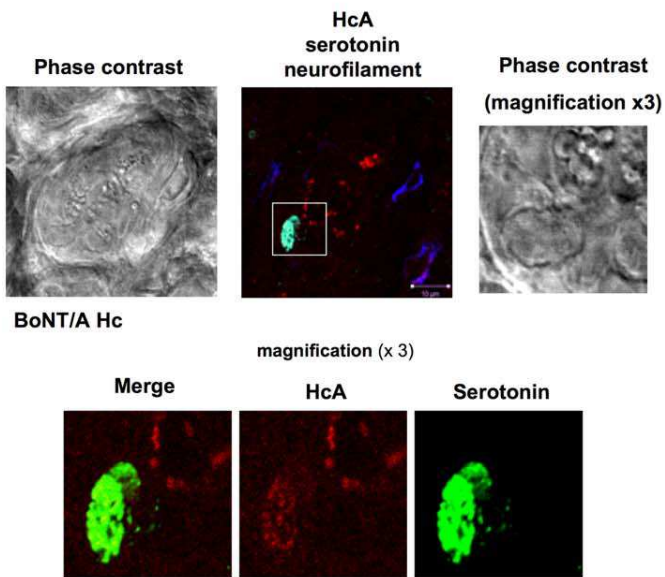


Figure 4. Visualization of HcA in neuroendocrine cells from mouse intestinal crypts. Fluorescent HcA (0.5 μ g) was injected into the lumen of a mouse ileum (A, B) or duodenum (C) loop, and after 30 min incubation the intestinal loop was washed and prepared for immunostaining with chromogranin A or serotonin antibodies. (A) Two cells stained with chromogranin A antibodies in an intestinal crypt (dotted circle) were co-labeled with HcA (green). Magnification of one cell (square) shows a uniform punctuate distribution of chromogranin A staining, whereas HcA was preferentially localized at the basal pole. Phase contrast shows that the chromogranin A-immunoreactive cell contained no large granules, in contrast to Paneth cell (black cross). (B) Co-labeling of a cell from an intestinal crypt (dotted circle) with HcA (green) and serotonin antibodies (red). Magnification of the cell (square) shows a basal distribution of both HcA and serotonin. Note that a cell extension was also labeled with serotonin antibodies but not by HcA (arrowhead), and that the serotonin-immunoreactive cell contained no large granules as in Paneth cells (black cross) (scale bars = 10 μ m). (C) Co-labeling of HcA (red) with serotonin (green) in a duodenum crypt cell. Neurofilament staining (blue) was observed at the crypt periphery.

doi:10.1371/journal.ppat.1002583.g004

HcA staining and glutamate- or serotonin-producing neurons in the myenteric plexus (data not shown).

BoNT/A receptor SV2 is expressed in certain intestinal neurons and glial cells

The protein receptor of BoNT/A on neuronal cells has been identified as SV2. Among the three SV2 isoforms, SV2C shows the highest affinity to BoNT/A *in vitro*, whereas BoNT/A binds to SV2A and SV2B with a lower strength [11,14,57]. SV2A is present in almost all neurons whatever their neurotransmitter type is, while SV2B shows a more restricted distribution. SV2C is reported to be present in a subset of neurons [58]. However, SV2 proteins are expressed not only in neuronal cells, but also in other cell types such as neuroendocrine cells, in particular in the gastrointestinal tract [59]. We investigated the distribution of SV2 proteins in mouse intestinal mucosa with our *in toto* tissue model. Numerous cell extensions in the submucosal plexus were stained with anti-SV2C antibodies (Figure 6F), whereas no specific staining was observed with anti-SV2B antibodies, and only a diffuse staining in certain crypt cells and cell extensions in the submucosa was evidenced with anti-SV2A antibodies (data not shown). The mouse intestinal crypt cell line m-IC_{cl2} was found to express SV2C at a higher level than in enterocyte-type cell lines (Figure 5B and [30]). However, in our *ex vivo* conditions intestinal crypt cells were not, or only weakly immunoreactive with anti-SV2C antibodies. This does not preclude that a subset of crypt cells express a significant level of SV2C that was not detected in our conditions. Most of SV2C-immunoreactive filaments in the submucosa, were also labeled with anti-neurofilament antibodies, indicating that SV2C is widely distributed in neuronal cells and neuronal extensions from the small intestine. However, HcA signal was observed in only some neuronal endings bearing SV2C, but not along the neuronal extensions stained with anti-SV2C antibodies (Figure 6F). Only a low proportion of SV2C-immunoreactive cells were labeled with HcA (Figure 6G). It is worth noting that a distinct network of thin filaments around small blood vessels was stained with anti-SV2C, and only weakly with anti-neurofilament antibodies. No specific binding of HcA was observed on these structures (Figure S3A and B). In the intestinal submucosa and musculosa, large cells with wide cellular bodies and short extensions were stained with anti-SV2C antibodies, but not with anti-neurofilament antibodies. Co-labelling with anti-GFAP indicated that they were glial cells (Figure S3C). However, HcA, as reported above, was not found to label glial cells.

Discussion

The standard scheme of botulism intoxication includes BoNT transit through the digestive tract, passage across the intestinal epithelial barrier and subsequent delivery to the blood circulation and dissemination to the target motor nerve endings. Indeed, BoNT has been found to be absorbed preferentially from the upper small intestine, but also from the stomach in experimental

rodents, and to be delivered in the blood and lymph circulation [21,23,24,60]. The aim of this study was to identify the entry pathway and target cells of BoNT/A in the mouse intestinal wall. For that, we checked the activity of BoNT/A in mouse intestine following intraluminal administration and we used the fluorescent Hc domain, which is the functional binding domain of BoNT, to monitor the trafficking of BoNT/A.

First, we tested whether BoNT/A injected into intestinal lumen was able to enter intestinal mucosa and to induce local effects on the intestine. *In vitro* studies have already shown that BoNT/A reduces cholinergic transmission in gastrointestinal smooth muscles as well as pylori and Oddi sphincter muscles by inhibiting ACh release [40,41,61–63]. In our experimental conditions, BoNT/A passed through the epithelial intestinal barrier and by diffusion through the extracellular space, locally targeted intestinal neurons independently of the blood circulation. BoNT/A reduced the frequency of spontaneous contractions of small intestine and inhibited the contractile response evoked by electric field stimulation within 2–4 h after intraluminal administration. Since carbachol was still able to stimulate muscle contraction after BoNT/A treatment, this supports a toxin-dependent inhibition of ACh release. To the best of our knowledge, this is the first report demonstrating a local intestinal effect of botulism after intraluminal administration of purified BoNT/A. Constipation is often (about 70%), but not always, associated with food-borne botulism and its participation to the progression of the disease is unknown [64,65]. However, constipation is a major and early symptom of botulism resulting from an intestinal colonization by *C. botulinum* such as during infant botulism [66,67]. This digestive symptom might result from a local effect of BoNT after crossing the intestinal barrier instead of toxin dissemination through the general circulation. BoNT locally synthesized in the intestine is possibly absorbed in a higher local concentration able to induce an intestinal muscle paralysis, than toxin orally ingested which disseminates more broadly through the digestive tract. Interestingly, BoNT/A-dependent inhibition of evoked smooth muscle contraction was significantly prevented by preincubation with the intravesicular domain of SV2C. This indicates that a protein related to SV2C/L4 might impair the BoNT/A passage through the intestinal barrier and/or toxin uptake by the underlying nerve terminals. We have previously found that SV2C, or a related protein, is part of BoNT/A receptor mediating toxin transcytosis through cultured intestinal cell monolayers [68]. In addition, SV2C/L4, which is expressed by intestinal and neuroendocrine STC-1 cells (Figure 5B), significantly prevented HcA entry into the intestinal crypt m-IC_{cl2} and STC-1 cells (Figure 5C, D). Taken together, these data suggest that SV2C, or a related protein, facilitates BoNT/A uptake through the mouse intestinal barrier.

BoNT/A trafficking in mouse intestinal wall was investigated with fluorescent HcA as already used [38]. First, we investigated the potential binding sites of HcA by using mouse small intestine cryosections overlaid with fluorescent probes. Thereby, HcA was found to bind only to certain cell types of the intestinal mucosa,

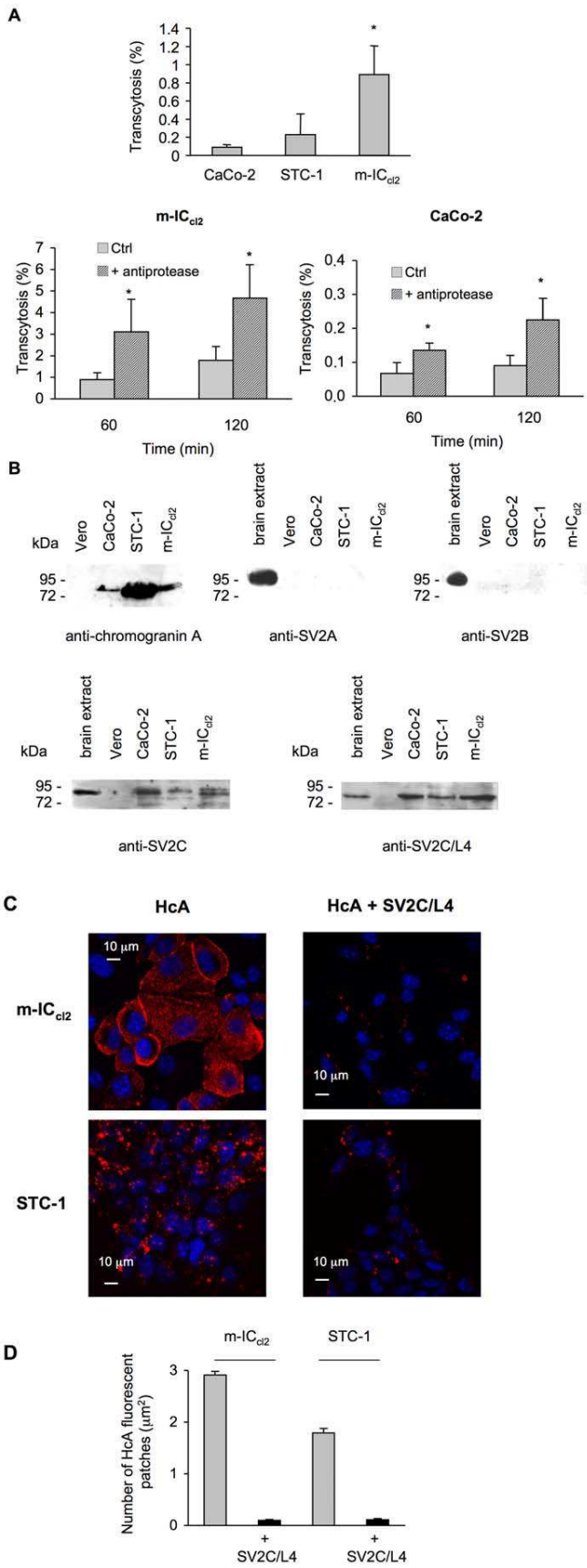


Figure 5. Transcytosis of BoNT/A through intestinal and neuroendocrine cell monolayers, and SV2C-dependent entry of HcA into cells. (A) Transcytosis of BoNT/A through the intestinal neuroendocrine cell line STC-1, m-IC_{cl2}, and Caco-2 cells. Cells were grown on filters (Transwell) until confluence. Integrity of cell monolayers was confirmed by ZO-1 labeling and non-permeability to FITC-labeled dextran (4300 Da). BoNT/A was added to the upper chamber and 60 min after incubation at 37°C, the toxin was assayed in the lower chamber by mouse bioassay. The results were expressed as the mean percentage (n=9) of transcytosed BoNT/A corresponding to the ratio of mouse lethal dose 50 between the lower and upper well (inoculation titer). BoNT/A transport was significantly higher (*) in m-IC_{cl2} and in cells treated with anti-proteases (Student's t test). (B) Immunoblotting of cell lysates separated by SDS-PAGE with anti-chromograninA, anti-SV2A, anti-SV2B, anti-SV2C, and anti SV2C-L4 antibodies. (C) m-IC_{cl2} and STC-1 grown on glass cover slips were exposed to HcA-Cy3, alone or in combination with a 10-fold more molar concentration of SV2C/L4-GST for 10 min at 37°C. SV2C/L4 impaired HcA uptake in both m-IC_{cl2} and STC-1 cells. (D) The number of HcA fluorescent patches per μm^2 in m-IC_{cl2} and STC-1 cells were reduced by 97% and 94% respectively (p<0.0001) by incubation with SV2C/L4. Each column represents the mean \pm SEM (n=250).

doi:10.1371/journal.ppat.1002583.g005

preferentially from intestinal crypts, whereas enterocytes showed only a weak staining of the brush border. In contrast, it was reported that the botulinum complexes type A or type C (BoNT and associated non-toxin proteins, ANTPs), strongly bind to the epithelia cell surface and goblet cells of guinea pig small intestine. Moreover, this binding was shown to be mediated by the hemagglutinins HA1 and HA3b, which interact with distinct gangliosides and/or glycoproteins [24,29,60,69] from those recognized by the neurotoxin alone [11,14]. This certainly accounts for the differential binding between progenitor toxin and BoNT to intestinal epithelial cells.

The functions of ANTPs are still controversial. Ancillary proteins probably participate in BoNT protection from degradation inside the digestive tract in a dose-dependent manner, particularly in the stomach [21]. In addition, it is assumed that HAs are involved in the internalization of progenitor type C toxin into intestinal cells and subsequently in the small intestine [24,29,70], and that they disrupt the intestinal epithelial barrier facilitating toxin absorption via the paracellular route [71–74]. However, since BoNT/A absorption from mouse stomach or small intestine was found to occur independently of the presence of ANTPs, HAs might have not an essential role but an additional facilitating effect on BoNT/A passage through the intestinal barrier. At pH around neutrality, as found in the intestine, BoNT dissociates from ANTPs [75], and thus might be absorbed through the epithelial intestinal barrier independently of ancillary proteins. In our model of ligated mouse intestinal loops and recording of muscle contraction, BoNT/A entered the intestinal mucosa in the absence of ANTPs supporting that ANTPs are not absolutely required in the intestinal uptake of BoNT/A.

The main finding of the *ex vivo* intestinal loop experiments was that fluorescent HcA preferentially recognized certain crypt cells. Intestinal crypts contain stem cells which proliferate and differentiate in four main cell types including enterocytes, mucus, endocrine, and Paneth cells, which are the most abundant cell type at the bottom of intestinal crypts [76]. HcA labeling was observed in chromogranin- and serotonin-immunoreactive cells, but not in Paneth cells. It is noteworthy that HcA was detected in only some, but not all, chromogranin-immunoreactive cells. This strongly suggests that HcA specifically binds to a subset of neuroendocrine cells from intestinal crypts, which possibly represent the preferential site of toxin uptake.

BoNT/A has been found to pass through intestinal cell monolayers grown on filter by a transcytotic mechanism [26,27]. We have previously reported that the passage rate of biologically active BoNT/A was higher (about 10-fold more) through the mouse crypt cell line m-IC_{cl2} than through the colonic enterocyte lines Caco-2 and T84 [30]. Here, we found that the neuroendocrine intestinal cell line STC-1 also permits a transcytotic passage of BoNT/A not statistically different from that through Caco-2 cells and to a lower extent than in m-IC_{cl2} cells. This further supports that a subset of intestinal crypt cells constitute a

preferential entry site of BoNT/A within the intestinal mucosa. However, STC-1 cells, which derive from an intestinal endocrine tumor, secrete several hormones and neuropeptides, but not serotonin [45]. Thereby, STC1 cells are not the most representative cells of the serotonin-reactive cells co-labeled with HcA, which have been identified in intestinal loop tests. To the best of our knowledge, no intestinal serotonin-secreting endocrine cell line is known at present. m-IC_{cl2} cells, which have been isolated from fetal mouse intestine, express various markers of intestinal cells and thus are a totipotent intestinal crypt cell line in a less differentiated state than the tumor cell line STC-1 [77]. m-IC_{cl2} cells show a neuroendocrine-like phenotype since they synthesize chromogranin A albeit to a lower extent than STC-1, but more significantly than Caco-2 cells (Figure 5B). In addition, m-IC_{cl2} cells retain transport pathways similar to those of native crypt cells. Indeed, in contrast to colonocytes such as Caco-2 and HT29 cells, m-IC_{cl2} cells express polymeric Ig receptors (pIgRs), which mediate the transepithelial transport of polymeric IgA and IgM [77]. It is noteworthy that only a low number of cells (1 to 2) from each intestinal crypt were labeled by HcA and are likely susceptible to transport the toxin through the intestinal barrier. This might account for the low rate of BoNT absorption from the digestive tract to the general circulation. Indeed, the transport rate of BoNT/B from rat duodenum to the lymphatic circulation has been estimated from 0.01 to 0.1% [22]. In addition, chromogranin-immunoreactive cells are distributed throughout the gastrointestinal tract, but are more predominant in the pylorus and duodenum [78]. This might support the observation that the upper small intestine is the preferential site of BoNT absorption [22–25].

Using the intestinal loop model, we found that neuronal cells in the submucosa and more laterally in the musculosa were stained with HcA. However, not all the neuronal cells were recognized by HcA as tested by co-labeling with antibodies against neurofilament, indicating that HcA targeted specific neurons in the intestine. About half of neurons in the submucosa are ChAT-immunoreactive, and most of them produce other neurotransmitter types [53,55]. As previously found [79], HcA stained most of the cholinergic neurons (more than 90%) of the submucosa. However, in contrast to previous findings [79], BoNT/A recognized other neuronal cells in the intestinal mucosa, albeit to a lower extent. Indeed, a low proportion of VIP-immunoreactive neurons, which are also largely present in the submucosa (about 45%) [53] as well as a low proportion of glutamatergic and serotonergic neurons were targeted by HcA. It is noteworthy that the BoNT/A receptor, assigned to ganglioside GD_{1b}/GT_{1b} and SV2 protein [6,7,10,14], is part of a synaptic vesicle complex, which contains additional membrane proteins including vesicular glutamate transporters (cGLY-1 and vGLUT-2) [80], supporting that BoNT/A may target glutamatergic neurons. BoNTs are known to block the release of ACh, but also that of other neurotransmitters and neuropeptides the effects of which are still poorly known

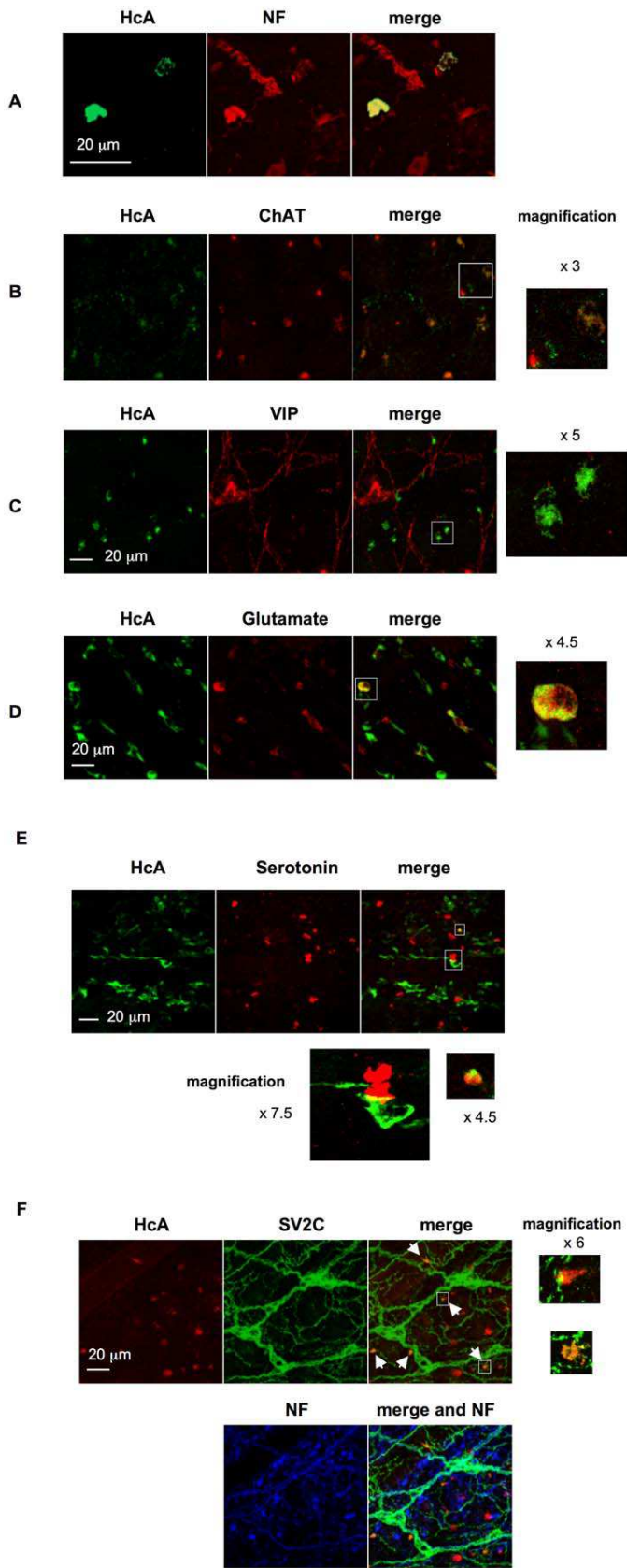


Figure 6. Neuronal cell types recognized by HcA in the intestinal submucosa after its inoculation into the intestinal lumen (30 min incubation). (A) Cells and neuronal structures labeled with HcA (green) were immunoreactive to anti-neurofilament (NF, red), indicating that HcA reached neuronal structures in the submucosa. Note that only few neurons and neuronal extensions were labeled with HcA (B) Co-staining with ChAT shows that some but not all ChAT-immunoreactive neurons were labeled with HcA. (C) Co-staining with anti-VIP antibodies showing no colocalisation with HcA. (D) Co-staining with anti-glutamate. Note that only a few neurons stained with anti-glutamate antibodies colocalized with HcA (scale bar = 20 μ m). (E) Co-staining with anti-serotonin antibodies. Only few neurons stained with anti-serotonin antibodies colocalized with HcA. Note in the phase contrast in (E) that serotonin labeling was observed in some crypt intestinal cells and a few nerve endings in the submucosa. (F) Anti-SV2C and anti-neurofilament antibodies stained neurons and thin neuronal extensions in the submucosa. HcA labeled only certain nerve endings (arrows). Note that some SV2C-immunoreactive large cells with thicker extensions were neither stained with anti-neurofilament antibodies nor with HcA. (G) Quantification of colocalization between HcA and neurotransmitter markers in mouse intestinal submucosa. Results are expressed as colocalization index for which 1 represent 100% of colocalization between HcA and a neuronal marker. Colocalization index represents the ratio of the number of HcA positive terminal endings colocalized with one neurotransmitter marker to the total number of terminal endings labeled with HcA. Columns represent means \pm SD accounting for at least 50 cells in three different experiments. doi:10.1371/journal.ppat.1002583.g006

[61,81–86]. The BoNT/A-dependent inhibitory activity on non-ChAT neurons in the intestine may contribute to the local effects of the toxin.

In the myenteric plexus, HcA stained essentially cholinergic neurons, which are the predominant neuronal cells in this tissue (about 80%) [53]. But, only a part of ChAT-immunoreactive neurons were labeled with HcA. This might be due either to a low number of HcA molecules reaching the myenteric plexus, or to the fact that HcA recognized only a subset of ChAT-reactive neurons, which remains to be determined. Targeting of cholinergic neurons of the myenteric plexus by HcA is consistent with constipation which frequently occurs during botulism, and with the BoNT/A-dependent inhibition of evoked intestinal contractions in the *ex vivo* experiments.

SV2C, the protein receptor with the highest affinity to BoNT/A [10,14], was the main isoform detected in the mouse intestine, whereas no, or a weak staining was obtained with anti-SV2B or -SV2A antibodies. Immunostaining with anti-SV2C antibodies was

observed in cells with thin arborescent extensions, which were also labeled with anti-neurofilament antibodies. However, SV2C staining did not match all the cells labeled with anti-neurofilament antibodies, indicating a SV2C distribution in a broader range of cell types than neuronal cells in the intestinal mucosa. HcA did not bind all along the neuronal extensions or cell structures which are recognized by anti-SV2C antibodies, but only in discrete zones. One possibility is that HcA staining was too weak to be visualized. Alternatively, the BoNT/A high-affinity receptors, which consist of a ganglioside part and a protein part such as SV2C [11,14–17], are distributed in only some restricted areas on the neuronal cell surface. This is supported by the observed colocalization between HcA and SV2C, which is restricted to only some cell areas (Figure 6F). Moreover, SV2, which is an integral protein of the synaptic vesicle membrane, has to be exposed to the extracellular compartment to be accessible to BoNT/A, as during synaptic vesicle fusion with the presynaptic membrane. Another type of thin cell extensions stained with anti-SV2C antibodies, formed a dense network all around microvessels (Figure

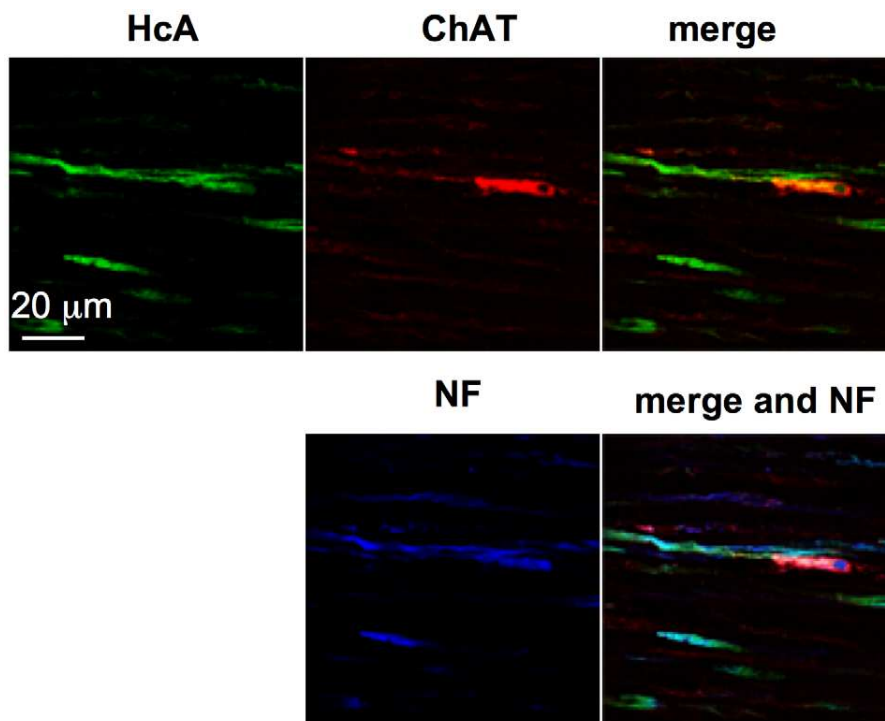


Figure 7. HcA labeled cholinergic neurons in the muscleda after 90 min exposure in the intestinal lumen. Co-staining with anti-ChAT and/or anti-neurofilament antibodies. Note that HcA preferentially stained neuronal cell extensions and to a lower extent cell bodies. (scale bar = 20 μ m). doi:10.1371/journal.ppat.1002583.g007

S2). These neuronal extensions, which were only faintly stained with anti-neurofilament antibodies, are probably involved in vessel innervation [87], but were not observed to be targeted by HcA under our experimental conditions. In addition, glial cells identified by GFAP immunofluorescence were also stained with anti-SV2C antibodies but not with HcA (Figure S3C). Thereby, SV2C seems to have a broad distribution and to form BoNT/A high-affinity receptor only when associated with gangliosides in certain neuronal membrane domains.

When passed across the intestinal barrier, BoNT is delivered to the connective tissue of the submucosa, where the toxin can have access to microvessel endothelial cells. BoNT passage into the blood and lymph circulation, supposes a transcytotic transport of the toxin through the endothelial cell barrier of vessels. In ligated intestinal loop experiments, no staining of endothelial cells forming small vessels or microvessel structure was observed in the submucosa and musculosa. Under natural conditions, BoNT binding to endothelial cells is possibly low and/or transient permitting the passage of the toxin into the vessel lumen. In our experimental conditions, the blood circulation was interrupted, thus preventing HcA passage into vessels. But, the diffusion through the matrix of connective tissue can mediate the toxin trafficking until the target cells in the submucosa and musculosa. Indeed, HcA staining of neuronal cells in the submucosa after 30–60 min incubation of the probe into the intestinal lumen and later (60–120 min) in the musculosa, as well as the decrease in fluorescence intensity of HcA from the mucosa to musculosa likely reflects the progressive diffusion of the recombinant protein in the tissue extracellular matrix. It cannot be ruled out that a shorter time period may be required in natural conditions for the passage of low amounts of HcA across the intestinal epithelial cell barrier and subsequent targeting to neuronal cells. Alternatively, another mode of HcA transport might be involved. Indeed, like TeNT, which undergoes a retrograde transport into motor neurons, a transcytotic mechanism might also be supported by neuronal cells from the ENS to disseminate BoNT/A to target neuronal cells both locally and even at distance from the intestine. One possibility is that BoNT/A uses non-cholinergic neurons such as those identified with fluorescent HcA to be transported to other target neurons. Indeed, neurons from ENS are highly interconnected between them and with neurons of the central nervous system [31,32]. Moreover, it has been recently found that BoNT/A can use a retrograde transport and transcytosis to migrate from peripheral neurons to central circuits [88,89]. This opens novel ways of investigation to unravel the mechanism of BoNT transport from the intestinal barrier to target motoneurons, which is still poorly known.

In conclusion, in this work we have shown that BoNT/A enters the intestinal mucosa, possibly via an uptake process involving SV2C or a related protein, and impairs spontaneous and electrically-evoked muscle contractions. Following intraluminal administration, HcA preferentially recognized a subset of neuroendocrine crypt cells in the mouse upper small intestine, which likely represents the main pathway for toxin entry and passage across the epithelial cell barrier. HcA diffused progressively within the submucosa, and later reached the musculosa, where it targeted specifically some cholinergic neurons and to a lower extent glutamatergic and serotonergic neurons. The implication of these non-cholinergic neurons in the botulinum intoxication process remains to be determined.

Materials and Methods

Ethic statements

All experiments were performed in accordance with French and European Community guidelines for laboratory animal handling.

The protocols of experiments were approved by the Pasteur Institute (Agreement of laboratory animal use n° 75-279).

Reagents

The primary antibodies used recognized neurofilament (Sigma; mouse, 1:500 dilution), Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) (Sigma; rabbit, 1:200 dilution), Choline Acetyltransferase (ChAT) (Chemicon International, Temecula, CA, USA; goat, 1:100 dilution), VIP (Abcam; rabbit, diluted 1:200), Serotonin (Sigma; rabbit, diluted 1:100; and Abcam; goat, 1/200 dilution), Glutamate (Chemicon; rabbit, diluted 1:200), SV2A, SV2B (Synaptic systems; rabbit, diluted 1:200), SV2C (Santa Cruz; goat, diluted 1:200), chromogranin A (Abcam; rabbit, diluted 1:200). For Western blotting rabbit anti-SV2C (Abcam 33892) and rabbit anti-SV2C intravesicular domain were used. SV2C/L4 domain (amino acid 454 to 579) was produced as a GST-fusion protein [30] and was used to immunize rabbits. Specific antibodies against SV2C/L4 were purified by immunoaffinity with SV2C/L4 produced as a histidine-tagged protein in pET28 vector (Novagen) and immobilized on cyanogen bromide activated Sepharose-4B (GE Healthcare).

The secondary antibodies used were: Cy5 coupled donkey anti-mouse IgG (US Biological), Cy3 coupled donkey anti-goat IgG (US Biological), Alexa488 donkey coupled anti-goat IgG (Invitrogen), Alexa488 coupled anti-rabbit IgG (Invitrogen). 4'-6'-Diamidino-2-phenylindole (DAPI, SIGMA) was incubated with secondary antibodies to stain cell nuclei.

Animals

Adult male IOPS mice (20–25 g body weight) purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France) were anesthetized by inhalation with Isoflurane (AErrane, Baxter S.A., Lessines, Belgium), and euthanized by dislocation of the cervical vertebrae, as specified by the CNRS Animal Ethics User's Committee.

Protein production

BoNT/A was produced and purified as previously described [90].

Recombinant His-tag Hc fragment of BoNT/A was produced and purified from pET28b vector containing DNA encoding for HcA cloned into *Bam*HI and *Sal*I sites, as previously described [91]. A recombinant derivative plasmid encoding HcA with a N-terminal tag containing 4 cysteine residues, as described for TeNT-Hc [92], was performed inserting the two complementary oligonucleotides P1132 (5'-TATGGCAGAGGCAGCAGCAGCAGAGGCTTGTTCGAGAGTGTTCGACGAG-3') and P1131 (5'-GATCCCTCGTGCACAACACTCTCGACAA-CAAGCCTCTCGTGTCTGC TGCCTCTGCCA-3') into *Nde*I and *Bam*HI sites of pET28b vector. HcA with 4 Cys tag was then labeled with either maleimide Alexa 488 reagent (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) or maleimide Cy3 (Amersham, Les Ulis, France) according to the manufacturer's recommendations.

cDNA coding the intraluminal SV2C fragment L4 (amino acid 454 to 579) was PCR-amplified as previously described [68] and cloned into pGEX-2T. The fusion protein, GST-SV2C/L4, was produced in *E. coli* BL21 and purified on glutathione agarose matrix (SIGMA) equilibrated with 50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 7.5 and eluted with 40 mM reduced glutathione in the same buffer. Purified fusion protein was then dialyzed against phosphate balanced solution (PBS) before use.

Tension recordings on isolated mouse ileum segments

The mouse ileum was removed and placed in an oxygenated standard Krebs-Ringer solution composed of 154 mM NaCl,

5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 11 mM glucose and 5 mM HEPES (pH 7.4). An ileum segment of about 2 cm length was extensively washed to flush out the intestinal content, and mounted in a silicone-lined chamber (4 ml volume), bathed in the standard medium. For tension measurements, one of the ends of the ileum segment was tied with silk thread, via an adjustable stainless-steel hook, to an FT03 isometric transducer (Grass Instruments, AstroMed, W. Warwick, RI, USA), and the other end was ligatured and pinned onto the silicone-coated bath via stainless-steel micro pins. BoNT/A (5 µg/ml) diluted in the Krebs-Ringer solution was injected into the ileum segment, between the two ligatures, with a micro syringe. Electric field stimulation was performed with an electrode assembly, placed along and on both sides of the length of the ileum segment, and connected to S-48 Grass stimulator. Preparations were usually stimulated with pulses of 0.15 ms duration at 30 Hz for 15 or 25 s, every hour. The resting tension was adjusted for each preparation investigated with a mobile micrometer stage (to allow incremental adjustments of ileum length) in order to obtain maximal spontaneous or evoked contractile responses, and was monitored during the whole duration of the experiment. Carbachol (Sigma, 20 µM) was added to the bath solution of ileal segment exposed to BoNT/A for 3–4 hours to check that ACh receptors were not affected by intoxication. Tension signals from the isometric transducer were amplified, collected, and digitized with the aid of a computer equipped with a DT2821 analogue to digital interface board (Data Translation, Marlboro, USA) and expressed in g or N. Data acquisition and analysis were performed with a program kindly provided by Dr. John Dempster (University of Strathclyde, Scotland). All experiments were performed at 22±0.5°C.

Ex-vivo experiments with mouse ligated ileal loops

Segments of mouse ileum (2 cm length) were removed and immersed in oxygenated Krebs-Ringer solution. After extensive wash to flush out the luminal contents, segments were ligated on both extremities and injected with a micro syringe with fluorescent HcA (0.5 µg) diluted in 150 µl of Krebs-Ringer solution (5.5 10⁻⁸ M). The injection site was isolated with another ligature and ileal segments were incubated in oxygenated Krebs-Ringer solution for different times (30 to 120 min) before washing. Tissues were cut along the mesenteric border and pinned out with the mucosal surface facing down in a silicone-lined Petri dish. After fixation with 4% paraformaldehyde (PFA; 1 h, 22°C), tissues were washed in phosphate buffer saline (PBS) and autofluorescence quenched with 50 mM NH₄Cl (30 min, 22°C).

Microdissection and indirect immunofluorescence of dissected ileal loops

Specimens were dissected by carefully separating the mucosa and submucosa from the muscle layers under a microscope. Whole-mount preparations of the myenteric and submucosal plexuses of the ileum were permeabilized and blocked with PBS/bovine serum albumin (BSA) 2%/Donkey Serum 10%/Triton 2% for 1 h at room temperature (RT) and incubated with primary antibody for 16 h at RT. After 3 washes of 10 min in PBS, tissue sections were incubated for 4 h at RT with the appropriate secondary antibodies diluted 1:500 in PBS/BSA 2%/Triton 2%. After being washed in PBS (3×10 min), tissues were mounted in Mowiol (Polysciences Europe, Eppelheim, Germany) and analyzed using a Zeiss confocal laser scanning microscope and a ×63 oil immersion objective (N.A. 1.4). For quantitative analysis of co-localization of HcA with other markers, images of 512×512 pixels were taken from series of optical sections of 0.8 µm thickness. The colocalisation was analyzed with the Zeiss LSM Image Browser software, on 100 HcA-immunoreactive varicosities for each marker using the merged image from the

different experiments. For analysis of BoNT/A internalization into intestinal cells, total fluorescence intensity was quantified in serotonin-positive cells in at least 40 optical fields taken from three independent experiments. Data are presented as the mean ± SD.

Small intestine cryosections

Segments of the ileum were removed and immersed in oxygenated Krebs-Ringer solution. After extensive wash to flush out the luminal contents, the tissues were embedded in OCT embedding medium (Tissue-Tek, Miles Laboratories, Naperville, IL, USA), and stored at -80°C. Sections (5 µm) were cut with a cryostat-microtome and thaw, mounted onto SuperFrost glass slides (Fisher Scientific, Illkirch, France). For HcA binding experiments, sections were removed from the freezer and incubated for 30 min with 10 µg/ml Alexa- or Cy3-labeled HcA in PBS/BSA (1%). After 3 washes in PBS, tissue sections were fixed with 4% PFA for 20 min at RT (22°C), rinsed in PBS and autofluorescence was quenched with 50 mM NH₄Cl (15 min, 22°C). After permeabilization with 1% triton X-100 in PBS for 10 min, tissues were stained with TRITC-phalloidin (Sigma, 0.4 µg/ml), TRITC-*Urexa europaeus* agglutinin type 1 (UEA1, 1 µg/ml), immunostained with anti-neurofilament 200 (Sigma; mouse, diluted 1:500) and Cy3 coupled goat anti-mouse IgG (Sigma, diluted 1:250). After 3 washes in PBS, sections were mounted in Mowiol and observed with a Zeiss confocal laser scanning microscope and a ×25 objective. For quantitative analysis of co-localization of HcA with markers, images of 512×512 pixels were taken from serial optical sections of 1 µm thickness. Data are presented as the mean ± SD.

BoNT/A transcytosis and immunofluorescence experiments

The mouse neuroendocrine intestinal cell line STC-1 [45], m-IC_{cl2} [77] and Caco-2 (human colon) cells were grown on filter (Transwell, Corning) in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Invitrogen) until confluence. Integrity of tight junctions was confirmed by ZO-1 labeling and non-permeability to FITC-labeled dextran (4300Da, Sigma-Aldrich) (data not shown). BoNT/A as prepared previously [30] was added to the apical chamber. After 60 min incubation at 37°C, medium from the basal chamber was collected and BoNT/A was assayed by the mouse bioassay as previously described [30]. In the experiments with anti-proteases, culture medium in the apical and basolateral chambers was replaced with Dulbecco's medium containing 1% bovine serum albumin (BSA) and 1× anti-protease cocktail without EDTA (Calbiochem) 30 min prior addition of BoNT/A into the apical compartment. BoNT/A transcytosis was monitored in basolateral medium samples after 60 and 120 min incubation at 37°C by a biological assay as previously described [30].

m-IC_{cl2} and STC-1 cells grown on glass coverslips (coated with poly-ornithine, Invitrogen, for STC-1 cells) were exposed to HcA-Cy3 (2.5 µg/ml), alone or in combination with a 10-fold more molar concentration of SV2C/L4-GST for 10 min at 37°C. Cells were washed twice with PBS, fixed with 4% PFA and mounted in Mowiol. The number of HcA fluorescent patches per µm² was evaluated in m-IC_{cl2} and STC-1 cells by counting in images of 512×512 pixels (10 optical fields), taken from serial optical sections of 1 µm thickness from 3 experiments. Data was evaluated using ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

SDS-PAGE and immunoblotting

Cells were lysed with boiling Laemmli buffer and lysates were homogenized by passages through a 26-gauge needle. An equal

amount of protein (100 µg) from each boiled sample was loaded on a SDS-polyacrylamide (10%) gel. Samples separated by SDS-PAGE were transferred to nitrocellulose membrane (Amersham) and blocked in phosphate saline buffer containing 5% dried milk, washed with Tris-buffered saline containing 0.1% Tween20 (TBST), incubated with primary antibodies diluted in TBST overnight at room temperature, then washed 5 times for 10 min, and incubated for 1 h at room temperature with HRP-protein A diluted in TBST. After membrane washing in TBST, the specific signal was detected by enhanced chemiluminescence.

Specificity of the anti-SV2A antibodies was tested using lysate from SV2A-transfected cells (Santa Cruz). The lysate (10 µg) was run on a 10% SDS-PAGE, transferred on nitrocellulose, and blotted with anti-SV2A, anti-SV2B, anti-SV2C, and anti-SV2C-L4 antibodies. The specificity of anti-SV2B and anti-SV2C antibodies was tested on rat brain extract by competition with peptides, which had been used for immunization. Rat brain extract (5 µg, Santa Cruz) was run on a 10% SDS-PAGE, transferred on nitrocellulose, and blotted with anti-SV2B or anti-SV2C antibodies preincubated or not with the indicated SV2B or SV2C peptides (10 µg, Synaptic System) for 30 min at room temperature.

Statistics

Values in the text are expressed as the mean ± SD, unless otherwise indicated. Differences between means were tested using Student's *t*-test, and *p*-values < 0.05 were taken to indicate significance.

Supporting Information

Figure S1 Specificity of the anti-SV2 antibodies tested by Western blot. **(A)** In lysate of cells overexpressing SV2A, the corresponding 75–80 kDa band was detected with anti-SV2A, but not with anti-SV2B, anti-SV2C, and anti-SV2C-L4 antibodies. **(B)** In rat brain extract, a band corresponding to SV2B was detected with anti-SV2B antibodies alone or pre-incubated with SV2C peptide. No band was observed when anti-SV2B antibodies were

preincubated with SV2B peptide. Conversely, a band corresponding to SV2C was detected in rat brain lysate with anti-SV2C antibodies alone or pre-incubated with SV2B, but to a much lower extent when antibodies were pre-incubated with SV2C peptide. (TIF)

Figure S2 Immuno-detection of BoNT/A (10⁵ LD₅₀/ml) injected into the lumen of a ligated ileal segment (4 h incubation) using antibodies against HcA. BoNT/A (green) was detected in filament structures of the musculosa co-labeled with anti-NF (blue) and anti-ChAT (red), showing that BoNT/A, injected in the intestinal lumen, reached cholinergic nerve endings in the musculosa. (scale bar = 20 µm). (TIF)

Figure S3 Immunolabeling pattern of SV2C in intestinal submucosa. **(A)** HcA (red) was injected into the lumen of a ligated intestinal loop and incubated for 1 h at room temperature. A network of thin cell extensions around microvessels in the submucosa were stained with anti-SV2C (green), and not with HcA. HcA only decorated some filament extremities. **(B)** Thin neuronal extensions around microvessels were labeled with anti-neurofilament (NF, blue) and anti-SV2C (red) antibodies. **(C)** Glial cells in the submucosa were stained with anti-GFAP (green) and anti-SV2C (red), but not with HcA (not shown) (scale bar = 20 µm). (TIF)

Acknowledgments

We thank G. Rindi and C. Roche for providing the STC-1 cell line, as well as A. Vandewalle for providing the m-IC₂₂ cells.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AC MRP JM. Performed the experiments: AC JM MRP CC. Analyzed the data: AC MRP JM. Contributed reagents/materials/analysis tools: AC MRP JM. Wrote the paper: MRP AC JM.

References

- Herreros J, Lalli G, Montecucco C, Schiavo G (1999) Pathophysiological properties of clostridial neurotoxins. In: Alouf JE, Freer JH, eds. *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*. London: Academic Press. pp 202–228.
- Humeau Y, Doussau F, Grant NJ, Poulain B (2000) How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release. *Biochimie* 82: 427–446.
- Poulain B, Stiles BG, Popoff MR, Molgó J (2006) Attack of the nervous system by clostridial toxins: Physical findings, cellular and molecular actions. In: Alouf JE, Popoff MR, eds. *The Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, Academic Press. pp 348–389.
- Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C (2000) Neurotoxins affecting neuroexcitotoxicity. *Physiol Rev* 80: 717–766.
- Montecucco C, Rossetto O, Schiavo G (2004) Presynaptic receptor arrays for clostridial neurotoxins. *Trends Microbiol* 12: 442–446.
- Kitamura M, Takamiya K, Aizawa S, Furukawa K (1999) Gangliosides are the binding substances in neural cells for tetanus and botulinum toxins in mice. *Biochim Biophys Acta* 1441: 1–3.
- Rummel A, Mahrhold S, Bigalke H, Binz T (2004) The H_{cc}-domain of botulinum neurotoxins A and B exhibits a singular ganglioside binding site displaying serotype specific carbohydrate interaction. *Mol Microbiol* 51: 631–643.
- Nishiki T, Tokuyama Y, Kamata Y, Nemoto Y, Yoshida A, et al. (1996) The high-affinity of *Clostridium botulinum* type B neurotoxin to synaptotagmin II associated with gangliosides G_{T1B}/G_{D1a}. *FEBS Lett* 378: 253–257.
- Kozaki S, Kamata Y, Watarai S, Nishiki T, Mochida S (1998) Ganglioside GT1b as a complementary receptor component for *Clostridium botulinum* neurotoxins. *Microbiol Pathol* 25: 91–99.
- Dong M, Richards DA, Goodnough MC, Tepp WH, Johnson EA, et al. (2003) Synaptotagmins I and II mediate entry of botulinum neurotoxin B into cells. *J Cell Biol* 162: 1293–1303.
- Dong M, Yeh F, Tepp WH, Dean C, Johnson EA, et al. (2006) SV2 is the protein receptor for botulinum neurotoxin A. *Science* 312: 592–596.
- Nishiki T, Kamata Y, Nemoto Y, Omori A, Ito T, et al. (1994) Identification of protein receptor for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin in rat brain synaptosomes. *J Biol Chem* 269: 10498–10503.
- Rummel A, Karnath T, Henke T, Bigalke H, Binz T (2004) Synaptotagmins I and II act as nerve cell receptors for botulinum neurotoxin G. *J Biol Chem* 279: 30865–30870.
- Mahrhold S, Rummel A, Bigalke H, Davletov B, Binz T (2006) The synaptic vesicle protein 2C mediates the uptake of botulinum neurotoxin A into phrenic nerves. *FEBS Lett* 580: 2011–2014.
- Dong M, Liu H, Tepp WH, Johnson EA, Janz R, et al. (2008) Glycosylated SV2A and SV2B mediate the entry of botulinum neurotoxin E into neurons. *Mol Biol Cell* 19: 5226–5237.
- Fu Z, Chen C, Barbieri JT, Kim JJ, Baldwin MR (2009) Glycosylated SV2 and gangliosides as dual receptors for botulinum neurotoxin serotype F. *Biochemistry* 48: 5631–5641.
- Rummel A, Hafner K, Mahrhold S, Darashchonak N, Holt M, et al. (2009) Botulinum neurotoxins C, E and F bind gangliosides via a conserved binding site prior to stimulation-dependent uptake with botulinum neurotoxin F utilising the three isoforms of SV2 as second receptor. *J Neurochem* 110: 1942–1954.
- Peng L, Tepp WH, Johnson EA, Dong M (2011) Botulinum neurotoxin D uses synaptic vesicle protein SV2 and gangliosides as receptors. *PLoS Pathog* 7: e1002008.
- Yeh FL, Dong M, Yao J, Tepp WH, Lin G, et al. (2011) SV2 mediates entry of tetanus neurotoxin into central neurons. *PLoS Pathog* 6: e1001207.
- Tackett CO, Rogawski MA (1989) Botulism. In: Simpson LL, ed. *Botulinum neurotoxin and Tetanus toxin*. San Diego: Academic Press. pp 351–378.
- Maksymowych AB, Rienhard M, Malizio CJ, Goodnough MC, Johnson EA, et al. (1999) Pure botulinum neurotoxin is absorbed from the stomach and small

- intestine and produces peripheral neuromuscular blockade. *Infect Immun* 67: 4708–4712.
22. Sugii S, Ohishi I, Sakaguchi G (1977) Intestinal absorption of botulinum toxins of different molecular sizes in rats. *Infect Immun* 17: 491–496.
 23. Bonventre PF (1979) Absorption of botulinum toxin from the gastrointestinal tract. *Rev Infect Dis* 1: 663–667.
 24. Fujinaga Y, Inoue K, Watanabe S, Yokota K, Hirai Y, et al. (1997) The haemagglutinin of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin plays an essential role in binding of toxin to the epithelial cells of guinea pig intestine, leading to the efficient absorption of the toxin. *Microbiol* 143: 3841–3847.
 25. Kitamura M, Sakaguchi S, Sakaguchi G (1969) Significance of 12S toxin of *Clostridium botulinum* type E. *J Bacteriol* 98: 1173–1178.
 26. Maksymowych AB, Simpson LI (2004) Structural features of the botulinum neurotoxin molecule that govern binding and transcytosis across polarized human intestinal epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 210: 633–641.
 27. Maksymowych AB, Simpson LL (1998) Binding and transcytosis of botulinum neurotoxin by polarized human carcinoma cells. *J Biol Chem* 273: 21950–21957.
 28. Park JB, Simpson LL (2003) Inhalation poisoning by botulinum toxin and inhalation vaccination with its heavy-chain component. *Infect Immun* 71: 1147–1154.
 29. Nishikawa A, Uotsu N, Arimitsu H, Lee JC, Miura Y, et al. (2004) The receptor and transporter for internalization of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin into HT-29 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 319: 327–333.
 30. Couesnon A, Pereira Y, Popoff MR (2008) Receptor-mediated transcytosis of botulinum neurotoxin A through intestinal cell monolayers. *Cell Microbiol* 10: 375–387.
 31. Goyal RK, Hirano I (1996) The enteric nervous system. *N Engl J Med* 334: 1106–1115.
 32. Grundy D, Schermann M (2006) Enteric nervous system. *Curr Opin Gastroenterol* 22: 102–110.
 33. McLean PG, Borman RA, Lee K (2006) 5-HT in the enteric nervous system: gut function and neuropharmacology. *Trends Neurosci* 30: 9–13.
 34. Bohnert S, Schiavo G (2005) Tetanus toxin is transported in a novel neuronal compartment characterized by a specialized pH regulation. *J Biol Chem* 280: 42336–42344.
 35. Roux S, Saint Clément C, Curie T, Girard E, Mena FJ, et al. (2006) Brain-derived neurotrophic factor facilitates in vivo internalization of tetanus neurotoxin C-terminal fragment fusion proteins in mature mouse motor nerve terminals. *Eur J Neurosci* 24: 1546–1554.
 36. Lalli G, Gschmeissner S, Schiavo G (2003) Myosin Va and microtubule-based motors are required for fast axonal retrograde transport of tetanus toxin in motor neurons. *J Cell Sci* 116: 4639–4650.
 37. Montal M (2010) Botulinum neurotoxin: a marvel of protein design. *Annu Rev Biochem* 79: 591–617.
 38. Harper CB, Martin S, Nguyen TH, Daniels SJ, Lavidis NA, et al. (2011) Dynamin inhibition blocks botulinum neurotoxin type A endocytosis in neurons and delays botulism. *J Biol Chem* 286: 35966–35976.
 39. Ahsan CR, Hajnoczky G, Maksymowych AB, Simpson LL (2005) Visualization of binding and transcytosis of botulinum toxin by human intestinal epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 315: 1028–1035.
 40. Bigalke H, Habermann E (1980) Blockade by tetanus and botulinum A toxin of postganglionic cholinergic nerve endings in the myenteric plexus. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol* 312: 255–263.
 41. Sand J, Nordback I, Arvola P, Porsti I, Kalloo A, et al. (1998) Effects of botulinum toxin A on the sphincter of Oddi: an in vivo and in vitro study. *Gut* 42: 507–510.
 42. Garabedian EM, Roberts LJJ, McNevin MS, Gordon JI (1997) Examining the role of Paneth cells in the small intestine by lineage ablation in transgenic mice. *J Biol Chem* 272: 23729–23740.
 43. Kandori H, Hirayama K, Takeda M, Doi K (1996) Histochemical, lectin-histochemical and morphometrical characteristics of intestinal goblet cells of germ free and conventional mice. *Exp Anim* 45: 155–160.
 44. Portela-Gomes GM, Stridsberg M, Johansson H, Grimelius L (1997) Complex co-localization of chromogranins and neurohormones in the human gastrointestinal tract. *J Histochem Cytochem* 45: 815–822.
 45. Rindi G, Grant SG, Yianguo Y, Ghatei MA, Bloom SR, et al. (1990) Development of neuroendocrine tumors in the gastrointestinal tract of transgenic mice. Heterogeneity of hormone expression. *Am J Pathol* 136: 1349–1363.
 46. Wang JK, Lee MS, Tseng IC, Chou FP, Chen YW, et al. (2009) Polarized epithelial cells secrete matriptase as a consequence of zymogen activation and HAI-1-mediated inhibition. *Am J Physiol Cell Physiol* 297: C459–470.
 47. Howell S, Kenny AJ, Turner AJ (1992) A survey of membrane peptidases in two human colonic cell lines, Caco-2 and HT-29. *Biochem J* 284: 595–601.
 48. Lottaz D, Maurer CA, Hahn D, Buchler MW, Sterchi EE (1999) Nonpolarized secretion of human meprin alpha in colorectal cancer generates an increased proteolytic potential in the stroma. *Cancer Res* 59: 1127–1133.
 49. Meunier FA, Herreros J, Schiavo G, Poulain B, Molgó J (2002) Molecular mechanism of action of botulinum neurotoxins and the synaptic remodeling they induce in vivo at the skeletal neuromuscular junction. In: Massaro J, ed. *Handbook of Neurotoxicology*. Totowa, NJ: Humana Press. pp 305–347.
 50. Verderio C, Coco S, Rossetto O, Montecucco C, Matteoli M (1999) Internalization and proteolytic action of botulinum toxins in CNS neurons and astrocytes. *J Neurochem* 73: 372–379.
 51. Verderio C, Grumelli C, Raiteri L, Coco S, Paluzzi S, et al. (2007) Traffic of botulinum toxins A and E in excitatory and inhibitory neurons. *Traffic* 8: 142–153.
 52. Kulkarni-Narta A, Beltz AJ, Brown DR (1999) Catecholaminergic, cholinergic and peptidergic innervation of gut-associated lymphoid tissue in porcine jejunum and ileum. *Cell Tissue Res* 298: 275–286.
 53. Furness JB, Jones CA, Nurgali K, Clerc N (2004) Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Prog Neurobiol* 72: 143–164.
 54. Hernandez L, Gama P, Alvares EP (2004) Ileal VIP submucosal neurons: confocal study of the area enlargement induced by myenteric denervation in weanling rats. *Regul Peptides* 117: 69–72.
 55. Brookes SH (2001) Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine. *Anat Rec* 262: 58–70.
 56. Liu MT, Rothstein JD, Gershon MD, Kirchgessner AL (1987) Glutamanergic enteric neurons. *J Neurosci* 7: 4764–4784.
 57. Baldwin MR, Barbieri JT (2009) Association of botulinum neurotoxins with synaptic vesicle protein complexes. *Toxicol* 54: 570–574.
 58. Bajjalieh SM, Frantz GD, Weimann JM, McConnell SK, Scheller RH (1994) Differential expression of synaptic vesicle protein 2 (SV2) isoforms. *J Neurosci* 14: 5223–5235.
 59. Portela-Gomes GM, Lukinius A, Grimelius L (2000) Synaptic vesicle protein 2, a new neuroendocrine cell marker. *Am J Pathol* 157: 1299–1309.
 60. Fujinaga Y, Inoue K, Nomura T, Sasaki J, Marvaud JC, et al. (2000) Identification and characterization of functional subunits of *Clostridium botulinum* type A progenitor toxin involved in binding to intestinal microvilli and erythrocytes. *FEBS Lett* 467: 179–183.
 61. MacKenzie I, Burnstock G, Dolly JO (1982) The effects of purified botulinum neurotoxin type A on cholinergic, adrenergic and non-adrenergic, atropine-resistant autonomic neuromuscular transmission. *Neuroscience* 7: 997–1006.
 62. Pasricha PJ, Ravich WJ, Kalloo AN (1993) Effects of intrasphincteric botulinum toxin on the lower esophageal sphincter in piglets. *Gastroenterology* 105: 1045–1049.
 63. James AN, Ryan JP, Parkman HP (2003) Inhibitory effects of botulinum toxin on pyloric and antral smooth muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285: G291–297.
 64. Armon SS, Schechter R, Inglesby TV, Henderson DA, Bartlett JG, et al. (2001) Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA* 285: 1059–1070.
 65. Sobel J (2005) Botulism. *Clin Infect Dis* 41: 1167–1173.
 66. Brook I (2007) Infant botulism. *J Perinatol* 27: 175–180.
 67. Mitchell WG, Tseng-Ong L (2008) Reviews of infant botulism at children's hospital los angeles. *J Child Neurol* 23: 968.
 68. Couesnon A, Raffestin S, Popoff MR (2006) Expression of botulinum neurotoxins A and E, and associated non-toxin genes, during the transition phase and stability at high temperature: analysis by quantitative reverse transcription-PCR. *Microbiol* 152: 759–770.
 69. Fujinaga Y, Inoue K, Watarai S, Sakaguchi G, Arimitsu H, et al. (2004) Molecular characterization of binding subcomponents of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin for intestinal epithelial cells and erythrocytes. *Microbiol* 150: 1529–1538.
 70. Uotsu N, Nishikawa A, Watanabe T, Ohyama T, Tonozuka T, et al. (2005) Cell internalization and traffic pathway of *Clostridium botulinum* type C neurotoxin in HT-29 cells. *Biochim Biophys Acta* 1763: 120–128.
 71. Matsumura T, Jin Y, Kabumoto Y, Takegahara Y, Oguma K, et al. (2008) The HA proteins of botulinum toxin disrupt intestinal epithelial intercellular junctions to increase toxin absorption. *Cell Microbiol* 10: 355–364.
 72. Jin Y, Takegahara Y, Sugawara Y, Matsumura T, Fujinaga Y (2009) Disruption of the epithelial barrier by botulinum haemagglutinin (HA) proteins - differences in cell tropism and the mechanism of action between HA proteins of types A or B, and HA proteins of type C. *Microbiology* 155: 35–45.
 73. Fujinaga Y, Matsumura T, Jin Y, Takegahara Y, Sugawara Y (2009) A novel function of botulinum toxin-associated proteins: HA proteins disrupt intestinal epithelial barrier to increase toxin absorption. *Toxicol* 54: 583–586.
 74. Sugawara Y, Matsumura T, Takegahara Y, Jin Y, Tsukasaki Y, et al. (2010) Botulinum hemagglutinin disrupts the intercellular epithelial barrier by directly binding E-cadherin. *J Cell Biol* 189: 691–700.
 75. Chen F, Kuziemko GM, Stevens RC (1998) Biophysical characterization of the stability of the 150-kilodalton botulinum toxin, the nontoxic component, and the 900-kilodalton botulinum toxin complex species. *Infect Immun* 66: 2420–2425.
 76. Simon-Assmann P, Turk N, Siddhoum-Jenny M, Gradwohl G, Kedinger M (2007) *In vitro* models of intestinal epithelial cell differentiation. *Cell Biol Toxicol* 23: 241–256.
 77. Bens M, Bogdanova A, Cluzeaud F, Miqerol L, Kerneis S, et al. (1996) Transimmortalized mouse intestinal cells (m-IC12) that maintain a crypt phenotype. *Am J Physiol* 270: C1666–1674.
 78. Ku SK, Lee HS, Lee JH (2003) An immunohistochemical study of the gastrointestinal endocrine cells in the C57BL/6 mice. *Anat Histol Embryol* 32: 21–28.
 79. Black JD, Dolly JO (1987) Selective location of acceptors for botulinum neurotoxin A in the central and peripheral nervous systems. *Neuroscience* 23: 767–779.

80. Baldwin MR, Barbieri JT (2007) Association of botulinum neurotoxin serotypes A and B with synaptic vesicle protein complexes. *Biochemistry* 46: 3200–3210.
81. Rapp DE, Turk KW, Bales GT, Cook SP (2006) Botulinum toxin type A inhibits calcitonin gene-related peptide release from isolated rat bladder. *J Urol* 175: 1138–1142.
82. Lucioni A, Bales GT, Lotan TL, McGehee DS, Cook SP, et al. (2008) Botulinum toxin type A inhibits sensory neuropeptide release in rat bladder models of acute injury and chronic inflammation. *BJU Int* 101: 366–370.
83. Hou YP, Zhang YP, Song YF, Zhu CM, Wang YC, et al. (2007) Botulinum toxin type A inhibits rat pyloric myoelectrical activity and substance P release in vivo. *Can J Physiol Pharmacol* 85: 209–214.
84. Najib A, Pelliccioni P, Gil C, Aguilera J (1999) Clostridium neurotoxins influence serotonin uptake and release differently in rat brain synaptosomes. *J Neurochem* 72: 1991–1998.
85. Sanchez-Prieto J, Sihra TS, Evans D, Ashton A, Dolly JO, et al. (1987) Botulinum toxin A blocks glutamate exocytosis from guinea-pig cerebral cortical synaptosomes. *Eur J Biochem* 165: 675–681.
86. McMahon HT, Foran P, Dolly JO, Verhage M, Wiegant VM, et al. (1992) Tetanus toxin and botulinum toxins type A and B inhibit glutamate, gamma-aminobutyric acid, aspartate, and met-enkephalin release from synaptosomes. Clues to the locus of action. *J Biol Chem* 267: 21338–21343.
87. Li ZS, Fox-Threlkeld JE, Furness JB (1998) Innervation of intestinal arteries by axons with immunoreactivity for the vesicular acetylcholine transporter (VACht). *J Anat* 192: 107–117.
88. Antonucci F, Rossi C, Gianfranceschi L, Rossetto O, Caleo M (2008) Long-distance retrograde effects of botulinum neurotoxin A. *J Neurosci* 28: 3689–3696.
89. Restani L, Antonucci F, Gianfranceschi L, Rossi C, Rossetto O, et al. (2011) Evidence for anterograde transport and transcytosis of botulinum neurotoxin A (BoNT/A). *J Neurosci* 31: 15650–15659.
90. Poras H, Ouimet T, Orng SV, Fournie-Zaluski MC, Popoff MR, et al. (2009) Detection and quantification of botulinum neurotoxin type A by a novel rapid in vitro fluorimetric assay. *Appl Environ Microbiol* 75: 4382–4390.
91. Tavallaie M, Chenal A, Gillet D, Pereira Y, Manich M, et al. (2004) Interaction between the two subdomains of the C-terminal part of the botulinum neurotoxin A is essential for the generation of protective antibodies. *FEBS Lett* 572: 299–306.
92. Lalli G, Schiavo G (2002) Analysis of retrograde transport in motor neurons reveals common endocytic carriers for tetanus toxin and neurotrophin receptor p75^{NTR}. *J Cell Biol* 156: 233–239.



Bibliographie

- [Abbruzzese 2006] G Abbruzzese et A Berardelli. *Neurophysiological effects of botulinum toxin type A*. *Neurotoxicity research*, vol. 9, no. 2-3, pages 109–114, 2006. (Cité en page 190.)
- [Ahsan 2005] CR Ahsan et G Hajnóczky. *Visualization of binding and transcytosis of botulinum toxin by human intestinal epithelial cells*. vol. 315, no. 3, pages 1028–1035, 2005. (Cité en pages 114 et 179.)
- [Al-Saleem 2008] Fetweh H Al-Saleem, Denise M Ancharski, Easwaran Ravichandran, Suresh G Joshi, Ajay K Singh, Yujing Gong et Lance L Simpson. *The role of systemic handling in the pathophysiologic actions of botulinum toxin*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 326, no. 3, pages 856–863, 2008. (Cité en page 191.)
- [Al-Saleem 2012] Fetweh H Al-Saleem, Denise M Ancharski, Suresh G Joshi, Md Elias, Ajay Singh, Zidoon Nasser et Lance L Simpson. *An Analysis of the Mechanisms that Underlie Absorption of Botulinum Toxin by the Inhalation Route*. *Infection and immunity*, no. September, Septembre 2012. (Cité en pages 95 et 185.)
- [Ancharski 2011] Denise M Ancharski, Ajay Singh, Zidoon Nasser, Rebecca M Olson et Lance L Simpson. *Evidence That Botulinum Toxin Receptors on Epithelial Cells and Neuronal Cells Are Not Identical : Implications for Development of a Non-Neurotropic Vaccine*. *Pharmacology*, vol. 336, no. 3, pages 605–612, 2011. (Cité en page 113.)
- [Antonucci 2008] Flavia Antonucci, Chiara Rossi, Laura Gianfranceschi, Ornella Rossetto et Matteo Caleo. *Long-distance retrograde effects of botulinum neurotoxin A*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 28, no. 14, pages 3689–96, Avril 2008. (Cité en pages 174 et 190.)
- [Apodaca 2001] G Apodaca. *Endocytic traffic in polarized epithelial cells : role of the actin and microtubule cytoskeleton*. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, vol. 2, no. 3, pages 149–59, Mars 2001. (Cité en pages 100, 109 et 274.)
- [Argaman 2001] L Argaman, R Hershberg, J Vogel, G Bejerano, E G Wagner, H Margalit et S Altuvia. *Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of Escherichia coli*. *Current biology : CB*, vol. 11, no. 12, pages 941–50, Juin 2001. (Cité en page 48.)
- [Arimitsu 2003] Hideyuki Arimitsu, Kaoru Inoue, Yoshihiko Sakaguchi, Jaechul Lee, Yukako Fujinaga, Toshihiro Watanabe, Tohru Ohyama, Robert Hirst et Keiji Oguma. *Purification of fully activated Clostridium botulinum serotype B toxin for treatment*

- of patients with dystonia*. Infection and immunity, vol. 71, no. 3, pages 1599–1603, 2003. (Cité en page 169.)
- [Arimitsu 2008] Hideyuki Arimitsu, Yoshihiko Sakaguchi, Jae-Chul Lee, Sadayuki Ochi, Kentaro Tsukamoto, Yumiko Yamamoto, Shaobo Ma, Takao Tsuji et Keiji Oguma. *Molecular properties of each subcomponent in Clostridium botulinum type B haemagglutinin complex*. Microbial pathogenesis, vol. 45, no. 2, pages 142–9, Août 2008. (Cité en pages 89, 94, 176 et 183.)
- [Arndt 2005] Joseph W Arndt, Jenny Gu, Lukasz Jaroszewski, Robert Schwarzenbacher, Michael A Hanson, Frank J Lebeda et Raymond C Stevens. *The Structure of the Neurotoxin-associated Protein HA33/A from Clostridium botulinum Suggests a Reoccurring β -Trefoil Fold in the Progenitor Toxin Complex*. Journal of molecular biology, vol. 346, no. 4, pages 1083–1093, 2005. (Cité en page 171.)
- [Arnon 1986] Stephen S Arnon *et al.* *Infant botulism : anticipating the second decade*. Journal of Infectious Diseases, vol. 154, no. 2, pages 201–206, 1986. (Cité en page 171.)
- [Arnon 1989] S.S. Arnon. *Infant botulism, in Anaerobic infections in humans*. pages 601–609, 1989. (Cité en page 173.)
- [Arnon 2001] S. S. Arnon, R. Schechter, T. V. Inglesby, D. A. Henderson, J. G. Bartlett, M. S. Ascher, E. Eitzen, A. D. Fine, J. Hauer, M. Layton, S. Lillibridge, M. T. Osterholm, T. O’Toole, G. Parker, T. M. Perl, P. K. Russell, D. L. Swerdlow et K. Tonat. *Botulinum toxin as a biological weapon : medical and public health management*. Jama, vol. 285 :1059-7, 2001. (Cité en pages 22, 172, 179 et 263.)
- [Arnon 2007] Stephen S Arnon. *Creation and development of the public service orphan drug human botulism immune globulin*. Pediatrics, vol. 119, no. 4, pages 785–789, 2007. (Cité en page 174.)
- [Artin 2010] Ingrid Artin, David R Mason, Carmen Pin, Jenny Schelin, Michael W Peck, Elisabet Holst, Peter Rå dström et Andrew T Carter. *Effects of carbon dioxide on growth of proteolytic Clostridium botulinum, its ability to produce neurotoxin, and its transcriptome*. Applied and environmental microbiology, vol. 76, no. 4, pages 1168–72, Février 2010. (Cité en pages 44 et 266.)
- [Ault 2008] A. Ault. *New Botulinum Toxin Injection Warnings Issued Postinjection symptoms include dysphagia, ptosis, and shortness of breath, according to the FDA*. Skin & Allergy News, vol. 39, no. 3, pages 13–13, 2008. (Cité en page 172.)
- [Aurelie Couesnon, Cesare Colasante, Jordi Molgo 2010] Michel R. Popoff Aurelie Couesnon, Cesare Colasante, Jordi Molgo. *Differential entry of Botulinum Neurotoxin A into neuronal and intestinal cells : an ultrastructural approach*. The botulinum Journal, vol. 1, no. 4, pages 375 – 392, 2010. (Cité en pages 186 et 270.)

- [Balali-Mood 2013] Mahdi Balali-Mood, Mohammad Moshiri et Leila Etemad. *Medical aspects of bio-terrorism*. *Toxicon* : official journal of the International Society on Toxinology, vol. 9153161446, no. January, pages 1–12, Janvier 2013. (Cité en page 40.)
- [Balas 2010] Professeur Daniel Balas. *HISTOLOGIE MORPHO-FONCTIONNELLE DES ÉPITHÉLIUMS - L ' EXEMPLE DE L ' APPAREIL DIGESTIF* -. Structure, 2010. (Cité en page 63.)
- [Barker 2007] Nick Barker, Johan H van Es, Jeroen Kuipers, Pekka Kujala, Maaike van den Born, Miranda Cozijnsen, Andrea Haegbarth, Jeroen Korving, Harry Begthel, Peter J Peters et Hans Clevers. *Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5*. *Nature*, vol. 449, no. 7165, pages 1003–7, Octobre 2007. (Cité en page 69.)
- [Barker 2010] Nick Barker, Sina Bartfeld et Hans Clevers. *Tissue-resident adult stem cell populations of rapidly self-renewing organs*. *Cell stem cell*, vol. 7, no. 6, pages 656–70, Décembre 2010. (Cité en pages 69, 70 et 362.)
- [Barth 2004] Holger Barth et Klaus Aktories. *Binary bacterial toxins : biochemistry, biology, and applications of common Clostridium and Bacillus proteins*. and molecular biology, vol. 68, no. 3, pages 373–402, 2004. (Cité en page 38.)
- [Barth 2011] Holger Barth et Klaus Aktories. *New insights into the mode of action of the actin ADP-ribosylating virulence factors Salmonella enterica SpvB and Clostridium botulinum C2 toxin*. *European journal of cell biology*, vol. 90, no. 2010, pages 944–50, Janvier 2011. (Cité en pages 39 et 360.)
- [Beier 2006] Dagmar Beier et Roy Gross. *Regulation of bacterial virulence by two-component systems*. *Current opinion in microbiology*, vol. 9, no. 2, pages 143–52, Avril 2006. (Cité en page 265.)
- [Benefield 2013] Desirée a Benefield, Scott K Dessain, Nancy Shine, Melanie D Ohi et D Borden Lacy. *Molecular assembly of botulinum neurotoxin progenitor complexes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, pages 1–6, Mars 2013. (Cité en pages 30, 31, 90, 169 et 360.)
- [Benmerah 2002] Alexandre Benmerah et Christophe Lamaze. *Endocytose : chaque voie compte !* *M/S : médecine sciences*, vol. 18, pages 1126–1136, 2002. (Cité en pages 99, 100 et 363.)
- [Bens 1996] M. Bens, A. Bogdanova, F. Cluzeaud, L. Miquerol, S. Kerneis, J. P. Kraehenbuhl, A. Kahn, E. Pringault et A. Vandewalle. *Transimmortalized mouse intestinal cells (m-ICc12) that maintain a crypt phenotype*. *Am J Physiol Cell Physiol*, vol. 270, no. 6, pages C1666–1674, Juin 1996. (Cité en pages 90, 114 et 180.)

- [Benson 2011] Marc a Benson, Zhuji Fu, Jung-Ja P Kim et Michael R Baldwin. *Unique ganglioside recognition strategies for clostridial neurotoxins*. The Journal of biological chemistry, vol. 286, no. 39, pages 34015–34022, Août 2011. (Cité en page 110.)
- [Beucher 2012] Anthony Beucher, Elisabet Gjernes, Caitlin Collin, Monica Courtney, Aline Meunier, Patrick Collombat et Gérard Gradwohl. *The homeodomain-containing transcription factors Arx and Pax4 control enteroendocrine subtype specification in mice*. PloS one, vol. 7, no. 5, page e36449, Janvier 2012. (Cité en page 66.)
- [Bevins 2011] Charles L Bevins et Nita H Salzman. *Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis*. Nature reviews. Microbiology, vol. 9, no. 5, pages 356–68, Mai 2011. (Cité en page 65.)
- [Bhatia 1999] KP Bhatia, A Münchau, PD Thompson, M Houser, VS Chauhan, M Hutchinson, AHV Shapira et CD Marsden. *Generalised muscular weakness after botulinum toxin injections for dystonia : a report of three cases*. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, vol. 67, no. 1, pages 90–93, 1999. (Cité en page 174.)
- [Binz 2009] Thomas Binz et Andreas Rummel. *Cell entry strategy of clostridial neurotoxins*. Journal of neurochemistry, vol. 109, no. 6, pages 1584–95, Juin 2009. (Cité en pages 110, 111, 112, 256, 258, 274, 364 et 365.)
- [Bohnert 2005] Stephanie Bohnert et Giampietro Schiavo. *Tetanus toxin is transported in a novel neuronal compartment characterized by a specialized pH regulation*. Journal of Biological Chemistry, vol. 280, no. 51, pages 42336–42344, 2005. (Cité en page 185.)
- [Bohnert 2006] S. Bohnert. *Uptake and transport of clostridium neurotoxins, in The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins*. pages 309–408, 2006. (Cité en page 185.)
- [Bonventre 1979] P F Bonventre. *Absorption of botulinal toxin from the gastrointestinal tract*. Reviews of infectious diseases, vol. 1, no. 4, pages 663–7, 1979. (Cité en pages 88, 176 et 269.)
- [Bradshaw 2004] Marite Bradshaw, Sean S Dineen, Nicole D Maks et Eric a Johnson. *Regulation of neurotoxin complex expression in Clostridium botulinum strains 62A, Hall A-hyper, and NCTC 2916*. Anaerobe, vol. 10, no. 6, pages 321–33, Décembre 2004. (Cité en page 43.)
- [Breidenbach 2005] Mark A Breidenbach et Axel T Brunger. *2.3 Å crystal structure of tetanus neurotoxin light chain*. Biochemistry, vol. 44, no. 20, pages 7450–7457, 2005. (Cité en page 167.)
- [Brodsky 2012] Frances M Brodsky. *Diversity of Clathrin Function : New Tricks for an Old Protein*. Annual review of cell and developmental biology, no. July, pages 1–28, Juillet 2012. (Cité en pages 99 et 363.)

- [Brook 2007] I Brook. *Infant botulism*. Journal of Perinatology, vol. 27, no. 3, pages 175–180, 2007. (Cité en page 173.)
- [Broos 2001] S. J. Broos. *Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine*. The Anatomical record, vol. 262, no. 1, pages 58–70, Janvier 2001. (Cité en pages 75 et 362.)
- [Burr 1982] DONALD H Burr et H Sugiyama. *Susceptibility to enteric botulinum colonization of antibiotic-treated adult mice*. Infection and immunity, vol. 36, no. 1, pages 103–106, 1982. (Cité en page 178.)
- [Caleo 2009] Matteo Caleo, Flavia Antonucci, Laura Restani et Riccardo Mazzocchio. *A reappraisal of the central effects of botulinum neurotoxin type A : by what mechanism ?* Journal of neurochemistry, vol. 109, no. 1, pages 15–24, Avril 2009. (Cité en page 185.)
- [Call 1995] JE Call, PH Cooke et AJ Miller. *In situ characterization of Clostridium botulinum neurotoxin synthesis and export*. Journal of Applied Microbiology, vol. 79, no. 3, pages 257–263, 1995. (Cité en page 167.)
- [Capaldo 2007] Christopher T Capaldo et Ian G Macara. *Depletion of E-cadherin disrupts establishment but not maintenance of cell junctions in Madin-Darby canine kidney epithelial cells*. Molecular biology of the cell, vol. 18, no. 1, pages 189–200, 2007. (Cité en page 184.)
- [Carli 2009] Luca Carli, Cesare Montecucco et Ornella Rossetto. *Assay of diffusion of different botulinum neurotoxin type a formulations injected in the mouse leg*. Muscle & nerve, vol. 40, no. 3, pages 374–380, 2009. (Cité en page 190.)
- [Carter 2005] G. P Carter. *Quorum sensing in Clostridium difficile : analysis of a luxS-type signalling system*. Journal of Medical Microbiology, vol. 54, no. 2, pages 119–127, Février 2005. (Cité en page 51.)
- [Carter 2011] Andrew T Carter, Bruce M Pearson, Lisa C Crossman, Nizar Drou, Darren Heavens, David Baker, Melanie Febrer, Mario Caccamo, Kathie a Grant et Michael W Peck. *Complete genome sequence of the proteolytic Clostridium botulinum type A5 (B3') strain H04402 065*. Journal of bacteriology, vol. 193, no. 9, pages 2351–2, Mai 2011. (Cité en page 51.)
- [Chadda 2007] Rahul Chadda, Mark T Howes, Sarah J Plowman, John F Hancock, Robert G Parton et Satyajit Mayor. *Cholesterol-sensitive Cdc42 activation regulates actin polymerization for endocytosis via the GEEC pathway*. Traffic (Copenhagen, Denmark), vol. 8, no. 6, pages 702–17, Juin 2007. (Cité en pages 114 et 187.)
- [Chaddock 2013] John Chaddock et Á Protein Á Retargeting Á. *Transforming the Domain Structure of Botulinum Neurotoxins into Novel Therapeutics*. vol. 364, pages 287–306, 2013. (Cité en page 40.)

- [Chang 2009] Wen-Pin Chang et Thomas C Südhof. *SV2 renders primed synaptic vesicles competent for Ca²⁺-induced exocytosis*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, vol. 29, no. 4, pages 883–97, Janvier 2009. (Cité en page 112.)
- [Chen 1998] Flora Chen, Geoffrey M Kuziemko et Raymond C Stevens. *Biophysical characterization of the stability of the 150-kilodalton botulinum toxin, the nontoxic component, and the 900-kilodalton botulinum toxin complex species*. Infection and immunity, vol. 66, no. 6, pages 2420–2425, 1998. (Cité en pages 89 et 175.)
- [Chen 2006] Xuejun Chen et Barry M Gumbiner. *Crosstalk between different adhesion molecules*. Current opinion in cell biology, vol. 18, no. 5, pages 572–578, 2006. (Cité en page 184.)
- [Chen 2011] Jianming Chen, Julian I Rood et Bruce A McClane. *Epsilon-Toxin Production by Clostridium perfringens Type D Strain CN3718 Is Dependent upon the agr Operon but Not the VirS / VirR. Production*, vol. 2, no. 6, pages 1–11, 2011. (Cité en pages 49 et 265.)
- [Cheng H 1974] L. CP. Cheng H. *Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types*. Am J Anat., no. 141(4), pages 537–61., 1974. (Cité en page 69.)
- [Cheng 2012] Luisa W Cheng et Larry H Stanker. *Detection of Botulinum Neurotoxin Serotypes A and B Using a Chemiluminescent versus Electrochemiluminescent Immunoassay in Food and Serum*. Journal of agricultural and food chemistry, Décembre 2012. (Cité en page 39.)
- [Cheroutre 2011] H Cheroutre, F Lambolez et D Mucida. *The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes*. Nature Reviews Immunology, vol. 11, no. 7, pages 445–456, 2011. (Cité en page 68.)
- [Chertow 2006] Daniel S Chertow, Esther T Tan, Susan E Maslanka, Joann Schulte, Eddy a Bresnitz, Richard S Weisman, Jeffrey Bernstein, Steven M Marcus, Savita Kumar, Jean Malecki, Jeremy Sobel et Christopher R Braden. *Botulism in 4 adults following cosmetic injections with an unlicensed, highly concentrated botulinum preparation*. JAMA : the journal of the American Medical Association, vol. 296, no. 20, pages 2476–9, Novembre 2006. (Cité en page 173.)
- [Chi 2013] Xiaojuan Chi, Song Wang, Yifan Huang, Mark Stammes et Ji-Long Chen. *Roles of rho GTPases in intracellular transport and cellular transformation*. International journal of molecular sciences, vol. 14, no. 4, pages 7089–108, Janvier 2013. (Cité en page 96.)

- [Coban 2010] Arzu Coban, Zeliha Matur, Hasmet A Hanagasi et Yesim Parman. *Iatrogenic botulism after botulinum toxin type A injections*. *Clinical neuropharmacology*, vol. 33, no. 3, pages 158–160, 2010. (Cité en page 172.)
- [Coffield 1999] J. Coffield, N. M. Bakry, B. Maksymowych et L. L. Simpson. *Characterization of a vertebrate neuromuscular junction that demonstrates selective resistance to botulinum toxin*. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, vol. 289, no. 3, pages 1509–16, Juin 1999. (Cité en page 186.)
- [Connan 2012] Chloé Connan, Holger Brueggemann, Christelle Mazuet, Stéphanie Raffestin, Nadège Cayet et Michel R Popoff. *Two-component systems are involved in the regulation of botulinum neurotoxin synthesis in Clostridium botulinum type A strain Hall*. *PloS one*, vol. 7, no. 7, page e41848, Janvier 2012. (Cité en pages 46, 124, 265, 266 et 267.)
- [Connan 2013] Chloé Connan, Cécile Denève, Christelle Mazuet et Michel R Popoff. *Regulation of toxin synthesis in Clostridium botulinum and Clostridium tetani*. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, pages 1–11, Juin 2013. (Cité en page 142.)
- [Conner 2003] Sean D Conner et Sandra L Schmid. *Regulated portals of entry into the cell*. *Nature*, vol. 422, no. 6927, pages 37–44, Mars 2003. (Cité en pages 98, 102 et 103.)
- [Cooksley 2010] Clare M Cooksley, Ian J Davis, Klaus Winzer, Weng C Chan, Michael W Peck et Nigel P Minton. *Regulation of neurotoxin production and sporulation by a Putative agrBD signaling system in proteolytic Clostridium botulinum*. *Applied and environmental microbiology*, vol. 76, no. 13, pages 4448–60, Juillet 2010. (Cité en pages 43, 53 et 267.)
- [Couesnon 2006] Aurélie Couesnon, Stéphanie Raffestin et Michel R Popoff. *Expression of botulinum neurotoxins A and E, and associated non-toxin genes, during the transition phase and stability at high temperature : analysis by quantitative reverse transcription-PCR*. *Microbiology (Reading, England)*, vol. 152, no. Pt 3, pages 759–70, Mars 2006. (Cité en pages 43, 45, 46, 89, 171 et 175.)
- [Couesnon 2008] Aurélie Couesnon, Yannick Pereira et Michel R Popoff. *Receptor-mediated transcytosis of botulinum neurotoxin A through intestinal cell monolayers*. *Cellular microbiology*, vol. 10, no. 2, pages 375–87, Février 2008. (Cité en pages 110, 113, 114, 115, 179, 180, 181, 184, 185, 186, 200, 204, 233, 251, 255, 256, 258, 269 et 274.)
- [Couesnon 2009] A. Couesnon, T. Shimizu et M. R. Popoff. *Differential entry of botulinum neurotoxin A into neuronal and intestinal cells*. *Cellular microbiology*, vol. 11, no. 2, pages 289–308, Février 2009. (Cité en pages 90, 95, 113, 114, 115, 181, 186, 187, 247, 249, 257, 258, 274 et 275.)

- [Couesnon 2012] A. Couesnon, J. Molgó, C. Connan et M. R. Popoff. *Preferential Entry of Botulinum Neurotoxin A Hc Domain through Intestinal Crypt Cells and Targeting to Cholinergic Neurons of the Mouse Intestine*. PLoS pathogens, vol. 8, no. 3, page e1002583, Mars 2012. (Cité en pages 90, 180, 190, 191, 204, 233, 234, 235, 238, 270 et 273.)
- [Cox 2002] NADINE Cox et RANDY Hinkle. *Infant botulism*. American family physician, vol. 65, no. 7, pages 1388–1392, 2002. (Cité en page 173.)
- [Dapa 2013] T. Dapa, R. Leuzzi, Y. K. Ng, S. T. Baban, R. Adamo, S. a Kuehne, M. Scarselli, N. P. Minton, D. Serruto et M. Unnikrishnan. *Multiple factors modulate biofilm formation by the anaerobic pathogen Clostridium difficile*. Journal of bacteriology, vol. 195, no. 3, pages 545–55, Février 2013. (Cité en page 52.)
- [Dineen 2003] Sean S Dineen, Marite Bradshaw et Eric A Johnson. *Neurotoxin gene clusters in Clostridium botulinum type A strains : sequence comparison and evolutionary implications*. Current microbiology, vol. 46, no. 5, pages 0345–0352, 2003. (Cité en page 169.)
- [Dineen 2004] Sean S Dineen, Marite Bradshaw, Charles E Karasek et Eric A Johnson. *Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the type A2 neurotoxin gene cluster in Clostridium botulinum*. FEMS microbiology letters, vol. 235, no. 1, pages 9–16, 2004. (Cité en page 168.)
- [Disanza 2009] A. Disanza, E. Frittoli, A. Palamidessi et G. Scita. *Endocytosis and spatial restriction of cell signaling*. Molecular oncology, vol. 3, no. 4, pages 280–96, Août 2009. (Cité en page 106.)
- [Doherty 2009] Gary J Doherty et Harvey T McMahon. *Mechanisms of endocytosis*. Annual review of biochemistry, vol. 78, pages 857–902, Janvier 2009. (Cité en pages 98, 100, 102, 103, 105, 106, 200, 257, 258 et 363.)
- [Dolly 2012] J Oliver Dolly et Marie Ann O’Connell. *Neurotherapeutics to inhibit exocytosis from sensory neurons for the control of chronic pain*. Current opinion in pharmacology, vol. 12, no. 1, pages 100–8, Février 2012. (Cité en pages 39 et 40.)
- [Dong 2003] M. Dong, D. a Richards, M. C. Goodnough, W. H. Tepp, E. a Johnson et E. R. Chapman. *Synaptotagmins I and II mediate entry of botulinum neurotoxin B into cells*. The Journal of cell biology, vol. 162, no. 7, pages 1293–303, Septembre 2003. (Cité en pages 111, 112, 181, 230, 236, 238, 242, 255, 256 et 273.)
- [Dong 2006] Min Dong, Felix Yeh, William H Tepp, Camin Dean, Eric a Johnson, Roger Janz et Edwin R Chapman. *SV2 is the protein receptor for botulinum neurotoxin A*. Science (New York, N.Y.), vol. 312, no. 5773, pages 592–6, Avril 2006. (Cité en pages 112, 181, 236, 255 et 273.)

- [Dong 2007] M. Dong, W. H. Tepp, H. Liu, E. Johnson et E. R. Chapman. *Mechanism of botulinum neurotoxin B and G entry into hippocampal neurons*. The Journal of cell biology, vol. 179, no. 7, pages 1511–22, Décembre 2007. (Cité en page 230.)
- [Dong 2008] Min Dong, Huisheng Liu, William H Tepp, Eric A Johnson, Roger Janz et Edwin R Chapman. *Glycosylated SV2A and SV2B Mediate the Entry of Botulinum Neurotoxin E into Neurons*. Molecular Biology of the Cell, vol. 19, no. December, pages 5226–5237, 2008. (Cité en pages 112, 113, 181, 238, 255 et 273.)
- [Dover 2013] Nir Dover, Jason R Barash, Karen K Hill, Karen W Davenport, Hazuki Teshima, Gary Xie et Stephen S Arnon. *Clostridium botulinum Strain Af84 Contains Three Neurotoxin Gene Clusters : Bont/A2, bont/F4 and bont/F5*. PloS one, vol. 8, no. 4, page e61205, Janvier 2013. (Cité en page 14.)
- [Downward 2003] Julian Downward. *Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy*. Nature reviews. Cancer, vol. 3, no. 1, pages 11–22, Janvier 2003. (Cité en page 97.)
- [Dressler 2002] Dirk Dressler et Reiner Benecke. *Autonomic side effects of botulinum toxin type B treatment of cervical dystonia and hyperhidrosis*. European neurology, vol. 49, no. 1, pages 34–38, 2002. (Cité en page 190.)
- [Dupuy 1998] B Dupuy et a L Sonenshein. *Regulated transcription of Clostridium difficile toxin genes*. Molecular microbiology, vol. 27, no. 1, pages 107–20, Janvier 1998. (Cité en page 44.)
- [Dupuy 2005] B. Dupuy, N. Mani, S. Katayama et A. L. Sonenshein. *Transcription activation of a UV-inducible Clostridium perfringens bacteriocin gene by a novel sigma factor*. Molecular microbiology, vol. 55, no. 4, pages 1196–206, Février 2005. (Cité en page 46.)
- [Dupuy 2006] Bruno Dupuy et Susana Matamouros. *Regulation of toxin and bacteriocin synthesis in Clostridium species by a new subgroup of RNA polymerase sigma-factors*. Research in microbiology, vol. 157, no. 3, pages 201–5, Avril 2006. (Cité en page 47.)
- [Eberhard 1972] a Eberhard. *Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis*. Journal of bacteriology, vol. 109, no. 3, pages 1101–5, Mars 1972. (Cité en page 51.)
- [Eisele 2010] Karl-Heinz Eisele, Klaus Fink, Martin Vey et Harold V Taylor. *Studies on the Dissociation of Botulinum Neurotoxin Type A Complexes*. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology, vol. 57, no. January, pages 1–11, Décembre 2010. (Cité en page 89.)
- [Eisele 2011] Karl-Heinz Eisele, Klaus Fink, Martin Vey et Harold V Taylor. *Studies on the dissociation of botulinum neurotoxin type A complexes*. Toxicon, vol. 57, no. 4, pages 555–565, 2011. (Cité en page 190.)

- [Eklund 1972] M W Eklund, F T Poysky et S M Reed. *Bacteriophage and the toxigenicity of Clostridium botulinum type D*. Nature : New biology, vol. 235, no. 53, pages 16–7, Janvier 1972. (Cité en page 26.)
- [Elias 2011] Md Elias, Fetweh al Saleem, Denise M Ancharski, Ajay Singh, Zidoon Nasser, Rebecca M Olson et Lance L Simpson. *Evidence that botulinum toxin receptors on epithelial cells and neuronal cells are not identical : implications for development of a non-neurotropic vaccine*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, vol. 336, no. 3, pages 605–612, 2011. (Cité en page 181.)
- [Emsley 2000] Paul Emsley, Constantina Fotinou, Isobel Black, Neil F Fairweather, Ian G Charles, Colin Watts, Eric Hewitt et Neil W Isaacs. *The structures of the HC fragment of tetanus toxin with carbohydrate subunit complexes provide insight into ganglioside binding*. Journal of Biological Chemistry, vol. 275, no. 12, pages 8889–8894, 2000. (Cité en page 167.)
- [Epstein 1996] FH Epstein et RK Goyal. *The enteric nervous system*. New England Journal of, no. Dk 31092, pages 1106–1115, 1996. (Cité en pages 74, 78, 79, 235, 270 et 362.)
- [Erickson 1994] J. D. Erickson, H. Varoqui, M. K. Schäfer, W. Modi, M. F. Diebler, E. Weihe, J. Rand, L. E. Eiden, T. I. Bonner et T. B. Usdin. *Functional identification of a vesicular acetylcholine transporter and its expression from a "cholinergic" gene locus*. The Journal of biological chemistry, vol. 269, no. 35, pages 21929–32, Septembre 1994. (Cité en page 222.)
- [Evergren 2007] Emma Evergren, Helge Gad, Kristin Walther, Anna Sundborger, Nikolay Tomilin et Oleg Shupliakov. *Intersectin is a negative regulator of dynamin recruitment to the synaptic endocytic zone in the central synapse*. The Journal of neuroscience, vol. 27, no. 2, pages 379–390, 2007. (Cité en pages 187 et 188.)
- [Falguières 2001] T Falguières, F Mallard, C Baron, D Hanau, C Lingwood, B Goud, J Salamero et L Johannes. *Targeting of Shiga toxin B-subunit to retrograde transport route in association with detergent-resistant membranes*. Molecular biology of the cell, vol. 12, no. 8, pages 2453–68, Août 2001. (Cité en page 101.)
- [Fasano 2002] a Fasano. *Toxins and the gut : role in human disease*. Gut, vol. 50 Suppl 3, no. table 1, pages III9–14, Mai 2002. (Cité en page 80.)
- [Federle 2003] MJ Federle et BL Bassler. *Interspecies communication in bacteria*. Journal of Clinical Investigation, vol. 112, no. 9, pages 1291–1299, 2003. (Cité en pages 49 et 51.)
- [Fischer 2008] Audrey Fischer, Darren J Mushrush, D Borden Lacy et Mauricio Montal. *Botulinum neurotoxin devoid of receptor binding domain translocates active protease*.

- PLoS pathogens, vol. 4, no. 12, page e1000245, Décembre 2008. (Cité en pages 35 et 360.)
- [Fischer 2013] A. Fischer. *Synchronized Chaperone Function of Botulinum Neurotoxin Domains Mediates Light Chain Translocation into Neurons*. vol. 364, pages 115–137, 2013. (Cité en pages 35 et 167.)
- [Fotinou 2001] C Fotinou, P Emsley, I Black, H Ando, H Ishida, M Kiso, K a Sinha, N F Fairweather et N W Isaacs. *The crystal structure of tetanus toxin Hc fragment complexed with a synthetic GT1b analogue suggests cross-linking between ganglioside receptors and the toxin*. The Journal of biological chemistry, vol. 276, no. 34, pages 32274–81, Août 2001. (Cité en page 167.)
- [Franciosa 2009] Giovanna Franciosa, Antonella Maugliani, Concetta Scalfaro et Paolo Aureli. *Evidence that plasmid-borne botulinum neurotoxin type B genes are widespread among Clostridium botulinum serotype B strains*. PloS one, vol. 4, no. 3, page e4829, Janvier 2009. (Cité en page 26.)
- [Fu 1998] Fen-Ni Fu, Shashi K Sharma et Bal Ram Singh. *A protease-resistant novel hemagglutinin purified from type A Clostridium botulinum*. Journal of protein chemistry, vol. 17, no. 1, pages 53–60, 1998. (Cité en page 175.)
- [Fu 2006] Zhuji Fu, Sheng Chen, Michael R Baldwin, Grant E Boldt, Adam Crawford, Kim D Janda, Joseph T Barbieri et Jung-Ja P Kim. *Light chain of botulinum neurotoxin serotype A : structural resolution of a catalytic intermediate*. Biochemistry, vol. 45, no. 29, pages 8903–8911, 2006. (Cité en page 167.)
- [Fu 2009] Zhuji Fu, Chen Chen, Joseph T Barbieri, Jung-Ja P Kim et Michael R Baldwin. *Glycosylated SV2 and gangliosides as dual receptors for botulinum neurotoxin serotype F*. Biochemistry, vol. 48, no. 24, pages 5631–5641, 2009. (Cité en pages 110, 112, 113, 181, 255 et 273.)
- [Fujinaga 1994] Yukako Fujinaga, Kaoru Inoue, Satoshi Shimazaki, Kenichi Tomochika, Kayo Tsuzuki, Nobuhiro Fujii, Toshihiro Watanabe, Tohru Ohyama, Kouichi Takeshi et K Oguma. *Molecular Construction of Clostridium botulinum Type C Progenitor Toxin and Its Gene Organization*. Biochemical and biophysical research communications, vol. 205, no. 2, pages 1291–1298, 1994. (Cité en page 184.)
- [Fujinaga 1996] Y. Fujinaga, K. Inoue, S. Watanabe, K. Yokota, Y. Hirai, E. Nagamachi et K. Oguma. *The haemagglutinin of Clostridium botulinum type C progenitor toxin plays an essential role guinea pig small intestine, leading to the efficient absorption of the toxin*. Microbiology (Reading, England), no. 1 997, pages 3841–3847, 1996. (Cité en page 94.)

- [Fujinaga 1997] Yukako Fujinaga, Kaoru Inoue, Sadahiro Watanabe, Kenji Yokota, Yoshikazu Hirai, Eiko Nagamachi et Keiji Oguma. *The haemagglutinin of Clostridium botulinum type C progenitor toxin plays an essential role in binding of toxin to the epithelial cells of guinea pig small intestine, leading to the efficient absorption of the toxin*. Microbiology, vol. 143, no. 12, pages 3841–3847, 1997. (Cité en page 183.)
- [Fujinaga 2000] Yukako Fujinaga, Kaoru Inoue, Takako Nomura, Junzo Sasaki, Jean C Marvaud, Michel R Popo, Shunji Kozaki et Keiji Oguma. *Identification and characterization of functional subunits of Clostridium botulinum type A progenitor toxin involved in binding to intestinal microvilli and erythrocytes*. FEBS Letters, vol. 467, pages 0–4, 2000. (Cité en pages 94 et 183.)
- [Fujinaga 2003] Yukako Fujinaga, Anne A Wolf, Chiara Rodighiero, Heidi Wheeler, Billy Tsai, Larry Allen, Michael G Jobling, Tom Rapoport, Randall K Holmes et Wayne I Lencer. *Gangliosides that associate with lipid rafts mediate transport of cholera and related toxins from the plasma membrane to endoplasmic reticulum*. Molecular biology of the cell, vol. 14, no. 12, pages 4783–4793, 2003. (Cité en page 182.)
- [Fujinaga 2004] Y. Fujinaga. *Molecular characterization of binding subcomponents of Clostridium botulinum type C progenitor toxin for intestinal epithelial cells and erythrocytes*. Microbiology, vol. 150, no. 5, pages 1529–1538, Mai 2004. (Cité en pages 94, 170 et 183.)
- [Fujinaga 2006] Yukako Fujinaga. *Transport of bacterial toxins into target cells : pathways followed by cholera toxin and botulinum progenitor toxin*. Journal of biochemistry, vol. 140, no. 2, pages 155–160, 2006. (Cité en page 190.)
- [Fujinaga 2009] Y Fujinaga, T Matsumura, Y Jin, Y Takegahara et Y Sugawara. *A novel function of botulinum toxin-associated proteins : HA proteins disrupt intestinal epithelial barrier to increase toxin absorption*. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology, vol. 54, no. 5, pages 583–6, Octobre 2009. (Cité en pages 95, 183 et 184.)
- [Fujinaga 2013] Yukako Fujinaga, Yo Sugawara, Takuhiro Matsumura et Á Epithelial Á E-cadherin Á. *Uptake of Botulinum Neurotoxin in the Intestine*. vol. 364, pages 45–59, 2013. (Cité en pages 95 et 184.)
- [Fujita 1995] Ryuji Fujita, Yukako Fujinaga, Kaoru Inoue, Hiroshi Nakajima, Hiromi Kumon et Keiji Oguma. *Molecular characterization of two forms of nontoxic-nonhemagglutinin components of Clostridium botulinum type A progenitor toxins*. FEBS letters, vol. 376, no. 1, pages 41–44, 1995. (Cité en page 170.)
- [Furness 2000] J B Furness. *Types of neurons in the enteric nervous system*. Journal of the autonomic nervous system, vol. 81, no. 1-3, pages 87–96, Juillet 2000. (Cité en pages 74 et 362.)

- [Furness 2004] John B Furness, Clare Jones, Kulmira Nurgali et Nadine Clerc. *Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine*. Progress in neurobiology, vol. 72, no. 2, pages 143–64, Février 2004. (Cité en pages 75, 235 et 362.)
- [Furness 2012] John B Furness. *The enteric nervous system and neurogastroenterology*. Nature reviews. Gastroenterology & hepatology, vol. 9, no. 5, pages 286–94, Mai 2012. (Cité en pages 72, 73, 74, 77, 78, 82 et 362.)
- [Galloux 2008] Marie Galloux, Heidi Vitrac, Caroline Montagner, Stéphanie Raffestin, Michel R Popoff, Alexandre Chenal, Vincent Forge et Daniel Gillet. *Membrane Interaction of botulinum neurotoxin A translocation (T) domain. The belt region is a regulatory loop for membrane interaction*. The Journal of biological chemistry, vol. 283, no. 41, pages 27668–76, Octobre 2008. (Cité en page 34.)
- [Garner 1993] CG Garner, A Straube, TN Witt, T Gasser et WH Oertel. *Time course of distant effects of local injections of botulinum toxin*. Movement disorders, vol. 8, no. 1, pages 33–37, 1993. (Cité en pages 174 et 190.)
- [Gauthier 2005] NC Gauthier, Pascale Monzo et Vincent Kaddai. *Helicobacter pylori VacA cytotoxin : a probe for a clathrin-independent and Cdc42-dependent pinocytic pathway routed to late endosomes*. Molecular biology of the cell, vol. 16, no. October, pages 4852–4866, 2005. (Cité en pages 114 et 187.)
- [Geisinger 2006] Edward Geisinger, Rajan P Adhikari, Ruzhong Jin, Hope F Ross et Richard P Novick. *Inhibition of rot translation by RNAIIII, a key feature of agr function*. Molecular microbiology, vol. 61, no. 4, pages 1038–48, Août 2006. (Cité en pages 53 et 267.)
- [Geppert 1994] M Geppert, Y Goda, R E Hammer, C Li, T W Rosahl, C F Stevens et T C Südhof. *Synaptotagmin I : a major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse*. Cell, vol. 79, no. 4, pages 717–27, Novembre 1994. (Cité en page 111.)
- [Gerbe 2011] François Gerbe, Johan H van Es, Leila Makrini, Bénédicte Brulin, Georg Mellitzer, Sylvie Robine, Béatrice Romagnolo, Noah F Shroyer, Jean-François Bourgaux, Christine Pignodel, Hans Clevers et Philippe Jay. *Distinct ATOH1 and Neurog3 requirements define tuft cells as a new secretory cell type in the intestinal epithelium*. The Journal of cell biology, vol. 192, no. 5, pages 767–80, Mars 2011. (Cité en page 67.)
- [Gerbe 2012] François Gerbe, Catherine Legraverend et Philippe Jay. *The intestinal epithelium tuft cells : specification and function*. Cellular and molecular life sciences : CMLS, vol. 69, no. 17, pages 2907–17, Septembre 2012. (Cité en page 67.)

- [Gerhard 1998] Ralf Gerhard et Gudula Schmidt. *Activation of Rho GTPases by Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor 1 increases intestinal permeability in Caco-2 cells*. Infection and disease, 1998. (Cité en page 97.)
- [Ghasemi 2012] Majid Ghasemi, Rasul Norouzi, Mehri Salari et Bahador Asadi. *Iatrogenic botulism after the therapeutic use of botulinum toxin-a : a case report and review of the literature*. Clinical neuropharmacology, vol. 35, no. 5, pages 254–7, Septembre 2012. (Cité en page 22.)
- [Gibert 2010] Maryse Gibert, Marie-Noëlle Monier, Richard Ruez, Martha L Hale, Bradley G Stiles, Alexandre Benmerah, Ludger Johannes, Christophe Lamaze et Michel R Popoff. *Endocytosis and toxicity of clostridial binary toxins depend on a clathrin-independent pathway regulated by Rho-GDI*. Cellular microbiology, vol. 13, no. 1, pages 1–17, Septembre 2010. (Cité en pages 38 et 101.)
- [Gill 1982] D M Gill. *Bacterial toxins : a table of lethal amounts*. Microbiological reviews, vol. 46, no. 1, pages 86–94, Mars 1982. (Cité en page 178.)
- [Girlanda 1992] Paolo Girlanda, Giuseppe Vita, Carmelo Nicolosi, Sonia Milone et Corrado Messina. *Botulinum toxin therapy : distant effects on neuromuscular transmission and autonomic nervous system*. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, vol. 55, no. 9, pages 844–845, 1992. (Cité en page 190.)
- [Gonzalez 2010] David J Gonzalez, Shaun W Lee, Mary E Hensler, Andrew L Markley, Samira Dahesh, Douglas a Mitchell, Nuno Bandeira, Victor Nizet, Jack E Dixon et Pieter C Dorrestein. *Clostridiolysin S, a post-translationally modified biotoxin from Clostridium botulinum*. The Journal of biological chemistry, vol. 285, no. 36, pages 28220–8, Septembre 2010. (Cité en page 38.)
- [Gracies 2004] Jean-Michel Gracies. *Physiological effects of botulinum toxin in spasticity*. Movement disorders, vol. 19, no. S8, pages S120–S128, 2004. (Cité en page 190.)
- [Grant 2009] Barth D Grant et Julie G Donaldson. *Pathways and mechanisms of endocytic recycling*. Nature reviews. Molecular cell biology, vol. 10, no. 9, pages 597–608, Septembre 2009. (Cité en pages 107 et 109.)
- [Grider 2003] JR Grider. *Neurotransmitters mediating the intestinal peristaltic reflex in the mouse*. Journal of Pharmacology and Experimental therapeutics, vol. 307, no. 2, pages 460–467, 2003. (Cité en page 78.)
- [Gu 2012] Shenyan Gu, Sophie Rumpel, Jie Zhou, Jasmin Strotmeier, Hans Bigalke, Kay Perry, Charles B Shoemaker, Andreas Rummel et Rongsheng Jin. *Botulinum neurotoxin is shielded by NTNHA in an interlocked complex*. Science (New York, N.Y.), vol. 335, no. 6071, pages 977–81, Février 2012. (Cité en pages 27, 29, 30, 31, 89, 175 et 360.)

- [Gu 2013] Shenyan Gu et Rongsheng Jin. *Assembly and Function of the Botulinum Neurotoxin Progenitor Complex*. vol. 364, pages 21–44, 2013. (Cité en pages 29, 30, 31, 89, 175 et 360.)
- [Gumbiner 1996] Barry M Gumbiner. *Cell adhesion : the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis*. Cell, vol. 84, no. 3, pages 345–357, 1996. (Cité en page 184.)
- [Gutiérrez 2005] Pablo Gutiérrez, Yan Li, Michael J Osborne, Ekaterina Pomerantseva, Qian Liu et Kalle Gehring. *Solution structure of the carbon storage regulator protein CsrA from Escherichia coli*. Journal of bacteriology, vol. 187, no. 10, pages 3496–3501, 2005. (Cité en page 48.)
- [Hansen 2003] Mark Berner Hansen. *The enteric nervous system I : organisation and classification*. Pharmacology & toxicology, vol. 92, no. 3, pages 105–13, Mars 2003. (Cité en pages 72 et 76.)
- [Haque 1992] a Haque, N Sugimoto, Y Horiguchi, T Okabe, T Miyata, S Iwanaga et M Matsuda. *Production, purification, and characterization of botulinolysin, a thiol-activated hemolysin of Clostridium botulinum*. Infection and immunity, vol. 60, no. 1, pages 71–8, Janvier 1992. (Cité en page 38.)
- [Harper 2013] Callista B Harper, Michel R Popoff, Adam McCluskey, Phillip J Robinson et Frédéric a Meunier. *Targeting membrane trafficking in infection prophylaxis : dynamin inhibitors*. Trends in cell biology, vol. 23, no. 2, pages 90–101, Février 2013. (Cité en pages 97 et 257.)
- [Hartsock 2008] A. Hartsock et W. J. Nelson. *Adherens and tight junctions : structure, function and connections to the actin cytoskeleton*. Biochimica et biophysica acta, vol. 1778, no. 3, pages 660–9, Mars 2008. (Cité en page 184.)
- [Hasegawa 2007] Kimiko Hasegawa, Toshihiro Watanabe, Tomonori Suzuki, Akihito Yamano, Tetsuo Oikawa, Yasuhiko Sato, Hirokazu Kouguchi, Tohru Yoneyama, Koichi Niwa, Toshihiko Ikeda et al. *A novel subunit structure of Clostridium botulinum serotype D toxin complex with three extended arms*. Journal of Biological Chemistry, vol. 282, no. 34, pages 24777–24783, 2007. (Cité en page 169.)
- [Hatheway 1987] CHARLES L Hatheway et LORETTA M McCROSKEY. *Examination of feces and serum for diagnosis of infant botulism in 336 patients*. Journal of clinical microbiology, vol. 25, no. 12, pages 2334–2338, 1987. (Cité en page 173.)
- [Hauser 1995] D Hauser, M Gibert et JC Marvaud. *Botulinal neurotoxin C1 complex genes, clostridial neurotoxin homology and genetic transfer in Clostridium botulinum*. Toxicon, vol. 0101, no. 4, pages 515–526, 1995. (Cité en page 46.)

- [Heath 2010] Joan K Heath. Transcriptional networks and signaling pathways that govern vertebrate intestinal development., volume 90. Elsevier Inc., Janvier 2010. (Cité en page 71.)
- [Helmann 2002] John D Helmann. The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors., volume 46. Janvier 2002. (Cité en page 46.)
- [Hill 2007] K K Hill, T J Smith, C H Helma, L O Ticknor, B T Foley, R T Svensson, J L Brown, E a Johnson, L a Smith, R T Okinaka, P J Jackson et J D Marks. *Genetic diversity among Botulinum Neurotoxin-producing clostridial strains*. Journal of bacteriology, vol. 189, no. 3, pages 818–32, Février 2007. (Cité en pages 17 et 26.)
- [Hill 2009] Karen K Hill, Gary Xie, Brian T Foley, Theresa J Smith, Amy C Munk, David Bruce, Leonard a Smith, Thomas S Brettin et John C Detter. *Recombination and insertion events involving the botulinum neurotoxin complex genes in Clostridium botulinum types A, B, E and F and Clostridium butyricum type E strains*. BMC biology, vol. 7, page 66, Janvier 2009. (Cité en pages 26 et 27.)
- [Hill 2013] Karen K. Hill et T. J Smith. *Genetic Diversity Within Clostridium botulinum Serotypes, Botulinum Neurotoxin Gene Clusters and Toxin Subtypes*. vol. 364, pages 1–20, 2013. (Cité en pages 15, 16, 26, 27 et 359.)
- [Hines 2005] Harry B Hines, Frank Lebeda, Martha Hale et Ernst E Brueggemann. *Characterization of botulinum progenitor toxins by mass spectrometry*. Applied and environmental microbiology, vol. 71, no. 8, pages 4478–4486, 2005. (Cité en page 169.)
- [Hirsch 2005] M. Hirsch et T. Elliott. *Stationary-phase regulation of RpoS translation in Escherichia coli*. Journal of bacteriology, vol. 187, no. 21, pages 7204–7213, 2005. (Cité en page 47.)
- [Hoch 1985] D H Hoch, M Romero-Mira, B E Ehrlich, a Finkelstein, B R DasGupta et L L Simpson. *Channels formed by botulinum, tetanus, and diphtheria toxins in planar lipid bilayers : relevance to translocation of proteins across membranes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 82, no. 6, pages 1692–6, Mars 1985. (Cité en page 34.)
- [Holzer 1966] E Holzer. *Botulism caused by inhalation*. Rapport technique, DTIC Document, 1966. (Cité en page 172.)
- [Honda 1999] Akira Honda, Masahiro Nogami et Takeaki Yokozeki. *Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase α is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation*. Cell, vol. 99, pages 521–532, 1999. (Cité en page 102.)
- [Hsu 2012] Victor W Hsu, Ming Bai et Jian Li. *Getting active : protein sorting in endocytic recycling*. Nature reviews. Molecular cell biology, vol. 13, no. 5, pages 323–8, Mai 2012. (Cité en page 107.)

- [Huch 2013] Meritxell Huch, Craig Dorrell, Sylvia F Boj, Johan H van Es, Vivian S W Li, Marc van de Wetering, Toshiro Sato, Karien Hamer, Nobuo Sasaki, Milton J Finegold, Annelise Haft, Robert G Vries, Markus Grompe et Hans Clevers. *In vitro expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration*. *Nature*, vol. 494, no. 7436, pages 247–50, Février 2013. (Cité en page 271.)
- [Humeau 2000] Y Humeau, F Doussau, N J Grant et B Poulain. *How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release*. *Biochimie*, vol. 82, no. 5, pages 427–46, Mai 2000. (Cité en page 37.)
- [Hussain 2011] S Hussain et S Davanger. *The discovery of the soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor complex and the molecular regulation of synaptic vesicle transmitter release : the 2010 Kavli Prize in neuroscience*. *Neuroscience*, vol. 190, pages 12–20, Septembre 2011. (Cité en page 35.)
- [Inoue 1999] Kaoru Inoue, Yukako Fujinaga, Koichi Honke, Kenji Yokota, Tetsuya Ikeda, Tohru Ohyama, Kouichi Takeshi, Toshihiro Watanabe, Katsuhiko Inoue et Keiji Oguma. *Characterization of haemagglutinin activity of Clostridium botulinum type C and D 16S toxins, and one subcomponent of haemagglutinin (HA1)*. *Microbiology*, vol. 145, no. 9, pages 2533–2542, 1999. (Cité en page 170.)
- [Inoue 2001] Kaoru Inoue, Yukako Fujinaga, Koichi Honke, Hideyuki Arimitsu, Nazira Mahmut, Yoshihiko Sakaguchi, Tohru Ohyama, Toshihiro Watanabe, Katsuhiko Inoue et Keiji Oguma. *Clostridium botulinum type A haemagglutinin-positive progenitor toxin (HA+-PTX) binds to oligosaccharides containing Gal β 1-4GlcNAc through one subcomponent of haemagglutinin (HA1)*. *Microbiology*, vol. 147, no. 4, pages 811–819, 2001. (Cité en page 170.)
- [Inoue 2003] Kaoru Inoue, Mack Sobhany, Thomas R Transue, Keiji Oguma, Lars C Pedersen et Masahiko Negishi. *Structural analysis by X-ray crystallography and calorimetry of a haemagglutinin component (HA1) of the progenitor toxin from Clostridium botulinum*. *Microbiology*, vol. 149, no. 12, pages 3361–3370, 2003. (Cité en page 171.)
- [Inui 2010] Ken Inui, Hiroaki Ito, Keita Miyata, Tomohito Matsuo, Ryohta Horiuchi, Toshihiko Ikeda, Toshihiro Watanabe, Tohru Ohyama et Koichi Niwa. *Involvement of sialic acid in transport of serotype C1 botulinum toxins through rat intestinal epithelial cells*. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*, vol. 72, no. 9, pages 1251–5, Septembre 2010. (Cité en page 183.)
- [Ito 2011] Hiroaki Ito, Yoshimasa Sagane, Keita Miyata, Ken Inui, Tomohito Matsuo, Ryohta Horiuchi, Toshihiko Ikeda, Tomonori Suzuki, Kimiko Hasegawa, Hirokazu Kouguchi, Keiji Oguma, Koichi Niwa, Tohru Ohyama et Toshihiro Watanabe. *HA-33 facilitates*

- transport of the serotype D botulinum toxin across a rat intestinal epithelial cell monolayer*. FEMS immunology and medical microbiology, vol. 61, no. 3, pages 323–331, Janvier 2011. (Cité en page 183.)
- [Jackie D. Wood 2011] Jackie D. Wood. The Enteric Nervous System (The Brain-In-The-Gut). 2011. (Cité en pages 72, 74, 75, 76, 77, 82 et 235.)
- [Jacky 2013] Birgitte P S Jacky, Patton E Garay, Jérôme Dupuy, Jeremy B Nelson, Brian Cai, Yanira Molina, Joanne Wang, Lance E Steward, Ron S Broide, Joseph Francis, K Roger Aoki, Raymond C Stevens et Ester Fernández-Salas. *Identification of Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3) as a Protein Receptor for Botulinum Neurotoxin Serotype A (BoNT/A)*. PLoS pathogens, vol. 9, no. 5, page e1003369, Mai 2013. (Cité en page 113.)
- [Jacobson 2008] Mark J Jacobson, Guangyun Lin, Brian Raphael, Joanne Andreadis et Eric A Johnson. *Analysis of neurotoxin cluster genes in Clostridium botulinum strains producing botulinum neurotoxin serotype A subtypes*. Applied and environmental microbiology, vol. 74, no. 9, pages 2778–2786, 2008. (Cité en page 168.)
- [Jang 2004] Myoung Ho Jang, Mi-Na Kweon, Koichi Iwatani, Masafumi Yamamoto, Kazutaka Terahara, Chihiro Sasakawa, Toshihiko Suzuki, Tomonori Nochi, Yoshifumi Yokota, Paul D Rennert, Takachika Hiroi, Hiroshi Tamagawa, Hideki Iijima, Jun Kunisawa, Yoshikazu Yuki et Hiroshi Kiyono. *Intestinal villous M cells : an antigen entry site in the mucosal epithelium*. vol. 101, no. 16, pages 6110–5, Avril 2004. (Cité en page 64.)
- [Jankovic 1991] Joseph Jankovic et MF Brin. *Therapeutic uses of botulinum toxin*. The New England journal of medicine, vol. 324, no. 17, page 1186, 1991. (Cité en page 173.)
- [Järvi 1956] Osmo Järvi et Olavi Keyriläinen. *On the cellular Structures of the epithelial invasions in the glandula somach of mice caused by intrmural application or 20-methylcholantren*. Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica, vol. 38, no. S111, pages 72–73, 1956. (Cité en page 67.)
- [Jin 2009] Yin Jin, Yuki Takegahara, Yo Sugawara, Takuhiro Matsumura et Yukako Fujinaga. *Disruption of the epithelial barrier by botulinum haemagglutinin (HA) proteins - differences in cell tropism and the mechanism of action between HA proteins of types A or B, and HA proteins of type C*. Microbiology (Reading, England), vol. 155, no. Pt 1, pages 35–45, Janvier 2009. (Cité en pages 95 et 183.)
- [John Barton Furness 2006] John Barton Furness. The Enteric Nervous System. Blackwell édition, 2006. (Cité en pages 72, 235 et 270.)

- [Johnson 2009] E. Johnson et K. Marshall. *Plasmid Encoded Neurotoxin Genes in Clostridium botulinum Serotype A Subtypes*. Biochem Biophys Res Commun, vol. 361, no. 1, pages 49–54, 2009. (Cité en page 26.)
- [Just 2011] I. Just, A. Rohrbeck, S. C. Huelsenbeck et M. Hoeltje. *Therapeutic effects of Clostridium botulinum C3 exoenzyme*. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology, vol. 383, no. 3, pages 247–52, Mars 2011. (Cité en page 38.)
- [Karalewitz 2012a] Andrew P-a Karalewitz et Joseph T Barbieri. *Vaccines against botulism*. Current opinion in microbiology, Juin 2012. (Cité en page 23.)
- [Karalewitz 2012b] Andrew P-a Karalewitz, Zhuji Fu, Michael R Baldwin, Jung-Ja P Kim et Joseph T Barbieri. *Botulinum Neurotoxin Serotype C Associates with Dual Ganglioside Receptors to Facilitate Cell Entry*. The Journal of biological chemistry, no. 2, pages 1–24, Octobre 2012. (Cité en page 110.)
- [Keita 2010] a V Keita et J D Söderholm. *The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors*. Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society, vol. 22, no. 7, pages 718–33, Juillet 2010. (Cité en page 92.)
- [Keller 2004] James E Keller, Fang Cai et Elaine a Neale. *Uptake of botulinum neurotoxin into cultured neurons*. Biochemistry, vol. 43, no. 2, pages 526–32, Janvier 2004. (Cité en pages 113, 115, 186, 258 et 274.)
- [Kemshead 1982] J. T. Kemshead, M. A. Ritter, S. F. Cotmore et M. F. Greaves. *Human Thy-1 : expression on the cell surface of neuronal and glial cells*. Brain research, vol. 236, no. 2, pages 451–61, Mars 1982. (Cité en page 216.)
- [Kerneis 1997] S. Kerneis. *Conversion by Peyer's Patch Lymphocytes of Human Enterocytes into M Cells that Transport Bacteria*. Science, vol. 277, no. 5328, pages 949–952, Août 1997. (Cité en pages 114 et 180.)
- [Kernéis 2000] S Kernéis, E Caliot, H Stubbe, a Bogdanova, J Kraehenbuhl et E Pringault. *Molecular studies of the intestinal mucosal barrier physiopathology using cocultures of epithelial and immune cells : a technical update*. Microbes and infection / Institut Pasteur, vol. 2, no. 9, pages 1119–24, Juillet 2000. (Cité en page 180.)
- [Kim 2006] Dae-Yul Kim, Byung-Mo Oh et Nam-Jong Paik. *Central effect of botulinum toxin type A in humans*. International journal of neuroscience, vol. 116, no. 6, pages 667–680, 2006. (Cité en page 190.)
- [Kirchhausen 2008] T. Kirchhausen, E. Macia et H.E. Pelish. *Use of dynasore, the small molecule inhibitor of dynamin, in the regulation of endocytosis*. Methods in enzymology, vol. 6879, no. 07, pages 1–15, 2008. (Cité en page 257.)

- [Kiss 2009] Anna L Kiss et Erzsébet Botos. *Endocytosis via caveolae : alternative pathway with distinct cellular compartments to avoid lysosomal degradation?* Journal of cellular and molecular medicine, vol. 13, no. 7, pages 1228–37, Juillet 2009. (Cité en page 103.)
- [Kitamura 1969] M Kitamura, S Sakaguchi et G Sakaguchi. *Significance of 12S toxin of Clostridium botulinum type E.* Journal of bacteriology, vol. 98, no. 3, pages 1173–8, Juin 1969. (Cité en pages 32, 89, 175 et 177.)
- [Kitamura 2005] Masaru Kitamura, Shizunobu Igimi, Keiko Furukawa et Koichi Furukawa. *Different response of the knockout mice lacking b-series gangliosides against botulinum and tetanus toxins.* Biochimica et biophysica acta, vol. 1741, no. 1-2, pages 1–3, Juin 2005. (Cité en pages 109 et 182.)
- [Klinkert 2009] Birgit Klinkert et Franz Narberhaus. *Microbial thermosensors.* Cellular and molecular life sciences : CMLS, vol. 66, no. 16, pages 2661–76, Août 2009. (Cité en page 48.)
- [Kobayashi 2003] Hiroshi Kobayashi, Kohji Fujisawa, Yoshihiro Saito, Makoto Kamijo, Sakiko Oshima, Masakatsu Kubo, Yoshikatsu Eto, Chie Monma et Masaru Kitamura. *A botulism case of a 12-year-old girl caused by intestinal colonization of Clostridium botulinum type Ab.* Japanese journal of infectious diseases, vol. 56, no. 2, pages 73–4, Avril 2003. (Cité en pages 32, 174 et 177.)
- [Kojima 2005] Shoudou Kojima, Hironobu Eguchi, Tomomi Ookawara, Noriko Fujiwara, Jun Yasuda, Kazuhiko Nakagawa, Takehira Yamamura et Keiichiro Suzuki. *Clostridium botulinum type A progenitor toxin binds to Intestine-407 cells via N-acetyllactosamine moiety.* Biochemical and biophysical research communications, vol. 331, no. 2, pages 571–6, Juin 2005. (Cité en page 183.)
- [Kouguchi 2002] Hirokazu Kouguchi, Toshihiro Watanabe, Yoshimasa Sagane, Hiroyuki Sunagawa et Tohru Ohyama. *In vitro reconstitution of the Clostridium botulinum type D progenitor toxin.* Journal of Biological Chemistry, vol. 277, no. 4, pages 2650–2656, 2002. (Cité en page 169.)
- [Kozaki 1998] Shunji Kozaki, Yoichi Kamata, Tei-ichi Nishiki, Hiroaki Kakinuma, Hiromi Maruyama, Hiroaki Takahashi, Tadahiro Karasawa, Kiyotaka Yamakawa et Shinichi Nakamura. *Characterization of Clostridium botulinum type B neurotoxin associated with infant botulism in Japan.* Infection and immunity, vol. 66, no. 10, pages 4811–4816, 1998. (Cité en page 182.)
- [Kroken 2011] Abby R Kroken, Andrew P-a Karalewitz, Zhuji Fu, Jung-Ja P Ja P Kim et Joseph T Barbieri. *Novel ganglioside-mediated entry of botulinum neurotoxin serotype D into neurons.* The Journal of biological chemistry, vol. 286, no. 30, pages 26828–26837, Juin 2011. (Cité en page 109.)

- [Kumaran 2009] Desigan Kumaran, Subramaniam Eswaramoorthy, William Furey, Jorge Navaza, Martin Sax et Subramanyam Swaminathan. *Domain organization in Clostridium botulinum neurotoxin type E is unique : its implication in faster translocation*. Journal of molecular biology, vol. 386, no. 1, pages 233–45, Février 2009. (Cité en pages 28, 29, 40, 167 et 360.)
- [Kunisawa 2007] Jun Kunisawa, Ichiro Takahashi et Hiroshi Kiyono. *Intraepithelial lymphocytes : their shared and divergent immunological behaviors in the small and large intestine*. Immunological reviews, vol. 215, pages 136–53, Février 2007. (Cité en page 68.)
- [Kunze 1999] W a Kunze et J B Furness. *The enteric nervous system and regulation of intestinal motility*. Annual review of physiology, vol. 61, pages 117–42, Janvier 1999. (Cité en page 78.)
- [Lacy 1999] D Borden Lacy et Raymond C Stevens. *Sequence homology and structural analysis of the clostridial neurotoxins*. Journal of molecular biology, vol. 291, no. 5, pages 1091–1104, 1999. (Cité en page 167.)
- [Lalli 2003] Giovanna Lalli, Stephanie Bohnert, Katrin Deinhardt, Carole Verastegui et Giampietro Schiavo. *The journey of tetanus and botulinum neurotoxins in neurons*. Trends in Microbiology, vol. 11, no. 9, pages 431–437, Septembre 2003. (Cité en page 187.)
- [Lamanna 1959] Carl Lamanna. *The Most Poisonous Poison What do we know about the toxin of botulism ? What are the problems to be solved ?* Science, vol. 130, no. 3378, pages 763–772, 1959. (Cité en page 176.)
- [Lamaze 2006] C. Lamaze et L. Johannes. *Intracellular trafficking of bacterial and plant toxins, in The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins*. pages 135–153, 2006. (Cité en pages 182 et 186.)
- [Lee 2005] Alex Sek Yew Lee et Keang Peng Song. *LuxS/autoinducer-2 quorum sensing molecule regulates transcriptional virulence gene expression in Clostridium difficile*. Biochemical and biophysical research communications, vol. 335, no. 3, pages 659–66, Septembre 2005. (Cité en page 51.)
- [Leung 1999] S M Leung, R Rojas, C Maples, C Flynn, W G Ruiz, T S Jou et G Apodaca. *Modulation of endocytic traffic in polarized Madin-Darby canine kidney cells by the small GTPase RhoA*. Molecular biology of the cell, vol. 10, no. 12, pages 4369–84, Décembre 1999. (Cité en page 274.)
- [Leyer 1990] GJ Leyer et EA Johnson. *Repression of toxin production by tryptophan in Clostridium botulinum type E*. Archives of microbiology, pages 443–447, 1990. (Cité en pages 44 et 266.)

- [Lietzow 2008] Michael A Lietzow, Elizabeth T Gielow, Denise Le, Jifeng Zhang et Marc F Verhagen. *Subunit stoichiometry of the Clostridium botulinum type A neurotoxin complex determined using denaturing capillary electrophoresis*. The protein journal, vol. 27, no. 7-8, pages 420–425, 2008. (Cité en page 169.)
- [Lin 2010] Ann En-Ju Lin et Julian Andrew Guttman. *Hijacking the endocytic machinery by microbial pathogens*. Protoplasma, vol. 244, no. 1-4, pages 75–90, Août 2010. (Cité en pages 101, 105 et 169.)
- [Lindström 2006] Miia Lindström et Hannu Korkeala. *Laboratory diagnostics of botulism*. Clinical Microbiology Reviews, vol. 19, no. 2, pages 298–314, 2006. (Cité en page 173.)
- [Louis DS. Smith 1988] PH.D Louis DS. Smith et Hiroshi Sugiyama. *Botulism : The Organism, Its toxin, The disease*. Second edi édition, 1988. (Cité en page 15.)
- [Lovenklev 2004] M Lovenklev, Ingrid Artin, Oskar Hagberg, Maria Lo, Elisabeth Borch, Elisabet Holst et Peter Ra. *Quantitative interaction effects of carbon dioxide, sodium chloride, and sodium nitrite on neurotoxin gene expression in nonproteolytic Clostridium botulinum type B*. Applied and, vol. 70, no. 5, pages 2928–2934, 2004. (Cité en pages 44 et 266.)
- [Low 1998] Phillip A Low. *Autonomic neuropathies*. Current opinion in neurology, vol. 11, no. 5, pages 531–537, 1998. (Cité en page 173.)
- [Ma 2011] Menglin Ma, Jorge Vidal, Juliann Saputo, Bruce A McClane et Francisco Uzal. *The VirS / VirR Two-Component System Regulates the Anaerobic Cytotoxicity , Intestinal Pathogenicity , and Enterotoxemic Lethality of*. vol. 2, no. 1, pages 1–9, 2011. (Cité en page 266.)
- [Macia 2006] Eric Macia, Marcelo Ehrlich, Ramiro Massol, Emmanuel Boucrot, Christian Brunner et Tomas Kirchhausen. *Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin*. Developmental cell, vol. 10, no. 6, pages 839–50, Juin 2006. (Cité en pages 200 et 247.)
- [Mahmut 2002] Nazira Mahmut, Kaoru Inoue, Yukako Fujinaga, Lynn Hughes, Hideyuki Arimitsu, Yoshihiko Sakaguchi, Aiji Ohtsuka, Takuro Murakami, Kenji Yokota et Keiji Oguma. *Characterisation of monoclonal antibodies against haemagglutinin associated with Clostridium botulinum type C neurotoxin*. Journal of medical microbiology, vol. 51, no. 4, pages 286–294, 2002. (Cité en page 170.)
- [Mahrhold 2006] Stefan Mahrhold, Andreas Rummel, Hans Bigalke, Bazbek Davletov et Thomas Binz. *The synaptic vesicle protein 2C mediates the uptake of botulinum neurotoxin A into phrenic nerves*. FEBS letters, vol. 580, no. 8, pages 2011–4, Avril 2006. (Cité en page 181.)

- [Maksymowych 1998] a. B. Maksymowych. *Binding and Transcytosis of Botulinum Neurotoxin by Polarized Human Colon Carcinoma Cells*. Journal of Biological Chemistry, vol. 273, no. 34, pages 21950–21957, Août 1998. (Cité en pages 89, 115, 176, 185, 186, 258 et 274.)
- [Maksymowych 2004] AB Maksymowych et LL Simpson. *Structural features of the botulinum neurotoxin molecule that govern binding and transcytosis across polarized human intestinal epithelial cells*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, vol. 310, no. 2, pages 633–641, 2004. (Cité en pages 109, 114, 179, 180 et 185.)
- [Mani 2001] N Mani et B Dupuy. *Regulation of toxin synthesis in Clostridium difficile by an alternative RNA polymerase sigma factor*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 98, no. 10, pages 5844–9, Mai 2001. (Cité en page 46.)
- [Marvaud 1998] J C Marvaud, U Eisel, T Binz, H Niemann et M R Popoff. *TetR is a positive regulator of the tetanus toxin gene in Clostridium tetani and is homologous to botR*. Infection and immunity, vol. 66, no. 12, pages 5698–702, Décembre 1998. (Cité en pages 280, 286 et 371.)
- [Marvaud 2002] J.-C. Marvaud, S. Raffestin et M. R. Popoff. *Le botulisme ? : agent, mode d'action des neurotoxines botuliques, formes d'acquisition, traitement et prévention*. Comptes Rendus Biologies, vol. 325, no. 8, pages 863–878, Août 2002. (Cité en pages 19, 22 et 359.)
- [Matak 2012] Ivica Matak, Peter Riederer et Zdravko Lacković. *Botulinum toxin's axonal transport from periphery to the spinal cord*. Neurochemistry international, vol. 61, no. 2, pages 236–9, Juillet 2012. (Cité en pages 32, 34 et 271.)
- [Matsumura 2008] Takuhiro Matsumura, Yingji Jin, Yuko Kabumoto, Yuki Takegahara, Keiji Oguma, Wayne I Lencer et Yukako Fujinaga. *The HA proteins of botulinum toxin disrupt intestinal epithelial intercellular junctions to increase toxin absorption*. Cellular microbiology, vol. 10, no. 2, pages 355–64, Février 2008. (Cité en pages 94, 95, 183, 184 et 185.)
- [May 1958] a J May et B C Whaler. *The absorption of Clostridium botulinum type A toxin from the alimentary canal*. British journal of experimental pathology, vol. 39, no. 3, pages 307–16, Juin 1958. (Cité en page 176.)
- [Mayor 2004] S. Mayor et M. Rao. *Rafts : scale-dependent, active lipid organization at the cell surface*. Traffic (Copenhagen, Denmark), vol. 5, no. 4, pages 231–40, Avril 2004. (Cité en page 181.)

- [Mayor 2007] Satyajit Mayor et Richard E Pagano. *Pathways of clathrin-independent endocytosis*. Nature reviews. Molecular cell biology, vol. 8, no. 8, pages 603–12, Août 2007. (Cité en pages 101 et 187.)
- [McClane 2006] B.A. McClane. *Clostridium perfringens enterotoxin*, in *The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins*. pages 763–778, 2006. (Cité en page 184.)
- [McMahon 2011] Harvey T. McMahon et Emmanuel Boucrot. *Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, vol. 12, no. 8, pages 517–533, Juillet 2011. (Cité en pages 99, 100 et 363.)
- [Mercer 2010] Jason Mercer, Mario Schelhaas et Ari Helenius. *Virus entry by endocytosis*. Annual review of biochemistry, vol. 79, pages 803–33, Janvier 2010. (Cité en pages 106, 257 et 363.)
- [Middlebrook 1986] John L Middlebrook. *Cellular mechanism of action of botulinum neurotoxin*. Toxin Reviews, vol. 5, no. 2, pages 177–190, 1986. (Cité en pages 174 et 178.)
- [Miyata 2009] Keita Miyata, Tohru Yoneyama, Tomonori Suzuki, Hirokazu Kouguchi, Ken Inui, Koichi Niwa, Toshihiro Watanabe et Tohru Ohyama. *Expression and stability of the nontoxic component of the botulinum toxin complex*. Biochemical and biophysical research communications, vol. 384, no. 1, pages 126–30, Juin 2009. (Cité en pages 89 et 176.)
- [Moberg 1979] LLOYD J Moberg et H Sugiyama. *Microbial ecological basis of infant botulism as studied with germfree mice*. Infection and immunity, vol. 25, no. 2, pages 653–657, 1979. (Cité en page 178.)
- [Moberg 1980] LJ Moberg et H Sugiyama. *The rat as an animal model for infant botulism*. Infection and immunity, vol. 29, no. 2, pages 2–5, 1980. (Cité en pages 88 et 178.)
- [Montal 2010] Mauricio Montal. *Botulinum neurotoxin : a marvel of protein design*. Annual review of biochemistry, vol. 79, pages 591–617, 2010. (Cité en pages 167 et 185.)
- [Moreno-López 1997] B Moreno-López, RR De la Cruz, AM Pastor et JM Delgado-García. *Effects of botulinum neurotoxin type A on abducens motoneurons in the cat : alterations of the discharge pattern*. Neuroscience, vol. 81, no. 2, pages 437–455, 1997. (Cité en page 174.)
- [Mostov 2000] Keith E Mostov, Marcel Verges et Yoram Altschuler. *Membrane traffic in polarized epithelial cells*. Current opinion in cell biology, vol. 12, no. 4, pages 483–490, 2000. (Cité en page 179.)
- [Mutoh 2003] Shingo Mutoh, Hirokazu Kouguchi, Yoshimasa Sagane, Tomonori Suzuki, Kimiko Hasegawa, Toshihiro Watanabe et Tohru Ohyama. *Complete subunit structure*

- of the Clostridium botulinum type D toxin complex via intermediate assembly with nontoxic components.* Biochemistry, vol. 42, no. 37, pages 10991–10997, 2003. (Cité en page 169.)
- [Narberhaus 2006] Franz Narberhaus, Torsten Waldminghaus et Saheli Chowdhury. *RNA thermometers.* FEMS microbiology reviews, vol. 30, no. 1, pages 3–16, Janvier 2006. (Cité en page 48.)
- [Neunlist 2013] Michel Neunlist, Laurianne Van Landeghem, Maxime M Mahé, Pascal Derkinderen, Stanislas Bruley des Varannes et Malvyne Rolli-Derkinderen. *The digestive neuronal-glial-epithelial unit : a new actor in gut health and disease.* Nature reviews. Gastroenterology & hepatology, vol. 10, no. 2, pages 90–100, Février 2013. (Cité en pages 93, 94 et 363.)
- [Nikitas 2011] Georgios Nikitas, Chantal Deschamps, Olivier Disson, Théodora Niault, Pascale Cossart et Marc Lecuit. *Transcytosis of Listeria monocytogenes across the intestinal barrier upon specific targeting of goblet cell accessible E-cadherin.* The Journal of experimental medicine, vol. 208, no. 11, pages 1–8, Octobre 2011. (Cité en pages 65 et 295.)
- [Nishikawa 2004] A. Nishikawa, N. Uotsu, H. Arimitsu, J.-C. Lee, Y. Miura, Y. Fujinaga, H. Nakada, T. Watanabe, T. Ohyama, Y. Sakano et K. Oguma. *The receptor and transporter for internalization of Clostridium botulinum type C progenitor toxin into HT-29 cells.* Biochemical and biophysical research communications, vol. 319, no. 2, pages 327–33, Juin 2004. (Cité en pages 183 et 188.)
- [Nishiki 1996] T Nishiki, Yoshimi Tokuyama, Y Kamata et Y Nemoto. *Binding of botulinum type B neurotoxin to Chinese hamster ovary cells transfected with rat synaptotagmin II cDNA.* Neuroscience, vol. 208, pages 105–108, 1996. (Cité en pages 111, 181, 242 et 256.)
- [Niwa 2007] Koichi Niwa, Kumiko Koyama, Shin-Ichi Inoue, Tomonori Suzuki, Kimiko Hasegawa, Toshihiro Watanabe, Toshihiko Ikeda et Tohru Ohyama. *Role of nontoxic components of serotype D botulinum toxin complex in permeation through a Caco-2 cell monolayer, a model for intestinal epithelium.* FEMS immunology and medical microbiology, vol. 49, no. 3, pages 346–52, Avril 2007. (Cité en page 190.)
- [Niwa 2010] Koichi Niwa, Tohru Yoneyama, Hiroaki Ito, Maya Taira, Tomoyuki Chikai, Hirokazu Kouguchi, Tomonori Suzuki, Kimiko Hasegawa, Keita Miyata, Ken Inui et al. *Sialic acid-dependent binding and transcytosis of serotype D botulinum neurotoxin and toxin complex in rat intestinal epithelial cells.* Veterinary microbiology, vol. 141, no. 3, pages 312–320, 2010. (Cité en pages 183 et 190.)

- [Nonnenmacher 2011] Mathieu Nonnenmacher et Thomas Weber. *Adeno-associated virus 2 infection requires endocytosis through the CLIC/GEEC pathway*. *Cell host & microbe*, vol. 10, no. 6, pages 563–76, Décembre 2011. (Cité en page 105.)
- [Novick 2008] Richard P Novick et Edward Geisinger. *Quorum sensing in staphylococci*. *Annual review of genetics*, vol. 42, pages 541–64, Janvier 2008. (Cité en pages 52 et 361.)
- [Nusrat 2013] J. R. T. Nusrat et J. L. Madara. *Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli : Nutrients, cytokines and immune cells*. *Am J Physiol Gastroenterol Liver Physiol*, 2013. (Cité en page 93.)
- [Oguma 1976] K. Oguma. *The Stability of Toxigenicity in Clostridium botulinum Types C and D*. *Journal of general microbiology*, pages 67–75, 1976. (Cité en page 26.)
- [Oguma 1999] K Oguma, K Inoue, Y Fujinaga, K Yokota, T Watanabe, T Ohyama, K Takeshi et K Inoue. *Structure and function of Clostridium botulinum progenitor toxin*. *Toxin Reviews*, vol. 18, no. 1, pages 17–34, 1999. (Cité en pages 168, 169 et 170.)
- [Ohishi 1977] IWAO Ohishi, SHUNJI Sugii et GENJI Sakaguchi. *Oral toxicities of Clostridium botulinum toxins in response to molecular size*. *Infection and immunity*, vol. 16, no. 1, pages 107–109, 1977. (Cité en pages 89 et 175.)
- [Ohishi 1980] I Ohishi et G Sakaguchi. *Oral toxicities of Clostridium botulinum type C and D toxins of different molecular sizes*. *Infection and immunity*, 1980. (Cité en pages 89 et 175.)
- [Ohtani 2002] Kaori Ohtani, Hideo Hayashi et Tohru Shimizu. *The luxS gene is involved in cell-cell signalling for toxin production in Clostridium perfringens*. *Molecular microbiology*, vol. 44, no. 1, pages 171–9, Avril 2002. (Cité en pages 51 et 267.)
- [Orlandi 1998] P a Orlandi et P H Fishman. *Filipin-dependent inhibition of cholera toxin : evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains*. *The Journal of cell biology*, vol. 141, no. 4, pages 905–15, Mai 1998. (Cité en page 101.)
- [Ouzilou 2002] Laurent Ouzilou, Elise Caliot, Isabelle Pelletier, Marie-Christine Prévost, Eric Pringault et Florence Colbère-Garapin. *Poliovirus transcytosis through M-like cells*. *Journal of general virology*, vol. 83, no. 9, pages 2177–2182, 2002. (Cité en pages 179 et 180.)
- [Park 2003] Jong-Beak Park et Lance L Simpson. *Inhalational poisoning by botulinum toxin and inhalation vaccination with its heavy-chain component*. *Infection and immunity*, vol. 71, no. 3, pages 1147–1154, 2003. (Cité en pages 178, 182 et 185.)

- [Park 2013] Hyun Ho Park. *Structural basis of membrane trafficking by rab family small g protein*. International journal of molecular sciences, vol. 14, no. 5, pages 8912–23, Janvier 2013. (Cité en pages 97, 98, 249 et 257.)
- [Parton 2007] Robert G Parton et Kai Simons. *The multiple faces of caveolae*. Nature reviews. Molecular cell biology, vol. 8, no. 3, pages 185–94, Mars 2007. (Cité en pages 103, 104 et 363.)
- [Paton 1983] JC Paton, AJ Lawrence et IM Steven. *Quantities of Clostridium botulinum organisms and toxin in feces and presence of Clostridium botulinum toxin in the serum of an infant with botulism*. Journal of clinical microbiology, vol. 17, no. 1, pages 13–15, 1983. (Cité en page 173.)
- [Patterson-Curtis 1989] SI Patterson-Curtis et EA Johnson. *Regulation of neurotoxin and protease formation in Clostridium botulinum Okra B and Hall A by arginine*. Applied and environmental . . . , vol. 55, no. 6, 1989. (Cité en pages 44 et 266.)
- [Pellett 2012] S. Pellett. *Learning from the past : historical aspects of bacterial toxins as pharmaceuticals*. Current opinion in microbiology, Mai 2012. (Cité en page 14.)
- [Peng 2011] Lisheng Peng, William H Tepp, Eric a Johnson et Min Dong. *Botulinum neurotoxin D uses synaptic vesicle protein SV2 and gangliosides as receptors*. PLoS pathogens, vol. 7, no. 3, page e1002008, Mars 2011. (Cité en pages 112, 255 et 273.)
- [Peng 2012] L. Peng, R. P.-a Berntsson, W. H. Tepp, R. M. Pitkin, E. Johnson, P. Stenmark et M. Dong. *Botulinum neurotoxin D-C uses synaptotagmin I/II as receptors and human synaptotagmin II is not an effective receptor for type B, D-C, and G toxins*. Journal of cell science, no. March, Mars 2012. (Cité en page 113.)
- [Perez-Moreno 2003] Mirna Perez-Moreno, Colin Jamora et Elaine Fuchs. *Sticky business : orchestrating cellular signals at adherens junctions*. Cell, vol. 112, no. 4, pages 535–48, Février 2003. (Cité en pages 93 et 363.)
- [Petro 2006] Kimberly a Petro, Maureen a Dyer, Brian C Yowler et Cara-Lynne Schengrund. *Disruption of lipid rafts enhances activity of botulinum neurotoxin serotype A*. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology, vol. 48, no. 8, pages 1035–45, Décembre 2006. (Cité en pages 113, 182 et 186.)
- [Pickett 2009] Andy Pickett. *Dysport ® : Pharmacological properties and factors that influence toxin action*. Toxicon, vol. 54, no. 5, pages 683–689, 2009. (Cité en page 190.)
- [Pier 2011] Christina L Pier, Chen Chen, William H Tepp, Guangyun Lin, Kim D Janda, Joseph T Barbieri, Sabine Pellett et Eric a Johnson. *Botulinum neurotoxin subtype A2 enters neuronal cells faster than subtype A1*. FEBS letters, vol. 585, no. 1, pages 199–206, Janvier 2011. (Cité en page 40.)

- [Popoff 1995] M.R Popoff. *Ecology of Neurotoxicogenic Strains of Clostridia*. In *Clostridial Neurotoxins*, pages 1–29. 1995. (Cité en pages 14 et 18.)
- [Popoff 2006] M.R. Popoff et J.C. Marvaud. *Structural and genomic features of clostridial neurotoxins, in The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins*. pages 135–153, 2006. (Cité en pages 167, 168, 169 et 170.)
- [Popoff 2009] Michel R Popoff et Philippe Bouvet. *Clostridial toxins*. *Future microbiology*, vol. 4, no. 8, pages 1021–64, Octobre 2009. (Cité en pages 38, 184 et 263.)
- [Popoff 2010] M. R. Popoff et B. Poulain. *Bacterial toxins and the nervous system : neurotoxins and multipotential toxins interacting with neuronal cells*. *Toxins*, vol. 2, no. 4, pages 683–737, Avril 2010. (Cité en pages 81 et 82.)
- [Popoff 2012] M. R. Popoff et C. Mazuet. *CLOSTRIDIUM BOTULINUM A Spore Forming Organism and A Challenge To Food Safety*. pages 1–36, 2012. (Cité en pages 13, 20, 21 et 359.)
- [Porfírio 1997] Z Porfírio, S M Prado, M D Vancetto, F Fratelli, E W Alves, I Raw, B L Fernandes, a C Camargo et I Lebrun. *Specific peptides of casein pancreatic digestion enhance the production of tetanus toxin*. *Journal of applied microbiology*, vol. 83, no. 6, pages 678–84, Décembre 1997. (Cité en page 44.)
- [Poulain 2008] Bernard Poulain, Michel R Popoff, Institut De Neurobiologie, Alfred Fessard, Laboratoire De Neurobiologie et Moléculaire Upr. *How do the Botulinum Neurotoxins block neurotransmitter release : from botulism to the molecular mechanism of action*. *Neurosciences*, vol. 1, no. 1, pages 14–87, 2008. (Cité en pages 35, 37, 167, 173, 233 et 263.)
- [Predescu 2003] Sanda A Predescu, Dan N Predescu, Barbara K Timblin, Radu V Stan et Asrar B Malik. *Intersectin regulates fission and internalization of caveolae in endothelial cells*. *Molecular biology of the cell*, vol. 14, no. 12, pages 4997–5010, 2003. (Cité en pages 187 et 188.)
- [Pust 2010] Sascha Pust, Holger Barth et Kirsten Sandvig. *Clostridium botulinum C2 toxin is internalized by clathrin- and Rho-dependent mechanisms*. *Cellular microbiology*, vol. 12, no. 12, pages 1809–20, Décembre 2010. (Cité en pages 38, 103 et 258.)
- [Qualmann 2003] Britta Qualmann et Harry Mellor. *Regulation of endocytic traffic by Rho GTPases*. *The Biochemical journal*, vol. 371, no. Pt 2, pages 233–41, Avril 2003. (Cité en pages 106, 257 et 363.)
- [Quinn 2001] Conrad P Quinn et Nigel P Minton. *Clostridial neurotoxins*. *Clostridia : Biotechnology and Medical Applications*, pages 211–250, 2001. (Cité en page 168.)
- [Raffestin 2005] Stéphanie Raffestin, Bruno Dupuy, Jean Christophe Marvaud et Michel R Popoff. *BotR/A and TetR are alternative RNA polymerase sigma factors controlling*

- the expression of the neurotoxin and associated protein genes in Clostridium botulinum type A and Clostridium tetani*. Molecular microbiology, vol. 55, no. 1, pages 235–49, Janvier 2005. (Cité en pages 45, 46, 265 et 360.)
- [Ramachandran 2002] Rajesh Ramachandran, Alejandro P Heuck, Rodney K Tweten et Arthur E Johnson. *Structural insights into the membrane-anchoring mechanism of a cholesterol-dependent cytolysin*. Nature Structural & Molecular Biology, vol. 9, no. 11, pages 823–827, 2002. (Cité en page 181.)
- [Ramirez 2003] C. Ramirez et a. Gebert. *Vimentin-positive Cells in the Epithelium of Rabbit Ileal Villi Represent Cup Cells but not M-cells*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, vol. 51, no. 11, pages 1533–1544, Novembre 2003. (Cité en page 68.)
- [Rao 2007] Sphoorthy Rao, Renate L Starr, Melissa G Morris et Wei-Jen Lin. *Variations in expression and release of botulinum neurotoxin in Clostridium botulinum type A strains*. Foodborne pathogens and disease, vol. 4, no. 2, pages 201–7, Janvier 2007. (Cité en page 43.)
- [Ravichandran 2006] Easwaran Ravichandran, Yujing Gong, Fetweh H Al Saleem, Denise M Ancharki, Suresh G Joshi et Lance L Simpson. *An initial assessment of the systemic pharmacokinetics of botulinum toxin*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, vol. 318, no. 3, pages 1343–1351, 2006. (Cité en page 191.)
- [Restani 2011] Laura Restani, Flavia Antonucci, Laura Gianfranceschi, Chiara Rossi, Ornella Rossetto et Matteo Caleo. *Evidence for Anterograde Transport and Transcytosis of Botulinum Neurotoxin A (BoNT/A)*. Journal of Neuroscience, vol. 31, no. 44, pages 15650–15659, Novembre 2011. (Cité en pages 34 et 190.)
- [Restani 2012] L. Restani, E. Novelli, D. Bottari, P. Leone, I. Barone, L. Galli-Resta, E. Strettoi et M. Caleo. *Botulinum neurotoxin A (BoNT/A) impairs neurotransmission following retrograde transsynaptic transport*. Traffic (Copenhagen, Denmark), Avril 2012. (Cité en pages 190 et 191.)
- [Rhodin 1956] J. Rhodin et T. Dalhamn. *Electron microscopy of the tracheal ciliated mucosa in rat*. Zeitschrift fuer Zellforschung und Mikroskopische . . . , vol. 412, 1956. (Cité en page 67.)
- [Roche 2008] Nicolas Roche, Alexis Schnitzler, François Genêt, Marie-Christine Durand et Djamel Bensmail. *Undesirable distant effects following botulinum toxin type a injection*. Clinical neuropharmacology, vol. 31, no. 5, pages 272–280, 2008. (Cité en page 190.)
- [Roux 2006] A. Roux, K. Uyhazi, A. Frost et P. De Camilli. *GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission*. Nature, vol. 441, no. 7092, pages 528–31, Mai 2006. (Cité en page 187.)

- [Royle 2005] SJ Royle, NA Bright et Leon Lagnado. *Clathrin is required for the function of the mitotic spindle*. Nature, vol. 434, no. April, pages 0–5, 2005. (Cité en page 100.)
- [Rummel 2003] Andreas Rummel, Steffen Bade, Jürgen Alves, Hans Bigalke et Thomas Binz. *Two Carbohydrate Binding Sites in the HCC-domain of Tetanus Neurotoxin are Required for Toxicity*. Journal of Molecular Biology, vol. 326, no. 3, pages 835–847, Février 2003. (Cité en pages 109 et 113.)
- [Rummel 2004a] A. Rummel, T. Karnath, T. Henke, H. Bigalke et T. Binz. *Synaptotagmins I and II act as nerve cell receptors for botulinum neurotoxin G*. The Journal of biological chemistry, vol. 279, no. 29, pages 30865–70, Juillet 2004. (Cité en page 112.)
- [Rummel 2004b] Andreas Rummel, Tino Karnath, Tina Henke, Hans Bigalke et Thomas Binz. *Synaptotagmins I and II act as nerve cell receptors for botulinum neurotoxin G*. Journal of Biological Chemistry, vol. 279, no. 29, pages 30865–30870, 2004. (Cité en page 181.)
- [Rummel 2004c] Andreas Rummel, Stefan Mahrhold, Hans Bigalke et Thomas Binz. *The HCC-domain of botulinum neurotoxins A and B exhibits a singular ganglioside binding site displaying serotype specific carbohydrate interaction*. Molecular microbiology, vol. 51, no. 3, pages 631–643, 2004. (Cité en page 181.)
- [Rummel 2007] Andreas Rummel, Timo Eichner, Tanja Weil, Tino Karnath, Aleksandrs Gutcaits, Stefan Mahrhold, Konrad Sandhoff, Richard L Proia, K Ravi Acharya, Hans Bigalke et Thomas Binz. *Identification of the protein receptor binding site of botulinum neurotoxins B and G proves the double-receptor concept*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 104, no. 1, pages 359–64, Janvier 2007. (Cité en page 182.)
- [Rummel 2009] Andreas Rummel, Kirstin Häfner, Stefan Mahrhold, Natallia Darashchonak, Matthew Holt, Reinhard Jahn, Silke Beermann, Tino Karnath, Hans Bigalke et Thomas Binz. *Botulinum neurotoxins C, E and F bind gangliosides via a conserved binding site prior to stimulation-dependent uptake with botulinum neurotoxin F utilising the three isoforms of SV2 as second receptor*. Journal of neurochemistry, vol. 110, no. 6, pages 1942–54, Septembre 2009. (Cité en pages 102, 110, 181 et 363.)
- [Rummel 2012] Andreas Rummel. *The Molecular And Structural Biology of Clostridium Botulinum Neurotoxins Reveals Insights Into The Sophisticated Mechanism Of Neurotoxicity*. In S. Christine Rasetti_Escargueil, editeur, *Clostridium botulinum A Spore Forming Organism and A Challenge To Food Safety*, chapitre Chapter 2, pages 38–70. Nova Science Publishers, Inc., N.Y, 2012. (Cité en pages 25, 29 et 34.)
- [Sabharanjak 2002] Shefali Sabharanjak, Pranav Sharma, Robert G Parton et Satyajit Mayor. *GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct*

- cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytic pathway*. *Developmental cell*, vol. 2, no. 4, pages 411–23, Avril 2002. (Cité en pages 114 et 187.)
- [Sagane 2000] Yoshimasa Sagane, Toshihiro Watanabe, Hirokazu Kouguchi, Hiroyuki Sunagawa, Kaoru Inoue, Yukako Fujinaga, Keiji Oguma et Tohru Ohyama. *Characterization of nicking of the nontoxic-nonhemagglutinin components of Clostridium botulinum types C and D progenitor toxin*. *Journal of Protein Chemistry*, vol. 19, no. 7, pages 575–581, 2000. (Cité en page 170.)
- [Sagane 2001] Yoshimasa Sagane, Hirokazu Kouguchi, Toshihiro Watanabe, Hiroyuki Sunagawa, Kaoru Inoue, Yukako Fujinaga, Keiji Oguma et Tohru Ohyama. *Role of C-terminal region of HA-33 component of botulinum toxin in hemagglutination*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 288, no. 3, pages 650–657, 2001. (Cité en page 170.)
- [Sakaguchi 1982] Genji Sakaguchi. *Clostridium botulinum toxins*. *Pharmacology & therapeutics*, vol. 19, no. 2, pages 165–194, 1982. (Cité en page 190.)
- [Sambrook 1989] J. E. Sambrook, F. Fritsch et T. Maniatis. *Molecular cloning : a laboratory manual*. N. Y., second edi édition, 1989. (Cité en page 279.)
- [Sanford 2010] Daniel C Sanford, Roy E Barnewall, Michelle L Vassar, Nancy Niemuth, Karen Metcalfe, Robert V House, Ian Henderson et Jeffry D Shearer. *Inhalational botulism in rhesus macaques exposed to botulinum neurotoxin complex serotypes A1 and B1*. *Clinical and Vaccine Immunology*, vol. 17, no. 9, pages 1293–1304, 2010. (Cité en page 179.)
- [Sato 2009] Toshiro Sato, Robert G Vries, Hugo J Snippert, Marc van de Wetering, Nick Barker, Daniel E Stange, Johan H van Es, Arie Abo, Pekka Kujala, Peter J Peters et Hans Clevers. *Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche*. *Nature*, vol. 459, no. 7244, pages 262–5, Mai 2009. (Cité en page 271.)
- [Schlegel 2011] Nicolas Schlegel, Michael Meir, Volker Spindler, Christoph-Thomas Germer et Jens Waschke. *Differential role of Rho GTPases in intestinal epithelial barrier regulation in vitro*. *Journal of cellular physiology*, vol. 226, no. 5, pages 1196–203, Mai 2011. (Cité en page 97.)
- [Schneider 2010] Marlon R Schneider, Maik Dahloff, David Horst, Benjamin Hirschi, Konrad Trülsch, Josef Müller-Höcker, Roger Vogelmann, Michael Allgäuer, Markus Gerhard, Sylvia Steininger, Eckhard Wolf et Frank T Kolligs. *A key role for E-cadherin in intestinal homeostasis and Paneth cell maturation*. *PloS one*, vol. 5, no. 12, page e14325, Janvier 2010. (Cité en page 93.)

- [Schroeder 2008] Gunnar N Schroeder et Hubert Hilbi. *Molecular pathogenesis of Shigella spp. : controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion*. Clinical microbiology reviews, vol. 21, no. 1, pages 134–56, Janvier 2008. (Cité en page 95.)
- [Schuijers 2012] Jurian Schuijers et Hans Clevers. *Adult mammalian stem cells : the role of Wnt, Lgr5 and R-spondins*. The EMBO journal, vol. 31, no. 12, pages 2685–96, Juin 2012. (Cité en page 72.)
- [Sears 2001] Cynthia L. Sears. *The toxins of Bacteroides fragilis*. Toxicon, vol. 39, no. 11, pages 1737–1746, Novembre 2001. (Cité en pages 93 et 184.)
- [Sears 2006] C.L. Sears, A.A. Franco et S. Wu. *Bacteroides fragilis toxins, in The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins*. pages 535–546, 2006. (Cité en page 184.)
- [Sebahia 2007] M. Sebahia, M. W Peck, Nigel P Minton, Nicholas R Thomson, Matthew TG Holden, Wilfrid J Mitchell, Andrew T Carter, Stephen D Bentley, David R Mason, Lisa Crossman et al. *Genome sequence of a proteolytic (Group I) Clostridium botulinum strain Hall A and comparative analysis of the clostridial genomes*. Genome research, vol. 17, no. 7, pages 1082–1092, 2007. (Cité en pages 17, 50 et 265.)
- [Sebald 1973] M Sebald et G Saimot. *Le diagnostic biologique du botulisme*. Médecine et Maladies Infectieuses, vol. 3, no. 2, pages 83–85, 1973. (Cité en page 173.)
- [Sharma 1999] Shashi Kant Sharma, Fen-Ni Fu et Bal Ram Singh. *Molecular properties of a hemagglutinin purified from type A Clostridium botulinum*. Journal of protein chemistry, vol. 18, no. 1, pages 29–38, 1999. (Cité en pages 170 et 175.)
- [Sharma 2003] Deepak K Sharma, Amit Choudhury, Raman Deep Singh, Christine L Wheatley, David L Marks et Richard E Pagano. *Glycosphingolipids internalized via caveolar-related endocytosis rapidly merge with the clathrin pathway in early endosomes and form microdomains for recycling*. Journal of Biological Chemistry, vol. 278, no. 9, pages 7564–7572, 2003. (Cité en pages 168, 169 et 182.)
- [Sheth 2008] Anandi N Sheth, Petra Wiersma, David Atrubin, Vinita Dubey, Donald Zink, Guy Skinner, Fran Doerr, Patricia Juliao, German Gonzalez, Cindy Burnett et al. *International outbreak of severe botulism with prolonged toxemia caused by commercial carrot juice*. Clinical infectious diseases, vol. 47, no. 10, pages 1245–1251, 2008. (Cité en page 191.)
- [Shimizu 2002] Tohru Shimizu, Harumi Yaguchi, Kaori Ohtani, Sayera Banu et Hideo Hayashi. *Clostridial VirR/VirS regulon involves a regulatory RNA molecule for expression of toxins*. Molecular microbiology, vol. 43, no. 1, pages 257–65, Janvier 2002. (Cité en pages 49 et 266.)

- [Simpson 1984a] L L Simpson. *The binding fragment from tetanus toxin antagonizes the neuromuscular blocking actions of botulinum toxin*. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, vol. 229, no. 1, pages 182–7, Avril 1984. (Cité en page 109.)
- [Simpson 1984b] Lance L Simpson. *Botulinum toxin and tetanus toxin recognize similar membrane determinants*. Brain Research, vol. 305, no. 1, pages 177–180, 1984. (Cité en page 109.)
- [Simpson 1994] Lance L Simpson, Julie A Coffield et Nabil Bakry. *Inhibition of vacuolar adenosine triphosphatase antagonizes the effects of clostridial neurotoxins but not phospholipase A2 neurotoxins*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, vol. 269, no. 1, pages 256–262, 1994. (Cité en page 186.)
- [Simpson 1999] F Simpson, N K Hussain, B Qualmann, R B Kelly, B K Kay, P S McPherson et S L Schmid. *SH3-domain-containing proteins function at distinct steps in clathrin-coated vesicle formation*. Nature cell biology, vol. 1, no. 2, pages 119–24, Juin 1999. (Cité en pages 114 et 187.)
- [Simpson 2004] Lance L Simpson. *Identification of the major steps in botulinum toxin action*. Annual review of pharmacology and toxicology, vol. 44, pages 167–93, Janvier 2004. (Cité en pages 33, 34 et 360.)
- [Skarin 2011] Hanna Skarin, Therese Hå fström, Josefina Westerberg, Bo Segerman et Therese Hafstrom. *Clostridium botulinum group III : a group with dual identity shaped by plasmids, phages and mobile elements*. BMC genomics, vol. 12, no. 1, page 185, Janvier 2011. (Cité en page 26.)
- [Smith 2005] TJ Smith, J Lou et IN Geren. *Sequence Variation within Botulinum Neurotoxin Serotypes Impacts Antibody Binding and Neutralization*. Infection and Immunity, 2005. (Cité en page 17.)
- [Smith 2006] L. A. Smith. *Bacterial protein toxins as biological weapons, in The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins*. 2006. (Cité en pages 172 et 174.)
- [Sobel 2005] Jeremy Sobel. *Botulism*. Clinical Infectious Diseases, vol. 41, no. 8, pages 1167–1173, 2005. (Cité en page 171.)
- [Sorek 2008] R. Sorek, V. Kulin et P. Hugenholtz. *CRISPR—a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea*. Nature reviews. Microbiology, vol. 6, no. 3, pages 181–6, Mars 2008. (Cité en page 49.)
- [Sorkin 2009] Alexander Sorkin et Mark von Zastrow. *Endocytosis and signalling : intertwining molecular networks*. Nature reviews. Molecular cell biology, vol. 10, no. 9, pages 609–22, Septembre 2009. (Cité en page 106.)

- [Spoden 2008] Gilles Spoden, Kirsten Freitag, Matthias Husmann, Klaus Boller, Martin Sapp, Carsten Lambert et Luise Florin. *Clathrin- and caveolin-independent entry of human papillomavirus type 16—involvement of tetraspanin-enriched microdomains (TEMs)*. PLoS one, vol. 3, no. 10, page e3313, Janvier 2008. (Cité en page 105.)
- [Stenmark 2008] På I Stenmark, Jérôme Dupuy, Akihiro Imamura, Makoto Kiso et Raymond C Stevens. *Crystal structure of botulinum neurotoxin type A in complex with the cell surface co-receptor GT1b—insight into the toxin-neuron interaction*. PLoS pathogens, vol. 4, no. 8, page e1000129, Janvier 2008. (Cité en page 167.)
- [Strotmeier 2010] Jasmin Strotmeier, Kwangkook Lee, Anne K Völker, Stefan Mahrhold, Yinong Zong, Johannes Zeiser, Jie Zhou, Andreas Pich, Hans Bigalke, Thomas Binz, Andreas Rummel et Rongsheng Jin. *Botulinum neurotoxin serotype D attacks neurons via two carbohydrate-binding sites in a ganglioside-dependent manner*. The Biochemical journal, vol. 431, no. 2, pages 207–16, Octobre 2010. (Cité en page 109.)
- [Südhof 2011] Thomas C Südhof et Josep Rizo. *Synaptic vesicle exocytosis*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, vol. 3, no. 12, Décembre 2011. (Cité en page 35.)
- [Sugawara 2010] Yo Sugawara, Takuhiro Matsumura, Yuki Takegahara, Yingji Jin, Yoshikazu Tsukasaki, Masatoshi Takeichi et Yukako Fujinaga. *Botulinum hemagglutinin disrupts the intercellular epithelial barrier by directly binding E-cadherin*. The Journal of cell biology, vol. 189, no. 4, pages 691–700, Mai 2010. (Cité en pages 95 et 184.)
- [Sugawara 2011] Yo Sugawara et Yukako Fujinaga. *The botulinum toxin complex meets E-cadherin on the way to its destination*. Cell Adhesion & Migration, vol. 5, no. 1, pages 34–36, Janvier 2011. (Cité en pages 95 et 184.)
- [Sugii 1977a] S Sugii, I Ohishi et G Sakaguchi. *Correlation between oral toxicity and in vitro stability of Clostridium botulinum type A and B toxins of different molecular sizes*. Infection and immunity, vol. 16, no. 3, pages 910–4, Juin 1977. (Cité en pages 32, 89, 90 et 269.)
- [Sugii 1977b] S Sugii, IWAH Ohishi et GENJI Sakaguchi. *Correlation between oral toxicity and in vitro stability of Clostridium botulinum type A and B toxins of different molecular sizes*. Infection and immunity, vol. 16, no. 3, pages 910–914, 1977. (Cité en pages 176, 177 et 180.)
- [Sugii 1977c] Shunji Sugii, Iwao Ohishi et Genji Sakaguchi. *Intestinal absorption of botulinum toxins of different molecular sizes in rats*. Infection and immunity, vol. 17, no. 3, pages 491–496, 1977. (Cité en pages 175, 177 et 190.)

- [Sugiyama 1978] H Sugiyama et DANIEL C Mills. *Intraintestinal toxin in infant mice challenged intragastrically with Clostridium botulinum spores*. Infection and Immunity, vol. 21, no. 1, pages 59–63, 1978. (Cité en page 178.)
- [Sugiyama 1980] H Sugiyama. *Clostridium botulinum neurotoxin*. Microbiological reviews, vol. 44, no. 3, page 419, 1980. (Cité en page 178.)
- [Sun 2012] Shihu Sun, William H Tepp, Eric a Johnson et Edwin Raymond Chapman. *Botulinum Neurotoxins B and E Translocate at Different Rates and Exhibit Divergent Responses to GT1b and Low pH*. Biochemistry, Juin 2012. (Cité en page 167.)
- [Swaminathan 2000] S Swaminathan et S Eswaramoorthy. *Structural analysis of the catalytic and binding sites of Clostridium botulinum neurotoxin B*. Nature structural biology, vol. 7, no. 8, pages 693–9, Août 2000. (Cité en page 167.)
- [Tacket 1989] C.O. Tacket et M.A. Rogawski. Botulism, in botulinum neurotoxin and tetanus toxin. Access Online via Elsevier, 1989. (Cité en page 173.)
- [Taguchi 2013] Tomohiko Taguchi. *Emerging roles of recycling endosomes*. Journal of biochemistry, vol. 153, no. 6, pages 505–10, Juin 2013. (Cité en page 106.)
- [Takei 2005] Kohji Takei, Yumi Yoshida et Hiroshi Yamada. *Regulatory mechanisms of dynamin-dependent endocytosis*. Journal of biochemistry, vol. 137, no. 3, pages 243–7, Mars 2005. (Cité en page 187.)
- [Taysse 2005] L Taysse, S Daulon, JH Calvet, S Delamanche, D Hilaire, B Bellier et P Breton. *Induction of acute lung injury after intranasal administration of toxin botulinum a complex*. Toxicologic pathology, vol. 33, no. 3, pages 336–342, 2005. (Cité en pages 178 et 179.)
- [Thompson 2007] Anthony Thompson et Randy Nessler. *Recycling endosomes of polarized epithelial cells actively sort apical and basolateral cargos into separate subdomains*. Molecular biology of the cell, vol. 18, no. July, pages 2687–2697, 2007. (Cité en page 107.)
- [Thompson 2011] Aaron a Thompson, Guan-Sheng Jiao, Seongjin Kim, April Thai, Lynne Cregar-Hernandez, Stephen a Margosiak, Alan T Johnson, Gye Won Han, Sean O'Malley et Raymond C Stevens. *Structural Characterization of Three Novel Hydroxamate-based Zinc Chelating Inhibitors of the C. botulinum Serotype A Neurotoxin Light Chain Metalloprotease Reveals a Compact Binding Site Resulting from 60/70 Loop Flexibility*. Biochemistry, vol. 50, no. 19, pages 4019–28, Mars 2011. (Cité en page 48.)
- [Toledo-Arana 2007] Alejandro Toledo-Arana, Francis Repoila et Pascale Cossart. *Small noncoding RNAs controlling pathogenesis*. Current opinion in microbiology, vol. 10, no. 2, pages 182–8, Avril 2007. (Cité en page 49.)

- [Tracy 2012] Bryan P Tracy, Shawn W Jones, Alan G Fast, Dinesh C Indurthi et Eleftherios T Papoutsakis. *Clostridia : the importance of their exceptional substrate and metabolite diversity for biofuel and biorefinery applications*. Current opinion in biotechnology, vol. 23, no. 3, pages 364–81, Juin 2012. (Cité en pages 19 et 40.)
- [Trieu-Cuot 1991] Patrick Trieu-Cuot, Cécile Carlier, Claire Poyart-Salmeron et Patrice Courvalin. *Shuttle vectors containing a multiple cloning site and a lacZ alpha gene for conjugal transfer of DNA from Escherichia coli to gram-positive bacteria*. Gene, vol. 102, no. 1, pages 99–104, 1991. (Cité en pages 279, 280 et 371.)
- [Umland 1997] Timothy C Umland, Lavinia M Wingert, S Swaminathan, William F Furey, James J Schmidt et Martin Sax. *Structure of the receptor binding fragment HC of tetanus neurotoxin*. Nature structural biology, vol. 4, no. 10, pages 788–792, 1997. (Cité en page 167.)
- [Uotsu 2006] Nobuo Uotsu, Atsushi Nishikawa, Toshihiro Watanabe, Tohru Ohyama, Takashi Tonzuka, Yoshiyuki Sakano et Keiji Oguma. *Cell internalization and traffic pathway of Clostridium botulinum type C neurotoxin in HT-29 cells*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, vol. 1763, no. 1, pages 120–128, 2006. (Cité en page 188.)
- [Verderio 2007] Claudia Verderio, Carlotta Grumelli, Luca Raiteri, Silvia Coco, Silvio Paluzzi, Paola Caccin, Ornella Rossetto, Giambattista Bonanno, Cesare Montecucco et Michela Matteoli. *Traffic of botulinum toxins A and E in excitatory and inhibitory neurons*. Traffic (Copenhagen, Denmark), vol. 8, no. 2, pages 142–53, Février 2007. (Cité en pages 113 et 186.)
- [Veshnyakova 2012] A. Veshnyakova, J. Piontek, J. Protze, N. Waziri, I. Heise et G. Krause. *Mechanism of Clostridium perfringens enterotoxin interaction with claudin-3/-4 protein suggests structural modifications of the toxin to target specific claudins*. The Journal of biological chemistry, vol. 287, no. 3, pages 1698–708, Janvier 2012. (Cité en page 92.)
- [Wagman 1953] J Wagman et J B Bateman. *Botulinum type A toxin : properties of a toxic dissociation product*. Archives of biochemistry and biophysics, vol. 45, no. 2, pages 375–83, Août 1953. (Cité en page 89.)
- [Wang 2010] Donghai Wang, RC Pezo, Georgia Corner et Cristina Sison. *Altered dynamics of intestinal cell maturation in Apc1638N/+ mice*. Cancer research, vol. 70, no. 13, pages 5348–5357, 2010. (Cité en page 69.)
- [Waters 2005] Christopher M Waters et Bonnie L Bassler. *Quorum sensing : cell-to-cell communication in bacteria*. Annual review of cell and developmental biology, vol. 21, pages 319–46, Janvier 2005. (Cité en pages 51, 52 et 267.)

- [Waters 2009] Lauren S Waters et Gisela Storz. *Regulatory RNAs in bacteria*. Cell, vol. 136, no. 4, pages 615–28, Février 2009. (Cité en page 48.)
- [Wells 1982] Carol L Wells, Hiroshi Sugiyama et Sarah E Bland. *Resistance of mice with limited intestinal flora to enteric colonization by Clostridium botulinum*. Journal of Infectious Diseases, vol. 146, no. 6, pages 791–796, 1982. (Cité en page 178.)
- [Wiegand 1976] H Wiegand, G Erdmann et HH Wellhöner. *125 I-labelled botulinum A neurotoxin : pharmacokinetics in cats after intramuscular injection*. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology, vol. 292, no. 2, pages 161–165, 1976. (Cité en page 190.)
- [Wohlfarth 2001] Kai Wohlfarth, Margot Schubert, Beate Rothe, Josef Elek et Reinhard Dengler. *Remote F-wave changes after local botulinum toxin application*. Clinical neurophysiology, vol. 112, no. 4, pages 636–640, 2001. (Cité en page 190.)
- [Wohlfarth 2009] Kai Wohlfarth, Thomas Sycha, Danièle Ranoux, Hans Naver et David Caird. *Dose equivalence of two commercial preparations of botulinum neurotoxin type A : time for a reassessment ?* Current medical research and opinion, vol. 25, no. 7, pages 1573–1584, 2009. (Cité en page 190.)
- [Yamakawa 1998] K Yamakawa et T Karasawa. *Inhibition of enhanced toxin production by Clostridium difficile in biotin-limited conditions*. Journal of medical Microbiology, vol. 47, pages 767–771, 1998. (Cité en page 44.)
- [Yoneyama 2008] Tohru Yoneyama, Keita Miyata, Tomoyuki Chikai, Akifumi Mikami, Tomonori Suzuki, Kimiko Hasegawa, Toshihiko Ikeda, Toshihiro Watanabe, Tohru Ohyama et Koichi Niwa. *Clostridium botulinum serotype D neurotoxin and toxin complex bind to bovine aortic endothelial cells via sialic acid*. FEMS Immunology & Medical Microbiology, vol. 54, no. 3, pages 290–298, 2008. (Cité en page 190.)
- [Yowler 2002] Brian C Yowler, Richard D Kensinger et Cara-Lynne Schengrund. *Botulinum neurotoxin A activity is dependent upon the presence of specific gangliosides in neuroblastoma cells expressing synaptotagmin I*. Journal of Biological Chemistry, vol. 277, no. 36, pages 32815–32819, 2002. (Cité en page 182.)
- [Zatelli 2007] M. C. Zatelli, M. Torta, A. Leon, M. R. Ambrosio, M. Gion, P. Tomassetti, F. De Braud, G. Delle Fave, L. Dogliotti et E. C. degli Uberti. *Chromogranin A as a marker of neuroendocrine neoplasia : an Italian Multicenter Study*. Endocrine-related cancer, vol. 14, no. 2, pages 473–82, Juin 2007. (Cité en pages 67 et 204.)
- [Zhang 2013] Yanfeng Zhang, Anna Gardberg, Thomas E Edwards, Banumathi Sankaran, Howard Robinson, Susan M Varnum et Garry W Buchko. *Structural insights into the functional role of the Hcn sub-domain of the receptor-binding domain of the*

botulinum neurotoxin mosaic serotype C/D. Biochimie, no. March, pages 1–7, Mars 2013. (Cité en pages 26, 51 et 265.)

[Zhao 2006] L Zhao, T J Montville et D W Schaffner. *Evidence for quorum sensing in Clostridium botulinum 56A*. Letters in applied microbiology, vol. 42, no. 1, pages 54–8, Janvier 2006. (Cité en page 52.)

Table des figures

I.1	Frise chronologique représentant les moments clés de l'histoire des neurotoxines botuliques et du botulisme (noter que la flèche n'est pas à l'échelle). Les découvertes des types sont notées en vert, les utilisations en thérapeutique en bleu et les tentatives de bioterrorisme et les préventions appliquées en rouge.	12
I.2	Historique de la découverte des différents types de souches de <i>C. botulinum</i> (d'après [Hill 2013]).	15
I.3	Dendogramme de la classification des différentes souches de Clostridies au sein des groupes I à IV des souches de <i>C. botulinum</i> , V de <i>C. baratii</i> , et VI de <i>C. butyricum</i> (d'après [Hill 2013]).	16
I.4	Photos en contraste de phase de la forme végétative (bacille) et sporulée d'une souche de type A1 isolée d'un patient en 2013. Noter la réfringence importante de la spore et sa localisation terminale (Connan, non publié)	18
I.5	Réservoirs principaux et localisations géographiques des différents types de <i>C. botulinum</i> . (d'après [Marvaud 2002]).	19
I.6	Récapitulatif des caractéristiques physiologiques des différents types et sous-types, le type de botulisme provoqué et les souches apparentées (d'après [Popoff 2012]).	20
I.7	Photo de souris prise 18h après injection en intrapéritonéale d'un sérum issu d'un patient atteint de botulisme. Noter la détresse respiratoire de l'animal indiquée par la bouche ouverte et la silhouette efflanquée. Noter également la paralysie des membres inférieurs reflétant l'état avancé de la maladie.	23
I.8	Evolution du nombre de cas déclarés de botulisme humain et animal au sein du CNRAB depuis 2006 (données recueillies à partir des rapports annuels d'activité du CNRAB).	24
I.9	Organisation des loci botuliques pour les différents types de souches de <i>C. botulinum</i>	25
I.10	Diversité génétique des neurotoxines entre les souches exprimée en pourcentage d'identité de séquences nucléotidiques et d'acide aminés. Noter que les plus forts pourcentages en acide nucléiques et acides aminés sont retrouvés entre les souches F1 et E3 (d'après [Hill 2013])	27

I.11	Architecture moléculaire des BoNTs de types A ou B et du type E. En a) Schéma de la structure de BoNT/A. La chaîne monocaténaire est activée par clivage protéolytique par une protéase endogène ou exogène. En b) représentation schématique et en ruban des BoNT/A BoNT/B et BoNT/E. Il est à noter que pour BoNT/E les domaines BD et le CD sont du même côté (d'après [Kumaran 2009]).	28
I.12	Représentation en ruban de BoNT/A, NTNHA-A et du complexe 12s. En a) comparaison des structures de BoNT/A et NTNH. Noter la ressemblance dans la structure. En b) représentation en ruban et de surface du complexe 12s. On observe un emboîtement à la manière d'une poignée de main (d'après [Gu 2012] [Gu 2013]).	31
I.13	Structure du complexe 16s de BoNT/A et BoNT/B. Noter l'orientation des 3 bras que forment les HA33 HA17 et HA70. L'hélice en rouge présente sur BoNT/A1 ou BoNT/B correspond au site de liaison aux gangliosides de type GD1b. Les domaines en dégradé de rose représentent les 3 HA70 (d'après [Benefield 2013]).	31
I.14	Schéma des 6 grandes étapes de l'intoxication. En vert sont indiquées les étapes étudiées au cours de cette thèse. Noter que TeNT (Tetanus NeuroToxin) clive également des protéines SNAREs (modifié à partir de [Simpson 2004]).	33
I.15	Modèle dit en "gouttière" proposé par Montal et collaborateurs représentant les 6 étapes de la translocation de la chaîne légère au travers de la vésicule synaptique. Noter que le devenir de Hc inséré dans la membrane n'est pas clair (d'après [Fischer 2008]).	35
I.16	Schéma représentant l'implication des SNAREs dans la neuroexocytose. Les chaînes légères de BoNT/A, C et E clivent SNAP-25, celles de BoNT/B, D, F, G et de TeNT clivent la synaptotagmine, et BoNT/C hydrolyse la syntaxine.	36
I.17	Schéma représentant le mode d'action des toxines ADP ribosylantes de l'actine. Les toxines agissent sur la forme monomérique et ADP ribosyle l'arginine en position 177 de l'actine et empêche la polymérisation de l'actine G en actine F. CDT : <i>C. difficile</i> binary toxin CST : <i>C. spiroforme</i> toxin VIP : vegetative interstitial protein SpvB : <i>S. enterica</i> virulence factor (d'après [Barth 2011]).	39
II.1	Schéma de la régulation de l'expression du locus botulique de type A par les facteurs environnementaux et endogènes. Les facteurs identifiés chez les autres types sont suivis d'un point d'interrogation. Les flèches rouges correspondent à une régulation positive de la production de toxine et les flèches vertes à une régulation négative (d'après [Raffestin 2005]).	45

II.2	Schéma des différentes étapes de l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase associée à un facteur σ de la famille 70. Noter que l'ARN polymérase est constituée de plusieurs sous unités : 2 sous-unités α permettant l'association des 2 sous-unités β et la reconnaissance des éléments d'activation en cis et en trans. Les 2 sous-unités β permettent la liaison à l'ADN, la synthèse des ARNs et la reconnaissance du terminateur. Le facteur σ permet la liaison spécifique au promoteur.	47
II.3	Modèle prédit de séquestration de CsrA par le petit sRNA CsrB.	48
II.4	Schéma de la régulation par les systèmes à deux composants (TCSs). Le signal est détecté par le senseur histidine kinase (SHK) par son domaine senseur transmembranaire, entraînant un changement de conformation. Ceci conduit à une autophosphorylation dépendante de l'ATP sur un résidu Histidine (H) conservé. Ce groupement phosphate est alors transféré sur un résidu aspartate (D) également conservé, sur la partie réceptrice de la protéine régulatrice (RR, Response Regulator) entraînant son activation. Une fois activée, la partie effectrice de RR modifie spécifiquement l'expression des gènes cibles.	50
II.5	Exemple de communication intra-spécifique. Schéma de la régulation de la production de toxine par le système Agr chez <i>S. aureus</i> . <i>agrD</i> code un peptide précurseur de 46aa, hydrolysé par la protéine codé par <i>agrB</i> en un octapeptide, l'AIP (Autoinducer Peptid). Cet AIP est alors détecté de façon spécifique par le TCS <i>agrC/ argA</i> alors que les AIPs hétérologues produits par d'autres bactéries, ne sont pas détectés. AgrA est la protéine régulatrice qui active la transcription à partir des promoteurs P2 et P3 permettant l'autorégulation et la synthèse de l'ARN III. L'ARN III bloque la traduction de l'ARNm de Rot (Repressor of toxins) et permet la production de toxine (d'après [Novick 2008]).	52
III.1	Schéma de l'appareil digestif comprenant les 3 parties distinctes, la cavité buccale (légendes en vert), le tube digestif en noir avec l'intestin grêle (légendes en bleu) et le gros intestin (légendes en rouge) ainsi que les glandes annexes (en violet).	58
III.2	Schéma représentant la composition histologique de l'intestin grêle.	60
III.3	Image en microscopie à fluorescence des différentes couches histologiques de l'intestin grêle (grossissement X400). Noter la différence d'orientation des noyaux dans les deux couches musculaires. En bleu, les noyaux (Hoechst), et en blanc la cadhérine épithéliale (cadhérine E). (C. Conman, non publié).	61
III.4	Localisation, fonction et occurrence des principaux types cellulaires présents dans la muqueuse intestinale. Noter que les cellules M sont absentes de l'axe cryptes/ villosités.	63

III.5	Microvillosités des entérocytes. Noter la position du noyau dans le tiers basal des cellules (grossissement x400). (C. Connan, non publié).	64
III.6	Image en microscopie à fluorescence permettant de visualiser la forme en calice des cellules calciformes. (grossissement X400). Bleu : Hoechst, Blanc : cadhérine E, Vert : WGA (Wheat Germ Hemagglutinin), marqueur spécifique des cellules calciformes. (C.Connan, non publié)	65
III.7	Image en microscopie à fluorescence représentant les cellules de Paneth situées au fond des cryptes. Noter que ces cellules sont facilement reconnaissables de part leur localisation mais également par les grains de zymogènes qu'elles contiennent. (Grossissement X400). Bleu : Hoechst, Blanc : cadhérine E et Vert : UEA1 (Ulex europaeus agglutinin I) marqueur spécifique des cellules de Paneth (C.Connan, non publié).	66
III.8	Image en microscopie à fluorescence permettant de mettre en évidence les " tuft cells ". Noter la répartition à la fois dans les villosités et les cryptes (Grossissement X400). Bleu : Hoechst, Blanc : cadhérine E, Vert : DCLK-1 (double cortin kinase 1 protein) marqueur des " tuft cells " (C.Connan, non publié).	68
III.9	Schéma représentatif de la division asymétrique des cellules souches CBC Lgr5 ⁺	70
III.10	Schéma du renouvellement de l'épithélium intestinal et de la différenciation cellulaire (modifié à partir de [Barker 2010]).	70
III.11	Schéma simplifié des voies de signalisation entrant en jeu dans le devenir des cellules souches CBC Lgr5 ⁺ . Les cellules souches CBC Lgr5 ⁺ vont rapidement se différencier en cellules sécrétrices ou absorbantes grâce au facteur de transcription Math-1. Puis d'autres facteurs (Wnt, Klf4, Elf4, Neurog3 et Pax6) vont permettre de différencier ces cellules en cellules de Paneth, cellules calciformes ou cellules entéroendocrines.	71
III.12	Schéma représentatif du Système Nerveux Entérique de l'intestin grêle (modifié de [Furness 2012]).	73
III.13	Schéma représentatif des différents types de neurones existants dans l'intestin grêle du cobaye (modifié [Furness 2000]).	74
III.14	Tableau synthétisant les différents types de neurones, leur localisation dans la barrière intestinale, leur morphologie, leur occurrence dans la barrière intestinale, ainsi que les principaux types de neurotransmetteurs qu'ils produisent. Les chiffres correspondent aux neurones identifiés dans le schéma FigIII.13[Broos 2001], [Furness 2004].	75
III.15	Schéma du mécanisme d'action du SNE lors du péristaltisme (modifié de [Epstein 1996]).	79

III.16 Classification générale des entérotoxines et toxines utilisant la barrière intestinale comme cible ou voie d'entrée dans l'organisme. H, Homme, A, Animal.	81
IV.1 Modèles proposés des voies d'entrée des neurotoxines botuliques à travers la barrière intestinale. Il n'est pas encore clairement établi si le complexe transite sous forme de complexe ou si BoNT transite seule à travers la barrière épithéliale.	91
IV.2 Schéma du modèle cellulaire pour l'étude de la transcytose.	91
IV.3 Schéma des jonctions intercellulaires intervenant dans le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale (d'après [Neunlist 2013] et [Perez-Moreno 2003]).	93
IV.4 Cycle des GTPases. Les GTPases sont inactives sous leur forme liée au GDP et actives lorsqu'elles sont liées au GTP. Ce passage de forme active à inactive est régulé par 3 types de protéines, les GAPs, les GEFs, et les GDIs qui ne régulent pas toutes les GTPases.	96
IV.5 Modèle de formation des vésicules de clathrine. Les triskèles de clathrine s'associent les uns aux autres grâce aux protéines accessoires et à la protéine adaptatrice (AP-2) pour former un manteau de clathrine à la membrane plasmique. Puis la vésicule est libérée dans le milieu intra-cellulaire grâce à la dynamine et libérée de son manteau de clathrine grâce à l'ATPase hsc70, recrutée par l'auxiline et GAK. D'après [McMahon 2011] [Benmerah 2002] [Brodsky 2012].	99
IV.6 Représentation schématique de la voie de biosynthèse des polysialo gangliosides complexes. Le schéma montre le rôle des enzymes GM3-synthase (GM3S), GD3-synthase (GD3S) et N-acétylgalactosamine transférase (NAcGalT), dans la biosynthèse des gangliosides. La GlcCer (glucosyl-céramide synthase) est inhibée par le PPMP (DL-threo-1-Phenyl-2 palmitoyl-amino-3 morpholino-1-propanol). LacCer : lactosylcéramide, NeuAc, acide neuraminique. D'après [Rummel 2009]	102
IV.7 Images en microscopie électronique (a et b) et schéma de la structure à la membrane des cavéoles (c). Noter que le cavéoles peuvent prendre différentes formes et plusieurs cavéoles peuvent s'associer ensemble, pour former des structures plus importantes (d) (d'après [Parton 2007]).	104
IV.8 Schéma et principales caractéristiques des différentes voies d'endocytose décrites dans la littérature [Mercer 2010] [Qualmann 2003] [Doherty 2009].	106

IV.9 Trafic endosomal dans les cellules polarisées. La transcytose peut être réalisée dans les deux sens, du pôle baso-latéral au pôle apical (A) et du pôle apical au pôle baso-latéral (B). 1) Les cargos sont endocytés par une voie CDE ou CIE au pôle apical ou au pôle baso-latéral et rejoignent les endosomes précoces (EE, Early Endosome) du pôle apical (AEE), ou du pôle basal (BEE). Puis les cargos peuvent être dirigés vers plusieurs voies, une voie de recyclage à la membrane (2a), un voie des endosomes tardifs (LE, Late Endosome) (2b) où ils seront dégradés dans les lysosomes (2b'), ou une voie des endosomes de recyclage commun (CRE, Common Recycling Endosome) (2c). Au niveau des CREs, les cargos pourront être soit recyclés à la membrane (3a), soit dirigés vers les endosomes de recyclage apicaux (ARE, Apical Recycling Endosome) (3b) puis être recyclés à la membrane (3b'). Au pôle apical, une voie directe entre AEE et ARE (4) pourrait exister (flèche pointillée). La transcytose du pôle apical au pôle baso-latéral pourrait également impliquer une voie entre ARE et CRE (5). Ce trafic intracellulaire implique le cytosquelette ainsi que les petites protéines G, les Rabs. 108

IV.10 Modèle d'entrée des BoNTs dans les cellules neuronales : les BoNTs se lient à un ganglioside à la surface de la cellule (a). A la suite de la libération de neurotransmetteurs, la partie intracellulaire des protéines des vésicules synaptiques est exposée à la membrane plasmique (b). Les BoNTs s'associent alors avec leur protéine réceptrice (exemple ici de la synaptotagmine, Syt) potentiellement par diffusion à la membrane après liaison aux récepteurs gangliosidiques (c). Une fois liées à leur récepteur, les BoNTs sont internalisées grâce au recyclage des vésicules synaptiques (e). La lumière de la vésicule s'acidifie grâce à une pompe à proton vésiculaire (vATP) (f) ce qui provoque un réarrangement structural permettant à la chaîne légère de transloquer dans le cytosol (g) et agir sur les protéines SNARE (h). D'après [Binz 2009] . . . 111

IV.11	Topologie membranaire des protéines réceptrices des BoNTs : la Synaptotagmine (Syt) (a) et SV2C (b). La Syt-II est une protéine de 422 aa, dont les 65 premier aa en N-terminal, sont dans la lumière de la vésicule. La partie C terminal contient deux domaines C2 (impliqués dans le ciblage des protéines à la membrane cellulaire). Les résidus conservés chez Syt-I sont indiqués en noir et les sites de N-glycosylation en rouge (Y). SV2C est une glycoprotéine à 12 domaines transmembranaires putatifs. Les résidus conservés sont en noir, et ceux conservés chez SV2A ou SV2B sont en gris. La grande boucle LD4 (large domaine 4) de 125aa contient 4 site de n-glycosylation (Y en rouge). Noter que l'entrée de BoNT/E dépend de la glycosylation du 3ème résidu (flèche bleue). D'après [Binz 2009].	112
II.1	Genome organization of botulinum loci in <i>C. botulinum</i> type A and subtypes strains.	189
II.2	Genome organization of botulinum loci in <i>C. botulinum</i> type B to G strains	192
II.3	Composition of the main botulinum complex forms. Numbers inside the boxes indicate protein sizes in kDa. L, light chain; H, heavy chain; NTNH, non-toxic non-hemagglutinin; HA, hemagglutinin and Genome organization of botulinum loci and botulinum toxin organization.	194
II.4	Image en microscopie à fluorescence de la liaison de HcB avec la barrière intestinale après 5 min d'incubation (échelle indiquée sur chaque image). Les noyaux sont marqués au Hoechst (bleu). Un faible marquage de HcBCy3 (rouge) est observé à la surface des villosités (A et B flèches blanches). Certaines cellules, de forme pyramidale ou allongée, sont marquées à la surface des villosités (B et C flèches bleues). Enfin, on observe également un marquage de structures filamenteuses dans la lamina propria (A, B et C flèches oranges). Les différentes couches structurales sont encadrées en violet pour la muqueuse, et en vert pour la sous-muqueuse et la musculature.	197
II.5	Image en microscopie à fluorescence de la liaison de HcBCy3 avec la barrière intestinale après 10 min d'incubation (échelle indiquée sur chaque image). Les noyaux sont marqués au Hoechst (bleu). Les flèches blanches indiquent l'accumulation de HcBCy3 à la surface des villosités (A) et au fond des cryptes (B et D). Les flèches bleues indiquent les cellules marquées de l'épithélium villositaire (B et C). Les flèches oranges signalent les marquages des structures filamenteuses dans la muqueuse (A, B et D) dans la sous-muqueuse et la musculature (E)	198

II.6	Image en microscopie à fluorescence de la liaison de HcBCy3 (en rouge) avec la barrière intestinale après 20 min d'incubation (échelle indiquée sur chaque image). L'image A est une coupe longitudinale de la barrière intestinale où un faible marquage est observé à la surface des villosités (flèches blanches) alors qu'un fort marquage de type filamentaire est observé autours des cryptes, dans la sous-muqueuse et la musculuse (flèches oranges). L'image B réalisée à partir d'une coupe transversale, permet de visualiser l'accumulation du HcBCy3 au fond des cryptes (flèches blanches). Les noyaux ont également été marqués au Hoechst (bleu).	199
II.7	Image en microscopie à fluorescence de la liaison de HcBCy3 avec la barrière intestinale après 10 min d'incubation (Figure A et B) et en présence de Dynasore (figure C et D) (échelle indiquée sur chaque image). Les noyaux sont marqués au Hoechst (bleu). Les figures A et B sont des mosaïques d'images réalisées à partir de deux expériences indépendantes.	202
II.8	Image en microscopie à fluorescence de la liaison de HcBCy3 avec la barrière intestinale après 10 min d'incubation (Figure A et B) et en présence de Dynasore (figure C et D). Voir légende Fig. II.7.	203
II.9	Image en microscopie à fluorescence des cellules marquées par HcBCy3 (rouge) et des cellules immunoréactives pour la CgA (vert) dans les villosités et les cryptes après 10 min d'incubation (échelle indiquée sur chaque image). Les figures sont des projections en Z de plusieurs tranches optiques (environ 20 tranches à 0,3 μm d'épaisseur) afin de visualiser la cellule en entier. La figure A correspond au marquage obtenu au niveau des villosités et la figure B au marquage obtenu dans les cryptes. Les noyaux ont également été marqués au Hoechst.	206
II.10	Image en microscopie à fluorescence des cellules marquées par HcBCy3 (rouge) et des cellules immunoréactives pour la sérotonine (vert) dans les villosités et les cryptes après 10 min d'incubation (échelle indiquée sur chaque image). Voir légende Fig. II.9.	207
II.11	Image en microscopie à fluorescence des cellules marquées par HcBCy3 (en rouge) et des cellules caliciformes (WGA-FITC, vert) dans les villosités et les cryptes après 10 min d'incubation (échelle indiquée sur chaque image). Les figures sont des projections en Z de plusieurs tranches optiques (environ 20 tranches à 0,3 μm d'épaisseur) afin de visualiser la cellule en entier. Les figures A et B sont issues de deux expériences indépendantes. Les noyaux ont également été marqués au Hoechst et les membranes cellulaires avec un anticorps anti-cadhérine (ECCD2, blanc).	208

- II.12 Image en microscopie à fluorescence des cellules marquées par HcBCy3 (rouge) et des cellules M des villosités (vert, figure A) ou les lymphocytes intra-épithéliaux (DCLK1, vert, figure B) dans les villosités après 10 min d'incubation (échelle indiquée sur chaque image). Les figures sont des projections en Z de plusieurs tranches optiques (environ 20 tranches à $0,3 \mu\text{m}$ d'épaisseur) afin de visualiser les cellules en entier. Les noyaux sont marqués au Hoechst (bleu) et les membranes cellulaires avec un anticorps anti-cadhérine (ECCD2, en blanc). 209
- II.13 Analyse en immunohistochimie réalisée sur des coupes longitudinales d'anses intestinales de souris après 10 min d'incubation d'HcB. Les figures B et E sont les agrandissements des figures A et D au niveau des rectangles noirs. Les figures C et F sont les intestins contrôles sans HcB. La détection de HcB est réalisée à l'aide d'anticorps dirigés contre HcB. 211
- II.14 Immunohistochimie de la sous-muqueuse et musculuse réalisées à partir de coupes longitudinales d'anses intestinales de souris après 10 min d'incubation de HcB. La détection de HcB est réalisée à l'aide d'anticorps dirigés contre HcB. 211
- II.15 Liaison de HcB à la barrière épithéliale en microscopie électronique. La détection est réalisée à l'aide d'anticorps dirigés contre HcB couplés à des billes d'or. Les flèches bleues indiquent la localisation des vésicules d'endocytose de la cellule. Les flèches noires indiquent la présence de HcB détectée au niveau des microvillosités et dans le cytoplasme. Les flèches orange indiquent HcB détectée dans les vésicules d'endocytose. La figure B est un agrandissement de la figure A au niveau du rectangle. 213
- II.16 Liaison de HcB à la barrière épithéliale en microscopie électronique. La détection est réalisée à l'aide d'anticorps dirigés contre HcB couplés à des billes d'or. Les flèches noires indiquent les HcB détectés à la surface des microvillosités et les flèches vertes, ceux détectés à l'intérieur des microvillosités. La figure B est une image d'une coupe transverse (flèches noires) des microvillosités. 214
- II.17 HcB est localisée dans des vésicules d'endocytose. La détection est réalisée à l'aide d'anticorps dirigés contre HcB couplés à des billes d'or. Les flèches noires indiquent les HcB détectés dans le cytoplasme. Les flèches orange, le HcB détecté dans les vésicules d'endocytose. La figure B est un agrandissement de la figure A au niveau du rectangle. 215

II.18 Image en microscopie à fluorescence des structures marquées par HcBCy3 (rouge) et immunoréactives pour les NF (vert) dans la sous-muqueuse après 10 min d'incubation (échelle indiquée sur chaque image). La figure A est une projection en Z de plusieurs tranches optiques (environ 20 tranches à 0,3 μm d'épaisseur) d'une fibre nerveuse. Les structures marquées par HcBCy3 et les NF sont corrélées mais ne colocalisent que partiellement. La figure B est un zoom numérique réalisé sur une tranche optique de la partie encadrée dans la figure A montrant la colocalisation partielle observée entre HcBCy3 et les structures immunoréactives pour les NF. Les noyaux ont également été marqués au Hoechst (bleu).	218
II.19 Image en microscopie à fluorescence des structures marquées par HcBCy3 (rouge) et des structures immunoréactives pour les NF (vert) dans la musculature après 10 min d'incubation (échelle indiquée sur chaque image). Voir légende Fig. II.18.	219
II.20 Image en microscopie à fluorescence des structures marquées par HcBCy3 (rouge) et des structures marquées par Thy-1 (vert) dans la sous-muqueuse et la musculature après 10 min d'incubation (échelle indiquée sur chaque image). La figure A est une projection en Z de plusieurs tranches optiques (environ 20 tranches à 0,3 μm d'épaisseur) et la figure B est un zoom numérique réalisé sur une tranche optique au niveau de la partie encadrée dans la figure A. Les noyaux ont également été marqués au Hoechst (bleu).	220
II.21 Image en microscopie à fluorescence des structures marquées par HcBCy3 (rouge) et des structures marquées par Thy-1 (vert) dans la sous-muqueuse et la musculature après 10 min d'incubation (échelle indiquée sur chaque image). Voir figure légende figure 16.	221
II.22 Image en microscopie à fluorescence des structures marquées par HcBCy3 (rouge) et des structures immunoréactives pour ChAT (vert) dans la sous-muqueuse et la musculature après 10 min d'incubation (échelle indiquée sur chaque image). La figure A est une projection en Z de plusieurs tranches optiques (environ 20 tranches à 0,3 μm d'épaisseur) et la figure B est un zoom numérique réalisé sur une tranche optique au niveau de la partie encadrée dans la figure A. Les noyaux sont marqués au Hoechst (bleu) et les membranes cellulaires, avec un anticorps dirigé contre la cadhérine E (ECCD2, blanc).	224
II.23 Image en microscopie à fluorescence des structures marquées par HcBCy3 (rouge) et des structures immunoréactives pour ChAT (vert) dans la sous-muqueuse et la musculature après 10 min d'incubation (échelle indiquée sur chaque image). Voir légende Fig II.22.	225

II.24 Image en microscopie à fluorescence des structures marquées par HcBCy3 (rouge) et des structures immunoréactives pour ChAT (vert) dans la lamina propria après 10 min d'incubation (échelle indiquée sur chaque image). La figure A est une projection en Z de plusieurs tranches optiques (environ 20 tranches à 0,3 μm d'épaisseur) et la figure B est un zoom numérique réalisé sur une tranche optique au niveau de la partie encadrée dans la figure A. Les noyaux ont également été marqués au Hoechst et les membranes cellulaires avec un anticorps dirigé contre la cadhérine E (ECCD2, blanc).	226
II.25 Image en microscopie à fluorescence des structures marquées par HcBCy3 (rouge) et des structures immunoréactives pour ChAT (vert) dans la lamina propria après 10 min d'incubation (échelle indiquée sur chaque image). Voir légende Fig. II.27.	227
II.26 Image en microscopie à fluorescence des structures marquées par HcBCy3 (rouge) et des structures immunoréactives pour la sérotonine (vert) dans la sous-muqueuse après 10 min d'incubation (échelle indiquée sur chaque image). La figure A est une projection en Z de plusieurs tranches optiques (environ 20 tranches à 0,3 μm d'épaisseur) et la figure B est un zoom numérique réalisé sur une tranche optique au niveau de la partie encadrée dans la figure A. Les noyaux ont également été marqués au Hoechst.	228
II.27 Image en microscopie à fluorescence des structures marquées par HcBCy3 (rouge) et des structures immunoréactives pour la sérotonine (vert) dans la musculuse après 10 min d'incubation (échelle indiquée sur chaque image). Voir légende Fig. II.26.	229
II.28 Image en microscopie à fluorescence des structures marquées par HcBCy3 (rouge), Thy-1 (en blanc) et des structures immunoréactives pour Syt-II (vert) dans la musculuse après 10 min d'incubation (échelle indiquée sur chaque image). La figure B est un zoom numérique de la zone encadrée dans la figure A. Les noyaux ont également été marqués au Hoechst.	231
II.29 Image en microscopie à fluorescence des structures marquées par HcBCy3 (rouge), Thy-1 (en blanc) et des structures immunoréactives pour Syt-II (vert) dans la musculuse après 10 min d'incubation (échelle indiquée sur chaque image). Voir légende Fig. II.28.	232

II.30 Image en microscopie à fluorescence de neurones primaires de cortex de souris, de cellules NG108-15 et m-IC _{cl2} traitées avec HcBCy3 (rouge), après 10 min d'incubation à 37°C. HcBCy3 marque de manière homogène les neurites et les corps cellulaires des neurones primaires alors que HcBCy3 est majoritairement localisé en périnucléaire dans les NG108-15 et les m-IC _{cl2} . Les images sont des projections en Z de plusieurs tranches optiques afin de visualiser l'intégralité de la cellule. Un marquage à la phalloïdine (vert) des m-IC _{cl2} a été réalisé afin de mieux visualiser la morphologie de ces cellules.	239
II.31 Image en microscopie en fluorescence de l'entrée de HcBCy3 (rouge) dans les m-IC _{cl2} et les NG108-15 avec et sans compétition en présence d'un mélange de gangliosides enrichis en GD1b/GT1b. Les quantifications de fluorescence et les écart types ont été réalisés au minimum à partir de 5 expériences indépendantes. Les tests de significativité ont été réalisés par t-test avec $***P < 0.0001$	241
II.32 Image en microscopie en fluorescence de l'entrée de HcBCy3 (rouge) dans les m-IC _{cl2} et les NG108-15 en présence et en absence de Syt-I. Les quantifications de fluorescence et les écart types ont été réalisés au minimum à partir de 5 expériences indépendantes. Les tests de significativité ont été réalisés par t-test où $***P < 0.0001$	243
II.33 Image en microscopie en fluorescence de l'entrée de HcBCy3 (rouge) dans les m-IC _{cl2} et les NG108-15 en présence et absence de Syt-II. Les quantifications de fluorescence et les écart types ont été réalisés au minimum à partir de 5 expériences indépendantes. Les tests de significativité ont été réalisés par t-test où $***P < 0.0001$	244
II.34 Image en microscopie en fluorescence de l'entrée de HcBCy3 (rouge) dans les m-IC _{cl2} et les NG108-15 en présence et en absence de Syt-I et du mélange de gangliosides enrichis en GD1b/GT1b. Les quantifications de fluorescence et les écart types ont été réalisés au minimum à partir de 5 expériences indépendantes. Les tests de significativité ont été réalisés par t-test où $***P < 0.0001$	245
II.35 Image en microscopie en fluorescence de l'entrée de HcBCy3 (rouge) dans les m-IC _{cl2} et les NG108-15 en présence et en absence de Syt-II et les gangliosides enrichis en GD1b/GT1b. Les quantifications et les écart types ont été réalisés au minimum à partir de 5 expériences indépendantes. Les tests de significativité ont été réalisés par t-test où $***P < 0.0001$	246

II.36 Image en microscopie en fluorescence de l'entrée de HcBCy3(rouge) dans les m-IC _{cl2} et les NG108-15 après et sans traitement au Dynasore (80 μM). Les quantifications de fluorescence et les écart types ont été réalisés au minimum à partir de 5 expériences indépendantes. Les tests de significativité ont été réalisés par t-test où *** $P < 0.0001$	248
II.37 Image en microscopie en fluorescence de l'entrée de HcBCy3 (rouge) dans les cellules mIC _{cl2} et NG10815 transfectées avec un plasmide exprimant le dominant négatif de Cdc42 (vert).	250
II.38 Image en microscopie en fluorescence de l'entrée de HcBCy3 (rouge) dans les cellules mIC _{cl2} et NG10815 transfectées avec un plasmide exprimant le dominant négatif de Rac1 (vert).	250
II.39 Image en microscopie en fluorescence de l'entrée de HcBCy3 (rouge) dans les cellules mIC _{cl2} et NG10815 transfectées avec un plasmide exprimant le dominant négatif de RhoA (vert).	251
II.40 Image en microscopie en fluorescence de cellules m-IC _{cl2} et NG108-15 marquées avec HcBCy3 (rouge) et des endosomes immunoréactifs pour EEA1 (vert). Les quantifications et les écart types ont été réalisés à partir de 3 expériences indépendantes.	253
II.41 Image en microscopie en fluorescence de cellules m-IC _{cl2} et NG108-15 marquées avec HcBCy3 (rouge) et des endosomes immunoréactifs pour Rab7 (vert). Les quantifications et les écart types ont été réalisés à partir de 3 expériences indépendantes.	254
A.1 Structure du vecteur pAT19 et stratégie utilisés pour la construction de pMRP306. Le numéro des séquences proviennent de [Marvaud 1998]. La carte provient du pAT19, [Trieu-Cuot 1991]. Le site de restriction NcoI a été ajouté par PCR.	280
A.2 Amorces utilisées pour la construction des plasmides recombinants dérivés de Hall/306 et comportant les ADN codants pour les ARN antisens des gènes régulateurs.	283
A.3 Amorces utilisées pour la construction des plasmides recombinants dérivés de Hall/306 et comportant les ADN codants pour les ARN antisens des gènes régulateurs suite.	284
A.4 Amorces utilisées pour l'amplification par PCR temps réel des fragments internes des gènes cibles du locus botulique.	288
A.5 Gradient de température et efficacité de PCR correspondantes pour chaque couple d'amorces des gènes d'intérêt.	288

A.6	Le clonage est réalisée dans des souches d'E.Coli BL21 codon + (Stratagene, Agilent technology).	290
A.7	Anticorps et drogues utilisés pour l'étude.	292
A.8	Schéma du fonctionnement de la grille d'apotome (d'après Zeiss)	297
A.9	Schéma du fonctionnement d'un microscope confocal (d'après Olympus). . .	298
A.10	Schéma du fonctionnement du spinning disk (d'après Zeiss)	299

Résumé : Les neurotoxines botuliques (BoNTs), produites par *C. botulinum*, sont responsables du botulisme humain et animal. Dans sa forme naturelle, le botulisme résulte le plus souvent d'une absorption des toxines botuliques à partir du tube digestif après ingestion d'aliments contaminés par la toxine et *C. botulinum*. L'intoxication peut être divisée en 4 grandes étapes : production de toxine par la bactérie, ingestion d'aliments contenant la toxine préformée, passage de la neurotoxine à travers la barrière intestinale et action protéolytique aux terminaisons nerveuses. La régulation de la production des toxines et le passage des neurotoxines botuliques à travers la barrière intestinale sont mal compris. BoNT s'associe à des protéines non toxiques (NAPs) pour former des complexes de différentes tailles. Les gènes codant les BoNTs et NAPs sont regroupés sur le locus botulique et leur expression est contrôlée positivement par le facteur sigma alternatif BoTR/A. La toxinogénèse chez *C. botulinum* est contrôlée par un réseau complexe de régulateurs incluant au moins 3 systèmes à deux composants (TCS), identifiés par la méthode d'ARN antisens, qui régulent positivement la production de complexe botulique indépendamment de BoTR/A. D'autre part, l'entrée de BoNT/B dans la barrière intestinale a été suivie à l'aide du fragment HcB marqué en fluorescence dans une anse intestinale ligaturée de souris. Des analyses en microscopie à fluorescence, immunohistochimie et microscopie électronique ont permis de mettre en évidence que HcB transcytose à travers les entérocytes par une voie d'endocytose dépendante de la dynamine. HcB cible les terminaisons nerveuses acétylcholinergiques de la lamina propria des villosités et gagne les neurones acétylcholinergiques et sérotoninergiques de la sous-muqueuse et de la musculature en seulement 10 minutes. Une étude *in vitro* réalisée sur cellules intestinales (m-ICcl2) montre que l'entrée de HcB est dépendante de récepteurs gangliosidiques GD1b/GT1b présents à la surface des cellules mais pas de la synaptotagmine II qui est requise pour l'entrée de BoNT/B dans les cellules neuronales.

Mots clés : *Clostridium botulinum*, Neurotoxine Botulique, régulation, intestin, transcytose, récepteurs, cellules intestinales, cellules neuronales

Abstract : Botulinum neurotoxins (BoNTs), produced by *C. botulinum*, are responsible for animal and human botulism. In its natural form, botulism is mostly acquired after absorption of BoNTs in the digestive tract after ingestion of food contaminated with *C. botulinum* and its toxins. The intoxication can be divided in 4 major steps : toxin production, ingestion of food contaminated with BoNTs, passage of BoNTs through the intestinal barrier, and proteolytic activity on nerve endings. Regulation of toxin production and passage of BoNTs through the intestinal barrier are poorly understood. BoNT associates with non toxic protein (NAPs) to form complexes of various sizes. The BoNTs and NAPs genes are clustered in the botulinum locus and are positively regulated by an alternative sigma factor BotR/A. Toxinogenesis in *C. botulinum* is regulated by a complex regulatory network containing at least 3 two components systems (TCS), identified by antisens RNA strategy, which regulate the production of botulinum complex independently of BotR/A. On the other hand, BoNT/B entry was monitored with fluorescent HcB fragment in ligatureted mouse intestinal loop. Fluorescent imaging analysis, immunohistochemistry and electron microscopy, have evidence that HcB is transcytosed through enterocytes cells by an endocytosis dynamin dependant. HcB targets acetylcholinergic nerves localized in lamina propria of villi then reaches serotonergic and acetylcholinergic nerve endings in the submucosa and musculosa within 10 minutes. *In vitro* experiments performed on intestinal cell line (m-ICcl2) shows that the endocytosis of HcB is dependent on the GD1b/GT1b gangliosidic receptors on the cell surface but not on the synaptotagmine II protein which is requiered HcB entry in neuronal cells. **Key words : *Clostridium botulinum*, botulinum neurotoxin, regulation, intestine, transcytosis, receptors : intestinal cells, euronal cells.**
