



**HAL**  
open science

# Passage of botulinum neurotoxin across intestinal barrier

Aurélie Couesnon

► **To cite this version:**

Aurélie Couesnon. Passage of botulinum neurotoxin across intestinal barrier. Life Sciences [q-bio]. AgroParisTech, 2007. English. NNT : 2007AGPT0065 . pastel-00003461

**HAL Id: pastel-00003461**

**<https://pastel.hal.science/pastel-00003461>**

Submitted on 27 Feb 2008

**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.

# THÈSE

pour obtenir le grade de

**Docteur**

de

**l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement  
(Agro Paris Tech)**

Spécialité : Sciences pour les Industries Biologiques et Alimentaires

*présentée et soutenue publiquement  
par*

**Aurélie COUESNON**

**le 21 décembre 2007**

## **PASSAGE DE LA NEUROTOXINE BOTULIQUE A TRAVERS LA BARRIERE INTESTINALE**

*Directeur de thèse : M. Michel Robert POPOFF*

*Codirecteur(s) de thèse : M. Jean-Claude MEUNIER*

*Travail réalisé : Institut Pasteur, Unité des Bactéries Anaérobies et Toxines, F-75015 Paris.*

Devant le jury :

**M. Jean Claude MEUNIER, PR, INA-PG**  
**M. Bernard POULAIN, DR1, CNRS**  
**M. Daniel GILLET, PR, CEA**  
**M. Jordi MOLGO, DR, CNRS**  
**Mme Claire DANE, vétérinaire en chef, DGA**  
**M. Michel R. POPOFF, chef d'unité, INSTITUT PASTEUR**

**Président**  
**Rapporteur**  
**Rapporteur**  
**Examinateur**  
**Examinateur**  
**Directeur de thèse**

## *Remerciements*

୧୨୩୪୫୬୭୮୯୧୦୧୧୧୨୧୩୧୪୧୫୧୬୧୭୧୮୧୯୨୦

Je voudrais tout d'abord remercier le Dr. Michel Popoff pour m'avoir accueilli dans son équipe durant ces quatre années, me permettant ainsi de me plonger dans le monde de la recherche.

Je remercie également tous les membres de mon jury de thèse : le Pr. Jean-Claude Meunier qui a accepté de présider le jury, les Dr. Bernard Poulain et Daniel Gillet qui se sont investis en tant que rapporteurs, les Dr. Jordi Molgo et Claire Dane, les examinateurs de ma thèse.

Je remercie particulièrement Jordi Molgo de m'avoir accueilli dans son laboratoire à de nombreuses reprises, ainsi qu'Emmanuelle Girard et Cesare Colasante pour leur aide précieuse.

Je remercie également Andres Alcover, mon tuteur de thèse à l'Institut Pasteur, pour son écoute et ses conseils tout au long de ma thèse.

Je tiens à tirer un grand coup de chapeau à Maryse Gibert, « Cell Mother » pour les intimes, qui m'a beaucoup apporté, tant sur le plan professionnel qu'affectif. Toujours présente pour les autres, elle a le don de trouver les petits gestes qui font oublier les problèmes du quotidien. Des moments mémorables au laboratoire resteront gravés dans ma mémoire. Une pensée particulière à Claude Gibert, nommé dresseur en chef des assiettes.

Un grand merci à mon fidèle acolyte Yannick Pereira, plus connu sous le nom de YaYa, pour son soutien permanent et son écoute. Je salue son dévouement et son dynamisme au sein de l'équipe et le remercie pour tous les conseils précieux et les actes de générosité que Christophe et lui m'ont donné.

Let's not forget, "on the other side of the pond", Bradley Stiles or BraBra, who has been supporting me at distance for several years. In memory to our early coffee breaks and philosophical talks, bike ride and tennis games, and funny challenges of course...Many thanks to a very special American guy. I take my hat off to you !

Merci également aux étudiants qui ont déjà quitté le laboratoire mais qui ont partagé une partie de mon séjour.

Je pense notamment à Stéphanie Raffestin, qui m'a accueilli à mon arrivée et m'a familiarisé avec le campus de Pasteur. J'ai apprécié de travailler avec elle et je suis reconnaissante pour toutes les choses qu'elle m'a transmises et qui m'ont aidé dans mon apprentissage.

Je garde de bons souvenirs du passage de Gabriel David et je le remercie profondément de son écoute et de sa bonté, notamment en ce qui concerne certaines denrées.

Une pensée pour Manuela Lotierzo, avec qui nous avons passé de très bons moments, en particulier autour du chocolat.

Je remercie également tous les membres du laboratoire des Bactéries Anaérobies et Toxines, les filles du CNR, Guylène K'ouas, Maria Manich et Marie Bedora, ainsi que Christelle Mazuet, Blandine Geny, Oliver Knapp, Philippe Bouvet et Jean-Philippe Carlier.

Je n'oublie pas nos secrétaires successives, Mireille Ferrand, Laurette Lecarpentier, Marie-Aude Mainnemare, et Nathalie Hatchi que j'apprécie particulièrement pour sa gentillesse, sa spontanéité et sa disponibilité.

Une pensée pour le personnel du laboratoire de préparation qui nous permet de travailler dans les meilleures conditions, en particulier pour Françoise qui a partagé un certain nombre de pauses café matinales très sympathiques.

Je salue également Fred, le livreur spécialisé dans les bulles et les autocollants, pour sa bonne humeur et sa gentillesse.

Enfin je remercie ma famille de m'avoir soutenu et épaulé tout au long de ma thèse, en particulier ma mère et mon frère.

Une pensée toute particulière à ma meilleure amie, Sarah, qui a suivi mes tribulations dans la recherche au travers de nos discussions autour de délicieuses salades du chef.

୧୨୩୪୫୬୭୮୯୧୦୧୧୧୨୧୩୧୪୧୫୧୬୧୭୧୮୧୯୨୦

<b>1</b>	<b>L'agent du botulisme et ses armes létales, les neurotoxines botuliques .....</b>	<b>9</b>
1.1	Historique .....	9
1.2	Formes de botulisme .....	11
1.2.1	Intoxination botulique.....	11
1.2.2	Toxi-infection botulique.....	11
1.2.3	Botulisme par blessure.....	11
1.3	Manifestations cliniques et traitement du botulisme.....	13
1.4	Agent du botulisme : organisme et habitat .....	15
1.4.1	Caractéristiques physiologiques des <i>Clostridium</i> neurotoxinogènes .....	15
1.4.2	Classification des <i>Clostridium</i> neurotoxinogènes .....	15
1.4.3	Habitat des <i>Clostridium</i> neurotoxinogènes .....	17
1.5	Neurotoxines et complexes botuliques : organisation des protéines et des gènes associés .....	19
1.5.1	Formation des complexes botuliques.....	19
1.5.1.1	Découverte des complexes .....	19
1.5.1.2	Structure des complexes .....	21
1.5.1.3	Caractéristiques des BoNTs et des ANTPs .....	23
1.5.2	Structure des BoNTs .....	25
1.5.3	Diversité génétique des souches de <i>Clostridium</i> neurotoxinogènes.....	27
1.5.3.1	Caractéristiques des gènes du locus botulique.....	27
1.5.3.2	Localisation génomique et transfert de gènes du locus botulique .....	31
1.5.4	Organisation génétique du locus botulique .....	35
1.6	Régulation des gènes du locus botulique.....	39
<b>2</b>	<b>Interaction de la neurotoxine botulique avec l'intestin.....</b>	<b>43</b>
2.1	Description anatomique et fonctionnelle du tractus gastrointestinal des mammifères.....	43
2.2	Structure de la paroi intestinale .....	43
2.2.1	La muqueuse intestinale.....	45
2.2.1.1	Les villosités intestinales .....	45
2.2.1.2	Les cryptes intestinales.....	47
2.2.2	La sous-muqueuse .....	49
2.2.3	La musculature .....	51
2.2.4	La séreuse .....	51
2.3	Système nerveux entérique .....	53
2.3.1	Système nerveux entérique extrinsèque .....	53
2.3.2	Système nerveux entérique intrinsèque.....	55
2.3.3	Automatisme et contrôle nerveux de la motricité digestive .....	59
2.3.4	Le système glial entérique.....	63
2.4	Études <i>in vivo</i> de l'interaction de BoNT/A avec l'intestin .....	64
2.4.1	Mise en évidence d'une corrélation entre stabilité et toxicité des complexes botuliques.....	64
2.4.2	Passage de la neurotoxine à travers la barrière intestinale : voies transcellulaire et paracellulaire .....	66

<b>3</b>	<b>Liaison, entrée et trafic des neurotoxines botuliques dans les cellules neuronales et intestinales .....</b>	<b>69</b>
<b>3.1</b>	<b>Liaison des neurotoxines botuliques aux récepteurs cellulaires .....</b>	<b>71</b>
3.1.1	Les gangliosides .....	71
3.1.1.1	Liaison des BoNTs aux gangliosides .....	73
3.1.1.2	Liaison des hémagglutinines aux gangliosides .....	75
3.1.2	Les protéines impliquées dans la liaison des BoNTs aux cellules .....	77
3.1.2.1	Les synaptotagmines I et II .....	77
3.1.2.2	La protéine des vésicules synaptiques SV2 .....	79
<b>3.2</b>	<b>Voies d'entrée des BoNTs dans les cellules .....</b>	<b>85</b>
3.2.1	Organisation de la membrane plasmique en microdomaines .....	85
3.2.2	Principales voies d'entrée dans les cellules .....	87
3.2.2.1	Organisation des cellules épithéliales et du trafic endocytotique .....	89
3.2.2.2	Caractéristiques des voies d'endocytose .....	91
3.2.3	Internalisation et translocation des neurotoxines dans les cellules neuronales .....	95
3.2.3.1	Cycle des vésicules synaptiques .....	95
3.2.3.2	Internalisation de la neurotoxine tétanique .....	95
3.2.3.3	Internalisation de la neurotoxine botulique .....	97
3.2.3.4	Translocation des BoNTs dans le cytosol neuronal .....	97
3.2.4	Transport des BoNTs à travers les cellules intestinales .....	99
3.2.4.1	Mécanisme de la transcytose .....	99
3.2.4.2	Exemples de transcytose à travers des modèles de barrière intestinale .....	99
3.2.4.3	Mise en évidence du transport des complexes botuliques sur un modèle d'épithélium intestinal .....	103
<b>3.3</b>	<b>Activité enzymatique des BoNTs au niveau des terminaisons nerveuses .....</b>	<b>109</b>
<b>4</b>	<b>Résultats .....</b>	<b>115</b>
<b>4.1</b>	<b>Article n°1 : Expression des gènes des neurotoxines botuliques A et E et des gènes des protéines non toxiques associées pendant la transition de phase et stabilité à haute température : Analyse par PCR en temps réel en transcription inverse .....</b>	<b>115</b>
4.1.1	Résumé .....	115
4.1.2	Souches de <i>C. botulinum</i> utilisées .....	115
4.1.3	Quantification de l'expression des gènes du locus botulique et de la production de toxine .....	116
4.1.4	Stabilité des BoNTs et des ANTPs à température élevée .....	117
<b>4.2</b>	<b>Article n°2 : Transcytose médiée par récepteur de la neurotoxine botulique A à travers des monocouches de cellules intestinales .....</b>	<b>119</b>
4.2.1	Résumé .....	119
4.2.2	Choix du modèle de barrière intestinale et des lignées cellulaires .....	119
4.2.3	Transcytose de BoNT/A à travers les Caco-2 et les m-IC <sub>cl2</sub> .....	120
4.2.3.1	Caractéristiques du passage .....	120
4.2.3.2	Spécificité de BoNT/A .....	120
4.2.4	Caractérisation des récepteurs de BoNT/A sur les cellules intestinales ..	121
4.2.4.1	Spécificité de la liaison .....	121

4.2.4.2	Rôle des gangliosides .....	121
4.2.4.3	Rôle d'une protéine apparentée à SV2 .....	121
<b>4.3</b>	<b>Article n°3 : La neurotoxine botulique A passe à travers la muqueuse intestinale de souris et cible localement certaines terminaisons nerveuses .....</b>	<b>123</b>
4.3.1	Résumé.....	123
4.3.2	BoNT/A, injectée dans la lumière d'anses intestinales ligaturées, inhibe les contractions spontanées de l'iléum .....	123
4.3.3	Distribution des sites potentiels de liaison de Hc/A dans l'iléum de souris	124
4.3.4	Passage de la muqueuse et liaison de Hc/A aux cellules neuronales intestinales.....	124
4.3.5	Types de neurones ciblés par Hc/A et localisation de SV2C dans le système nerveux entérique .....	125
4.3.5.1	Cellules neuronales ciblées par le Hc/A dans la sous-muqueuse .....	125
4.3.5.2	Cellules neuronales ciblées par le Hc/A dans la musculature .....	125
4.3.5.3	Le récepteur neuronal SV2 de BoNT/A est exprimé par certaines cellules neuronales et gliales intestinales .....	125
<b>4.4</b>	<b>Article n°4 : La neurotoxine botulique A entre par des voies différentes dans les cellules neuronales et intestinales.....</b>	<b>127</b>
4.4.1	Résumé.....	127
4.4.2	Cinétique d'entrée de Hc/A dans les cellules neuronales (NG108-15) et dans les cellules intestinales (Caco-2 et m-IC <sub>cl2</sub> ) .....	127
4.4.3	Caractéristiques de la liaison de Hc/A à la membrane cellulaire .....	128
4.4.4	Voies d'entrée de Hc/A dans les cellules neuronales et intestinales.....	128
4.4.4.1	Une voie d'entrée de Hc/A dans les cellules intestinales est dépendante de Cdc42	129
4.4.4.2	L'internalisation de Hc/A est dépendante de la dynamine .....	129
<b>5</b>	<b>Discussion et perspectives .....</b>	<b>131</b>
<b>5.1</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>131</b>
5.1.1	L'expression synchrone des gènes de la neurotoxine botulique, des protéines associées et du régulateur BotR est finement régulée lors de la croissance bactérienne.....	131
5.1.2	BoNT/A passe la muqueuse intestinale par un mécanisme de transcytose qui a lieu préférentiellement au niveau des cryptes intestinales. ....	134
5.1.3	BoNT/A, injectée dans la lumière intestinale, cible préférentiellement des terminaisons nerveuses cholinergiques dans la sous-muqueuse et la musculature intestinale. ....	137
5.1.4	Les voies d'endocytose empruntées par le domaine Hc de BoNT/A diffèrent en partie dans les cellules neuronales et intestinales. ....	140
<b>5.2</b>	<b>Perspectives .....</b>	<b>142</b>
<b>6</b>	<b>Bibliographie .....</b>	<b>145</b>



## Abbréviations

5-HT	5-hydroxytryptamine
ACh	Acétylcholine
AEE	Endosome précoce apical
AFLP	Amplification sélective de fragments de restriction génomique
ANTP	Protéine non toxique associée
AP-180	Adaptator protein-180
AP-3	Adaptator protein-3
ARE	Endosome de recyclage péricentriolaire
ARF6	ADP-ribosylation Factor 6
BEE	Endosome précoce basal
BoNT	Neurotoxine botulique
BSLD	Lipase dépendante des sels de la bile pancréatique
Cdc42	Cell-division cycle-42
CE	Compartiment de recyclage commun supranucléaire
CER	Céramide
CGRP	Peptide alternatif du gène de la calcitonine
ChAT	Choline acétyl-transférase
CIC	Cellule interstitielle de Cajal
CMH I	Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I
CytoD	Cytochalasine D
DAF	Decay-accelerating factor
DL	Dose létale
DN	Dominant négatif
DO	Densité optique
DRM	Domaine résistant aux détergents
DTT	Dithiothréitol
Dyn	Dynamine
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
EEA1	Antigène 1 des endosomes précoces
EGF	Facteur de croissance épidermique
EGTA	Acide éthylène-glycol-tétraacétique
GalNAc	N-acétylgalactosamine
GAPDH	Glyceraldéhyde-3-Phosphate Déhydrogénase
GDNF	Facteur neurotrophique dérivé des cellules gliales
GEEC	Compartiment des endosomes précoces des GPI-AP
GFAP	Protéine fibrillaire acide gliale
GFP	Green fluorescent protein
GPI-AP	Protéines ancrées au glycosylphosphatidylinositol
GST	Glutathione-S-Transférase
H	Chaîne lourde des BoNTs ou de TeNT
HA	Hémagglutinine
Hc	Moitié C-terminale de H
Hc/A	Moitié C-terminale de H de BoNT/A
Hn	Moitié N-terminale de H
Ig	Immunoglobuline
i.p.	Intrapéritonéale

IPAN	Neurone afférent primaire intrinsèque
i.v.	Intraveineuse
Jas	Jasplakinolide
k.o.	Knock out
L	Chaîne légère des BoNTs ou de TeNT
LacCer	Lactosylcéramide
LatA	Latrunculine A
LDL	Lipoprotéines de faible densité
M $\beta$ CD	Méthyl- $\beta$ -CycloDextrine
NE	Norépinéphrine
NeuAc	Acide sialique ou neuraminique
NO	Monoxyde d'azote
NTNH	Composant non toxique non hémagglutinant
OL	Onde lente
Orf	Phase ouverte de lecture
P	Parasympathique
PFO	Perfringolysine
PPMP	DL-threo-1-phényl-2-palmitoylamino-3-morpholino-1-propanol
PSE	Plexus sous-muqueux externe
PSI	Plexus sous-muqueux interne
REB	Rythme électrique de base
S	Sympathique
SOM	Somatostatine
SNAP-23	Protéine associée aux synaptosomes de 23 kDa
SNAP-25	Protéine associée aux synaptosomes de 25 kDa
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptor
SP	Substance P
S-S	Pont disulfure
SV2	Synaptic vesicle two
SV2C/L4	Boucle extracellulaire n°4 de l'isoforme C de SV2
SVOP	Synaptic vesicle two-related protein
Syp	Synaptophysine
Syt	Synaptotagmine
TeNT	Neurotoxine tétanique
TER	Résistance trans-épithéliale
TH	Tyrosine hydroxylase
TMR	Région transmembranaire
UEA1	Agglutinine d' <i>Ulex europaeus</i> de type 1
VAMP-2	Protéine membranaire associée aux vésicules 2 (ou synaptobrevine)
v-ATPase	Pompe à protons vésiculaire
v-GLUT1/2	Transporteur de glutamate vésiculaire 1/2
VIP	Vasoactive intestinal peptide
VMAT-2	Transporteur vésiculaire de monoamine 2

## Préambule

**Le sujet de mon travail de thèse a porté sur la neurotoxine botulique (BoNT), une toxine très puissante et spécifique de certaines terminaisons nerveuses. Sa sélectivité et son efficacité en ont fait un agent de choix dans diverses applications, que ce soit à des fins thérapeutiques ou terroristes.**

Le fait que la BoNT soit une toxine, c'est-à-dire un composé toxique produit par des organismes vivants, des bactéries anaérobies du genre *Clostridium*, implique que sa synthèse est contrôlée par un certain nombre de paramètres intrinsèques et extérieurs.

Les bactéries neurotoxigènes sont présentes dans l'environnement, le plus souvent sous la forme de spores qui est leur forme de résistance. Ce ne sont pas des bactéries invasives, mais elles peuvent proliférer, notamment dans les aliments ou les cadavres en décomposition, et produire les BoNTs. D'autres composés non toxiques, les ANTPs (Associated Non-Toxic Proteins), sont trouvés en association avec les BoNTs.

Les premières étapes de l'intoxication botulique comprennent tout d'abord la production de BoNT et des ANTPs par les souches neurotoxigènes, qui peut avoir lieu dans un aliment ou dans le tractus gastrointestinal, puis le passage de la toxine à travers la barrière intestinale suivi de son cheminement jusqu'aux neurones cibles.

Mon travail de thèse a porté sur l'étude de ces deux premières étapes, à savoir la régulation de la toxigenèse et le franchissement de la muqueuse intestinale. Une meilleure compréhension de leurs mécanismes permettrait de développer de nouvelles stratégies de prévention du botulisme.

**La synthèse des BoNTs et des ANTPs est très régulée, notamment selon les phases de croissance des bactéries et sous l'influence de divers signaux externes de l'environnement.**

**La première partie de mon travail de thèse a donc consisté en l'étude de la régulation de la production des BoNTs au cours de la croissance de deux souches de *C. botulinum*.**

Le premier chapitre de mon introduction présente les formes et les symptômes de la maladie causée par les BoNTs, le botulisme. Trois voies d'acquisition du botulisme ont été décrites : la contamination de blessure par des *Clostridium* neurotoxigènes, l'ingestion d'aliments contaminés par la toxine (intoxication) et/ ou les bactéries neurotoxigènes (toxi-infection). Puis les microorganismes neurotoxigènes et leur classification selon les types de toxine botulique produits sont décrits.

Les différentes formes de complexes entre les BoNTs et les ANTPs ainsi qu'une présentation succincte de la structure et du mécanisme d'action des BoNTs sont exposés. Ce dernier point est détaillé dans la troisième partie de l'introduction.

La diversité des souches clostridiennes neurotoxigènes et le support génétique des BoNTs et des ANTPs sont ensuite présentés, avant d'introduire les acteurs de la régulation de la toxigenèse.

**Dans les cas d'intoxication ou de toxi-infection botulique, un passage de la toxine au niveau de l'intestin a été supposé.**

**L'interaction des complexes botuliques avec la muqueuse intestinale est le deuxième thème abordé lors de ma thèse. Pour cela, j'ai essayé de visualiser le trafic des neurotoxines botuliques au niveau de l'intestin de souris, dans un modèle de cas d'intoxication alimentaire.**

Tout d'abord, une description de l'anatomie et du fonctionnement de l'intestin est exposée. La composition de la muqueuse intestinale, qui constitue la barrière entre les milieux externe et interne, et du système nerveux entérique est plus précisément détaillée. Puis un historique de la détection de la toxine dans la lymphe et le sang, suite à son injection dans le lumen intestinal, est rapporté, avec une attention particulière sur l'implication des ANTPs dans ce passage.

**Enfin, si le mécanisme d'action intracellulaire de BoNT au niveau des cellules neuronales est de mieux en mieux connu, la manière dont cette toxine passe la barrière épithéliale intestinale pour atteindre sa cible reste obscure.**

**Je me suis donc intéressée à l'interaction entre la neurotoxine botulique et les cellules neuronales ou intestinales, en essayant de comparer entre ces deux types cellulaires les étapes de liaison et de trafic intracellulaire de BoNT.**

Dans la dernière partie de l'introduction, la caractérisation des récepteurs impliqués dans la reconnaissance des cellules neuronales et intestinales par les différents types de BoNTs et les ANTPs est relatée. Puis un panel des voies d'endocytose est dépeint et les éléments connus sur l'entrée des neurotoxines dans les cellules neuronales sont détaillés. La manière dont les BoNTs passent dans le cytosol neuronal est décrite succinctement, alors que le mécanisme de transcytose, c'est-à-dire le transport de molécules dans des structures vésiculaires d'un côté à l'autre de la cellule, est plus précisément détaillé. Les expériences de transcytose des BoNTs et des ANTPs réalisées sur des modèles cellulaires de barrière intestinale sont présentées. Enfin, le mécanisme d'action intracytosolaire des BoNTs, c'est-à-dire l'expression de l'activité enzymatique qui est à l'origine des symptômes de paralysie flasque observée au niveau de l'organisme, est décrit. La spécificité des types de BoNTs pour leur(s) cible(s) ainsi que le rôle majeur de ces dernières dans la transmission nerveuse sont mis en valeur.

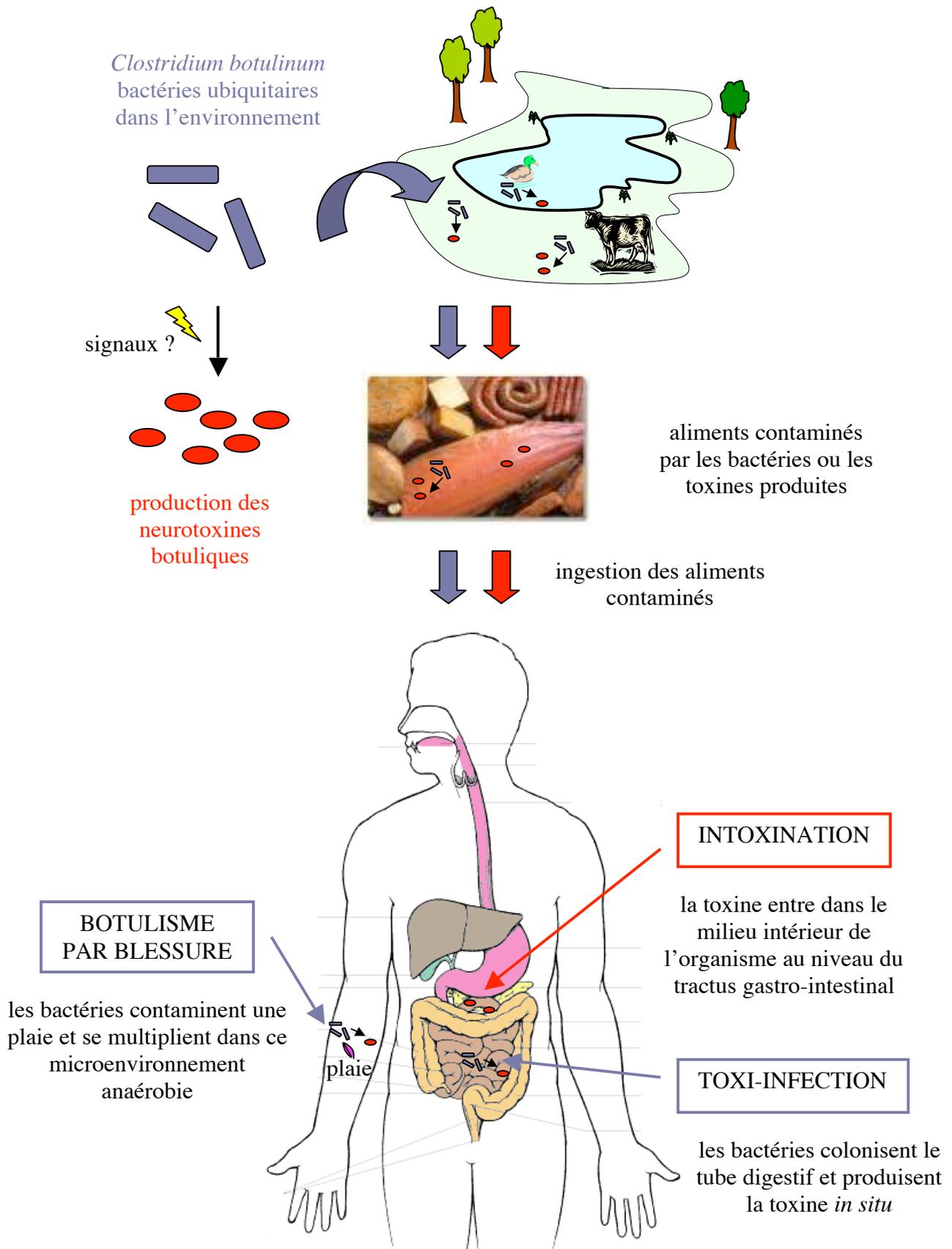
# 1 L'agent du botulisme et ses armes létales, les neurotoxines botuliques

## 1.1 Historique

Le botulisme et le tétanos sont deux maladies neuronales sévères affectant l'homme et les animaux dues à l'action des neurotoxines botuliques (BoNTs) et tétanique (TeNT) (Bielinski *et al.*) respectivement. Ces toxines sont produites par des bactéries anaérobies appartenant au genre *Clostridium*, respectivement *C. botulinum* et *C. tetani*.

Le botulisme se traduit par des paralysies flasques et est le plus souvent d'origine alimentaire. Le terme botulisme provient du mot latin « botulus », signifiant saucisse, et le premier cas probable a été décrit dans un document indien du 15-16<sup>ème</sup> siècle relatant la préparation d'un toxique, sans doute la toxine botulique, à partir du contenu intestinal de mouton. Les premiers cas d'intoxications alimentaires pourraient avoir été signalés par des médecins allemands en 1735 et le nombre de cas d'« empoisonnements à la saucisse » augmente à la fin du 18<sup>ème</sup> siècle. La première description détaillée des symptômes du botulisme est rapportée en 1817 par l'Allemand Justinus Kerner qui comptabilise 150 cas dont 80 mortels entre 1820 et 1822. Il ne réussit cependant pas à définir le « poison biologique », mais développe déjà l'idée d'une utilisation thérapeutique potentielle de la toxine. Les recherches s'orientent alors vers la présence de toxiques pouvant se former dans les saucisses ou présents dans les épices ou condiments. Dès 1833, des similarités sont notées entre les cas d'intoxications aux saucisses en Allemagne et celles dues aux poissons fumés consommés dans certaines régions de Russie. Le nombre d'intoxications causées par les poissons augmente en Allemagne. La nature bactérienne de cette affection ainsi que la toxine botulique ont été identifiées à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle. En 1895, presque un siècle après les travaux de Kerner, un cas de botulisme dû à la consommation de jambon fumé lors d'un dîner funéraire aboutit à la découverte par Emile Pierre van Ermengem du pathogène *Clostridium botulinum*, une bactérie anaérobie toxigène isolée à partir du jambon consommé d'une part, et d'autre part de l'intestin et de la rate d'une des trois victimes (Weinberg *et al.*, 1937; Niemann, 1991; Bigalke and Shoer, 2000).

Le tétanos est également une affection nerveuse, mais qui se caractérise par une paralysie spastique, c'est-à-dire des contractions des muscles squelettiques, et son origine est le plus souvent une contamination par blessure. Sa dénomination provient du mot grec τετανος qui se traduit par rigidité ou tension. Cette maladie, caractéristique sur le plan clinique, a été rapportée dès les premiers écrits de médecine. Ainsi, Hippocrate, médecin grec de l'Antiquité (environ 470 - 360 av. J.-C., île de Kos) décrit un syndrome d'hypercontraction généralisée chez un marin qui mourût sept jours après l'apparition des symptômes. Carle et Rattone montrèrent que le tétanos était une maladie transmissible due à une bactérie, décrite par Nicolaïer comme un bacille long et mince. Rosenbach et Flugge retrouvèrent en 1886 le même bacille dans la plaie d'un homme mort de tétanos et notèrent des formes sporulées ressemblant à des épingles à grosse tête ou à des baguettes de tambour. *Clostridium tetani* fut isolé pour la première fois en 1889 par Kitasato à partir d'une plaie de malade.



**Fig. 1** Schéma des voies d'acquisition du botulisme.

## 1.2 Formes de botulisme

La toxine à l'origine du botulisme peut être acquise par trois voies différentes (cf. Fig. 1) (Sugiyama, 1980). La plus classique, l'intoxication alimentaire, est principalement due à la toxine préformée dans l'aliment ingéré. Dans le cas d'une toxi-infection, à l'origine du botulisme infantile, la toxine est produite *in vivo* lors de la croissance intraintestinale des microorganismes. Enfin le botulisme par blessure est causé par la toxine formée *in vivo* dans une plaie.

### 1.2.1 Intoxication botulique

L'intoxication botulique a lieu suite à l'ingestion d'aliments dans lesquels des bactéries toxigènes se sont multipliées et ont produit de la neurotoxine botulique en quantité suffisante. Cette toxine préformée est à l'origine à elle seule de l'ensemble des symptômes du botulisme, d'où le terme d'intoxication. La dose létale chez l'homme adulte est estimée à environ 70 µg par voie orale pour la neurotoxine botulique de type A.

### 1.2.2 Toxi-infection botulique

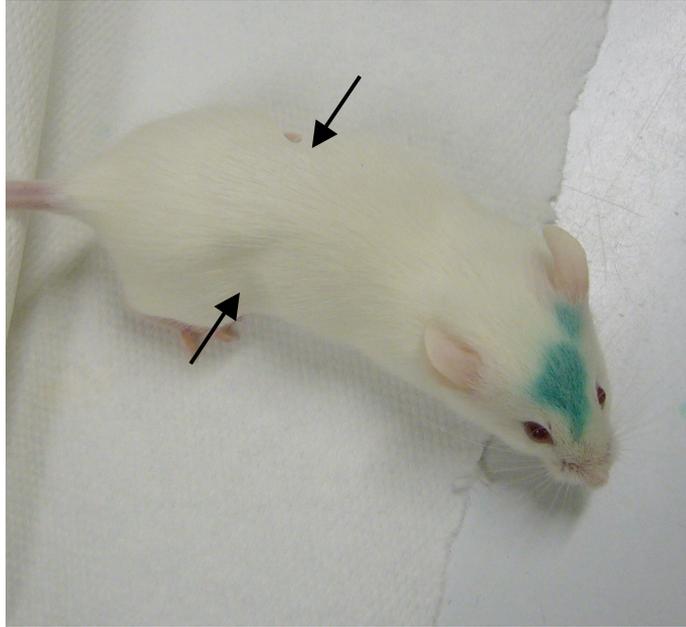
La toxi-infection est due à la colonisation de l'intestin par *C. botulinum* suite à l'ingestion de formes végétatives ou sporulées qui, dans certaines circonstances, peut s'accompagner d'une multiplication bactérienne et de la production de toxine dans le contenu intestinal. Elle est à l'origine du botulisme infantile qui affecte plus particulièrement les enfants en bas âge (moins d'un an) mais certains adultes sont également atteints. Une flore digestive immature pourrait permettre l'implantation et le développement de *Clostridium* neurotoxigènes chez les jeunes enfants. Chez les adultes, une chirurgie intestinale, une antibiothérapie, l'inflammation ou les lésions chroniques de l'intestin seraient des facteurs prédisposant à la croissance de *C. botulinum* dans le tube digestif.

### 1.2.3 Botulisme par blessure

Les plaies profondes avec une faible ouverture sur l'extérieur constituent un environnement favorable au développement de bactéries anaérobies tels *C. botulinum* et *C. tetani*. De plus, la présence de tissu nécrosé, suite à une contusion par exemple, assure un apport de nutriments stimulant la croissance des *Clostridium* qui sont des bactéries non invasives. Cette forme de botulisme, plutôt rare, est en recrudescence chez les toxicomanes soit par l'utilisation de matériel contaminé lors des injections soit par la présence de spores dans les drogues.

En France, le botulisme est une maladie à déclaration obligatoire depuis 1986 et le nombre de cas annuel est assez constant (10 à 27). Traditionnellement, l'origine était la consommation de jambon salé non cuit ou de charcuteries familiales. Mais les habitudes alimentaires ont sensiblement changé. La consommation de conserves familiales a régressé au profit d'aliments d'origine commerciale et la prise de repas en restauration se fait plus fréquente, ce qui complique l'investigation de l'origine des nouveaux cas de botulisme.

Le tétanos n'est acquis que par blessure, les voies d'intoxication ou de toxi-infection n'ayant jamais été décrites.



**Fig. 2** Photo de souris prise 24 h après l'injection intrapéritonéale d'une dose sub-létale de neurotoxine botulique. Notez la silhouette efflanquée (flèches) témoignant la détresse respiratoire de la souris. L'animal a également des difficultés à se déplacer. (Couesnon, non publié)

### 1.3 Manifestations cliniques et traitement du botulisme

L'incubation de la maladie est variable. Généralement de 12 à 72 h, elle peut atteindre 8 j dans certains cas. Les symptômes du botulisme sont similaires, quelque soit le mode d'acquisition (intoxication alimentaire, toxi-infection ou contamination de plaies) et suivent en général une séquence temporelle identique. Ils débutent souvent par une dysautonomie afébrile comprenant troubles oculaires (défaut d'accommodation, diplopie, mydriase), dysfonctionnements du système nerveux autonome (sécheresse de la bouche et des yeux, difficulté de déglutition, atonie intestinale, constipation) et parfois troubles digestifs (nausées, douleurs abdominales, vomissement...). Les formes les plus graves se traduisent par une faiblesse, voire une paralysie, descendante symétrique affectant en premier les muscles innervés par les nerfs craniaux, puis du cou, des membres et enfin du diaphragme. Le système nerveux central est très rarement atteint (observation de signes pyramidaux) et ce phénomène apparaît en condition expérimentale suite à une injection massive de BoNT dans les muscles.

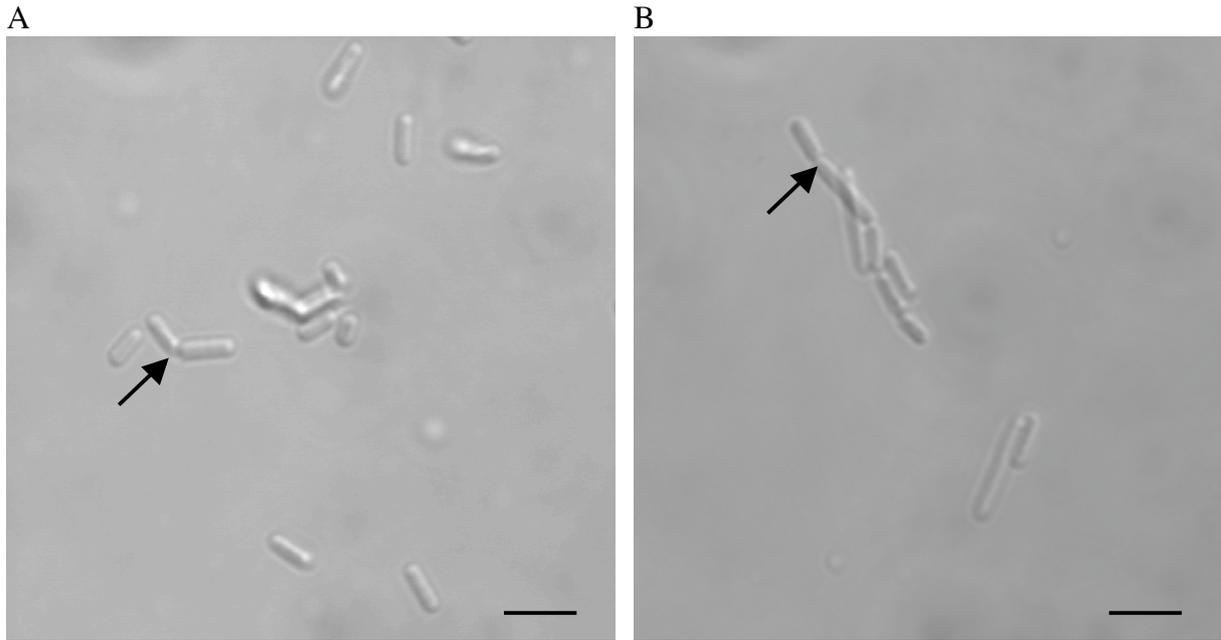
L'identification du botulisme repose sur le diagnostic de cette affection chez le patient et sur l'investigation de l'aliment à l'origine de la contamination. L'intoxication botulique s'accompagne souvent d'une toxémie, c'est-à-dire la présence de toxine botulique dans le sang. Plus sensible que les méthodes immuno-chimiques de type ELISA, le test le plus utilisé pour la détection des BoNTs dans le sérum est le test de létalité sur souris (cf. Fig. 2). Les titres en BoNT dans le sérum des malades est de l'ordre de 0,5 à 4 doses létales souris (DL, voie intrapéritonéale, i.p.) par millilitre (1 DL = 2 à 4 pg de BoNT/A). D'autres tests basés sur l'activité biochimique spécifique des BoNTs sont en cours de développement.

Dans les formes de toxi-infections de botulisme, le *Clostridium* neurotoxigène et la toxine botulique sont présents dans le contenu intestinal et les selles du patient. L'isolement et l'identification des *Clostridium* neurotoxigènes par les méthodes standard de bactériologie sont complexes et peu fiables du fait que les bactéries sont anaérobies strictes avec des phénotypes variés. La détection est donc souvent réalisée par amplification génique (PCR) d'un fragment du gène de la neurotoxine à partir d'une culture d'enrichissement d'un échantillon.

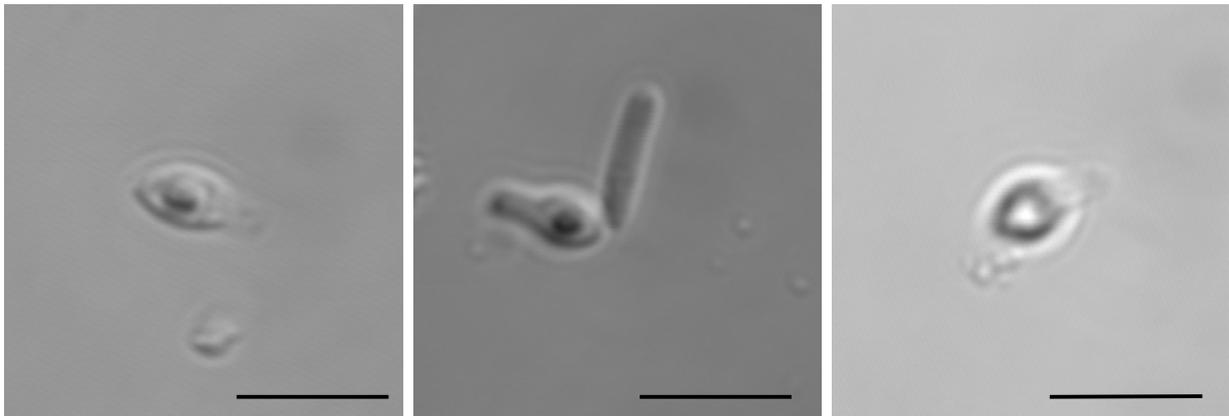
Le traitement du botulisme est le plus souvent symptomatique et consiste essentiellement en une assistance respiratoire. Dans les cas les plus graves, une trachéotomie est réalisée et le séjour en réanimation peut durer jusqu'à plusieurs semaines. Le traitement spécifique est basé sur la sérothérapie, à savoir l'administration d'anticorps préparés chez le cheval contre les BoNTs. La neutralisation est restreinte à la toxine circulante et ne concerne pas la toxine liée ou internalisée au niveau du tissu nerveux. La sérothérapie ne serait donc efficace que si elle est opérée précocement (dans les premières 24h) après l'apparition des symptômes, même si la demi-vie des anticorps injectés est de 5 à 8 j. Par ailleurs, ce traitement a l'inconvénient d'induire chez certains patients (environ 10%) des réponses allergiques.

L'antibiothérapie (notamment pénicillines) est recommandée dans les toxi-infections botuliques et le botulisme par blessure.

Certains composés capables de stimuler la libération d'acétylcholine aux jonctions neuromusculaires, comme les aminopyridines ou la guanidine, ont été largement utilisées avec des effets variables selon les cas. En outre, le traitement par la guanidine s'accompagne parfois d'effets secondaires comme aplasie médullaire, néphrite, arythmie, dysfonctionnement hépatique ou convulsions.



**Fig. 3** Photos en contraste de phase des formes végétatives de la souche Hall de *C. botulinum* de type A (A) et de la souche CN655 de *C. tetani* (B). Noter les cellules en division pas encore séparées (flèche). (Barre = 5 µm) (Couesnon, non publié)



**Fig. 4** Photos en contraste de phase de formes sporulées de la souche NCTC2916 de *C. botulinum* de type A. Notez la forme en raquette de tennis de la bactérie en sporulation et la réfringence de la spore. (barre = 5 µm) (Couesnon, non publié)

La souche Hall est la souche de référence pour le type A, mais ne sporule pas très efficacement. La souche NCTC1916 est communément utilisée au laboratoire pour la production de complexes botuliques et a la particularité de bien sporuler.

## 1.4 Agent du botulisme : organisme et habitat

### 1.4.1 Caractéristiques physiologiques des *Clostridium* neurotoxigènes

Les *Clostridium* sont des bacilles à Gram positif, sporulés et anaérobies stricts. Ces bactéries sont très communes dans l'environnement où elles participent à la dégradation de la matière organique, comme la décomposition de cadavres et de végétaux. Les spores, formes de résistance à divers stress environnementaux telle la chaleur, la sécheresse, les radiations, l'exposition à l'oxygène ou à de nombreux agents dénaturants, assurent la survie des bactéries dans des conditions hostiles pendant de longues périodes. Ce sont des bactéries fermentaires qui sécrètent de nombreuses enzymes hydrolytiques capables de dégrader de nombreux substrats. Parmi plus de 150 espèces de *Clostridium* décrites, une quinzaine produit de puissantes toxines responsables de pathologies graves chez l'homme et les animaux. *C. botulinum* produit des toxines paralysantes de type flasque et *C. tetani* une toxine contracturante. Les *Clostridium* neurotoxigènes sont des bacilles de 0,3 à 0,6 µm de largeur et 3 à 12 µm de longueur (cf. Fig. 3), celle-ci variant considérablement selon le stade de la culture (phase exponentielle de croissance ou stationnaire). Pour plupart des souches, les bacilles sont très mobiles grâce à une ciliature péritriche. La forme sporulée est très caractéristique, avec une extrémité très élargie du fait de la présence d'une spore ronde de grande taille en position terminale ou subterminale selon les souches (cf. Fig. 4). Ainsi, *C. tetani* est souvent comparé à une baguette de tambour et la forme sporulée *C. botulinum* de type A ressemble à une raquette de tennis. Les conditions optimales et le taux de sporulation varie selon les souches, mais en général la sporulation débute vers 24 h de culture. Chez *C. tetani*, la sporulation a lieu à 37°C mais pas à des températures supérieures à 41°C alors que chez une souche de *C. botulinum* B la sporulation serait favorisée à 25°C et faible à 35°C (Peck *et al.*, 1995). Les signaux extérieurs déclenchant la sporulation restent méconnus.

### 1.4.2 Classification des *Clostridium* neurotoxigènes

En 1910 Leuchs décrivit que la toxine produite par deux souches de *C. botulinum* (celle responsable d'un cas de botulisme en Allemagne dû à des haricots et celle isolée par van Ermengem) pouvaient être distinguées par neutralisation différentielle à l'aide d'antisera spécifiques. En 1919, la désignation des types A et B de la toxine botulique fût établie à partir de cas de botulisme aux Etats-Unis (E.-U.) et le type C établi à partir de cas de botulisme chez des poulets aux Etats-Unis et du bétail en Australie. En Afrique du Sud, une souche à l'origine d'un cas de botulisme chez le bétail proche du type C mais produisant une toxine immunologiquement distincte fût désignée D par Meyer et Gunnison. *C. botulinum* de type E fut découvert en 1934 suite à deux cas de botulisme dus à la consommation de poisson. Le type F fut isolé en 1960 à partir d'un pâté de foie à l'origine d'une intoxication botulique puis le type G dans les sols argentins (cf. Tab. 1) (Hatheway, 1990). On distingue donc sept types de neurotoxines botuliques (A à G) selon leurs propriétés antigéniques qui sont produites par diverses espèces de *Clostridium*, contrairement à *C. tetani* qui ne produit qu'un seul type de neurotoxine, TeNT, mais ayant les mêmes propriétés pharmacologiques. Les *Clostridium* neurotoxigènes présentent des caractéristiques bactériologiques très hétérogènes. La position taxonomique des espèces de *C. botulinum* était initialement basée sur un seul phénotype, c'est-à-dire la production d'une BoNT. D'autres souches non toxiques, bien que génétiquement reliées à *C. botulinum*, furent désignées comme appartenant à d'autres espèces comme *C. sporogenes* ou *C. subterminale*. Puis des différences physiologiques entre les différentes souches de *C. botulinum* furent mises en évidence, mais la production des différentes BoNTs ne corrèle pas nécessairement avec ces phénotypes.

Type	Date	Pays	Espèces victimes du botulisme (sources)
A/B	1919	E.-U.	Homme (conserves de légumes et fruits familiale) Cheval (fourrage)
C	1922	E.-U. Australie	Poulet Bétail
D	1928	Afrique du Sud	Bétail
E	1934	E.-U. Ukraine	Homme (conserves de hareng) Homme (poisson)
F	1960	Danemark	Homme (pâté de foie)
G	1970	Argentine	∅ (sol)

**Tab. 1** Historique de la découverte des différents types de souches de *C. botulinum*. Notez que la première souche de *C. botulinum* a été isolée en 1895 par E.P. van Ermengem. D'après (Hatheway, 1990).

Type	Réservoir principal	Zone géographique de prédominance
A	Sol	Partie Ouest des E.-U. Amérique du Sud Chine
B	Sol	Partie Est des E.-U. Europe
E	Sédiments marins Sédiments d'eau douce Contenu intestinal des poissons et autres animaux marins	Régions Nord : <ul style="list-style-type: none"> <li>• de l'Amérique du Nord (Alaska, Canada)</li> <li>• de l'Europe (Scandinavie,..)</li> <li>• de l'Asie et du Japon</li> </ul>
C/D	Cadavres d'animaux Contenu intestinal d'animaux	Régions tropicales Régions tempérées en saison chaude

**Tab. 2** Principaux réservoirs et répartition géographique globale des souches de *C. botulinum* selon les types. D'après (Popoff, 1995)

Les espèces de *C. botulinum* ont donc été divisées en quatre groupes physiologiques (Smith and Sugiyama, 1977) :

- Groupe I : *C. botulinum* A, et souches protéolytiques de *C. botulinum* B (Bp) et F
- Groupe II : *C. botulinum* E, et souches glucidolytiques de *C. botulinum* B (Bnp) et F
- Groupe III : *C. botulinum* C et D
- Groupe IV : *C. botulinum* G ou *C. argentinense*.

Il faut noter que chacun des quatre groupes contient des souches non toxigènes qui ne sont pas différenciables des souches toxigènes d'après leurs caractères biologiques. De plus, certaines souches appartenant à d'autres espèces de *Clostridium* (*C. butyricum* et *C. baratii*) sont capables de produire des BoNTs (types E et F respectivement).

Par ailleurs, certaines souches de *C. botulinum* produisent d'autres toxines que les neurotoxines. En effet, certaines souches de type C et D produisent une entérotoxine nommée C<sub>2</sub>, toxine binaire ayant une activité ADP-ribosylante à l'origine d'une augmentation de la perméabilité vasculaire et de nécrose intestinale, ou l'exoenzyme C<sub>3</sub> qui a également une activité ADP-ribosylante mais n'a pas d'effet sur les cellules intactes. Par ailleurs, *C. tetani* produit une hémolysine appelée tétanolysine qui est fonctionnellement et sérologiquement apparentée à la streptolysine O et à d'autres hémolysines produites par d'autres *Clostridium*. Son rôle dans l'infection par *C. tetani* reste à déterminer.

### 1.4.3 Habitat des *Clostridium* neurotoxigènes

L'habitat des souches neurotoxigènes est comme pour le reste des *Clostridium* l'environnement. Les *Clostridium* neurotoxigènes sont largement distribués dans le sol et les sédiments aquatiques. Si la forme sporulée leur permet de persister sur de longues durées et de résister à diverses agressions de l'environnement, la germination des spores et la division bactérienne n'ont lieu qu'en conditions anaérobies et en présence suffisante de nutriments.

Les groupes de *C. botulinum* ont un profil différent de répartition géographique résumé dans le tableau 2 (Popoff, 1995).

Les types A et B sont préférentiellement trouvés dans les échantillons de sol avec une prédominance de A dans la partie Ouest des E.-U., en Amérique du Sud et en Chine, et une prévalence de B dans la partie Est des E.-U. et en Europe.

Le type E, qui a la particularité de se multiplier à basse température (2-3°C), est souvent présent dans les sédiments marins et d'eau douce, ainsi que dans le contenu intestinal des poissons et mammifères marins des régions Nord de l'Europe du Nord (Alaska, Canada, Scandinavie, régions Nord de l'Europe, de l'Asie et du Japon).

Les types C et D, dont la température optimale de croissance se situe entre 30 et 40°C et qui sont exigeants en matière organique, sont localisés principalement dans les régions tropicales et les régions tempérées en saison chaude, les animaux morts de botulisme ou porteurs de *C. botulinum* dans leur tube digestif étant les principaux réservoirs de ces bactéries.

*C. butyricum* et *C. baratii* sont largement répandues dans l'environnement (sol, sédiments, surface des végétaux, végétaux en décomposition, contenu intestinal de l'homme et des animaux sains) mais la distribution des souches neurotoxigènes reste mal connue.

*C. tetani* est une bactérie ubiquitaire présente dans les sols de toutes les parties du monde. Selon des enquêtes réalisées au Japon, au Canada, au Brésil et aux E.-U., la fréquence de sa présence varie de 30 à 42%. Il est aussi communément trouvé dans les fèces humains et animaux, mais ne fait pas partie de la flore normale de l'intestin.

*L'agent du botulisme est une bactérie anaérobie sporulée de l'environnement appartenant au genre Clostridium, et ayant la capacité de produire des neurotoxines différenciables selon leurs propriétés antigéniques en 7 types (A à G).*



## 1.5 Neurotoxines et complexes botuliques : organisation des protéines et des gènes associés

Contrairement à la neurotoxine tétanique, les neurotoxines botuliques (BoNTs) sont sécrétées dans le surnageant de culture en association avec des protéines non toxiques (ANTPs) et forment des complexes de taille variable. Les études sur la génétique des *Clostridium* toxigènes menées dans les années 90 ont mis en évidence la présence d'un locus botulique, une région spécifique du matériel génétique qui concentre les gènes des BoNTs et des ANTPs. L'organisation génétique de ce locus a été décrite et les différents gènes ont été clonés à partir de souches représentatives de tous les types de *C. botulinum*. Le génome d'une souche de type A, nommée Hall (ATCC3502), a récemment été séquencé et annoté (Sebahia *et al.*, 2007). La régulation de la toxinogénèse commence à être élucidée.

### 1.5.1 Formation des complexes botuliques

#### 1.5.1.1 Découverte des complexes

Historiquement, lors des premières tentatives de purification des neurotoxines à partir de surnageant de culture, des complexes furent isolés et considérés en premier lieu comme de la neurotoxine purifiée. La première avancée fut l'obtention de cristaux hautement toxiques à partir de culture de *C. botulinum* de type A, identifiés par des tests physicochimiques comme étant des entités de 900 kDa environ (Lamana, 1960; DasGupta and Sugiyama, 1977). Puis la découverte d'une activité hémagglutinante des cristaux sur des érythrocytes, sans modification du titre toxique, démontra qu'ils contenaient plus d'une espèce (Lamanna and Lowenthal, 1951).

L'utilisation des méthodes de chromatographie à échange d'ions permit de déterminer avec plus de précision la composition de ces complexes (DasGupta and Boroff, 1968). Sur une colonne Sephadex, un gradient de NaCl permit d'éluer deux pics protéiques :

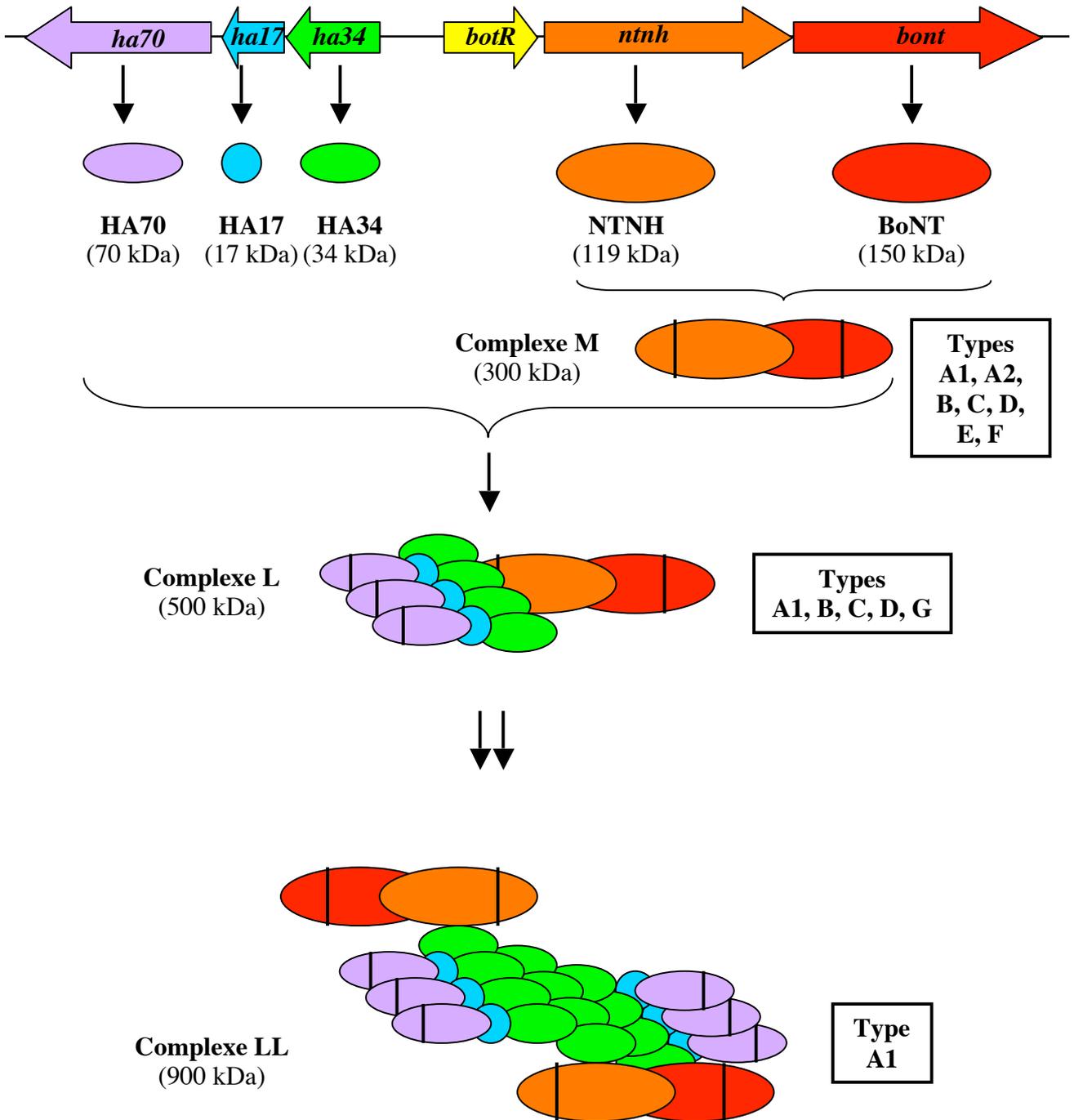
- Un pic représentant environ 20% des protéines de l'échantillon total contenant un composé toxique de 150 kDa ayant un coefficient de sédimentation de 7 (7S),
- Un pic de faible toxicité ayant une activité hémagglutinante.

L'élucidation de la structure de complexes de type B et E a évolué de la même manière que pour le type A. Ainsi des préparations apparemment homogènes de type B contiennent des unités d'environ 500 kDa pour le type B et 350 kDa pour le type E.

Les techniques de filtration sur gel appliquées au surnageant de culture de *C. botulinum* de type A ont permis de séparer différentes formes de complexe :

- LL (très grande taille) : 900 kDa ou 19S
- L (grande taille) : 450 - 500 kDa ou 16S
- M (moyen) : 300 - 350 kDa ou 12S.

Gènes codant pour les protéines des complexes botuliques pour le type A



**Fig. 5** Schéma de la composition des complexes botuliques de différentes tailles. Les neurotoxines botuliques (BoNTs) sont associées par des liaisons non covalentes à une ou plusieurs protéines non toxiques associées (ANTPs) selon les toxinotypes. Les ANTPs comprennent des hémagglutinines (HAs) de différentes tailles (indiquées par le chiffre situé à la suite des initiales) et un composé non toxique non hémagglutinant (NTNH). Les BoNTs et les ANTPs forment des complexes de moyenne (M), grande (L) ou très grande (LL) taille. La barre verticale présente sur BoNT, NTNH et HA70 indique un clivage protéolytique spécifique de ces protéines.

### 1.5.1.2 Structure des complexes

L'état naturel des neurotoxines botuliques (dans les cultures bactériennes ou les aliments contaminés) est sous forme de complexe. La plupart des surnageants de culture ne contiennent qu'un seul type de complexes, mais certains en ont plusieurs.

Ils sont composés de l'association par de liaisons non covalentes de la neurotoxine botulique (BoNT) à tout ou partie des quatre protéines non toxiques associées (ANTPs) (cf. Fig. 5) :

- BoNT associée au composé non toxique non hémagglutinant NTN<sub>H</sub> forme le complexe de taille moyenne (M)
- Le complexe M en association avec plusieurs hémagglutinines (HAs), à savoir trois molécules HA<sub>70</sub> et HA<sub>17</sub>, et quatre molécules HA<sub>34</sub>, forme le complexe de grande taille (L)
- Deux complexes L associées entre eux avec huit molécules HA<sub>34</sub> supplémentaires forment les complexes de très grande taille (LL).

Les complexes M sont produits par tous les types de *Clostridium* neurotoxino-gènes alors que les complexes de grande taille ne sont produits que par les types A1, B, C, D et G, les types A2, E et F ne produisant pas d'hémagglutinines mais sécrétant d'autres protéines (OrfX). La fonction des OrfX et leur implication dans la formation de complexes avec BoNT et NTN<sub>H</sub> ne sont pas connues.

Le type A1 est le seul à produire des complexes de très grande taille (LL).

Les conditions de culture déterminent quels types de complexes sont produits (Sugii *et al.*, 1977a). Si les toxicités relatives des différents types de complexe sont similaires par injection intrapéritonéale, on observe une toxicité plus importante des complexes de plus grande taille par voie intragastrique.

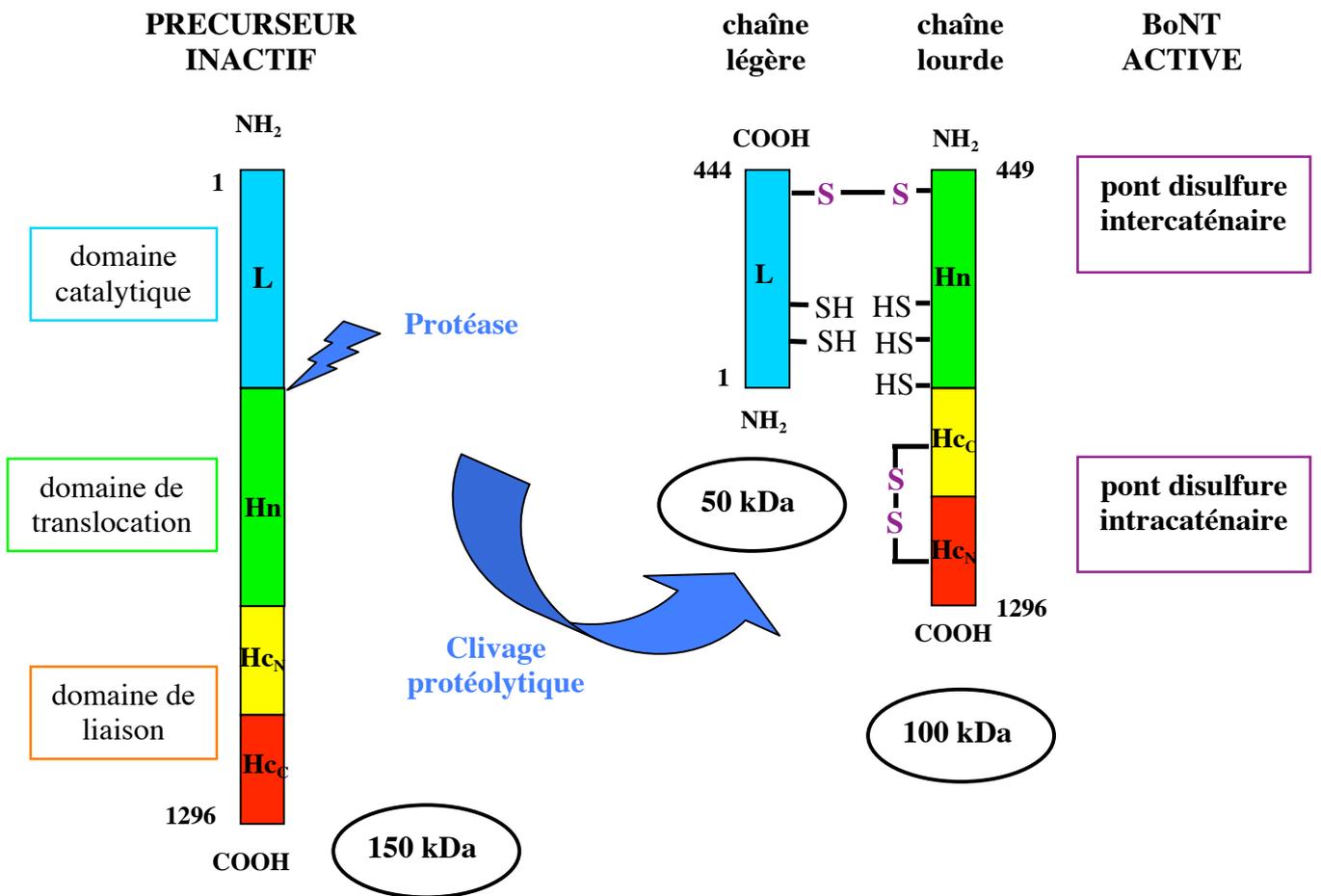
Ainsi les toxicités relatives à BoNT seule des complexes :

- M : L : LL de type A sont 1 : 12 : 20 : 360
- M : L de type B sont 1 : 20 : 16000 (Ohishi *et al.*, 1977).

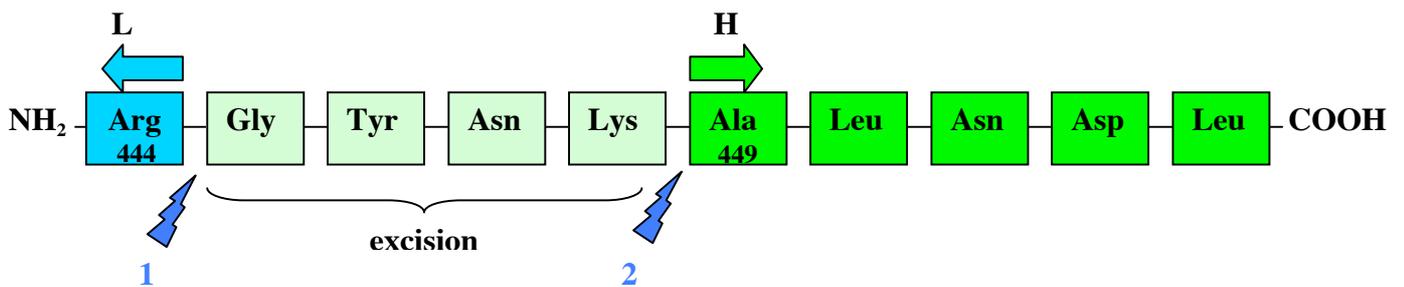
De même, si on injecte *ex vivo* des complexes de différentes tailles dans des duodénus ligaturés de rat, la quantité de toxine active qui passe dans la lymphe est plus importante avec les complexes de grande taille (Sugii *et al.*, 1977b). La résistance à l'inactivation a également été testée *in vitro* en incubant des complexes à pH acide, à 37°C, ou en présence de protéases (pepsine, pancréatine, jus gastrique ou intestinal) (Sugii *et al.*, 1977a). Ils montrent la résistance des complexes M en comparaison avec la toxine pure. Cette différence est probablement due à la protection de la toxine par les ANTPs qui préviennent l'inactivation de la toxine par les protéases gastriques et intestinales. L'absence de protéines associées à la neurotoxine tétanique pourrait expliquer l'inexistence d'intoxications alimentaires dues à *C. tetani*.

La composition des complexes détectés dans le sang et la lymphe d'animaux ayant ingéré des aliments contaminés reste débattue. Le rôle des ANTPs dans les étapes suivant le passage dans l'intestin n'a pas encore été clairement établi et est discuté dans la deuxième partie de l'exposé.

*Les neurotoxines botuliques (BoNTs) s'associent par des liaisons non covalentes aux protéines non toxiques associées (ANTPs) qui comprennent le composant non toxique non hémagglutinant (NTN<sub>H</sub>) et les hémagglutinines (HAs). Ils forment des complexes de différentes tailles (M, L, LL) selon les types de souches de C. botulinum.*



**Fig. 6A** Schéma de la structure des BoNTs : exemple du type A. La protéine précurseur inactive est clivée par une protéase (endogène ou exogène selon les souches) en une chaîne légère et une chaîne lourde qui restent liées par un pont disulfure intercaténaire (S-S). À la structure tripartite correspond une répartition fonctionnelle des BoNTs.



**Fig. 6B** Schéma des sites de coupure de BoNT/A entre la chaîne lourde et la chaîne légère. La protéase clostridienne endogène ou la trypsine coupe la BoNT/A monocaténaire au niveau de la liaison peptidique formée par le groupement carboxyl de l'Arginine 444 (1), avant de clivée la liaison Lys-Ala (2) à une vitesse inférieure. L'excision des 4 acides aminés Gly-Tyr-Asn-Lys aboutit à la chaîne lourde mature. D'après (DasGupta and Dekleva, 1990).

### 1.5.1.3 Caractéristiques des BoNTs et des ANTPs

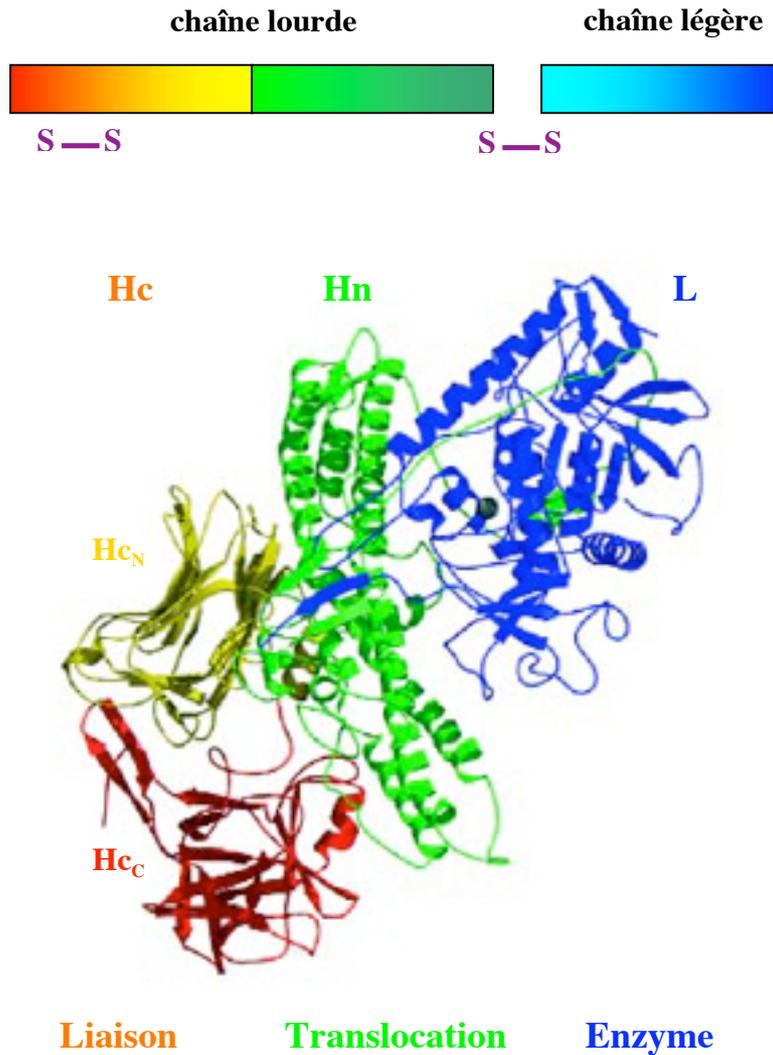
Les BoNTs sont produites sous la forme d'une seule chaîne peptidique de 150 kDa peu ou pas toxiques. Leur séquence ne présente pas de peptide signal et le mécanisme de sécrétion reste mal connu. Le clivage des protéines précurseurs en deux fragments de 50 kDa (chaîne légère L en N-terminal) et 100 kDa (chaîne lourde H en C-terminal) permet l'activation des BoNTs (cf. Fig. 6B). Ce clivage est réalisé après le résidu arginine 444, soit par les protéases endogènes sécrétées par la bactérie, soit par des protéases exogènes (comme la trypsine) présentes dans le tractus digestif et agissant suite à l'ingestion de la toxine (cf. Fig. 6B) (DasGupta and Dekleva, 1990).

Les souches protéolytiques de type A, B et F produisent une protéase, ayant une spécificité de substrat de type trypsine, détectée dans les surnageants de culture. La protéase responsable de l'activation de BoNT/A a été isolée et caractérisée chez la souche Hall (Dekleva and DasGupta, 1990). L'activité de cette protéase est dépendante d'agents réducteurs et d'ions divalents comme le calcium, optimale à température élevée (70°C) et très spécifique pour les liaisons amide arginyl. Le séquençage du génome de la souche Hall a révélé la présence d'une séquence (CBO1920) codant pour une protéine ayant 74% d'homologie avec une  $\alpha$ -clostripaine de *C. histolyticum* qui a été caractérisée comme étant une endopeptidase de type trypsine ayant une spécificité de substrat pour les liaisons arginyl, ce qui suggère que ce gène code pour la protéine responsable de l'activation chez Hall isolée par Dekleva et DasGupta (Sebahia *et al.*, 2007).

Les protéines NTNH, de taille variant de 120 à 139 kDa, existent sous forme clivée (libération d'une protéine de 15 kDa environ) dans les complexes M ou sous forme non clivée dans les complexes L et LL des types ayant des hémagglutinines. Chez les types E et F, les complexes sont uniquement constitués de forme M issue de l'association de BoNT et d'un NTNH plus court que dans les autres types, présentant une délétion au niveau du site d'activation et probablement de liaison aux HAs (Fujita *et al.*, 1995). Par ailleurs BoNT/G ne semble pas former de complexe M, même si NTNH/G possède la région du site de clivage, avec une séquence légèrement différente.

HA70 est également clivée en deux protéines HA52 (C-terminal) et HA21,5 par des protéases de type trypsine. HA52 est homologue dans sa partie N-terminale à l'entérotoxine CPE de *C. perfringens*, mais aucune fonction commune n'a été décrite (Inoue *et al.*, 1996).

Si la fonction de la protéine HA17 reste inconnue, HA34 est l'hémagglutinine la mieux caractérisée actuellement. Des tests *in vitro* ont montré qu'elle est très résistante à diverses protéases (trypsine, chymotrypsine, pepsine) et protège la toxine de la dégradation (Fu *et al.*, 1997). Elle aurait également un rôle dans le passage de la toxine à travers la barrière intestinale (Fujinaga *et al.*, 1997; Fujinaga *et al.*, 2000; Inoue *et al.*, 2001; Fujinaga *et al.*, 2004; Matsumura *et al.*, 2007). Ceci sera discuté ultérieurement.



**Fig. 7** Modèle en rubans de la structure tridimensionnelle de BoNT/A. La structure tripartite des BoNTs reflète l'organisation fonctionnelle en trois domaines impliqués dans différentes étapes de l'intoxication. La moitié C-terminale de la chaîne lourde (Hc, en rouge-orangé) est impliquée dans la liaison de la toxine aux cellules. La moitié N-terminale (Hn, en vert) est responsable de la translocation de la chaîne légère (L, en bleu) qui détient l'activité enzymatique de métalloprotéase à Zn<sup>2+</sup>. D'après (Lacy *et al.*, 1998)

### 1.5.2 Structure des BoNTs

Les structures tridimensionnelles de BoNT/A (Lacy *et al.*, 1998; Lacy and Stevens, 1999) et BoNT/B (Hanson and Stevens, 2000; Swaminathan and Eswaramoorthy, 2000) ont montré une organisation des toxines en 3 domaines structuraux bien distincts (cf. Fig. 7) :

- La chaîne légère (L), qui détient l'activité enzymatique de métalloprotéase dépendante du zinc avec son motif His-Glu-X-X-His
- La moitié C-terminale de la chaîne lourde (Hc), impliquée dans la liaison aux cellules et l'internalisation de la toxine
- La moitié N-terminale de la chaîne lourde (Hn), responsable de la translocation de la chaîne légère dans le cytosol.

Les chaînes L et H restent liées par un pont disulfure (S-S) et des liaisons non covalentes stabilisent la structure. Un pont disulfure intracaténaire est également présent au niveau du domaine Hc. Ces ponts disulfures jouent un rôle important car leur réduction, au dithiothreitol (DTT) par exemple, induit une perte quasi complète de la toxicité extracellulaire (Sugiyama *et al.*, 1973).

Lorsque le pont disulfure intercaténaire n'est pas réduit, le site actif porté par la chaîne légère est masqué par l'extension N-terminale de Hn qui empêche son accès au substrat. L'activité intracellulaire de la toxine dépend donc de sa réduction. La chaîne L est plus ou moins conservée selon les types (32 à 44% d'analogie, 53 à 70% de similitude) (Niemann, 1991).

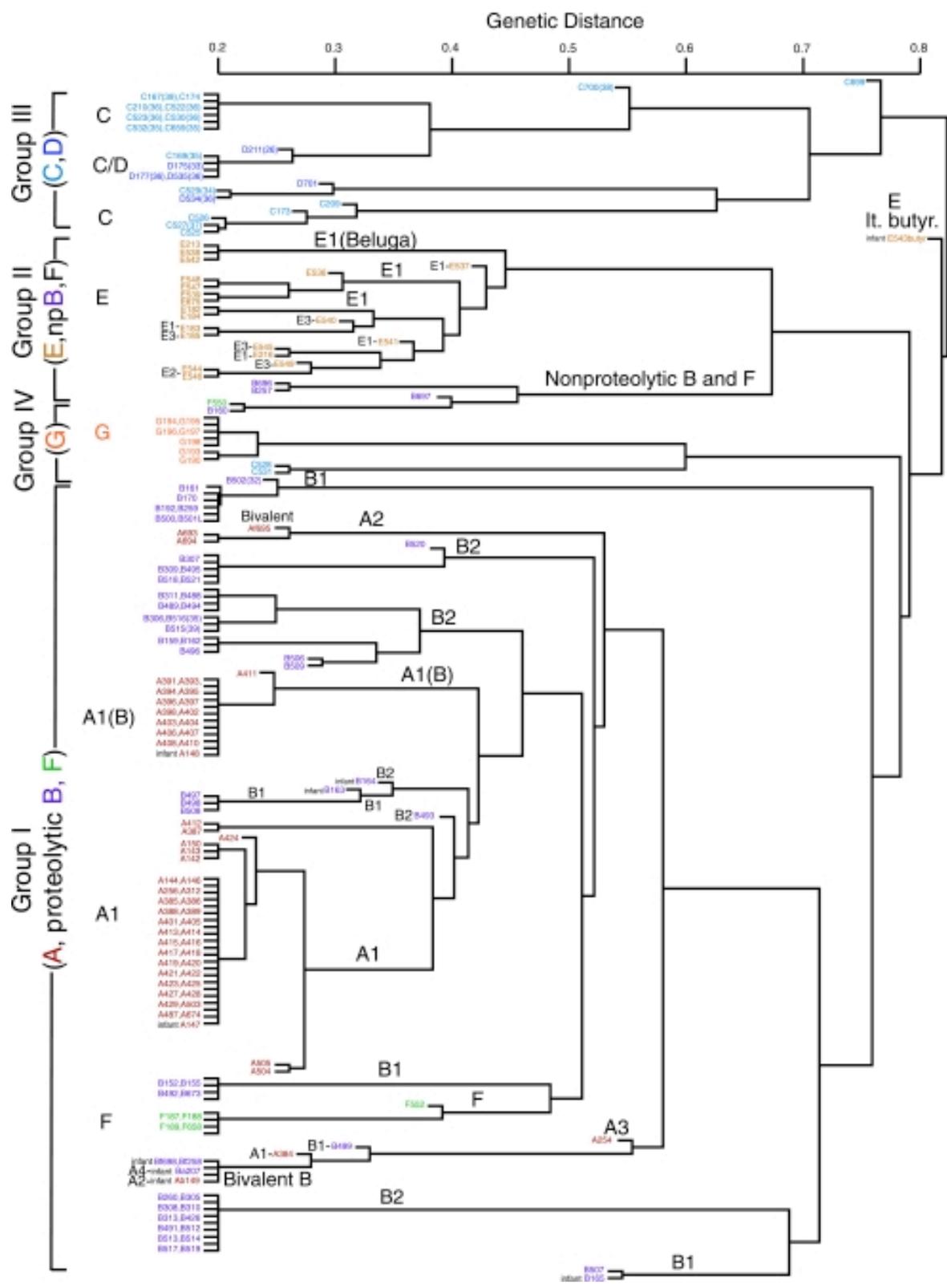
La région Hn, impliquée dans l'insertion dans les membranes et la translocation de L dans le cytosol, a une forme cylindrique et contient deux longues hélices alpha entourant la chaîne légère et plusieurs hélices alpha courtes. Elle a une structure similaire à de nombreuses protéines de fusion virales qui changent de conformation à pH acide. Elle est très conservée dans les différents types (34 à 75% d'analogie, 57 à 85% de similitude) ce qui suggère un mécanisme commun de passage dans le cytoplasme (Niemann, 1991).

Enfin, le domaine Hc est nécessaire et suffisant à la liaison des BoNTs aux cellules neuronales notamment (Lalli *et al.*, 1999). Le Hc est structuré en deux sous-domaines :

- Hc<sub>N</sub> : de type lectine et de fonction encore inconnue, assez conservé selon les types (24 à 42 % d'analogie, 41 à 60% de similitude)
- Hc<sub>C</sub> : présentant une forte variabilité selon les types et ayant des domaines de liaison aux gangliosides (16 à 31% d'analogie, 24 à 41% de similitude).

Ces deux sous-domaines sont nécessaires à la liaison des BoNTs aux cellules et la variabilité observée permet d'expliquer en partie la spécificité de liaison des différents types de toxines. Le rôle du Hc dans l'interaction avec les cellules est détaillé dans la troisième partie de l'introduction.

*BoNT est une protéine de 150 kDa synthétisée sous la forme d'un précurseur monocaténaire inactif clivé par une protéase en deux chaînes liées par un pont disulfure. Elle est structurée en trois domaines fonctionnels : la chaîne légère (L) portant l'activité enzymatique, le domaine C-terminal (Hc) de la chaîne lourde (H) impliqué dans la liaison aux récepteurs cellulaires et le domaine N-terminal de H (Hn) permettant la translocation de L dans le cytosol.*



**Fig. 8** Dendrogramme basé sur l'analyse AFLP de 174 souches de *C. botulinum*. La comparaison des profils montre une séparation nette entre les souches protéolytiques (groupe I) et non protéolytiques (groupes II, III et IV) ainsi que les branches représentant les différents groupes de I à IV. Les groupes déduits de l'AFLP contiennent généralement des sérotypes distincts. D'après (Hill *et al.*, 2007).

### 1.5.3 Diversité génétique des souches de *Clostridium neurotoxinogènes*

#### 1.5.3.1 Caractéristiques des gènes du locus botulique

Tout d'abord, il faut noter que les séquences nucléotidiques des gènes clostridiens présentent une grande richesse en A ou T, avec un pourcentage de GC variant de 24,5 à 27,8. Le pourcentage de GC des gènes des BoNTs et des ANTPs est semblable à celui des autres gènes du génome des *Clostridium*, ce qui laisse supposer une origine clostridienne des gènes des neurotoxines ou d'un organisme dont le génome a également un bas pourcentage de GC.

Des alignements de séquences entre les gènes du locus botulique de la souche Hall et ceux d'autres souches de *C. botulinum* ont été réalisés (Zhang *et al.*, 2003).

Leur comparaison montre :

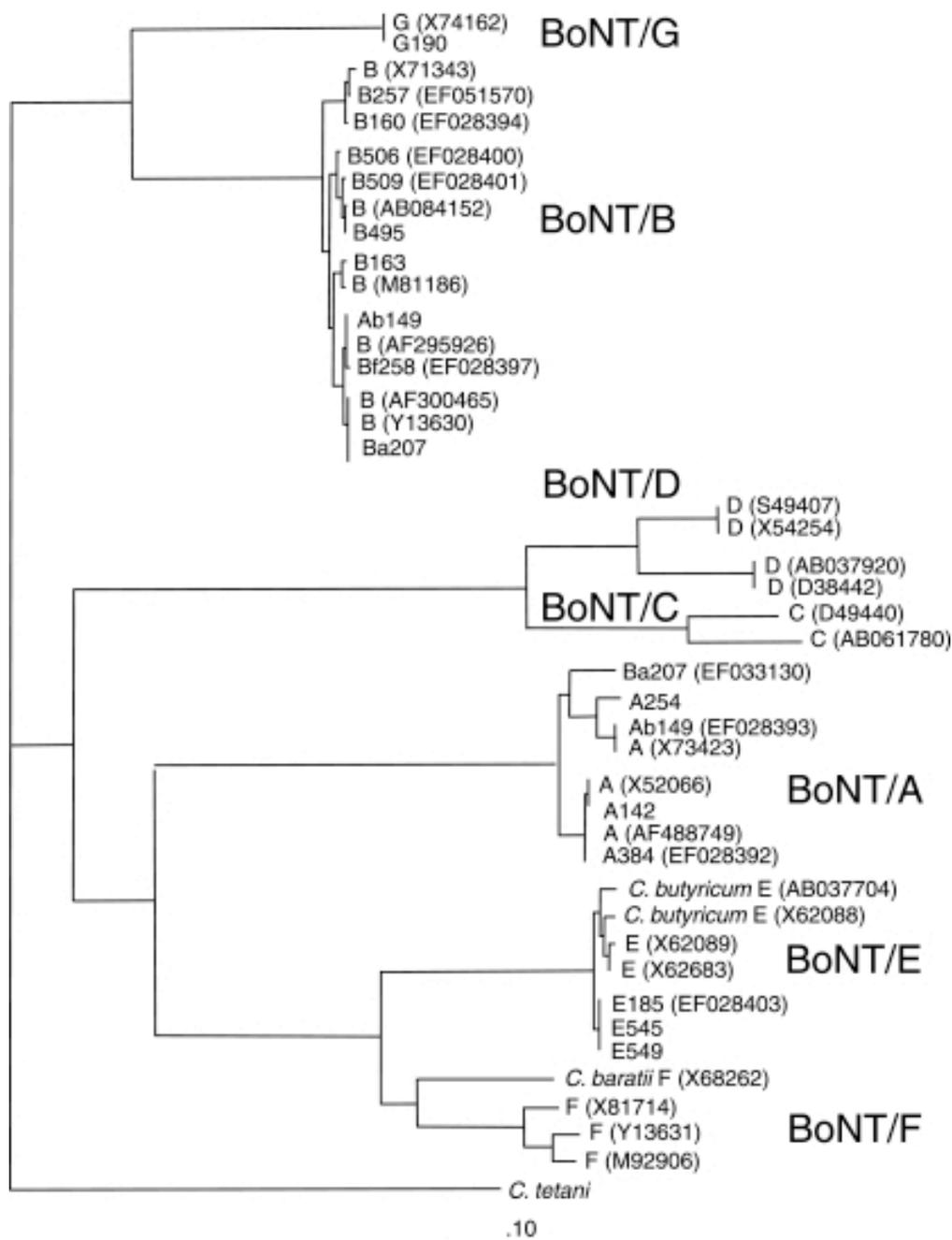
- pour tous les gènes : une forte identité entre les souches de type A (95-100%) mais plus faible avec les autres sérotypes, en particulier pour le gène *bont* (30-39%)
- pour NTNH et HA70, qui sont les plus conservées : 65 à 87% d'identité selon les sérotypes
- pour HA34, la moins conservée : une forte identité de HA34/A avec HA34/B (90%) mais beaucoup plus faible (35%) avec HA34/C et /HA34/D
- pour HA17 et BotR : le schéma est similaire à HA34, avec une identité un peu plus élevée du type A avec les C et D (50 à 60%).

Une étude récente, basée sur l'analyse de diverses souches de *Clostridium* par amplification sélective de fragments de restriction génomique (AFLP) et séquençage des gènes de l'ARN16S et des BoNTs, a permis d'étudier la diversité génétique au sein des ces espèces. La comparaison des séquences du gène de l'ARN16S dans différentes souches de *C. botulinum* a abouti à une répartition en quatre clusters correspondant aux quatre groupes physiologiques (I à IV) décrit précédemment.

Par ailleurs, le dendrogramme issu de l'analyse par AFLP (cf. Fig. 8) sépare nettement les souches :

- protéolytiques :
  - groupe I : A, Bp, F
- non-protéolytiques :
  - groupe II : Bnp, E et F
  - groupe III : C et D
  - groupe IV : G

De plus les souches produisant BoNT/C, /D, /Fp ou /G sont groupées par sérotype de toxine au sein des groupe alors que les souches représentant les différents sous-types de A et B présentent une plus large diversité et ne sont pas clairement différenciées par l'analyse AFLP.



**Fig. 9** La comparaison des séquences du gène *bont* entre les 7 toxinotypes montre une relation entre les sérotypes différente de celle établie par l'analyse AFLP. D'après (Hill *et al.*, 2007)

Par ailleurs, la comparaison des séquences des *bonts* (cf. Fig. 9) a mis en évidence :

- Trois clusters distincts :
  - BoNT/A, /E et /F
  - BoNT/B et /G
  - BoNT/C et /D
  
- Plusieurs sous-types :
  - quatre sous-types de *bont/A*, dont deux nouveaux sous-types représentés par les souches Loch Maree (A257, sous-type A3) et 657Ba (sous-type A4)
  - quatre sous-types de *bont/B*, dont un regroupant les non protéolytiques (Bnp)
  - cinq sous-types de *bont/E*.

Les relations entre les gènes des BoNTs sont donc différentes de celles basées sur la séquence du gène de l'ARN16S et de l'analyse AFLP, suggérant que le gène de la toxine a évolué séparément dans les différents fonds génomiques. Cette phylogénie discordante suggère des transferts de gènes entre les différentes espèces clostridiennes (Hill *et al.*, 2007).

Il ne faut pas oublier que la diversité génétique peut également refléter une distribution géographique différente des souches ainsi que leur implication dans divers événements épidémiologiques. Ainsi les séquences des toxines BoNT/A, /B ou /E impliquées dans des cas de botulisme infantile diffèrent fréquemment des autres séquences du groupe et forment des clusters uniques au sein des sérotypes (Hill *et al.*, 2007).

La signification de la variabilité de séquence des BoNTs reste encore mal connue mais elle peut avoir de l'importance dans la mise au point d'outils de diagnostic ou de traitement du botulisme, notamment ceux basés sur des méthodes immunologiques. Par exemple les toxines BoNT/A1 et /A2 qui diffèrent de 10% au niveau des séquences en acides aminés ont une affinité de liaison aux anticorps différente (Smith *et al.*, 2005). Cette différence doit être prise en compte dans le développement d'anticorps neutralisants, monoclonaux ou polyclonaux, et impose de tester leur pouvoir protecteur sur la gamme de sous-types.

Les différences de séquence nucléotidique pourraient avoir un impact sur l'activité biologique des BoNTs et des études structurales et fonctionnelles vont permettre de mieux comprendre les relations entre variabilité et activité des BoNTs.

*Comme pour le reste du génome clostridien, le pourcentage en GC des gènes des BoNTs et des ANTPs est très bas. Les analogies entre les types de Clostridium neurotoxigènes sont variables selon les gènes des complexes botuliques. La classification des souches à partir de la comparaison des séquences de l'ARN16S reflète leurs caractéristiques physiologiques (protéolytiques ou non) et une certaine homogénéité au sein des types de Clostridium neurotoxigènes. A l'inverse, la comparaison des séquences des gènes des BoNTs conduit à une classification différente de la précédente et montre une certaine hétérogénéité au sein de chaque type de Clostridium neurotoxigène.*

Micro-organismes	Neurotoxines	Localisation génomique	Références
<i>C. tetani</i>	TeNT	plasmide	(Eisel <i>et al.</i> , 1986) (Fairweather and Lyness, 1986)
<i>C. botulinum</i> A1	BoNT/A1	chromosome	(Binz <i>et al.</i> , 1990b) (Thompson <i>et al.</i> , 1990)
<i>C. botulinum</i> A2	BoNT/A2	chromosome plasmide	(Willems <i>et al.</i> , 1993) (Marshall <i>et al.</i> , 2007)
<i>C. botulinum</i> Bp	BoNT/B	chromosome plasmide	(Whelan <i>et al.</i> , 1992b) (Marshall <i>et al.</i> , 2007)
<i>C. botulinum</i> Bnp	BoNT/B	chromosome	(Whelan <i>et al.</i> , 1992b) (Hutson <i>et al.</i> , 1994)
<i>C. botulinum</i> C	BoNT/C1	phage	(Hauser <i>et al.</i> , 1990) (Kimura <i>et al.</i> , 1990)
<i>C. botulinum</i> D	BoNT/D	phage	(Binz <i>et al.</i> , 1990a)
<i>C. botulinum</i> E	BoNT/E	chromosome	(Whelan <i>et al.</i> , 1992a) (Poulet <i>et al.</i> , 1992)
<i>C. butyricum</i>	BoNT/E	chromosome	(Poulet <i>et al.</i> , 1992)
<i>C. botulinum</i> Fp	BoNT/F	?	(Elmore <i>et al.</i> , 1995)
<i>C. botulinum</i> Fnp	BoNT/F	?	(East <i>et al.</i> , 1992)
<i>C. baratii</i>	BoNT/F	?	(Thompson <i>et al.</i> , 1993)
<i>C. argentinense</i>	BoNT/G	plasmide	(Campbell <i>et al.</i> , 1993)

**Tab. 3** Localisation génomique des gènes des neurotoxines.

### 1.5.3.2 Localisation génomique et transfert de gènes du locus botulique

Le génome de la souche Hall de type A comprend un chromosome d'environ 3,9 Mb et un plasmide de 16 kb, avec un pourcentage de GC de 28,2 et 26,8 respectivement.

Le locus botulique est situé sur différents éléments du génome selon les espèces et les souches de *Clostridium* neurotoxigènes (cf. Tab. 3) :

- Sur le chromosome pour les types A, B, E et F
- Sur un phage pour les types C et D
- Sur un plasmide pour le type G (et certaines souches de type A et B)

Des plasmides ou des bactériophages sont parfois détectés chez les types A, B, E et F, mais ne sont en général pas associés à la toxicité. Cependant, il a été récemment montré que chez deux souches de *C. botulinum* de type A, Loch Maree et 657Ba, les gènes codant les BoNTs étaient localisés sur de grands plasmides (Marshall *et al.*, 2007). Le fait que ces gènes soient situés sur des éléments extrachromosomiques a d'importantes implications sur l'évolution de la neurotoxigenèse chez les *Clostridium*, notamment sur l'origine, l'expression et la mobilité latérale des *bonts*.

Il a été clairement montré que pour les types C et D les gènes *bonts* étaient portés par des bactériophages. En effet, les souches curées de leurs phages ne produisent plus de BoNT/C ou /D, mais continuent à produire la toxine C<sub>2</sub>. Elles peuvent être à nouveau converties en souches toxigéniques de type C ou D par réinfection avec des phages obtenus à partir de souches toxigéniques. Les similarités et les combinaisons de gènes observées entre les différents *bonts* suggèrent une dérive et un transfert des gènes à partir d'un ancêtre commun. Les souches bivalentes produisant deux types de BoNTs ainsi que les souches possédant un gène *bont* silencieux indiquent un transfert latéral de gène. De plus, des dérivés non toxigéniques ont été isolés dans certains toxinotypes comme *C. botulinum* B (Yamakawa *et al.*, 1997), démontrant une instabilité des éléments génomiques porteurs des gènes *bonts*. La génétique des *Clostridium* reste mal connue et l'on suppose que ces transferts ont eu lieu par l'intermédiaire d'éléments mobiles (Minton, 1995).

#### Les plasmides

Les gènes *bont/G* et *tent* ont été localisés sur des plasmides de grande taille chez *C. tetani* et *C. argentinense* (Finn *et al.*, 1984; Eklund *et al.*, 1988).

Leur transfert peut être réalisé par la mobilisation des plasmides correspondants. La conjugaison et la mobilisation de grands plasmides ont été observées chez des *Clostridium* comme *C. perfringens* (Brefort *et al.*, 1977) mais seuls des variants non toxigéniques (sans plasmide) de *C. tetani* et *C. argentinense* ont été obtenus. Le séquençage de la souche Hall de type A a mis en évidence la présence d'un plasmide de petite taille, pBOT3502, contenant des séquences codant notamment pour un système de biosynthèse et de transport dédié à la production d'une bactériocine qui pourrait constituer un avantage compétitif à la souche. De plus, la découverte récente de souches de *C. botulinum* de type A et B portant les gènes des neurotoxines sur des plasmides de grande taille apporte de nouvelles perspectives pour la caractérisation de l'acquisition et de la production des BoNTs (Marshall *et al.*, 2007).



## *Bactériophages*

Le transfert des gènes des BoNT/C et /D se fait par l'intermédiaire des bactériophages au sein du groupe III des *Clostridium* neurotoxigènes (Eklund *et al.*, 1971 ; Eklund and Poysky, 1974; Eklund *et al.*, 1974 ). La présence de bactériophages libres dans le cytoplasme bactérien témoigne d'une relation pseudolysogénique entre phage et hôte. Ainsi, des variants curés des bactériophages peuvent être obtenus de manière efficace en utilisant des réactifs tels l'acridine orange et les rayons ultraviolets. Dans les conditions de culture au laboratoire, une partie plus ou moins importante des bactéries, selon les conditions de température ou de salinité, est lysée et libère ses bactériophages dans le milieu . De même, les bactéries présentes dans le sol ou le tractus gastro-intestinal des animaux libèrent des bactériophages qui peuvent alors réinfecter d'autres bactéries. Ces cycles de lysogénie et réinfection expliquent l'existence de variants non toxigéniques ou producteurs de faible quantité de toxine.

Récemment, le séquençage et l'analyse moléculaire du phage de conversion de *C. botulinum* en type C1 (Sakaguchi *et al.*, 2005) ont révélé qu'il contient bien les gènes codant pour BoNT/C1 et l'exoenzyme C<sub>3</sub>. De plus, il se trouve sous la forme d'un prophage circulaire dans la bactérie lysogène et ne s'intègre pas dans le chromosome de l'hôte, ce qui explique l'instabilité de la lysogénie des phages portant les BoNTs.

Par ailleurs, un gène *lyc* a été identifié chez *C. botulinum* A et F à proximité des gènes des BoNTs. Les gènes *lyc/A* et *lyc/C* sont apparentés à des gènes de bactériophages codant pour des enzymes lytiques chez *Lactobacillus* et *Streptococcus pneumoniae* (Henderson *et al.*, 1997). Les enzymes lytiques sont généralement impliquées dans le cycle de réplication des bactériophages et la proximité des gènes *lyc* et *bont* suggère qu'ils pourraient provenir d'un prophage intégré. Par ailleurs, deux prophages ont été identifiés dans la souche Hall, mais n'ont pas été détectés dans d'autres souches testées (Sebahia *et al.*, 2007).

## *Transposons*

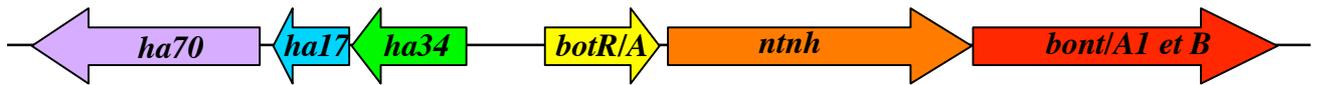
Des éléments transposables ont été identifiés chez *C. botulinum* C et D. Un fragment de 21,5 kb, présent dans plusieurs bactériophages isolés de souches de type C et D, est responsable de la propagation du gène codant pour l'exoenzyme C<sub>3</sub>. D'autres éléments analogues pourraient expliquer la localisation différente du locus botulique et les transferts entre les sérotypes. Le séquençage de la souche Hall a révélé la présence de trois transposases en 3' du locus botulique et d'une transposase en 5'. Cette association aurait pu permettre le transfert latéral du locus entier, mais il n'est pas prouvé qu'il ait été transposé en bloc.

Les souches de *C. butyricum* toxigènes ont probablement acquis le gène codant pour BoNT/E présent sur le chromosome à partir de *C. botulinum* E (Poulet *et al.*, 1992) par un mécanisme apparenté à la transduction (Zhou *et al.*, 1993) non élucidé.

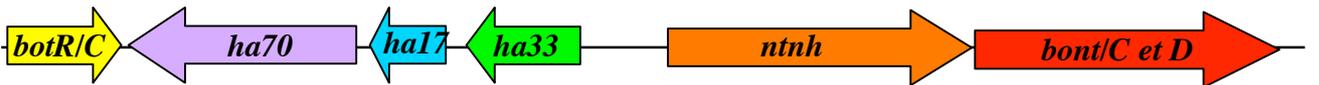
Enfin, des réarrangements par recombinaison semblent avoir eu lieu entre les gènes du locus botulique des différents sérotypes, par exemple entre les types C et D (Moriishi *et al.*, 1996), ou au sein d'un même sérotype comme cela a été découvert pour le sous-type A2 décrit par Hill (Hill *et al.*, 2007).

*Les localisations diverses des gènes des BoNTs et des ANTPS, la possibilité pour diverses espèces de Clostridium de produire des BoNTs, l'existence de souches produisant plusieurs types ou des hybrides de BoNTs, et la présence de variants non toxigènes suggèrent fortement une origine ancestrale commune des gènes codant pour les BoNTs. Cependant, les mécanismes de transfert de gènes chez les Clostridium restent méconnus.*

*C. botulinum* A1 et B



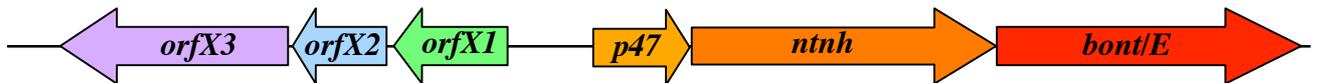
*C. botulinum* C et D



*C. botulinum* A2 et F



*C. botulinum* E et *C. butyricum*



*C. argentinense* (type G)



**Fig. 10** Schéma de l'organisation des locus botuliques pour les différents types de *C. botulinum*.

#### 1.5.4 Organisation génétique du locus botulique

Les gènes codant pour les BoNTs et les ANTPs sont groupés sur une portion d'ADN qui constitue le locus botulique. L'organisation des gènes est conservée dans la partie 3' du locus mais varie dans sa partie 5' selon les toxinotypes des *Clostridium* produisant des BoNTs (cf. Fig. 10).

Ainsi, le gène *bont* codant pour la neurotoxine botulique est toujours situé à l'extrémité 3' et est précédé du gène *ntnh* codant pour le composant non toxique non hémagglutinant (NTNH). Des analyses transcriptionnelles chez les sérotypes A et C1 ont montré l'existence d'un ARNm couvrant les deux gènes *ntnh* et *bont* ainsi qu'un ARNm correspondant au gène *bont* seul. Ces deux gènes semblent donc être transcrits en opéron mono ou bicistronique (Hauser *et al.*, 1994; Hauser *et al.*, 1995; Henderson *et al.*, 1996). Pour la souche Kyoto F de type A2, les gènes *p47 - ntnh - bont/A2* ne seraient transcrits qu'en opéron tricistronique (Dineen *et al.*, 2004).

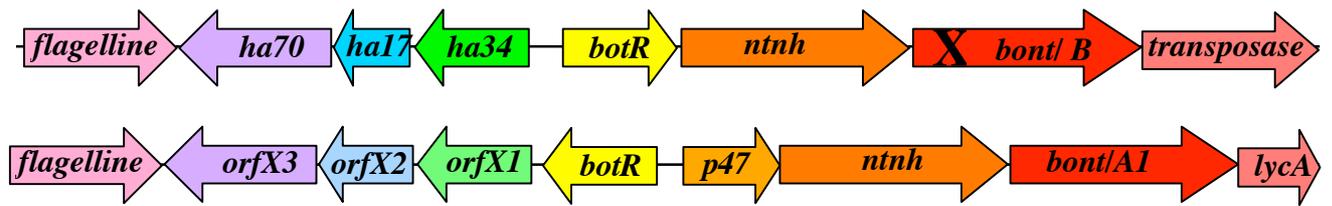
En amont, on distingue un deuxième opéron transcrit en sens opposé qui se compose différemment selon les toxinotypes :

- Les gènes codant pour les hémagglutinines (HAs) :
  - *ha34, ha17 et ha 70* pour les types A1, B, C et D
  - *ha17 et ha70* pour le type G
- Les gènes codant pour les OrfX (de fonction inconnue) :
  - *orfx1, orfx2, orfx3* pour les types A2, E et F

Dans les locus botuliques de type A2, E et F, un gène supplémentaire *p47*, codant pour une protéine de 47 kDa (P47) de fonction inconnue, se trouve en amont de *ntnh* et est traduit en opéron dans le même sens que celui-ci. En effet, les analyses transcriptionnelles chez *C. botulinum* A et C1 ont révélé l'existence d'un seul transcrit couvrant les trois gènes des HAs (Hauser *et al.*, 1995; Henderson *et al.*, 1996). De même, chez la souche Kyoto F de type A2 a été détecté un ARNm couvrant les trois gènes des OrfX.

Enfin, le gène *botR* code pour une protéine de 21-22 kDa qui présente des homologies avec certaines protéines régulatrices. *botR* est situé en amont de l'opéron des hémagglutinines pour les types C et D, ou entre les deux opérons pour les types A, B et G. Il est absent chez le toxinotype E. Le gène *botR* semble être transcrit en faible quantité en opéron avec *ntnh-bont* ou *orfx1-orfx2-orfx3* selon les types.

Pour les autres sérotypes non décrits, l'organisation similaire du locus botulique laisse supposer une expression des gènes en deux opérons polycistroniques.



**Fig. 11** Schéma de l'organisation du locus botulique de la souche NCTC2916 qui présente un locus B silencieux (la croix indique une mutation non-sens dans le gène *bont/B*).

Dans la plupart des cas, une souche produit un seul type de BoNT et une seule copie du locus botulique est présente dans le génome. Cependant, des souches produisant plusieurs toxines ont été isolées, notamment A et B, A et F ou B et F. Les souches AB par exemple possèdent un locus de type A2 et un locus de type B (Fujinaga *et al.*, 1995). Les deux toxines ne sont généralement pas produites en même quantité, ce qui est indiqué dans le type par une lettre majuscule pour le type de toxine le plus produit et une minuscule pour l'autre. Les productions relatives des deux toxines sont parfois dépendantes de la température de croissance de la souche, comme cela a été décrit pour une souche Bf (Barash and Arnon, 2004), comme par exemple les souches Ba ou Bf, produisent plus de BoNT/B que de BoNT/A ou /F (Henderson *et al.*, 1997).

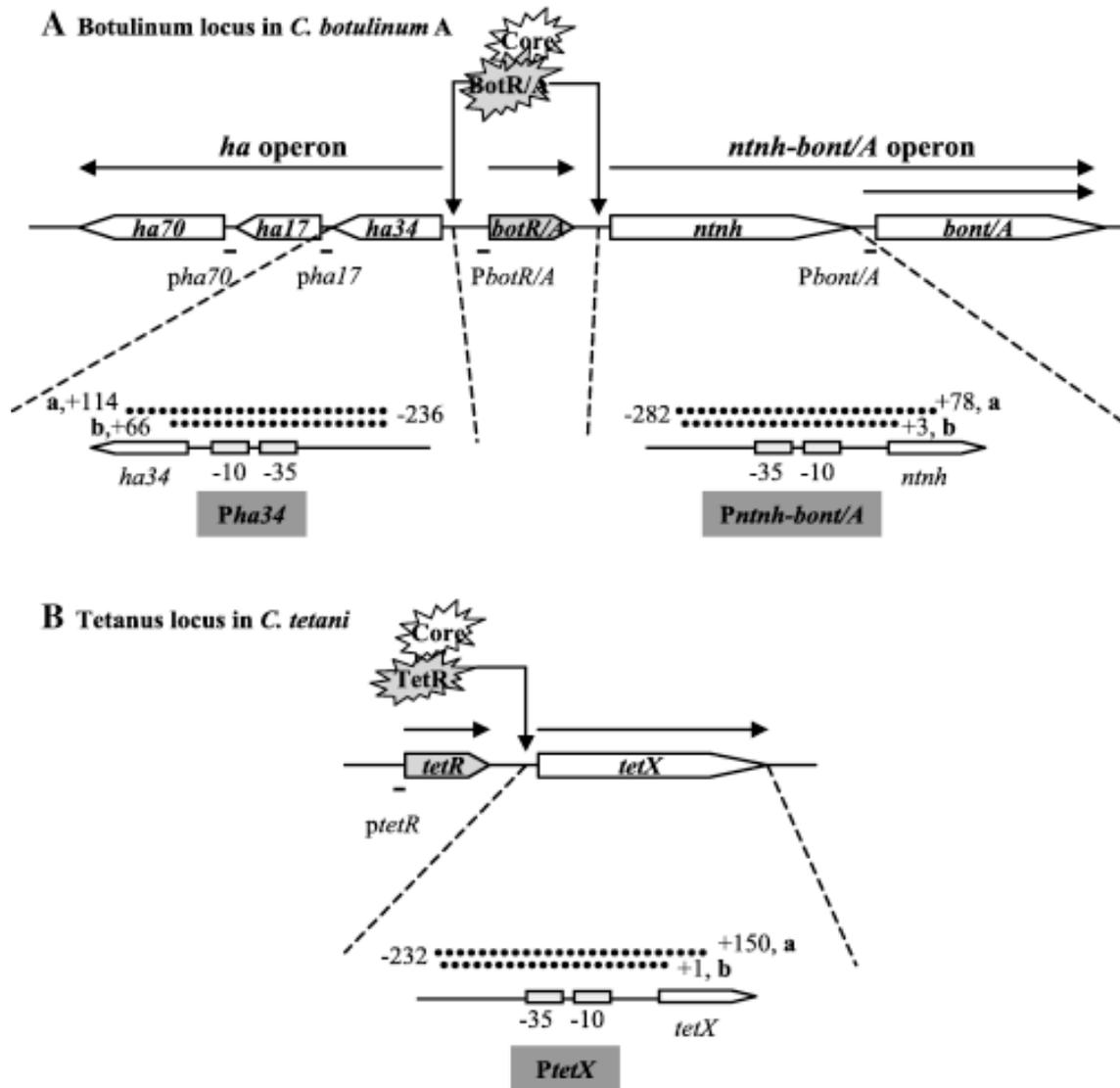
Par ailleurs, certaines souches présentent des gènes codant pour les BoNTs qui sont silencieux. Ainsi un gène *bont/b* silencieux a été détecté chez plusieurs souches de type A isolées de cas de botulisme alimentaire ou infantile.

Par exemple la souche NCTC2916, de type A(B), a deux loci botuliques (cf. Fig. 11) :

- A : organisation de type A2 (*orfx3-orfx2-orfx1-botR-p47-ntnh-bont/A*) mais avec une toxine similaire au type A1
- B : organisation de type B (*ha70-ha17-ha734-botR-ntnh-bont/B*) mais la séquence de *bont/B* a une mutation codon stop (en position 128) et deux délétions (en position 2839 et 2944) entraînant plusieurs codons stop.

Cette souche a été utilisée en parallèle avec la souche Hall pour réaliser des cinétiques de croissance et étudier l'expression des gènes du locus botulique dont les résultats sont présentés dans mon premier article.

*Les gènes codant pour les composants des complexes botuliques, les BoNTs et les ANTPs, sont regroupés au sein d'un même locus, le locus botulique. La composition et l'organisation du locus botulique varie selon les types de Clostridium neurotoxigènes mais ils contiennent toujours un opéron comprenant ntnh et bont (et parfois p47), et un autre opéron comprenant soit les has soit les orfx. Un gène, botR, codant pour une protéine régulatrice est également présent en différentes localisations du locus, sauf chez le type E.*



**Fig. 12** Organisation génétique et régulation de l'expression des gènes des locus botuliques de type A et tétanique. D'après (Raffestin *et al.*, 2005).

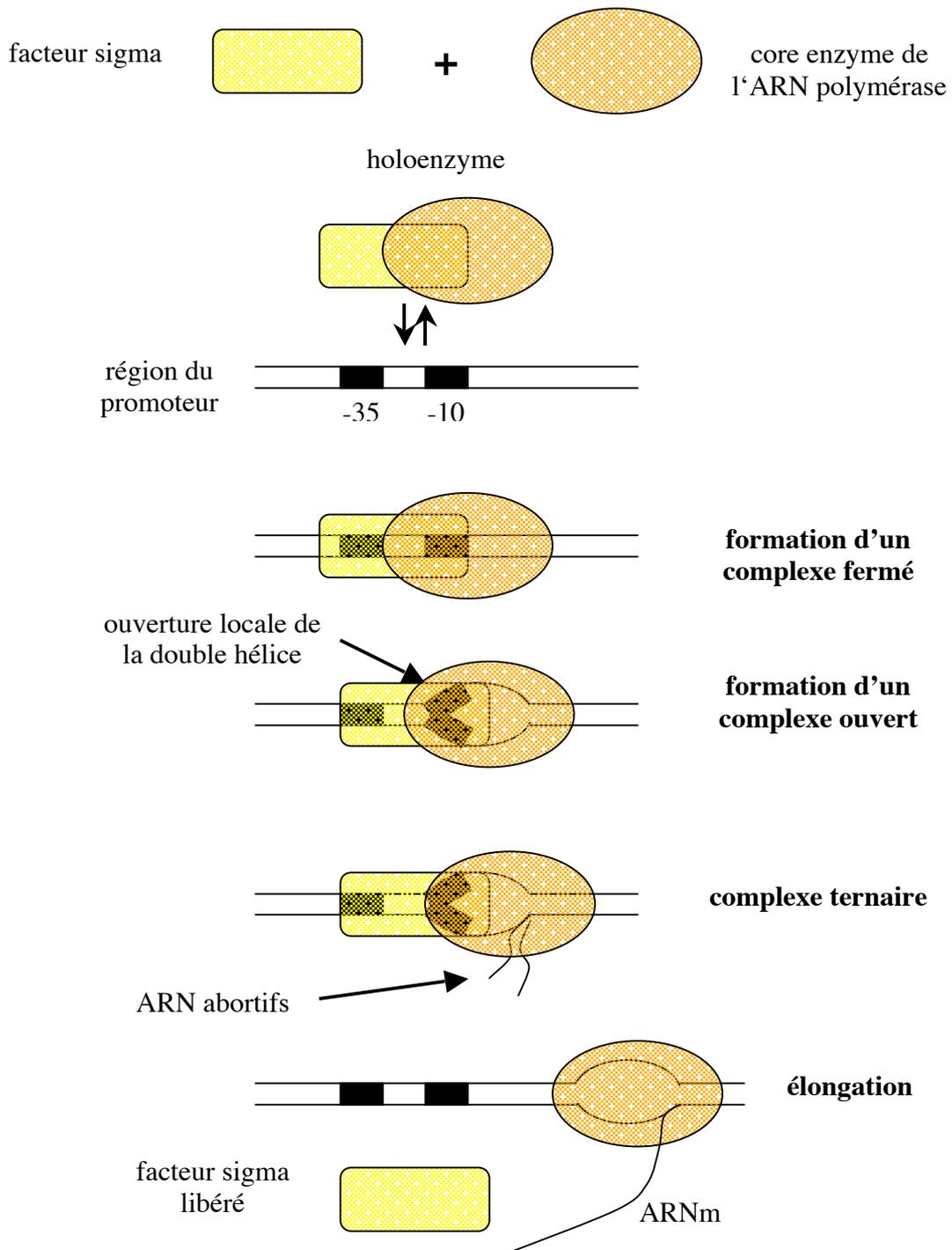
## 1.6 Régulation des gènes du locus botulique

C'est chez *C. botulinum* de type C qu'ont été décrites pour la première fois les caractéristiques de protéines liant l'ADN de BotR : pI basique (10,4) et présence d'un motif « helix-turn-helix » de liaison à l'ADN (Hauser *et al.*, 1995). Un gène homologue fût par la suite identifié chez les types A (Henderson *et al.*, 1996), puis B, D, F et G (East *et al.*, 1996 ; Henderson *et al.*, 1996 ; Bhandari *et al.*, 1997 ; Li *et al.*, 1998). Cependant, aucun gène homologue à *botR* n'a été détecté pour le type E. Par contre, un gène homologue à *botR*, nommé *tetR*, a été localisé en amont du gène de la neurotoxine tétanique. Les BotR des différents types et TetR présentent des analogies allant de 51 à 97% et sont apparentés à d'autres protéines régulatrices, notamment TcdR qui régule positivement la production de toxines A et B de *C. difficile* et dont le gène a une localisation similaire à celle de *botR* et *tetR* (Moncrief *et al.*, 1997).

Le travail de thèse de Stéphanie Raffestin réalisé dans le laboratoire de M. Popoff a permis la caractérisation de BotR et TetR et l'étude de leur rôle dans la régulation de la toxinogénèse.

Elle a ainsi montré avec J.C. Marvaud que la surexpression de *botR/A* (ou *tetR*) dans une souche de *C. botulinum* A (ou *C. tetani*) entraîne une forte augmentation de la production des BoNTs et ANTPs (ou de TeNT), et une hausse des niveaux d'ARNm détectés par la technique de Northern blot, en comparaison avec la souche sauvage. Inversement, l'inhibition partielle de l'expression de *botR* (ou *tetR*) par ARN antisens entraîne une baisse de la toxicité et des niveaux d'ARNm. BotR/A est donc un activateur transcriptionnel des gènes *bont* et *antp* et TetR un activateur transcriptionnel du gène *tent* (Marvaud *et al.*, 1998b).

Des expériences *in vitro* préliminaires sur des lysats de *C. botulinum* A surexprimant BotR/A ont montré la formation de complexes entre les promoteurs de l'opéron *ntnh-bont/A* et de protéines dont BotR/A (Marvaud *et al.*, 1998a). De plus, les protéines recombinantes BotR/A ou TetR, en association avec le core enzyme de l'ARN polymérase d'*E. coli*, entraînent respectivement *in vitro* un retard de migration des régions promotrices des deux opérons du locus botulique (*Pntnh-bont/A* et *Pha34*) et de la région promotrice de *tent* (*PtetX*) (Raffestin *et al.*, 2005). Des expériences de transcription *in vitro* ont confirmé que BotR/A et TetR sont des facteurs sigma. Un schéma de la régulation des opérons botuliques et tétanique par BotR et TetR est présenté en Fig. 12.



**Fig. 13** Représentation schématique des différentes des étapes d'initiation de la transcription par l'ARN polymérase associée à un facteur sigma de la famille  $\sigma^{70}$ . Les séquences promotrices, composées des boîtes -10 et -35 en amont du site d'initiation de la transcription. L'efficacité des promoteurs dépend de l'affinité de l'ARN polymérase (holoenzyme) pour ces séquences. Une fois l'holoenzyme fixée sur le promoteur (complexe fermé), le complexe adopte une conformation ouverte (complexe ouvert) caractérisée par l'ouverture de la double hélice d'ADN. Il y a alors transcription des premiers brins d'ADN dits abortifs, puis lorsque les conditions sont optimales le facteur sigma est chassé de l'ADN et la polymérase perd son affinité pour la zone du promoteur. Elle peut alors se déplacer sur l'ADN et l'élongation des ARNm débute.

La caractérisation du mécanisme d'action de BotR/A sur la transcription des deux opérons du locus botulique a mené à la conclusion que BotR/A fait partie d'un nouveau sous-groupe de régulateurs de la famille des facteurs sigma alternatifs auquel appartient TcdR. Les facteurs sigma sont des protéines qui, en s'associant au core enzyme de l'ARN polymérase, dirigent sa liaison avec une forte affinité vers des séquences promotrices cibles. Ils assurent ainsi un contrôle positif sur la transcription de certains gènes (cf. Fig. 13). Les facteurs sigma alternatifs ont la particularité de contrôler la transcription de régulons spécifiques en réponse à des conditions de stress ou lors de processus de développement particuliers (Hecker and Volker, 2001).

Chez *C. difficile*, il a été montré que l'expression des gènes des toxines contrôlés par le régulateur TcdR est réprimée pendant la phase exponentielle de croissance des cultures bactériennes et augmente significativement à l'entrée en phase stationnaire (Dupuy and Sonenshein, 1998). La phase de croissance joue donc un rôle dans l'activité de ce facteur sigma alternatif apparenté à BotR. De plus, la température de croissance influe également sur la production des toxines au niveau transcriptionnel via le régulateur TcdR, dont le gène est exprimé à 37°C et inhibé aux autres températures comme 22°C ou 42°C (Karlsson *et al.*, 2003).

Chez cinq souches de toxinotype B, des analyses de l'expression de *bont/B* par PCR quantitative en temps réel ont montré que le niveau le plus élevé est observé au niveau de la phase de transition entre les phases exponentielle et stationnaire de croissance (Lovenklev *et al.*, 2004). Les niveaux d'expression au moment de la phase de transition sont 2 à 10 fois supérieurs selon les souches à ceux détectés en phase exponentielle. L'influence de deux inhibiteurs de croissance sur l'expression de *bont/B* a été testée : l'effet de l'oxygénation du milieu de culture est négligeable alors que le nitrite de sodium diminue l'expression de *bont/B* à des doses supérieures à 30 ppm.

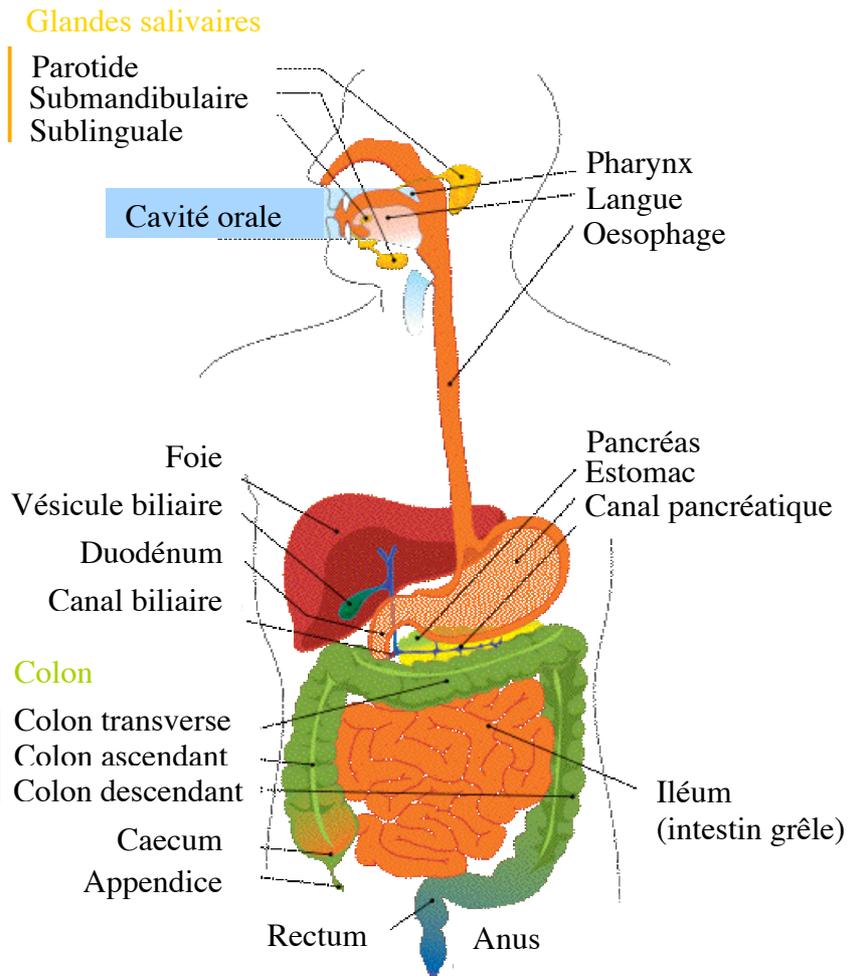
De même, l'expression relative de *bont/E* (par rapport aux ARN totaux) est diminuée d'un facteur 25 en présence de nitrite de sodium (100 µg/ml) ou d'acide sorbique (1 mg/ml).

Par ailleurs, certains nutriments semblent réguler la production de BoNT/A. Ainsi, la formation de toxine est réprimée par les voies cataboliques de l'azote impliquées dans la dégradation de l'arginine et stimulée par des facteurs non identifiés présents dans de la caséine purifiée ou dans des hydrolysats de caséine (Patterson-Curtis and Johnson, 1989). Contrairement à la répression observée chez *C. difficile* sur la production des toxines A et B, le glucose n'a pas d'effet inhibiteur sur la production de BoNT/A et réduit même les effets répresseurs de l'arginine.

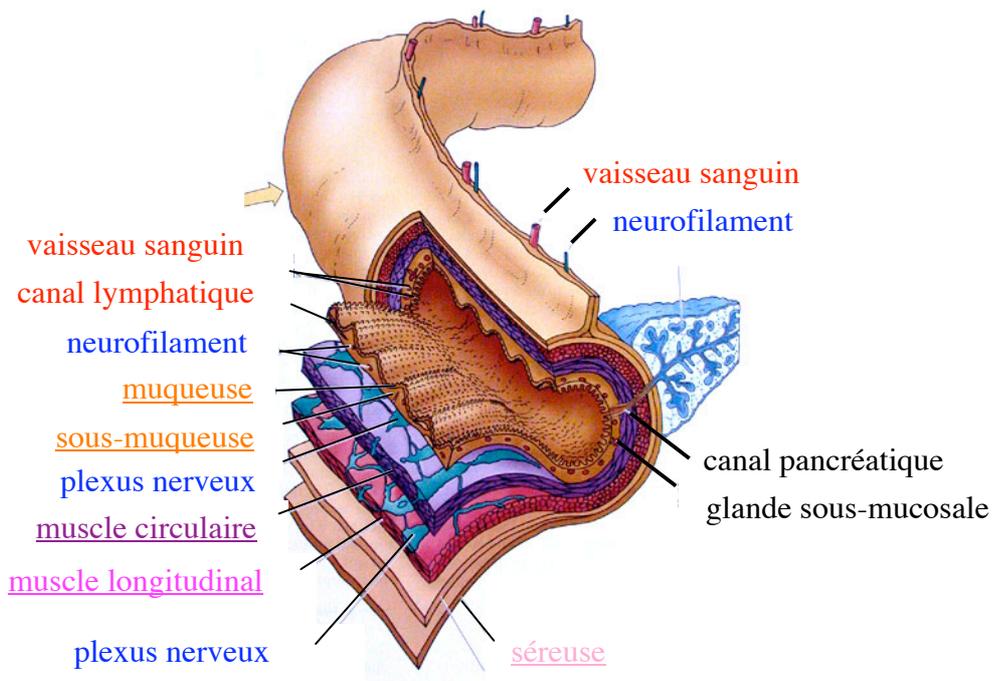
Les facteurs environnementaux contrôlant la toxinogénèse, et ceux qui jouent sur le régulateur BotR restent largement méconnus.

*BotR/A est un activateur transcriptionnel des gènes des opérons ntnh-bont/A et ha34-ha17-ha70. Il fait partie d'un nouveau sous-groupe de régulateurs de facteurs sigma alternatifs auquel appartient TcdR, un régulateur de la production des toxines A et B chez C. difficile.*

Afin de savoir si un mécanisme similaire était observé chez *C. botulinum* de type A, l'impact de la phase de croissance sur la régulation de la toxinogénèse a été étudié en réalisant une analyse transcriptionnelle semi-quantitative des gènes du locus botulique par transcription inverse et PCR en temps réel, au cours d'une cinétique de croissance bactérienne.



**Fig. 14** Schéma de l'organisation du tube digestif des mammifères.



**Fig. 15** Représentation schématique de la structure de l'intestin. D'après (Hansen, 2003b)

## 2 Interaction de la neurotoxine botulique avec l'intestin

Dans le cas de botulisme dû à une intoxication alimentaire ou à une toxi-infection, les complexes botuliques préformés sont respectivement ingérés avec les aliments ou produits *in situ* par les bactéries colonisant le tractus intestinal. L'hypothèse la plus commune est qu'ils passent la barrière intestinale puis se retrouvent dans le sang et la lymphe où ils sont véhiculés dans l'organisme. Cette étape, permettant à la toxine d'atteindre le milieu intérieur, est assez mal connue et les résultats observés à ce sujet sont présentés ci-dessous.

### 2.1 Description anatomique et fonctionnelle du tractus gastrointestinal des mammifères

Les cellules du corps humain ont besoin de quantités adéquates de nutriments pour leur processus de synthèse dépendants de l'énergie. Ces matières premières sont issues de l'environnement extérieur via l'ingestion de nourriture. La fonction globale du système digestif est de transférer les nutriments extraits de la nourriture de l'environnement externe vers le milieu intérieur où ils peuvent être distribués aux cellules du corps via la circulation.

Le tractus gastrointestinal comprend la bouche, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle et le colon (cf. Fig. 14). La nourriture est ingérée au niveau de la bouche et progresse vers le pharynx grâce à l'activité des muscles squelettiques puis le long du tractus digestif grâce à l'activité des muscles lisses. La nourriture est amenée à une consistance semi-fluide appropriée et dégradée en nutriments par les sécrétions débouchant en divers endroits le long du tractus digestif. Ces processus sont aidés par les contractions des muscles qui servent à mélanger les sécrétions à la nourriture.

Les organes associés situés hors du tractus intestinal mais essentiels au processus digestif sont les glandes exocrines qui sécrètent des sucs digestifs importants :

- trois paires de glandes salivaires produisant la salive
- le pancréas sécrétant le suc pancréatique
- le foie produisant la bile

La salive est sécrétée dans la bouche, le suc pancréatique et la bile dans le duodénum.

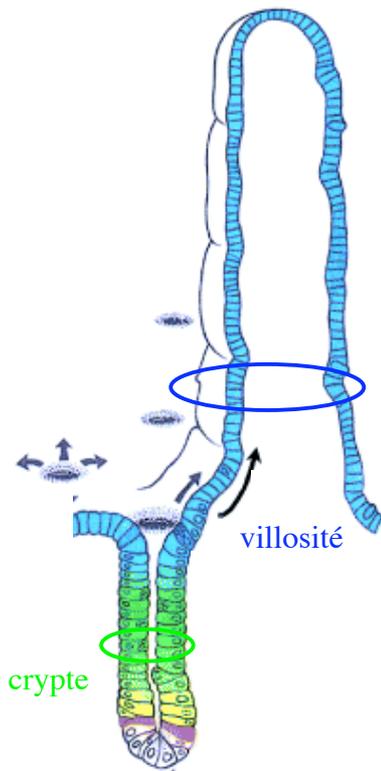
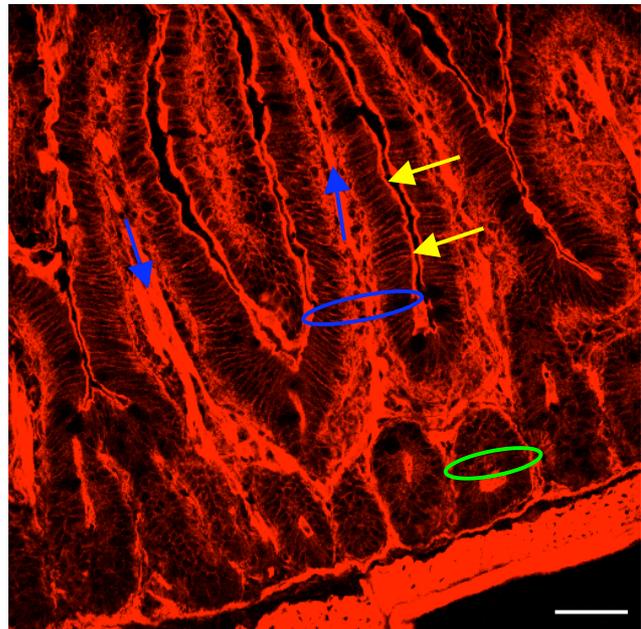
Le tube digestif humain mesure environ 6,5 m de long et traverse le corps de la bouche à l'anus, le contenu du tube digestif étant considéré comme un compartiment extérieur de l'organisme.

### 2.2 Structure de la paroi intestinale

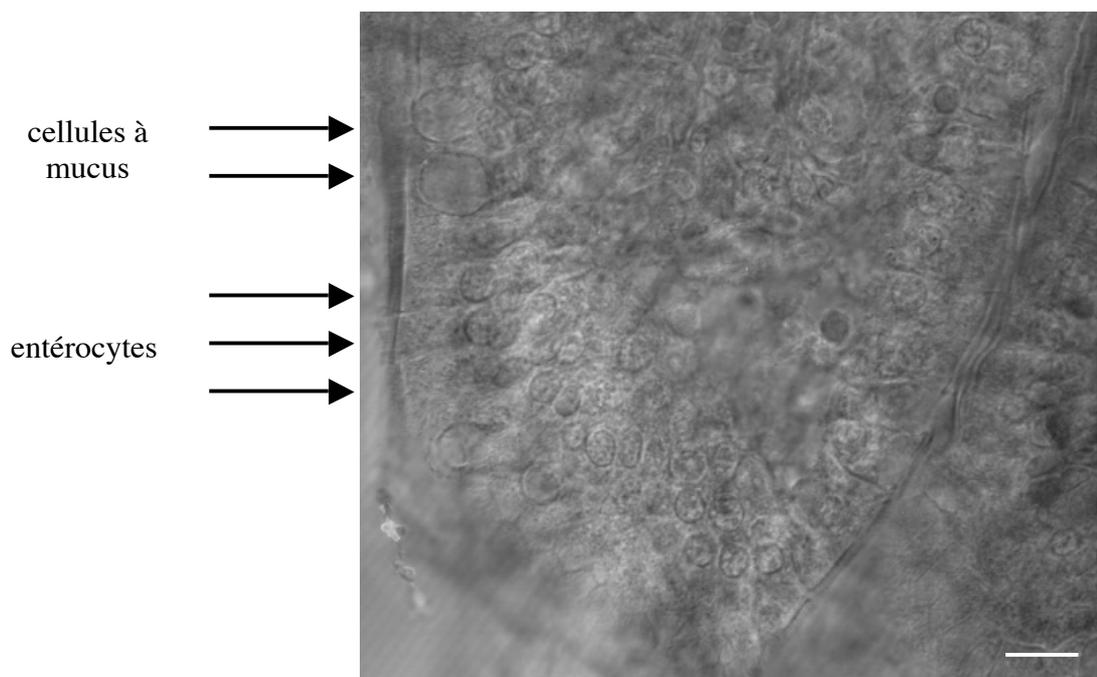
Le tube digestif est un long tube musculaire tapissé intérieurement d'une muqueuse et extérieurement d'une séreuse. La majeure partie de la surface de la lumière du tube présente un grand nombre de plis, augmentant considérablement la surface disponible pour l'absorption.

La paroi du tube digestif est constituée de 4 couches (cf. Fig. 15) :

- la muqueuse
- la sous-muqueuse
- la musculieuse
- la séreuse

**A****B**

**Fig. 16** Représentation de la muqueuse intestinale qui comprend les villosités (rond bleu) et les cryptes (rond vert) sous la forme de schéma (A) ou (B) d'une cryocoupe d'intestin de souris marquée en rouge par la phalloïdine. Notez les câbles d'actine soutenant les villosités (flèche bleue) et le marquage des limites latérales des cellules épithéliales (flèche jaune). D'après (Hendry and Potten, 1995) et (Couesnon, non publié). (barre = 50  $\mu\text{m}$ ).



**Fig. 17** Vue au contraste de phase de l'extrémité d'une villosité intestinale de souris. (barre = 10  $\mu\text{m}$ ). (Couesnon, non publié)

## 2.2.1 La muqueuse intestinale

La muqueuse intestinale comprend deux grandes structures : les villosités, qui se projettent dans la lumière de l'intestin, et les glandes (ou cryptes) de Lieberkühn, orientées vers la couche musculaire (cf. Fig. 16). La villosité est considérée comme l'unité d'absorption de l'intestin. Sa longueur varie entre 0,5 et 1,5 mm selon sa localisation. Chaque villosité comprend un réseau sanguin et un lactéal en cul-de-sac.

La muqueuse de l'intestin comprend :

- l'épithélium, qui est formé à partir de l'estomac d'une seule couche de cellules reliées les unes aux autres par des jonctions occlusives au niveau de leur surface apicale
- la lamina propria, une couche de tissu connectif lâche qui supporte l'épithélium et contient du collagène, des fibres réticulaires et des fibres élastiques ; elle est très riche en capillaires sanguins et lymphatiques, en leucocytes et autres cellules du système immunitaire

La muqueuse est séparée de la sous-muqueuse par la muscularis mucosae qui se trouve sous la lamina propria. Elle est constituée de fines couches de muscles lisses orientées dans différentes directions qui se contractent continuellement pour expulser le contenu des glandes des cellules des cryptes et modifier les plis de l'épithélium, permettant d'augmenter le contact entre l'épithélium et le contenu du lumen intestinal.

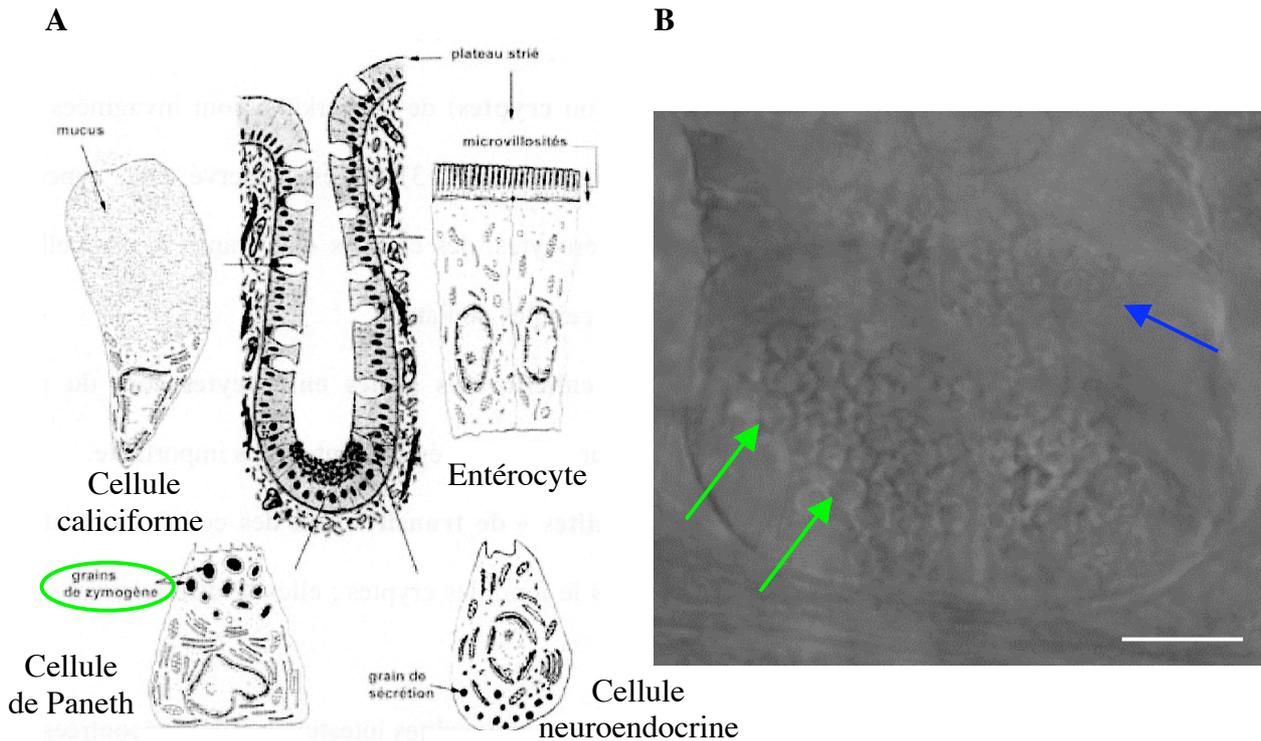
### 2.2.1.1 Les villosités intestinales

À niveau des villosités, l'épithélium intestinal, de type prismatique simple, comprend 4 types cellulaires (cf. Fig. 17 et 18) :

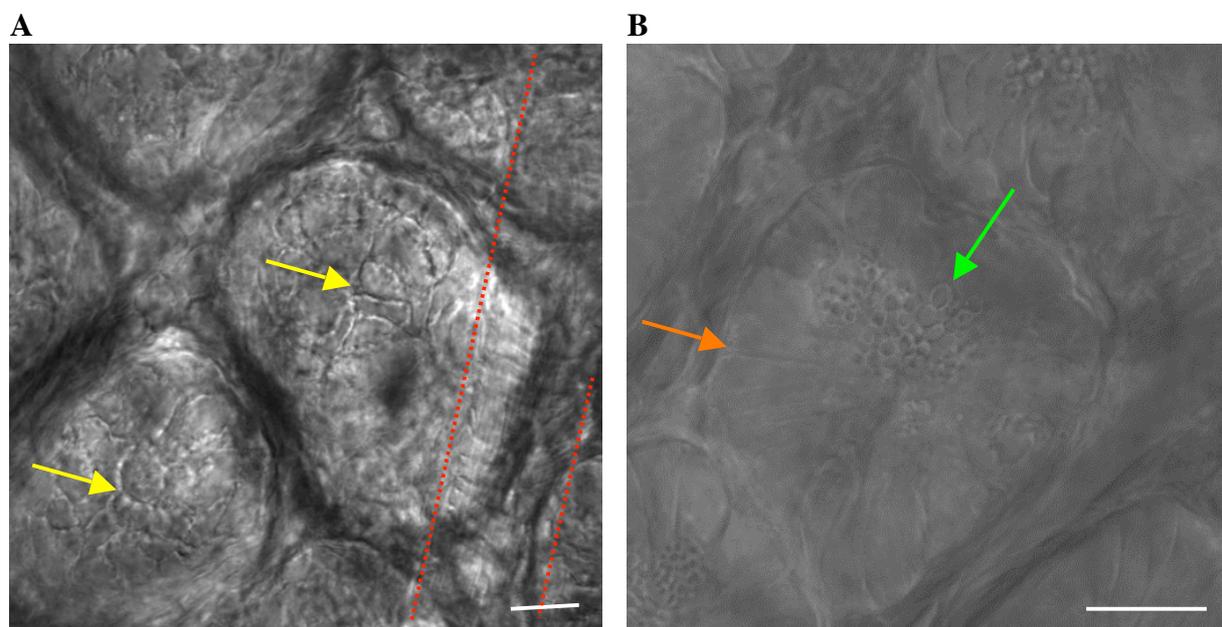
- des entérocytes
- des cellules caliciformes (cellules à mucus)
- des cellules neuroendocrines (ou entérochromaffines)
- des cellules M (Microfold, non représentées ici).

Les entérocytes sont les cellules les plus représentées (80% de l'épithélium) et assurent la fonction d'absorption intestinale. Ils ont de nombreuses extensions cytoplasmiques au niveau de leur surface luminale appelées microvillosités. La surface des microvillosités est appelée bordure en brosse. Grâce à la combinaison des plissements de la muqueuse, des villosités et des microvillosités, la surface totale de l'intestin grêle humain atteint 300 m<sup>2</sup>.

Les cellules caliciformes sécrètent du mucus qui protège l'épithélium contre les enzymes de la lumière intestinale, les infections bactériennes et les pH acides. Elles ne possèdent pas de microvillosités mais une vacuole de sécrétion.



**Fig. 18** Représentation des cryptes intestinales sous la formes d'un schéma (A) montrant les 4 types de cellules différenciées présents dans les cryptes et d'une photo au contraste de phase (B) permettant de bien apercevoir les grains de zymogène des cellules de Paneth (flèches vertes) situées au fond des cryptes et une cellule à mucus (flèche bleue) localisées plus haut. (barre = 10 µm). D'après (Hendry and Potten, 1995) et (Couesnon, non publié).



**Fig. 19** Vue des cryptes par la sous-muqueuse. (A) Notez les contours du pôle basal des cellules épithéliales (flèche jaune) et la présence d'un vaisseau sanguin (entre les lignes en pointillés rouges). (B) Notez la présence de grains de zymogène (flèche verte) et la visualisation des espaces intercellulaires (flèche orange). (Couesnon, non publié) (barre = 10 µm).

### 2.2.1.2 *Les cryptes intestinales*

Les cryptes, qui sont invaginées en forme de doigts vers la paroi musculaire (cf. Fig. 18A et 19A), comprennent 5 types cellulaires : des cellules caliciformes, des entérocytes, des cellules « de transit », des cellules neuroendocrines et des cellules de Paneth (cf. Fig.18B).

Les deux premiers types sont similaires à ceux décrits dans les villosités. Les cellules dites « de transit » sont des cellules encore capables de se diviser et qui se différencient en migrant du fond des cryptes vers le sommet des villosités.

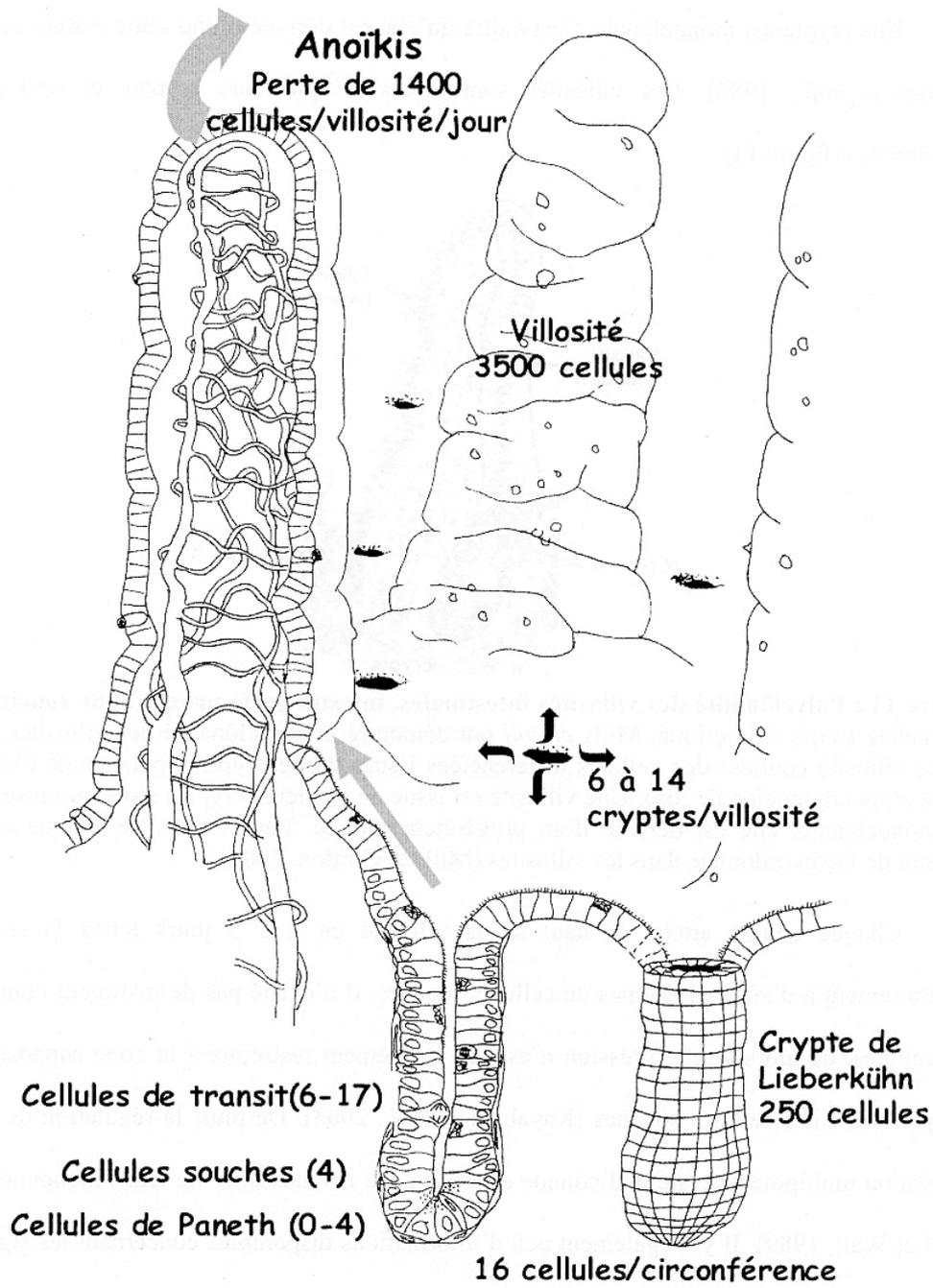
Les cellules neuroendocrines intestinales sont présentes en plus grand nombre dans les cryptes que dans les villosités. Elles sont responsables de la sécrétion des médiateurs locaux, (sérotonine, sécrétine, neurotensine, substance P,...). Elles représentent 1% des cellules épithéliales de la muqueuse. Ces cellules expriment de marqueurs de différenciation neuronale, comme par exemple ceux de la biosynthèse des neurotransmetteurs. Elles expriment également des protéines de structure contrôlant la différenciation des neurones, notamment certaines neurotrophines (Nerve Growth Factor, Brain Derived Neurotrophic Factor,...). Leur morphologie est caractéristique, assez similaire à celle des neurones, avec des extensions lumineales et des projections de type axone contenant des granules de sérotonine (Gustafsson *et al.*, 2006).

Les cellules de Paneth, situées au fond des cryptes, déversent leurs produits de sécrétion à action antimicrobienne dans la lumière des cryptes. Elles contiennent des granules sécrétoires apicaux (cf. Fig. 18A et 19B) denses aux électrons et produisent des glycoconjugués fucosylés reconnus par les lectines, notamment l'agglutinine de la plante *Ulex europaeus* (ajonc) de type 1 (UEA1) (Garabedian *et al.*, 1997).

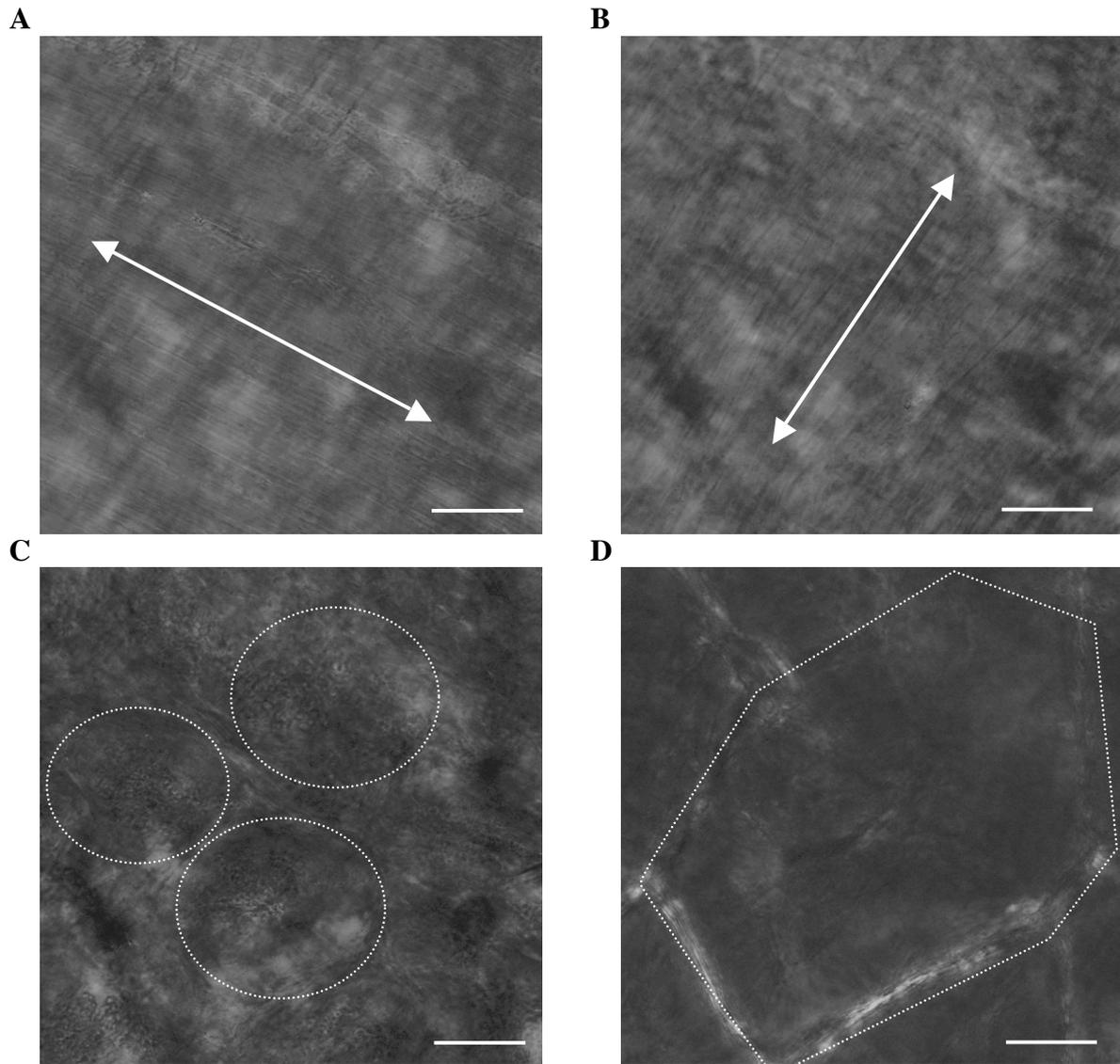
Les cellules souches sont localisées dans le fond des cryptes au-dessus des cellules de Paneth. Elles seraient au nombre de quatre par crypte et servent au renouvellement très rapide des cellules de l'épithélium intestinal. Une crypte comprend environ 250 cellules et une villosité 3500 cellules (cf. Fig. 20). On dénombre 6 à 14 cryptes par villosité et chaque villosité perd 1400 cellules par jour, d'où un renouvellement cellulaire très actif. Chaque cellule atteint le haut de la villosité en 2 à 5 jours (chez la souris) et est extrudée dans la lumière intestinale par un phénomène d'anoïkis proche de l'apoptose (Potten, 1998).

Les cellules M, produites par les cryptes sont adjacentes aux plaques de Peyer, structures lymphoïdes spécialisées en forme de dome sous l'épithélium qui comprennent de nombreux lymphocytes T et B, ces derniers produisant l'IgA sécrétoire. Les cellules M assurent le transport de nombreux antigènes de la lumière intestinale vers les follicules lymphoïdes et permettent ainsi au système immunitaire de surveiller en permanence le contenu de l'intestin.

*L'épithélium de la paroi intestinale est constitué de deux grandes structures : les villosités, se projetant dans la lumière intestinale, et les cryptes, invaginées vers la sous-muqueuse. Les cellules souches de l'épithélium intestinal, situées au fond des cryptes, donnent naissance à quatre types cellulaires : les cellules de Paneth, qui restent au fond des cryptes, et les cellules neuroendocrines, les cellules à mucus et les entérocytes qui migrent vers l'apex des villosités. Le renouvellement des cellules de l'épithélium intestinal est très rapide (quelques jours) permettant de maintenir l'intégrité de cette barrière entre le milieu extérieur et le milieu intérieur. Le système immunitaire est également très présent, notamment au niveau de structures spécialisées appelées plaques de Peyer.*



**Fig. 20** Schéma de l'organisation tridimensionnelle de la muqueuse intestinale de souris. D'après (Hendry and Potten, 1995).



**Fig. 21** Vue au contraste de phase des différentes couches de l'intestin en partant de (A) la couche musculaire longitudinale externe, (B) la couche musculaire circulaire interne (la flèche indiquant le sens des fibres musculaires), (C) la sous-muqueuse avec les cryptes puis (D) les villosités (entourées en pointillé). (Couesnon, non publié) (barre = 20  $\mu\text{m}$ ).

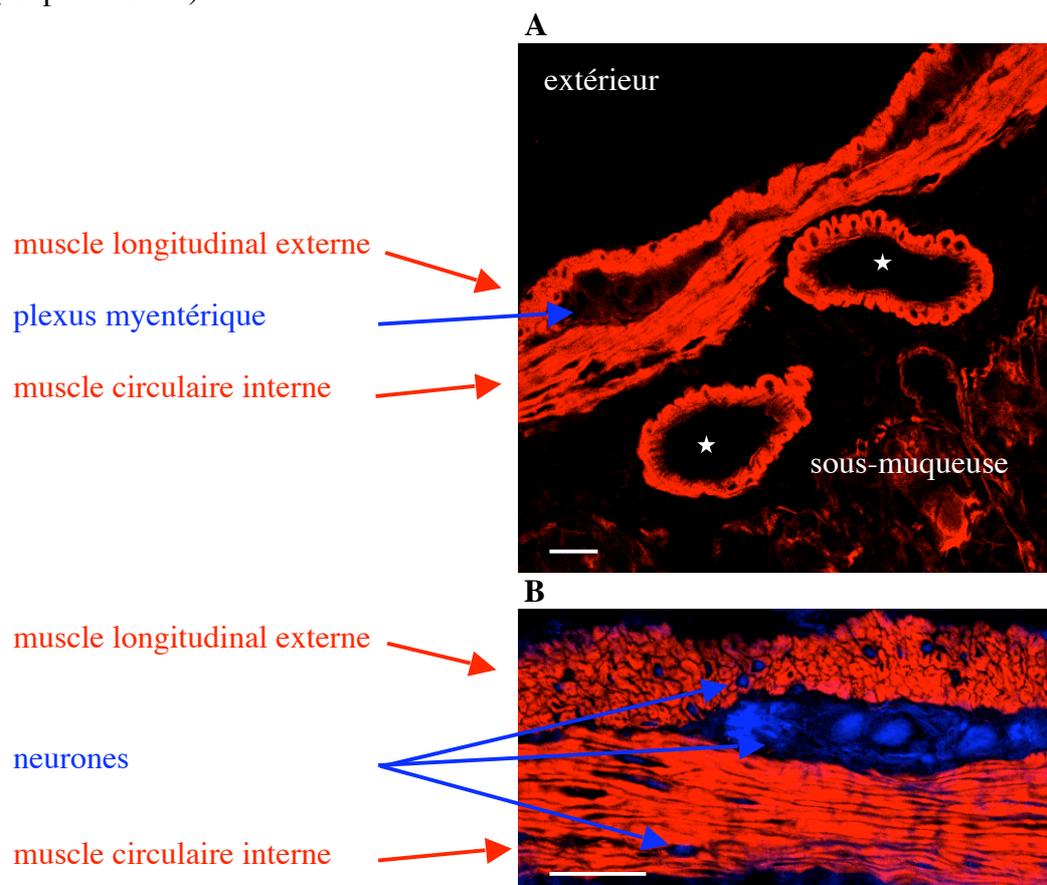
### 2.2.2 La sous-muqueuse

La sous-muqueuse est une couche de tissu conjonctif contenant des vaisseaux, (cf Fig. 19A et 21C) des lymphatiques et des nerfs. Elle contient un réseau de neurones, le plexus sous-muqueux ou plexus de Meissner. L'organisation de ce plexus est détaillée dans la partie 2.3.2.



### 2.2.3 La musculuse

La musculuse est constituée de deux couches de cellules musculaires, circulaire interne et longitudinale externe (cf. Fig 21A et B). Entre ces deux couches se trouve un réseau de neurones, le plexus myentérique ou plexus d'Auerbach (cf. Fig. 22). Des épaissements de la couche circulaire constituent des sphincters (pylore, jonction iléocécale,...). Aux deux extrémités du tube digestif (pharynx et tiers supérieur de l'œsophage, sphincter anal externe), les cellules musculaires sont de type strié squelettique. Dans le reste du tube digestif, la musculature est constituée de cellules musculaires lisses. La différence majeure entre un muscle strié et un muscle lisse est que ce dernier est doué d'automatismes alors que l'activité motrice d'un muscle strié est subordonnée à une commande par le système nerveux extrinsèque (cf. partie 2.3.3).

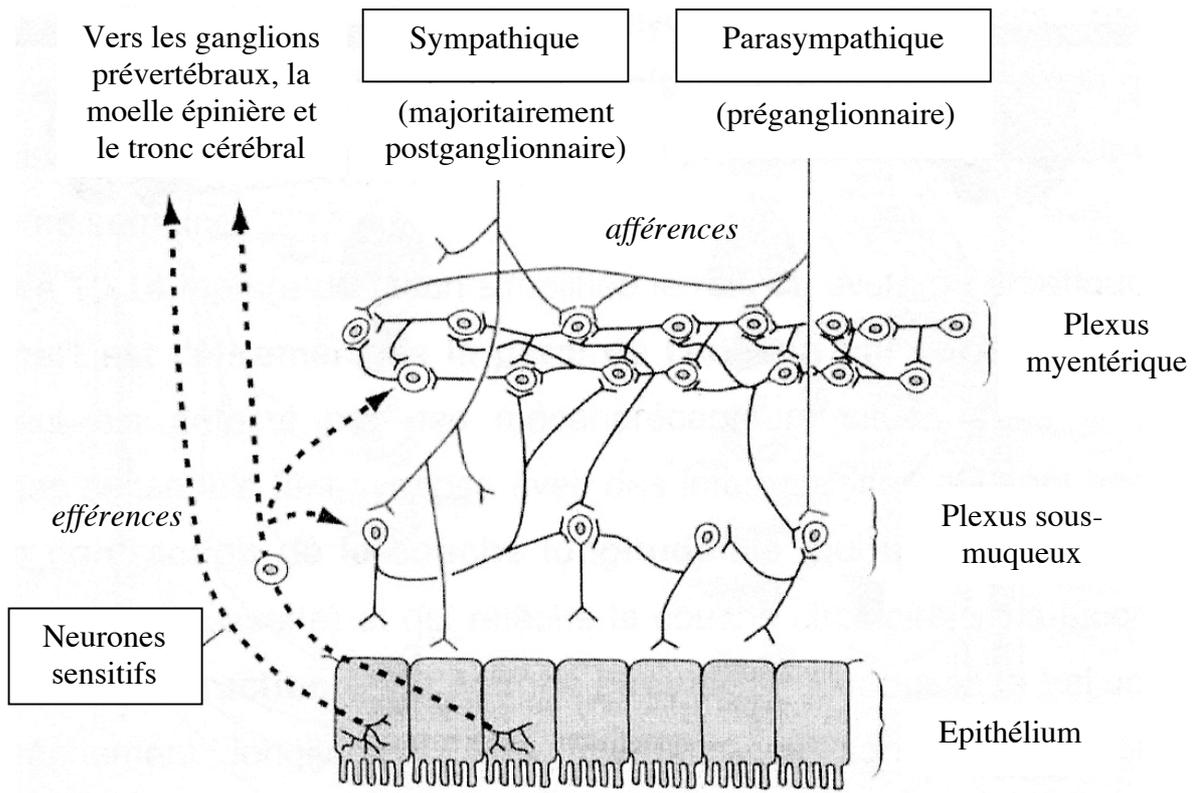


**Fig. 22** Visualisation des couches musculaires longitudinales et circulaires sur de cryocoupes d'intestin (coupes transversales) de souris par (A) marquage de l'actine filamenteuse par la phalloïdine (produite par le champignon *Amanita phalloides*, rouge) et (B) marquage des neurones par des anti-neurofilament (bleu). Notez la présence de capillaires sanguins dans la sous-muqueuse (étoile). (Couesnon, non publié) (barre = 20  $\mu$ m).

N.B. : les anticorps « anti-neurofilament » sont dirigés contre le polypeptide de 200 kDa, un des trois polypeptides formant le triplet des neurofilaments (200, 145 et 68 kDa), qui sont des filaments intermédiaires spécifiques des cellules neuronales. (Debus *et al.*, 1982)

### 2.2.4 La séreuse

La séreuse est une mince couche de tissu conjonctif qui permet aux différents segments du tube digestif de se replier et de glisser les uns sur les autres dans la cavité abdominale.



**Fig. 23** Contrôle du système nerveux intrinsèque par le système nerveux extrinsèque (sympathique et parasympathique) au niveau de l'intestin. D'après (Hansen, 2003b)

## 2.3 Système nerveux entérique

La paroi de l'intestin est très riche en neurones : l'intestin contient autant de neurones que le système nerveux central (environ  $10^8$  de neurones chez la souris, plus de  $10^9$  chez l'homme).

Deux types d'innervation coexistent :

- intrinsèque (majoritaire) : située en totalité dans la paroi digestive, répartie en deux plexus (myentérique et sous-muqueux)
- extrinsèque : dont les neurones ont leur corps cellulaire en dehors de la paroi digestive.

Les plexus reçoivent des afférences du système nerveux extrinsèque (sympathique, S, et parasympathique, PS) et ils émettent des axones efférents primaires qui remontent vers le système nerveux central (substance grise médullaire, ganglions paravertébraux), ce qui est le support de la viscéro-sensibilité (mécanique, chimique,..., type n°7 dans la Fig. 24) (cf. Fig. 23).

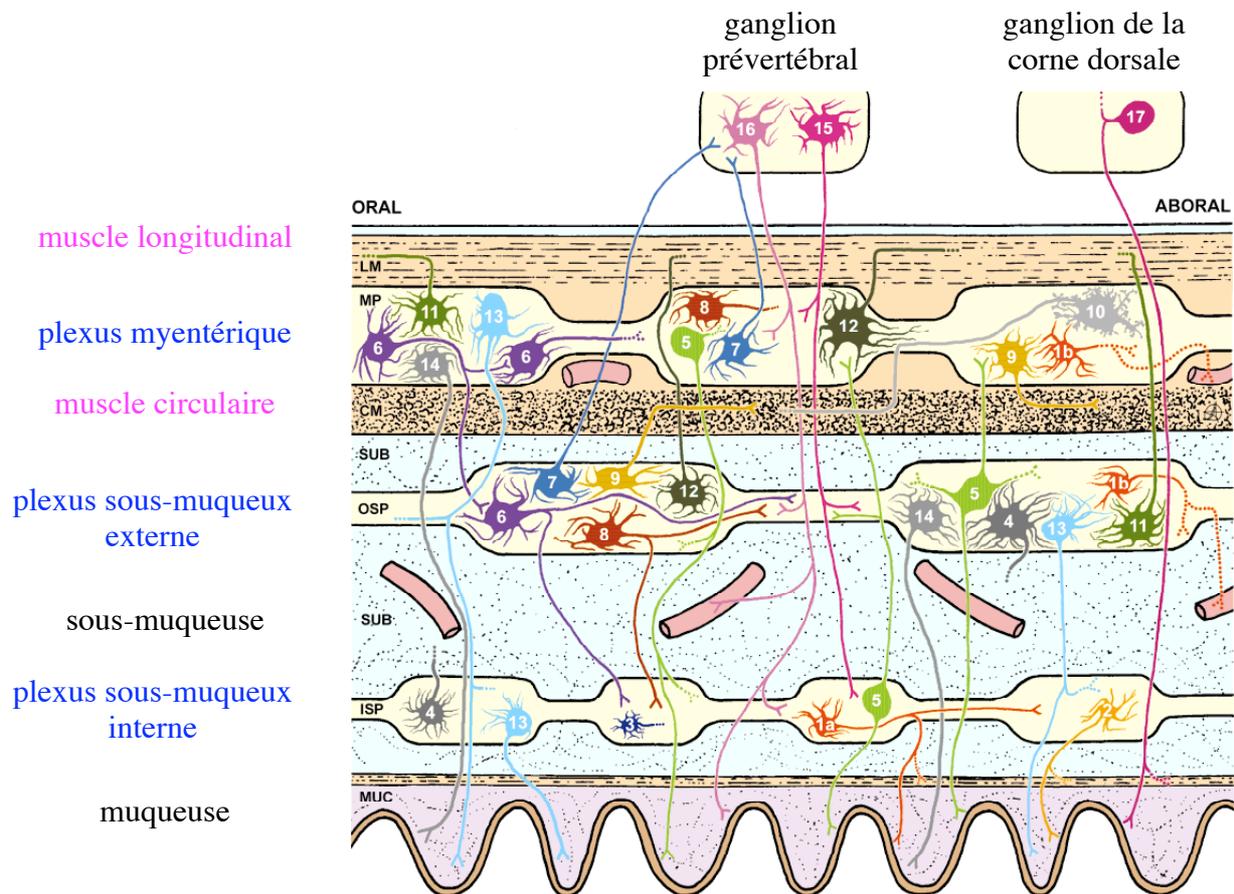
### 2.3.1 Système nerveux entérique extrinsèque

Le PS a pour origine le bulbe, avec la voie vagale, et la moelle sacrée, avec les nerfs pelviens. L'innervation vagale est surtout importante au niveau de l'estomac et de la partie proximale de l'intestin. Les fibres PS font synapse au niveau des plexus sur les motoneurones excitateurs cholinergiques ainsi que sur les motoneurones inhibiteurs (VIP/NO). L'innervation vagale est impliquée aussi bien dans les contractions que dans les relâchements de la paroi digestive, et également dans la sécrétion de l'estomac. Le PS augmente la motilité, stimule les sécrétions et inhibe les sphincters.

La plupart des fibres sympathiques post-ganglionnaires proviennent des ganglions coeliaque et mésentérique. Les fibres sympathiques sont inhibitrices (diminution de la motilité et inhibition des sécrétions), sauf au niveau des sphincters où elles ont un rôle excitateur.

Parmi les fibres vagues, 80% sont des fibres sensibles (signaux mécaniques, chimiques et thermiques) qui assurent la viscéro-sensibilité en remontant vers le système nerveux central via les nerfs splanchniques (type n°7 dans la Fig. 24) (Timmermans *et al.*, 2001 ; Furness *et al.*, 2004).

Il existe également des neurones sensitifs dans le système nerveux intrinsèque, les IPANs (Intrinsic Primary Afferent Neurons, type n°5 dans la Fig. 24), qui contrôlent principalement la digestion.



n°	Code chimique	Rôle fonctionnel présumé
1a	(ChAT)/VIP	Neurone sécrétomoteur
1b	(ChAT)/VIP	Neurone vasomoteur
2	ChAT/SP	Neurone sécrétomoteur
3	GABA	?
4	VMAT2/TH	?
5	ChAT/CGRP/SP	Neurone afférent primaire intrinsèque (IPAN)
6	ChAT/5-HT/calbindine	Interneurone
7	ChAT/5-HT/calbindine	Neurone viscérofugale
8	NO/calrétine	Interneurone
9	NO/calrétine	Motoneurone inhibiteur pour les muscles circulaires
10	ChAT/SP	Motoneurone excitateur pour les muscles circulaires
11	(ChAT)/(SP)	Motoneurone excitateur pour les muscles longitudinaux
12	NO/(VIP)	Motoneurone inhibiteur pour les muscles longitudinaux
13	ChAT/SOM	Neurone sécrétomoteur ?
14	ChAT/SP	Neurone sécrétomoteur ?
15	NE/SOM	Neurone sympathique post-ganglionnaire
16	NE/NPY	Neurone sympathique post-ganglionnaire vasoconstricteur
17	CGRP/SP	Neurone afférent primaire extrinsèque

**Fig. 24** Classification des types de neurones entériques (Timmermans *et al.*, 2001).

ChAT : acétylcholine transférase ; VIP : vasoactive intestinal peptide ; SP : substance P ; SOM : somatostatine ; CGRP : peptide apparenté au gène de la calcitonine ; 5-HT : sérotonine ; TH : tyrosine hydroxylase ; VMAT-2 : transporteur vésiculaire de monoamine 2 ; NO : monoxyde d'azote ; NE : norépinéphrine.

### 2.3.2 Système nerveux entérique intrinsèque

Le système nerveux intrinsèque ou entérique forme des plexus intramuraux. Le plexus myentérique (ou d'Auerbach) est le plus volumineux. Situé entre les couches musculaires longitudinale et circulaire, il est responsable du contrôle moteur. Le plexus sous-muqueux (ou de Meissner) est moins développé et est impliqué dans les sécrétions gastro-intestinales et le débit sanguin local. Ce dernier peut être subdivisé en un plexus sous-muqueux externe (vers la musculuse) et un plexus sous-muqueux interne (vers la muqueuse) qui sont physiquement séparés par les arcades vasculaires de la sous-muqueuse.

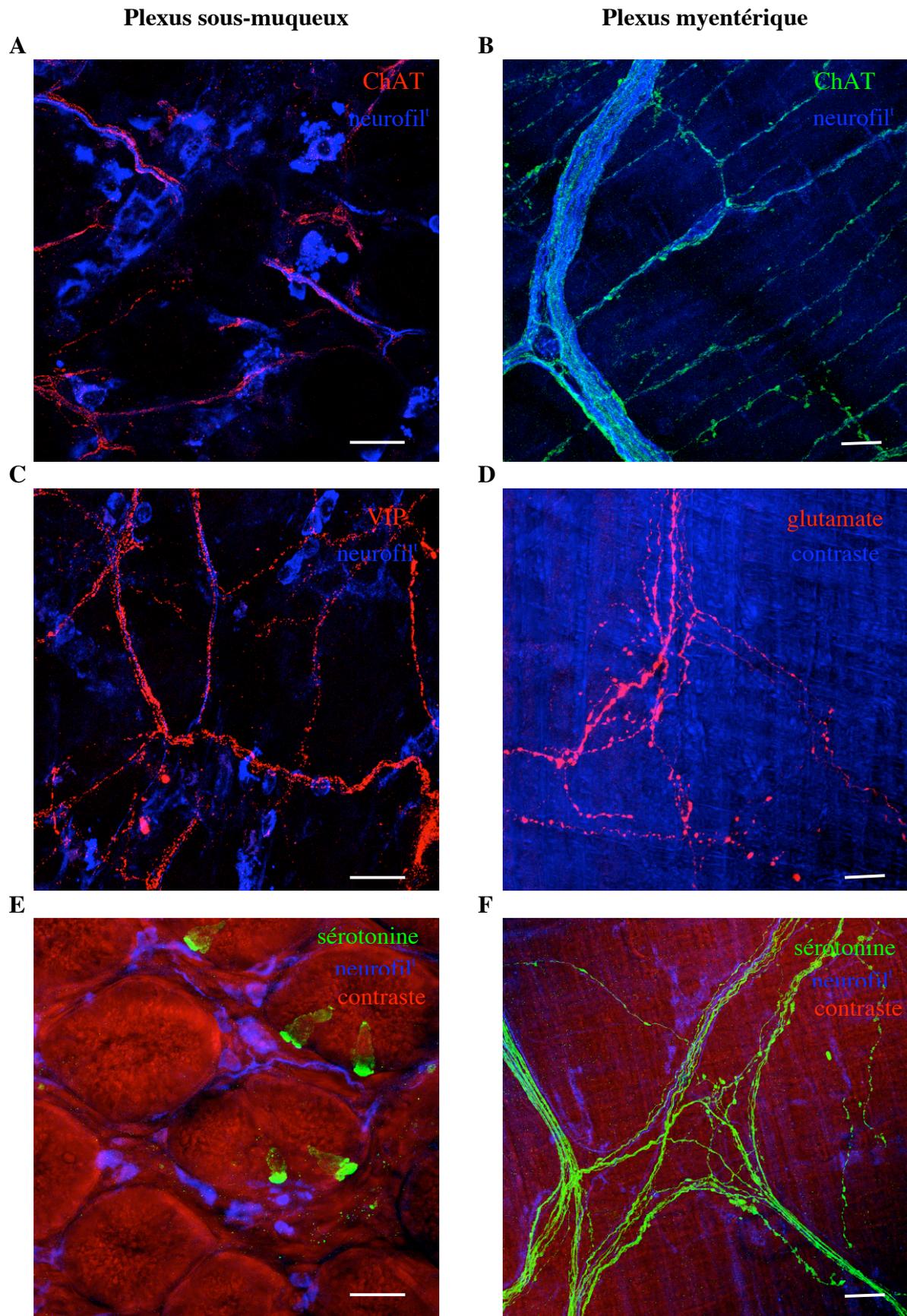
Le système intrinsèque possède une autonomie propre car il est constitué, outre des neurones moteurs, d'interneurones et de neurones sensitifs dont les extrémités afférentes sont au contact de l'épithélium ou de la musculuse. Ces neurones intra-muraux sont capables de s'organiser en boucles réflexes responsables de mouvement de la musculature, de la sécrétion gastrique d'acide, du transport de l'eau et des électrolytes vers la lumière intestinale.

Les plexus myentérique et sous-muqueux forment des réseaux dont les mailles correspondent aux axones ou aux dendrites, et les nœuds aux corps cellulaires regroupés en ganglions. Ces plexus sont également connectés entre eux par de nombreux filets nerveux.

Les neurones peuvent être classés en 14 types selon leur morphologie et les marqueurs chimiques (Furness *et al.*, 2004).

Plus de 30 neuromédiateurs ont été identifiés dans le système nerveux entérique (cf. Fig. 24), comme par exemple :

- L'acétylcholine (ACh) : libérée par les neurones intramuraux commandant la musculature, des interneurones, et des fibres parasympathiques pré-ganglionnaires se projetant dans les plexus ; elle a une action excitatrice sur les muscles et la sécrétion.
- La noradrénaline : libérée par les fibres sympathiques post-ganglionnaires se projetant au niveau des neurones intramuraux ; elle a une action inhibitrice en diminuant la libération d'ACh par les neurones intramuraux et en hyperpolarisant les muscles lisses.
- Les neuropeptides : inhibiteurs (Vaso-Intestinal Peptide (VIP), somatostatine) ou excitateurs (substance P).
- Le monoxyde d'azote (NO) : entraîne la relaxation des muscles lisses.



**Fig. 25** Exemples de marquages en microscopie confocale à fluorescence. (barre = 20  $\mu$ m)  
(Couesnon, non publié)

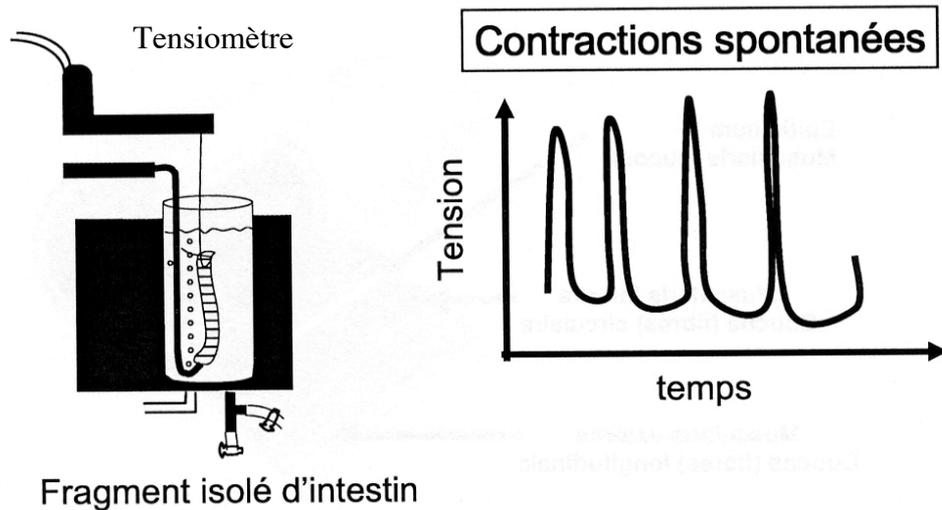
L'innervation cholinergique peut être observée par marquage des fibres avec des anticorps dirigés contre l'acétylcholine transférase (ChAT). Des fibres immunoréactives sont détectées dans le muscle circulaire de l'iléum et un marquage de la ChAT est observé dans des ganglions des deux plexus sous-muqueux (cf. Fig. 25A et B), avec des neurones immunoréactifs plus gros dans le PSE que dans le PSI.

Le marquage de VIP (VasoIntestinal Peptide) souligne l'organisation du système entérique : les mailles du PSE sont plus lâches avec des ganglions, des fibres et des neurones plus gros alors que les ganglions dans le PSI sont abondants (Balemba *et al.*, 1998). Près de la moitié des neurones du plexus sous-muqueux sont immunoréactifs à VIP (cf. Fig. 25C) alors que VIP n'est représenté que dans moins de 20% des neurones du plexus myentérique. Les fibres immunoréactives à VIP sont plus fréquentes dans la lamina propria et dans la couche musculaire circulaire que dans la couche longitudinale. Des varicosités immunoréactives sont également observées dans les villosités sous l'épithélium et autour des cryptes alors que le marquage avec des anti-neurofilaments n'est pas présent.

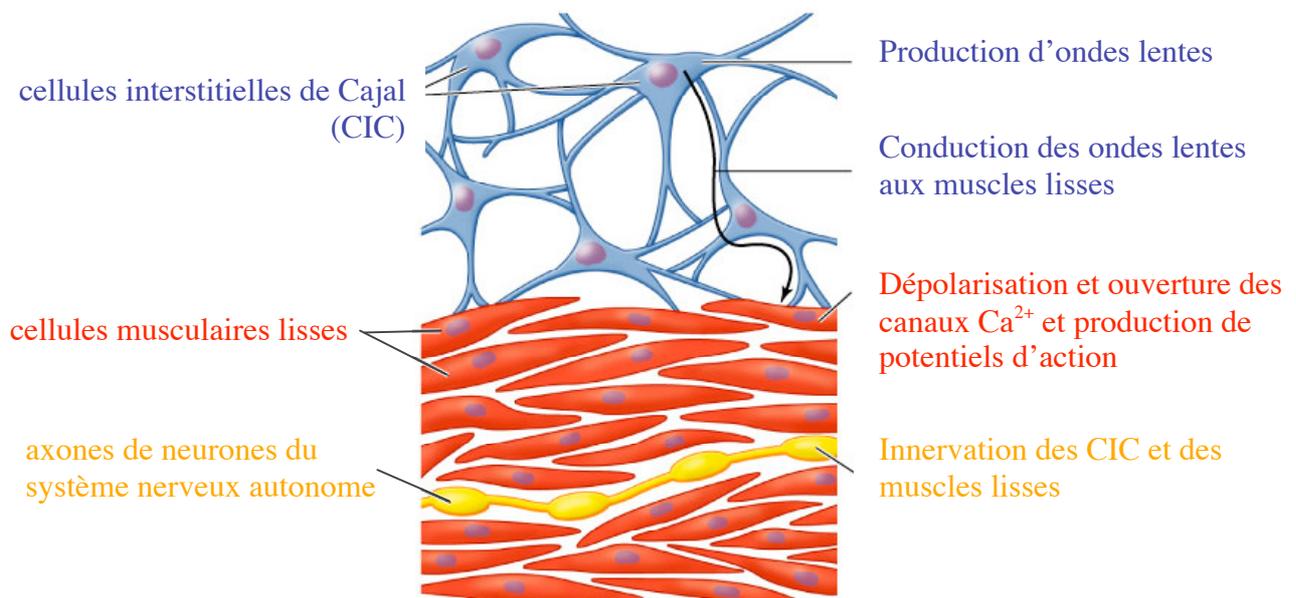
Le glutamate est le neuromédiateur majeur des signaux excitateurs dans le système nerveux central et la plupart de neurones (ainsi que les cellules gliales) ont des récepteurs au glutamate. Ces derniers sont présents au niveau des deux plexus entériques (cf. Fig. 25 D), en particulier au niveau du plexus sous-muqueux où une immunoréactivité à ChAT est observée. Ces neurones co-marqués sont probablement des IPANs excitateurs. Une immunoréactivité pour un récepteur du glutamate est présente au niveau de fibres encerclant les cryptes et au niveau de certaines cellules neuroendocrines.

Le marquage de la sérotonine (5-hydroxytryptamine, ou 5-HT) est détecté au niveau de varicosités et de quelques corps cellulaires du plexus myentérique (cf. Fig. 25F) (Fujimiya *et al.*, 1997). Au niveau du plexus sous-muqueux aucun corps cellulaire neuronal n'est immunoréactif à 5-HT, mais des fibres fortement marquées sont présentes autour des vaisseaux sanguins et dans la lamina propria à proximité des cellules neuroendocrines (ou entérochromaffines) qui sont fortement immunoréactives à 5-HT, surtout au niveau du pôle basal (cf. Fig. 25E). Le réseau de fibres immunoréactives à 5-HT est particulièrement dense sous l'épithélium des cryptes. La sérotonine est synthétisée et stockée dans plusieurs types cellulaires, principalement dans les cellules neuroendocrines (90%) et dans les neurones (10%) du tube digestif.

*Le système nerveux entérique est constitué d'une innervation extrinsèque double (parasympathique et sympathique), impliquée dans la régulation de la motilité et de la sécrétion digestives, et d'une innervation intrinsèque majoritaire. Le système nerveux entérique intrinsèque est organisé en deux plexus : le plexus myentérique, situé entre les couches musculaires longitudinale et circulaire, et le plexus sous-muqueux, localisé dans la sous-muqueuse. Le plexus myentérique assure un contrôle moteur de l'intestin alors que le plexus sous-muqueux est responsable de la régulation des sécrétions gastro-intestinales et du débit sanguin. Il existe un grand nombre de types de neurones associés à divers neuromédiateurs, excitateurs comme l'acétylcholine (ACh) ou la sérotonine (5-HT), ou inhibiteurs comme le polypeptide vasoactif intestinal (VIP).*



**Fig. 26** Automatisme de l'intestin mise en évidence *ex vivo*. Un fragment d'intestin placé dans un bain de solution physiologique oxygéné est capable de se contracter en exerçant une tension à l'une de ses extrémités qui peut être mesurée à l'aide d'un tensiomètre.



**Fig. 27** Schéma de l'action des cellules interstitielles de Cajal au niveau du plexus myentérique. D'après (Sanders, 1996)

### 2.3.3 Automatismes et contrôle nerveux de la motricité digestive

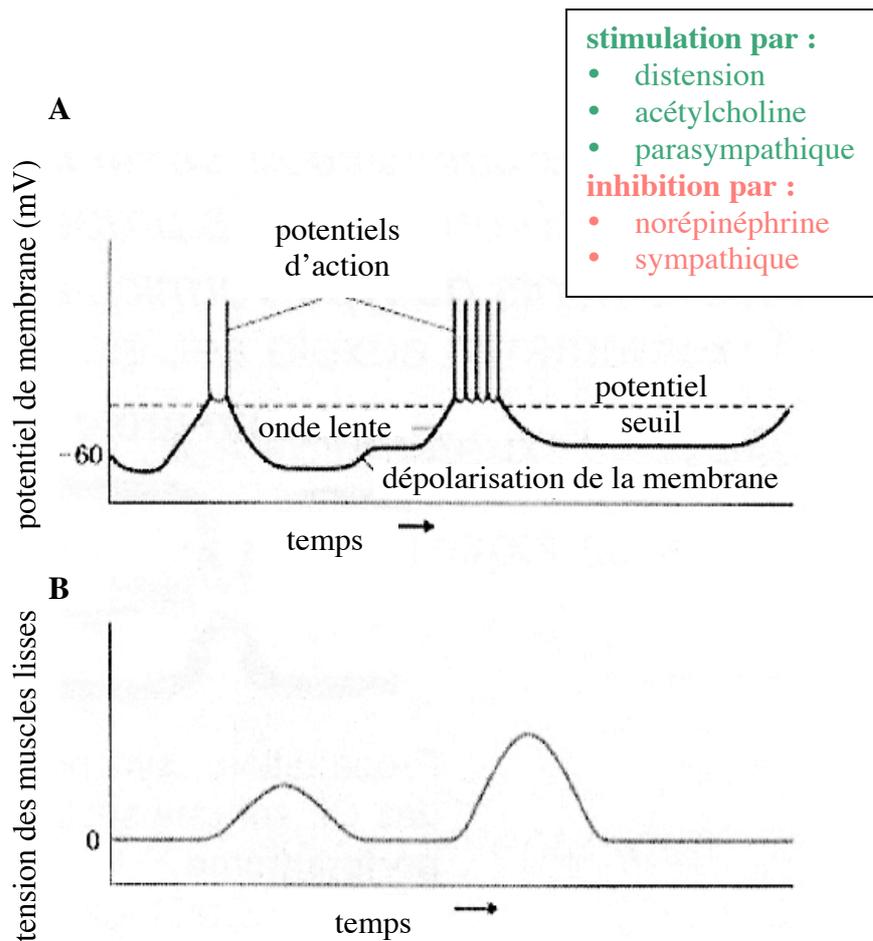
Le rôle principal de l'innervation intrinsèque est d'assurer la coordination du fonctionnement gastro-intestinal dans le sens oral-aboral. Le réflexe péristaltique en est un exemple type (cf. Fig. 26).

L'automatisme du tube digestif repose sur l'existence de cellules spécialisées : les cellules interstitielles de Cajal (CIC). Ce sont des cellules différentes des fibres lisses (elles sont pauvres en éléments contractiles) qui sont principalement localisées entre les couches musculaires longitudinale et circulaire au voisinage du plexus myentérique (cf. Fig. 27). Les CIC ne sont pas dérivées de la crête neurale, c'est-à-dire de l'ectoderme, comme les cellules neuronales mais elles proviennent, comme les cellules musculaires lisses, de cellules précurseurs du mésenchyme (Young, 1999).

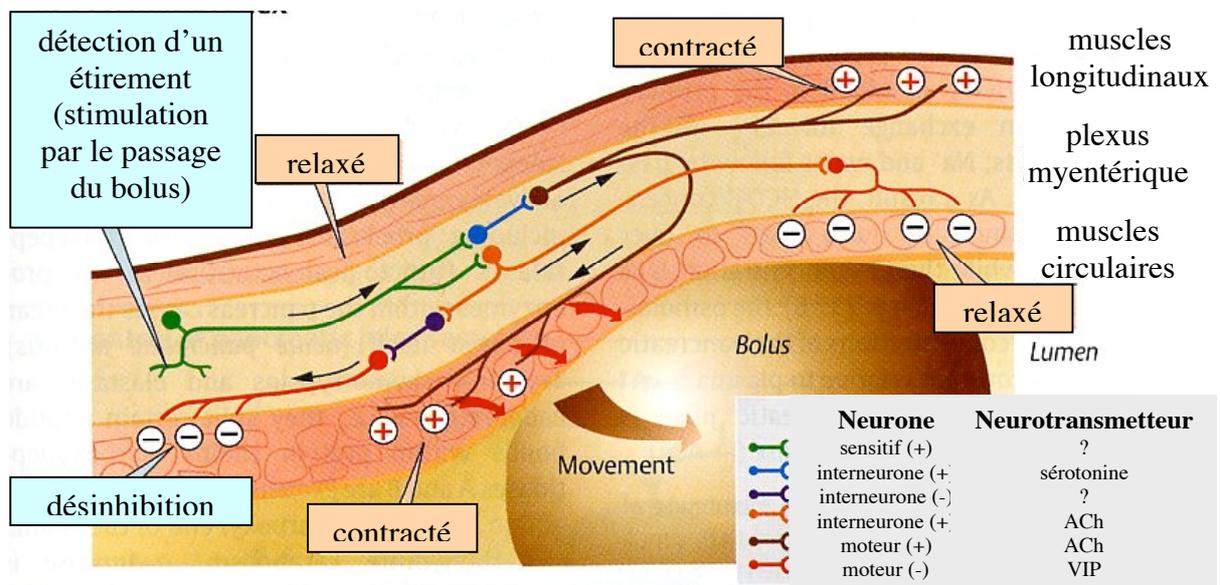
Elles développent de nombreuses ramifications interconnectées pour former un réseau. Elles sont connectées aux cellules lisses par des jonctions serrées, ce qui donne à l'ensemble des propriétés de « câble ».

Les CIC ont quatre fonctions majeures :

- l'automatisme digestif (pacemaker)
- la dépolarisation des cellules musculaires lisses en ouvrant leurs canaux calciques « voltage dépendant », à l'origine des ondes lentes c'est-à-dire des oscillations régulières du potentiel de repos des fibres lisses. Les ondes lentes déterminent le rythme électrique de base dont la fréquence est propre à chaque segment du tube digestif
- la conduction électrique des ondes lentes (propriété de câble)
- la liaison entre les motoneurones (excitateurs ou inhibiteurs) et les fibres lisses.



**Fig. 28** Automatisme de la fibre lisse du tube digestif. (A) Activité électrique et (B) mécanique du muscle lisse intestinal. D'après (Hansen, 2003a)



**Fig. 29** Schéma du rôle du système nerveux entérique dans la progression de l'onde péristaltique. L'étirement de la paroi dû au passage du bol alimentaire active des neurones inhibiteurs et excitateurs entraînant respectivement un relâchement des muscles en aval et une contraction de la couche circulaire permettant la progression du bol. D'après (Hansen, 2003a)

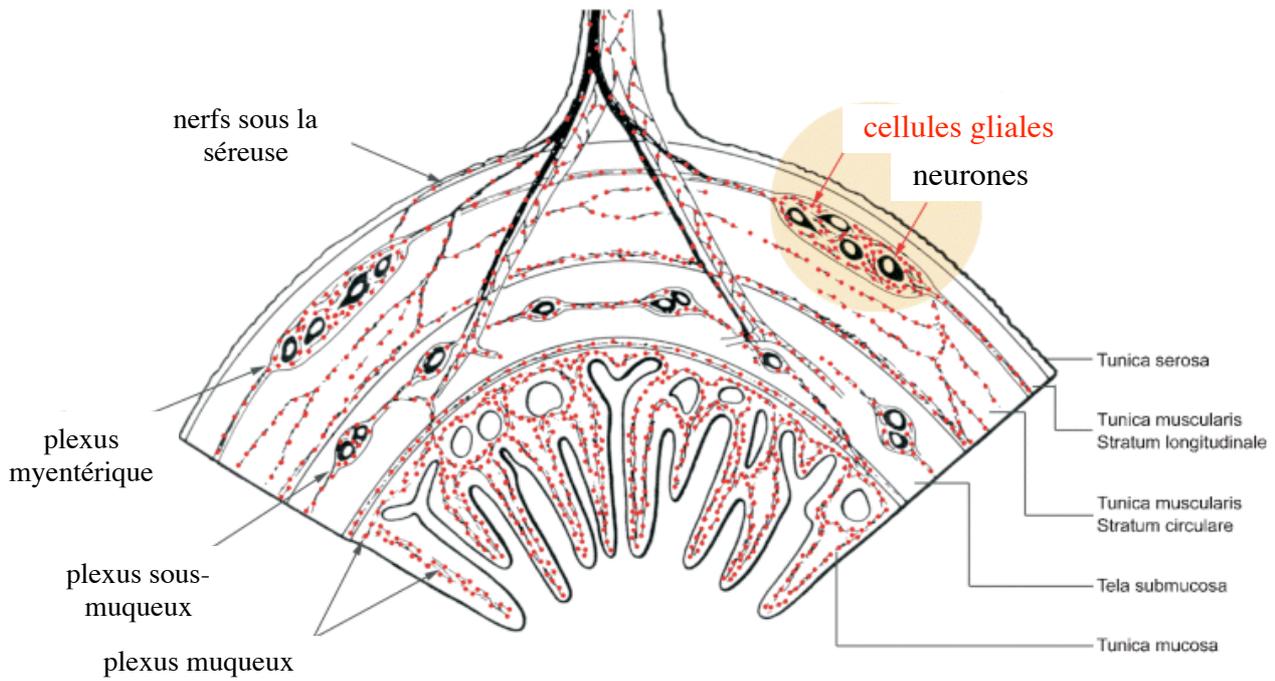
Sous l'influence des CIC et avec une fréquence qui dépend du segment du tube digestif (3-6 / min pour l'estomac, 12-17 / min pour l'intestin grêle et 9-16 / min pour le colon), les fibres lisses se dépolarisent régulièrement. Les dépolarisations partielles (de - 50 mV à - 40 mV) forment des oscillations du potentiel de membrane nommées ondes lentes (cf. Fig. 28A) et leur régularité donne naissance à un rythme électrique de base (REB). La dépolarisation partielle va persister sous la forme d'un plateau qui peut durer jusqu'à 10 sec au niveau de l'estomac. L'onde lente n'est pas à l'origine d'une activité mécanique qui ne sera vue que si le sommet de l'onde lente est surchargé de potentiels de pointe (ou potentiels d'action), correspondant à des dépolarisations presque totales de la fibre lisse (cf. Fig. 28A). La puissance de l'activité mécanique est proportionnelle à la fréquence des potentiels de pointe (cf. Fig. 28B).

La dépolarisation des cellules lisses est due à une entrée de  $Ca^{2+}$  et non de  $Na^+$  comme pour un axone ou une fibre striée. Le muscle lisse est de type unitaire. Il se comporte comme un syncytium électrique, la dépolarisation se propageant d'une cellule à l'autre au niveau des zones de basse résistance, les jonctions communicantes (« gap junctions »). Sur une section donnée de l'intestin grêle, une synchronisation du REB existe entre les fibres lisses, ce qui est l'origine du caractère annulaire de la contraction intestinale. Cette synchronisation est due à la connectivité assurée par les CIC (Komuro, 2006).

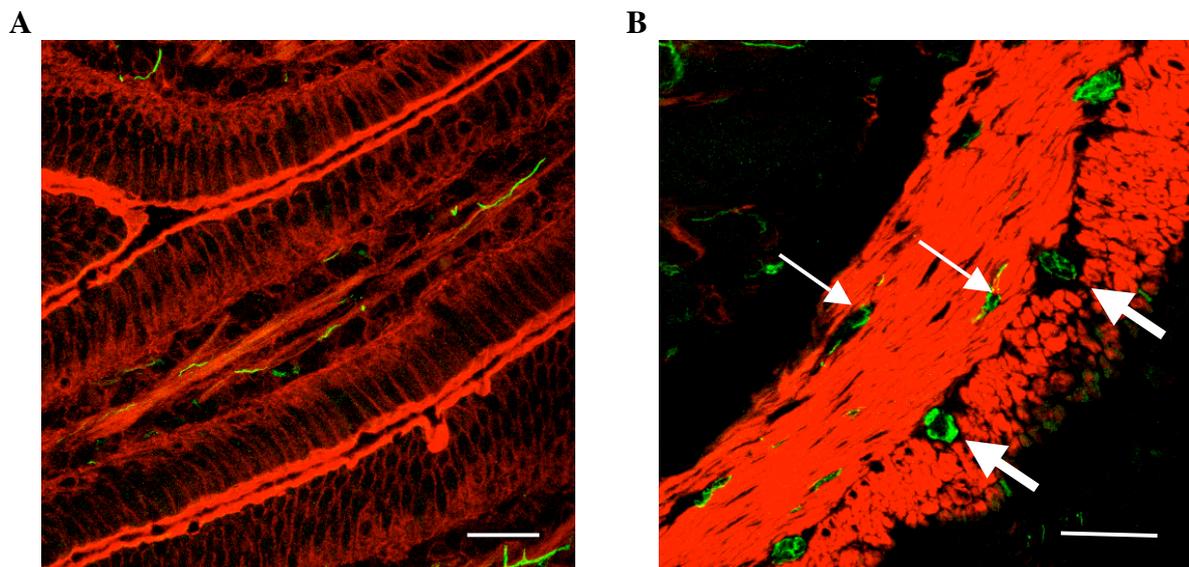
Le système nerveux intrinsèque joue un rôle important dans l'organisation de la motricité du tube digestif puisqu'il est capable d'organiser des mouvements péristaltiques. Une distension provoque une augmentation de la motricité en amont et une diminution en aval, ce qui permet la propulsion des aliments dans le tube digestif.

A la suite d'une distension locale (stimulation de la muqueuse) se produit une excitation d'un neurone sensitif : la sérotonine, libérée par les cellules entéroendocrines, stimule les IPANs (cf. Fig. 29) (Hansen, 2003a). Ces derniers activent plusieurs chaînes d'interneurones en libérant plusieurs neurotransmetteurs dont l'ACh et le glutamate : une chaîne dirigée vers l'amont excite les nerfs cholinergiques commandant la contraction de la musculature circulaire et longitudinale ; deux autres chaînes dirigées vers l'aval excitent respectivement des nerfs inhibiteurs de la musculature circulaire (avec comme médiateurs NO et VIP) et des nerfs cholinergiques commandant la contraction de la musculature circulaire et longitudinale. Ceci aboutit dans un premier temps à une inhibition descendante, puis après un délai, à une excitation descendante, permettant la progression du bol alimentaire .

*Les muscles lisses de la paroi intestinale sont capables de se contracter régulièrement et de manière autonome grâce à la présence de cellules spécialisées, les cellules interstitielles de Cajal (CIC). Principalement localisées au niveau du plexus myentérique, les CIC forment un réseau qui est connecté aux cellules musculaires lisses par des jonctions serrées. Les CIC sont responsables de la dépolarisation des cellules musculaires lisses, à l'origine des ondes lentes (OL), et la conduction électronique de ces OL. Les CIC assurent également la liaison entre les motoneurones (excitateurs ou inhibiteurs) du système nerveux intrinsèque et les fibres lisses. Une distension de la paroi intestinale par le bol alimentaire est à l'origine de l'excitation de neurones sensoriels faisant synapse avec des interneurones qui vont assurer en aval la contraction de la couche longitudinale et en amont la contraction de la couche circulaire. La répétition de cette série d'évènements permet la propulsion des aliments dans l'intestin.*



**Fig. 30** Schéma de la répartition des cellules gliales (points rouges) dans les différentes couches de l'intestin (Ruhl, 2005)

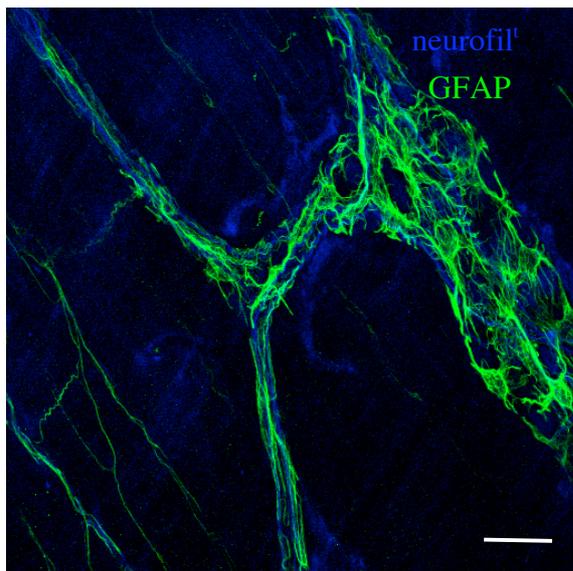


**Fig. 31** Marquage des cellules gliales (GFAP, vert) et des filaments d'actine (phalloïdine, rouge) sur des cryocoupes transversales d'intestin et visualisation de fibres gliales (A) dans les villosités et (B) au niveau du plexus myentérique (flèche large) ou dans la musculature (flèche mince). (Couesnon, non publié) (barre = 20  $\mu$ m).

### 2.3.4 Le système glial entérique

Le système nerveux entérique comprend à la fois les neurones et les cellules gliales (Ruhl, 2005). Bien plus nombreuses que les neurones, les cellules gliales ont tout d'abord été considérées comme de simples éléments de soutien maintenant le système nerveux entérique solidaire (le terme « glia » provient du mot grec signifiant « glue ») (cf. Fig. 30). Les deux plexus entériques forment des ganglions (cf. Fig. 31B) et la plupart des cellules gliales font partie de ces ganglions. Cependant, certaines cellules gliales sont également présentes au niveau des neurofilaments qui interconnectent les ganglions. Elles sont également présentes sous la muqueuse, où leurs extensions entrent en contact étroit avec la couche épithéliale (cf. Fig. 31A), et dans le mésentère accompagnant les nerfs extrinsèques allant au tube digestif (cf. Fig. 30).

Comme les neurones, les cellules gliales dérivent des cellules souches de la crête neurale. Ce sont de petites cellules, en forme d'étoile avec de nombreuses extensions de diverses taille et forme. Dans les ganglions, elles sont tellement serrées autour des neurones que l'espace extracellulaire n'est que de 20 nm. Comme les astrocytes, qui pour leur part font partie du système nerveux central, leur constituant majeur est la protéine fibrillaire acide gliale (GFAP) qui est une protéine des filaments intermédiaires (cf. Fig. 32). Dans l'intestin, la GFAP est considérée comme un marqueur spécifique des cellules gliales (Ruhl, 2005).



**Fig. 32** Vue microscopique des systèmes nerveux neuronal (marquage des neurofilaments en bleu) et glial (marquage de GFAP en vert) au niveau de la musculature intestinale. (Couesnon, non publié) (barre = 20 µm).

Les cellules gliales entériques sont indispensables à la survie des neurones. Cependant, les mécanismes impliqués dans ce soutien restent méconnus. Elles assurent un soutien structural en protégeant le système nerveux qui est soumis à des contraintes mécaniques importantes vu sa localisation entre deux couches musculaires orientées perpendiculairement. Elles sécrètent des facteurs trophiques comme le facteur neurotrophique dérivé des cellules gliales (GDNF) qui pourraient stimuler les neurones. Enfin, elles pourraient assurer un microenvironnement protecteur, par exemple en éliminant les excès de certains cations comme le  $K^+$ . Les cellules gliales pourraient participer à la synthèse et/ou l'inactivation des neurotransmetteurs, ou elles pourraient répondre à des molécules signal et participer directement à la transmission synaptique. Ainsi, elles pourraient avoir un rôle important dans la signalisation par le glutamate et sont sensibles à de nombreux neuromédiateurs comme la sérotonine ou l'acétylcholine. Par ailleurs, les cellules gliales projettent vers les vaisseaux sanguins adjacents des extensions planes qui semblent former une gaine autour des capillaires. Elles pourraient jouer un rôle dans la régulation de la perméabilité endothéliale (Ruhl, 2005).

## 2.4 Etudes *in vivo* de l'interaction de BoNT/A avec l'intestin

L'intestin est un organe structuré en différentes couches de tissus cellulaires spécialisés (muqueuse, sous-muqueuse, musculuse et séreuse) qui lui permettent d'assurer des fonctions vitales d'échange et de défense pour l'organisme. L'intestin est doté d'un système nerveux autonome intrinsèque complexe et reçoit également un contrôle extrinsèque, assurant notamment la motricité digestive. La muqueuse intestinale constitue une barrière physique au passage de molécules, telle la toxine botulique présente dans des aliments contaminés ingérés, dans le milieu intérieur. Afin de mieux comprendre l'interaction des complexes botuliques avec l'intestin, des expériences d'intoxication par voie orale ou l'injection de toxine dans des anses intestinales ligaturées ont été réalisées.

### 2.4.1 Mise en évidence d'une corrélation entre stabilité et toxicité des complexes botuliques

Une des premières études du passage de la toxine botulique à travers la barrière intestinale a été réalisée en 1960 (Heckly *et al.*, 1960). Le modèle animal utilisé était le rat et la toxine employée était de la toxine botulique cristalline de type A, c'est-à-dire sous forme de mélange de complexes L et LL. La méthode de mesure de la taille des complexes appliquée était la détermination du coefficient de sédimentation des particules par ultracentrifugation dans un gradient de glycérol. Ils ont montré que le coefficient de sédimentation de la toxine cristalline injectée dans une anse ligaturée intestinale n'est pas modifié après deux heures d'incubation. De plus, la toxine est apparue en premier dans la lymphe, recueillie par cannulation dans la cysterna chyli. Deux heures après l'injection de  $10^7$  DL<sub>50</sub> dans le duodénum, la quantité de toxine retrouvée dans la lymphe représentait à peu près  $1/10^5$  de la dose initiale, soit environ  $10^2$  DL<sub>50</sub>. La caractérisation par ultracentrifugation des particules retrouvées dans la lymphe a montré que leur taille est uniforme et inférieure à celle de la toxine cristalline. Cependant, du fait de la faible quantité de matériel récupéré, l'activité hémagglutinante n'a pas pu être testée.

En 1969, des expériences similaires avec le type E ont montré que le complexe M est plus stable que BoNT/E à bas pH et à haute température (Kitamura *et al.*, 1969). De plus, la forme détectée dans le sang après administration orale de complexe M a été identifiée comme étant la toxine monocaténaire BoNT/E seule. Quatre heures après l'administration orale de complexe M (environ  $5.10^7$  MLD<sub>50</sub> / mg) à des lapins, le sérum contenait environ  $5.10^2$  MLD<sub>50</sub> / ml, soit un facteur  $1/10^5$  entre la dose ingérée et la dose détectée dans le sérum.

En 1977, plusieurs travaux réalisés par Sakaguchi, Ohishi et Sugii ont montré que les ANTPs des complexes botuliques L et M de type B étaient détectés dans la lymphe de rats injectés par voie intraduodénale (Sugii *et al.*, 1977b). Le site préférentiel d'absorption était le duodénum parmi les autres régions du tractus gastro-intestinal (jéjunum, iléum, caecum, colon, rectum et estomac). Quelque soit la taille des complexes, la même cinétique d'absorption de BoNT/B et des ANTPs a été observée par hémagglutination passive inverse, avec un pic au bout de 2h d'incubation. Cependant, la toxicité de la lymphe prélevée au bout de 6 h et mesurée par injection i.p. chez la souris (LD<sub>50</sub>) est 100 fois plus élevée dans le cas du complexe L (0,01-0,1% de l'inoculum) que dans le cas des complexes M ou de BoNT/B. Une différence notable de stabilité entre les complexes M et L a été observée par une exposition prolongée au jus intestinal de rat à pH 7 (supérieure à 2h), contrairement à l'absence d'inactivation dans la lymphe de rat à pH 8,2. Les différences de toxicité mesurée dans la lymphe entre les complexes M et L pourraient être dues à une susceptibilité différente aux enzymes protéolytiques du duodénum. Par ailleurs, une toxicité faible (inférieure à  $10^2$  DL<sub>50</sub> , soit

moins de  $1/10^5$  de l'inoculum) a été détectée dans la lymphe après administration intraduodénale de complexe L et M de type A, ou de complexe M de type E et F.

L'étude de la corrélation entre la toxicité orale et la stabilité *in vitro* des complexes de type A et B a montré que plus la taille des complexes est grande plus la résistance à l'acidité et aux protéases de type pepsine est importante (Sugii *et al.*, 1977a). La dissociation des complexes n'a pas été observée dans un jus intestinal de pH 7 mais a eu lieu dans une solution saline de même pH. L'hypothèse a alors été émise que la toxicité orale dépendrait majoritairement de la stabilité des complexes dans l'estomac, et dans une moindre mesure dans l'intestin. La résistance dépendrait non seulement de la taille des complexes mais également d'autres facteurs puisqu'il existe des différences de résistance entre les complexes L de type A et B. La remarquable toxicité orale du complexe L de type B a été comparée aux autres formes de complexes botuliques de différents types (Ohishi *et al.*, 1977). Celle-ci est presque 100 fois plus grande que le complexe LL de type A et plus de 1000 fois plus importante que le complexe L de type A. BoNT/A et /B ont des toxicités orales comparables, environ 100 fois moins grande que celle du complexe L de type A.

La relation entre toxicité orale et taille des complexes a également été notée pour les types C et D, dont les formes M auraient une résistance supérieure au jus gastrique mais inférieure au jus intestinal par rapport aux autres types (Ohishi and Sakaguchi, 1980).

Les types C et D ont été presque exclusivement impliqués dans des cas de botulisme animal, en particulier chez les oiseaux. Des expériences menées chez l'oie ont montrées que la dose létale par voie orale du complexe L de type C n'est que 100 fois supérieure à la voie intraveineuse (comparée à un facteur 5000 chez la souris), suggérant une absorption intestinale plus efficace chez l'oie que chez la souris (Ohishi *et al.*, 1981). De plus, il a été observé que les symptômes sont similaires quelque soit la voie d'administration, orale ou intraveineuse.

Contrairement aux travaux présentés ci-dessus, l'absorption *in vivo* de BoNT/A pure au niveau de l'estomac et de l'intestin grêle a été montrée par l'équipe de Simpson (Maksymowych *et al.*, 1999). L'efficacité d'absorption a été quantifiée en mesurant la durée de survie des souris injectées dans des anses ligaturées d'intestin ou dans l'estomac avec les formes L, M ou BoNT/A purifiée. Une différence significative des temps de survie des souris dans le cas d'une injection dans l'intestin par rapport à une injection dans l'estomac a été observée pour la toxine pure, et non pour les complexes M et L. La moins bonne efficacité de BoNT/A au niveau de l'estomac pourrait être due à un métabolisme plus important de la toxine ou à une absorption plus faible.

*BoNT seule serait capable de passer la muqueuse intestinale, et dans une moindre mesure la paroi de l'estomac, et d'exercer son activité létale dans un modèle d'intoxication chez la souris. Cependant, la toxicité orale est beaucoup plus grande lorsque les BoNTs sont sous forme de complexes. Plus la taille des complexes botuliques est importante, plus la toxicité orale est grande. Ceci est notamment dû à la protection des BoNTs de la dégradation par les ANTPs mais cette propriété n'explique pas tous les résultats observés puisque des différences de toxicité sont observées entre complexes de même taille mais de sérotypes différents, et entre les espèces animales intoxiquées.*

#### 2.4.2 Passage de la neurotoxine à travers la barrière intestinale : voies transcellulaire et paracellulaire

L'implication des HAs dans la protection des BoNTS contre la dégradation a donc été mise en évidence par de nombreuses études. Récemment, un autre rôle des HAs a été proposé pour les sérotypes D et A : elles auraient la capacité de perméabiliser l'épithélium intestinal.

En effet, deux voies de passage à travers un épithélium sont possibles : la voie cellulaire (passage dans les cellules) et la voie paracellulaire (passage entre les cellules). La voie cellulaire fait intervenir un mécanisme appelé transcytose qui est détaillé dans la troisième partie de l'introduction.

L'activité spécifique de HA34 de type B a été décrite très récemment sur un modèle de monocouche épithéliale intestinale de Caco-2 (cf. partie 3.2.3 pour le schéma du modèle), (Matsumura *et al.*, 2007). La mesure de la résistance transépithéliale (TER) a été utilisée pour quantifier l'étanchéité des jonctions serrées qui caractérisent un épithélium normal. Une baisse linéaire de la TER a été mesurée sur 48 h après incubation des Caco-2 du côté apical avec le complexe L de type B, mais pas avec le complexe M ou BoNT/B purifiée. Ceci prouve que la baisse de TER est spécifiquement due aux HAs, ce qui a été confirmé par l'inhibition de la baisse de TER après préincubation du complexe L avec un sérum anti-HAs. De plus, l'activité des HAs était beaucoup plus importante lorsque le complexe L a été appliqué du côté basolatéral. La perméabilité des jonctions serrées suite à l'application apicale de complexe L a été visualisée à l'aide de rouge de Ruthénium, ainsi que par le passage de dextrans fluorescents dans le réservoir basolatéral. De plus, une altération des jonctions serrées et d'adhérence a été visualisée en microscopie confocale par marquage de l'occludine et de ZO-1, et de l'E-cadhérine et de l'alpha-caténine respectivement. Par ailleurs, l'effet des HAs sur la TER a pu être généralisée à une lignée de cellules épithéliales rénale (MDCK), laissant penser que d'autres lignées cellulaires pourraient être sensibles à l'activité des HAs. La quantification par la technique de Western blot du transport apical-basolatéral des complexes botuliques à travers les Caco-2 a montré que la forme L était transportée 10 fois plus efficacement que la forme M ou BoNT/B seule sur une période de 24 h, mais avec des niveaux similaires au bout de 12 h. L'inhibition de la baisse de TER induite par l'incubation apicale de complexe L par addition de sérum anti-HAs dans le compartiment basolatéral a montré que les HAs agissent principalement au niveau basolatéral des Caco-2.

L'action des HAs sur la perméabilité de l'épithélium intestinal a été montrée *in vivo* en injectant les ANTPs et des dextrans fluorescents dans des anses intestinales de souris et en détectant 6 h après la présence de fluorescence dans le sérum. L'injection additionnelle d'ANTPs au complexe M dans l'intestin a accéléré la mort des souris, montrant que les ANTPs agissent sur le fonctionnement de la barrière intestinale et facilitent ainsi l'absorption de BoNT ou d'autres protéines par diffusion passive (Matsumura *et al.*, 2007).

Cependant, certains types de *C. botulinum* ne possèdent pas de gènes codant pour des HAs et sont quant même capables de causer des cas de botulisme par voie alimentaire, bien que les toxicités orales soient moindres. Les HAs ne seraient donc pas essentielles mais agiraient comme des facteurs accessoires de pathogenèse pour augmenter la toxicité en facilitant le passage des BoNTs à travers la barrière épithéliale intestinale (Matsumura *et al.*, 2007).

*Les complexes botuliques, et dans une moindre mesure BoNT seule, sont capables de franchir la barrière intestinale et sont détectés dans le milieu intérieur (sang, lymphe). Les ANTPs semblent jouer un rôle de protection des BoNTs lors de leur transit gastrointestinal et pourraient en outre faciliter le passage de la barrière intestinale en augmentant la perméabilité de la muqueuse intestinale.*

**En utilisant le fragment recombinant du domaine Hc de BoNT/A marqué par un fluorophore (Hc/A\*), j'ai essayé de visualiser le trafic du Hc/A\* injecté dans la lumière d'une anse d'iléum de souris ligaturée. Je me suis particulièrement intéressée à l'interaction du Hc/A\* avec les nombreuses terminaisons nerveuses présentes dans la sous-muqueuse et dans la musculuse. L'effet de BoNT/A injectée dans la lumière intestinale sur les contractions spontanées de l'intestin a également été étudié. Il peut être considéré comme un test fonctionnel du passage de la muqueuse intestinale par la toxine et il faut noter que la constipation est un des symptômes précoces couramment signalés lors de cas de botulisme dû à une intoxication alimentaire ou à une toxi-infection (cf. partie 1.3).**

Cependant, le fait que la toxine seule injectée dans la lumière du tube digestif puisse exercer son action létale laisse penser qu'un des mécanismes d'entrée de la toxine est la voie cellulaire. Cette voie est détaillée dans la troisième partie de l'introduction, en décomposant les étapes de liaison aux cellules, trafic intracellulaire et activité enzymatique des BoNTs.

Méthodes	Sensibilité pour le type A
<p><b>Animal entier</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Létalité</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ DL (Dose Létale) : dose minimale pour causer la mort par injection i.p.</li> <li>▪ DL<sub>50</sub> : dose produisant 50% de létalité dans une population d'animaux par injection i.p..</li> </ul> </li> <li>• <b>Durée de survie</b> : inversement proportionnelle à la dose de toxine</li> </ul>	<p>12,5 pg</p> <p>6,25 pg</p> <p>10<sup>2</sup> DL<sub>50</sub></p>
<p><b>Préparations neuromusculaires</b></p> <p>Les tissus musculaires avec leurs nerfs moteurs sont placés dans un bain physiologique et la force de contraction musculaire induite par stimulation électrique est mesurée</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Muscle de la patte postérieure de la souris</li> <li>• Diaphragme et nerf phrénique</li> </ul>	<p>5 DL<sub>50</sub></p>
<p><b>Cellules en culture</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Cellules primaires</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Tissu du cerveau</li> <li>▪ Moelle épinière de fœtus de souris</li> <li>▪ Cellules granulaires</li> </ul> </li> <li>• <b>Lignées immortalisées</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ PC12 : Pheochromocytoma</li> </ul> </li> <li>• <b>Synaptosomes</b> Obtenus par homogénéisation et fractionnement de tissu nerveux, ils sont constitués de la couche lipidique de la membrane cellulaire et des protéines synaptiques</li> <li>• <b>Système nerveux d'Aplysie</b> Ganglions buccal et cérébral</li> </ul>	<p>10<sup>2</sup>-10<sup>3</sup> DL<sub>50</sub></p> <p>10<sup>3</sup> DL<sub>50</sub></p> <p>10<sup>2</sup> DL<sub>50</sub></p> <p>10<sup>5</sup> DL<sub>50</sub></p> <p>10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> DL<sub>50</sub></p> <p>10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> DL<sub>50</sub></p>
<p><b>Méthodes Immunologiques</b></p> <p>Distinction des différents composants des complexes botuliques grâce à leurs propriétés immunologiques</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Test d'hémagglutination passive</b> Les hématies liées à des anticorps spécifiques des différents composants du complexe s'aggrègent en présence de ceux-ci.</li> </ul>	<p>1 DL<sub>50</sub></p>
<p><b>Mesure de l'activité endopeptidase</b></p> <p>Etude du clivage de la cible de chaque type de toxine</p>	<p>&lt; 1 DL<sub>50</sub></p>

**Tab. 4** Exemples de méthodes de détection et de mesure de l'activité des BoNTs. D'après (Pearce *et al.*, 1997).

### **3 Liaison, entrée et trafic des neurotoxines botuliques dans les cellules neuronales et intestinales**

Les cellules cibles des neurotoxines botuliques sont, comme leur nom l'indique, des cellules neuronales. Le botulisme se manifeste par une paralysie flasque suite à l'action des BoNTs sur le système nerveux périphérique se traduisant par un blocage de la neurotransmission, c'est-à-dire le transfert d'informations des neurones vers d'autres cellules notamment musculaires. Ce blocage résulte de l'inhibition de la libération des neurotransmetteurs, qui sont les « agents » de ce transfert d'informations, au niveau de zones spécialisées appelées synapses. Les neurotoxines ciblent spécifiquement les jonctions neuromusculaires en agissant au niveau des terminaisons pré-synaptiques des motoneurones.

Du fait de leur taille, les BoNTs ne peuvent pas atteindre directement le système nerveux central puisque l'endothélium de la barrière hémato-encéphalique empêche la diffusion des protéines du plasma sanguin vers le fluide cérébro-spinal, sauf peut-être au niveau des rares endroits où les capillaires sanguins sont fenestrés. L'action sur le système nerveux central pourrait également être indirecte due à une altération de l'intégration des signaux sensitifs par l'action directe des BoNTs ; entraînant donc des changements centraux secondaires (Curra *et al.*, 2004). Par ailleurs, à forte dose les BoNTs sont capables d'atteindre le système nerveux central, probablement par transport rétrograde comme le fait la neurotoxine tétanique (Wellhöner, 1992).

Les cellules épithéliales intestinales, qui constituent une barrière physique à l'entrée dans le milieu intérieur de l'organisme, pourraient jouer le rôle de cellules de transport des BoNTs, ce qui leur permettrait ensuite d'atteindre les terminaisons nerveuses.

Si le mécanisme d'action intracellulaire des BoNTs au niveau des cellules neuronales est relativement bien connu, les étapes de reconnaissance des récepteurs et de transport cellulaires des BoNTs commencent seulement à être détaillées.

La remarquable toxicité des neurotoxines (0,1 à 1 ng / kg de poids corporel) *in vivo* est due à leur spécificité pour les neurones et à leur activité catalytique qui a des conséquences très importantes sur la neurotransmission. Afin de détecter les toxines et d'étudier leur mode d'action, plusieurs méthodes et systèmes ont été développés et quelques exemples sont regroupés dans un tableau (cf. Tab. 4). Les sensibilités de chaque méthode pour BoNT/A sont également indiquées.

Cependant, la plupart des modèles *in vitro* ou même *ex vivo* restent relativement peu sensibles en comparaison avec les doses retrouvées dans les cas naturels de botulisme. Malgré leurs limites, ils permettent d'élucider peu à peu les étapes de l'intoxication botulique dont voici les principaux résultats, en commençant par l'étape de liaison des toxines aux cellules et l'identification des récepteurs cellulaires.



### 3.1 Liaison des neurotoxines botuliques aux récepteurs cellulaires

La liaison aux récepteurs cellulaires est la première étape du processus d'intoxication mais elle est primordiale car elle détermine le type de cellule cible ainsi que la voie d'entrée de la toxine. Une fois dans la circulation générale, les BoNTs se lient très spécifiquement à la membrane présynaptique des terminaisons nerveuses des motoneurones.

Il a été montré que le domaine C-terminal (Hc) de la chaîne lourde des BoNTs est impliqué dans la liaison spécifique des BoNTs aux neurones (Bandyopadhyay *et al.*, 1987; de Paiva *et al.*, 1993).

Le rôle des gangliosides dans la liaison aux neurones a été mis en évidence précocement (Kitamura *et al.*, 1980 ; Bigalke *et al.*, 1986 ; Schengrund *et al.*, 1991). Mais ces molécules ne sont pas uniquement présentes dans les membranes des neurones et n'expliquent donc pas à elles seules la spécificité des BoNTs.

Seuls, les gangliosides constitueraient des sites de liaison non toxigéniques et ne pourraient être pleinement fonctionnels qu'en association avec un récepteur protéique (Kitamura *et al.*, 1980 ; Nishiki *et al.*, 1996a ; Yowler *et al.*, 2002; Jin *et al.*, 2006; Rummel *et al.*, 2007).

L'hypothèse d'un récepteur mixte gangliosides – protéine a donc été émise.

#### 3.1.1 Les gangliosides

Les gangliosides sont des glycosphingolipides sialylés (cf. Tab. 5) qui sont présents dans le feuillet externe des membranes de certaines cellules, en particulier au niveau des synapses. Leur diversité est régulée par des glycosyltransférases spécifiques (Bullens *et al.*, 2002).

Notamment la GD3 synthase sépare deux séries de gangliosides (cf. Fig. 33) :

- La série a : gangliosides dérivant de GM3
- La série b : gangliosides dérivant de GD3.

La GM2/ GD2 synthase ( $\beta$ 1,4 GalNAc transférase) conduit à la formation de gangliosides dits complexes (cf. Fig. 33) (Bullens *et al.*, 2002).

Par ailleurs, les gangliosides coexistent avec le complexe SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptor) dans des domaines spécialisés de la membrane enrichis en cholestérol appelés radeaux lipidiques ou lipid rafts (Chamberlain *et al.*, 2001; Lang *et al.*, 2001). Il a été montré que les gangliosides constituent des récepteurs naturels pour certaines toxines bactériennes, comme GM<sub>1</sub> pour la toxine cholérique produite par *Vibrio cholerae* (Griffiths *et al.*, 1986), GB<sub>3</sub> pour la toxine Shiga produite par *Shigella flexneri* (Shimizu *et al.*, 2007) ou GM<sub>2</sub> pour la toxine Delta produite par *Clostridium perfringens* (Alouf and Jolivet-Reynaud, 1981).

Composé	Gangliosides liés
BoNT/A	GD <sub>1a</sub> , GD <sub>1b</sub> , GT <sub>1b</sub> , GQ <sub>1b</sub>
BoNT/B	GD <sub>1a</sub> , GD <sub>1b</sub> , GT <sub>1b</sub>
BoNT/C1	GD <sub>1a</sub> , GD <sub>1b</sub> , GT <sub>1b</sub>
BoNT/D	GT <sub>1b</sub>
BoNT/E	GD <sub>1a</sub> , GT <sub>1b</sub> , GQ <sub>1b</sub>
BoNT/F	GD <sub>1a</sub> , GD <sub>1b</sub> , GT <sub>1b</sub>
BoNT/G	∅
HA34/A	nLc <sub>4</sub> , Lac-Cer, asialo- GM <sub>1</sub> , Gb <sub>3</sub> , Gb <sub>4</sub>
HA34/C	nLc <sub>4</sub> , SnLc <sub>4</sub> , GM <sub>3</sub>
HA70/C	SnLc <sub>4</sub> , GM <sub>3</sub>

**Tab. 6** Tableau récapitulatif des gangliosides liés par les complexes botuliques. D'après (Yowler and Schengrund, 2004)

### 3.1.1.1 Liaison des BoNTs aux gangliosides

Le rôle des gangliosides a été suggéré par des expériences *in vitro* de liaison et d'activité des BoNT/A et de TeNT. Ainsi, GT<sub>1b</sub> est le plus efficace pour détoxifier BoNT/A et empêcher la liaison de la toxine marquée à l'iode 125 (I<sup>125</sup>) aux synaptosomes (Kitamura *et al.*, 1980). De plus, le traitement à la neuraminidase de cellules en culture de moelle épinière de souris inhibe l'action de BoNT/A et la liaison de la toxine marquée aux cellules (Bigalke *et al.*, 1986). Il a été montré que BoNT/A se lie aux cellules chromaffines de bœuf dont la membrane contient GD<sub>1a</sub> contrairement à TeNT qui reconnaît GD<sub>1b</sub> et GT<sub>1b</sub> absents dans ces cellules. L'enrichissement des membranes avec un mélange de gangliosides augmente l'efficacité de BoNT/A et rend les cellules sensibles à TeNT (Marxen *et al.*, 1989).

Il résulte de diverses études que chaque sérotype, en dehors du type G est capable de se lier spécifiquement aux différents gangliosides séparés par chromatographie en couche mince. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 6 (Yowler and Schengrund, 2004). Ils montrent que les BoNTs se lient préférentiellement aux gangliosides complexes de la série b. Les HAs de certains sérotypes sont également capables de reconnaître des gangliosides, mais ils appartiennent à d'autres séries que ceux reconnus par les BoNTs (Inoue *et al.*, 2001; Fujinaga *et al.*, 2004). Par ailleurs, des souris knock-out (k.o) pour le gène de la synthase GM<sub>2</sub>/GD<sub>2</sub>, qui conduit à l'absence de synthèse des gangliosides complexes, sont moins sensibles à BoNT/A (Kitamura *et al.*, 1999). De plus, l'inhibition de la synthèse des gangliosides par le PPMP (DL-threo-1-phényl-2-palmitoylamino-3-morpholino-1-propanol) dans des neuroblastomes murins exprimant des gangliosides de la série b empêche l'action de BoNTA. La complémentation par incubation des cellules traitées avec GT<sub>1b</sub> restaure l'activité de la toxine (Yowler *et al.*, 2002).

L'identification du ou des site(s) de liaison aux gangliosides des BoNTs a été réalisée en suivant les découvertes faites pour TeNT. Des expériences préliminaires sur BoNT/E ont montré que le domaine Hc est associé à la liaison aux gangliosides (Kamata *et al.*, 1986). Le rôle critique des 34 derniers résidus de la partie C-terminale du Hc dans la liaison à la partie oligosaccharide des polysialogangliosides a été ensuite démontré (Shapiro *et al.*, 1997). L'analyse cristallographique aux rayons X de la structure de BoNT/A et de BoNT/B (Lacy *et al.*, 1998 ; Swaminathan and Eswaramoorthy, 2000) a permis d'identifier un site de liaison unique aux gangliosides, contrairement aux deux sites de liaison présents sur TeNT (Rummel *et al.*, 2003 ; Rummel *et al.*, 2004b).

La caractérisation de l'interaction de BoNT/A avec GT<sub>1b</sub> par résonance plasmonique de surface a révélé que GT<sub>1b</sub> se lie à la toxine avec un K<sub>D</sub> de 0,1 µM et induit un changement de conformation de la toxine qui pourrait lui permettre de se lier à une protéine nécessaire à son internalisation ou de faciliter les étapes suivantes de son transport du milieu extracellulaire vers le cytosol (Yowler and Schengrund, 2004).

Le fait que GT<sub>1b</sub> constitue un meilleur ligand que GD<sub>1a</sub> ou GM<sub>1</sub> pour BoNT/A semble indiquer que la présence de multiples acides sialiques est nécessaire à une liaison optimale. Cependant la partie oligosaccharide de GT<sub>1b</sub> est un ligand bien moins efficace que le ganglioside entier pour la toxine (Schengrund *et al.*, 1991), ce qui montre que la portion céramide joue également un rôle dans la reconnaissance. Les similarités entre les portions céramides de GM<sub>1</sub>, GD<sub>1a</sub>, GD<sub>1b</sub> et GT<sub>1b</sub> et le fait que la portion céramide fait partie de la bicouche lipidique laissent penser que les céramides ne constitueraient pas des sites fonctionnels de liaison mais serviraient à présenter à la toxine un regroupement (cluster) de résidus oligosaccharidiques.



### 3.1.1.2 *Liaison des hémagglutinines aux gangliosides*

Les études réalisées sur les complexes botuliques ont mis en évidence la liaison des hémagglutinines de certains types avec les gangliosides :

- HA34 /A au paragloboside et à l'asialo-GM<sub>1</sub> (Inoue *et al.*, 2001).
- HA34/C1 (et HA52/C1 dans une moindre mesure) au sialylparagloboside et à GM<sub>3</sub> (Fujinaga *et al.*, 2004).

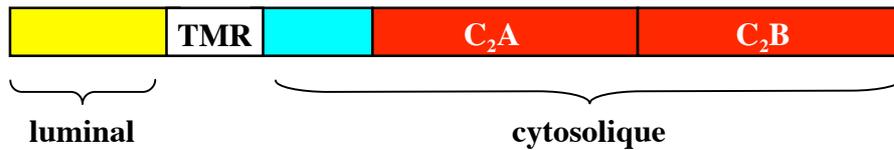
De plus, la capacité des protéines recombinantes HA34/C1 et HA70/C1 en fusion avec la GST (Glutathione-S-Transférase) à se lier aux cellules épithéliales intestinales a été montrée sur des coupes en paraffine d'intestin de cobaye par détection immunochimique indirecte (Fujinaga *et al.*, 2004). Certaines hémagglutinines pourraient donc jouer un rôle dans la liaison des complexes botuliques de type C1 aux cellules intestinales.

L'implication des gangliosides dans la liaison des complexes botuliques de type A aux cellules intestinales a également été étudiée. Les résultats obtenus en ELISA ont révélé que la portion N-acétyl lactosamine située en position terminale sur l'oligosaccharide est essentielle à la liaison des complexes de type A et que cette moitié synthétique est capable de se lier fortement au complexe (Kojima *et al.*, 2005). Les moitiés peptidiques ou lipidiques n'auraient que peu de rôle dans la liaison des oligosaccharides aux complexes de type A, ce qui est en désaccord avec les résultats trouvés *in vitro* par Yowler et Schengrund (Yowler and Schengrund, 2004).

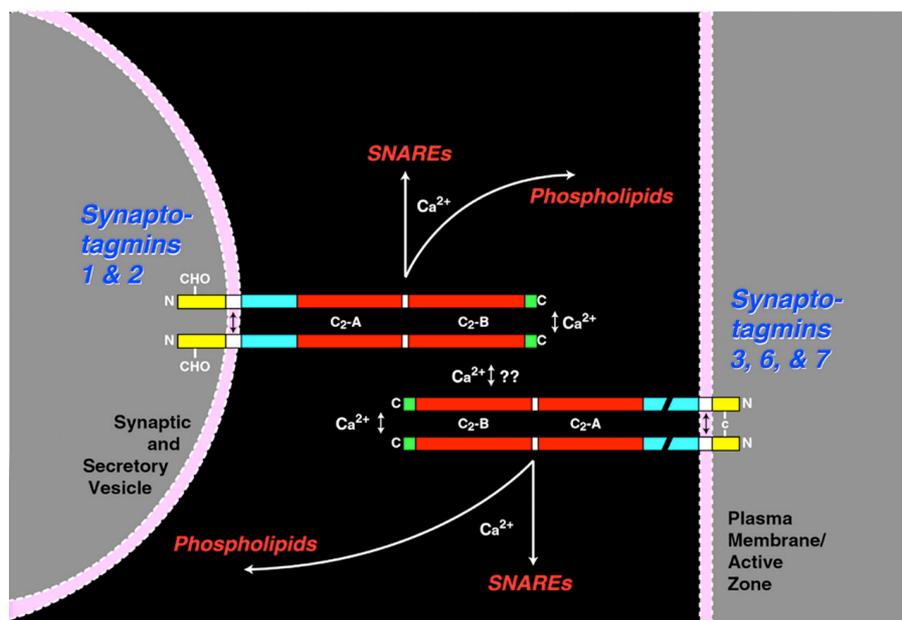
*Certains gangliosides semblent donc impliqués dans la liaison des neurotoxines botuliques aux cellules neuronales et intestinales mais le rôle des hémagglutinines reste un sujet à débat.*

Il existe également des variations importantes selon les toxinotypes, notamment en ce qui concerne le type D. Il semblerait qu'il n'y ait pas de récepteur de nature protéique pour BoNT/D. En effet, des synaptosomes traités avec diverses protéases ou à la chaleur n'ont pas perdu leur affinité pour Hc/D. De plus, il a été montré que Hc/D interagit avec le phosphatidyléthanolamide et que son activité est indépendante des gangliosides, contrairement à Hc/C qui reconnaît GD<sub>1b</sub> et GT<sub>1b</sub> comme récepteurs fonctionnels sur des synaptosomes (Tsukamoto *et al.*, 2005).

Par ailleurs, des récepteurs de nature protéique ont été identifiés pour les types B et plus récemment A, ce qui étaye le modèle de double récepteur : un sous-domaine du Hc liant les polysialogangliosides et un sous-domaine liant différentes glycoprotéines selon les types de BoNTs (Chai *et al.*, 2006; Jin *et al.*, 2006 ; Rummel *et al.*, 2007 ).



**Fig. 34** Schéma de la structure des synaptotagmines (Syts). Les Syts sont des protéines insérées dans la membrane plasmique ou vésiculaire par leur région transmembranire (TMR) qui sépare un domaine luminal (ou extracellulaire) et un domaine cytosolique. D'après (Sudhof, 2002)



**Fig. 35** Schéma représentant la géométrie des synaptotagmines au niveau des vésicules synaptiques ou de sécrétion. Une classe de synaptotagmines (Syt I et II, et probablement 4, 9 et 11) est localisée sur les vésicules synaptiques ou les granules de sécrétion, alors qu'une seconde classe (Syt 3, 6, 7, voire d'autres) est présente au niveau de la membrane plasmique., créant un arrangement symétrique de récepteurs du signal  $Ca^{2+}$  en opposition. Toutes les synaptotagmines forment probablement des dimères via l'interaction de leurs régions transmembranaires (Alber *et al.*) et/ou des ponts disulfures entre les domaines N-terminaux extracytoplasmiques pour la deuxième classe. D'après (Sudhof, 2002)

### 3.1.2 Les protéines impliquées dans la liaison des BoNTs aux cellules

#### 3.1.2.1 Les synaptotagmines I et II

Le premier récepteur protéique identifié pour les BoNTs a été la synaptotagmine. Les synaptotagmines (Syts) forment une famille d'une douzaine de protéines membranaires de transport, caractérisées par un unique domaine transmembranaire N-terminal et un large domaine cytoplasmique C-terminal C<sub>2</sub> comprenant deux copies répétées d'une séquence homologue au domaine régulateur de la protéine kinase C (cf. Fig. 34). Les Syts I et II semblent fonctionner comme des protéines réceptrices du signal Ca<sup>2+</sup> pour l'exocytose dans les vésicules synaptiques (cf. Fig. 35). Les autres isoformes sont moins bien caractérisés mais ils sont souvent co-exprimés avec les Syts I et II dans le cerveau et leur séquences sont conservées (Sudhof, 2002).

Il a été montré que Syt I et II se lient à BoNT/B en présence de gangliosides, avec un K<sub>D</sub> de 2,3 nM et 0,23 nM respectivement, mais sans la preuve que cette liaison assure l'entrée de BoNT/B dans les cellules (Nishiki *et al.*, 1996a; Nishiki *et al.*, 1996b). La liaison de BoNT/A et /E à la synaptotagmine I, indépendamment de la présence de gangliosides, a également été rapportée (Li *et al.*, 1998).

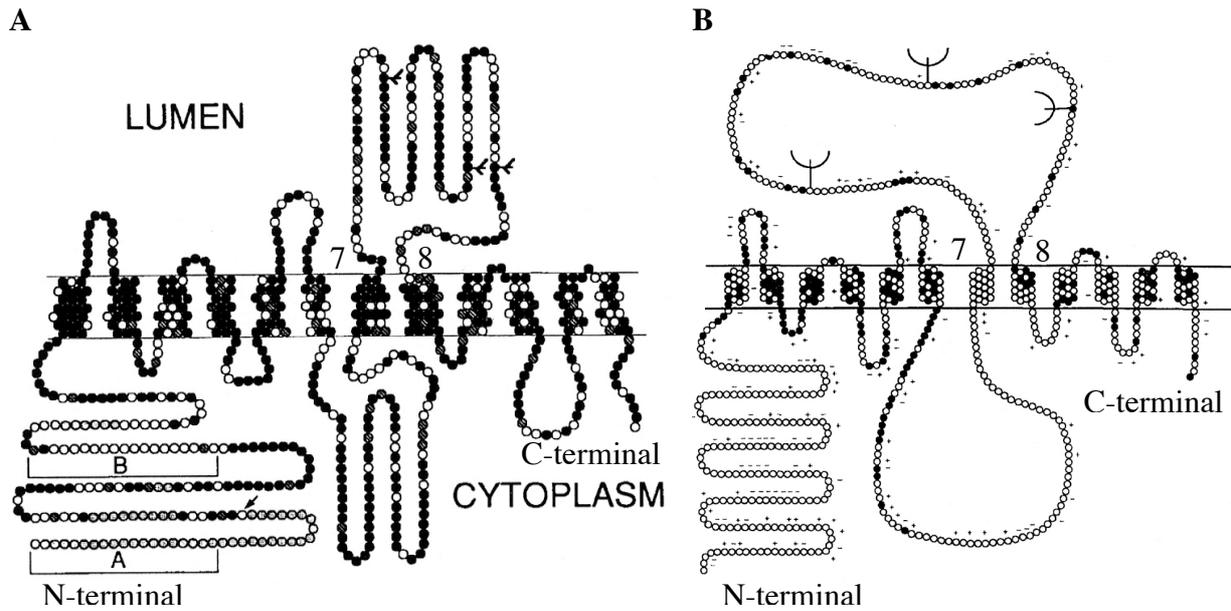
La preuve de l'implication des synaptotagmines I et II dans l'entrée de BoNT/B, mais pas celle de BoNT/A ou /E, dans les cellules PC12 (une lignée de cellules neuroendocrines) a été apportée en 2003 (Dong *et al.*, 2003). De plus, l'entrée de BoNT/B dans les PC12 est bloquée par le fragment minimal 1-267 de Syt II et ce fragment en association avec les gangliosides est capable de neutraliser la toxicité de BoNT/B chez la souris. Ceci prouve que les Syts I et II sont des récepteurs protéiques fonctionnels pour BoNT/B.

De même, les Syts I et II sont les récepteurs protéiques neuronaux de BoNT/G, indépendamment de la présence des gangliosides, mais pas des 5 autres types de BoNTs ou de TeNT (Rummel *et al.*, 2004a). Il a été également prouvé que les domaines Hc/G et Hc/B sont responsables de la liaison avec ces récepteurs protéiques.

Par ailleurs, il a été montré que HA34/A est capable de lier *in vitro* à la synaptotagmine II recombinante et de se fixer aux synaptosomes (Zhou *et al.*, 2005). Le rôle de HA34/A ne serait donc pas uniquement la protection de BoNT/A contre la dégradation. HA34/A pourrait être impliquée dans la liaison aux récepteurs sur les cellules neuronales.

Le modèle de double récepteur a été récemment confirmé par l'identification des sites de liaison aux récepteurs protéiques des BoNT/B et /G au niveau de l'extrémité C-terminale du Hc (Rummel *et al.*, 2007). La désactivation des sites de liaison identifiés par des mutations ponctuelles dans la séquence protéique (sites de liaison aux gangliosides et aux Syts) a diminué de façon drastique la liaison aux Syts et la toxicité des BoNTs sur des hémidiaphragmes. Ceci exclut donc la contribution significative de sites de liaison supplémentaires au niveau du Hc.

Du fait de la localisation des synaptotagmines dans les vésicules synaptiques, des anticorps dirigés contre le domaine luminal de Syt I ont été utilisés pour suivre les mécanismes d'endocytose au niveau des synapses. Lors de ces expériences, un double marquage des cellules neuronales a été réalisé sur une autre protéine des vésicules synaptiques appelée SV2 et a montré une colocalisation importante et un fort marquage des filopodes (Matteoli *et al.*, 1992).



**Fig. 36** Topologie prédite de SV2. (A) Les cercles noirs représentent des acides aminés (aa) communs entre les isoformes A et B, les cercles hachurés des différences conservatives, les cercles blancs les différences non conservatives et les cercles pointillés les aa présents seulement chez SV2A. (B) Les cercles noirs représentent des aa communs à SV2 et au moins un des transporteurs de sucre, les cercles pointillés des homologies avec les transporteurs de neurotransmetteurs. Les trois sites potentiels de glycosylation sont situés entre les domaines transmembranaires prédits 7 et 8 (Feany *et al.*, 1992; Bajjalieh *et al.*, 1994 ).

### 3.1.2.2 *La protéine des vésicules synaptiques SV2*

Le récepteur protéique de BoNT/A a été identifié récemment comme étant SV2 (Synaptic Vesicle 2), une autre protéine des vésicules synaptiques.

SV2 a été décrite pour la première fois en 1985 comme un glycoprotéine transmembranaire de 100 kDa environ présente dans les vésicules de sécrétions des cellules neuronales et endocrines chez les espèces animales des cinq classes de vertébrés (Buckley and Kelly, 1985). SV2 est présente dans toutes les vésicules synaptiques quelque soit leur contenu en neurotransmetteur (amines, acétylcholine, GABA, glycine). La protéine SV2 a été isolée d'un organe électrique d'éelasmobranch qui contenait un épitope supplémentaire, SV1, qui n'est retrouvé nulle part ailleurs dans le système nerveux du poisson. La large distribution de SV2 ainsi que sa conservation au cours de l'évolution suggèrent un rôle central dans la fonction présynaptique.

La taille prédite de SV2 est 82 kDa mais la variabilité de sa glycosylation explique les différentes tailles observées lors de sa migration sur gel de polyacrylamide. L'analyse d'hydrophobie a révélé la présence de 12 domaines potentiels d'insertion dans la membrane. La région N-terminale a été identifiée comme étant cytoplasmique et la région entre les domaines transmembranaires 7 et 8 intravésiculaires (cf. Fig. 36A) (Feany *et al.*, 1992).

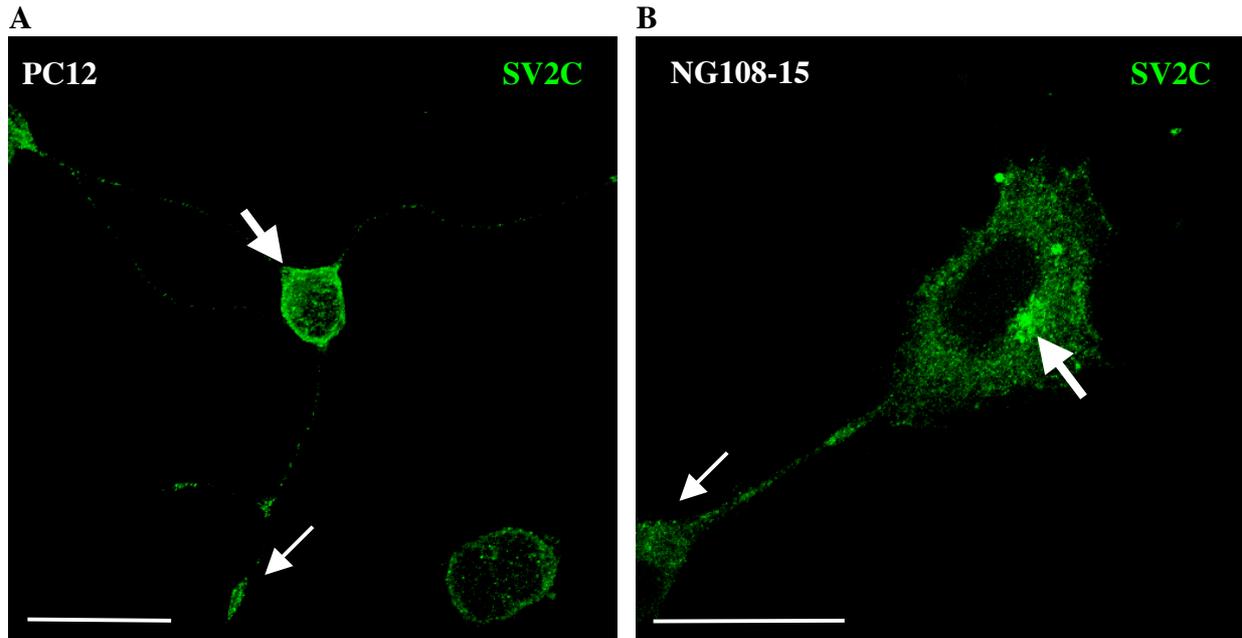
Des analogies de séquences remarquables ont été observées entre SV2 et deux sous-familles de transporteurs transmembranaires (cf. Fig. 36B) (Feany *et al.*, 1992) :

- Le domaine N-terminal avec des transporteurs de sucres de mammifères
- Le domaine C-terminal avec la partie C-terminale des transporteurs membranaires des neurotransmetteurs.

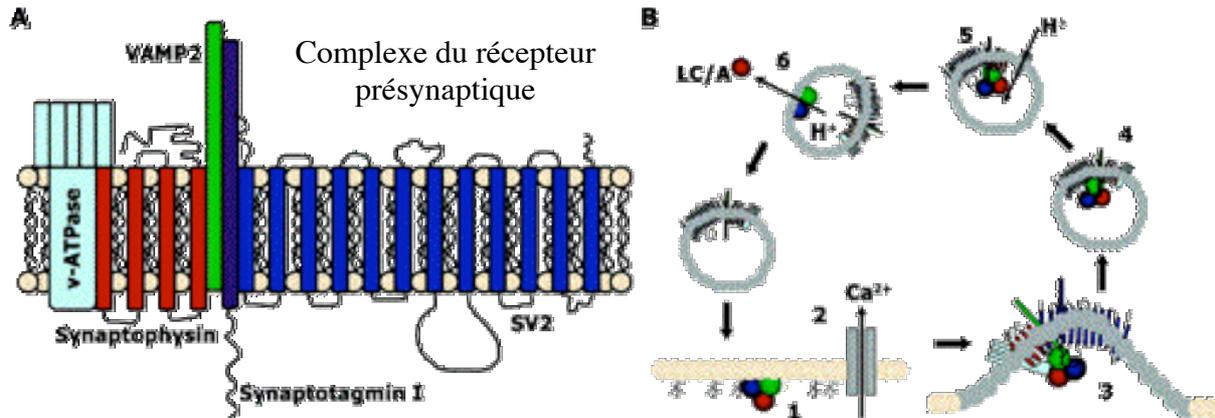
SV2 serait donc un exemple de transporteur chimère dont les deux domaines sont homologues à deux familles différentes de transporteurs.

Un autre isoforme de SV2 nommé SV2B fût identifié en 1992. Homologue à 78% à SV2A et localisé dans les membranes intracellulaires, son expression est détectée majoritairement dans le cortex et l'hippocampe contrairement à SV2A exprimée préférentiellement dans les régions sous-corticales (Bajjalieh *et al.*, 1994). Les différences observées entre les isoformes sont majoritairement situées dans la région N-terminale précédant les premiers domaines intermembranaires. Contrairement à l'hypothèse émise par le groupe de Feany, seule une faible analogie avec des transporteurs de neurotransmetteur de la partie C-terminal de SV2 fût observée par Bajjalieh *et al.* qui conclurent qu'il n'y avait aucune relation entre SV2 et des transporteurs de neurotransmetteurs (Feany *et al.*, 1992; Bajjalieh *et al.*, 1994).

En plus des protéines SV2, les vésicules synaptiques contiennent une protéine apparentée appelée SVOP (SV two-related protein) (Janz *et al.*, 1998). SVOP a une structure transmembranaire similaire à celle de SV2 mais ne possède pas la longue boucle intravésiculaire glycosylée. De plus, SVOP est très conservée chez les invertébrés, alors que SV2 ne l'est pas. Ces différences suggèrent que les protéines SV2 pourraient être apparues relativement tard dans l'évolution et seraient des descendants de SVOP (Janz *et al.*, 1998).



**Fig. 37** Marquage indirect en immunofluorescence de SV2C sur les lignées neuronales (A) PC12 et (B) NG108-15. Notez le signal fort dans les varicosités (flèche mince) et dans la région périnucléaire du cytoplasme (flèche épaisse). (Couesnon, non publié) (barre = 20  $\mu\text{m}$ ).



**Fig. 38** (A) L'interaction des protéines des vésicules synaptiques forme un complexe de grande taille incluant : la protéine des vésicules synaptiques 2 (SV2), la synaptotagmine I (Syt I), la synaptophysine (Syp), la protéine membranaire associée aux vésicules 2 (VAMP2), et la pompe à protons vésiculaire (v-ATPase)

(B) BoNT/A s'associe à la membrane présynaptique des motoneurones via des interactions avec des oligosaccharides comme  $\text{GT}_{1b}$  (1). Un influx de  $\text{Ca}^{2+}$  stimule la fusion de la membrane des vésicules synaptiques (2). BoNT/A interagit avec le complexe récepteur exposé du côté extracellulaire, stimulant le recyclage des vésicules synaptiques (3). Les vésicules recyclées sont acidifiées suite à l'action de la v-ATPase (4). L'acidification vésiculaire induit la translocation de la chaîne légère de BoNT/A (LC/A) dans le cytosol (5), complétant le cycle (6). D'après (Baldwin and Barbieri, 2007).

Enfin un troisième isoforme, SV2C, a été décrit en 1999 (Janz and Südhof, 1999). Plus apparenté à SV2A qu'à SV2B (respectivement 62 et 57 % d'analogie), SV2C est localisé dans de petites vésicules synaptiques et dans des microvésicules des cellules chromaffines adrénales (cf. Fig. 37). De plus, SV2C n'est observé que dans de rares régions du cerveau, principalement dans des régions anciennes phylogénétiquement, et non dans le cortex et l'hippocampe.

Les différents isoformes de SV2 pourraient permettre une spécialisation de certains types de synapses.

Par ailleurs, une interaction dépendante du  $Ca^{2+}$  entre les trois isoformes de SV2 et la synaptotagmine a été mise en évidence (Schivell *et al.*, 2005). Des complexes entre SV2B, la synaptotagmine I et les protéines SNAREs syntaxine 1 et SNAP-25 (synaptosome-associated protein 25) ont été détectés dans des extraits protéiques de cerveau (Lazzell *et al.*, 2004). Ceci montre que les protéines ciblées par les BoNTs interagissent entre elles et sont spatialement proches dans la cellule.

De plus, une étude récente de R. Baldwin et T. Barbieri (Baldwin and Barbieri, 2007) a mis en évidence l'association de Hc/A et Hc/B avec un complexe de protéines des vésicules synaptiques comprenant :

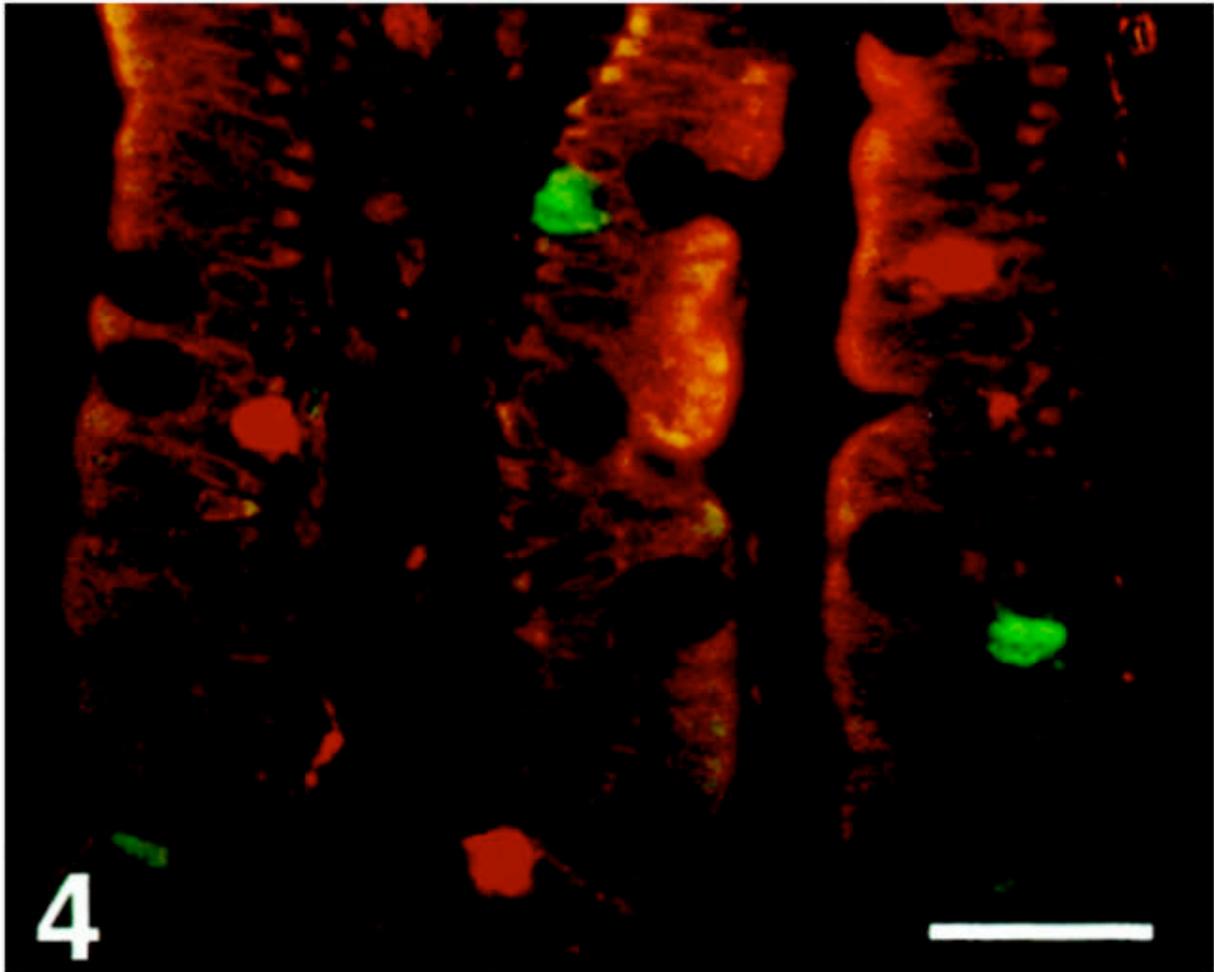
- SV2
- La synaptotagmine I
- La synaptogyrine 3
- VAMP2
- SNAP-25
- Plusieurs sous-unités de l'ATPase de type vacuolaire
- GAPDH (Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déhydrogénase)
- vGLUT1/2 (transporteur de glutamate vésiculaire 1/2)

BoNT/A et /B interagiraient avec ce complexe exposé à la surface cellulaire suite à la fusion de vésicules synaptiques stimulée par influx calcique. L'endocytose de la toxine associée au complexe initierait l'internalisation de BoNT dans les cellules (cf. Fig. 38).

L'interaction de BoNT/A et SV2 a été caractérisée par les équipes de E.R. Chapman et T. Binz en 2006.

Il a été montré que des fragments recombinants de SV2 (A, B et C) inhibent la liaison de BoNT/A aux neurones (Dong *et al.*, 2006). De plus, la liaison de BoNT/A à des neurones d'hippocampe issus de souris knock-out (k.o) pour les gènes codant pour SV2A/B est abolie, mais peut être restaurée par l'expression de l'un des trois isoformes de SV2. Les mêmes résultats ont été obtenus sur des lignées cellulaires neuronales (PC12 et N2A). Par ailleurs, les souris k.o pour le gène codant pour SV2B ont montré une sensibilité inférieure à BoNT/A (par injection intraveineuse) par rapport aux souris sauvages.

L'équipe de T. Binz a quant à elle montré que le Hc de BoNT/A, et aucun des autres types, interagit spécifiquement avec l'isoforme C de SV2, indépendamment de la présence des gangliosides (Mahrhold *et al.*, 2006). Une séquence minimale pour la liaison à Hc/A a été identifiée comme étant le peptide constitué des acides aminés 454 à 579, localisé dans la boucle intravésiculaire L4 située entre les domaines 7 et 8 transmembranaires. Le peptide synthétique SV2C-454-579 fusionné à la GST inhibe l'activité de BoNT/A sur des hémidiaphragmes de souris en augmentant la durée nécessaire pour observer la paralysie. Ceci est la preuve fonctionnelle que ce domaine est nécessaire et suffisant à la liaison effective de BoNT/A et à son activité physiologique (Mahrhold *et al.*, 2006).



**Fig. 39** Marquage de SV2 (en rouge) et la somatostatine (en vert) sur une coupe de duodénum humain montrant l'absence de colocalisation entre ces deux marqueurs. (barre = 170  $\mu$ m). D'après (Portela-Gomes *et al.*, 2000)

Région de l'organisme	Immunoréactivité à SV2	Colocalisation SV2 + sérotonine
Corpus de l'estomac	++	++
Antrum de l'estomac	+++	++/+++
Duodénum	++/+++	+/+++
Iléum	+/++	++
Colon	++/+++	+/+++

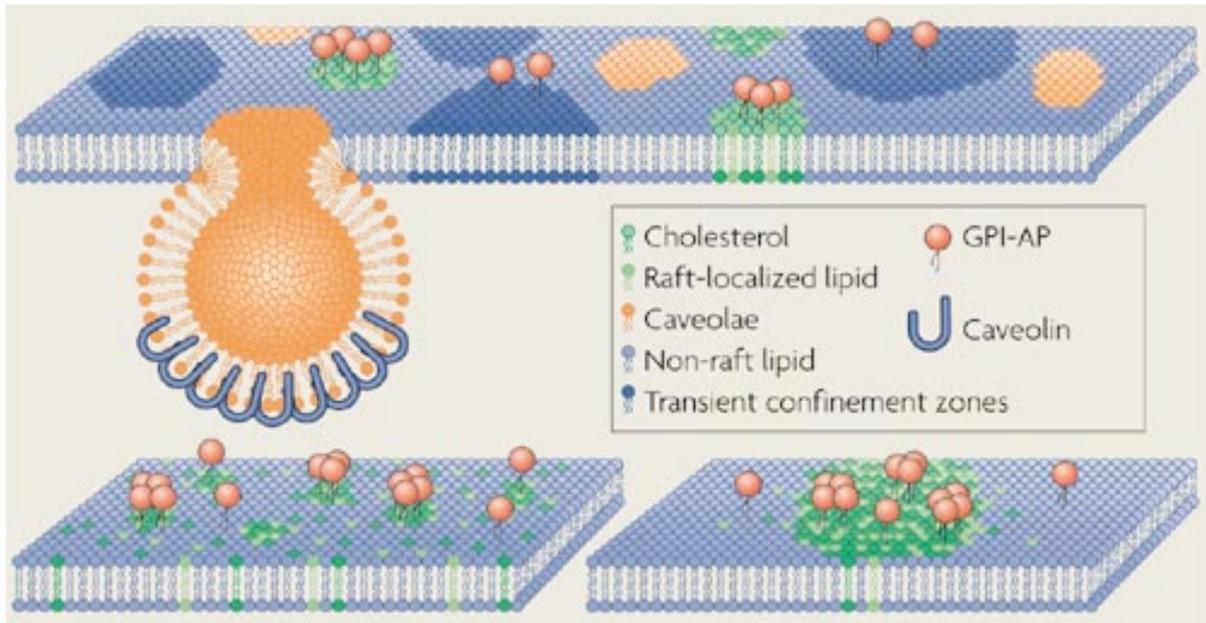
**Tab. 7** Répartition de SV2 dans les cellules endocrines des différentes régions du tube digestif et colocalisation de SV2 avec une hormone de cellules entéroendocrines, la sérotonine. +++ : immunoréactivité à SV2 supérieure à 50% ; ++ : immunoréactivité comprise entre 30 et 50% ; + : immunoréactivité occasionnelle. D'après (Portela-Gomes *et al.*, 2000).

SV2 a également été utilisée comme un marqueur des cellules neuroendocrines. Ainsi une immunoréactivité de SV2 a été détectée dans le tractus gastro-intestinal, le pancréas, la glande pituitaire antérieure, la thyroïde, la parathyroïde, la médulla adrénale et dans la muqueuse gastrique (Portela-Gomes *et al.*, 2000). Des cellules éparpillées dans tout le tractus gastro-intestinal présentent une immunoréactivité à SV2, notamment dans l'antrum, le duodénum et le colon. Dans le duodénum, seulement une partie des cellules entérochromaffines mais toutes les cellules marquées pour la gastrine, la cholecystokinine, la sécrétine et l'entéroglucagon sont également marquées par l'anti-SV2 (cf. Fig. 39). Dans l'iléum comme dans le colon, les quelques cellules immunoréactives pour SV2 représentaient des cellules entérochromaffines ou entéroglucagon (cf. Tab. 7) (Portela-Gomes *et al.*, 2000).

La caractérisation des trois isoformes de SV2 et l'étude de leur rôle dans les cellules endocrines INS-1E a montré que SV2A et SV2C étaient associés à des granules contenant de l'insuline et à des microvésicules de type synaptique, alors que SV2B n'était présent que dans ces dernières structures (Iezzi *et al.*, 2005). De plus, il a été montré que SV2 agissait au niveau du recrutement des granules du réservoir vers la membrane plasmique, et que SV2C avait un rôle encore plus crucial que SV2A dans le processus de sécrétion.

*Tous les types de BoNTs (sauf G) ont une affinité pour les gangliosides, en particulier ceux appartenant à la série b. Cette affinité ne permet pas d'expliquer la grande spécificité de ces neurotoxines pour les cellules neuronales et un modèle de double récepteur a été proposé. Il comprend une composante ganglioside et une composante protéique variable selon les types de BoNTs. Une composante protéique neuronale a été identifiée comme étant les synaptotagmines I et II pour les types B et G, et la protéine des vésicules synaptiques 2 (SV2) pour le type A. Un récepteur de nature protéique n'a pas encore été identifié pour le type E et pour les types C et D il n'y en aurait probablement pas. Certaines hémagglutinines (HAs) sont capables, comme les BoNTs, d'interagir avec certains gangliosides et certaines protéines des vésicules synaptiques. Elles pourraient donc jouer un rôle dans la liaison aux cellules. Les récepteurs présents sur les cellules intestinales, autres que les gangliosides, restent méconnus.*

L'identification des récepteurs des toxines est importante car elle détermine les étapes suivant la liaison en surface, c'est-à-dire les voies d'entrée et le trafic intracellulaire. L'élucidation de ces voies permet de comprendre comment la toxine peut exercer son activité dans la cellule ou bien être transportée, selon les compartiments dans lesquels elle est véhiculée.



**Fig. 40** Hétérogénéité des membranes et formation des domaines résistants aux détergents (DRMs). Les DRMs sont des domaines membranaires définis physiquement par leur insolubilité à froid dans les détergents non ioniques et chimiquement par leur richesse en cholestérol (en vert foncé) et en glycosphingolipides (en vert clair). Ils concentrent certaines protéines comme les protéines ancrées au glycosylphosphatidylinositol (GPI-AP, en rouge) et la cavéoline (en orange). D'après (Mayor and Pagano, 2007).

## 3.2 Voies d'entrée des BoNTs dans les cellules

L'identification des récepteurs des BoNTs est une première étape dans l'élucidation de leur mécanisme d'action cellulaire. La seconde étape, liée à la première, est de déterminer comment les BoNTs entrent dans les cellules, dans quels types de vésicules elles sont véhiculées et la nature de leur trafic intracellulaire.

En effet, une fois liée à la membrane la molécule cargo peut être internalisée dans des structures vésiculaires et être dirigée vers différents compartiments de la cellule grâce au cytosquelette. L'endocytose est un processus cellulaire de base utilisé par les cellules pour internaliser une grande variété de molécules. Toute voie d'endocytose qui assure le transport d'un cargo spécifique requiert tout d'abord des mécanismes de sélection à la surface cellulaire. Ensuite, le bourgeonnement et le pincement de la membrane plasmique pour libérer les vésicules d'endocytose doivent être induits. Enfin, des mécanismes sont nécessaires pour diriger ces vésicules vers la prochaine étape de leur itinéraire et induire leur fusion à la membrane du compartiment cible. Certaines voies d'endocytose sont constitutives mais d'autres sont déclenchées par des signaux spécifiques ou détournées par des pathogènes ou des toxines (Mayor and Pagano, 2007).

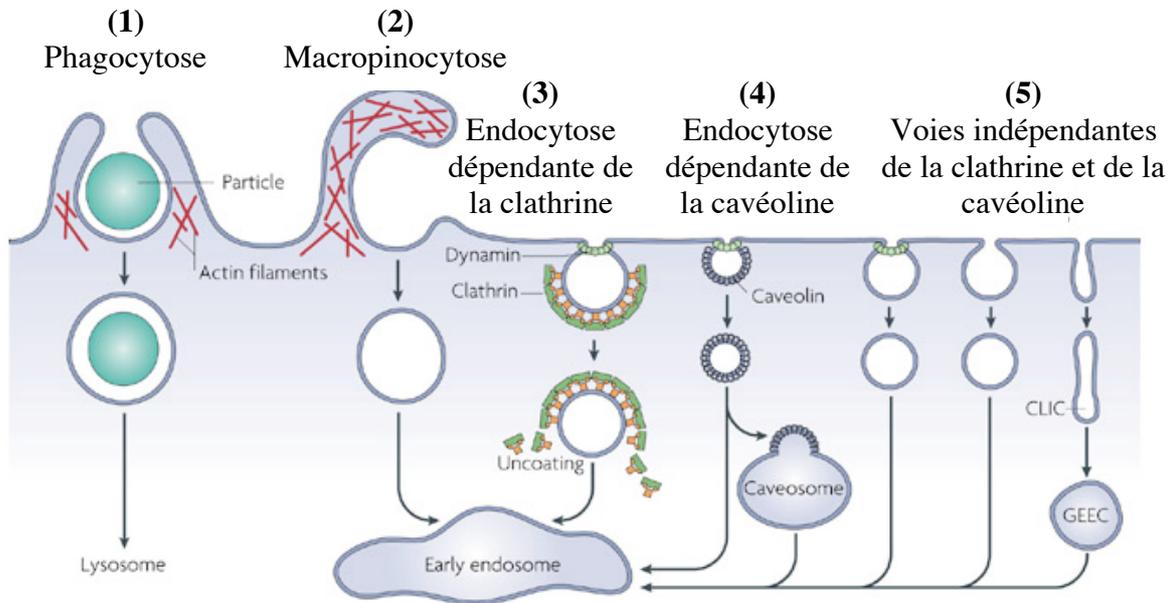
### 3.2.1 Organisation de la membrane plasmique en microdomaines

La distribution des différents composants de la membrane plasmique, à savoir les lipides (phospholipides, glycolipides, et stéroïdes) et les protéines (glycoprotéines, lipoprotéines telles les gangliosides, récepteurs et transporteurs protéiques,...etc), est hétérogène.

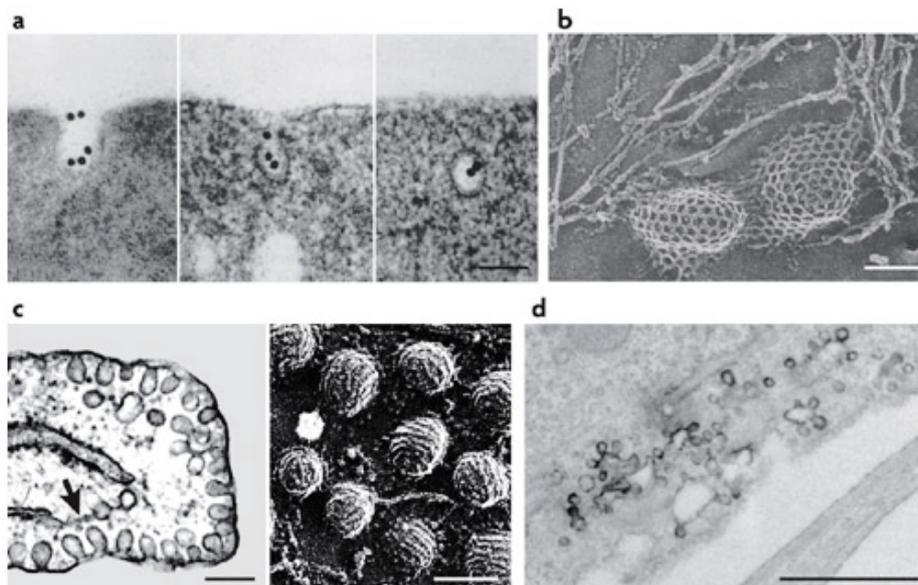
Les domaines membranaires résistants aux détergents (DRMs) ou radeaux lipidiques (lipid rafts) ont été définis chimiquement comme étant des assemblages dynamiques de cholestérol et de glycosphingolipides présents dans les membranes, et fonctionnellement comme formant des plateformes importantes pour le triage des protéines et la construction de complexes de signalisation (cf. Fig. 40). De taille nanométrique, ces petites structures dynamiques stabilisées par des interactions avec le cytosquelette pourraient s'agréger en plateformes plus grandes en réponse à divers stimuli. Les radeaux sont considérés comme des îlots de lipides saturés et de cholestérol très structurés qui seraient mobile latéralement dans le plan d'une bicouche de lipides insaturés beaucoup plus fluide et désordonnée. Du fait de cette organisation, ils sont relativement résistants aux détergents non-ioniques et sont présents dans les fractions peu denses d'un gradient de saccharose après ultracentrifugation (Parton and Richards, 2003).

Parmi les résidents des radeaux lipidiques, on trouve les protéines ancrées au GPI (glycosylphosphatidylinositol) et les protéines associées au cholestérol dont la cavéoline. Les marqueurs des voies d'endocytose indépendantes de la clathrine sont en général isolés dans les DRMs alors que les marqueurs de la voie dépendante de la clathrine, comme le récepteur de la transferrine, ne le sont pas. Une méthode classique pour déterminer si un ligand est associé aux DRMs est d'appliquer un traitement chimique à l'aide de la Méthyl- $\beta$ -CycloDextrine (M $\beta$ CD) qui est un agent séquestrant le cholestérol (Johannes and Lamaze, 2002).

Les DRMs serviraient de plateformes pour le captage de ligands (hormones, facteurs de croissance, toxines,...), leur regroupement (clustering), leur présentation à des récepteurs de plus haute affinité et ensuite à leur orientation vers certaines voies d'endocytose.



**Fig. 41** Schéma des principales voies d'endocytose. Les particules de grande taille peuvent être internalisées par phagocytose (1), tandis que l'entrée de fluide a lieu par macropinocytose (2). La taille des vésicules est plus réduite dans les autres voies d'endocytose qui comprennent la voie dépendante de la clathrine (3), la voie dépendante de la cavéoline (4) et les voies indépendantes de la clathrine et de la cavéoline (5). La plupart des cargo internalisés sont dirigés vers l'endosome précoce, certaines voies passant avant par des compartiments intermédiaires comme le cavéosome et le GEEC (glycosyl phosphatidylinositol-anchored protein enriched early endosomal compartments). D'après (Mayor and Pagano, 2007).



**Fig. 42** Photos en microscopie électronique d'intermédiaires précoces des voies d'endocytose dépendante de la clathrine (a et b) ou dépendante de la cavéoline (c et d). (a) Vues en coupe mince de vésicules internalisant de la transferrine liée à des billes d'or. (b) Vue de la structure du manteau de clathrine autour de vésicules en formation. (c) Vue en coupe mince de cavéoles (à gauche) et vue du manteau de cavéoline autour des cavéoles (à droite). (d) Vue en coupe mince de l'internalisation de la toxine cholérique liée à la peroxydase dans des cavéoles en « grappe ». (barre = 100nm pour a et b, 200 nm pour le panel de gauche de c et 100 nm pour celui de droite, 200 nm pour d). D'après (Mayor and Pagano, 2007).

### 3.2.2 Principales voies d'entrée dans les cellules

L'internalisation des molécules cargo fait intervenir différents types de vésicules qui définissent plusieurs voies (cf. Fig. 41) :

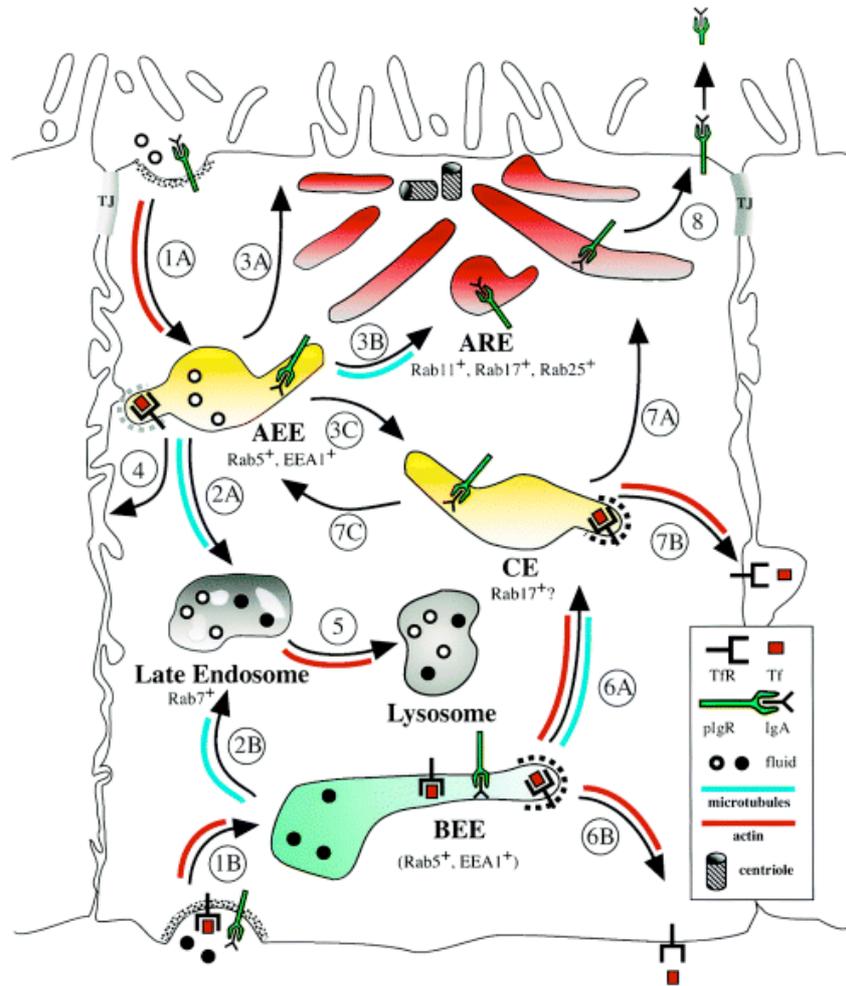
- à grosses vésicules :
  - la macropinocytose, due à la formation de replis membranaires induite par des signaux comme des facteurs de croissance ou par des bactéries
  - la phagocytose, formant une grande vésicule contenant des particules (phagosome)
- à petites vésicules :
  - vésicules couvertes de clathrine (diamètre moyen de 110 nm), voie la mieux connue (cf. Fig. 42a et b)
  - cavéoles (diamètre moyen de 50-80 nm) (cf. Fig. 42c)
  - vésicules lisses (diamètre moyen de 100 nm), voie peu connue.

Les ligands entrant dans les vésicules sont très divers :

- des protéines de transport : transferrine (cf. Fig. a), LDL (lipoprotéines de faible densité),...
- des hormones et des facteurs de croissance : EGF (facteur de croissance épidermique), insuline, interleukine 2,...
- d'autres protéines : enzymes lysosomales, IgA (Immunoglobuline A),...
- des virus et des toxines (cf. Fig. 42d) qui sont des ligands opportunistes.

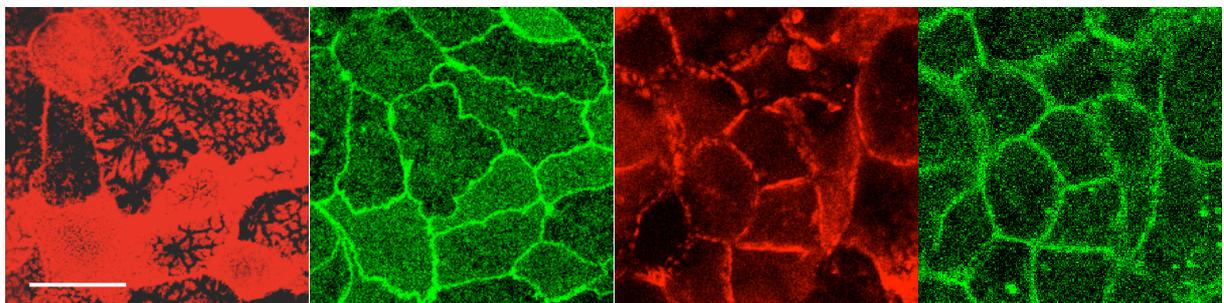
Par ailleurs, ces voies sont caractérisées par des marqueurs des compartiments vers lesquels les vésicules sont dirigées et la dépendance vis-à-vis du cytosquelette ou d'autres molécules régulatrices. Ici nous nous intéressons plus particulièrement aux voies d'entrée dans deux types de cellules polarisées, les cellules neuronales et les cellules épithéliales intestinales.

Une description succincte des principales voies d'endocytose est présentée dans la figure 41.



**Fig. 43** Modèle de trafic endocytique dans les cellules polarisées épithéliales. AEE : endosome précoce apical ; BEE : endosome précoce basal ; CE : compartiment de recyclage commun, ARE : compartiment de recyclage apical. D'après (Apodaca, 2001).

**A** Phalloïdine (apicale)      **B** ZO-1      **C** Phalloïdine (latérale)      **D** E-cadhérine



**Fig. 44** Marquage en immunofluorescence sur une lignée de cellules intestinales (Caco-2) du cytosquelette d'actine apical (A) ou latéral (C) par la phalloïdine, des jonctions serrées apicales (ZO-1, B) et des jonctions d'adhérence (E-cadhérine, D). (Couesnon *et al.*, 2007) (Barre = 20  $\mu$ m).

### 3.2.2.1 *Organisation des cellules épithéliales et du trafic endocytotique*

Les cellules épithéliales sont caractérisées par l'établissement de jonctions serrées (dont ZO-1 est un marqueur, cf. Fig. 44B) qui séparent deux régions membranaires plasmiques distinctes, apicale et basolatérale. Les jonctions serrées établissent ainsi des barrières qui séparent des compartiments distincts au sein de l'organisme, ou constituent une première ligne de défense et d'échange avec le milieu extérieur. Elles exploitent les éléments du cytosquelette pour contrôler l'adressage des protéines néosynthétisées du réseau trans-golgien vers les domaines membranaires appropriés (Apodaca, 2001). Le cytosquelette joue également un rôle dans l'endocytose, la sortie des molécules cargo des endosomes précoces et tardifs, et le transport par transcytose de protéines endocytosées d'une région membranaire plasmique vers l'opposée. Dans une simple cellule non polarisée, les protéines et les fluides internalisés sont dirigés vers des compartiments appelés endosomes précoces, caractérisés par la présence des marqueurs Rab5 et EEA1 (Early Endosome Antigen 1, cf. Fig. 43). La portion vacuolaire des endosomes précoces est dirigée vers les endosomes tardifs (late endosome) puis les lysosomes dont un marqueur est Lamp-1, alors que les domaines tubulaires dirigent leur cargo dans l'endosome de recyclage péricentriolaire (ARE). D'autres voies connectent les endosomes tardifs et de recyclage vers le réseau trans-Golgien.

Le schéma est plus complexe dans le cas des cellules polarisées épithéliales car elles internalisent des macromolécules au niveau des deux domaines apical ou baso-latéral. L'internalisation des marqueurs de phase fluide (comme la peroxydase) au niveau des deux pôles cellulaires permet de distinguer deux populations d'endosomes précoces : une apicale (AEE) et une baso-latérale (BEE). De plus il existe un compartiment de recyclage commun supranucléaire (CE) de forme tubulaire qui reçoit des vésicules provenant des compartiments AEE ou BEE, ainsi qu'un compartiment de recyclage apical (ARE).

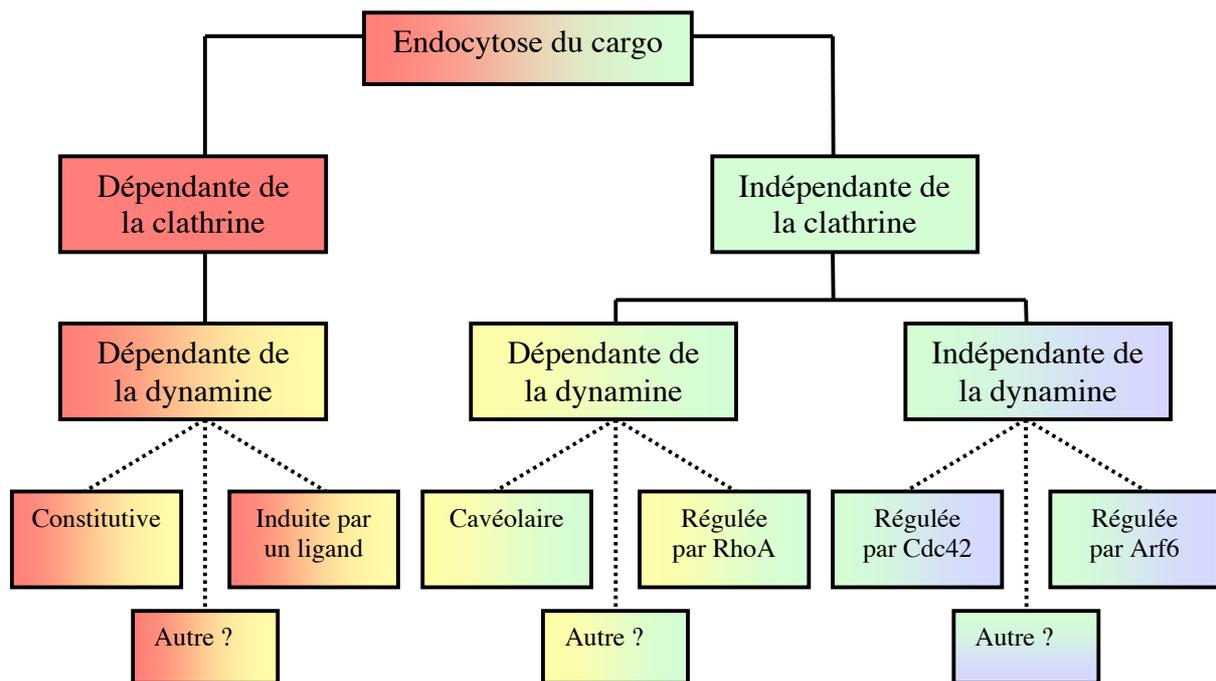
Le cytosquelette, qui comprend notamment les microtubules (constitués de tubuline) et le réseau d'actine (cf. Fig. 44A et C), joue un rôle important dans la localisation des organelles et le transport vésiculaire. Les mouvements le long des microtubules sont relativement rapides (1  $\mu\text{m/s}$ ) contrairement au transport utilisant l'actine qui est relativement lent (0,1  $\mu\text{m/s}$ ).

Il existe différents traitements qui perturbent le cytosquelette et permettent de tester le rôle de celui-ci dans la voie d'endocytose étudiée.

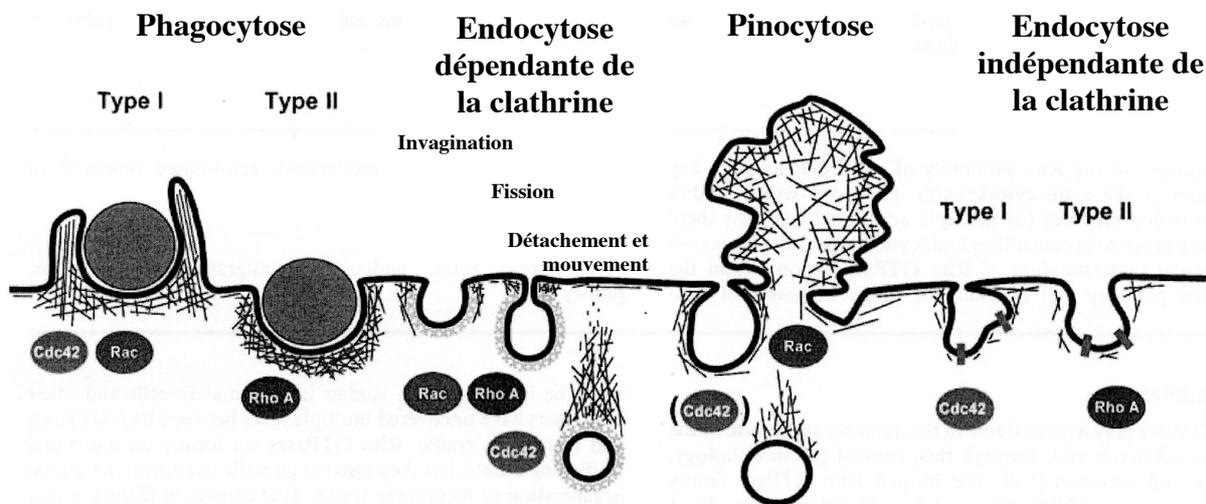
On peut citer par exemple des agents dépolymérisant :

- les microtubules : Nocodazole, Colchicine
- les filaments d'actine : Cytochalasine D, Latrunculine B.

Par ailleurs, certains membres de la famille des GTPases Rho (RhoA, Rac1 et Cdc42) qui sont impliqués dans la formation de structures riches en actine modulent également de multiples événements cellulaires, dont l'endocytose. L'expression de dominants négatifs ou positifs dans les cellules permet également de distinguer les voies d'entrée des molécules étudiées (cf. infer).



**Fig. 46** Système de classification proposé pour les voies d'endocytose. D'après (Mayor and Pagano, 2007).



**Fig. 45** Schéma des sites d'action des Rho GTPases sur les voies d'endocytose (Qualmann and Mellor, 2003)

### 3.2.2.2 *Caractéristiques des voies d'endocytose*

#### 3.2.2.2.1 *La voie dépendante de la clathrine*

La voie la mieux caractérisée est l'endocytose dépendante de la clathrine dont la définition morphologique est l'observation au niveau de la membrane des vésicules d'une couche dense aux électrons constituée d'un réseau géométrique organisé de molécules de clathrine et d'adaptateurs. D'autres protéines sont impliquées dans la régulation de la formation des puits, notamment Eps15. Le récepteur de la transferrine est un exemple de protéine internalisée par la voie clathrine et la transferrine peut donc être utilisée comme sonde de cette voie. Ainsi, une mutation particulière sur Eps15 conduit à l'inhibition de l'endocytose de la transferrine médiée par récepteur. C'est le premier dominant négatif identifié pour cette voie (Mayor and Pagano, 2007)..

La dynamine est une protéine impliquée, directement ou non, dans le pincement de la membrane avant la fission des vésicules. Elle est donc impliquée dans la voie dépendante de la clathrine, mais également dans d'autres voies d'endocytose (cavéoles et d'autres) et interagit avec de nombreux partenaires, notamment le cytosquelette d'actine (cf. Fig. 45). L'expression d'un dominant négatif de la dynamine (K44A) empêche donc l'entrée de ligands par les voies dépendantes de la clathrine et des cavéoles. De plus, l'expression d'un mutant négatif de l'intersectine, une protéine d'échafaudage régulant la formation des vésicules couvertes par la clathrine et qui interagit avec la dynamine, inhibe la voie d'entrée dépendante de la clathrine.

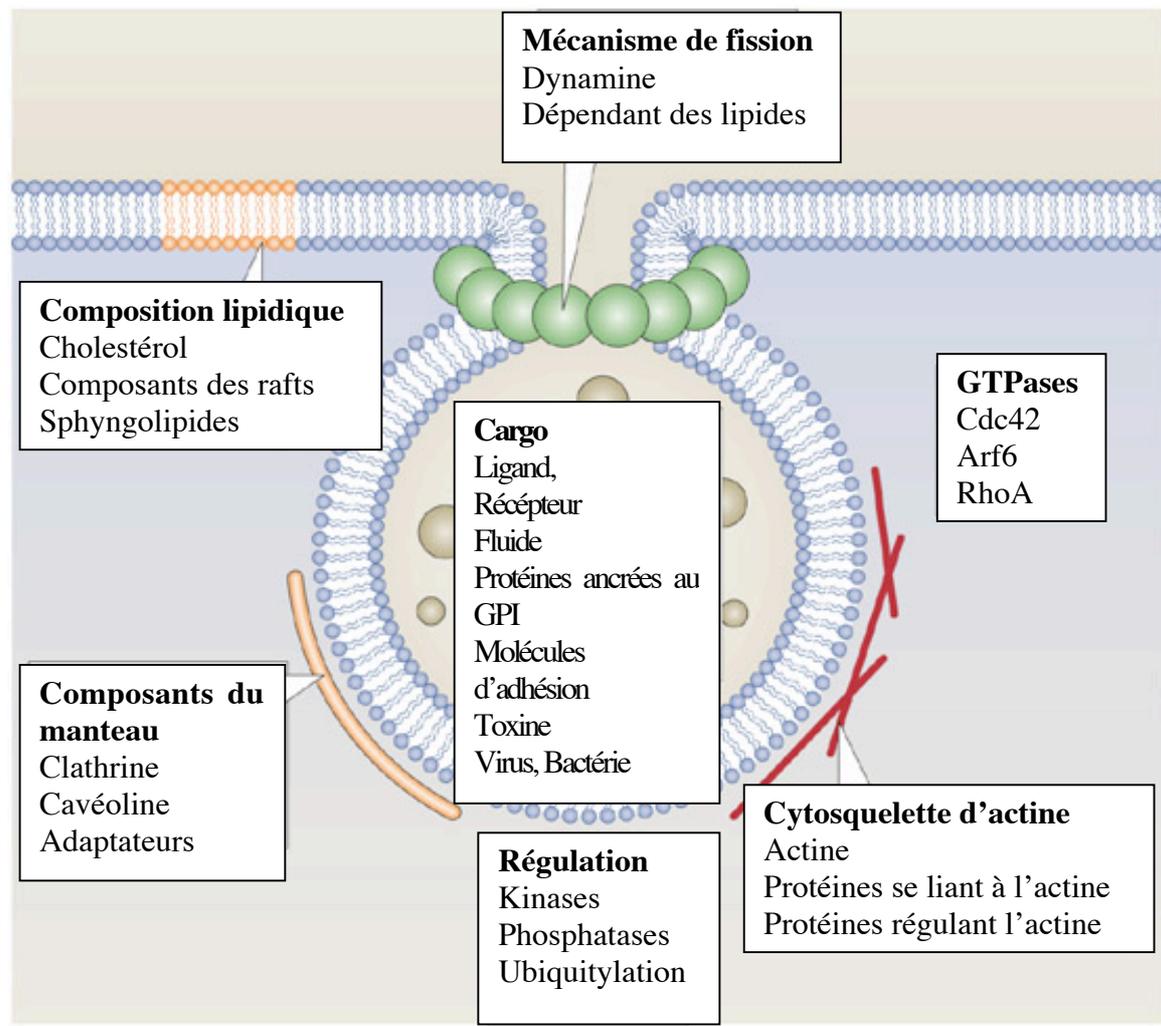
#### 3.2.2.2.2 *Les voies indépendantes de la clathrine mais dépendantes de la dynamine*

Parmi les voies indépendantes de la clathrine, on peut distinguer celles qui sont dépendantes de la dynamine de celles qui ne le sont pas. Au sein de ces deux groupes, l'implication de certaines petites GTPases permet de distinguer plusieurs sous-groupes (cf. Fig. 46). La classification en voies « régulées » par Cdc42, RhoA et ARF6 est basée sur le fait que l'interférence dans l'activité des différentes GTPases affecte l'internalisation des marqueurs d'une des voies d'endocytose indépendantes de la clathrine (cf. Tab. 8). Ce qui ne veut pas dire qu'une certaine GTPase est impliquée dans un mécanisme particulier d'endocytose. En effet, ces voies ont été définies à l'origine par des mutants de ces GTPases qui sont susceptibles d'affecter de nombreux processus cellulaires (Mayor and Pagano, 2007).

L'endocytose dans des cavéoles est sans doute la voie dépendante de la dynamine la mieux détaillée. Les cavéoles sont caractérisées par la présence d'une protéine, la cavéoline-1, qui lie le cholestérol. La dynamine est impliquée dans le détachement des cavéoles de la membrane. Des analyses biochimiques et protéomiques ont montré que la membrane des cavéoles est enrichie en sphingolipides et en cholestérol, en protéines de signalisation et en protéines ancrées au GPI regroupées (Mayor and Pagano, 2007). Cette voie est donc caractérisée par la présence de cavéoline-1, la localisation dans les DRMs et est dépendante de la dynamine. Les cavéoles sont des structures relativement stationnaires et leur internalisation est en général induite. Les molécules cargo des cavéoles sont très divers (lipides, protéines, pathogènes,...) et les mêmes cargo peuvent être internalisés par divers mécanismes selon les types cellulaires ou les conditions. Ceci suggère l'existence de mécanismes d'endocytose redondants pouvant être utilisés par certaines molécules cargo.

Mécanismes d'endocytose indépendants de la clathrine				
Inhibiteurs ou protéines de dominants négatifs (DN)	Cavéoles	Régulé par RhoA	Régulé par Cdc42	Régulé par Arf6
DN de la Dynamine-2 (K44A)	Inhibe	Inhibe	Pas d'effet	Pas d'effet
DN de ARF6	ND	ND	Pas d'effet	Inhibe
Déplétion du cholestérol	Inhibe	ND	Inhibe	Inhibe
Modification de la polymérisation de l'actine (LatA, CytoD, Jas)	Inhibe	Inhibe	Inhibe	Inhibe
Toxine B de <i>C. difficile</i>	Pas d'effet	Inhibe	Inhibe	ND
DN de RhoA	Pas d'effet	Inhibe	Pas d'effet	ND
DN de CDC42	Pas d'effet	Pas d'effet	Inhibe	ND

**Tab. 8** Tableau récapitulatif des caractéristiques des mécanismes d'endocytose indépendants de la clathrine. AP-180 : adaptator protein-180 ; ARF6 : ADP-ribosylation Factor 6 ; CDC42 : cell-division cycle-42 ; CytoD : cytochalasine D ; DN : dominant négatif ; Jas : jasplakinolide ; LatA : latrunculine ND : non déterminé . Adapté de (Mayor and Pagano, 2007).



**Fig. 46** Schéma des critères de classification des mécanismes d'endocytose. D'après (Mayor and Pagano, 2007).

Un deuxième mécanisme d'endocytose indépendant de la clathrine est une voie dépendante de la petite GTPase RhoA. Cette voie a été découverte en étudiant l'internalisation de la chaîne  $\beta$  du récepteur de l'interleukine-2 (IL-2R- $\beta$ ), mais elle est également utilisée lors de l'internalisation d'autres protéines dans des cellules immunitaires ou des fibroblastes (Lamaze *et al.*, 2001).

### 3.2.2.2.3 Les voies indépendantes de la clathrine et de la dynamine

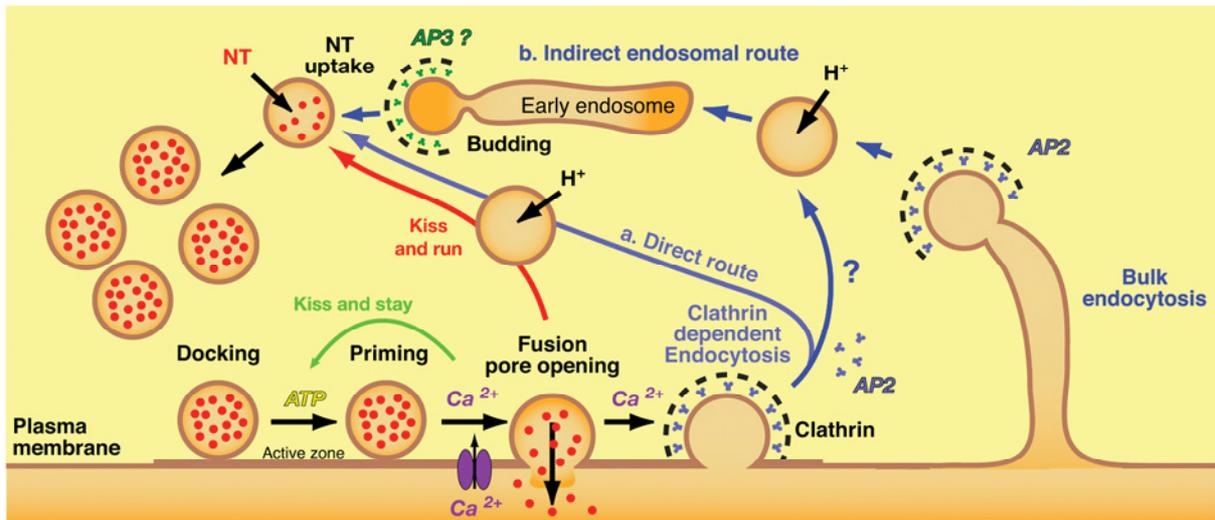
Une voie indépendante de clathrine et de la dynamine a été identifiée suite à l'observation des effets de l'expression d'un mutant de la dynamine-1 dans les cellules Hela, le blocage de l'endocytose médiée par récepteur et une augmentation de l'entrée par phase fluide via un processus indépendant de la clathrine et de la dynamine. Un caractère commun des voies indépendantes de la dynamine semble être l'implication des petites GTPases, soit un membre de la famille Rho (Cdc42), soit un membre de la famille Arf (Arf6) (Mayor and Pagano, 2007).

Le rôle de Cdc42 dans l'endocytose indépendante de la dynamine a été mis en évidence pour la première fois lors de l'étude des effets d'un inhibiteur de RhoGTPases, la toxine B de *Clostridium difficile*, et des effets de l'expression d'un dominant négatif de Cdc42 sur l'internalisation de protéines ancrées au GPI. Cette voie est notamment utilisée par la toxine cholérique (en plus de la voie clathrine et des cavéoles), par la toxine vacuolisante VacA d'*Helicobacter pylori* et par une protéine végétale, la ricine, et représente le mécanisme principal d'internalisation par phase fluide dans de nombreux types cellulaires.

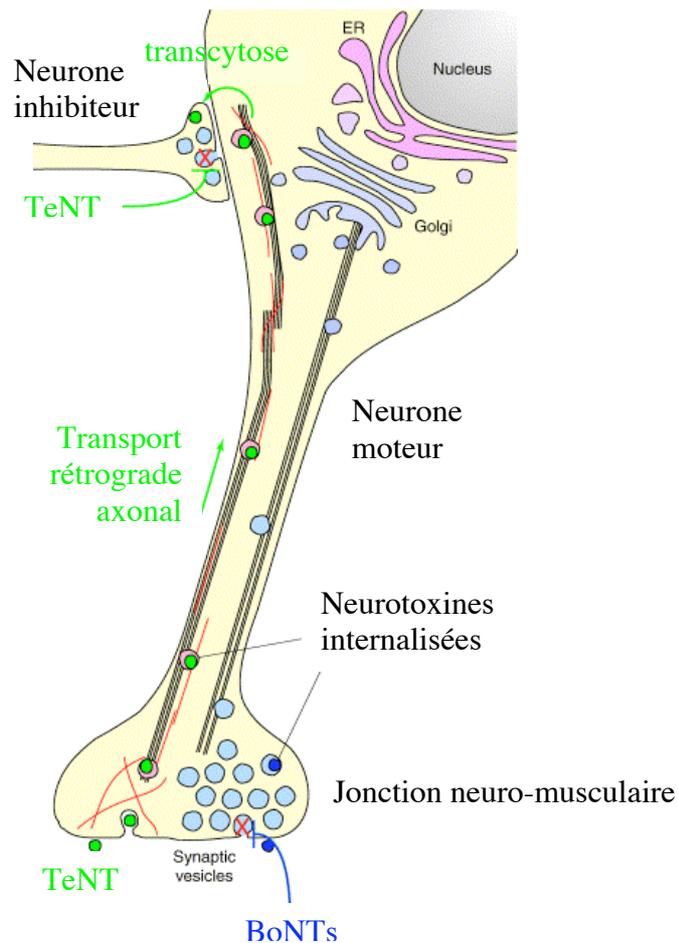
Le rôle de Arf6 a été suggéré dans l'endocytose indépendante de la clathrine et de la dynamine de plusieurs protéines, notamment les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I), de l'intégrine  $\beta$ , de la carboxypeptidase A (CPE), de la E-cadhérine et des protéines ancrées au GPI. Cependant, il faut noter que le rôle direct de Arf6 dans l'internalisation n'a pas été explicitement établi (Mayor and Pagano, 2007).

Par ailleurs, l'internalisation de certaines toxines fait intervenir plusieurs voies d'entrée ou un combinaison de celles-ci. Ainsi, la toxine cholérique et la toxine Shiga se lient à des récepteurs glycolipidiques (GM<sub>1</sub> et Gb<sub>3</sub> respectivement) qui sont associés aux DRMs mais elles sont internalisées dans des vésicules couvertes de clathrine et aussi dans des voies indépendantes de la clathrine. Il se peut donc que des microdomaines membranaires puissent recruter la clathrine selon la protéine cargo. Si plusieurs voies d'entrée d'une toxine peuvent co-exister, dans certains cas seules certaines vont permettre à la toxine d'exercer son activité. Les voies ne sont donc pas forcément fonctionnellement équivalentes. Ainsi, dans le cas de la toxine cholérique, les traitements inhibant la voie dépendante de la clathrine n'a que peu d'effet sur son activité intracellulaire (inhibition de la synthèse protéique) alors que les traitements inhibant l'endocytose indépendante de la clathrine ont un effet notable sur celle-ci (Lamaze *et al.*, 2001).

*Une multitude de cargo (ligand, récepteur, fluide, toxines,...) peut être internalisée dans différentes voies d'endocytose qui sont caractérisées par de nombreux paramètres, comme la nature de la composition lipidique du domaine membranaire (lipid rafts ou non), la composition du manteau couvrant les vésicules (clathrine, cavéoline,...), le cytosquelette d'actine et les RhoGTPases impliquées (Cdc42, Arf6, RhoA), le mécanisme de fission (dépendant de la dynamine ou non) (cf. Fig. 46). Certaines voies, comme l'endocytose dépendante de la clathrine, sont maintenant bien connues, mais certaines voies indépendantes de la clathrine commencent seulement à être caractérisées et il en existe probablement d'autres. De plus, plusieurs mécanismes d'endocytose d'un même cargo peuvent exister dans différents systèmes cellulaires ou dans différentes conditions.*



**Fig. 47** Schéma du cycle des vésicules synaptiques dans les terminaisons nerveuses. Les voies « longues » de recyclage sont dépendantes de la clathrine et comprennent une voie directe (a, bleu clair) et peut-être une voie indirecte (b, bleu foncé) passant par les endosomes précoces. Les voies rapides de recyclage feraient intervenir deux mécanismes, « kiss and run » et « kiss and stay ». D'après (Danglot and Galli, 2007).



**Fig. 49** Schéma de l'internalisation de TeNT (en vert) au niveau des terminaisons nerveuses cholinergiques périphériques, de son transport rétrograde axonal, et de sa migration transynaptique vers les neurones inhibiteurs cibles. D'après (Lalli *et al.*, 2003)

### 3.2.3 Internalisation et translocation des neurotoxines dans les cellules neuronales

#### 3.2.3.1 Cycle des vésicules synaptiques

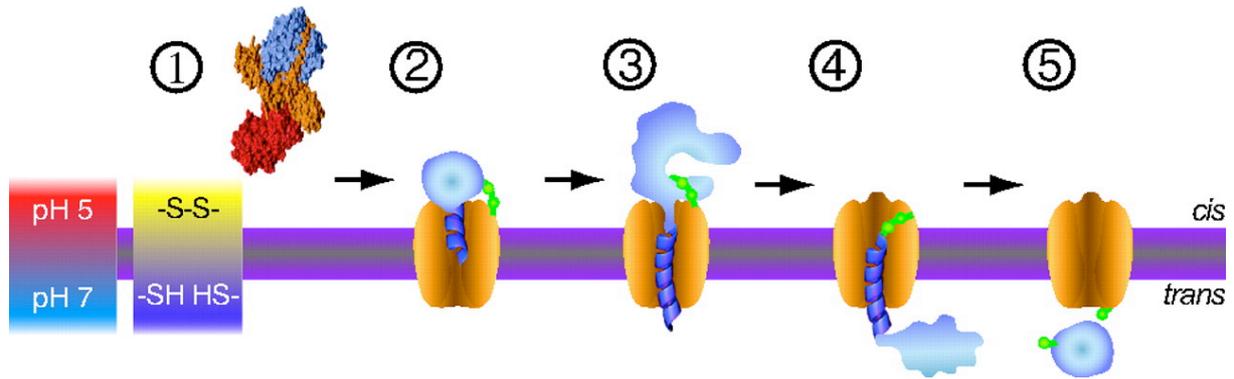
Lors du cycle vésiculaire dans les terminaisons nerveuses, les vésicules synaptiques s'arriment et sont amorcées au niveau de la zone active de la membrane pré-synaptique (cf. Fig. 47) (Danglot and Galli, 2007). Après stimulation, les vésicules synaptiques fusionnent avec la membrane permettant la libération des neurotransmetteurs (NT) dans la fente synaptique. Si la vésicule synaptique ne fusionne pas totalement avec la membrane, mais forme un pore transitoire, elle peut être récupérée par les voies courtes de recyclage, c'est-à-dire les mécanismes « kiss and run » (en rouge dans la Fig. 47) ou « kiss and stay » (en vert). Dans le mécanisme « kiss and run », la vésicule synaptique est récupérée par une invagination de la membrane au niveau de la zone active et est rapidement remplie à nouveau de NT. Dans le mécanisme « kiss and stay », la vésicule synaptique est rapidement remplie à nouveau de NT sans quitter la zone active. Si la vésicule synaptique fusionne complètement avec la membrane plasmique, elle est alors internalisée par une endocytose dépendante de la clathrine. Suite à une forte stimulation, une endocytose de gros volumes au niveau des terminaisons nerveuses a été observée accompagnée de grandes invaginations couvertes de clathrine et de la protéine adaptatrice du manteau AP-2. Les vésicules synaptiques sont alors débarrassées de leur manteau de clathrine et suivent la voie directe (« a », bleu clair dans la Fig. 47) pour être remplie à nouveau de NT, ou la voie indirecte (« b », bleu foncé dans la Fig. 47) qui passe par les endosomes précoces. C'est la protéine adaptatrice AP-3 qui assure le bourgeonnement des vésicules synaptiques dans la lignée cellulaire neuronale PC12.

#### 3.2.3.2 Internalisation de la neurotoxine tétanique

Alors que la neurotoxine botulique agit au niveau des terminaisons cholinergiques périphériques, la neurotoxine tétanique agit au niveau des synapses dans le système nerveux central. TeNT est transportée par un transport axonal rétrograde de la membrane pré-synaptique de la terminaison nerveuse périphérique motrice jusqu'au corps cellulaire situé dans la moelle épinière. TeNT subit alors une migration transynaptique et atteint les neurones cibles qui sont les neurones inhibiteurs impliqués dans la régulation des motoneurones cf. Fig. 48).

Il a été montré que, dans des neurones d'hippocampe de rat, la neurotoxine tétanique (Bielinski *et al.*) serait internalisée dans des vésicules synaptiques (colocalisation avec SV2) lors du processus de recyclage (Matteoli *et al.*, 1996). En conditions dépolarisantes, TeNT a été visualisée par microscopie électronique dans des vésicules dont la taille correspond à celle des vésicules synaptiques.

Cependant, au niveau des neurones moteurs, il a été montré que l'internalisation du domaine Hc (Hc/TeNT) n'est pas dépendante de l'activité synaptique mais elle est dépendante de la dynamine puisque l'expression du mutant K44A dans les motoneurones inhibe l'entrée de Hc/TeNT (Deinhardt *et al.*, 2006). De plus, l'internalisation à 12°C de Hc/TeNT couplé à la peroxydase a été visualisée en microscopie électronique dans des puits couverts de clathrine au niveau de la membrane plasmique du soma, des dendrites et des axones. Seule la moitié des vésicules couvertes de clathrine internalisant le Hc/TeNT contient de la transferrine, ce qui laisse penser que l'entrée de Hc/TeNT a lieu via une voie spécialisée dépendante de la clathrine. Bien que TeNT se lie à GD<sub>1b</sub> et GT<sub>1b</sub>, ces gangliosides ne sont pas présents dans les vésicules contenant le Hc/TeNT, ce qui suggère un tri latéral du Hc/TeNT et ses ligands GD<sub>1b</sub> et GT<sub>1b</sub> présents dans des radeaux lipidiques avant l'internalisation de Hc/TeNT.



**Fig. 49** Séquence d'évènements assurant la translocation de la chaîne légère L de BoNT (en bleu) à travers le canal formé par la moitié N-terminale de la chaîne lourde Hn. (1) Structure cristallographique de BoNT/A avant insertion dans la membrane. (2) Insertion de BoNT/A dans la membrane associée au dépliement de L en une forme globule fondu (« molten globule »). Après une série d'étapes de transferts (3 et 4), l'évènement de sortie a lieu (5) avec réduction du pont disulfure (en vert) et libération du canal de H, dans des conditions analogues à celles rencontrées dans les endosomes. (Fischer and Montal, 2007b).

### 3.2.3.3 *Internalisation de la neurotoxine botulique*

Dans un modèle de cellules primaires de neurones d'hippocampe de rat, il a été montré que les voies d'entrée des BoNTs et de TeNT seraient différentes, les BoNTs étant internalisées par un processus indépendant de l'activité synaptique (Verderio *et al.*, 1999). Inversement l'entrée de BoNT/A et /E dans des neurones de moelle épinière en culture a été induite par une dépolarisation au K<sup>+</sup> et dépendrait donc de l'activité synaptique (Keller *et al.*, 2004), comme cela a été confirmé lors de la découverte du récepteur SV2 (Dong *et al.*, 2006).

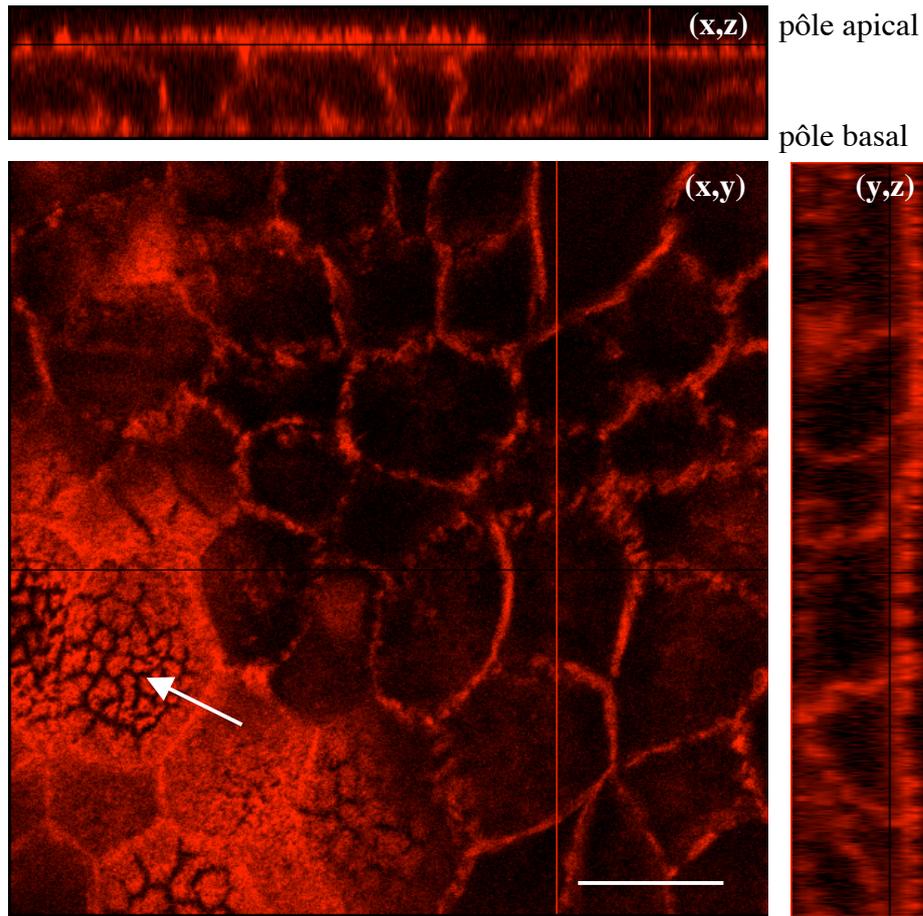
Par ailleurs, l'inhibition de la voie d'endocytose dépendante de la clathrine, par désorganisation des puits couverts de clathrine, diminue fortement l'activité de BoNT/A sur une lignée de neuroblastomes murins alors qu'une désorganisation des DRMs, par traitement à la M $\beta$ CD, augmente l'activité de BoNT/A. Cette hausse de l'activité de BoNT/A pourrait être due à une stimulation induite de l'exocytose des vésicules synaptiques conduisant soit à une présence accrue de SV2 à la membrane, soit à une augmentation de la mobilité latérale facilitant les interactions entre BoNT/A, les gangliosides et SV2 (Petro *et al.*, 2006).

*BoNT et TeNT semblent entrer par des voies différentes au niveau des terminaisons nerveuses périphériques mais la dépendance de l'activité de recyclage n'a pas encore été clairement établie et pourrait varier selon les modèles cellulaires et les conditions expérimentales utilisés.*

### 3.2.3.4 *Translocation des BoNTS dans le cytosol neuronal*

Les toxines endocytosées dans les cellules neuronales se retrouvent dans des compartiments intracellulaires où elles sont inactives. Les BoNTs gagnent le cytosol par un mécanisme de translocation faisant intervenir le domaine N-terminal (Hn) de la chaîne lourde. Ce domaine, très conservé parmi les différents sérotypes, est capable de s'associer en tétramères et de faire des pores dans des bicouches lipidiques suite à l'acidification du milieu (Montal *et al.*, 1992). Ainsi, lorsque la vésicule contenant la toxine (vésicule synaptique recyclée ou vésicule d'endocytose « classique ») est acidifiée par action des ATPases vacuolaires, Hn changerait de conformation et deviendrait capable de s'insérer dans la membrane vésiculaire puis de transloquer la chaîne légère L dans le cytosol neuronal. Deux schémas ont été proposés pour expliquer ce processus. Selon une première hypothèse, la chaîne L se déplierait à pH acide et passerait par un pore transmembranaire formé par le ou les domaine(s) Hn puis, suite à l'exposition au pH neutre du cytosol, la chaîne L se replierait et serait libérée de la vésicule par réduction du pont disulfure intercaténaire (Hoch *et al.*, 1985). Le second modèle avancé par Beise *et al.* (Beise *et al.*, 1994) propose que suite à l'acidification de la vésicule, la chaîne L s'insérerait dans la bicouche lipidique et provoquerait une lyse osmotique de la vésicule et la libération de la toxine entière dans le cytosol. Divers éléments sont en désaccord avec ces deux schémas et une hypothèse alternative a proposé que la chaîne L serait transloquée à travers la membrane vésiculaire via un canal ouvert latéralement aux lipides, plutôt qu'à l'intérieur d'un pore protéique (Montecucco *et al.*, 1994). Il a été récemment montré que le pont disulfure intercaténaire est nécessaire à la translocation de la chaîne légère à travers le canal protéique formé par la chaîne lourde (cf. Fig. 48) (Fischer and Montal, 2007a).

*La translocation de BoNT implique donc une étape d'insertion membranaire de Hn induite par une acidification, qui pourrait être couplée à un dépliement de la chaîne L permettant son entrée dans le canal « chaperon » de Hn et sa conduction. La chaîne légère est alors libérée de la chaîne lourde suite à la réduction du pont disulfure et retrouverait une conformation active dans le cytosol.*



**Fig. 50** Marquage des filaments d'actine (phalloïdine, rouge) sur une monocouche de cellules épithéliales intestinales (lignée Caco-2) avec les coupes (x,y), (x,z) et (y,z). Notez l'aspect unistratifié de l'épithélium sur les coupes (x,z) et (y,z), et sur la coupe (x,y) l'apparence des microvillosités apicales en « chou-fleur » dont le cytosquelette d'actine est marqué par la phalloïdine (flèche). (Barre = 10  $\mu$ m). (Couesnon, non publié)

### 3.2.4 Transport des BoNTs à travers les cellules intestinales

Le passage de la neurotoxine botulique à travers la barrière intestinale a été rapporté pour la première fois en 1960 (Heckly *et al.*, 1960), mais le terme de transcytose pour décrire ce transport par des lignées de cellules intestinales fut employé seulement en 1998 (Maksymowych and Simpson, 1998).

#### 3.2.4.1 Mécanisme de la transcytose

Le terme de transcytose désigne le transport de cargos macromoléculaires d'un côté d'une cellule vers l'autre coté au sein d'une structure vésiculaire. Il s'oppose au transport paracellulaire qui est le mouvement entre les cellules de ces cargos accompli par la régulation de la perméabilité des jonctions serrées. (Tuma and Hubbard, 2003). La transcytose est assez répandue, en particulier dans les tissus épithéliaux qui forment des barrières cellulaires entre deux environnements (cf. Fig. 50), mais elle est également présente dans des ocléoclastes ou dans des neurones. Dans les cellules intestinales, la transcytose est une voie particulière d'endocytose, le cargo étant internalisé pas des mécanismes dépendants de la liaison aux récepteurs (voie clathrine en général), et progressivement orienté vers des destinations cellulaires spécifiques.

Dans les cellules endothéliales, la transcytose est assurée par les cavéoles. De multiples mécanismes de transcytose ont évolué selon le contexte cellulaire mais la caractéristique principale de cette voie est que le cargo n'est pas dirigé vers la dégradation par les lysosomes. La distance entre le côté apical et basolatéral est 100 fois plus grande pour les cellules épithéliales que pour les cellules endothéliales et le rôle des microtubules est également plus important. Dans les cellules épithéliales, les compartiments de la voie de transcytose sont alignés le long des microtubules. Une désorganisation des microtubules (par la colchicine par exemple) n'inhibe pas l'internalisation de molécules dans les endosomes précoces mais empêche leur transfert vers d'autres compartiments. Cette inhibition n'est pas observée dans le cas d'une transcytose dans le sens apical-basolatéral. Les microtubules ne sont probablement pas strictement nécessaires à la transcytose et il est probable que lorsqu'ils sont désorganisés les cinétiques de transport soient seulement ralenties (Tuma and Hubbard, 2003). L'actine semble jouer un rôle régulateur important dans l'endocytose du côté apical mais pas basolatéral. Ainsi, la cytochalasine D, un agent désorganisant l'actine, inhibe l'internalisation uniquement au niveau du pôle apical et cause une accumulation des puits couverts de clathrine à la membrane plasmique qui semblent ne plus pouvoir se refermer. Mais il existe certaines exceptions à ce schéma classique (Tuma and Hubbard, 2003).

#### 3.2.4.2 Exemples de transcytose à travers des modèles de barrière intestinale

##### 3.2.4.2.1 Transferrine

Le transport de la transferrine à travers les cellules intestinales est l'un des mécanismes de transcytose les plus étudiés. Il a été montré que la transferrine était internalisée au niveau de la membrane basolatérale d'une lignée de cellules épithéliales intestinales, Caco-2, dans des vésicules couvertes de clathrine. La transferrine est détectée dans des tubules lisses dès 5 min à 37°C et dans des éléments vacuolaires périnucléaires dès 10 min. Après 15 min, elle est localisée dans le Golgi puis vers le cytoplasme apical. Il existe également une voie rapide de recyclage de la transferrine qui ramène le ligand internalisé au niveau de la surface où il a été endocytosé (Hughson and Hopkins, 1990)..



#### 3.2.4.2.2 Immunoglobulines de type A, M et E

Les immunoglobulines (Igs) sont des éléments essentiels du système immunitaire et leur transport a été largement étudié au niveau des cellules épithéliales qui représentent les barrières physiques de l'organisme contre les agressions extérieures.

Ainsi, il a été montré que les Igs sont internalisées par endocytose dépendante de la liaison aux récepteurs et transcytosées dans différentes lignées de cellules épithéliales intestinales :

- Les IgA reconnaissent les récepteurs aux polyimmunoglobulines (pIgR) et sont transportées du côté basolatéral vers le côté apical dans l'épithélium de l'intestin de souris.
- Les IgG et IgE se lient respectivement au récepteur néonatal de la chaîne des Igs (FcRn) et à une glycoprotéine de type lectine, CD23 ; elles sont ensuite transportées bidirectionnellement par les T84 et les Caco-2, deux lignées humaines de cellules épithéliales intestinales (Dickinson *et al.*, 1999 ; Tu *et al.*, 2005).

#### 3.2.4.2.3 BSLD

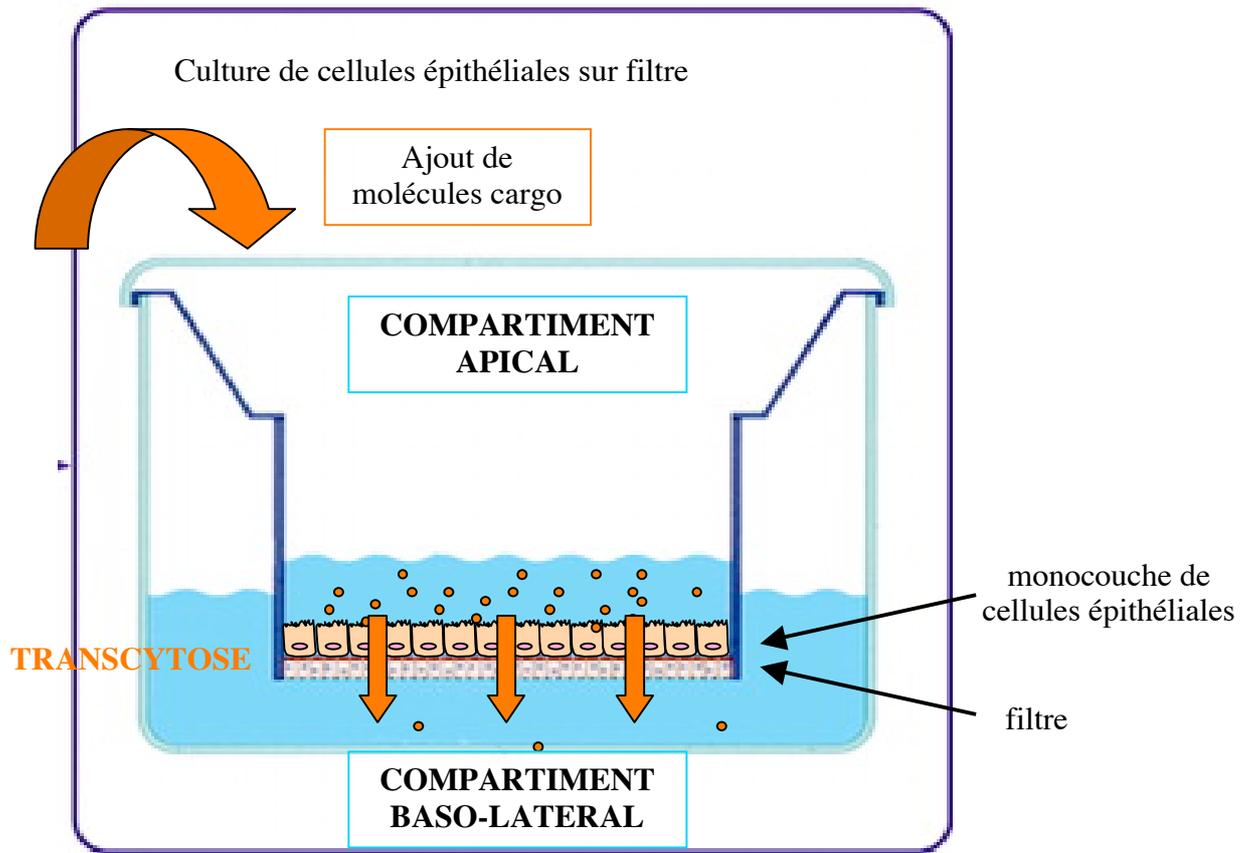
La lipase dépendante des sels de la bile pancréatique (BSLD) est transportée par la lignée humaine épithéliale intestinale Int407 (Bruneau *et al.*, 2001). Le passage de la BSLD radiomarquée à travers ces cellules est linéaire pendant les quatre premières heures d'incubation puis atteint un plateau, excluant un mouvement par phase fluide. Le passage à 4°C était très diminué montrant l'absence d'une diffusion passive due à des jonctions intercellulaires perméables. De plus, il a été montré que la BSLD est internalisée dans des vésicules couvertes de clathrine et non dans des cavéoles. C'est la première démonstration d'une transcytose dans le sens apical-basolatéral d'une enzyme digestive pancréatique sécrétée à travers des cellules intestinales polarisées, le sens basolatéral-apical de transport étant beaucoup plus répandu.

#### 3.2.4.2.4 Cobalamine II

La vitamine B12 ou cobalamine II est un deuxième exemple de molécule transcytosée dans le sens apical-basolatéral. En effet, il a été montré que la cobalamine II est internalisée par endocytose médiée par récepteur à la base des microvillosités dans des vésicules couvertes de clathrine et transcytosée par des Caco-2 (Gueant *et al.*, 1988).

En conclusion, peu de récepteurs ont été identifiés au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales intestinales et des marqueurs d'internalisation par phase fluide comme la peroxydase ont été utilisés pour étudier l'endocytose au niveau apical. Si on incube les Caco-2 avec la peroxydase du côté apical, son signal est détecté au bout de 5 min dans des puits couverts puis dans des endosomes tubulaires sous la bordure en brosse. Après 15 min, les endosomes contenant la peroxydase sont plus volumineux, parfois vacuolaires, et sont localisés plus profondément dans la cellule. Mais aucun élément marqué n'est présent dans la région située sous le noyau comme le système d'endosome basolatéral, excluant la voie transcytotique.

*La transcytose est une voie particulière de l'endocytose permettant le transport de cargo d'un côté de la cellule à l'autre par une voie intravésiculaire. Plusieurs exemples de transcytose à travers des cellules épithéliales intestinales ont été décrits mais la voie de transcytose dans le sens apical-basolatéral reste assez mal connue.*



**Fig. 51** Schéma du modèle cellulaire de la transcytose

### 3.2.4.3 *Mise en évidence du transport des complexes botuliques sur un modèle d'épithélium intestinal*

Les premières expériences de transcytose ont été réalisées sur des lignées cellulaires épithéliales intestinales (T-84 et Caco-2) et rénales (MDCK) en utilisant les toxines BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C, ou TeNT marquées radioactivement à l' $^{125}\text{I}$  (Maksymowych and Simpson, 1998).

L'intensité de la liaison aux cellules épithéliales, quantifiée par comptage radioactif, est équivalente pour les sérotypes A et B, mais beaucoup plus faible pour les BoNT/C et TeNT. La liaison de BoNT/A aux cellules MDCK est également négligeable.

Les expériences de transcytose ont été réalisées sur des monocouches de cellules épithéliales cultivées sur filtre, séparant un compartiment apical d'un compartiment baso-latéral (cf. Fig. 51). Le passage de la toxine marquée d'un compartiment à l'autre a été mesuré par dosage de la radioactivité. Les résultats ont montré que les T-84 sont capables d'internaliser, de transcytoser et de relarguer BoNT/A, contrairement aux cellules MDCK. BoNT/B est également transcytosée par les T-84, mais pas BoNT/C ni TeNT. De plus, une augmentation de la concentration en BoNT inoculée entraîne une augmentation du flux de toxine à travers la monocouche. Le passage des toxines dans le sens basolatéral-apical serait possible mais moins efficace que dans l'autre sens.

Cependant, la cinétique de passage de la toxine radiomarquée montre une augmentation linéaire au cours du temps (cinétique sur 24 h), ce qui pourrait être due soit à une fuite de radioactivité libre, soit à une augmentation de la perméabilité épithéliale.

L'effet de diverses drogues a également été testé :

- La brefeldine A, désorganisant le triage des vésicules et l'appareil de Golgi, augmente la quantité de toxine transcytosée au bout de 18 h à 37°C d'un facteur 1,5.
- Le nocodazole, désorganisant les microtubules, diminue le passage de moitié.
- La bafilomycine  $A_1$ , inhibant l'acidification des endosomes, diminue légèrement le taux de passage de la toxine.

L'analyse des toxines transcytosées sur gel de polyacrylamide a montré qu'elles sont identiques à celles de l'inoculum et qu'elles ne sont pas réduites au cours du transport. De plus, un test de létalité sur souris a montré que les toxines transcytosées conservent une partie de leur activité biologique. Enfin, si le complexe botulique est utilisé au lieu de la toxine pure, une minorité de composants hémagglutines est détecté de l'autre côté de la monocouche et un mécanisme d'endocytose par phase fluide a été proposé pour expliquer ce transport (Maksymowych and Simpson, 1998).

**A**

Toxine (4°C)			Traitements sur les cellules	Méthodes de détection	Lignée cellulaire	Référence
Type	Purifiée	Complexe				
<b>A</b>	+++	ND		Radioactivité	T84	N°1
	-				MDCK	
<b>B</b>	+++	ND		Radioactivité	T84	N°1
<b>C</b>	-	ND	PPMP : - BenzylsalNAc : -	Radioactivité	T84	N°1
		+++ (L)		Immunofluorescence	HT-29	N°3
<b>D</b>	-	+++ (L)		Western Blot (WB)	Caco-2	N°5
<b>TeNT</b>	-			Radioactivité	T84	N°1

**B**

Toxine (37°C)			Après traitement sur les cellules	Méthodes de détection	Lignée cellulaire	Référence
Type	Purifiée	Complexe				
<b>A</b>	+++	+++	Brefeldine : +++++ Nocodazole : ++ Bafilomycine : ++ Méthylamine : ++ Déplétion K <sup>+</sup> : ++ Chlorpromazine : +	Radioactivité Western Blot Dose létale sur souris Hémidiaphragme	T84	N°1 N°2
	-				-	
<b>B</b>	+++	+++		Radioactivité	T84	N°2
	-	-		Western Blot	MDCK	
<b>C</b>	-	ND	PPMP : +++ BenzylsalNAc : -	Radioactivité	T84	N°1
	-	+++ (L)		Immunofluorescence	HT-29	N°2
	-	+++ (L)		MβCD : -	Immunofluorescence	HT-29
<b>D</b>	+	+++		Dose létale sur souris	Caco-2	N°5
<b>TeNT</b>	-			Radioactivité	T84	N°1

**Tab. 9** Récapitulatif simplifié des expériences de liaison (A) et d'internalisation (B) des BoNTs et de TeNT sur différentes lignées cellulaires intestinales.

Ordre de grandeur de la quantité de toxine liée ou internalisée/transcytosée :

+++ : importante

++ : moyenne

+ : faible

- : négligeable

ND : non déterminé.

La correspondance des numéros des références avec la bibliographie est la suivante :

N°1 : (Maksymowych and Simpson, 1998).

N°2 : (Maksymowych and Simpson, 2004)

N°3 : (Nishikawa *et al.*, 2004)

N°4 : (Uotso *et al.*, 2005)

N°5 : (Niwa *et al.*, 2007)

Le passage des toxines BoNT/A et BoNT/B pures ou en complexe avec NTN<sub>H</sub> et les HAs dans le compartiment basolatéral des cellules T-84 a également été détecté par la technique de Western Blot avec des anticorps dirigés contre la chaîne lourde des BoNTs (Maksymowych and Simpson, 2004). Après 18 h d'incubation, les niveaux de toxine détectés sont similaires pour la toxine pure ou en complexe, confirmant que les ANTPs ne sont pas nécessaires au passage de la toxine dans les T-84. De plus, les formes activées ou non des BoNTs sont transcytosées avec une efficacité similaire, et la BoNT/B transcytosée par les T-84 conserve son activité biologique sur une préparation d'hémidiaphragme.

Par ailleurs, la chaîne lourde native H et le fragment recombinant Hc de BoNT/A sont transcytosés par les T-84 avec des taux similaires. Ceci démontre que le domaine impliqué dans l'interaction avec les cellules épithéliales intestinales est localisé dans la partie Hc de la toxine, comme cela a été montré pour les cellules neuronales (Maksymowych and Simpson, 2004).

L'implication de la clathrine dans le transport de la toxine a été mise en évidence par l'inhibition de la transcytose après déplétion au potassium ou traitement à la Chlorpromazine (Maksymowych and Simpson, 2004).

Le passage de la toxine BoNT/A marquée avec un fluorophore (Alexa 488) dans les cellules T-84 a également été quantifié par mesure de la fluorescence du milieu du pôle basolatéral (Ahsan *et al.*, 2005). Les cellules ont été préincubées à 3°C en présence de toxine du côté apical et transférées à 37°C. La toxine fluorescente a été détectée dans le compartiment basolatéral dès 5 min à 37°C et la quantité maximale de toxine a été mesurée au bout de 20 min. De plus, le passage de BoNT/A a été visualisé en microscopie confocale montrant une progression de la fluorescence de la membrane apicale vers la surface basale avec un marquage en halo. Cette distribution du marquage a été attribuée à l'anatomie des cellules épithéliales intestinales qui présentent un noyau de volume important en position centrale. Par ailleurs, un phénomène de saturation de l'endocytose a été mis en évidence par l'entrée de la toxine marquée en plusieurs vagues.

*BoNT/A et BoNT/B, mais pas BoNT/C ni TeNT, seraient transcytosées à travers un modèle d'épithélium intestinal, une monocouche de cellules T-84, suivant une endocytose dépendante de la liaison aux récepteurs. Le domaine Hc serait responsable de la liaison de BoNT aux récepteurs sur les cellules intestinales et de son transport par un mécanisme dépendant de la clathrine.*

Par ailleurs, dans un modèle de cellules Caco-2 cultivées sur filtre, des complexes botuliques de type D de différentes tailles ont été ajoutés dans le compartiment apical et la toxicité dans le milieu baso-latéral au bout de 24 h a été détectée chez la souris par injection intrapéritonéale (Niwa *et al.*, 2007). Le nombre de souris survivantes sur onze injectées a permis de montrer des différences de perméabilité des Caco-2 selon les formes de complexe. Les complexes L comprenant HA34 sont les plus toxiques, avec seulement 5 souris survivantes sur 11. Aucun passage des complexes M (BoNT + NTN<sub>H</sub>) et des complexes M/HA70 (BoNT + NTN<sub>H</sub> + HA70) n'a été détecté, contrairement à la toxine seule qui a montré un léger passage (9 souris survivantes sur 11). Seule la liaison aux Caco-2 des complexes L a été détectée en Western blot. La résistance aux jus gastrique et intestinal ainsi que la toxicité orale sont bien supérieures dans le cas des complexes L en comparaison avec les complexes M ou avec la toxine BoNT/D seule. Ces expériences ont montré un rôle crucial de HA34 dans la perméabilité de l'épithélium aux complexes botuliques de type D.



L'internalisation du complexe botulique de type C a été visualisée dans une autre lignée de cellules épithéliales intestinales, HT-29, par détection indirecte à l'aide d'anticorps dirigés soit contre BoNT/C soit contre les ANTPs (Nishikawa *et al.*, 2004). La nécessité des hémagglutinines dans la liaison aux HT-29 a été démontrée car seule la liaison du complexe L (comprenant BoNT/C, NTNH et les HAs) a été observée, et non celle du complexe M (comprenant uniquement BoNT/C et NTNH). L'observation en microscopie confocale des cellules incubées en présence du complexe L a montré un marquage périphérique des cellules après 4 min et à des temps plus tardifs. L'implication des acides sialiques des gangliosides a été démontrée par l'inhibition de la liaison du complexe L suite au traitement à la neuraminidase des cellules HT-29. Le traitement des cellules par le PPMP, un inhibiteur de la glucosylcéramide synthase qui réduit la quantité de gangliosides, n'a pas eu d'effet sur la liaison et l'internalisation du complexe L. Par ailleurs, le traitement au Benzyl-GalNAc, connu pour inhiber l'O-glycosylation des mucines, a empêché la liaison aux cellules HT-29 du complexe L. Il a donc été conclu que le complexe L de type C reconnaît les acides sialiques et pourrait être internalisé avec des oligosaccharides de type mucine présents à la surface des cellules (Nishikawa *et al.*, 2004).

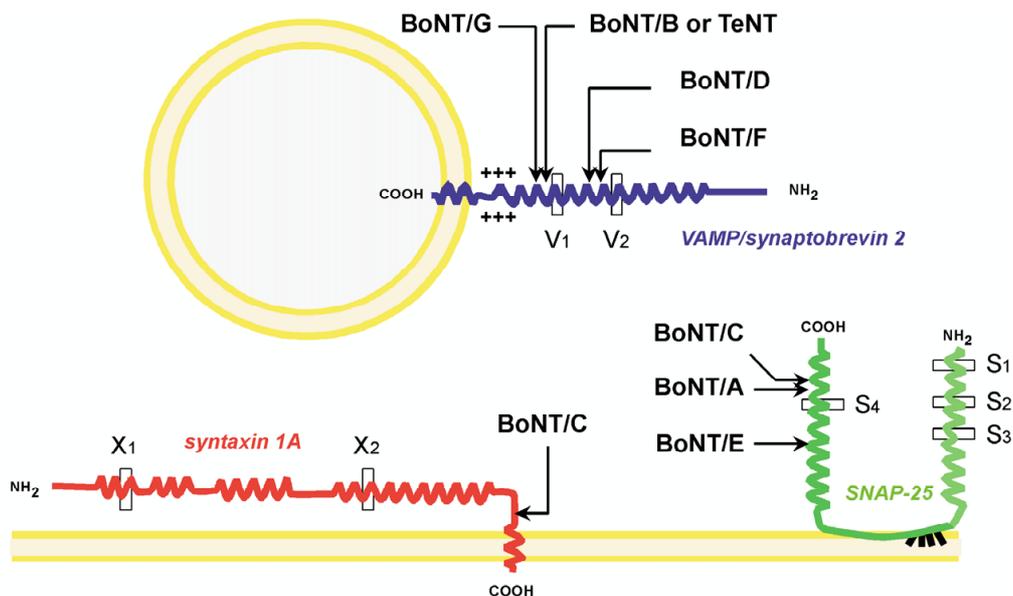
L'étude du trafic intracellulaire du complexe botulique de type C dans les cellules HT-29 a été poursuivie (Uotso *et al.*, 2005). La visualisation de l'internalisation du complexe L en microscopie confocale a montré qu'il est endocytosé à la fois dans des vésicules à clathrine (colocalisation avec la chaîne lourde de la clathrine et le marqueur des endosomes précoces EEA1) et dans des cavéoles (colocalisation avec la cavéoline-1). L'implication du cholestérol dans le trafic du complexe L a été mise en évidence par l'inhibition de son entrée (mais pas de sa liaison) par traitement des cellules HT-29 à la M $\beta$ CD. Par ailleurs, les DRMs isolés des cellules HT-29 contiennent peu de glycoprotéines jouant le rôle de récepteur pour le complexe L. Concernant les étapes plus tardives du trafic du complexe L, une dissociation de BoNT/C et des ANTPs a été observée puisque BoNT/C colocalise avec TGN38, un marqueur de l'appareil de Golgi, contrairement à HA34 et HA52. Aucune colocalisation n'a été observée avec les marqueurs du réticulum endoplasmique (protein disulfide isomerase) ou des lysosomes (Lamp-1).

*Pour les types C et D de neurotoxines botuliques, HA34 serait nécessaire à la liaison des complexes aux cellules intestinales (Caco-2 ou HT-29) et augmenterait la perméabilité de l'épithélium aux complexes botuliques. Le complexe L de type C serait internalisé majoritairement dans des vésicules couvertes de clathrine et localisé dans des endosomes précoces, mais également dans des cavéoles. Ensuite, le complexe L serait dissocié et BoNT serait dirigée vers l'appareil de Golgi. Les principaux résultats de liaison et d'internalisation des BoNTs dans les cellules intestinales sont résumés dans le tableau 9.*

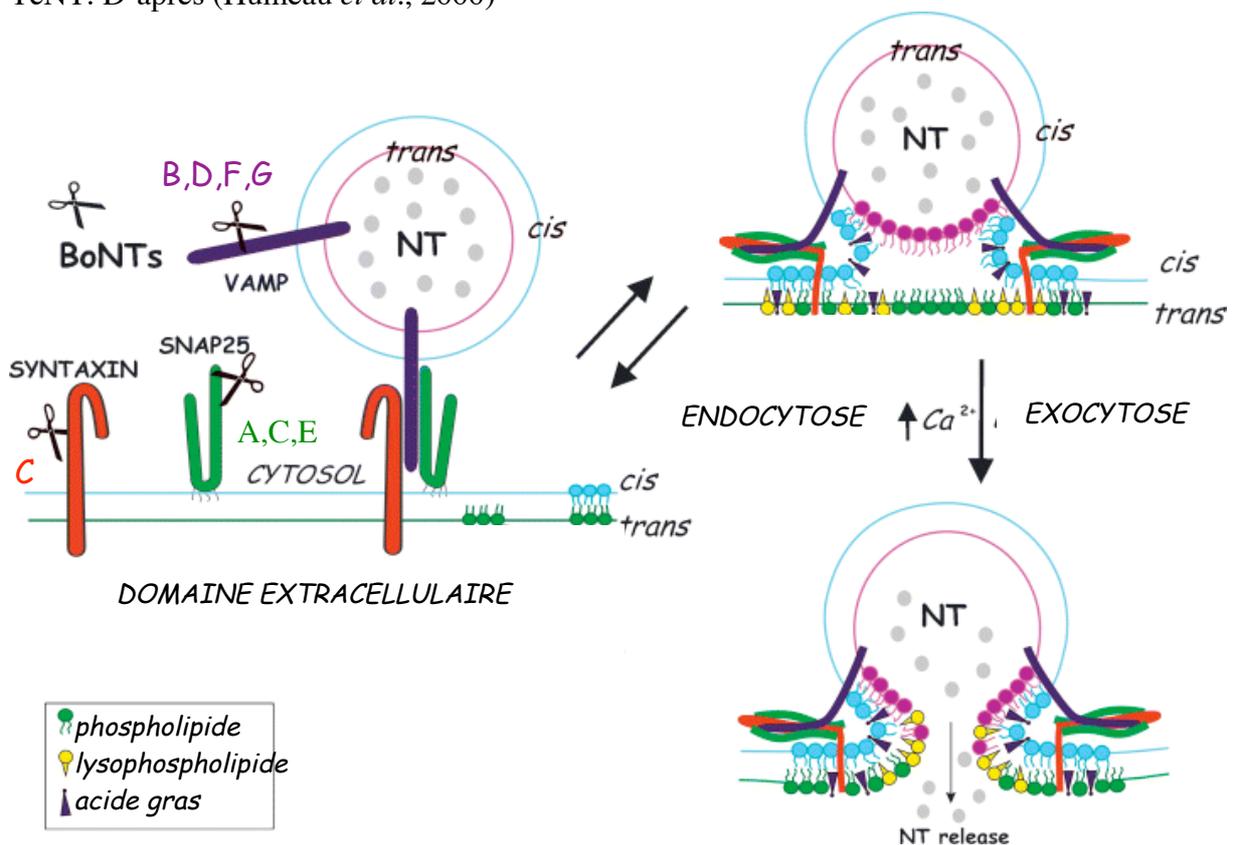
**Une grande partie de mon travail de thèse a porté sur l'étude des récepteurs reconnus par le domaine Hc de BoNT/A (Hc/A) à la surface des cellules intestinales en comparaison avec les cellules neuronales.**

**Je me suis également intéressée au passage de BoNT/A biologiquement active (seule ou en complexe) à travers une monocouche de cellules épithéliales intestinales, en comparant l'efficacité de deux lignées, l'une de type entérocyte et l'autre de type cellule de crypte.**

**Enfin, j'ai essayé de caractériser les voies d'endocytose de BoNT/A, en utilisant notamment le domaine Hc/A couplé à un fluorophore, dans les cellules intestinales et neuronales.**



**Fig. 52** Schéma de la localisation des sites de clivage des protéines SNAREs par les BoNTs et TeNT. D'après (Humeau *et al.*, 2000)



**Fig. 53** Schéma du rôle du complexe SNARE dans la neuro-exocytose et du ciblage par les neurotoxines botuliques (BoNTs). L'activité métalloprotéasique de la chaîne légère L des BoNTs est représentée sous forme de ciseaux. La formation du complexe SNARE en juxtaposition avec une vésicule synaptique contenant les neurotransmetteurs (NT) est essentielle à l'hémi-fusion de la vésicule (phospholipides bleu ciel) avec la membrane présynaptique. Cet intermédiaire d'hémi-fusion peut déboucher sur la formation d'un pore avec libération des NT dans la fente synaptique. La fusion complète d'un vésicule donne naissance à un potentiel de plaque motrice miniature. D'après (Rossetto *et al.*, 2006).

### 3.3 Activité enzymatique des BoNTs au niveau des terminaisons nerveuses

Les substrats de l'activité enzymatique des BoNTs sont intracellulaires et les BoNTs doivent entrer dans les cellules neuronales pour les intoxiquer. L'intoxication se déroule en quatre étapes : liaison à des récepteurs au niveau des terminaisons nerveuses, internalisation dans des vésicules d'endocytose, translocation de l'endosome vers le cytosol et modification enzymatique des cibles intracellulaires (Schiavo *et al.*, 2000). Les trois premières étapes ayant été décrites, il reste à comprendre comment la neurotoxine botulique induit la paralysie flasque caractéristique du botulisme.

La structure tripartite des BoNTs, déterminée grâce à la résolution de leur structure tridimensionnelle (Lacy *et al.*, 1998 ; Swaminathan and Eswaramoorthy, 2000), reflète le mécanisme d'entrée des toxines en distinguant un domaine de liaison aux cellules (Hc), un domaine de translocation (Hn) et un domaine catalytique (L) (cf. Fig. 7).

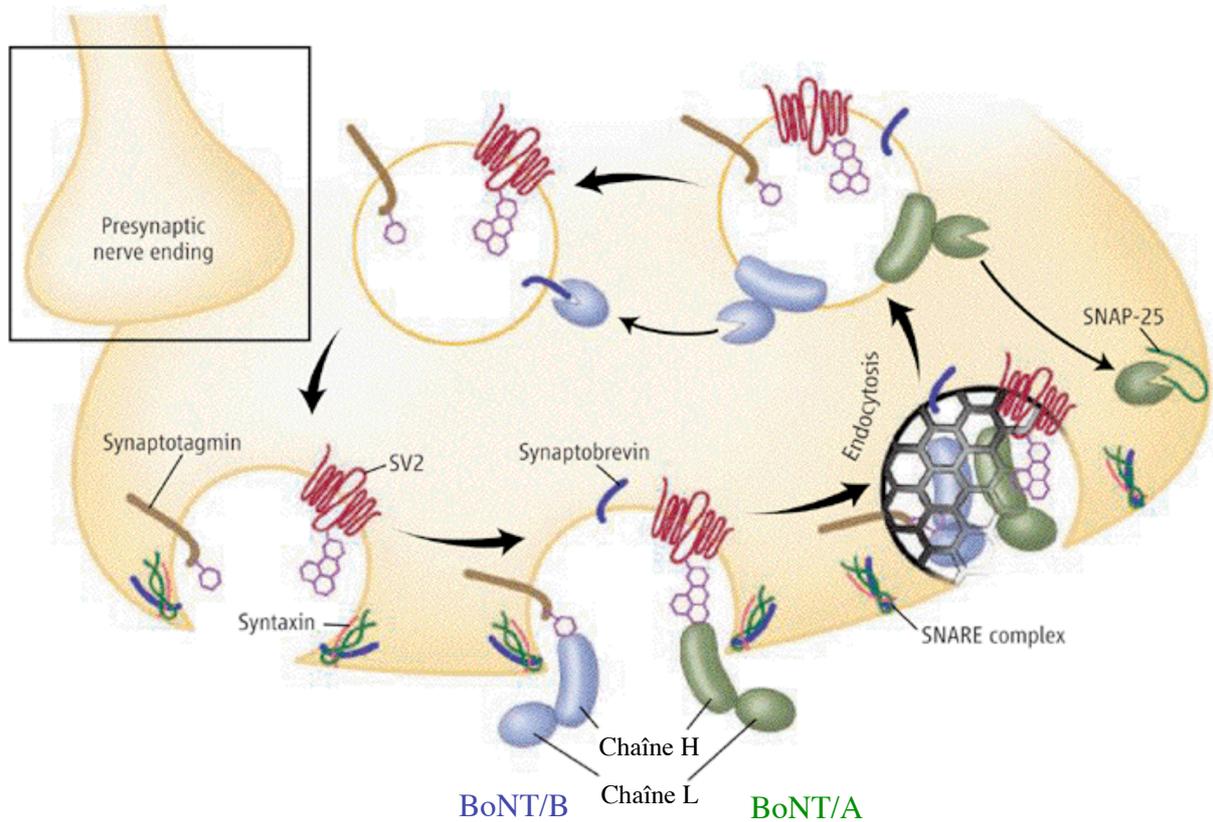
La chaîne légère L introduite dans le cytosol neuronal est capable à elle seule de reproduire l'action de la toxine (Poulain *et al.*, 1988; Stecher *et al.*, 1989; de Paiva and Dolly, 1990). Elle possède le motif His-Glu-X-X-His caractéristique des poches catalytiques des métallo-endopeptidases à Zn<sup>2+</sup> (Schiavo *et al.*, 1992b).

Elle agit en clivant spécifiquement en des sites distincts selon les toxinotypes une ou plusieurs protéines du complexe SNARE à l'extrémité des terminaisons nerveuses (cf. Fig. 52) :

- Les BoNT/A et /E clivent la SNAP-25 (Synaptosome-associated protein 25), souvent associée à la membrane plasmique
- Les BoNT/B, /D, /F et /G clivent la VAMP (Vesicle Associated Membrane Protein) ou synaptobrevine qui est une protéine intégrale des vésicules synaptiques
- BoNT/C clive deux substrats, la SNAP-25 et la syntaxine-1 qui est une protéine intégrale de la membrane plasmique (Schiavo *et al.*, 1992a ; Schiavo *et al.*, 1992b; Blasi *et al.*, 1993a; Blasi *et al.*, 1993b )

Ces trois protéines forment un complexe qui sert de récepteur à la protéine NSF (N-ethylmaleimide-Sensitive Factor). Ce complexe est impliqué dans la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique, permettant notamment la libération des neurotransmetteurs contenus dans des vésicules de stockage à proximité des zones actives des membranes pré-synaptiques (cf. Fig. 53) (Rothman, 1994). La fusion est déclenchée par une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca<sup>2+</sup> dont le principal senseur est la synaptotagmine. Cette protéine intégrale des vésicules synaptiques interagit de manière Ca<sup>2+</sup> dépendante avec les SNAREs, notamment avec la partie C-terminale de SNAP-25 (Chapman, 2002; Koh and Bellen, 2003).

Lorsque l'une des trois protéines du complexe SNARE est clivée, le complexe SNARE peut toujours se former mais le processus de fusion des vésicules synaptiques est interrompu à différents niveaux. Lorsque la SNAP-25 est clivé, le complexe conserve une certaine fonctionnalité mais dans le cas du clivage des deux autres cibles, le blocage est total (Humeau *et al.*, 2000).



**Fig. 54** Schéma de l'entrée de BoNT/A et BoNT/B au niveau de la terminaison nerveuse présynaptique. Les neurotoxines de type A et B se lient respectivement à SV2 et à la synaptotagmine, et sont internalisées par endocytose dans des vésicules probablement couvertes de clathrine. L'acidification des vésicules déclenche l'insertion membranaire de la chaîne lourde H et la translocation de la chaîne L à travers la membrane dans le cytoplasme. La chaîne L de BoNT/A clive SNAP-25 alors que la chaîne L de BoNT/B clive la synaptobrévine (ou VAMP). Le clivage de l'une ou l'autre des protéines SNARE interfère avec la formation de complexes SNARE stables qui sont requis pour la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane lors de l'exocytose. D'après (Jahn, 2006)

Seuls les substrats sous forme monomérique, et non associés en complexe SNARE, sont clivables par les BoNTs. TeNT et les BoNTs sont les toxines les plus puissantes connues, avec une dose mortelle chez l'homme estimée à moins de 1 µg par voie orale (Schantz and Johnson, 1992) Or leur activité enzymatique n'est pas très élevée, puisque le  $K_m$  de TeNT pour VAMP est de 200 µM. De plus, les substrats des neurotoxines ne sont sous forme monomérique qu'un court instant (1-5 s) au cours du cycle de fusion des vésicules. Mais comme ces protéines sont recyclées, les BoNTs clivent progressivement la totalité des molécules substrats et il a été montré chez l'animal qu'une inhibition de 20% de la libération de l'acétylcholine au niveau de la jonction musculaire est suffisante pour empêcher la contraction musculaire. En outre, la paralysie de 10 à 15 % des fibres musculaires du diaphragme suffit à déclencher des troubles respiratoires avec asphyxie (Poulain *et al.*, 2000).

Lorsque des neurones d'hippocampe de rat en culture sont intoxiquées par BoNT/A ou /E, seules certaines synapses sont bloquées (glutamatergiques) alors que d'autres conservent une activité d'endo-exocytose (GABAergiques). Cette différence d'activité est à mettre en relation avec les différences de niveaux d'expression de SNAP-25 dans les neurones (Verderio *et al.*, 2004; Verderio *et al.*, 2007). Par ailleurs certains isoformes non synaptiques des trois protéines SNAREs impliqués dans d'autres processus sécrétoires que la neuroexocytose sont également clivés par les BoNTs (la cellubrèvine, SNAP-23, les syntaxines 2 et 3). Ainsi, l'injection de la chaîne L des BoNTs dans des cellules non-neuronales contenant les cibles spécifiques des toxines bloque efficacement la sécrétion (Niemann *et al.*, 1994). Mais l'inefficacité de l'application extracellulaire des BoNTs sur ces mêmes cellules laisse penser que ces dernières ne possèdent pas les récepteurs nécessaires à la liaison et à l'internalisation des BoNTs.

Par ailleurs, en plus de son implication dans la reconnaissance des récepteurs neuronaux, HA34 aurait également un rôle dans l'activité enzymatique de BoNT/A et BoNT/E (Sharma and Singh, 2004). L'activité d'endopeptidase de ces deux types de neurotoxines botuliques est augmentée *in vitro* par préincubation avec HA34, en particulier lorsque les toxines sont réduites. Ainsi, le clivage de SNAP-25 par les formes réduites de BoNT/A et BoNT/E est respectivement 25 fois et 43 fois plus efficace après préincubation avec HA34. HA34 n'est pas capable de cliver SNAP-25 mais elle augmente les taux d'activité enzymatique de BoNT/A et BoNT/E. De plus, HA34 liée à BoNT/A ou BoNT/E augmente leur activité d'endopeptidase dans des synaptosomes, suggérant une entrée potentielle de HA34 et BoNT dans les synaptosomes.

*L'activité et la spécificité des complexes botuliques dépendent donc à la fois de la présence de récepteurs à la surface des cellules et de l'expression de la cible intracellulaire. La chaîne légère L est, à elle seule, responsable de l'activité enzymatique des BoNTs, à savoir le clivage spécifique d'une des trois protéines qui composent le complexe SNARE impliqué dans la libération des neurotransmetteurs au niveau des terminaisons présynaptiques (cf. Fig. 54). Ce clivage a des conséquences dramatiques sur la neurotransmission et donc sur la contraction musculaire. Les BoNTs entraînent alors une paralysie durable qui peut être mortelle, ce qui en fait des armes biologiques potentielles très puissantes, mais également des outils thérapeutiques très efficaces et de plus en plus utilisés.*



## Objectifs du travail de thèse

Afin de mieux connaître comment la production de la neurotoxine botulique et des protéines non toxiques associées était régulée, je me suis intéressée à l'expression des gènes du locus botulique de *C. botulinum* de type A. L'impact de la phase de croissance sur la régulation de la toxinogénèse a été étudié en réalisant une analyse transcriptionnelle semi-quantitative des gènes du locus botulique par RT-PCR en temps réel au cours d'une cinétique de croissance bactérienne (cf. **partie 4.1.**) (Couesnon *et al.*, 2006).

J'ai ensuite étudié comment, dans le cas d'une intoxication alimentaire ou d'une toxi-infection, la neurotoxine passe la barrière intestinale. Pour cela, deux approches ont été envisagées.

Tout d'abord, j'ai étudié l'interaction de BoNT/A avec des lignées de cellules neuronales, qui sont les cellules cibles de la toxine, et intestinales, qui sont des cellules potentielles de transport de la toxine.

Une partie de mon travail de thèse a porté sur l'étude des récepteurs reconnus par le domaine de liaison Hc de BoNT/A (Hc/A) à la surface des cellules intestinales en comparaison avec les cellules neuronales. Je me suis également intéressée au passage de BoNT/A biologiquement active (seule ou en complexe) à travers une monocouche de cellules épithéliales intestinales, en comparant l'efficacité de deux lignées, l'une de type entérocyte et l'autre de type cellule de crypte (cf. **partie 4.2.**) (Couesnon *et al.*, 2007).

J'ai également essayé de caractériser et de comparer les voies d'endocytose du Hc de BoNT/A, en utilisant la protéine recombinante Hc/A couplée à un fluorophore (Hc/A\*), dans les lignées de cellules intestinales et neuronales (cf. **partie 4.4.**) (article en préparation).

Une deuxième approche de l'étude de l'interaction des BoNTs avec la muqueuse intestinale se situe non plus à l'échelle cellulaire mais à l'échelle de l'organe, ou tout du moins une partie. En utilisant le fragment recombinant Hc/A marqué par fluorescence (Hc/A\*), j'ai essayé de visualiser le trafic du Hc/A\* injecté dans la lumière d'une anse d'iléum de souris ligaturée. Je me suis particulièrement intéressée à l'interaction du Hc/A\* avec les nombreuses terminaisons nerveuses présentes dans la sous-muqueuse et dans la musculature intestinales (cf. **partie 4.3.**) (article en préparation).

L'effet de BoNT/A injectée dans la lumière intestinale sur les contractions spontanées de l'intestin a également été étudié (cf. **partie 4.3.**). Il peut être considéré comme un test fonctionnel du passage de la muqueuse intestinale par la toxine, la constipation étant un des symptômes précoces couramment signalés lors de cas de botulisme dus à une intoxication alimentaire ou à une toxi-infection.

**Le passage de la neurotoxine botulique à travers la barrière intestinale et son transport vers les neurones cibles sont les premières étapes de l'intoxication botulique. Une meilleure compréhension de ces étapes devrait permettre de mieux connaître la physiopathologie et le déroulement de cette affection, ainsi que de développer de nouvelles stratégies de prévention du botulisme.**



## 4 Résultats

### 4.1 Article n°1 : Expression des gènes des neurotoxines botuliques A et E et des gènes des protéines non toxiques associées pendant la transition de phase et stabilité à haute température : Analyse par PCR en temps réel en transcription inverse

Article publié (Couesnon *et al.*, 2006).

#### 4.1.1 Résumé

Il a été montré précédemment que la production de la neurotoxine botulique de type A (BoNT/A) et des protéines non toxiques associées (ANTPs, comprenant un composant non toxique non hémagglutinant NTNH et trois hémagglutinines HAs) est dépendante d'un facteur sigma alternatif de l'ARN polymérase (BotR/A). L'expression synchrone de *botR/A*, *bont/A*, et des gènes des *antps*, mesurée par transcription inverse et analyse par PCR en temps réel, était maximale lors de la transition entre les phases de croissance exponentielle et stationnaire de *Clostridium botulinum* A. Le niveau d'expression de *botR/A* était environ 100 fois inférieur à ceux de *bont/A* et des *antps*. BotR/A est donc un facteur sigma alternatif contrôlant l'expression des gènes du locus botulique de type A lors de la phase de transition. Les concentrations les plus élevées en toxine libérée dans le surnageant de culture ont été détectées 12 h après le pic d'expression de *botR/A*, *bont/A*, et des *antps*, sans lyse apparente des bactéries. Les niveaux de toxine étaient alors stables sur une période de 5 jours à 37°C alors qu'une chute brutale de l'activité létale a été observée après 24 h lorsque la culture était incubée à 44°C. La température élevée n'a pas inhibé la transcription puisque les niveaux d'expression des gènes du locus étaient similaires dans les cultures incubées à 37°C ou 44°C. Cependant, l'incubation à 44°C a activé une protéase dépendante du calcium qui a dégradé BoNT/A et NTNH, mais pas les HAs. Chez *C. botulinum* de type E qui ne contient pas de gène apparenté à *botR*, les gènes *bont/E* et *p47* étaient également exprimés pendant la transition de phase mais aucune dégradation n'a été observée à 44°C.

#### 4.1.2 Souches de *C. botulinum* utilisées

Chez *Clostridium botulinum* de type A, les gènes de la neurotoxine (*bont/A*) et des protéines non toxiques associées (*antps*) sont regroupés au sein d'un segment chromosomique d'ADN nommé locus botulique.

Ces gènes sont associés en deux opérons transcrits en sens inverse :

- *ntnh/A-bont/A*
- *ha34-ha17-ha70*.

Le gène *botR/A*, qui code pour une protéine ayant des caractéristiques de protéine liant l'ADN, est localisé entre les deux opérons. BotR/A a été caractérisé dans le laboratoire comme étant un activateur transcriptionnel de *bont/A* et des *antps*. De plus, il a été identifié comme un facteur sigma alternatif de l'ARN polymérase, qui forme avec des régulateurs appartenant à d'autres espèces de *Clostridium* (TetR de *C. tetani*, TxeR de *C. difficile* et UviA de *C. perfringens*) un nouveau sous-groupe de la famille des facteurs sigma 70 de l'ARN polymérase.

La souche de référence utilisée pour le type A est la souche Hall (ATCC3502). Cependant, cette souche ne sporule pas bien en conditions de culture normales. Des séries de cycle « choc thermique/ensemencement » ont permis d'enrichir la souche en formes sporulées.

De plus, la souche NCTC2916, qui sporule très efficacement, a été testée en parallèle. Cette souche de type A a une organisation du locus légèrement différente puisqu'elle contient un locus de type B avec un gène *bont/b* inactif.

L'organisation du locus botulique de *C. botulinum* de type E est différente car il ne présente pas de gènes codant pour les HAs mais trois phases de lecture ouvertes *orfx1*, *orfx2* et *orfx3*, et à la place du gène *botR* le gène *p47*. Les souches de type E ont la caractéristique de ne pas être protéolytique donc ne sont pas capables d'activer BoNT/E.

Une cinétique de croissance typique, suivie par mesure de la densité optique à 600nm (DO<sub>600</sub>), comprend :

- une phase de latence où la DO<sub>600</sub> augmente très peu au cours du temps
- une phase de croissance exponentielle où la DO<sub>600</sub> augmente de manière quasi linéaire
- une phase stationnaire où la DO<sub>600</sub> stagne ou décline.

#### 4.1.3 Quantification de l'expression des gènes du locus botulique et de la production de toxine

La méthode utilisée pour étudier l'expression des gènes du locus, la PCR en temps réel, a été choisie pour sa sensibilité de détection et le fait qu'elle permette une réelle quantification, ce que ne permet pas d'autres techniques comme le Northern blot (empreinte à ADN) ou la reverse transcription (RT, transcription inverse).

Or le fait que BotR soit un régulateur suppose que son expression est très faible.

De plus, il faut noter que le génome de *C. botulinum* est particulièrement riche en AT, ce qui ne facilite pas le dessin des amorces pour la PCR.

La méthode employée fait intervenir plusieurs étapes :

- Une cinétique de croissance d'une souche de *C. botulinum* durant laquelle des échantillons de culture sont prélevés
- La toxicité du surnageant est déterminée par la Dose Létale (DL) sur souris (i.p.)
- Les ARNs sont extraits des culots bactériens et après RT, les niveaux d'expression des gènes du locus sont quantifiés par PCR en temps réel et normalisés par rapport à l'expression de l'ARN16S.

Les résultats de PCR en temps réel ont montré que la cinétique d'expression de tous les gènes du locus botulique est similaire et concomitante, à savoir que les niveaux augmentent fortement lors de la transition entre phases de croissance exponentielle et stationnaire, les niveaux d'expression de *botR* étant inférieurs d'un facteur 100 environ à ceux des autres gènes (cf. Fig. 2).

Aucune différence significative n'a été observée entre les souches Hall et NCTC2916, que ce soit en conditions de sporulation ou non (cf. Fig 3).

Les titres en toxine dans le surnageant ont suivi une cinétique parallèle à celle de l'expression des gènes de *bont* et des *antps*, bien que légèrement décalée dans le temps (cf. Fig. 1). Après avoir atteint leur maximum au temps 24 h, les titres en toxine dans le surnageant sont restés stables pendant plusieurs jours.

La température étant un signal environnemental classique de régulation pour plusieurs gènes bactériens, l'effet de l'augmentation de la température d'incubation des cultures (44°C au lieu de 37°C) sur l'expression des gènes du locus botulique a été testé.

Les cinétiques de croissance ainsi que les niveaux d'expression ont été équivalents entre les deux températures. Cependant, une baisse significative des titres en toxine a été notée après la phase de transition (temps ultérieurs à 12h environ).

Compte tenu des résultats de PCR en temps réel, cette baisse de toxicité ne pouvait être due à une inhibition de l'expression des gènes *bont* et *antps* par BotR.

L'implication de processus post-transcriptionnels des complexes botuliques de type A a donc été explorée.

Par ailleurs, l'expression des gènes *bont/E* et *p47* du locus de type E au cours d'une cinétique de croissance a présenté un schéma similaire à celui observé pour le type A (cf. Fig 5b), en dépit du fait qu'il n'y ait pas de gène *botR* identifié à ce jour dans les souches de type E. La toxicité détectée dans le surnageant, après activation de la toxine à l'aide de la trypsine, a suivi la même cinétique que la cinétique d'expression des gènes de la toxine, sans décalage dans le temps (cf. Fig. 5a). La toxicité est restée stable après la transition de phase pendant plusieurs jours.

#### 4.1.4 Stabilité des BoNTs et des ANTPs à température élevée

Le surnageant d'une culture incubée 24h à 37°C a été prélevé et incubé pendant différents temps à 44°C.

La stabilité des complexes botuliques a été déterminée selon plusieurs critères :

- Le titre en toxine déterminé par la DL sur souris
- La détection des différents éléments du complexe botulique par des anticorps spécifiques en Western Blot (immunoempreinte).

Le titre en toxine du surnageant de la souche Hall a chuté d'un facteur 100 au bout de 6 heures d'incubation à 44°C, puis d'un facteur 10 après 24h (cf. Fig 4a). Parallèlement une dégradation de BoNT/A et de NTN/A, mais pas des HAs, a été visualisée en Western blot au cours de l'incubation à 44°C (cf. Fig. 4b).

Parmi les inhibiteurs de protéases testés, seuls l'EDTA (acide éthylène-diamine-tétraacétique) et l'EGTA (acide éthylène-glycol-tétraacétique) ont été capables d'inhiber la dégradation de BoNT/A et de NTN/A à 44°C (cf. Fig. 4c et 4d). Ceci indique que la protéase responsable est une métalloprotéase dépendante du Ca<sup>2+</sup>, dont l'activité est activée à température élevée.

L'incubation d'un surnageant d'une souche de type E (HV) à 44°C n'a induit ni baisse de titre en toxine ni dégradation de BoNT/E ou NTN/E (cf. Fig. 5c et 5d). Ceci laisse supposer que la protéase présente dans le surnageant de la souche Hall de type A et responsable de la dégradation à température élevée de la toxine n'est pas présente dans le surnageant de la souche de type E, et/ou que BoNT/E n'est pas sensible à une telle protéase.

L'incubation à 44°C d'un mélange de surnageant de Hall et de HV a induit une baisse du titre en toxine E, mettant en évidence une activation de la protéase présente dans le surnageant de la souche Hall qui a dégradé BoNT/E.

*L'expression des gènes du locus botulique, étudiée chez deux souches de C. botulinum de type A, est régulée au cours de la cinétique de croissance bactérienne. L'expression des gènes des opérons bontA-ntnh et ha34-ha17-ha70, ainsi que du régulateur botR, est concomitante et maximale au cours de la transition entre la phase exponentielle de croissance et la phase stationnaire, la quantité de toxine détectée dans le surnageant étant maximale suite au pic d'expression. La température n'influe pas sur la régulation de l'expression mais elle active des protéases dégradant la toxine dans le surnageant. Le profil d'expression des gènes du locus botulique est similaire à celui observé pour d'autres régulateurs de la production de toxines clostridiennes, qui forment avec BotR un nouveau sous-groupe de facteurs sigma alternatifs.*

# 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

Aurélie Couesnon, Stéphanie Raffestin and Michel R. Popoff

Unité des Bactéries anaérobies et Toxines, Institut Pasteur, Paris, France

## Correspondence

Michel R. Popoff  
mpopoff@pasteur.fr

Received 4 October 2005  
Revised 30 November 2005  
Accepted 2 December 2005

Production of botulinum neurotoxin A (BoNT/A) and associated non-toxic proteins (ANTPs), which include a non-toxic non-haemagglutinin (NTNH/A) as well as haemagglutinins (HAs), was found previously to be dependent upon an RNA polymerase alternative sigma factor (BotR/A). Expression of the *botR/A*, *bont/A* and *antp* genes, monitored by reverse transcription and real-time PCR analysis, occurred concomitantly at the transition between the exponential and stationary growth phases of *Clostridium botulinum* A. The *botR/A* expression level was about 100-fold less than those of the *bont/A* and *antp* genes. Therefore, BotR/A is an alternative sigma factor controlling the botulinum A locus genes during the transition phase. The highest toxin concentration was released into the culture supernatant 12 h after maximum expression of the *botR/A*, *bont/A* and *antp* genes, without any apparent bacterial lysis. Toxin levels were then stable over 5 days in cultures at 37 °C, whereas a dramatic decrease in lethal activity was observed between 24 and 48 h in cultures at 44 °C. High temperature did inhibit transcription, since expression levels of the *botR/A*, *bont/A* and *antp* genes were similar in cultures at 37 and 44 °C. However, incubation at 44 °C triggered a calcium-dependent protease that degraded BoNT/A and NTNH/A, but not HAs. In *C. botulinum* E, which contains no gene related to *botR*, the *bont/E* and *p47* genes were also expressed during the transition phase, and no protease activation at 44 °C was evident.

## 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 (approx. 150 kDa) and exported from the bacteria by an unknown mechanism. Each toxinotype is proteolytically cleaved into a heavy (H) chain (approx. 100 kDa) and a light (L) chain (approx. 50 kDa), which remain linked by a disulfide bridge. The H chain recognizes through its C-terminal part a specific cell-surface receptor on nerve endings, and then facilitates toxin uptake into cells by receptor-mediated endocytosis. The L chain translocates into the cytosol of motoneurons, where it gains access to substrate. L chains are zinc-dependent proteases that 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 (reviewed by Humeau *et al.*, 2000; Meunier *et al.*, 2002; Schiavo *et al.*, 2000).

BoNTs and associated non-toxic proteins (ANTPs) form complexes of various sizes (300–900 kDa). ANTPs consist of a non-toxic non-haemagglutinin (NTNH) component, the size of which is similar to BoNT, and haemagglutinin (HA) components. 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) (reviewed by Popoff & Marvaud, 1999). The precise role of ANTPs and botulinum complexes remains unclear, but they possibly protect BoNT against acidic pH and proteolytic degradation during passage through the stomach and intestine. ANTPs might also be involved in transporting BoNT across the intestinal barrier (Fujinaga *et al.*, 1997, 2000).

In *C. botulinum* A, *bont* and *antp* genes are clustered in a chromosomal DNA segment called the botulinum locus (reviewed by Henderson *et al.*, 1997; Popoff & Marvaud, 1999). These 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

Abbreviations: ANTP, associated non-toxic protein; BoNT, botulinum neurotoxin; HA, haemagglutinin; Hc, heavy chain; Lc, light chain; MLD, mouse lethal dose; NTNH, non-toxic non-haemagglutinin.

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 *C. botulinum* A, the *has* operon contains successive genes for the 34 kDa (*ha34*), 17 kDa (*ha17*), and 70 kDa (*ha70*) haemagglutinins (Henderson *et al.*, 1996). Genes of the *ha* operon are transcribed in an opposite orientation versus the *ntnh/A-bont/A* genes. The *botR* gene, which has features of a DNA-binding protein (i.e. highly basic isoelectric point and helix–turn–helix motif), is localized at the 5' end of the botulinum locus in *C. botulinum* types C and D and between the two operons in *C. botulinum* types A, B and F (Henderson *et al.*, 1997; Popoff & Marvaud, 1999). *botR/A* from *C. botulinum* type A has been characterized as a transcriptional activator of *bont* and *ha* genes based on *botR/A* overexpression or partial inhibition by antisense mRNA in *C. botulinum* (Marvaud *et al.*, 1998b). Recently, BotR/A was found to be an alternative sigma factor of RNA polymerase, which forms, with *Clostridium tetani* TetR, *Clostridium difficile* TxrE and *Clostridium perfringens* UviA, a new subgroup of the sigma 70 family of RNA polymerase involved in controlling clostridial toxin genes (Raffestin *et al.*, 2005).

Genetic organization of the botulinum locus is slightly different in *C. botulinum* E strains, which are non-proteolytic bacteria unable to activate BoNT/E. The BoNT/E locus contains no gene related to *botR*, but immediately upstream of *ntnh/E-bont/E* and in a position equivalent to that of *botR/A* lies a gene encoding a 47 kDa protein (*p47*). The second operon encompasses *orfX1* and *orfX2* instead of *ha* genes (Hatheway, 1993; Popoff & Marvaud, 1999).

In this study, we report that the expression of *botR/A* is concomitant with that of *bont/A* and *antp*. This expression occurs during the transition from the exponential to the stationary growth phase, as assessed by quantitative reverse transcription-PCR (RT-PCR). In *C. botulinum* E, *bont/E* and *p47* are also expressed during the transition phase. In addition, high temperature (44 °C) does not act as a BotR/A-mediated regulation signal, but activates a protease which degrades BoNT/A and NTNH/A.

## METHODS

**Bacterial strains and cultures.** *C. botulinum* type A strains Hall A and NCTC 2916, and *C. botulinum* type E strain HV from the National Reference Centre for anaerobic bacteria (Institut Pasteur), were grown in TGY broth (pH 7.5) containing trypticase (Trypticase-Peptone BBL, BD Biosciences; 30 g l<sup>-1</sup>), yeast extract (Bacto Yeast Extract, BD Biosciences; 20 g l<sup>-1</sup>), glucose (5 g l<sup>-1</sup>) and cysteine.HCl (0.5 g l<sup>-1</sup>) under anaerobic conditions (N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>; 90:5:5, by vol. at 37 °C. Spores were germinated by heating (10 min, 95 °C) and subsequent inoculation into TGY.

Kinetic experiments were performed by incubating 500 ml TGY inoculated with either 10 ml of an overnight preculture (non-sporulated cultures) or 10 ml of a culture containing 0.5 ml heat-activated (10 min, 95 °C) spore suspension (about 2 × 10<sup>7</sup> spores ml<sup>-1</sup>). Bacterial growth was monitored as OD<sub>600</sub>. Culture samples

(5–10 ml) were removed at 3, 6, 9, 10, 11, 12, 24 and 48 h. Bacteria were collected by centrifugation and stored at –20 °C until RNA extraction, and the supernatants were stored at 4 °C for mouse bioassays. Total DNA was prepared as previously described (Marvaud *et al.*, 1998b), and at least three experiments were independently performed for each strain and condition.

**Total RNA extraction.** Bacterial pellets were washed and suspended in 1 ml distilled water treated with diethyl pyrocarbonate (DEPC, Sigma). For total RNA extraction, 400 µl bacterial suspension was used when the culture OD<sub>600</sub> was below 0.4, 200 µl when the OD<sub>600</sub> ranged between 0.4 and 2, and 100 µl otherwise. Bacteria were centrifuged at 4 °C (7500 g, 10 min) and total RNA was extracted using a RNeasy Mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's guidelines. Contaminating genomic DNA was degraded by treating the 60 µl RNA sample with 2 U DNA-free DNase (Ambion) and 1 × reaction buffer. The reaction mixture was incubated at 37 °C for 30 min and the DNase was removed by adding DNase Inactivation Reagent (DNase-free, 0.1 ×) (Ambion) to the mixture. Total RNA concentrations were determined by measuring A<sub>260</sub> and the formula 1 A<sub>260</sub> unit = 40 µg RNA. RNA purity was monitored using the ratio A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> (between 1.8 and 2.2) and real-time PCR was then done on the RNA samples, which were immediately used as a template in cDNA synthesis.

**Reverse transcription.** First-strand cDNA synthesis was performed in triplicate with random hexamers PDN6 and the M-MLV kit (Invitrogen) in a 20 µl final volume according to the handbook protocol. The reaction mixture contained 1 µg total RNA, 25 ng PDN6 µl<sup>-1</sup> (Roche Boehringer), 10 mM each nucleotide dATP, dTTP, dCTP and dGTP (Amersham Biosciences), 40 U RNA guard RNase inhibitor (Amersham Biosciences), 0.01 M DTT (Invitrogen), 1 × first-strand buffer (Invitrogen), and 200 U M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen). Before RT enzyme was added, the reaction mixture was heated to 65 °C for 5 min and thereafter chilled on ice. It was then incubated for 10 min at 25 °C and 50 min at 37 °C. The reaction was inactivated by heating at 70 °C for 15 min. The three replicates were pooled and aliquoted. An aliquot was diluted 10-fold in distilled DEPC-treated water. cDNA solutions were stored at –20 °C before PCR amplification.

**Quantitative real-time PCR assay.** The real-time PCR assay was based on the double-stranded DNA-specific dye SYBR Green I methodology. The primers used are listed in Table 1. A primer pair specific for each of six genes in the botulinum gene locus (*bont/A*, *ntnh/A*, *ha17*, *ha34*, *ha70* and *botR/A*) or the 16S rRNA gene was designed from the Hall A genome sequence (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) with Beacon Designer version 2.0 (Bio-Rad). Primers were also designed for *bont/E*, *p47* and the 16 rRNA gene from *C. botulinum* E (X62089 for *bont/E*, D88418 for *p47* and L37592 for 16 rRNA).

Reverse-transcribed cDNA samples (1 µl) were subjected to PCR amplification in 24 µl ready-to-use iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, 2 ×; 1:25 U iQ Taq DNA polymerase, 0.4 mM each dNTP, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 nM fluorescein, SYBR Green I) containing 0.5 µM each primer. The reactions were cycled in an iQ iCycler apparatus (Bio-Rad) using the following parameters: *Taq* polymerase activation at 95 °C for 10 min then 40 cycles at 95 °C for 15 s, 55 °C for 15 s and 72 °C for 15 s with fluorescence measurement at the end of extension, and finally a cooling step at 55 °C for 1 min before the melting curve programme (55 °C to 95 °C with a heating rate of 0.5 °C per 10 s and continuous fluorescence measurement).

Quantitative analysis was performed using the iCycler iQ Real-Time PCR Detection System Software Version 3.0 (Bio-Rad). Amplification plots displaying fluorescence for each well at every cycle were obtained. Each sample was amplified in triplicate. The background fluorescence

**Table 1.** Primers used to amplify the internal fragments of the target genes

Gene	Mol% G + C	Primer*	Sequence (5'–3')	Product length (bp)	$T_m$ (°C)	PCR efficiency (%)
<i>bont/A</i>	26	F	AATGGTTATGGCTCTACTCAATAC	134	81	95
		R	GCTAATGTTACTGCTGGATCTG			
16 rRNA A gene	52	F	GCGTAGCCGACCTGAGAG	149	88.5	82
		R	ACAATCCGAAGACCTTCATCAC			
<i>botR/A</i>	21	F	AAAGTTGATTTGAGCAATTTCAATACAC	233	76.5	81
		R	ATTTTCTTTTGATCGTCAGGTAATATGG			
<i>ha17</i>	25	F	TCCAATAGATGCTACTGGTTTCC	150	77.5	89
		R	ATTCGGTAATAGGAGTAGTGGTTG			
<i>ha34</i>	28	F	AAGTCGTACAACAAGTGGATATG	148	78.5	84
		R	GTTAGAACTCCGTTTGAAAGTATTG			
<i>ha70</i>	27	F	CTAATGCTCCTTACCTGAATCTG	100	80	90
		R	ATGACACCTACTACTACAATTTCTTC			
<i>ntnh/A</i>	25	F	AATGTTGTAGTAGTTAGAGCTAG	107	81.5	89
		R	CTCAAAGATTCCGCATAATATC			
<i>bont/E</i>	25	F	AAGCAAAGTATGGATTAGATAAAGATG	114	77	89
		R	TAGTTCGTAAATCAAATTCGGTAAAG			
16 rRNA E gene	52	F	GGAGCGAACAGGATTAGATACC	110	85	88
		R	GGCGGAATACTTAATGCGTTAG			
<i>P47</i>	23	F	CAACTGATAATAATGATGGATACTTGTG	112	76	82
		R	ACTTCACTATTCTCTGATAAGATACTAC			

F, forward; R, reverse.

was automatically removed by setting a noise band. The threshold cycle ( $c_T$ ) for each transcript was determined as the PCR cycle at which the fluorescence rose above background. Because the  $c_T$  is inversely proportional to the logarithm of the initial number of template molecules, the threshold cycle value was used in computation for quantification of gene expression. A standard curve consisting of the  $c_T$  versus log chromosomal DNA dilutions (corresponding to the log copy numbers) was generated by amplifying serial dilutions of chromosomal DNA corresponding to an unknown amount of amplicon. For each primer set, PCR was performed in parallel reactions using different amounts of Hall A chromosomal DNA (150 ng to 1.5 µg) and each cDNA sample in the same 96-well analysis. For each target gene, the software determined the unknown concentration in the cDNA samples by interpolating the  $c_T$  of the sample against the standard curve of known concentrations.

Expression levels of cDNA from the six botulinum locus genes were standardized against 16S rRNA gene expression. The 16S rRNA gene primer set was run concurrently with each set of experimental primers. At different points during the growth kinetics, relative expression of the six genes ( $X_1, X_2, \dots, X_i, \dots, X_6$ ) compared to 16S rRNA gene expression ( $Y$ ) was determined by the formula  $X_i = X_i'/Y$ .  $X_i'$  is the arbitrary genomic DNA dilution given by  $c_T$  values on a standard curve and corresponds to the amount of gene  $i$  transcripts in DNA samples.

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 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 ( $T_m$ ). For this, fluorescence was continuously monitored in samples heated from 55 to 95 °C at a transition rate of 0.1 °C. In order to check for amplification of any

contaminating genomic DNA in the RNA sample after extraction or in the PCR mixture, DNase-treated RNA and sterile water were added to the PCR.

**Mouse bioassay.** Serial twofold dilutions of supernatant samples (0.5 ml) in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.3) containing 0.2% (w/v) gelatin were injected intraperitoneally into mice weighing 18–20 g. For type E supernatant, the toxin was activated with trypsin (200 µg ml<sup>-1</sup>, Sigma) for 15 min at room temperature prior to dilution. Three mice were used for each dilution. The mice were observed over 4 days, and the number that died was recorded, with results expressed as mouse lethal dose (MLD) per millilitre.

**Toxin stability assay.** One-millilitre aliquots of supernatant from a 24 h Hall culture were incubated at 44 °C for different time periods: 30 min, 3 h, 6 h and 24 h. The supernatant was also incubated with protease inhibitors: EDTA (0.5 and 1 mM), EGTA (5 and 1 mM), *o*-phenanthroline (5 mM), PMSF (1 mM), pepstatin (10 µg ml<sup>-1</sup>) and benzamidine (1 mM) for 6 h at 44 °C. Toxin was then precipitated at pH 3.0 with 10 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and centrifuged 10 min at 7500 g and 4 °C. The precipitates were washed with distilled water and resuspended in 0.2 M phosphate buffer, pH 6.0. Protein concentration was determined by the Bradford method (Bio-Rad) using BSA as standard.

**PAGE and Western blotting.** Each precipitate (5 µg total protein) was separated by electrophoresis on SDS-polyacrylamide gels (10%). Proteins were transferred to PVDF membranes (Hybond-C, Amersham), which were blocked with 5% skimmed milk (w/v) in PBS (pH 7.2) and incubated 1 h at room temperature with rabbit antibodies (1/1000) against purified recombinant BoNT/A (Hc or Lc), NTNH/A, HA34 or HA52 (processed form of HA70) (Tavallaie *et al.*, 2004). DNAs encoding BoNT/A Hc (amino acids 872–1296), Lc (amino acids 1–438), NTNH/A (amino acids 783–1206), HA34 (amino acids 1–293) and HA52 (amino acids 203–626) were cloned

in pET28 vector in fusion with a N-terminal His<sub>6</sub>-tag, and the recombinant proteins were purified on a cobalt column (Clontech) as previously described (Tavallaie *et al.*, 2004). After three washes in PBS/0.1% Tween 20, the blots were treated with horseradish peroxidase-conjugated protein A (Bio-Rad) and analysed by the enhanced chemiluminescence system (ECL, Amersham Pharmacia Biotech).

## RESULTS

### Bacterial growth and toxin production in *C. botulinum* A

Type A *C. botulinum* strains Hall and NCTC 2916 showed a typical growth curve as monitored by OD<sub>600</sub>, which included a lag period, an exponential growth phase and a subsequent stationary phase characterized by a progressive decrease in OD<sub>600</sub>. Termination of the exponential growth phase and entry into stationary phase (transition phase), which is characterized by the arrest of cell division and a progressive bacterial lysis, occurred about 10 h after initiation of the exponential phase (Fig. 1a, b). The lag phase was slightly longer at 5–6 h versus 2–3 h in non-sporulated cultures, but the growth curve was similar, although strain Hall showed a slower decrease in OD during the stationary phase in sporulated cultures compared to strain NCTC 2916 (Fig. 1b). Spores were determined by phase-contrast microscopy and expressed as a percentage of the total bacterial population. *C. botulinum* strain NCTC 2916 was selected since it yielded a high percentage of sporulation in our culture conditions. Spores of strain NCTC 2916 were detected within 10 h after inoculation, corresponding to the transition phase, and increased to 65% at 24 h and almost 100% at 48 h. In contrast, spores of strain Hall were not apparent until 32 h after inoculation of the culture and then increased to 28% at 48 h and reached only 85% at 156 h.

The production and secretion of BoNT/A in the culture supernatant, as tested by the mouse bioassay, was similar for both strains in sporulated and non-sporulated cultures. Low levels of toxicity (10 MLD ml<sup>-1</sup>) were detected during entry into exponential growth. Lethal activity in the culture supernatant increased over time and reached 10<sup>3</sup> MLD ml<sup>-1</sup> during mid-exponential growth, and 10<sup>4</sup> MLD ml<sup>-1</sup> at the transition phase. The highest toxic value (10<sup>5</sup> MLD ml<sup>-1</sup>) was observed at 24 h and was stable for a period of at least 5 days (Fig. 1c, d, e, f). These results were in agreement with previous reports (Bradshaw *et al.*, 2004; Siegel & Metzger, 1979).

### Relative expression of the type A botulinum locus genes by real-time PCR

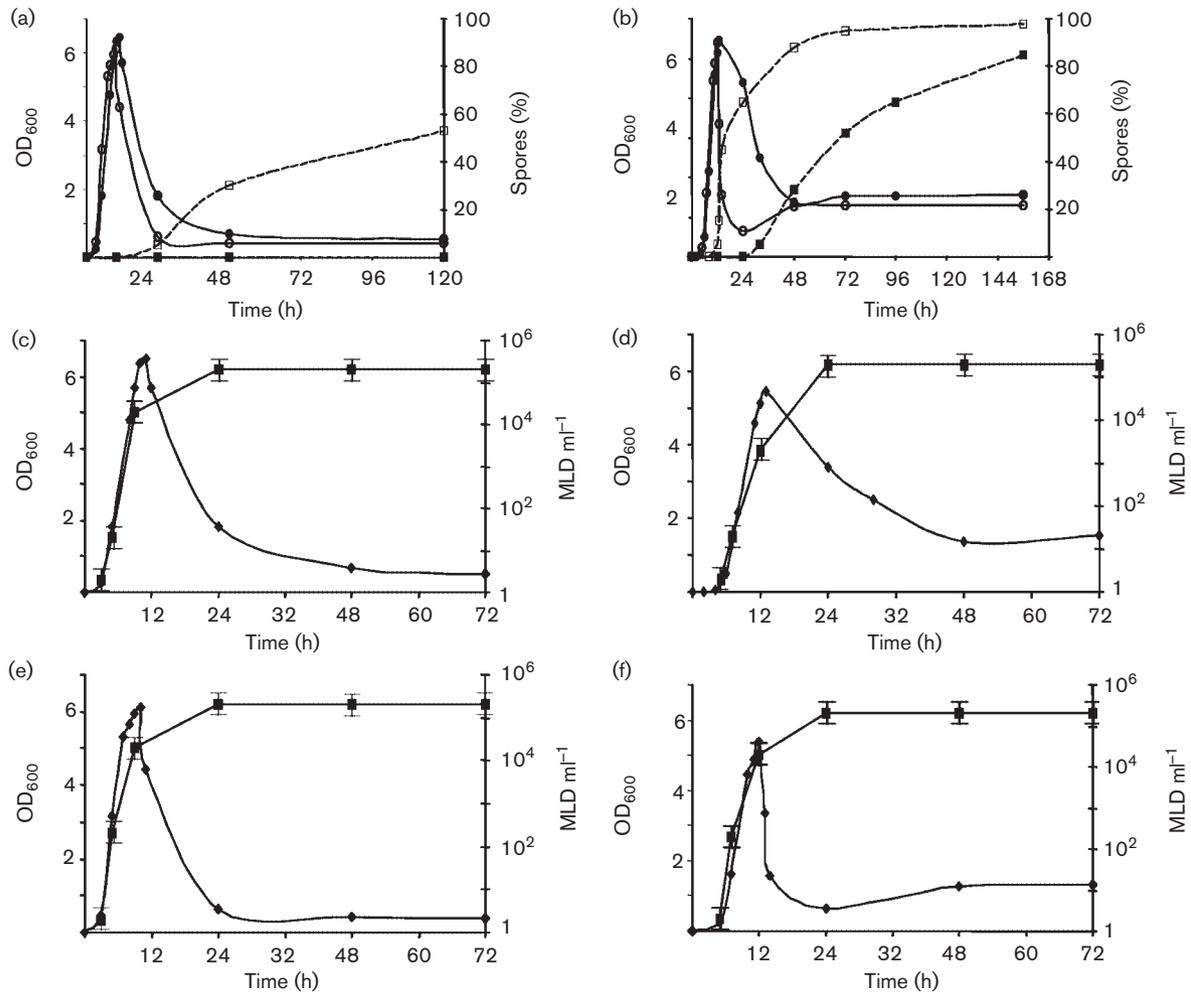
Gene expression was assayed by mRNA reverse transcription and cDNA amplification with real-time PCR. The amplified products were quantified by measuring SYBR Green fluorescence incorporated into double-stranded DNA resulting from a single specific gene product as determined by melting temperature curves. For this purpose, a primer

pair was designed for each target gene in order to define a DNA fragment having a high *T<sub>m</sub>*. Since the *C. botulinum* genome has a low G + C content, the *T<sub>m</sub>* of the PCR products of the botulinum toxin locus genes ranged from 76.5 to 81 °C (Table 1). However, the *T<sub>m</sub>* of the PCR product of the 16S rRNA gene, which has a greater G + C content (52 mol% versus 21–28 mol% for the botulinum toxin locus genes), was higher (88 °C). Despite the different *T<sub>m</sub>* values, calibration assays of PCR amplification of each gene with *C. botulinum* Hall or NCTC 2916 genomic DNA showed a correlation coefficient above 0.995 over 40 amplification cycles, indicating a linear measurement of 15 pg to 150 ng DNA (data not shown). All culture samples submitted to RT and cDNA real-time PCR yielded DNA amplification within this linear range. In addition, RNA samples prior to reverse transcription treatment did not yield any significant PCR amplification, indicating that DNA contamination was negligible.

Quantitative expression of the 16 rRNA gene as calculated by fluorescence intensity per microgram of RNA was constant over bacterial growth, at least until 48 h, in sporulated and non-sporulated cultures. Therefore, the 16S rRNA gene was used as a calibrator gene. An equal amount of total mRNA from each sample was used for relative quantification of gene expression. The levels of each gene transcript were then normalized to the 16S rRNA gene. Transcript of each botulinum toxin locus gene was detectable in all stages of growth in both strains and in sporulated and non-sporulated cultures. However, the relative expression of *botR/A* in *C. botulinum* strains Hall and NCTC 2916 was approximately 100-fold less than that of the other botulinum toxin locus genes.

Relative quantification of gene expression within the botulinum toxin locus, versus that of the 16 rRNA gene, revealed a concomitant expression of the *botR/A*, *bont/A* and *antp* genes in sporulated and non-sporulated cultures (Fig. 2). The expression pattern over time was similar for all these genes in both strains. A low expression level was detected at the beginning of exponential growth, followed by a rapid increase in expression during late exponential growth. A maximum expression value was reached at the transition phase (10 h incubation) and then expression decreased during the stationary phase. Relative expression of each gene within the botulinum toxin locus was increased 100-fold in the transition phase versus levels in the early exponential phase. After 24 h incubation, relative gene expression decreased to levels found in the early growth phase. Thereafter, the expression remained at basal levels during stationary phase, with a slight transient increase at 48 h.

Expression kinetics for the botulinum toxin locus genes were the same in both strains. The most relevant feature was synchronous expression of the *botR/A*, *bont/A* and *antp* genes, which occurred primarily during the transition phase. However, the *bont/A* and *antp* genes showed different levels of relative expression. Fig. 3 shows quantification of the



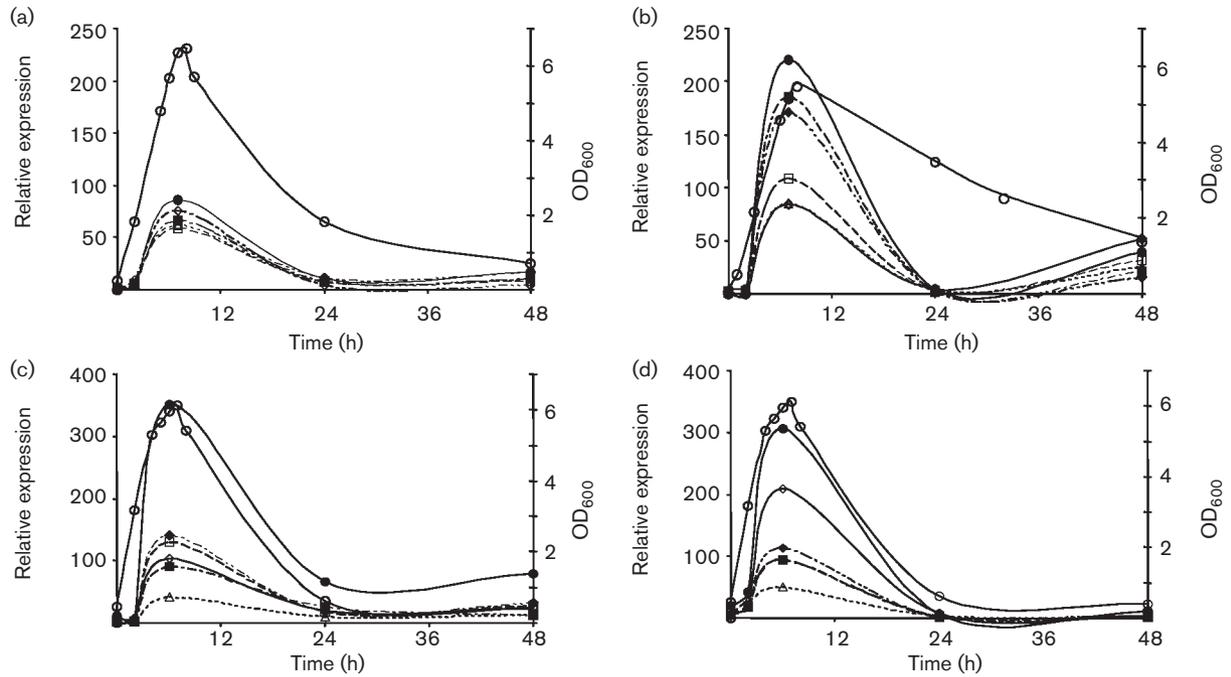
**Fig. 1.** (a, b) Growth and sporulation kinetics of *C. botulinum* strain Hall (filled symbols) and NCTC 2916 (open symbols) in non-sporulated (a) and sporulated (b) cultures. Growth curves (circles) were determined by measurement of OD<sub>600</sub>. The lag phase of cultures in sporulated cultures is not reported. Refractile spores were counted with a phase-contrast microscope and were expressed as percentage of the vegetative cell population (squares). Data are mean values from two independent experiments for each strain. (c–f) Production of botulinum neurotoxin (BoNT/A) in the extracellular medium during the growth of *C. botulinum* A strains Hall (c, d) and NCTC 2916 (e, f) in non-sporulated (c, e) and sporulated (d, f) cultures. Growth curve (◆) was determined by measuring OD<sub>600</sub>. BoNT/A production was assayed with the mouse test (MLD ml<sup>-1</sup>, ■). It was confirmed that lethal activity corresponded to BoNT/A by using specific neutralizing antibodies against BoNT/A. The lag phase of cultures in sporulated cultures is not reported. Note that BoNT/A was detected at a low level during entry into exponential growth, increased to a maximal value at 24 h and then remained constant, independent of sporulation. Data are mean values from two independent experiments for each strain and condition.

botulinum toxin locus gene expression versus the 16 rRNA gene obtained from three independent sporulated and non-sporulated cultures. In both strains and culture conditions, the relative expression of each botulinum toxin locus gene predominated at the transition phase. In the non-sporulated Hall strain, the relative levels of *bont/A* and *antp* transcripts at the transition phase were similar, whereas in sporulated cultures each *ha* gene was expressed in higher amounts (about twofold) compared to the *bont/A* and *ntnh/A* genes. In contrast, *C. botulinum* NCTC 2916 showed similar values of relative expression in both sporulated and

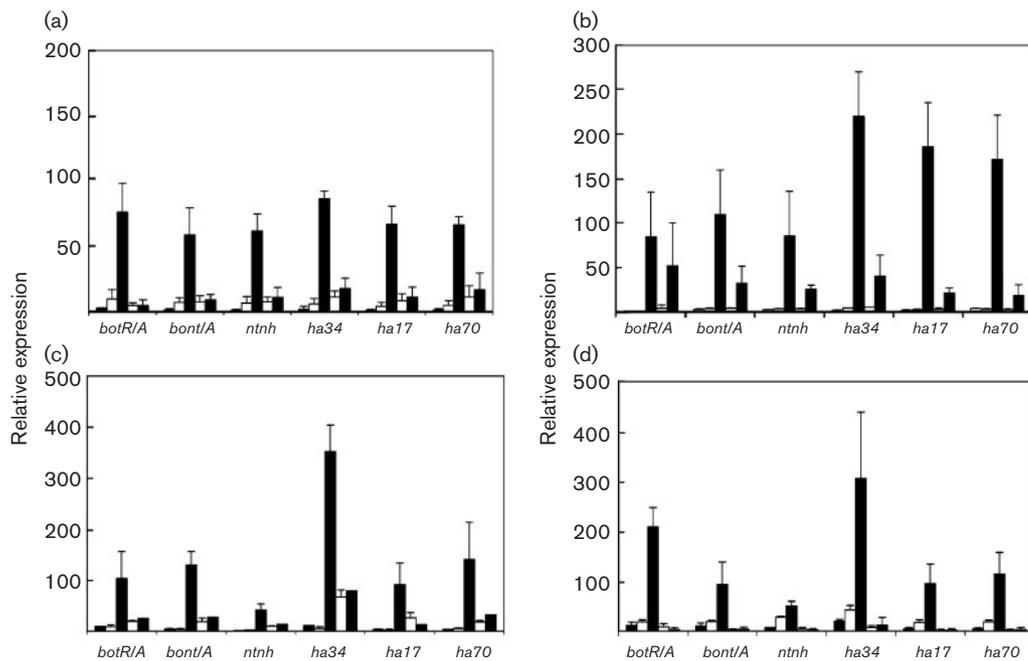
non-sporulated cultures. However, the botulinum toxin locus genes were expressed in different amounts: the relative expression of *bont/A* was approximately twice that of the *ntnh/A* gene, and *ha34* transcript levels were about twofold higher than those of *ha17* and *ha70* (Fig. 3).

### BoNT/A synthesis is independent of high temperature

Since temperature is a common environmental factor controlling many bacterial toxin genes, we tested the effect of



**Fig. 2.** Relative expression of the botulinum locus genes [ $\diamond$ , *botR/A* ( $\times 100$ );  $\square$ , *bont/A*;  $\triangle$ , *NTNH/A*;  $\bullet$ , *ha34*;  $\blacksquare$ , *ha17*;  $\blacklozenge$ , *ha70*] versus the 16 rRNA gene during growth of *C. botulinum* A strains Hall (a, b) and NCTC 2916 (c, d) in non-sporulated (a, c) and sporulated (b, d) cultures. Growth curves ( $\circ$ ) were determined by measurement of OD<sub>600</sub>. Lag phase of the sporulated cultures is not reported. Data are mean values from three independent experiments for each strain and condition.

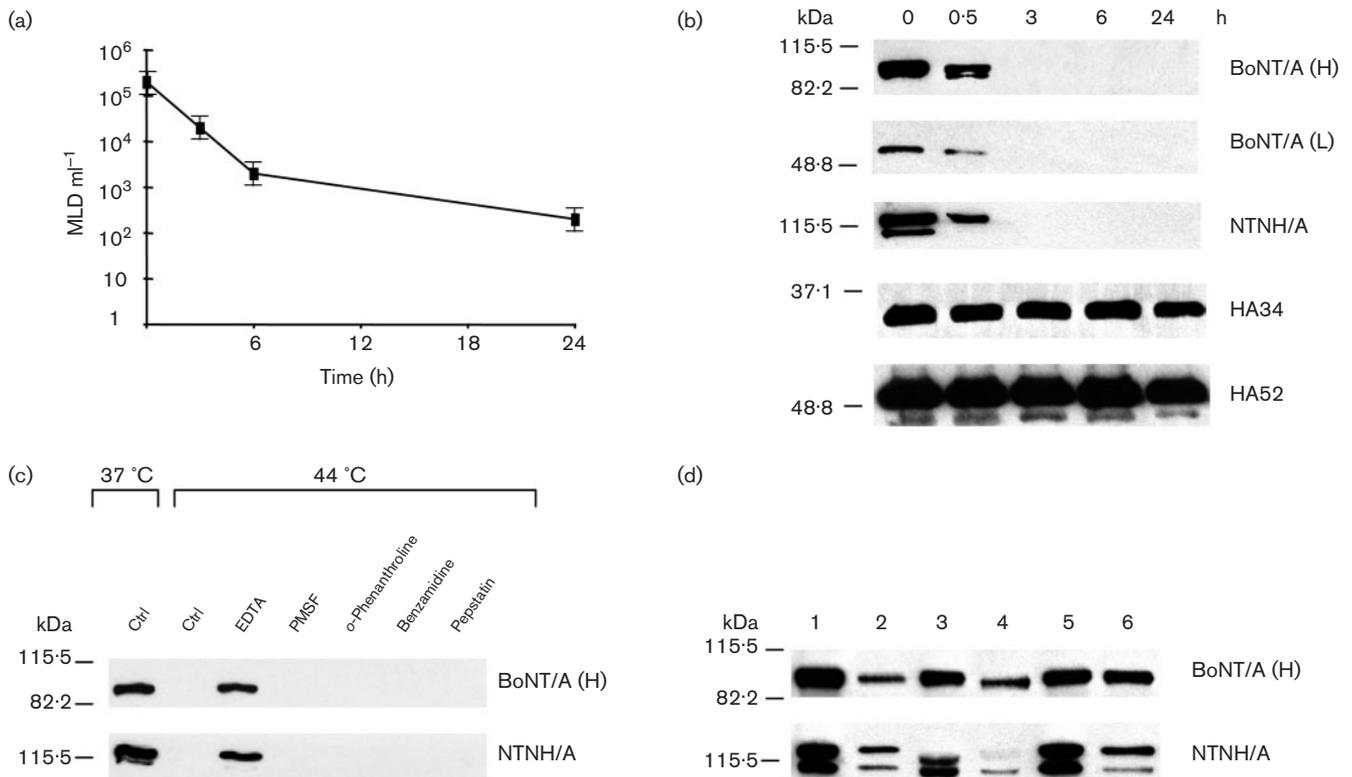


**Fig. 3.** Transcript levels from the botulinum locus genes versus the 16 rRNA gene at (from left to right, alternately black and white) early, mid-exponential, transition, and stationary growth phases at 24 h and 48 h for cultures of *C. botulinum* strains Hall (a, b) and NCTC 2916 (c, d), non-sporulated (a, c) and sporulated (b, d). The relative expression of *botR/A* is amplified 100-fold. The six botulinum locus genes were predominantly expressed during the transition phase. Data are means  $\pm$  SE from three independent experiments for each strain and condition.

high temperature on expression of the botulinum toxin locus genes and BoNT/A production. Incubation of the Hall strain in TGY broth at 44 °C under anaerobic conditions produced a growth curve similar to that obtained at 37 °C (data not shown). BoNT/A levels in culture supernatant monitored by the mouse test were identical to those measured at 37 °C ( $2 \times 10^5$  MLD ml<sup>-1</sup> at the end of the exponential growth phase) but lethal activity in the culture supernatant greatly decreased ( $2 \times 10^2$  MLD ml<sup>-1</sup>) during the subsequent incubation period from 24 to 48 h. However, the transcription levels of *botR/A*, *bont/A* and *ha17* genes measured by real-time RT-PCR were of the same magnitude as those found at 37 °C (data not shown), indicating that expression of *botR/A* and the other botulinum toxin locus genes were not temperature sensitive within the 37–44 °C range. The decreased lethal activity of supernatant from 44 °C cultures probably results from post-transcriptional processing of BoNT/A.

### Stability of BoNT/A and ANTPs at 44 °C

To further explore the temperature-dependent stability of BoNT/A and ANTPs, supernatant from a 37 °C Hall culture was incubated at 44 °C. As shown in Fig. 4(a), a progressive decrease in lethal activity was observed, similar to that found in a 44 °C culture during the 24–48 h incubation period. BoNT/A and ANTPs were monitored over time by Western blotting of culture supernatant incubated at 44 °C. BoNT/A significantly decreased after 0.5 h incubation at 44 °C and was not detected at 3 h or longer incubation times as monitored with antibodies specific for BoNT/A L or H chains (Fig. 4b). A similar pattern was observed with NTNH/A. After 0.5 h incubation at 44 °C, only a small amount of uncleaved NTNH/A (119 kDa) was detected, whereas the processed form (106 kDa) was not evident. In contrast, HA protein levels did not change during 24 h incubation at 44 °C (Fig. 4b). This suggests that BoNT/A and NTNH/A



**Fig. 4.** Proteolytic degradation of BoNT/A and NTNH/A occurs at 44 °C in Hall culture supernatant, but HA34 and HA52 (processed form of HA70) are resistant. (a) Mouse lethal activity in Hall culture supernatant obtained at 37 °C and subsequently incubated at 44 °C; (b) immunoblot analysis of neurotoxin and non-toxic components in supernatants incubated for 0, 0.5, 3, 6 and 24 h at 44 °C. Data are mean values from three independent experiments. (c) Effects of protease inhibitors on the proteolytic degradation of BoNT/A and NTNH/A at 44 °C. *C. botulinum* A strain Hall supernatant was incubated for 24 h at 37 °C (Ctrl 37 °C) or 44 °C (Ctrl 44 °C) in the absence or presence of EDTA (1 mM), PMSF (1 mM), o-phenanthroline (5 mM), benzamidine (1 mM), or pepstatin (10 µg ml<sup>-1</sup>). (d) BoNT/A and NTNH/A are protected from degradation in supernatant incubated for 6 h at 44 °C by either EDTA or EGTA. Lanes: 1, supernatant incubated at 37 °C; 2, supernatant incubated at 44 °C; 3–6, supernatant incubated at 44 °C with EDTA (lanes 3 and 4, 1 and 0.5 mM, respectively) or EGTA (lanes 5 and 6, 5 and 1 mM, respectively). Data are representative of three independent experiments.

were sensitive to a proteolysis at 44 °C, in contrast to HA proteins. Among the inhibitors for various proteases tested, only EDTA or EGTA (1 mM minimal concentration) blocked degradation of BoNT/A and NTNH/A (Fig. 4c, d). This indicated that a metalloprotease requiring  $\text{Ca}^{2+}$  but not  $\text{Zn}^{2+}$ , as evidenced by *o*-phenanthroline results, was active at 44 °C (not 37 °C) and degraded BoNT/A and NTNH/A in crude culture supernatant from *C. botulinum* A strain Hall.

### Kinetics of BoNT/E production and relative expression of the *bont/E* and *p47* genes in *C. botulinum* E

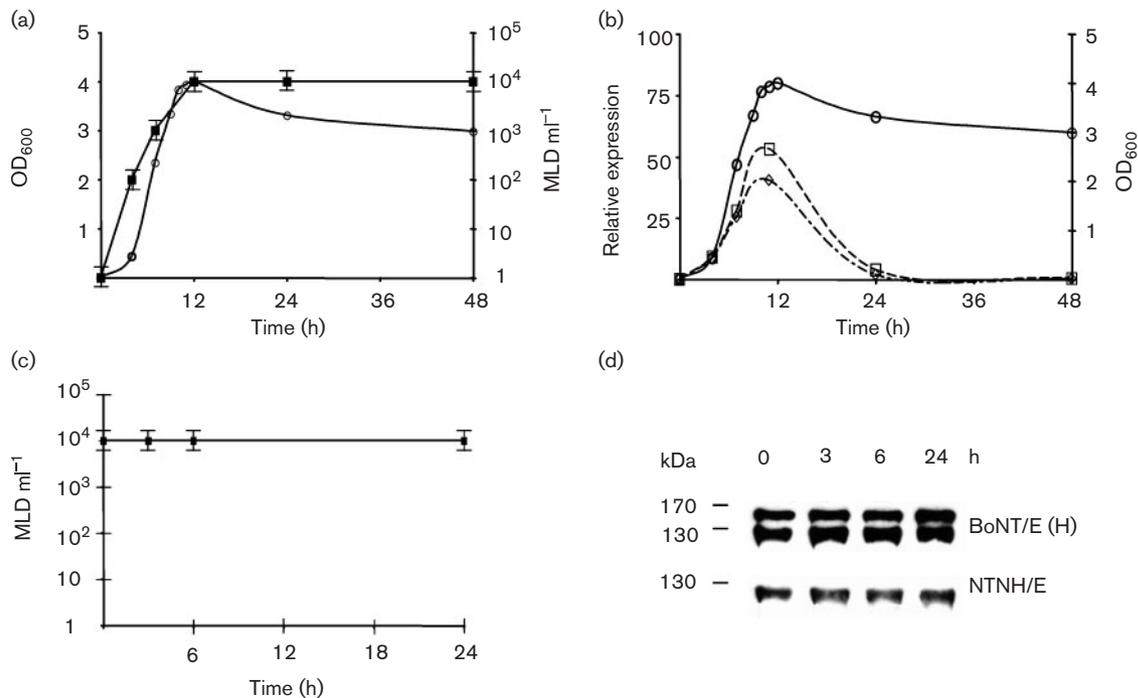
*C. botulinum* type E strain HV culture at 37 °C showed a similar growth curve to type A strains, with a lag phase followed by an exponential growth and a stationary phase, although the decrease in bacterial density was slower than in *C. botulinum* A strains (Fig. 5a). The sporulation pattern was the same as for NCTC 2916 in non-sporulated cultures (data not shown). BoNT/E production was monitored in trypsin-treated culture supernatant of *C. botulinum* E strain HV grown at 37 °C. As in *C. botulinum* A strains, BoNT/E

progressively increased during the exponential growth phase and reached its maximum value at the entry into stationary phase at about 12 h (Fig. 5a). The toxicity level of the culture supernatant was then stable until at least 48 h.

Relative quantification of *bont/E* and *p47* genes was determined versus the *C. botulinum* E 16S rRNA gene during the growth of strain HV. Both genes were concomitantly expressed and their levels of transcription were similar. As found in *C. botulinum* A, expression of *bont/E* and *p47* was detectable at the beginning of exponential growth, reached a maximum level at the transition phase, and then rapidly decreased. At 24 h and longer times, RT-PCR did not detect any expression of *bont/E* and *p47* (Fig. 5b).

### BoNT/E and NTNH/E are stable in culture supernatant incubated at 44 °C

We tested whether a 44 °C incubation of supernatant from a 24 h culture of strain HV at 37 °C induced a proteolytic degradation of BoNT/E and NTNH/E as found in *C. botulinum* A strain Hall. No decrease in lethal activity was



**Fig. 5.** Kinetics of production of botulinum neurotoxin E (BoNT/E) and relative expression of *bont/E* and *p47*. (a) Production of BoNT/E in the extracellular medium during the growth of *C. botulinum* E strain HV. The growth curve (○) was determined by measuring OD<sub>600</sub>. BoNT/E production was assayed with the mouse test (MLD ml<sup>-1</sup>, ■) using trypsinized culture supernatant. Note that BoNT/E, like BoNT/A, was detected at a low level during entry into exponential growth, increased to a maximum. (b) Relative expression of the botulinum *bont/E* (□) and *p47* (◇) versus the 16 rRNA gene during growth of *C. botulinum* E strain HV. The growth curve (○) was determined by measurement of OD<sub>600</sub>. Data are mean values from three independent experiments. No proteolytic degradation of BoNT/E and NTNH/E occurs at 44 °C in HV culture supernatant. (c) Mouse lethal activity in HV culture supernatant obtained at 37 °C and subsequently incubated at 44 °C. (d) Immunoblot analysis of neurotoxin and non-toxic components in supernatants incubated for 0, 3, 6 and 24 h at 44 °C.

observed in the HV culture supernatant incubated at 44 °C until at least 24 h (Fig. 5c). In addition, BoNT/E and NTNH/E degradation was not evidenced by SDS-PAGE and Western blotting after incubation at 44 °C (Fig. 5d). This suggests that either no protease activated at 44 °C is produced by *C. botulinum* E or BoNT/E is more protease resistant than BoNT/A. To test this last hypothesis, we mixed equal volumes of 37 °C culture supernatant from Hall (type A) and HV (type E) strains. The mixtures were incubated at 37 °C or 44 °C for 24 h and the mouse lethal activity of BoNT/E was monitored after addition of a specific neutralizing anti-BoNT/A serum. After incubation at 37 °C, the level of mouse lethal activity was the same as in untrypsinized HV culture, indicating that BoNT/E was not activated by *C. botulinum* A proteases, in agreement with previous findings (DasGupta & Sugiyama, 1972; Dekleva & DasGupta, 1989). However, a 44 °C incubation induced a total loss of lethal activity, likely resulting from protease degradation (data not shown). This further argues that BoNT/E is sensitive to protease degradation induced by *C. botulinum* A incubated at 44 °C and that no such protease is produced by *C. botulinum* E.

## DISCUSSION

The mechanism and signalling pathways controlling botulinum neurotoxin synthesis, its export into the external medium and activation by *C. botulinum* are still poorly understood. We have previously reported that BotR/A positively activates transcription of the botulinum toxin locus genes in *C. botulinum* A (Marvaud *et al.*, 1998b), acting as an RNA polymerase alternative sigma factor specific for the two promoters controlling the two operons (*ntnh/A-bont/A* and *ha-34-ha17-ha70*) of the botulinum toxin locus (Raffestin *et al.*, 2005). BotR/A is functionally related to TetR, which controls the expression of the *tet* gene in *C. tetani* *in vivo* (Marvaud *et al.*, 1998a). Moreover, BotR and TetR are also related to the alternative sigma factors TxeR and UviA, which control expression of toxin genes in *C. difficile* and a bacteriocin gene in *C. perfringens*, respectively (Dupuy *et al.*, 2005; Garnier & Cole, 1988; Mani & Dupuy, 2001). In this study, we analysed by real-time RT-PCR the relative expression of the botulinum toxin locus genes versus the 16 rRNA gene as calibrator gene (Broussolle *et al.*, 2002), in *C. botulinum* A and *C. botulinum* E strains, which in contrast to *C. botulinum* A contain no gene related to *botR*. Real-time RT-PCR is a very sensitive method to quantify gene expression and has been used to investigate various bacterial virulence genes and in particular to detect *C. botulinum* in food and clinical samples (Kimura *et al.*, 2001) and to monitor expression of neurotoxin genes in *C. botulinum* B and *C. botulinum* E (Lövenklev *et al.*, 2004a; McGrath *et al.*, 2000).

The patterns of relative expression for all botulinum toxin locus genes were identical in strains Hall and NCTC 2916 as well as in non-sporulated and sporulated cultures, although strain NCTC 2916 possesses a slightly different genetic

organization, with two botulinum toxin locus genes. One is similar to that from type A1 strains, including *ntnh*, *botR* and *has* genes, but its *bont/A* gene is replaced with a silent *bont/B* gene, while the other locus is typical of type A2 strains but has a *bont/A* type A1 gene and is organized in two operons, *p47-ntnh/A-bont/A1* and *orf1-orf2-orf3* (Dineen *et al.*, 2004; Henderson *et al.*, 1996; Jovita *et al.*, 1998). The botulinum toxin locus genes were concomitantly expressed and their kinetics showed a bell-shaped curve (Fig. 2). A low expression level was measured during entry into exponential growth, and maximal expression (50- to 200-fold increase compared to the baseline) occurred during the transition phase. Expression of the botulinum toxin locus genes then decreased to baseline at about 24 h of culture. A small increase in gene expression was observed late (48 h) in sporulated strain Hall cultures. Synchronous expression of *botR/A*, *bont/A* and *antp* genes, as well as *botR/A* being expressed about 100-fold less than the other botulinum toxin locus genes, further supports the hypothesis that BotR/A is a regulatory factor controlling *bont/A* and *antp* gene expression. In addition, the RT-PCR results clearly show that *botR/A*, *bont/A* and *antp* gene expression was mainly restricted to late exponential growth/early stationary phase, indicating that BotR/A is an alternative sigma factor specific to the transition phase and independent of sporulation. The time correlation between the expression of BotR/A and botulinum toxin locus genes suggests that BotR/A is the main regulatory factor. However, this does not rule out that another regulatory or sigma factor is also involved. These results are in agreement with a recent report showing by Northern hybridizations that *bontA*, *ntnhA* and *ha* genes are temporally expressed during late exponential and early stationary phase in *C. botulinum* type A strains 62A, Hall A-hyper and NCTC 2916 (Bradshaw *et al.*, 2004). It is noteworthy that TxeR from *C. difficile* is also predominantly expressed during the transition phase, as evidenced by a fusion between a  $\beta$ -glucuronidase reporter gene and TxeR in *C. perfringens* (Karlsson *et al.*, 2003).

Analysis of mRNA by Northern blotting and transcriptional study with purified BotR/A-RNA polymerase core enzyme has indicated that the *bont/A* and *antp* genes from *C. botulinum* type A1 strains such as Hall strain are transcribed in two divergent operons (*ntnh/A-bont/A1* and *ha34-ha17-ha70*) and that *bont/A1* can also be expressed separately (Bradshaw *et al.*, 2004; Henderson *et al.*, 1996; Raffestin *et al.*, 2005). RT-PCR results showing equivalent expression levels of each gene of the botulinum toxin locus in the Hall strain are in agreement with the genetic organization in two operons. However, strain NCTC 2916 yielded twofold more expression of *ha34* versus *ha17* and *ha70*. It is noteworthy that relative amounts of HA proteins vary in the different-sized botulinum complexes. Indeed, the ratio of HA34 versus HA17 or HA70 is about twice in 19S compared to 12S complexes (Inoue *et al.*, 1996; Oguma *et al.*, 1999; Sharma *et al.*, 2003). Regulation of HA production at the transcription and/or translation level in *C. botulinum* strains such as in NCTC 2916 remains to be defined.

BoNT/A was detected in the culture supernatant at low levels during early exponential growth and reached a maximum level at 24 h of culture, which remained stable until at least 72 h. No obvious bacterial lysis was observed during the transition and early stationary phases in either strain. This indicates that BoNT/A is essentially synthesized during the transition into early stationary phase and is transported in a delayed manner into the external medium. Similar patterns of growth and toxin production without apparent cell lysis were previously reported (Bradshaw *et al.*, 2004; Siegel & Metzger, 1979). An exfoliation process without cell lysis has been reported (Call *et al.*, 1995). It could be argued that BoNT degradation and resynthesis take place during stationary phase; however, BoNT/A is activated by an endogenous protease from *C. botulinum* and is stable in acidic cultures at 37 °C (DasGupta, 1989).

An important question is which are the environmental factors controlling neurotoxin gene production in *C. botulinum*. Although nitrogen and carbon sources are important for the toxinogenesis, specific external signals controlling toxinogenesis have not been clearly identified in *C. botulinum* or *C. tetani*. In contrast to *C. difficile* (Dupuy & Sonenshein, 1998), *C. botulinum* requires glucose for high toxin production. CO<sub>2</sub> seems to stimulate *bont/B* gene expression and subsequent neurotoxin production in *C. botulinum* type B (Lövenklev *et al.*, 2004b). Moreover, short peptides from media containing pancreatic digest of casein are essential for toxin production by *C. tetani* (Porfirio *et al.*, 1997). Growth temperature is a common signal involved in the control of alternative sigma factors and subsequent regulated gene expression. Thereby a temperature of 42 °C prevents transcription of *txeR* and the subsequent expression of *toxA* and *toxB* genes in *C. difficile* (Karlsson *et al.*, 2003). Cultures of *C. botulinum* Hall incubated at 44 °C showed an initial toxin production similar to that found in cultures at 37 °C and then a dramatic decrease in toxin activity after 24–48 h of growth (data not shown), which is in agreement with previous observations (Siegel & Metzger, 1979). However, no decrease in *botR/A*, *bont/A* and *antp* gene expression was observed in cultures at 44 versus 37 °C, indicating that declining toxin activity resulted not from gene regulation but rather from a post-translational event. Our data show that a calcium-dependent protease degraded BoNT/A in culture supernatant incubated at 44 °C. Interestingly, the same type of protease is responsible for BoNT/A activation into the di-chain form (Dekleva & DasGupta, 1990). Characteristics of the BoNT/A-activating protease from *C. botulinum* A include: (1) a thiol-reducing agent and Ca<sup>2+</sup> requirement; (2) maximum activity in the pH range 6.2–6.4; and (3) a temperature optimum of 70 °C (Dekleva & DasGupta, 1990). Although weakly active at 37 °C, this protease efficiently activates BoNT/A by a single proteolytic nicking and excision of 10 residues between the light and heavy chains (Krieglstein *et al.*, 1994), whereas increased activity at 44 °C caused neurotoxin degradation (Fig. 4) by cleaving multiple sites. This is further supported by the fact that prolonged exposure of BoNT/A to purified protease led

to considerable toxin degradation in multiple fragments (Dekleva & DasGupta, 1990). Seemingly, *C. botulinum* A uses a temperature-dependent protease to control BoNT/A activation and degradation. We can not rule out that an increase in temperature also induces a conformational change in BoNT/A, leading to exposure of cleavage sites on the surface of the molecule. One of the functions for ANTPs may be to protect BoNT/A against protease degradation. As shown in Fig. 4, NTNH/A was as sensitive as BoNT/A to proteolytic degradation at 44 °C, whereas HA34 and HA52 were resistant. Trypsin or pepsin resistance of HA34 versus NTNH/A at 25 °C has already been observed (Chen *et al.*, 1998; Fu *et al.*, 1997; Sharma *et al.*, 1999). Since BoNT/A from culture supernatant with increased temperature was degraded, it is excluded that HA proteins have a protective effect for the neurotoxin, at least against this type of protease.

In contrast to the other *C. botulinum* types, *C. botulinum* E strains do not contain an equivalent of the *botR* gene in their botulinum toxin locus, and no related gene has been identified in their genome (Quinn & Minton, 2001). However, *p47*, which encodes a 47 kDa protein, is located immediately upstream of *ntnh/E* and *bont/E*, similarly to *botR/A* in *C. botulinum* A (Popoff & Marvaud, 1999). In contrast to *botR/A*, *p47* was expressed at a level similar to that of *bont/E*. This is further supported by the fact that *C. botulinum* E transformed with a recombinant plasmid expressing *p47* antisense mRNA did not decrease BoNT/E synthesis (data not shown), in contrast to *botR/A* antisense mRNA in *C. botulinum* A (Marvaud *et al.*, 1998b), indicating that P47 is probably not a regulator of the botulinum toxin E locus genes. Interestingly, *bont/E* and *p47* were selectively expressed at the transition phase, as the botulinum toxin A locus genes, but by an as yet unknown regulator.

A possible regulation of the toxinogenesis in *C. botulinum* E by high temperature was investigated. However, *C. botulinum* E strains did not grow at 44 °C and only weakly at 40 °C. This group of bacteria is adapted to grow at low temperature and the optimum temperature is around 25–30 °C (Hatheway, 1989). Toxinogenesis was the same at 37 versus 30 °C (data not shown), suggesting that high temperature is probably not involved in toxin gene regulation by *C. botulinum* E. *C. botulinum* E strains are non-proteolytic and trypsin treatment of the culture supernatant is required to obtain fully active BoNT/E (Hatheway, 1989). In contrast to *C. botulinum* A strain Hall, no decrease in BoNT/E activity and no proteolytic degradation of BoNT/E and NTNH/E were apparent in culture supernatant incubated at 44 or 37 °C. This argues that a unique protease is involved in activation/degradation of BoNTs in proteolytic *C. botulinum* strains such as *C. botulinum* A.

In conclusion, the *botR/A*, *bont/A* and *antp* genes of *C. botulinum* A are mainly expressed during the transition from exponential into stationary phase, the level of *botR/A* expression being about 100-fold less than that for the *bont/A*

and *antp* genes. This further argues that BotR/A is an alternative sigma factor controlling botulinum toxin A locus genes during the transition phase. In *C. botulinum* E, expression of *bont/E* and *p47* is also positively regulated to an equivalent extent during the transition phase but by an unknown factor. Although high temperature is not an inhibitory signal for toxin gene regulation, it stimulates a calcium-dependent protease, which activates BoNT/A at 37 °C but degrades BoNT/A and NTNH/A at 44 °C. No such activating or degradative protease was found in *C. botulinum* E.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a DRET contract (0034056), Great Horizontal Program from Institut Pasteur, and a DGA fellowship awarded to A. C.

## REFERENCES

- 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.
- Broussolle, V., Alberto, F., Shearman, C. A., Mason, D. R., Botella, L., Nguyen-The, C., Peck, M. W. & Carlin, F. (2002). Molecular and physiological characterization of spore germination in *Clostridium botulinum* and *Clostridium sporogenes*. *Anaerobe* **8**, 89–100.
- Call, J. E., Cooke, P. H. & Miller, A. J. (1995). *In situ* characterization of *Clostridium botulinum* neurotoxin synthesis and export. *J Appl Bacteriol* **79**, 257–263.
- Chen, F., Kuziemko, G. M. & Stevens, R. C. (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.
- DasGupta, B. R. (1989). The structure of the botulinum neurotoxins. In *Botulinum Neurotoxin and Tetanus Toxin*, pp. 53–67. Edited by L. L. Simpson. San Diego: Academic Press.
- DasGupta, B. R. & Sugiyama, H. (1972). Role of protease in natural activation of *Clostridium botulinum* neurotoxin. *Infect Immun* **6**, 587–590.
- Dekleva, M. L. & DasGupta, B. R. (1989). Nicking of single chain *Clostridium botulinum* type A neurotoxin by an endogenous protease. *Biochem Biophys Res Commun* **162**, 767–772.
- Dekleva, M. L. & DasGupta, B. R. (1990). Purification and characterization of a protease from *Clostridium botulinum* type A that nicks single-chain type A botulinum neurotoxin into di-chain form. *J Bacteriol* **172**, 2498–2503.
- 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.
- Dupuy, B. & Sonenshein, A. L. (1998). Regulated transcription of *Clostridium difficile* toxin genes. *Mol Microbiol* **27**, 107–120.
- 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.
- Fu, F. N., Sharma, S. K. & Singh, B. R. (1997). A protease-resistant novel hemagglutinin purified from type A *Clostridium botulinum*. *J Protein Chem* **17**, 53–60.
- Fujinaga, Y., Inoue, K., Watanabe, S., Yokota, K., Hirai, Y., Nagamachi, E. & Oguma, K. (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. *Microbiology* **143**, 3841–3847.
- Fujinaga, Y., Inoue, K., Nomura, T., Sasaki, J., Marvaud, J. C., Popoff, M. R., Kozaki, S. & Oguma, K. (2000). Identification and characterization of functional subunits of *Clostridium botulinum* A progenitor toxin involved in binding to intestinal microvilli and erythrocytes. *FEBS Lett* **467**, 179–183.
- Garnier, T. & Cole, S. T. (1988). Studies of UV-inducible promoters from *Clostridium perfringens* *in vivo* and *in vitro*. *Mol Microbiol* **2**, 607–614.
- Hatheway, C. L. (1989). Bacterial sources of clostridial neurotoxins. In *Botulinum Neurotoxin and Tetanus Toxin*, pp. 3–24. Edited by L. L. Simpson. San Diego: Academic Press.
- Hatheway, C. L. (1993). *Clostridium botulinum* and other clostridia that produce botulinum neurotoxin. In *Clostridium Botulinum: Ecology and Control in Foods*, pp. 3–20. Edited by A. H. W. Hauschild & K. L. Dodds. New York: Marcel Dekker.
- 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.
- Henderson, I., Davis, T., Elmore, M. & Minton, N. (1997). The genetic basis of toxin production in *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani*. In *The Clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis*, pp. 261–294. Edited by I. Rood. New York: Academic Press.
- Humeau, Y., Doussau, F., Grant, N. J. & Poulain, B. (2000). How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter. *Biochimie* **82**, 427–446.
- Inoue, K., Fujinaga, Y., Watanabe, T., Ohyama, 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.
- 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*. *Curr Microbiol* **36**, 226–231.
- 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.
- Kimura, B., Kawasaki, S., Nakano, H. & Hujii, T. (2001). Rapid, quantitative PCR monitoring of growth of *Clostridium botulinum* type E in modified-atmosphere-packaged fish. *Appl Environ Microbiol* **67**, 206–218.
- Kriegelstein, K. G., DasGupta, B. R. & Henschen, A. H. (1994). Covalent structure of botulinum neurotoxin A: location of sulphydryl bridges and identification of C-termini of light and heavy chains. *J Protein Chem* **13**, 49–57.
- Lövenklev, M., Holst, E., Borch, E. & Radstrom, P. (2004a). Relative neurotoxin gene expression in clostridium botulinum type B, determined using quantitative reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol* **70**, 2919–2927.
- Lövenklev, M., Artin, I., Hagberg, O., Borch, E., Holst, E. & Radström, P. (2004b). 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.

- Mani, N. & Dupuy, B. (2001).** Regulation of toxin synthesis in *Clostridium difficile* by an alternative RNA polymerase sigma factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 5844–5849.
- 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/A* is a positive regulator of botulinum neurotoxin and associated non-toxin protein genes in *Clostridium botulinum* A. *Mol Microbiol* **29**, 1009–1018.
- McGrath, S., Dooley, J. S. & Haylock, R. W. (2000).** Quantification of *Clostridium botulinum* toxin gene expression by competitive reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol* **66**, 1423–1428.
- Meunier, F. A., Herrerros, J., Schiavo, G., Poulain, B. & Molgo, J. (2002).** Molecular mechanism of action of botulinum neurotoxins and the synaptic remodeling they induce in vivo at the skeletal neuromuscular junction. In *Handbook of Neurotoxicology*, pp. 305–347. Edited by J. Massaro. Totowa, NJ: Humana Press.
- Oguma, K., Inoue, K., Fujinaga, Y., Yokota, K., Watanabe, T., Ohyama, T., Takeshi, K. & Inoue, K. (1999).** Structure and function of *Clostridium botulinum* progenitor toxin. *J Toxicol* **18**, 17–34.
- Popoff, M. R. & Marvaud, J. C. (1999).** Structural and genomic features of clostridial neurotoxins. In *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, pp. 174–201. Edited by J. E. Alouf & J. H. Freer. London: Academic Press.
- 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.
- Quinn, C. P. & Minton, N. P. (2001).** Clostridial neurotoxins. In *Clostridia*, pp. 211–250. Edited by H. Bahl & P. Dürre. Weinheim: Wiley-VCH.
- 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.
- Schiavo, G., Matteoli, M. & Montecucco, C. (2000).** Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol Rev* **80**, 717–766.
- Sharma, S. K., Fu, F. N. & Singh, B. R. (1999).** Molecular properties of a hemagglutinin purified from type A *Clostridium botulinum*. *J Protein Chem* **18**, 29–38.
- Sharma, S. K., Ramzan, M. A. & Singh, B. R. (2003).** Separation of the components of type A botulinum neurotoxin complex by electrophoresis. *Toxicon* **41**, 321–331.
- Siegel, L. S. & Metzger, J. F. (1979).** Toxin production by *Clostridium botulinum* type A under various fermentation conditions. *Appl Environ Microbiol* **38**, 606–611.
- Tavallaie, M., Chenal, A., Gillet, D., Raffestin, S., Popoff, M. R. & Marvaud, J. C. (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.

## 4.2 Article n°2 : Transcytose médiée par récepteur de la neurotoxine botulique A à travers des monocouches de cellules intestinales

Article publié (Couesnon *et al.*, 2006).

### 4.2.1 Résumé

Le botulisme est principalement acquis par voie orale, et la neurotoxine botulique (BoNT) s'échappe du tractus gastrointestinal en passant à travers la barrière épithéliale intestinale avant d'atteindre les terminaisons nerveuses. Nous avons montré que la toxine BoNT/A biologiquement active traverse des monocouches de cellules intestinales par transcytose dépendante de la liaison aux récepteurs, caractérisée par une inhibition du passage à 4°C et un passage à 37°C de manière saturable en 60 min environ. Le taux de passage de BoNT/A est 10 fois supérieur dans une lignée de cellules intestinales des cryptes, m-IC<sub>cl2</sub>, que dans les lignées d'entérocytes Caco-2 ou T84 et n'est pas augmenté lorsque BoNT/A est en complexe avec les protéines non toxiques associées (ANTPs). Comme pour les cellules neuronales, la liaison de BoNT/A aux cellules intestinales se fait via la partie C-terminales de la chaîne lourde (Hc) comme indiqué par les expériences de cytométrie en flux et compétition pour la transcytose de BoNT/A. Un modèle de « récepteur mixte » comprenant des gangliosides de la série b (GD<sub>1b</sub>, GT<sub>1a</sub>) et la protéine des vésicules synaptiques SV2 a été proposé pour la liaison de BoNT/A aux cellules neuronales. La préincubation de BoNT/A avec des gangliosides de la série b ou un domaine recombinant de SV2 a inhibé partiellement la transcytose de BoNT/A, suggérant un rôle putatif des gangliosides et d'une protéine apparentée à SV2 dans la transcytose de BoNT/A à travers les cellules m-IC<sub>cl2</sub> et Caco-2.

### 4.2.2 Choix du modèle de barrière intestinale et des lignées cellulaires

Afin d'étudier le passage de BoNT/A à travers l'intestin, un modèle d'épithélium intestinal qui représente la barrière entre le milieu extérieur (lumen du tractus intestinal) et le milieu intérieur (sous-muqueuse), a été utilisé. Le système expérimental comprend une monocouche de cellules épithéliales reposant sur un filtre laissant passer les molécules de taille inférieure à 0,4 µm. Ce filtre est situé au fond d'un insert qui est positionné sur un puits d'une plaque de culture cellulaire. Lorsque les cellules épithéliales sontensemencées dans l'insert, elles forment une monocouche à la surface du filtre. Le pôle apical est en contact avec le milieu contenu dans l'insert alors que le pôle basolatéral est baigné par le milieu contenu dans le puits.

Ce système permet d'obtenir des monocouches de cellules épithéliales polarisées, dont on peut mesurer la résistance électrique trans-épithéliale (TER) traduisant l'étanchéité des jonctions serrées mais aussi les flux ioniques maintenus par les cellules.

Ce système permet également d'avoir accès aux deux pôles des cellules polarisées, et d'étudier ainsi les transports de molécules d'un pôle à l'autre (transcytose) en contrôlant de nombreux paramètres comme la composition des solutions et la température. Divers traitements peuvent être facilement appliqués aux cellules et les cellules peuvent être fixées et analysées en immunofluorescence par exemple.

Le choix des lignées cellulaires a été réalisé en fonction des types de cellules présents dans la muqueuse et de résultats préliminaires obtenus sur coupe intestinale de souris.

En effet, des expériences de liaison du domaine Hc recombinant marqué par un fluorophore sur des cryocoupes d'intestin de souris ont montré que les sites putatifs de liaison de BoNT/A

étaient préférentiellement situés dans les cryptes. Or la majorité des cellules de la muqueuse est constituée de cellules absorbantes, les entérocytes.

Les deux lignées intestinales choisies ont donc été les :

- Caco-2 (human Colon Carcinoma 2) : une lignée de type entérocyte classiquement utilisée.
- m-IC<sub>cl2</sub> (mouse Intestinal Cell clone 2) : une lignée isolée de cryptes intestinales de souris et immortalisée par A. Vandewalle et E. Pringault.

D'autres lignées classiquement utilisées sont les :

- T84 : isolées de carcinomes de colon, elles ont un phénotype de cellule de crypte de colon et ont tendance à faire des multicouches.
- HT-29 : de phénotype peu différencié, elles sont sécrétrices de Cl<sup>-</sup> d'où des niveaux de TER élevés.

#### 4.2.3 Transcytose de BoNT/A à travers les Caco-2 et les m-IC<sub>cl2</sub>

##### 4.2.3.1 *Caractéristiques du passage*

Le passage apico-basolatéral de BoNT/A a été étudié en appliquant la toxine dans le milieu baignant le pôle apical (10<sup>5</sup> DL, Doses Létales sur souris) et en mesurant la quantité de toxine dans le milieu du côté baso-latéral par détermination du titre en toxine exprimé en DL. Le rapport de ces deux valeurs donne le taux de passage de la toxine à travers la monocouche de cellules intestinales.

Les résultats obtenus avec la toxine purifiée ou en complexe sont similaires (cf. Fig 1A) et montrent une cinétique caractéristique d'une endocytose médiée par récepteur, à savoir :

- Une inhibition du passage de la toxine à 4°C.
- Un passage en 60 min, saturable puisque le taux de passage reste stable ensuite.

L'étanchéité des jonctions serrées a été contrôlée de diverses manières :

- Mesure de la TER avant et après transcytose
- Passage de dextrans fluorescents
- Marquage en immunofluorescence des jonctions serrées (cf. Fig 2)

Les résultats ont confirmé que la toxine passe par la voie transcellulaire et non paracellulaire.

##### 4.2.3.2 *Spécificité de BoNT/A*

Une différence des niveaux de passage a été observée entre les lignées Caco-2 (~ 0,1% de passage) et m-IC<sub>cl2</sub> (~ 1%) (cf. Fig. 1B).

Le domaine C-terminal de la chaîne lourde de BoNT/A (Hc/A) est responsable de la liaison fonctionnelle et spécifique de BoNT/A aux cellules intestinales. En effet, l'inhibition de la transcytose de BoNT/A par le domaine recombinant Hc de BoNT/A, BoNT/B et de la neurotoxine tétanique (Bielinski *et al.*) a été testée. Seul Hc/A (en excès d'un facteur 20 par rapport à BoNT/A) est capable d'inhiber efficacement (réduction du taux de transcytose d'un facteur 10) le passage de BoNT/A à travers une monocouche de m-IC<sub>cl2</sub> (cf. Fig. 3A).

## 4.2.4 Caractérisation des récepteurs de BoNT/A sur les cellules intestinales

### 4.2.4.1 Spécificité de la liaison

La liaison du Hc/A fluorescent à différentes lignées cellulaires a été quantifiée par cytométrie en flux (cf. Fig. 4) et visualisée en microscopie confocale à fluorescence (cf. Fig. 5). Les deux méthodes ont permis de conclure que la liaison de Hc/A est plus importante sur les lignées de type neuronal comme les PC12 (phéocytomes de rat) ou les NG108-15 (hybridomes de neuroblastomes de souris et de gliomes de rat), que sur les lignées de type intestinal. La liaison aux cellules intestinales reste toutefois supérieure à celle observée sur d'autres lignées non-neuronales et non-intestinales comme Cos-7 ou Vero, et plus spécifique comme le montre l'absence ou non de la liaison du Hc/A dénaturé par la chaleur.

Conformément aux résultats de transcytose, Hc/A se lie préférentiellement aux m-IC<sub>c12</sub> plutôt qu'aux Caco-2.

### 4.2.4.2 Rôle des gangliosides

L'implication des gangliosides dans la liaison de BoNT/A a ensuite été testée sur les cellules neuronales et intestinales.

L'inhibition de la liaison du Hc/A fluorescent sur les lignées cellulaires neuronales et intestinales a été mise en évidence par cytométrie en flux (cf. Fig. 6c).

De plus, l'enrichissement des membranes en gangliosides par apport exogène a légèrement augmenté la liaison de Hc/A aux cellules « non sensibles » comme les cellules Cos-7 ou Vero, mais n'a pas modifié l'intensité de la liaison aux cellules neuronales ou intestinales (cf. Fig. 6d). Par contre, ce traitement a beaucoup augmenté la liaison du Hc de la neurotoxine tétanique (Hc/TeNT), en particulier aux cellules non neuronales. Ceci montre que l'enrichissement en gangliosides a été effectif puisque le Hc/TeNT, qui dispose de deux sites de liaison aux gangliosides, se lie de manière plus efficace aux cellules traitées. Pour le Hc/A, les gangliosides ne semblent pas suffisants pour assurer une liaison aussi importante.

L'influence des gangliosides a également été testée dans le modèle de transcytose, de la même manière que pour les expériences de cytométrie en flux à savoir par compétition avec les gangliosides ou enrichissement membranaire. Les résultats sont concordants puisqu'une inhibition de 50% a été observée en préincubant BoNT/A avec le mélange de gangliosides enrichis en gangliosides GD<sub>1b</sub> et GT<sub>1b</sub> (et pas avec GM<sub>1</sub> seul), mais l'enrichissement en gangliosides n'a pas eu d'effet significatif sur le taux de transcytose (cf. Fig. 6a). De plus, le rôle des gangliosides endogènes a été confirmé par traitement des cellules avec le PMP (inhibiteur de la synthèse des gangliosides) qui a entraîné une baisse du taux de transcytose, la complémentation par le mélange de gangliosides permettant de retrouver le taux de transcytose initial (cf. Fig. 6b).

### 4.2.4.3 Rôle d'une protéine apparentée à SV2

Comme le récepteur neuronal de nature protéique venait d'être identifié comme étant la protéine des vésicules synaptiques SV2, la présence de protéines apparentées à l'une des trois isoformes de SV2 (A, B et C) a été recherché dans des lysats cellulaires par la technique de Western Blot (immunoempreinte). L'isoforme A a été détecté principalement dans les cellules neuronales PC12 et l'isoforme C dans les cellules intestinales m-IC<sub>c12</sub> (cf. Fig. 7).

Il a été montré qu'un domaine particulier, nommé L4, de SV2C est responsable de la liaison de BoNT/A aux cellules neuronales. Le rôle de la protéine recombinante SV2C/L4 dans la transcytose a été testé et une inhibition de 75% du passage de BoNT/A a été observée (cf. Fig. 8). L'inhibition combinée de SV2C/L4 et des gangliosides n'a été que légèrement supérieure. Les sites de BoNT/A responsables de la liaison aux récepteurs protéiques présents sur les cellules intestinales et neuronales semblent donc être communs. Une protéine apparentée à un domaine de SV2C pourrait être impliquée dans la reconnaissance de certaines cellules intestinales par BoNT/A.

*La toxine BoNT/A active est endocytosée suite à la liaison aux récepteurs membranaires via le domaine Hc/A, et transportée à travers une monocouche de cellules intestinales par une transcytose apico-basolatérale. Le taux de passage, de l'ordre de 1%, est supérieur dans les cellules de type crypte par rapport aux cellules de type entérocyte. La liaison spécifique du Hc/A aux cellules intestinales, d'intensité inférieure à celle observée pour les cellules neuronales, fait intervenir les gangliosides  $GD_{1b}$  et  $GT_{1b}$ , ainsi qu'une protéine qui pourrait être apparentée au récepteur protéique neuronal SV2C.*

# Receptor-mediated transcytosis of botulinum neurotoxin A through intestinal cell monolayers

Aurélie Couesnon, Yannick Pereira and Michel R. Popoff\*

Unité des bactéries anaérobies et Toxines, Institut Pasteur, 28 rue du Dr Roux, 75724 Paris cedex, France.

## Summary

**Botulism is mainly acquired by the oral route, and botulinum neurotoxin (BoNT) escapes the gastrointestinal tract by crossing the digestive epithelial barrier prior to gaining access to the nerve endings. Here, we show that biologically active BoNT/A crosses intestinal cell monolayers via a receptor-mediated transcytosis, including a transport inhibition at 4°C and a passage at 37°C in a saturable manner within 30–60 min. BoNT/A passage rate was about 10-fold more efficient through the intestinal crypt cell line m-IC<sub>cl2</sub>, than through the carcinoma Caco-2 or T84 cells, and was not increased when BoNT/A was associated with the non-toxic proteins (botulinum complex). Like for neuronal cells, BoNT/A binding to intestinal cells was mediated by the half C-terminal domain as tested by fluorescence-activated cytometry and by transcytosis competition assay. A 'double receptor model' has been proposed in which BoNT/A interacts with gangliosides of GD<sub>1b</sub> and GT<sub>1b</sub> series as well as SV2 protein. Gangliosides of GD<sub>1b</sub> and GT<sub>1b</sub> series and recombinant intravesicular SV2-C domain partially impaired BoNT/A transcytosis, suggesting a putative role of gangliosides and SV2 or a related protein in BoNT/A transcytosis through Caco-2 and m-IC<sub>cl2</sub> cells.**

## Introduction

Botulinum neurotoxins (BoNTs) are synthesized by *Clostridium botulinum* as single chain proteins (approximately 150 kDa), which are divided into seven toxinotypes (A to G) according to their immunogenic properties. The toxins are exported outside the bacteria by a yet unknown mechanism and are proteolytically cleaved into a heavy chain (H; approximately 100 kDa) and a light

chain (L; approximately 50 kDa), which remain linked by a disulfide bridge. The di-chain molecule constitutes the active neurotoxin. In culture medium or in food, BoNTs are non-covalently associated to non-toxic proteins (ANTPs) including haemagglutinin (HA) subunits and a single non-toxin non-haemagglutinin (NTNH) component, to form botulinum complexes of various sizes. Botulinum complex, also known as progenitor toxin, results from the association of a BoNT molecule and ANTPs and shows a higher stability to acidic pH and protease digestion than BoNT alone (Oguma *et al.*, 1999; Popoff and Marvaud, 1999; Humeau *et al.*, 2000; Meunier *et al.*, 2002a; Poulain *et al.*, 2006).

BoNTs are responsible for a severe nervous disease (botulism) characterized by a flaccid paralysis and respiratory arrest, in man and animals. BoNTs target and penetrate cholinergic nerve endings by receptor-mediated endocytosis. Upon acidification of endosome-containing toxin molecules, the L chain translocates into the cytosol and catalyses a zinc-dependent proteolysis of one of three proteins of the SNARE complex, which play an essential role in evoked neurotransmitter exocytosis. The BoNT/A L chain cleaves the synaptosomal-associated protein SNAP25 at neuromuscular junction (Herreros *et al.*, 1999; Humeau *et al.*, 2000; Schiavo *et al.*, 2000; Poulain *et al.*, 2006). The highly specific binding of BoNTs to the target nerve endings involves protein and ganglioside receptors that localize at the neuronal plasma membrane (Montecucco *et al.*, 2004). Gangliosides of GD<sub>1b</sub> and GT<sub>1b</sub> series are involved in binding and functional entry into cells of BoNT/A and BoNT/B (Nishiki *et al.*, 1996; Kozaki *et al.*, 1998; Kitamura *et al.*, 1999; Rummel *et al.*, 2004a). The protein receptor on neuronal cells has been identified as synaptotagmin I and II for both BoNT/B and BoNT/G, and as synaptic vesicle protein SV2 (isoforms A, B and C) for BoNT/A (Nishiki *et al.*, 1994; 1996; Dong *et al.*, 2003; 2006; Rummel *et al.*, 2004b; Mahrhold *et al.*, 2006). In contrast, BoNT/C and BoNT/D seem to interact only with gangliosides (GD<sub>1b</sub> and GT<sub>1b</sub>) or phosphatidylethanolamine respectively (Tsukamoto *et al.*, 2005).

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 neurotoxin *in situ* (Tacket and Rogawski, 1989). In either case, BoNT

Received 9 May, 2007; revised 5 September, 2007; accepted 6 September, 2007. \*For correspondence. E-mail mpopoff@pasteur.fr; Tel. (+33) 1 45688307; Fax (+33) 1 40613123.

escapes the gastrointestinal tract to reach the target cholinergic nerve endings, probably through the blood and lymph circulation (Maksymowych *et al.*, 1999). The upper small intestine was found to be the primary site of absorption (Sugii *et al.*, 1977; Bonventre, 1979), but BoNT can also be absorbed from the stomach (Maksymowych *et al.*, 1999). In addition, BoNT is able to cross other epithelial cell barriers, such as the epithelium of the respiratory system, indicating that botulism can also be acquired by toxin inhalation (Park and Simpson, 2003). Penetration of BoNT through an epithelial cell barrier and its subsequent migration to cholinergic nerve endings are the essential first steps of botulinal intoxication. It is noteworthy that tetanus toxin (TeNT), which is structurally and functionally related to BoNTs, uses a motoneuron to gain access to the target inhibitory interneurons in the central nervous system by a transcytotic process including receptor-mediated endocytosis and axonal retrograde transport (Lalli *et al.*, 2003; Bohnert *et al.*, 2006). Thereby, BoNTs are preferentially transported by epithelial cells prior to target neuro-muscular junction.

Previous works have shown that BoNTs bind to polarized epithelial cells and undergo a receptor-mediated endocytosis and transcytosis from apical to basolateral sides (Fujinaga *et al.*, 1997; Maksymowych and Simpson, 1998; Park and Simpson, 2003; Maksymowych and Simpson, 2004; Nishikawa *et al.*, 2004). Indeed, it was reported that iodinated BoNT/A and BoNT/B are transported through human colon carcinoma (T84 and Caco-2) as well as pulmonary adenocarcinoma (Calu3) cells (Maksymowych and Simpson, 1998; Park and Simpson, 2003). All the BoNT forms, including the single chain or uncleaved form, as well as the di-chain form with the disulfide bond in either oxidized or reduced states, are able to bind and penetrate epithelial cells (Maksymowych and Simpson, 2004). The H chain or its half C-terminal part (Hc), which contains the receptor-binding domain, is involved in driving the transcytotic process (Park and Simpson, 2003; Maksymowych and Simpson, 2004). The role of ANTPs in BoNT transport through epithelial cells is controversial. In transcytosis experiments using epithelial cells grown on filters and iodinated BoNT, ANTPs did not influence the transport efficiency of BoNT (Maksymowych and Simpson, 1998; Park and Simpson, 2003). However, in a guinea pig *in vivo* model, only the large form of BoNT/C complex (16s) binds to epithelial cells of the upper small intestine and is absorbed from the intestine and then released into the serum (Fujinaga *et al.*, 1997). In addition, type C progenitor toxin (16s) associates with high-molecular-weight glycoproteins, like mucin, on the surface of human colon carcinoma HT-29 cells, thus permitting the uptake of the toxin complex into cells via a clathrin and/or caveolae pathway (Nishikawa *et al.*, 2004; Uotsu *et al.*, 2005). Moreover, haemagglutinin compo-

nents (HA33 and mature HA70, also termed HA1 and HA3b respectively) from botulinum complex type A bind to intestinal microvilli and erythrocytes. HA1 binds to galactose moieties and HA3b to sialic acid moieties of membrane carbohydrates (Fujinaga *et al.*, 2000).

The identity of epithelial cell receptors recognized by BoNTs as well as the subsequent transcytosis mechanism remains to be clearly determined. The studies described in this article were designed to better characterize the receptors which mediate the transcytotic passage of BoNT/A through intestinal cells.

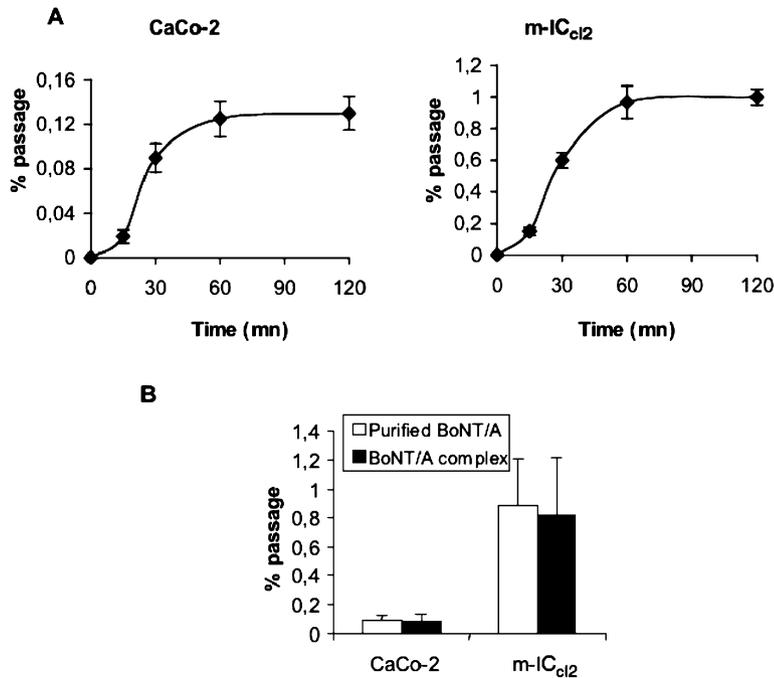
## Results

### *BoNT/A is transcytosed through intestinal cells by receptor-mediated endocytosis independently of ANTPs and transcytosis is more efficient through the intestinal crypt cells m-IC<sub>cl2</sub>*

The integrity of colon carcinoma Caco-2, T84 and intestinal crypt m-IC<sub>cl2</sub> (Bens *et al.*, 1996) cell monolayers was checked using transepithelial electrical resistance (TER) measurement. Purified BoNT/A or BoNT/A complex [ $10^5$  mouse lethal dose 50 (MLD<sub>50</sub>) ml<sup>-1</sup>] was introduced into the apical chamber of the cell cultures, and the toxin passage in the basolateral compartment was measured by titration of the BoNT lethal activity in mice, which is the most sensitive biological assay for BoNTs.

When purified BoNT/A was added to the apical chamber of the cell cultures cooled at 4°C, and further incubated for 30 min at this temperature, no significant lethal activity was detected in the basal chamber. Toxin was removed and cell cultures were then rapidly shifted to and incubated at 37°C. Basal supernatants were collected for toxin titration at regular intervals for up to 120 min. The kinetics of apical-basal passage of BoNT/A through Caco-2 or m-IC<sub>cl2</sub> cell monolayers as monitored by its lethal activity on mice is shown in Fig. 1A. The lethal activity titre increased during the first 30–60 min before reaching a plateau. The kinetics and plateau levels at 120 min were similar when either purified BoNT/A or BoNT/A complex was added in the apical chamber (Fig. 1 and data not shown). Similar findings were observed with m-IC<sub>cl2</sub> and T84 cell monolayers (data not shown). These data support that BoNT/A is transported via a receptor-mediated endocytosis (Kerneis *et al.*, 1997).

To further confirm the transcytotic transport of BoNT/A, the permeability of cell monolayers was monitored at the end of the incubation period at 37°C. No significant TER alteration was measured in cell monolayers incubated either with BoNT/A or with BoNT/A complex versus untreated cell monolayers (TER values: Caco-2 control,  $407 \pm 8 \Omega\text{cm}^{-2}$ , and after addition of BoNT/A,  $383 \pm 19 \Omega\text{cm}^{-2}$ ; m-IC<sub>cl2</sub> control,  $141 \pm 5 \Omega\text{cm}^{-2}$ , and



**Fig. 1.** Kinetics of purified BoNT/A translocation through polarized Caco-2 and m-IC<sub>cl2</sub> cell monolayers.

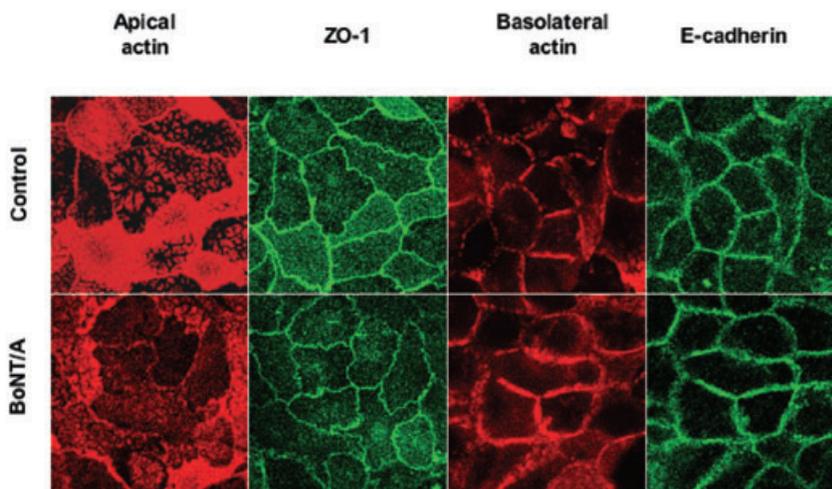
A. Purified BoNT/A ( $10^5$  LD<sub>50</sub> ml<sup>-1</sup>) was added to the apical compartment. Cell cultures were incubated at 4°C for 30 min, and then toxin was removed and cells were incubated in culture medium shifted at 37°C. The mouse lethal activity from the basolateral chamber was titrated at various interval times after the shift at 37°C.

B. Pure BoNT/A or BoNT/A complex crosses more efficiently m-IC<sub>cl2</sub> cell monolayers than Caco-2 cells. Passage of the toxin was titrated in the basolateral compartment after 120 min of incubation at 37°C. The results, expressed as the percentage of the total lethal activity applied into the apical chamber, are the mean  $\pm$  standard deviation of five independent assays with three replicates each.

after addition of BoNT/A,  $143 \pm 8 \Omega\text{cm}^{-2}$ ,  $n = 10$ ). This indicates that paracellular permeability was not affected by BoNT/A. In addition, no perturbation of immunostaining of ZO-1, which is representative of the apical tight junctions and E-cadherin, the major component of basolateral adherens junctions, was observed either in BoNT/A or in BoNT/A complex-treated Caco-2 cell monolayers (Fig. 2). Similar findings were observed with m-IC<sub>cl2</sub> cell monolayers (data not shown). This further supported that BoNT/A alone or in complex form did not induce any perturbation of apical and adherens intercellular junctions, as well as any modification of the actin cytoskeleton in cultured intestinal cells. This also excluded a possible diffusion of BoNT/A by the paracellular route.

The passage rate of purified BoNT/A or BoNT/A complex from apical to basal sides of Caco-2, T84 and m-IC<sub>cl2</sub> cell monolayers was monitored after 120 min of incubation at 37°C using the biological assay for toxin titration. The mouse intestinal crypt cell line m-IC<sub>cl2</sub> showed the highest rate of passage, about 10-fold more than Caco-2 cells (Fig. 1B). Human colon carcinoma cells T84, which display a morphology of intestinal villi cells (Bens *et al.*, 1996), yielded results similar to Caco-2 cells (data not shown).

Various bacterial and viral pathogens preferentially cross the intestinal barrier through M cells, as tested in Caco-2 cell monolayers co-cultured with murine lymphocytes which differentiate in M-like cells (Kerneis *et al.*,



**Fig. 2.** BoNT/A did not modify the actin, ZO-1 and E-cadherin distribution in Caco-2 cell monolayers. Caco-2 cell monolayers, control and incubated with BoNT/A at 37°C for 120 min, were fixed with PFA and stained with TRITC-phalloidin, and antibodies against either ZO-1 or E-cadherin. Representative images were recorded by confocal microscopy.

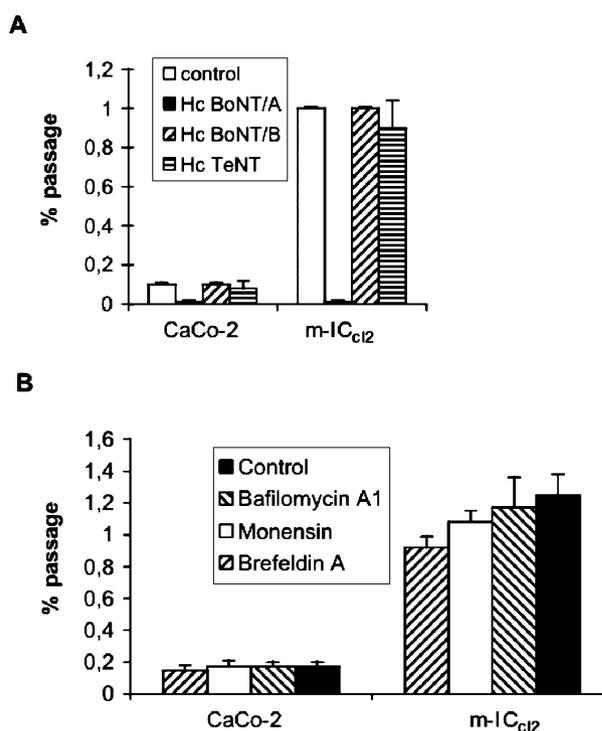
1997; 2000a; Ouzilou *et al.*, 2002). However, such differentiated M-like cells in Caco-2 cell monolayers (Kerneis *et al.*, 2000b) did not significantly increase the passage rate of BoNT/A or BoNT/A complex compared with Caco-2 cell monolayers alone (data not shown). Thereby, M-like cells did not seem to facilitate the transport of BoNT/A through Caco-2 cell monolayers.

These results indicate that intestinal crypt cells such as m-IC<sub>cl2</sub> are probably preferential targets for BoNT/A transcytosis compared with villi cells or M cells.

#### *Transcytosis of BoNT/A through intestinal cells is mediated by the Hc domain*

Heavy chain of clostridial neurotoxins contains two functional domains, the half N-terminal part, also referred to as the translocation domain, which facilitates the release of L chain into the cytosol, and the half C-terminal domain (Hc) which is involved in the interaction with membrane receptors and drives the toxin entry into target cells (Humeau *et al.*, 2000; Meunier *et al.*, 2002b; Lalli *et al.*, 2003). Iodinated H chain from BoNT/A was reported to be transported through pulmonary Calu-3 or rat alveolar epithelial cells in both directions, apical to basolateral and basolateral to apical sides, although at a slightly lower rate than for the whole BoNT/A (Park and Simpson, 2003). We also investigated whether Hc is involved in receptor-mediated transcytosis of BoNT/A through Caco-2 and m-IC<sub>cl2</sub> cell monolayers in a competition assay. Recombinant BoNT/A Hc was incubated with BoNT/A in a 20-molar ratio in the apical compartment and the biologically active neurotoxin was titrated in the basal chamber after 120 min of incubation at 37°C. As shown in Fig. 3A, BoNT/A Hc inhibited the passage of BoNT/A (10-fold decrease) as tested by the mouse lethal assay, whereas BoNT/B or TeNT Hc did not significantly prevent BoNT/A transcytosis through both Caco-2 and m-IC<sub>cl2</sub> cell monolayers. These results further support that BoNT/A is transported through intestinal cells by transcytosis mediated by a specific receptor recognized by BoNT/A which is distinct from that of BoNT/B or TeNT. In addition BoNT/A Hc, which is involved in the recognition of specific receptors on neuronal cells, is also implicated in the interaction with intestinal cells.

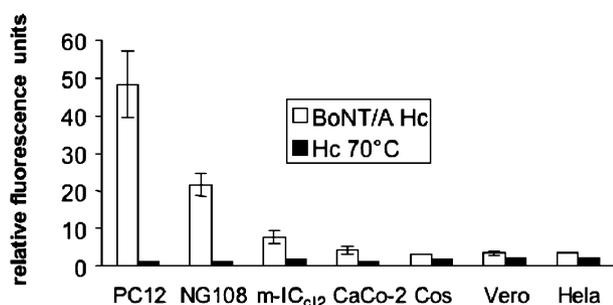
To investigate BoNT/A intracellular trafficking pathway, we used Bafilomycin A1 and monensin which inhibit acidification of endosomes, and Brefeldin A which disrupts the Golgi apparatus. Bafilomycin A1 (300 nM), monensin (50 µM) or Brefeldin A (50 µM) did not significantly impair BoNT/A transcytosis through Caco-2 or m-IC<sub>cl2</sub> cell monolayers (Fig. 3B). In addition, nocodazole or colchicin (50 µM), which depolymerizes the tubulin network, did not significantly prevent the passage of BoNT/A as monitored by the biological assay (data not shown).



**Fig. 3.** BoNT/A transport through Caco-2 and m-IC<sub>cl2</sub> cell monolayers is specifically impaired by BoNT/A Hc competition, but not by Bafilomycin A1, monensin or Brefeldin A. A. BoNT/A ( $10^5$  LD<sub>50</sub> ml<sup>-1</sup>) only (control) or incubated with recombinant Hc (20-molar excess ratio) from BoNT/A, BoNT/B or TeNT for 30 min at room temperature was then added to the apical compartment of cell monolayers. BoNT/A lethal activity was assayed in the basal compartment after 120 min of incubation at 37°C. Data represent an average  $\pm$  standard deviation of three experiments with three replicates each. B. Intestinal cell monolayers were treated with Bafilomycin A1 (300 nM), monensin (50 µM) or Brefeldin A (50 µM) for 30 min prior to addition of BoNT/A. The results, expressed as the percentage of the total lethal activity applied into the apical chamber, are the mean  $\pm$  standard deviation of five independent assays with three replicates each.

#### *Evidence of BoNT/A receptors on intestinal cells*

Quantitative analysis of the binding of fluorescent Hc from BoNT/A with various cell types was performed by fluorescence-activated cytometry (FACS). This methodology has been previously used to characterize interaction of toxins such as *Clostridium perfringens* Iota toxin with cells (Stiles *et al.*, 2000). As expected, fluorescent BoNT/A Hc showed a strong binding to chromaffin or neuronal cells such as PC12 and NG108-15, respectively, whereas a lower level of interaction was measured with m-IC<sub>cl2</sub> and Caco-2 cells (Fig. 4). Interestingly, the binding to m-IC<sub>cl2</sub> was approximately twice that to Caco-2 cells, and the binding to intestinal cells was slightly higher than that observed with non-neuronal and non-intestinal cells such as Cos-7, Vero and Hela cells. The binding of heat-inactivated fluorescent Hc (15 min, 70°C) was very weak



**Fig. 4.** Binding of BoNT/A Hc to cells assayed by fluorescence activated cytometry (FACS). Cells were incubated with Alexa488-labelled BoNT/A Hc ( $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) for 30 min at  $4^\circ\text{C}$ , washed and analysed with a FACSCalibur. Labelled BoNT/A Hc heated at  $70^\circ\text{C}$  for 15 min was used as a control of binding specificity. Values are the geometric means of relative fluorescence units from 20 000 events minus the mean signal from control cells. Values are means  $\pm$  standard deviation from three experiments with three replicates each.

and similar to the background level (cells only), especially in the case of neuronal and intestinal cells. Therefore, FACS experiments evidenced a specific interaction of BoNT/A Hc with the surface of intestinal cell lines, but in a three- to sixfold lower range than with neuronal cells. This may reflect a lower number of BoNT/A-specific receptors or lower-affinity receptors on intestinal cells. This also indicates that the structural integrity of the Hc domain, which is preserved in the recombinant protein (Tavallaie *et al.*, 2004), is required for binding to the cell surface.

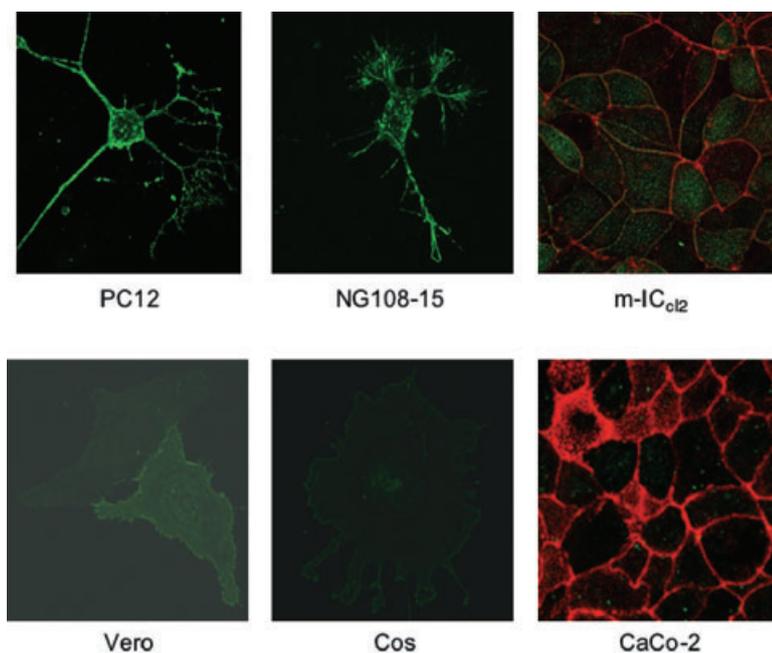
Binding of BoNT/A Hc to neuronal and intestinal cells was further investigated by fluorescence microscopy.

Cells grown on coverslips were incubated with Alexa488-Hc at  $4^\circ\text{C}$  for 30 min. Consistent with previous studies on clostridial neurotoxin interaction with neurons (Grumelli *et al.*, 2005), a strong binding of BoNT/A Hc was evidenced at the cell periphery and cell extensions of differentiated PC12 and NG108-15 cells, whereas a weaker staining was visualized on the surface of m-IC<sub>cl2</sub> (Fig. 5). Punctuated labelling of BoNT/A Hc on m-IC<sub>cl2</sub> surface is reminiscent of microvilli structures which are present on these intestinal cells. In agreement with the FACS results, a lower staining was observed with CaCo-2 cells, and only a low background was detected in Vero and Cos-7 cells (Fig. 5).

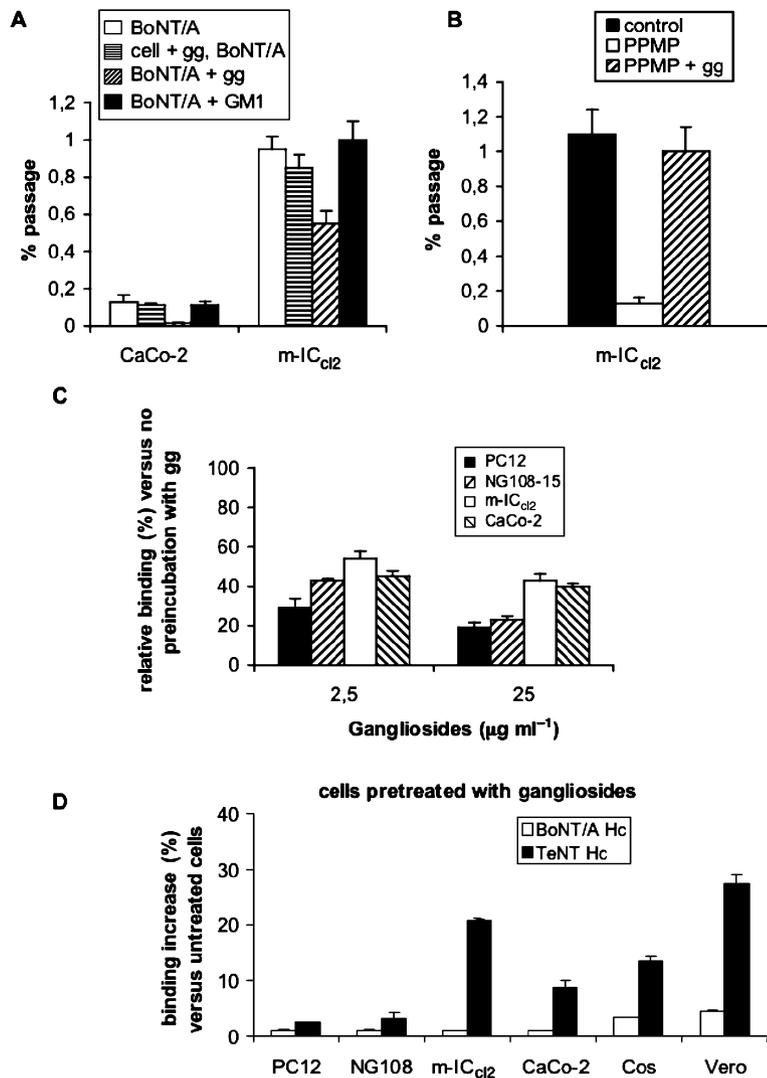
#### *Gangliosides of GD<sub>1b</sub> and GT<sub>1b</sub> series are candidate for BoNT/A receptor on intestinal cells*

Gangliosides of GD<sub>1b</sub> and GT<sub>1b</sub> series are part of the dual receptor of clostridial neurotoxins on neuronal cells (Nishiki *et al.*, 1996; Kitamura *et al.*, 1999; Bohnert *et al.*, 2006). Therefore, in order to show whether these receptor components are involved in the receptor-mediated transcytosis of BoNT/A through intestinal cells, BoNT/A was pre-incubated with a mix of gangliosides enriched in GD<sub>1b</sub> and GT<sub>1b</sub> prior to inoculation to the apical compartment of m-IC<sub>cl2</sub> or CaCo-2 cell monolayers. A significant transport inhibition (about 40%) of biologically active BoNT/A through m-IC<sub>cl2</sub> or CaCo-2 cells was observed (Fig. 6A). As control, pre-incubation of BoNT/A with GM1 did not decrease the level of toxin transcytosis (Fig. 6A).

To further address the role of gangliosides in BoNT/A transcytosis, m-IC<sub>cl2</sub> cells were depleted in endogenous



**Fig. 5.** Binding of Alexa488-labelled BoNT/A Hc to neuronal and non-neuronal cells. Cells grown on coverslips were incubated in HBSS/BSA containing labelled BoNT/A Hc ( $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) for 30 min at  $4^\circ\text{C}$ , then washed, fixed and mounted in Mowiol. In addition, the actin cytoskeleton of m-IC<sub>cl2</sub> and CaCo-2 cell monolayers was stained with TRITC-phalloidin.



**Fig. 6.** Involvement of gangliosides GD<sub>1b</sub> and GT<sub>1b</sub> in the passage of BoNT/A through intestinal cell monolayers and in the binding of BoNT/A Hc to intestinal cells.

A. BoNT/A was added into the apical compartment of Caco-2 or m-IC<sub>cl2</sub> cell monolayers (BoNT/A) or cells pre-treated with the preparation of gangliosides enriched in GD<sub>1b</sub> and GT<sub>1d</sub> (250 µg ml<sup>-1</sup>) (cell + gg, BoNT/A). Next, BoNT/A (10<sup>5</sup> LD<sub>50</sub> ml<sup>-1</sup>) was incubated with a preparation enriched in GD<sub>1b</sub> and GT<sub>1b</sub> (250 µg ml<sup>-1</sup>) (BoNT/A + gg) or GM1 (50 µg ml<sup>-1</sup>) (BoNT/A + GM1) for 30 min at room temperature prior to be added in the apical compartment of Caco-2 or m-IC<sub>cl2</sub> cell monolayers. BoNT/A was titrated by the mouse lethal assay in the basal compartment after 120 min of incubation at 37°C. Values are means ± standard deviation from three experiments with three replicates each.

B. BoNT/A transcytosis through m-IC<sub>cl2</sub> cell monolayers pre-treated with PPMP (7.5 µg ml<sup>-1</sup>), or pre-treated with PPMP and then supplemented with the ganglioside mixture enriched in GD<sub>1b</sub> and GT<sub>1d</sub> (PPMP + gg).

C. Labelled BoNT/A Hc (5 µg ml<sup>-1</sup>) was incubated with several concentrations of the preparation enriched in GD<sub>1b</sub> and GT<sub>1b</sub> and then incubated with cell suspension. Cells were analysed by FACS and the results are expressed as the percentage of the signal (geometric mean) of treated cells versus untreated cells.

D. Cells were pre-treated with the preparation of gangliosides enriched in GD<sub>1b</sub> and GT<sub>1b</sub> (250 µg ml<sup>-1</sup>) for 48 h, washed and then incubated with labelled BoNT/A or TeNT Hc. Cells were analysed by FACS and results are expressed as the signal (geometric mean) from 20 000 events. Values are means ± standard deviation from three experiments with three replicates each.

gangliosides by DL-threo-1-Phenyl-2-palmitoyl-amino-3-morpholino-1-propanol (PPMP), an inhibitor of glucosyl ceramide synthase (Yowler *et al.*, 2002; Chai *et al.*, 2006). Exposure of m-IC<sub>cl2</sub> cells to PPMP resulted in a significant decrease in BoNT/A transcytosis, whereas subsequent loading with exogenous gangliosides enriched in GD<sub>1b</sub> and GT<sub>1b</sub> restored the level of transcytosis (Fig. 6B).

In addition, pre-incubation of fluorescent BoNT/A Hc with the preparation of gangliosides enriched in GD<sub>1b</sub> and GT<sub>1b</sub> decreased its binding to membrane of neuronal as well as intestinal cells in a dose-dependent manner, as assayed by FACS (Fig. 6C).

Incubation of neuroblastoma cells with gangliosides GD<sub>1a</sub> or GT<sub>1b</sub> has been reported to result in incorporation of gangliosides into cell membrane and increase in sensitivity to BoNT/A (Yowler *et al.*, 2002). Indeed, m-IC<sub>cl2</sub> or Caco-2 cells were pre-incubated for 48 h with the ganglioside preparation enriched in GD<sub>1b</sub> and GT<sub>1b</sub> on their apical side and then washed prior to exposure to BoNT/A. No

increase in the transport rate of biologically active BoNT/A was found through intestinal cells pre-treated with gangliosides versus untreated cells (Fig. 6A).

Cells pre-incubated with the ganglioside mixture were analysed for their affinity to fluorescent Hc by FACS (Fig. 6D). No significant increase in binding of BoNT/A Hc to neuronal or intestinal cells was detected. Only a slight increase was measured with Cos-7 or Vero cells. Interestingly, pre-treatment of intestinal or non-neuronal and non-intestinal cells with the ganglioside preparation induced a higher binding of fluorescent Hc from TeNT, whereas no significant modification of binding was observed with PC12 and NG108-15 cells (Fig. 6D).

Either additional gangliosides inserted into the membrane could not alone induce binding to BoNT/A Hc, or they were inserted in insufficient quantities or at an inappropriate site in the membrane to be recognized by BoNT/A Hc. However, a marked increase in binding of TeNT Hc was evidenced with intestinal as well as with

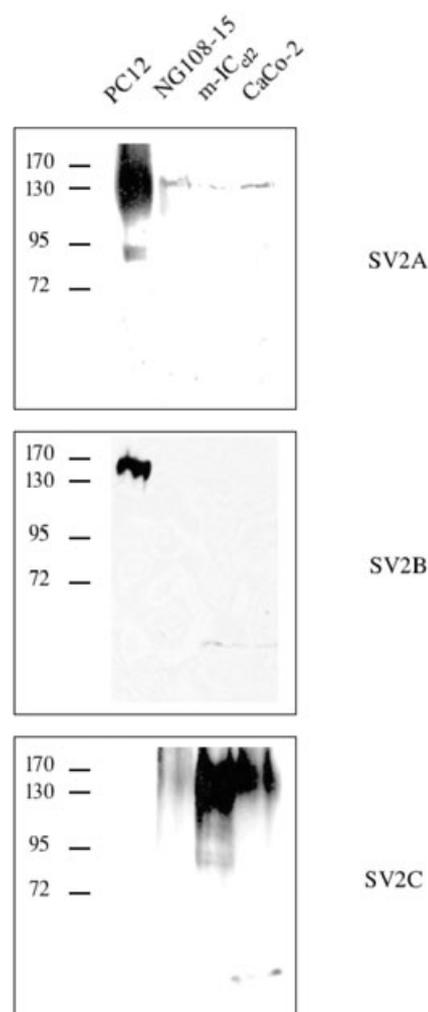
non-neuronal and non-intestinal cells treated with these gangliosides. The two binding sites to gangliosides in TeNT Hc instead of only one site in BoNT/A Hc (Rummel *et al.*, 2003; 2004a) might account for the increased affinity of cells pre-treated with gangliosides to TeNT Hc. Nevertheless, the addition of gangliosides to PC12 or NG108-15 produced no, or only weak, increase in affinity to TeNT Hc, possibly because the membrane of these cells or the protein part of the TeNT receptor is already saturated with these gangliosides. Indeed, GT<sub>1b</sub> is the major ganglioside in PC12 cells (Walton *et al.*, 1988), and supports high-affinity binding to TeNT.

Together these results strongly indicate that gangliosides of the GD<sub>1b</sub> and GT<sub>1b</sub> series are part of the functional receptor of BoNT/A on intestinal cells, but that the gangliosides alone added to cell membrane are not sufficient to drive the binding and transcytosis of BoNT/A.

#### *Is SV2 involved in the protein part of BoNT/A receptor on intestinal cells?*

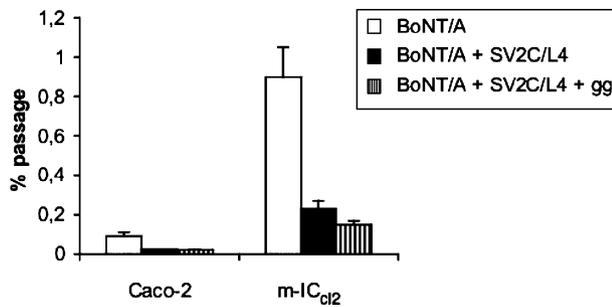
Recently, BoNT/A has been reported to bind specifically to the three isoforms A, B and C of SV2, with a stronger interaction with SV2C than with the two other isoforms. In addition, it was determined that SV2 was a physiological receptor, which accounts for the selective entry of BoNT/A into neuron endings (Dong *et al.*, 2006; Mahrhold *et al.*, 2006). SV2 proteins are expressed not only in neuronal cells but also in other cell types such as neuroendocrine cells (Portela-Gomes *et al.*, 2000). Therefore, we first investigated whether intestinal cell lines contain SV2-related proteins and whether this protein might correspond to a functional receptor for BoNT/A. As shown by Western blot using crude cell lysate and specific antibodies against SV2 isoforms, SV2A and to a lesser extent SV2B were evidenced in PC12 cells, whereas NG108-15 showed a low amount of SV2A and a little more of SV2C (Fig. 7), in agreement with previous reports (Mahrhold *et al.*, 2006). Interestingly, a strong immunodetection with SV2C antibodies was shown in m-IC<sub>cl2</sub> lysate and, at a lower intensity, in Caco-2 cells. In contrast, SV2A and SV2B isoforms were not evidenced in m-IC<sub>cl2</sub> and Caco-2 cell lysates, except for a weak immunodetection of SV2A in Caco-2 cells (Fig. 7). These results indicate that SV2C, or at least an immunologically related protein, is produced in m-IC<sub>cl2</sub> cells and, in a lesser amount, in Caco-2 cells.

As the intravesicular domain segment L4 (amino acids 454–579) of SV2-C is recognized by BoNT/A (Mahrhold *et al.*, 2006), SV2C-L4 was produced as a GST fusion protein and used in competition assay of transcytosis. As shown in Fig. 8, an about 50% inhibition of BoNT/A passage rate through m-IC<sub>cl2</sub> and Caco-2 cell monolayers was observed when BoNT/A was pre-incubated with



**Fig. 7.** Detection of SV2 isoforms in neuronal and intestinal cells. PC12, NG108-15, m-IC<sub>cl2</sub> and Caco-2 cells were lysed with 1% Triton X-100 in 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA and 0.2 mg ml<sup>-1</sup> BSA and centrifuged to remove the nuclei. Lysates (100 µg of total proteins) were electrophoresed on SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose and incubated with antibodies against SV2A, SV2B and SV2C (dilution 1:500). Revelation was performed with peroxidase-protein A or anti-goat conjugate and ECL kit detection.

GST–SV2C/L4 in a 20-molar ratio for 30 min at room temperature prior to incubation with cells. As the high-affinity receptor of clostridial neurotoxins results from the association of a ganglioside part and a protein part (Schiavo *et al.*, 2000; Bohnert *et al.*, 2006), a combination of gangliosides enriched in GD<sub>1b</sub> and GT<sub>1b</sub> with GST–SV2C/L4 was tested in BoNT/A transcytosis. The association of gangliosides and SV2C/L4 resulted in a slight increase of the passage inhibition of BoNT/A through Caco-2 or m-IC<sub>cl2</sub> cell monolayers when compared with gangliosides or SV2C/L4 alone. This suggests, but does not definitively prove, that SV2C or a related protein might be a functional BoNT/A receptor on intestinal cells.



**Fig. 8.** SV2C/L4 impairs the passage of BoNT/A through m-IC<sub>cl2</sub> and Caco-2 cell monolayers. BoNT/A ( $10^5$  LD<sub>50</sub> ml<sup>-1</sup>) was pre-incubated with GST-SV2C-L4 ( $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) or the association GST-SV2C-L4 + ganglioside preparation enriched in GD<sub>1b</sub> and GT<sub>1b</sub> for 30 min at room temperature prior to being inoculated in the apical compartment of polarized cell monolayers. BoNT/A was titrated by the mouse lethal assay in the basal compartment after 120 min of incubation at 37°C. Values are means  $\pm$  standard deviation from three experiments with three replicates each.

## Discussion

Botulism is a neurological disease, which is most often acquired by the oral route. Thus, the passage of neurotoxin through the intestinal barrier is an initial and critical step at the onset of the disease. The aim of our work is to better understand the mechanism of BoNT/A transport across intestinal cells using polarized cell monolayers grown on filters and a BoNT/A biological assay. Our results show (i) that BoNT/A alone, without ANTPs, uses a receptor-mediated transcytosis over a period of about 30–60 min at 37°C to cross intestinal cells, preferably intestinal crypt cells such as m-IC<sub>cl2</sub>, without alteration of TER or immunostaining of apical and adherens intercellular junctions, (ii) that BoNT/A Hc domain drives the transport of the toxin, and (iii) that Hc recognizes specific receptors on intestinal cells including, as in neuronal cells, a ganglioside part of the GD<sub>1b</sub>/GT<sub>1b</sub> series and a protein part, possibly SV2C or a related protein. In competition assays, gangliosides of GD<sub>1b</sub> and GT<sub>1b</sub> series and recombinant SV2C protein impaired BoNT/A transcytosis through Caco-2 and m-IC<sub>cl2</sub> cell monolayers, and their association resulted in a slight cumulative inhibition in BoNT/A transcytosis, suggesting a possible role of gangliosides from GD<sub>1b</sub> and GT<sub>1b</sub> series as well as SV2C or a SV2C-related protein in BoNT/A transcytosis through intestinal cells.

In intestinal polarized cell monolayers, we show that BoNT/A transport was inhibited at 4°C and occurred at 37°C in a saturable manner over a 30–60 min period approximately (Fig. 1). Low temperature has already been found to reduce the passage of iodinated BoNT/A through T84 cells, but a progressive passage of the iodinated toxin was monitored up to 24 h at 37°C (Maksymowich and Simpson, 1998; Park and Simpson, 2003). The discrepant results are likely due to the different

methods of toxin assay. Indeed, a fluorescent BoNT/A toxin passage through T84 cells was found to be almost complete within 90 min (Ahsan *et al.*, 2005). Prevention of toxin passage at 4°C and BoNT/A kinetics at 37°C in a saturation-dependent manner are compatible with previously reported receptor-mediated transcytosis through epithelial cells (Mostov *et al.*, 2000; Ouzilou *et al.*, 2002). This is further supported by the fact that BoNT/A was transported through epithelial cells within 2 h without TER 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 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 is able to bind and cross epithelial cells (Maksymowich and Simpson, 2004). Indeed, Hc constitutes a distinct structural domain of the neurotoxin, the only known function of which is to bind to specific cell surface receptors (Lacy *et al.*, 1998). Thereby, BoNT/A binding to gangliosides GD1b/GT1b as well as to SV2 is mediated by BoNT/A Hc (Kozaki *et al.*, 1998; Dong *et al.*, 2006; Mahrhold *et al.*, 2006). Thus, prevention of BoNT/A transport through intestinal cell monolayers by BoNT/A Hc certainly results from a competition between the whole toxin and the recombinant domain for surface receptors on intestinal cells. Moreover, each BoNT type as well as TeNT recognizes distinct receptors on neuronal cells (Bohnert *et al.*, 2006). Absence of competition with Hc from BoNT/B or TeNT indicates that BoNT/A triggers a transcytotic transport in intestinal cells by recognizing specific cell surface receptors and that BoNT/A is not absorbed by a non-specific mechanism or passage through the paracellular route.

Among the cell lines that have been tested, the intestinal crypt cells m-IC<sub>cl2</sub> showed the highest level of BoNT/A passage, whereas the colon carcinoma cells Caco-2 or T84, which have a phenotype of enterocyte (Bens *et al.*, 1996), showed a lower passage rate. As many pathogens preferably use M cells to enter the intestinal barrier (Kerneis *et al.*, 2000a; Ouzilou *et al.*, 2002), Caco-2 cells co-cultured with murine lymphocytes differentiated in M cells have been tested (Kerneis *et al.*, 1997). No significant difference in BoNT/A passage was observed through Caco-2 cell monolayers containing or not M-like cells (data not shown). These results suggest that intestinal crypt cells may represent a preferential site of BoNT/A passage. The rate of transcytosed BoNT/A versus the initial amount which was added in the apical chamber was low, about 1% with m-IC<sub>cl2</sub> and 0.1% with Caco-2 cell monolayers after 2 h of incubation. These results 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 *et al.*, 1997; Ouzilou *et al.*, 2002). In addition, it has been reported that the transport of iodinated BoNT/A through T84 cell monolayers reached 6–12% according to the initial toxin amount in the apical compartment after 18 h of incubation (Maksymowych and Simpson, 1998). It is noteworthy that the *in vivo* transport of BoNT through the intestinal barrier is also low. Indeed, the transport rate of BoNT/B from rat duodenum to the lymphatic circulation has been estimated from 0.01% to 0.1% (Sugii *et al.*, 1977). Thereby, transcytosis of BoNT/A in experimental intestinal barrier was low, but in the same range as that of enteric pathogens or that of BoNT in the *in vivo* model.

The role of ANTPs in the transcytosis of BoNT through epithelial cells is still controversial. Our results show that ANTPs did not significantly influence the passage of biologically active BoNT/A through m-IC<sub>cl2</sub> or Caco-2 cell monolayers. Similar results were obtained with iodinated BoNT/A and intestinal or pulmonary epithelial cells (Maksymowych and Simpson, 1998; Park and Simpson, 2003; Maksymowych and Simpson, 2004). However, large type C botulinum complex, as well as HA33 and HA70 from type C or type A botulinum complexes, has been reported to recognize carbohydrate derivatives and to bind to the microvilli of epithelial cells of guinea pig small intestine; this step is required for the absorption of the neurotoxin into the blood circulation (Fujinaga *et al.*, 1997; 2000; 2004; Nishikawa *et al.*, 2004; Uotsu *et al.*, 2005). In addition, mice immunized with ANTPs from *C. botulinum* C and D were partially protected when challenged orally, indicating that ANTPs might be involved in the intestinal absorption of the neurotoxin (Mahmut *et al.*, 2002). The discrepant findings in ANTP requirement for BoNT transcytosis could result from the different models and different host species used in these studies.

Our results taken with previous work (Maksymowych and Simpson, 1998; Park and Simpson, 2003; Maksymowych and Simpson, 2004) support a mechanism of receptor-mediated transcytosis for the transport of BoNT/A through epithelial cells. This raises the question whether BoNT/A receptors on epithelial cells are distinct from or the same as those on neuronal cells that contain a ganglioside and a protein part. Fluorescent BoNT/A Hc recognized neuronal cells and to a lesser extent intestinal cells using FACS. Therefore, affinity and/or number of BoNT/A receptors are probably lower on intestinal cells than on neuronal cells. Interestingly, intestinal crypt m-IC<sub>cl2</sub> cells showed a higher binding to BoNT/A Hc than Caco-2 (Fig. 4), and T84 cells (data not shown). As gangliosides of the GD<sub>1b</sub> and GT<sub>1b</sub> series are part of BoNT/A receptors on neuronal cells, we have investigated whether they constitute functional receptors on intestinal

cells. Addition of gangliosides GD<sub>1b</sub> and GT<sub>1b</sub> impaired the binding of fluorescent BoNT/A Hc to neuronal cells as well as to intestinal cells as assayed by FACS, and significantly decreased the transport of biologically active BoNT/A through intestinal cells monolayers. Furthermore, ganglioside depletion by PPMP strongly decreased BoNT/A transport through m-IC<sub>cl2</sub> cells, and loading PPMP-treated cells with gangliosides reversed this effect. However, incorporation of additional gangliosides GD<sub>1b</sub> and GT<sub>1b</sub> into membranes by pre-incubation of cells with the ganglioside preparation did not result in an increase in binding of BoNT/A Hc or in the passage rate of toxin through intestinal cell monolayers. Thereby, gangliosides GD<sub>1b</sub> and GT<sub>1b</sub> are probably involved in BoNT/A receptor on intestinal cells, but gangliosides alone seem insufficient for effective binding and transport of BoNT/A in these cells.

Proteins have also been found to be associated with gangliosides and to form specific and high-affinity BoNT receptors, thus a dual receptor model has been proposed (Montecucco, 1986). The protein moiety of BoNT receptors that have been identified up to now are membrane proteins of synaptic vesicles. Indeed, synaptotagmin I and II are involved in the binding of BoNT/B and BoNT/G (Nishiki *et al.*, 1994; Rummel *et al.*, 2004b), and recently SV2 was evidenced as a BoNT/A receptor (Dong *et al.*, 2006; Mahrhold *et al.*, 2006). SV2 isoforms A and B are largely distributed in the central and peripheral nervous system, whereas SV2C has a more restricted localization in a few brain areas (Buckley and Kelly, 1985; Janz and Südhof, 1999; Portela-Gomes *et al.*, 2000). SV2 proteins are also localized on neuroendocrine cells in various organs such as duodenum, colon, parathyroid and lungs (Portela-Gomes *et al.*, 2000; Pan *et al.*, 2004). Here we showed that m-IC<sub>cl2</sub> (and to a lower extent Caco-2) cells contain SV2C or SV2C immunologically related protein by Western blot. In a competition assay, the recombinant intraluminal part L4 of SV2C induced a 70% decrease in the transcytosis of BoNT/A through Caco-2 or m-IC<sub>cl2</sub> cell monolayers. As SV2 shares highly significant sequence similarities with several transmembrane transporters, such as carbohydrate transporters (Feany *et al.*, 1992), immunologically detected protein in intestinal cells with anti-SV2C could correspond to a SV2-related transporter having a distinct function in intestinal cells. These results suggest that SV2C or a SV2C-related protein might be involved in the BoNT/A receptor on intestinal cells, but further work is required to precisely determine BoNT/A receptor implicated in transcytosis.

BoNT endocytic pathway has not yet been clearly defined. It has been reported that BoNT/A is transported from apical to basolateral surface of T84 cells in a clathrin-dependent manner and with a migration pathway close from the cell periphery (Maksymowych and Simpson,

2004; Ahsan *et al.*, 2005), whereas the whole progenitor type C neurotoxin might enter HT-29 cells via both clathrin-coated pits and caveolae and might migrate through the Golgi apparatus (Uotsu *et al.*, 2005). Our results with Bafilomycin A1 and Brefeldin A suggest a transcytotic transport of BoNT/A through intestinal cells involving neither endosome acidification nor intracellular trafficking through the Golgi apparatus. 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 *et al.*, 1999; Keller *et al.*, 2004). Contrary to endocytosis in neuronal cells, transcytosis in intestinal cells permits the passage of undissociated neurotoxin through the intestinal barrier and its dissemination to target cells. Intracellular pathways of ligands are mainly controlled by receptors which are recognized on cell surface. BoNT/A interacts with gangliosides GD<sub>1b</sub>/GT<sub>1b</sub> which are distributed on different cell types and thus do not insure cell specificity. BoNT possibly uses gangliosides as a platform to cluster toxin molecules in a particular membrane microdomains containing specific receptor such as the protein part of BoNT dual receptor. SV2 probably mediates specific BoNT/A targeting to neuronal cells and its uptake in the synaptic vesicle endocytosis/exocytosis pathway. Indeed, BoNT/A seems to enter, although not exclusively, into the synaptic vesicle cycle (Verderio *et al.*, 2007). Does SV2 also drive the BoNT/A transcytotic pathway in intestinal cells? SV2 or a SV2-related protein might have different distribution and function in intestinal cells, when compared with neuronal cells, and thus could mediate BoNT/A transcytosis through these cells. Another possibility is that another, yet unidentified, receptor than SV2 might be involved in BoNT/A transport through intestinal cells.

## Experimental procedures

### *Botulinum neurotoxin preparations and recombinant proteins*

Production and purification of BoNT/A alone or associated with non-toxic proteins (BoNT/A complex) were performed according to procedures described in the literature (DasGupta and Sathyamoorthy, 1984; Shone and Tranter, 1995).

A recombinant His-tag Hc fragment of BoNT/A was produced and purified from pET28b vector containing DNA encoding for BoNT/A Hc cloned into BamHI and Sall sites as previously described (Tavallaie *et al.*, 2004). A recombinant derivative plasmid encoding BoNT/A Hc with an N-terminal tag containing four cysteines as described for TeNT Hc (Lalli and Schiavo, 2002) was performed by inserting the two complementary oligonucleotides P1132 (5'-TATGGCAGAGGCAGCAGCAGAGGCT

TGTTGTCGAGAGTGTGTGCACGAG-3') and P1131 (5'-GATCCCTCGTGCAACAACACTCTCGACAACAAGCCTCTCGTGCTGCTGCCCTGCCA-3') into NdeI and BamHI sites of pET28b vector. BoNT/A Hc with 4 Cys tag was then labelled with maleimide Alexa488 reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. Recombinant TeNT Hc and BoNT/B Hc were produced from pET28a vector containing a DNA fragment encoding TeNT (amino acids 856–1315) or BoNT/B (amino acids 861–1291) cloned into BamHI and Sall sites (pMRP859 and pMRP772).

cDNA coding the intraluminal SV2C fragment L4 (amino acids 454–579) was PCR-amplified from plasmid ID IRAM p995A117Q (RZPD, Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH) and cloned into pGEX-2T. The fusion protein, GST-SV2C/L4, was produced in *Escherichia 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 dialysed against phosphate-balanced solution (PBS) before use.

### *Cell cultures*

Cell lines including Vero (African green monkey kidney), Cos-7 (African green monkey kidney), HeLa (human cervix), MDCK (dog kidney), PC12 (rat pheochromocytoma), NG108-15 (mouse neuroblastoma X rat glioma), Caco-2 (human colon), T84 (human colon) were obtained from the ATCC, and m-IC<sub>cl2</sub> (mouse intestine) was kindly provided by A. Vandewalle. Vero, Cos-7, MDCK, Caco-2 and T84 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Invitrogen) at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Undifferentiated PC12 were grown in collagen-coated flasks in DMEM supplemented with 10% horse serum (Invitrogen) and 5% FCS. Differentiation was obtained by incubation in medium supplemented with 50 ng ml<sup>-1</sup> 7S nerve growth factor (NGF; Sigma-Aldrich) for 7 days. Undifferentiated NG108-15 were grown in DMEM supplemented with 5% FCS, HAT media supplement, 2 mM glutamine and 3 µM glycine. Two days before performing the experiments, the cells were differentiated by adding 0.5 mM dibutyl cyclic adenosine-monophosphate (Sigma-Aldrich) and reducing the serum concentration to 1%. m-IC<sub>cl2</sub> were cultured as described previously (Bens *et al.*, 1996).

Co-culture of murine Peyer's patch lymphocytes with Caco-2 cell monolayers in order to obtain differentiated M cells was performed as previously described (Kerneis *et al.*, 1997).

Enrichment of cell membranes with a mixture of gangliosides (18% GM1, 55% GD<sub>1a</sub>, 15% GD<sub>1b</sub>, 10% GT<sub>1b</sub> and 2% others, Calbiochem) was performed by incubating cells in culture medium supplemented with 250 µg ml<sup>-1</sup> for 48 h.

Depletion of cell membranes with PPMP (Sigma) was performed according to Yowler *et al.* (2002) and Chai *et al.* (2006) by incubating m-IC<sub>cl2</sub> cells with 7.5 µg ml<sup>-1</sup> PPMP in culture medium for 48 h. For ganglioside complementation, cells were incubated for 24 h with the ganglioside mixture (250 µg ml<sup>-1</sup>) in culture medium after 24 h of PPMP treatment.

### *Transcytosis of toxin across polarized intestinal cells*

Cells (2 × 10<sup>5</sup>) were seeded on the upper chamber of Transwell Inserts (Corning) and allowed to differentiate for 14 days until

they reached a stable TER. TER values were approximately  $400 \Omega \text{cm}^{-2}$  for T84 and Caco-2, and  $150 \Omega \text{cm}^{-2}$  for m-IC<sub>12</sub>. Integrity of tight junctions was confirmed by ZO-1 labelling and non-permeability to FITC-labelled dextran (4300 Da, Sigma-Aldrich) (data not shown).

Cells grown on inserts were cooled to 4°C in culture medium and purified BoNT/A or BoNT/A complex ( $5 \times 10^{-8}$  M,  $10^5$  MLD<sub>50</sub> ml<sup>-1</sup>) was added to the upper chambers. For competition assay, BoNT/A was pre-incubated for 30 min at room temperature with either a 20-molar ratio of recombinant Hc or SV2C L4, 250 µg ml<sup>-1</sup> ganglioside mixture, or 50 mg ml<sup>-1</sup> GM1 (Calbiochem) before addition to the upper well. After 30 min of incubation at 4°C, cells were rinsed with cold medium and transferred at 37°C. Medium from the lower chambers was collected at different times and stored at 4°C. Cells on filters were then washed with Hanks balanced salt solution (HBSS), fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS for 20 min, washed with PBS and conserved in a solution of 50 mM NH<sub>4</sub>Cl in PBS at 4°C for immunolabelling.

#### Toxin titration by mouse bioassay

Serial 10-fold and then twofold dilutions of samples (0.5 ml) in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.3) containing 0.2% gelatin were injected intraperitoneally into mice weighing 18–20 g as previously described (Marvaud *et al.*, 1998). Three mice were used for each dilution. The mice were observed over 4 days and the number that died was recorded. Results were expressed as MLD<sub>50</sub> ml<sup>-1</sup>. For each filter, the percentage of transcytosis was determined by the ratio of MLD<sub>50</sub> between the lower well and upper well (inoculation titre).

#### Fluorescence-activated cytometry

Cells grown to confluence were detached from flasks with 0.5 mM EDTA in PBS and washed with ice-cold HBSS. The cells ( $5 \times 10^5$  per tube) were incubated with 5 µg ml<sup>-1</sup> Alexa488-labelled Hc in HBSS containing 0.2% bovine serum albumin (HBSS+BSA) for 30 min at 4°C. Finally, they were washed with ice-cold HBSS+BSA, and cell-associated fluorescence was detected by a FACSCalibur (Becton Dickinson). Control samples were prepared using cells alone. Fluorescent values are representative of triplicate experiments and the peak signal (geometric mean) from 20 000 cells on a histogram plot minus the mean signal from control cells.

As control of binding specificity, Alexa488-labelled Hc was denatured by heating at 70°C for 15 min before addition to cells. The role of gangliosides in binding was tested by pre-incubating Alexa488-labelled Hc with different concentrations of ganglioside mixture in HBSS+BSA for 30 min at room temperature.

#### Immunofluorescence

Cells ( $5 \times 10^4$ ) were plated on coverslips and incubated on ice for 30 min in HBSS+BSA containing 5 µg ml<sup>-1</sup> Alexa488-labelled Hc. Cells were washed with cold HBSS, fixed with 4% PFA in PBS for 20 min, washed with PBS and free radicals were quenched by incubation with 50 mM NH<sub>4</sub>Cl in PBS.

Fixed cells on coverslips or on filters were then permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS and incubated with either TRITC-

phalloidin (Sigma-Aldrich) or primary antibody (1:500) in HBSS+BSA for 1 h. After washing and incubation with Alexa488- or Cy3-labelled secondary antibody (Invitrogen), cells were mounted in Mowiol (Calbiochem) and observed by confocal fluorescent microscopy.

Anti-SV2A and anti-SV2B rabbit polyclonal sera were purchased from Synaptic Systems and anti-SV2C goat polyclonal serum from Santa Cruz biotechnologies. Anti-Hc rabbit polyclonal serum was produced as described previously (Tavallaie *et al.*, 2004).

#### Electrophoresis and immunoblotting

Confluent cells were detached from culture flasks by 0.5 mM EDTA in PBS, washed with PBS and solubilized in lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5 containing 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA and 0.2 mg ml<sup>-1</sup> BSA). Lysed cells were centrifuged at 900 r.p.m. for 10 min and the supernatant was collected to remove nuclei.

Total protein concentration was determined using Bradford reagent (Bio-Rad) and lysates (100 µg) were separated with SDS-PAGE on 10% acrylamide gels. The separated proteins were transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Hybond-C, Amersham). Membranes were blocked with 5% skimmed milk (w/v) in PBS and incubated with the first antibody (1:500) in PBS containing 0.1% Tween 20 for 1 h. After three washes in PBS-0.1% Tween 20, the blots were treated with horseradish peroxidase conjugated to protein A (Bio-Rad) or anti-goat IgG, washed with PBS-Tween 0.1% and analysed with the enhanced chemiluminescence system (ECL, Amersham Bioscience).

#### Acknowledgements

This work was supported by DGA grant (0034056), Great Horizontal Program from Institut Pasteur, as well as a DGA and CANAM fellowship awarded to A.C.

#### References

- Ahsan, C.R., Hajnoczky, G., Maksymowych, A.B., and Simpson, L.L. (2005) Visualization of binding and transcytosis of botulinum toxin by human intestinal epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* **315**: 1028–1035.
- Bens, M., Bogdanova, A., Cluzeaud, F., Miquerol, L., Kerneis, S., Kraehenbuhl, J.P., *et al.* (1996) Transimmortalized mouse intestinal cells (m-ICc12) that maintain a crypt phenotype. *Am J Physiol* **270**: C1666–C1674.
- Bohnert, S., Deinhardt, K., Salinas, S., and Schiavo, G. (2006) Uptake and transport of clostridium neurotoxins. In *The Sourcebook of Comprehensive Bacterial Protein Toxins*. Alouf, J.E., and Popoff, M.R. (eds). Amsterdam: Elsevier, Academic Press, pp. 390–408.
- Bonventre, P.F. (1979) Absorption of botulinum toxin from the gastrointestinal tract. *Rev Infect Dis* **1**: 663–667.
- Buckley, K., and Kelly, R.B. (1985) Identification of a transmembrane glycoprotein specific for secretory vesicles of neuronal and endocrine cells. *J Cell Biol* **100**: 1284–1294.
- Chai, Q., Arndt, J.W., Dong, M., Tepp, W.H., Johnson, E.A.,

- Chapman, E.R., and Stevens, R.C. (2006) Structural basis of cell surface receptor recognition by botulinum neurotoxin B. *Nature* **444**: 1096–1100.
- Coffield, J.A., Bakry, N.M., Maksymowych, A.B., and Simpson, L.L. (1999) Characterization of a vertebrate neuromuscular junction that demonstrates selective resistance to botulinum toxin. *J Pharmacol Exp Ther* **289**: 1509–1516.
- DasGupta, B.R., and Sathyamoorthy, V. (1984) Purification and amino acid composition of type A botulinum neurotoxin. *Toxicon* **22**: 415–424.
- Dong, M., Richards, D.A., Goodnough, M.C., Tepp, W.H., Johnson, E.A., and Chapman, E.R. (2003) Synaptotagmins I and II mediate entry of botulinum neurotoxin B into cells. *J Cell Biol* **162**: 1293–1303.
- Dong, M., Yeh, F., Tepp, W.H., Dean, C., Johnson, E.A., Janz, R., and Chapman, E.R. (2006) SV2 Is the protein receptor for botulinum neurotoxin A. *Science* **312**: 592–596.
- Feany, M.B., Lee, S., Edwards, R.H., and Buckley, K.M. (1992) The synaptic vesicle protein SV2 is a novel type of transmembrane transporter. *Cell* **70**: 861–867.
- Fujinaga, Y., Inoue, K., Watanabe, S., Yokota, K., Hirai, Y., Nagamachi, E., and Oguma, K. (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. *Microbiology* **143**: 3841–3847.
- Fujinaga, Y., Inoue, K., Nomura, T., Sasaki, J., Marvaud, J.C., Popoff, M.R., *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., Watarai, S., Sakaguchi, G., Arimitsu, H., Lee, J.C., *et al.* (2004) Molecular characterization of binding subcomponents of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin for intestinal epithelial cells and erythrocytes. *Microbiology* **150**: 1529–1538.
- Grumelli, C., Verderio, C., Pozzi, D., Rossetto, O., Montecucco, C., and Matteoli, M. (2005) Internalization and mechanism of action of clostridial toxins in neurons. *Neurol Toxicol* **26**: 761–767.
- Herreros, J., Lalli, G., Montecucco, C., and Schiavo, G. (1999) Pathophysiological properties of clostridial neurotoxins. In *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*. Alouf, J.E., and Freer, J.H. (eds). London: Academic Press, pp. 202–228.
- Humeau, Y., Doussau, F., Grant, N.J., and Poulain, B. (2000) How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter. *Biochimie* **82**: 427–446.
- Janz, R., and Südhof, T.C. (1999) SV2C is a synaptic vesicle protein with an unusually restricted localization: anatomy of a synaptic vesicle protein family. *Neuroscience* **94**: 1279–1290.
- Keller, J.E., Cai, F., and Neale, E.A. (2004) Uptake of botulinum neurotoxin into cultured neurons. *Biochemistry* **43**: 526–532.
- Kerneis, S., Bogdanova, A., Kraehenbul, J.P., and Pringault, E. (1997) Conversion by payer's patch lymphocyte of human enterocytes into M cells that transport bacteria. *Science* **277**: 949–952.
- Kerneis, S., Caliot, E., Stubbe, H., Bogdanova, A., Kraehenbul, J.P., and Pringault, E. (2000a) Molecular studies of the intestinal mucosal barrier physiopathology using cocultures of epithelial and immune cells: a technical update. *Microb Infect* **2**: 1119–1124.
- Kerneis, S., Caliot, E., Stubbe, H., Bogdanova, A., Kraehenbul, J., and Pringault, E. (2000b) Molecular studies of the intestinal mucosal barrier physiopathology using cocultures of epithelial and immune cells: a technical update. *Microbes Infect* **2**: 1119–1124.
- Kitamura, M., Takamiya, K., Aizawa, S., and Furukawa, K. (1999) Gangliosides are the binding substances in neural cells for tetanus and botulinum toxins in mice. *Biochim Biophys Acta* **1441**: 1–3.
- Kozaki, S., Kamata, Y., Watarai, S., Nishiki, T., and Mochida, S. (1998) Ganglioside GT1b as a complementary receptor component for *Clostridium botulinum* neurotoxins. *Microbiol Pathol* **25**: 91–99.
- Lacy, D.B., Tepp, W., Cohen, A.C., Das Gupta, B.R., and Stevens, R.C. (1998) Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity. *Nat Struct Biol* **5**: 898–902.
- Lalli, G., and Schiavo, G. (2002) Analysis of retrograde transport in motor neurons reveals common endocytic carriers for tetanus toxin and neutrophin receptor p75<sup>NTR</sup>. *J Cell Biol* **156**: 233–239.
- Lalli, G., Bohnert, S., Deinhardt, K., Verastegui, C., and Schiavo, G. (2003) The journey of tetanus and botulinum neurotoxins in neurons. *Trends Microbiol* **11**: 431–437.
- Mahmut, N., Inoue, K., Fujinaga, Y., Arimitsu, H., Sakaguchi, Y., Hughes, L., *et al.* (2002) Mucosal immunization with *Clostridium botulinum* type C 16S toxoid and its non-toxic component. *J Med Microbiol* **51**: 813–820.
- Mahrhold, S., Rummel, A., Bigalke, H., Davletov, B., and Binz, T. (2006) The synaptic vesicle protein 2C mediates the uptake of botulinum neurotoxin A into phrenic nerves. *FEBS Lett* **580**: 2011–2014.
- Maksymowych, A.B., and Simpson, L.L. (1998) Binding and transcytosis of botulinum neurotoxin by polarized human carcinoma cells. *J Biol Chem* **273**: 21950–21957.
- Maksymowych, A.B., and Simpson, L.L. (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.
- Maksymowych, A.B., Rienhard, M., Malizio, C.J., Goodnough, M.C., Johnson, E.A., and Simpson, L.L. (1999) Pure botulinum neurotoxin is absorbed from the stomach and small intestine and produces peripheral neuromuscular blockade. *Infect Immun* **67**: 4708–4712.
- Marvaud, J.C., Gibert, M., Inoue, K., Fujinaga, V., Oguma, K., and Popoff, M.R. (1998) *botR* is a positive regulator of botulinum neurotoxin and associated non toxic protein genes in *Clostridium botulinum* A. *Mol Microbiol* **29**: 1009–1018.
- Meunier, F.A., Schiavo, G., and Molgo, J. (2002a) Botulinum neurotoxins: from paralysis to recovery of functional neuromuscular transmission. *J Physiol* **96**: 105–113.
- Meunier, F.A., Herreros, J., Schiavo, G., Poulain, B., and Molgo, J. (2002b) Molecular mechanism of action of botulinum neurotoxins and the synaptic remodeling they induce

- in vivo* at the skeletal neuromuscular junction. In *Handbook of Neurotoxicology*. Massaro, J. (ed.). Totowa, NJ: Humana Press, pp. 305–347.
- Montecucco, C. (1986) How do tetanus and botulinum toxins to neuronal membranes? *TIBS* **11**: 314–317.
- Montecucco, C., Rossetto, O., and Schiavo, G. (2004) Presynaptic receptor arrays for clostridial neurotoxins. *Trends Microbiol* **12**: 442–446.
- Mostov, K.E., Verges, M., and Altschuler, Y. (2000) Membrane traffic in polarized epithelial cells. *Curr Opin Cell Biol* **12**: 483–490.
- Nishikawa, A., Uotsu, N., Arimitsu, H., Lee, J.C., Miura, Y., Fujinaga, 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.
- Nishiki, T., Kamata, Y., Nemoto, Y., Omori, A., Ito, T., Takahashi, M., and Kozaki, S. (1994) Identification of protein receptor for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin in rat brain synaptosomes. *J Biol Chem* **269**: 10498–10503.
- Nishiki, T., Tokuyama, Y., Kamata, Y., Nemoto, Y., Yoshida, A., Sato, K., *et al.* (1996) The high-affinity of *Clostridium botulinum* type B neurotoxin to synaptotagmin II associated with gangliosides G<sub>T1B</sub>/G<sub>D1a</sub>. *FEBS Lett* **378**: 253–257.
- Oguma, K., Inoue, K., Fujinaga, Y., Yokota, K., Watanabe, T., Ohyama, T., *et al.* (1999) Structure and function of *Clostridium botulinum* progenitor toxin. *J Toxicol* **18**: 17–34.
- Ouzilou, L., Caliot, M., Pelletier, I., Prévost, M.C., Pringault, E., and Colbère-Garapin, F. (2002) Poliovirus transcytosis through M-like cells. *J Gen Virol* **83**: 2177–2182.
- Pan, J., Yeager, H., and Cutz, E. (2004) Innervation of pulmonary neuroendocrine cells and neuroepithelial bodies in developing rabbit lung. *J Histochem Cytochem* **52**: 379–389.
- Park, J.B., and Simpson, L.L. (2003) Inhalation poisoning by botulinum toxin and inhalation vaccination with its heavy-chain component. *Infect Immun* **71**: 1147–1154.
- Popoff, M.R., and Marvaud, J.C. (1999) Structural and genomic features of clostridial neurotoxins. In *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*. Alouf, J.E., and Freer, J.H. (eds). London: Academic Press, pp. 174–201.
- Portela-Gomes, G.M., Lukinius, A., and Grimelius, L. (2000) Synaptic vesicle protein 2, A new neuroendocrine cell marker. *Am J Pathol* **157**: 1299–1309.
- Poulain, B., Stiles, B.G., Popoff, M.R., and Molgo, J. (2006) Attack of the nervous system by clostridial toxins: physical findings, cellular and molecular actions. In *The Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*. Alouf, J.E., and Popoff, M.R. (eds). Amsterdam: Elsevier, Academic Press, pp. 348–389.
- Rummel, A., Bade, S., Alves, J., Bigalke, H., and Binz, T. (2003) Two carbohydrate binding sites in the H<sub>cc</sub>-domain of tetanus neurotoxin are required for toxicity. *J Mol Biol* **326**: 835–847.
- Rummel, A., Mahrhold, S., Bigalke, H., and Binz, T. (2004a) The H<sub>cc</sub>-domain of botulinum neurotoxins A and B exhibits a singular ganglioside binding site displaying serotype specific carbohydrate interaction. *Mol Microbiol* **51**: 631–643.
- Rummel, A., Karnath, T., Henke, T., Bigalke, H., and Binz, T. (2004b) Synaptotagmins I and II act as nerve cell receptors for botulinum neurotoxin G. *J Biol Chem* **279**: 30865–30870.
- Schiavo, G., Matteoli, M., and Montecucco, C. (2000) Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol Rev* **80**: 717–766.
- Shone, C.C., and Tranter, H.S. (1995) Growth of *Clostridia* and preparation of their neurotoxins. In *Clostridial Neurotoxins*. Montecucco, C. (ed.). Berlin: Springer, pp. 143–160.
- Stiles, B., Hale, M.L., Marvaud, J.C., and Popoff, M.R. (2000) *Clostridium perfringens* iota toxin: binding studies and characterization of cell surface receptor by fluorescence-activated cytometry. *Infect Immun* **68**: 3475–3484.
- Sugii, S., Ohishi, I., and Sakaguchi, G. (1977) Intestinal absorption of botulinum toxins of different molecular sizes in rats. *Infect Immun* **17**: 491–496.
- Tacket, C.O., and Rogawski, M.A. (1989) Botulism. In *Botulinum Neurotoxin and Tetanus Toxin*. Simpson, L.L. (ed.). San Diego, CA: Academic Press, pp. 351–378.
- Tavallaie, M., Chenal, A., Gillet, D., Pereira, Y., Manich, M., Gibert, 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.
- Tsukamoto, K., Kohda, T., Mukamoto, M., Takeuchi, K., Ihara, H., Saito, M., and Kozaki, S. (2005) Binding of *Clostridium botulinum* types C and D neurotoxins to ganglioside and phospholipid. *J Biol Chem* **280**: 35164–35171.
- Uotsu, N., Nishikawa, A., Watanabe, T., Ohyama, T., Tonzuka, T., Sakano, Y., and Oguma, K. (2005) Cell internalization and traffic pathway of *Clostridium botulinum* type C neurotoxin in HT-29 cells. *Biochim Biophys Acta* **1763**: 120–128.
- Verderio, C., Grumelli, C., Raiteri, L., Coco, S., Paluzzi, S., Caccin, P., *et al.* (2007) Traffic of botulinum toxins A and E in excitatory and inhibitory neurons. *Traffic* **8**: 142–153.
- Walton, K.M., Sandberg, K., Rogers, T.B., and Schnaar, R.L. (1988) Complex ganglioside expression and Tetanus toxin binding by PC12 pheochromocytoma cells. *J Biol Chem* **263**: 2055–2063.
- Yowler, B.C., Kensinger, R.D., and Schengrund, C.L. (2002) Botulinum neurotoxin A activity is dependent upon the presence of specific gangliosides in neuroblastoma cells expressing synaptotagmin I. *J Biol Chem* **277**: 32815–32819.

### **4.3 Article n°3 : La neurotoxine botulique A passe à travers la muqueuse intestinale de souris et cible localement certaines terminaisons nerveuses**

Article en préparation (Couesnon *et al.*).

#### **4.3.1 Résumé**

Le botulisme, caractérisé par une paralysie flasque, provient généralement d'une absorption de la neurotoxine botulique (BoNT) à travers la barrière épithéliale dans le tractus digestif, puis la dissémination via la circulation sanguine jusqu'aux neurones moteurs cibles. La toxine, injectée dans le lumen d'un segment d'intestin ligaturé, est capable d'inhiber les contractions spontanées et électriquement stimulées des muscles lisses intestinaux. L'entrée de BoNT/A au niveau de la partie antérieure de l'intestin grêle de souris a été visualisée à l'aide du fragment Hc de BoNT/A (Hc/A) marqué par un fluorophore, qui interagit avec les récepteurs cellulaires. Nous avons montré que le Hc/A reconnaît initialement une sous-population de cellules intestinales localisées dans les cryptes (après 30 min d'incubation), puis cible spécifiquement certains neurones dans la sous-muqueuse (30-90 min), et à des temps plus tardifs et dans une moindre mesure interagit avec certains neurones de la musculature. Le Hc/A fluorescent se lie majoritairement à certains neurones cholinergiques dans la sous-muqueuse et la musculature, mais reconnaît également d'autres neurones de la sous-muqueuse produisant du glutamate ou de la sérotonine. Le ciblage des neurones cholinergiques intestinaux par BoNT/A rend compte de l'inhibition du péristaltisme intestinal et de la sécrétion observée dans les cas de botulisme, mais les effets de BoNT/A sur les neurones non-cholinergiques reste à déterminer.

#### **4.3.2 BoNT/A, injectée dans la lumière d'anses intestinales ligaturées, inhibe les contractions spontanées de l'iléum**

Les mouvements de l'intestin sont régulés par le système nerveux entérique intrinsèque, sous contrôle du système nerveux extrinsèque. Un segment d'intestin prélevé et placé dans des conditions physiologiques est capable de se contracter spontanément. Le péristaltisme est contrôlé par l'intervention de plusieurs types de neurone : neurones inhibiteurs, interneurons, et neurones excitateurs, ces derniers libérant majoritairement de l'acétylcholine.

Comme test fonctionnel du passage de la muqueuse intestinale de BoNT/A et du ciblage de certains neurones cholinergiques, nous avons choisi d'étudier l'effet de BoNT/A sur les contractions du muscle lisse longitudinal d'un segment d'iléum ligaturé après injection de BoNT/A dans le lumen.

La fréquence des contractions spontanées du tissu contrôle a été très régulière et s'est maintenue sur plus de 4 heures, alors que celle du segment intestinal injecté avec BoNT/A a diminué progressivement à partir d'une heure d'exposition à la neurotoxine (cf. Fig. 1A). De plus, l'allure sigmoïde des contractions est restée constante pour le contrôle contrairement au tissu intoxiqué dont les contractions sont devenues de plus en plus irrégulières au cours du temps (cf. Fig. 1B).

L'action de BoNT/A sur les contractions induites par stimulation électrique a également été mesurée toutes les heures suite à l'injection de la toxine dans le lumen d'une anse iléale ligaturée. Au temps zéro, la stimulation électrique a provoqué une contraction de grande amplitude et plus longue que les contractions spontanées normales, puis un retour à des contractions régulières. Après une heure d'intoxication, la réponse induite par la stimulation électrique a été beaucoup plus réduite et inexistante aux temps ultérieurs (cf. Fig. 1C).

La contraction a pu être fortement stimulé par un agoniste des récepteurs à l'acétylcholine, prouvant que la paralysie du segment intestinal était bien due à une action présynaptique, empêchant la libération d'acétylcholine (cf. Fig. 1D)

Ceci a prouvé que les contractions spontanées et stimulées électriquement sont affectées par BoNT/A injectée dans le lumen dans anses intestinales ligaturées. BoNT/A est donc capable de passer la muqueuse intestinale et d'agir sur les terminaisons nerveuses.

De plus, la liaison de BoNT/A a pu être visualisée, bien que faiblement, de manière indirecte au niveau de terminaisons nerveuses dans les plexus sous-muqueux et myentérique des segments d'iléum intoxiqués pendant 3 heures (cf. Fig S1).

#### 4.3.3 Distribution des sites potentiels de liaison de Hc/A dans l'iléum de souris

Les sites potentiels de liaison de Hc/A ont été identifiés en incubant des cryocoupes d'intestin grêle (duodénum- jéjunum) de souris avec le Hc/A fluorescent et en les analysant en microscopie confocale. Un faible marquage de la bordure en brosse des entérocytes des villosités a été observé (cf. Fig. 2A), alors que le signal de liaison du Hc/A fluorescent est beaucoup plus intense au niveau des cryptes intestinales, colocalisant avec le marqueur de lectine *Ulex europaeus* agglutinin type 1 (UEA1), caractéristique des cellules de Paneth présentes dans les cryptes intestinales (cf. Fig. 2B).

Par ailleurs, une liaison du Hc/A fluorescent a été observée sur des corps cellulaires et des extensions neuronales dans la sous-muqueuse et dans la musculature. Cependant, la colocalisation avec le marqueur anti-neurofilament n'a été que partielle avec le Hc/A fluorescent, indiquant que le Hc/A ne reconnaît que certaines terminaisons nerveuses.

#### 4.3.4 Passage de la muqueuse et liaison de Hc/A aux cellules neuronales intestinales

Le passage de la Hc/A a été réalisé *ex-vivo* dans des anses ligaturées d'intestin de souris. Le trafic du Hc/A fluorescent, injecté dans la lumière intestinale d'un segment d'iléum ligaturé, a été suivi en fixant le tissu intestinal après différents temps d'incubation et en l'analysant en microscopie confocale après microdissection et immunomarquage.

Après 30 à 60 min d'incubation à température ambiante, le Hc/A fluorescent a été détecté dans la lumière des cryptes et dans certaines cellules des cryptes, mais très peu dans les entérocytes (cf. Fig. 3A). La colocalisation entre le marqueur des cellules de Paneth, UEA1, et le Hc/A fluorescent n'a pas été visualisée, indiquant que le Hc/A ne serait pas transporté par ces cellules.

Après 60 à 90 min d'incubation, certaines terminaisons nerveuses sont marquées par le Hc/A dans la sous-muqueuse intestinale. Comme observé précédemment sur les cryocoupes intestinales, toutes les terminaisons nerveuses révélées par l'anti-neurofilament ne sont pas co-marquées par le Hc/A fluorescent (cf. Fig. 3B).

A des temps plus tardifs (90-120 min), un faible marquage des terminaisons nerveuses de certains neurones du plexus a été observé (cf. Fig. 3C). Ceci suggère une progression du Hc/A du lumen intestinal à la muqueuse (préférentiellement au niveau des cryptes) et la sous-muqueuse, puis vers la musculature.

### 4.3.5 Types de neurones ciblés par Hc/A et localisation de SV2C dans le système nerveux entérique

#### 4.3.5.1 Cellules neuronales ciblées par le Hc/A dans la sous-muqueuse

Les neurones cholinergiques, marqués par des anti-ChAT (acétylcholine transférase), sont des neurones excitateurs abondants dans le plexus sous-muqueux (environ 55%), et ils sont également présents au niveau du plexus myentérique. Une grande majorité des terminaisons nerveuses marquées par le Hc/A fluorescent est immunoréactive pour ChAT, montrant que Hc/A cible préférentiellement les terminaisons cholinergiques (cf. Fig. 4A et 7).

Un autre neurotransmetteur très représenté parmi les neurones du plexus sous-muqueux (45%) est VIP (peptide vasointestinal). Il est synthétisé par des neurones inhibiteurs impliqués notamment dans des fonctions de régulation de la circulation sanguine et dans la sécrétion exocrine. Aucune colocalisation significative n'a été détectée entre le Hc/A fluorescent et le marqueur VIP (cf. Fig. 4C et 7).

Les neurones glutamatergiques, qui représentent la majorité des neurones du système nerveux central impliqués dans la réponse excitatrice, sont également représentés dans le système nerveux entérique. Le signal du Hc/A fluorescent ne colocalise que partiellement avec les anti-glutamate (cf. Fig. 4D et 7).

Enfin, la sérotonine (ou 5- hydroxytryptamine, 5-HT) est un neuromédiateur essentiel du système nerveux entérique et joue un rôle important dans les mouvements intestinaux. Le marquage de HT dans la sous-muqueuse révèle peu de fibres neuronales immunoréactives mais les cellules entérochromaffines sont très immunoréactives. Seule une colocalisation partielle du Hc/A des structures marquées par les anti-HT a pu être observée dans la sous-muqueuse.

#### 4.3.5.2 Cellules neuronales ciblées par le Hc/A dans la musculuse

Aucun marquage de cellules neuronales du plexus myentérique par le Hc/A fluorescent n'a été détecté avant 90 min d'incubation à température ambiante. Aux temps tardifs d'incubation (90-120 min), peu de terminaisons nerveuses ont été marquées par le Hc/A, celles-ci étant majoritairement de type cholinergique (cf. Fig. 5).

#### 4.3.5.3 Le récepteur neuronal SV2 de BoNT/A est exprimé par certaines cellules neuronales et gliales intestinales

Alors que les marquages des isoformes A et B de SV2 ont été très faibles dans l'intestin de souris, le marquage de l'isoforme C a révélé de nombreuses structures immunoréactives à SV2 dans la sous-muqueuse et dans la musculuse. La colocalisation avec les anti-neurofilaments a montré que SV2C est présent sur de nombreux filaments nerveux et dans les ganglions des plexus sous-muqueux et myentérique (cf. Fig. 6A). Un marquage important de structures entourant les vaisseaux sanguins de la sous-muqueuse intestinale a également été mis en évidence (cf. Fig. 6B), et le marquage de ces structures par les anti-neurofilament a confirmé qu'il s'agissait bien de terminaisons nerveuses autour des vaisseaux (cf. Fig. 6C). Le signal du Hc/A fluorescent n'a été détecté que dans certaines extensions neuronales exprimant SV2C (cf. Fig. 6A) et n'a pas été observé au niveau des filets nerveux encerclant les vaisseaux (cf. Fig. 6B).

Dans la sous-muqueuse, certaines cellules présentant un large corps cellulaire et marquées par les anti-GFAP, marqueur des cellules gliales, ont été co-marquées avec les anti-SV2C (cf. Fig. 6D). Ceci montre que certaines cellules gliales expriment également la protéine SV2C. Cependant, aucun marquage de ces cellules par le Hc/A n'a été mis en évidence

*BoNT/A, injectée dans la lumière d'une anse ligaturée intestinale, inhibe les contractions spontanées et électriquement stimulées des muscles lisses intestinaux. Le domaine de liaison Hc de la toxine, inoculé dans la lumière d'un segment iléal, est visualisé dans certaines cellules des cryptes de la muqueuse intestinal, puis au niveau de certaines terminaisons nerveuses dans la sous-muqueuse et la musculature. La plupart des terminaisons marquées par le Hc/A est de type cholinergique et une partie colocalise avec SV2C, le récepteur protéique neuronal de BoNT/A. Le Hc/A se lie également, bien que plus rarement, à d'autres types de terminaisons nerveuses, glutamatergiques et sérotoninergiques notamment. Leur implication dans le botulisme est encore méconnue.*

**PREFERENTIAL TARGETING OF CHOLINERGIC NEURONS BY THE  
C-TERMINAL HEAVY CHAIN DOMAIN OF BOTULINUM TYPE-A  
NEUROTOXIN IN THE MOUSE INTESTINE**

Aurélie COUESNON<sup>1</sup>, Jordi MOLGO<sup>2</sup>, Michel R. POPOFF<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unité des Bactéries anaérobies et Toxines, Institut Pasteur, Paris, France

<sup>2</sup>CNRS, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard – FRC2118, Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire – UPR9040, Gif sur Yvette, France

## **SUMMARY**

Botulism, which is characterized by flaccid paralysis, commonly results from botulinum neurotoxin (BoNT) absorption across the epithelial barrier in the digestive tract and then dissemination through the blood circulation to target motor neurons. Intraluminal administration of purified BoNT/A into mouse jejunum 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 BoNT/A fragment C (Hc) domain which interacts with cell surface receptor(s). We show that BoNT/A- Hc initially recognizes a subset of intestinal crypt cells, then targets specific neurons in the submucosa and later (90-120 min) in the musculosa. BoNT/A Hc mainly binds to certain cholinergic neurons of both submucosal and myenteric plexuses, but also recognizes, although to a lower extent, other glutamatergic- and serotonergic neurons in the submucosa. Targeting of intestinal cholinergic neurons by BoNT/A Hc accounts 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.

## 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 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, 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 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 (Herreros *et al.*, 1999; Humeau *et al.*, 2000; Schiavo *et al.*, 2000; Poulain *et al.*, 2006). The highly specific binding of BoNTs to target nerve endings involves protein and ganglioside receptors that localize at the neuronal plasma membrane (Montecucco *et al.*, 2004). Gangliosides of GD<sub>1b</sub> and GT<sub>1b</sub> series are involved in binding and functional entry into cells of BoNT/A and BoNT/B (Nishiki *et al.*, 1996; Kozaki *et al.*, 1998; Kitamura *et al.*, 1999; Rummel *et al.*, 2004b). 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 (Nishiki *et al.*, 1994; Nishiki *et al.*, 1996; Dong *et al.*, 2003; Rummel *et al.*, 2004a; Dong *et al.*, 2006; Mahrhold *et al.*, 2006).

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* (Tacket and Rogawski, 1989). In either case, BoNT escapes the gastro-intestinal tract to reach the target cholinergic nerve endings, possibly through the blood and lymph circulation (Maksymowych *et al.*, 1999). 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 (Kitamura *et al.*, 1969; Sugii *et al.*, 1977; Bonventre, 1979; Fujinaga *et al.*, 1997), but BoNT can also be absorbed from the stomach (Maksymowych *et al.*, 1999). Penetration of BoNT through an epithelial cell barrier and its subsequent migration to 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 (Fujinaga *et al.*, 1997; Maksymowych and Simpson, 1998; Park and Simpson, 2003; Maksymowych and Simpson, 2004; Nishikawa *et al.*, 2004; Couesnon *et al.*, 2007). However, little is known about the precise pathway of BoNT migration from the intestinal lumen to the target neuron 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 parasympathic neurons through nicotinic, and in some areas, muscarinic receptors (Goyal and Hirano, 1996; Grundy and Schermann, 2006). Vasoactive intestinal protein (VIP) and serotonin is also a major neurotransmitter in the regulation of normal gut function and interconnection with the central nervous system (McLean *et al.*, 2006).

In this study, we used fluorescent Hc fragment from BoNT/A to monitor the entry of the toxin into the mouse intestinal mucosa and to visualize the cells locally targeted by BoNT/A.

## **Experimental procedures**

### **Reagents**

The primary antibodies used were against Neurofilament 200 (Sigma ; mouse, diluted 1:500), Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) (Sigma ; rabbit, diluted 1:200), Choline Acetyltransferase (ChAT) (Chemicon ; goat, diluted 1:100), VIP (Abcam ; rabbit, diluted

1:200), Serotonin (Sigma ; rabbit, diluted 1:100), Glutamate (Chemicon ; rabbit, diluted 1:200), SV2A (Synaptic systems ; rabbit, diluted 1:200), SV2C (Santa Cruz ; goat, diluted 1:200).

The secondary antibodies used were : Cy5 coupled donkey anti-mouse IgG (US Biological), Cy3 coupled donkey anti-goat IgG (US Biological), Alexa488 coupled anti-goat IgG (Invitrogen), Alexa488 coupled anti-rabbit IgG (Invitrogen).

### **Animals**

Adult male IOPS mice (20-25 g body weight) purchased from Charles River Laboratories were anesthetized by inhalation with Isoflurane (AErrane®, Baxter S.A., Lessines, Belgium) inhalation, and euthanized by dislocation of the cervical vertebrae.

### **Recombinant BoNT/A Hc production**

Recombinant His-tag Hc fragment of BoNT/A was produced and purified from pET28b vector containing DNA encoding for BoNT/A--Hc cloned into *BamHI* and *Sall* sites as previously described (Tavallaie *et al.*, 2004). A recombinant derivative plasmid encoding BoNT/A Hc with a N-terminal tag containing 4 cystein residues, as described for TeNT-Hc (Lalli and Schiavo, 2002), was performed inserting the two complementary oligonucleotides P 1 1 3 2 (5'-TATGGCAGAGGCAGCAGCACGAGAGGCTTGTTGTCGAGAGTGTTGTGCACGAG-3') and P1131 (5'-GATCCCTCGTGCACAACACTCTCGACAACAAGCCTCTCGTGCTGCTGCCTCTGCCA-3') into *NdeI* and *BamHI* sites of pET28b vector. BoNT/A Hc with 4 Cys tag was then labeled with either maleimide Alexa 488 reagent (Invitrogen) or maleimide Cy3 (Amersham) according to the manufacturer's recommendations

### **Tension recordings on isolated mouse ileum segments**

The mouse ileum was removed from euthanized animals and placed in an oxygenated standard Krebs-Ringer solution composed of 154 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 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 a 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  $\mu$ g) 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 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 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  $\mu$ M) was added to the bath solution of ileal segment exposed to BoNT/A for 3 hours to check that ACh receptors were not affected by intoxication. 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). Data acquisition and analysis were performed with a program kindly provided by Dr. John Dempster (University of Strathclyde, Scotland). All experiments were performed at  $22 \pm 0.5^\circ\text{C}$ .

#### **Ex-vivo experiments on mouse ligatured ileal loops**

Segments of the mouse ileum (2 cm length) were removed from anesthetized mice and immersed in oxygenated Krebs-Ringer solution. After extensive wash to flush out the luminal contents, segments were ligatured on both extremities and injected with a micro syringe with BoNT/A Hc (20  $\mu$ M) diluted in Krebs-Ringer solution. 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 (1 h,  $22^\circ\text{C}$ ), tissues were washed in PBS and autofluorescence was quenched with 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (30 min,  $22^\circ\text{C}$ ).

#### **Microdissection and indirect immunofluorescence of dissected ileal loops**

Specimens were dissected by carefully separating the mucosa and submucosa from the muscle layers under a dissection microscope. Whole-mount preparations of the myenteric and submucosal plexuses of the ileum were permeabilized and blocked with PBS / BSA 2% / Donkey Serum 10% / Triton 2% for 1 h at RT. were 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 X 10 min), tissues were mounted in mowiol and analyzed using a Zeiss confocal laser scanning microscope and a X 63 oil immersion objective (N.A. 1.4). For quantitative analysis of co-localization of BoNT/A Hc with other markers, images of 512 X 512 pixels were taken from series of optical sections of 0.8  $\mu$ m thickness. The colocalisation was analysed with Zeiss LSM Image Browser software on 100 BoNT/A Hc immunoreactive varicosities for each marker using the merged image. Data are presented as the mean  $\pm$  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 and stored at -80°C. Sections (5  $\mu$ m) were cut with a cryostat-microtome and thaw mounted onto SuperFrost glass slides. For BoNT/A Hc binding experiments, sections were removed from the freezer and incubated for 30 min with 10  $\mu$ g/ml Alexa-labeled BoNT/A Hc in PBS / BSA (1%). After 3 washes in PBS, tissue sections were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 20 min at room temperature (22°C), rinsed in PBS and autofluorescence was quenched with 50 mM NH<sub>4</sub>Cl (15 min, 22°C). After permeabilization with 1% triton X-100 in PBS for 10 min, tissues were immunostained with TRITC-phalloidin (Sigma, 0.4  $\mu$ g/ml), TRITC-*Urexa europaeus* agglutinin type 1 (UEA1, 1  $\mu$ g/ml), 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 X 25 objective. For quantitative analysis of co-localization of BoNT/A Hc with markers, images of 512 X 512 pixels were taken from serial optical sections of 0.8  $\mu$ m thickness 0.8  $\mu$ m.

### *Statistics*

Values in the text are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. Differences between means were tested using Student's *t*-test, and *p*-values <0.05 were taken to indicate significance.

## **RESULTS**

### *Effect of BoNT/A on muscle tension from isolated ileum segments*

In striated muscle, BoNT/A is known to inhibit acetylcholine (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 (reviewed by Poulain et al., 2006). 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* (Bigalke and Habermann, 1980; Sand et al., 1998). 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 10 min<sup>-1</sup> (n = 3). These spontaneous contractions had a peak force that was variable from preparation to preparation, but comprised between 0.5 and 1.2 g (n = 3). BoNT/A reduces their frequency after 2, 3 and 4 h of the intraluminal injection (90%, 62.5% and 52.1% mean respectively). It is worth noting that 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 2h and 3 h) (Fig. 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 hours (Fig. 1B).

Electric field stimulation evoked responses that attained a peak force comprised between 1.2 and 3.6 g (n = 2) under control conditions and BoNT/A reduced the peak force by 100% and 90 % in the two preparations investigated (Fig. 1C). It is worth noting that after BoNT/A has blocked the response evoked by field stimulation, the addition of carbachol (20 μM) to the standard solution evoked a contractile response. These results suggest that under the conditions used BoNT/A is able to exert an action on the 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 after blockade of the contractile responses evoked by electric field stimulation by BoNT/A still induce contractile activity strongly suggest that the sensitivity of ACh receptors (muscarinic and nicotinic) is not affected by the toxin (Fig. 1D).

### *Distribution of BoNT/A- Hc binding sites in the mouse small intestine*

First, we investigated the potential binding sites for BoNT/A Hc 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 BoNT/A Hc and analyzed by confocal microscopy. Since BoNT has been reported to be preferentially absorbed from the upper small intestine (Bonventre, 1979; Fujinaga *et al.*, 1997), intestinal sections from duodenum-jejunum were analyzed. Only a faint staining was observed in brush border of enterocytes along intestinal villi (Fig. 2A ). However, a strong BoNT/A- Hc binding was observed on crypt cells localized at the bottom of villi. Intestinal crypts contain Paneth cells characterized by their content in numerous secretory granules. Immunostaining of Paneth cells with the TRITC labeled lectin *Urexa europaeus* agglutinin type 1 (UEA1) (Garabedian *et al.*, 1997) antibodies colocalized with BoNT/A Hc staining (Fig. 2B). This indicates that crypt cells exhibit preferential binding sites for BoNT/A Hc in mouse intestinal mucosa. Moreover, small cells in the lamina propria were co-stained with BoNT/A Hc and anti-UEA1 (Fig. 2B).

It is worth noting that BoNT/A Hc stained neuronal cell bodies, extensions and nerve endings in the submucosa and musculosa. However, only a low proportion of neuronal structures were recognized and labelled by BoNT/A Hc, as revealed by immunolabelling neurofilaments and co-staining with the fluorescent toxin (Fig. 2C). Indeed, as shown in Fig. 1C, under these conditions only a small number neuronal structures were stained with labelled BoNT/A Hc (Fig. 2C).

### *Entry of BoNT/A Hc into mouse intestinal mucosa*

To analyze BoNT/A Hc entry into the intestinal mucosa and submucosa, *ex-vivo* experiments were performed. For this small intestine loops excised from mice after laparotomy were washed, ligated at both extremities, and incubated in an oxygenated Krebs-Ringer solution at 37°C. Fluorescent BoNT/A Hc was inoculated into the intestinal lumen, and at various time intervals, intestinal loops were washed, fixed and processed for dissection, immunostaining, and mounting, as described in Experimental Procedures. After 30-60 min incubation, Alexa BoNT/A Hc was detected inside the lumen of intestinal crypts, in crypt cells, and not or with a low intensity in enterocytes (Fig. 3A). Immunostaining with UEA1-TRITC evidenced Paneth cells in intestinal crypts. However, BoNT/A Hc staining did not overlap with that of UEA1, but labeled different structures than Paneth cells. Higher resolution of intestinal crypts showed that BoNT/A Hc stained smaller cells than Paneth cells containing numerous large granules. This suggests that BoNT/A Hc preferentially targeted

intestinal crypt cells which are distinct from Paneth cells. It can not be excluded that a part of soluble BoNT/A Hc inside the cells was lost during processing of tissue samples.

BoNT/A Hc was also revealed in neuronal structures in the submucosa after 60-90 min incubation. As in previous experiments with intestine cryosections, not all neuronal structures immunostained with antibodies recognizing neurofilaments were labeled with BoNT/A Hc (Fig. 3B). Antibodies immunolabelling neurofilaments allowed to visualize a complex and abundant network of neuronal cell bodies and neuronal extensions of the submucosal plexus immediately underneath intestinal villi and crypts. Only a part of these neuronal structures, preferentially certain nerve endings, were stained with BoNT/A Hc (Fig. 3B).

A longer period of incubation (90-120 min) permitted to observe a weak BoNT/A Hc staining in certain neuronal extensions and neuronal cells from the musculosa (Fig. 3C). However, the proportion of neuronal elements from the myenteric plexus stained with BoNT/A Hc after a prolonged incubation was lower than was observed in the submucosal plexus. This suggests a progressive entry of BoNT/A Hc from the intestinal lumen through the mucosa, preferentially through crypt cells, to certain neuronal cell and extensions in the submucosa, and then in the musculosa.

#### *BoNT/A Hc targets specific neurons in the intestinal submucosa*

BoNTs are well known to interact with cholinergic neurons and to specifically block spontaneous and evoked acetylcholine release (Schiavo *et al.*, 2000; Meunier *et al.*, 2002). 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 (Verderio *et al.*, 1999; Verderio *et al.*, 2007). Enteric nervous system contains a large variety of neuron cell types. Thereby, we investigated the most representative neuronal types as putative targets of BoNT/A Hc 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 (Kulkarni-Narta *et al.*, 1999; Furness *et al.*, 2004). Most of ChAT immunoreactive neurons from the intestinal submucosa were labeled with fluorescent BoNT/A Hc (Figs. 4A and 7). In addition, large glial cells were also recognized by anti-ChAT antibodies. However, BoNT/A Hc did not recognize glial cells.

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 (Hernandes *et al.*, 2004). VIP immunoreactive neurons are estimated to represent about 45% of neurons from the submucosal plexus (Brookes, 2001; Furness *et al.*, 2004). Numerous cells were immunostained with anti-VIP antibodies in mouse intestinal submucosa, but a colocalization between VIP immunoreactivity and BoNT/A Hc staining was only observed in few of them (less than 3%) (Figs. 4B and 7). 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 the enteric nervous system. 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 (Liu *et al.*, 1987). In mouse intestinal submucosa, only a low number of glutamatergic neurons (less than 1 %), as evidenced by anti-glutamate antibodies, colocalized with BoNT/A Hc (Figs. 4C and 7).

Serotonin is also an important neurotransmitter in the enteric nervous system, where it is involved in the control of motility, secretion and sensory functions. Serotonin is produced by 2 to 20% of all enteric neurons (McLean *et al.*, 2006). In our analysis only few neuronal cell bodies were stained with anti-serotonin antibodies in the submucosal plexus, and some of them were also labeled with BoNT/A Hc, as shown in Fig. 4D.

Glial cells were neither immunostained with anti-neurofilament antibodies nor with BoNT/A Hc, but exhibited a clear immunolabelling with GFAP antibodies. These results support the view that BoNT/A Hc productive binding is neurospecific.

#### *BoNT/A Hc preferentially targets ChAT immunoreactive neurons in mouse intestine musculosa*

No BoNT/A Hc 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 prolonged incubation period (90-120 min). Cell extensions stained with BoNT/A Hc colocalized with neurofilament staining (Fig. 5). However, not all but only some of the nerve endings were labeled with BoNT/A Hc. Almost all cell bodies labeled with BoNT/A Hc were ChAT immunoreactive. This agrees with the fact that a large majority of

neurons in the myenteric plexus are immunoreactive for ChAT albeit many of them produce additional neurotransmitters (Brookes, 2001). No colocalization was observed between BoNT/A Hc 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 recently 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 (Dong *et al.*, 2006; Mahrhold *et al.*, 2006). 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 (Bajjalieh *et al.*, 1994). However, SV2 proteins are expressed not only in neuronal cells, but also in other cell types such as neuroendocrine cells (Portela-Gomes *et al.*, 2000). We investigated the distribution of SV2 protein in mouse intestinal mucosa. Numerous cell extensions were stained with anti SV2C antibodies in the submucosal plexus, whereas no specific staining was observed with anti-SV2B antibodies and only a diffuse staining in certain crypt cells and cell extensions was evidenced with anti-SV2A antibodies (Fig. 6A and data not shown). Most of filament structures decorated with anti-SV2C antibodies were also labeled with anti-neurofilament antibodies, indicating that SV2C is widely distributed in neuronal cells and neuronal extensions from the small intestine submucosa. However, BoNT/A Hc signal was observed in only some neuronal endings bearing SV2C, but not along the neuronal extensions stained with anti-SV2C antibodies (Fig. 6A). 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 BoNT/A Hc was observed on these structures (Fig. 6B, 6C). 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 (Fig. 6D). However, BoNT/A Hc, 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 neuron 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 (Bonventre, 1979; Fujinaga *et al.*, 1997; Maksymowych *et al.*, 1999; Fujinaga *et al.*, 2000). The aim of this study was to identify entry pathway(s) and target cells of BoNT/A in the mouse intestinal wall. For that, we used the fluorescent Hc domain which is the functional binding domain of BoNT to monitor the trafficking of BoNT/A.

Botulism is characterized by a flaccid paralysis and also by various dysautonomic disorders including gastrointestinal perturbations. Indeed, constipation is a common clinical manifestation of botulism (Sobel, 2005). *In vitro* studies, have already shown that BoNT/A reduce cholinergic transmission in gastrointestinal smooth muscles as well as pylori and oddi sphincter muscles by inhibiting ACh release (Bigalke and Habermann, 1980; MacKenzie *et al.*, 1982; Pasricha *et al.*, 1993; Sand *et al.*, 1998; James *et al.*, 2003). We checked whether BoNT/A injected into intestinal lumen was able to enter intestinal mucosa and to induce local effects on the intestine. 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 supports a toxin-dependent inhibition release of Ach. These data with isolated mouse ileum indicate that BoNT/A passes through the epithelial intestinal barrier, gains access to target intestinal neurons without diffusion by blood circulation, and locally inhibits evoked smooth muscle contractions. To our knowledge, this is the first report which demonstrates a local intestinal effect of botulism after intraluminal administration of purified BoNT/A.

Using cryosections of mouse small intestine overlaid with fluorescent probe, BoNT/A Hc was found to bind only to certain cell types. A strong BoNT/A Hc binding to intestinal crypt cells was visualized, whereas enterocytes showed no significant labeling or only a weak staining of the brush border. In contrast, it was shown that the whole progenitor 16s toxin type C or type A, which consists in large complex including BoNT, hemagglutinin, and non-toxic and non hemagglutinin components, strongly binds to the epithelia cell surface of the upper small intestine from guinea pig and that this binding was mediated by the hemagglutinins HA1 and HA3b (Fujinaga *et al.*, 1997; Fujinaga *et al.*, 2000; Fujinaga *et al.*, 2004). Hemagglutinin HA1 from progenitor type A toxin binds to galactose moiety and HA3b binds to sialic acid moiety, whereas hemagglutinins HA1 and HA3b from progenitor type C toxin interact with ganglioside GM<sub>3</sub>, sialosylparagloboside, and paragloboside (Fujinaga *et al.*, 2004). High MW glycoproteins on intestinal surface might be used as receptors for progenitor

type C toxin (Nishikawa *et al.*, 2004). In addition, progenitor 16S type C toxin was found to also associate with goblet cells in guinea pig small intestine epithelium (Fujinaga *et al.*, 1997). However, the neurotoxin alone recognizes distinct binding sites than the progenitor toxin. Indeed, BoNT/A receptors have been identified as gangliosides from GD<sub>1b</sub> and GT<sub>1b</sub> series and as SV2 protein. This certainly accounts for the differential binding to intestine epithelial cells between progenitor toxin and BoNT.

The functions of hemagglutinins from botulinum progenitor toxin are still controversial. It is assumed that hemagglutinins are involved in the internalization of progenitor type C toxin into intestinal cells and subsequently in the small intestine (Fujinaga *et al.*, 1997; Nishikawa *et al.*, 2004; Uotsu *et al.*, 2005). However, BoNT/A absorption from mouse stomach or small intestine was found to be independent on the presence of hemagglutinin and non-toxic non-hemagglutinin components. Ancillary proteins probably participate in BoNT protection from degradation inside the digestive tract, in a dose-dependent manner, particularly in the stomach (Maksymowych *et al.*, 1999). Our results, using ligated mouse intestinal loops, show that BoNT/A Hc entered the intestinal mucosa in the absence of ancillary proteins.

In the *ex vivo* experiments, fluorescent BoNT/A Hc was visualized on the surface and inside crypt cells, whereas no or a weaker staining was observed in epithelial villi cells. These results taken together with results obtained with intestine cryosections, suggests that BoNT/A Hc preferentially binds to, and enters intestinal crypt cells. However, Paneth cells which are numerous in intestinal crypts, were not directly recognized by BoNT/A Hc, indicating that BoNT/A Hc targeted distinct intestinal crypt cells than Paneth cells. BoNT/A has been found to pass through intestinal cell monolayers grown on filter by a transcytotic mechanism (Maksymowych and Simpson, 1998; Maksymowych and Simpson, 2004). We have previously reported that the passage rate of biologically active BoNT/A was higher (about 10-fold) in the mouse crypt cell line m-IC<sub>cl2</sub> than in the colonic cell lines Caco-2 and T84 (Coesnon *et al.*, 2007). This further supports that a subset of intestinal crypt cells might constitute a preferentially entry site for BoNT/A within the intestinal mucosa.

When passed across the intestinal barrier, BoNT is delivered in the connective tissue of the submucosa, where the toxin can have access to microvessel endothelial cells. BoNT passage in the blood and lymph circulation, supposes a transcytotic transport of the toxin through the vessel's endothelial cell barrier. In experiments with ligated intestinal loops, 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 within the microvessel's interior. In the ligated intestinal loop experiments, the blood circulation was interrupted, thus preventing the analysis of BoNT/A Hc passage into vessels. However, BoNT/A can migrate locally in the matrix of the connective tissue to attain potential target cells in the submucosa and musculosa. In cryosection experiments and overlaid with BoNT/A Hc, a staining of cells and cell extensions, the morphology of which is reminiscent of neuronal cells was observed in the submucosa and musculosa (Fig. 2C). Co-staining with anti-neurofilament antibodies confirmed that most of the cells labeled with BoNT/A Hc in the intestinal mucosa beneath the intestinal barrier are neurons. Thereby, local neuronal cells of the ENS are a target for BoNT/A, but at least some of them.

Our results with ligated intestinal loop experiments show that BoNT/A Hc associated with certain neuronal extensions and endings in the submucosa after 30-60 min incubation and later from at least 60 min to 120 min and at a lower extent in the musculosa. However, it can not be ruled out that a shorter time period may be required for BoNT/A Hc passage across the intestinal epithelial cell barrier, and subsequent targeting to neuronal cells in the submucosa. Incubations shorter than 30 min yielded low BoNT/A Hc fluorescence signal difficult to interpret. Since the blood circulation was impaired in the *ex vivo* experiments, BoNT/A Hc migration from intestinal cells to local neuronal cells might probably involve a dissemination of the recombinant protein in the extracellular matrix of connective tissue. The progressive passage of BoNT/A Hc from the submucosa to the musculosa was accompanied by a decrease in fluorescent intensity gradient, reflecting a dissemination in the intestinal tissues by a diffusion process. However, this does not preclude that another mode of BoNT/A Hc transport could be used. Indeed, as TeNT which undergoes a retrograde transport in motor neurons, a transcytotic mechanism might be supported by neuronal cells from the ENS to disseminate locally BoNT/A to other neuronal cells or neuronal cell types and even to target motor neurons at distance from the intestine.

We found that neuronal cells in the submucosa and more lately in the musculosa were stained with BoNT/A Hc, which has been inoculated in the intestinal loop lumen. However, not all neuronal cells were recognized by BoNT/A Hc as tested by co-labelling with antibodies against neurofilament. This indicates that BoNT/A Hc targeted specific neurons in the intestine. About half of neurons in the submucosa are ChAT- immunoreactive, and most of them produce other neurotransmitter types (Brookes, 2001; Furness *et al.*, 2004). As expected, BoNT/A Hc mainly stained cholinergic neurons of the submucosa. More than 90% of neurons labeled with BoNT/A Hc were ChAT immunoreactive. In contrast, only a low

proportion of VIP immunoreactive neurons, which are also largely present in the submucosa (about 45%) (Furness *et al.*, 2004), were targeted by BoNT/A Hc. Similarly, a low number of the other most represented neuron types in intestinal submucosa, glutamatergic and serotonergic neurons, were stained with BoNT/A Hc. It is noteworthy that it has been recently found that BoNT/A receptor, assigned to ganglioside GD1b/GT1b and SV2 protein, is part of a synaptic vesicle complex, which contains additional membrane proteins including vesicular glutamate transporter (cGLY-1 and vGLUT-2) (Baldwin and Barbieri, 2007). This further supports that BoNT/A may target glutamatergic receptors. (This shows that BoNT/A Hc mainly targeted cholinergic neurons in the intestinal submucosa, but also bound to other neuronal cell types albeit at a lower extent. BoNT/A effect on non-cholinergic neuronal cells *in vivo* is not known. One possibility is that BoNT/A uses non-cholinergic neurons to be transported to other target neurons. Indeed, neurons from ENS are highly interconnected between them and with neurons of the central nervous system (Goyal and Hirano, 1996; Grundy and Schermann, 2006).

The myenteric plexus mainly contains ChAT immunoreactive neurons (about 80%) (Furness *et al.*, 2004). BoNT/A Hc which has diffused until the myenteric plexus, essentially stained cholinergic neurons. However, only some ChAT were labeled with BoNT/A Hc. Differential staining of ChAT neurons with BoNT/A Hc might be due to a too low number of Hc molecules reaching the myenteric plexus, or to the fact that BoNT/A Hc recognized only a subset of ChAT neurons, which remains to be determined. Targeting of cholinergic neurons of the myenteric plexus by BoNT/A Hc is in agreement with intestinal paralysis and constipation syndromes, as well as decreased intestinal secretions, usually observed in patients with botulism.

The specific binding of BoNT/A Hc to target neuronal cells is mediated by the interaction with specific cell surface receptors identified as gangliosides of GD1b and GT1b series, as well as SV2 proteins (Kitamura *et al.*, 1999; Dong *et al.*, 2003; Rummel *et al.*, 2004b; Mahrhold *et al.*, 2006). We found that SV2C which shows the highest affinity to BoNT/A (Mahrhold *et al.*, 2006) was the main isoform expressed in the mouse intestine, whereas no, or a weak staining was obtained with anti-SV2B or SV2A antibodies, respectively. Immunostaining with anti-SV2C antibodies was only observed in cells with thin arborescent extensions, which were also labeled with anti-neurofilament antibodies. BoNT/A Hc preferentially recognized terminal endings of SV2C-immunoreactive neuronal cells, but did not bind all along the neuronal extensions labeled with anti-SV2C antibodies. One possibility is that BoNT/A Hc staining on these neuronal cell extensions was too weak to be

visualized. On the other hand, the BoNT/A functional receptor, which results in an association of gangliosides and SV2 protein, might be distributed in only some restricted areas on neuronal cell surface, whereas separate receptor components might have a wider (distinct) repartition. In addition, SV2, which is an integral synaptic vesicle membrane protein, has to be exposed to the extracellular milieu to be accessible to BoNT/A. This occurs during synaptic vesicle fusion with presynaptic membrane at the nerve terminal endings. Another type of thin cell extensions stained with anti SV2C antibodies, formed a dense network all around microvessels (Fig. 5B and 5C). These neuronal cell extensions, which were only faintly stained with anti-neurofilament antibodies, are probably involved in vessel innervation (Li *et al.*, 1998), but were not targeted by BoNT/A Hc.

In conclusion, in this work we have shown that BoNT/A Hc preferentially recognized certain crypt cells in the mouse upper small intestine, which might represent the main pathway for toxin entry and passage across the epithelial cell barrier. The BoNT/A Hc diffused progressively into the submucosa, and later attained the musculosa, where it targeted specifically some cholinergic neurons and to a lower extent glutamatergic and serotonergic neurons. Interestingly, the implication of these non-cholinergic neurons in the botulinum intoxication process remains to be determined.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

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.

## REFERENCES

- Bajjalieh, S.M., Frantz, G.D., Weimann, J.M., McConnell, S.K., and Scheller, R.H. (1994). Differential expression of synaptic vesicle protein 2 (SV2) isoforms. *J. Neurosci.* *14*, 5223-5235.
- Baldwin, M.R., and Barbieri, J.T. (2007). Association of botulinum neurotoxin serotypes A and B with synaptic vesicle protein complexes. *Biochemistry* *46*, 3200-3210.
- Bigalke, H., and Habermann, E. (1980). Blockade by tetanus and botulinum A toxin of postganglionic cholinergic nerve endings in the myenteric plexus. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* *312*, 255-263.
- Bonventre, P.F. (1979). Absorption of botulinum toxin from the gastrointestinal tract. *Rev. Infect. Dis.* *1*, 663-667.
- Brookes, S.H. (2001). Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine. *Anat. Rec.* *262*, 58-70.
- Couesnon, A., Pereira, Y., and Popoff, M.R. (2007). Receptor-mediated transcytosis of botulinum neurotoxin A through intestinal cell monolayers. *Cell. Microbiol.*
- Dong, M., Richards, D.A., Goodnough, M.C., Tepp, W.H., Johnson, E.A., and Chapman, E.R. (2003). Synaptotagmins I and II mediate entry of botulinum neurotoxin B into cells. *J. Cell Biol.* *162*, 1293-1303.
- Dong, M., Yeh, F., Tepp, W.H., Dean, C., Johnson, E.A., Janz, R., and Chapman, E.R. (2006). SV2 Is the Protein Receptor for Botulinum Neurotoxin A. *Science* *312*, 592-596.
- Fujinaga, Y., Inoue, K., Nomura, T., Sasaki, J., Marvaud, J.C., Popoff, M.R., Kozaki, S., and Oguma, K. (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., Nagamachi, E., and Oguma, K. (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.
- Fujinaga, Y., Inoue, K., Watarai, S., Sakaguchi, G., Arimitsu, H., Lee, J.C., Jin, Y., Matsumura, T., Kabumoto, Y., Watanabe, T., Ohyama, T., Nishikawa, A., and Oguma, K. (2004). Molecular characterization of binding subcomponents of

- Clostridium botulinum* type C progenitor toxin for intestinal epithelial cells and erythrocytes. *Microbiol.* 150, 1529-1538.
- Furness, J.B., Jones, C.A., Nurgali, K., and Clerc, N. (2004). Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Prog. Neurobiol.* 72, 143-164.
- Garabedian, E.M., Roberts, L.J.J., McNevin, M.S., and Gordon, J.I. (1997). Examining the role of Paneth cells in the small intestine by lineage ablation in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 272, 23729-23740.
- Goyal, R.K., and Hirano, I. (1996). The enteric nervous system. *N Engl J Med* 334, 1106-1115.
- Grundy, D., and Schermann, M. (2006). Enteric nervous system. *Curr Opin Gastroenterol.* 22, 102-110.
- Hernandes, L., Gama, P., and Alvares, E.P. (2004). Ileal VIP submucous neurons: confocal study of the area enlargement induced by myenteric denervation in weanling rats. *Regul. Peptides* 117, 69-72.
- Herreros, J., Lalli, G., Montecucco, C., and Schiavo, G. (1999). Pathophysiological properties of clostridial neurotoxins. In: *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, vol. 2, eds. J.E. Alouf and J.H. Freer, London: Academic Press, 202-228.
- Humeau, Y., Doussau, F., Grant, N.J., and Poulain, B. (2000). How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter *Biochimie* 82, 427-446.
- James, A.N., Ryan, J.P., and Parkman, H.P. (2003). Inhibitory effects of botulinum toxin on pyloric and antral smooth muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285, G291-297.
- Kitamura, M., Sakaguchi, S., and Sakaguchi, G. (1969). Significance of 12S toxin of *Clostridium botulinum* type E. *J Bacteriol* 98, 1173-1178.
- Kitamura, M., Takamiya, K., Aizawa, S., and Furukawa, K. (1999). Gangliosides are the binding substances in neural cells for tetanus and botulinum toxins in mice. *Biochim. Biophys. Acta* 1441, 1-3.
- Kozaki, S., Kamata, Y., Watarai, S., Nishiki, T., and Mochida, S. (1998). Ganglioside GT1b as a complementary receptor component for *Clostridium botulinum* neurotoxins. *Microbiol. Pathol.* 25, 91-99.
- Kulkarni-Narta, A., Beltz, A.J., and Brown, D.R. (1999). Catecholaminergic, cholinergic and peptidergic innervation of gut-associated lymphoid tissue in porcine jejunum and ileum. *Cell Tissue Res.* 298, 275-286.

- Lalli, G., and Schiavo, G. (2002). Analysis of retrograde transport in motor neurons reveals common endocytic carriers for tetanus toxin and neurotrophin receptor p75<sup>NTR</sup>. *J. Cell Biol.* *156*, 233-239.
- Li, Z.S., Fox-Threlkeld, J.E., and Furness, J.B. (1998). Innervation of intestinal arteries by axons with immunoreactivity for the vesicular acetylcholine transporter (VAChT). *J Anat* *192 ( Pt 1)*, 107-117.
- Liu, M.T., Rothstein, J.D., Gershon, M.D., and Kirchgessner, A.L. (1987). Glutamatergic enteric neurons. *J. Neurosci.* *17*, 4764-4784.
- MacKenzie, I., Burnstock, G., and Dolly, J.O. (1982). The effects of purified botulinum neurotoxin type A on cholinergic, adrenergic and non-adrenergic, atropine-resistant autonomic neuromuscular transmission. *Neuroscience* *7*, 997-1006.
- Mahrhold, S., Rummel, A., Bigalke, H., Davletov, B., and Binz, T. (2006). The synaptic vesicle protein 2C mediates the uptake of botulinum neurotoxin A into phrenic nerves. *FEBS Lett* *580*, 2011-2014.
- Maksymowych, A.B., Rienhard, M., Malizio, C.J., Goodnough, M.C., Johnson, E.A., and Simpson, L.L. (1999). Pure botulinum neurotoxin is absorbed from the stomach and small intestine and produces peripheral neuromuscular blockade. *Infect. Immun.* *67*, 4708-4712.
- Maksymowych, A.B., and Simpson, L.I. (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.
- Maksymowych, A.B., and Simpson, L.L. (1998). Binding and transcytosis of botulinum neurotoxin by polarized human carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* *273*, 21950-21957.
- McLean, P.G., Borman, R.A., and Lee, K. (2006). 5-HT in the enteric nervous system: gut function and neuropharmacology. *Trends Neurosci* *30*, 9-13.
- Meunier, F.A., Herreros, J., Schiavo, G., Poulain, B., and Molgo, J. (2002). Molecular mechanism of action of botulinum neurotoxins and the synaptic remodeling they induce in vivo at the skeletal neuromuscular junction. In: *Handbook of Neurotoxicology*, vol. 1, ed. J. Massaro, Totowa, NJ: Humana Press, 305-347.
- Montecucco, C., Rossetto, O., and Schiavo, G. (2004). Presynaptic receptor arrays for clostridial neurotoxins. *Trends Microbiol.* *12*, 442-446.
- Nishikawa, A., Uotsu, N., Arimitsu, H., Lee, J.C., Miura, Y., Fujinaga, Y., Nakada, H., Watanabe, T., Ohyama, T., Sakano, Y., and Oguma, K. (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.
- Nishiki, T., Kamata, Y., Nemoto, Y., Omori, A., Ito, T., Takahashi, M., and Kozaki, S. (1994). Identification of protein receptor for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin in rat brain synaptosomes. *J. Biol. Chem.* *269*, 10498-10503.
- Nishiki, T., Tokuyama, Y., Kamata, Y., Nemoto, Y., Yoshida, A., Sato, K., Sekiguchi, M., Taakahashi, M., and Kozaki, S. (1996). The high-affinity of *Clostridium botulinum* type B neurotoxin to synaptotagmin II associated with gangliosides G<sub>T1B</sub>/G<sub>D1a</sub>. *FEBS Lett.* *378*, 253-257.
- Park, J.B., and Simpson, L.L. (2003). Inhalation poisoning by botulinum toxin and inhalation vaccination with its heavy-chain component. *Infect. Immun.* *71*, 1147-1154.
- Pasricha, P.J., Ravich, W.J., and Kalloo, A.N. (1993). Effects of intrasphincteric botulinum toxin on the lower esophageal sphincter in piglets. *Gastroenterology* *105*, 1045-1049.
- Portela-Gomes, G.M., Lukinius, A., and Grimelius, L. (2000). Synaptic vesicle protein 2, A new neuroendocrine cell marker. *Am J Pathol* *157*, 1299-1309.
- Poulain, B., Stiles, B.G., Popoff, M.R., and Molgo, J. (2006). Attack of the nervous system by clostridial toxins: Physical findings, cellular and molecular actions. In: *The Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, eds. J.E. Alouf and M.R. Popoff, Amsterdam: Elsevier, Academic Press, 348-389.
- Rummel, A., Karnath, T., Henke, T., Bigalke, H., and Binz, T. (2004a). Synaptotagmins I and II act as nerve cell receptors for botulinum neurotoxin G. *J. Biol. Chem.*, in press.
- Rummel, A., Mahrhold, S., Bigalke, H., and Binz, T. (2004b). The H<sub>cc</sub>-domain of botulinum neurotoxins A and B exhibits a singular ganglioside binding site displaying serotype specific carbohydrate interaction. *Mol. Microbiol.* *51*, 631-643.
- Sand, J., Nordback, I., Arvola, P., Porsti, I., Kalloo, A., and Pasricha, P. (1998). Effects of botulinum toxin A on the sphincter of Oddi: an in vivo and in vitro study. *Gut* *42*, 507-510.
- Schiavo, G., Matteoli, M., and Montecucco, C. (2000). Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol. Rev.* *80*, 717-766.
- Sobel, J. (2005). Botulism. *Clin Infect Dis* *41*, 1167-1173.
- Sugii, S., Ohishi, I., and Sakaguchi, G. (1977). Intestinal absorption of botulinum toxins of different molecular sizes in rats. *Infect. Immun.* *17*, 491-496.
- Tacket, C.O., and Rogawski, M.A. (1989). Botulism. In: *Botulinum neurotoxin and Tetanus toxin*, ed. L.L. Simpson, San Diego: Academic Press, 351-378.

- Tavallaie, M., Chenal, A., Gillet, D., Pereira, Y., Manich, M., Gibert, M., Raffestin, S., Popoff, M.R., and Marvaud, J.C. (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.
- Uotsu, N., Nishikawa, A., Watanabe, T., Ohyama, T., Tonozuka, T., Sakano, Y., and Oguma, K. (2005). Cell internalization and traffic pathway of *Clostridium botulinum* type C neurotoxin in HT-29 cells. *Biochim Biophys Acta* 1763, 120-128.
- Verderio, C., Coco, S., Rossetto, O., Montecucco, C., and Matteoli, M. (1999). Internalization and proteolytic action of botulinum toxins in CNS neurons and astrocytes. *J Neurochem* 73, 372-379.
- Verderio, C., Grumelli, C., Raiteri, L., Coco, S., Paluzzi, S., Caccin, P., Rossetto, O., Bonanno, G., Montecucco, C., and Matteoli, M. (2007). Traffic of botulinum toxins A and E in excitatory and inhibitory neurons. *Traffic* 8, 142-153.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** Effect on muscle contraction of BoNT/A injected in the lumen of ligatured ileal segments. (A) BoNT/A was injected into the lumen of a ligatured ileal loop and longitudinal muscle contractions were recorded. The frequency of spontaneous contractions remained stable or increased a little in the control tissue whereas a progressive fall in contraction frequency was observed in intoxicated ileal loops. (B) Contraction pattern of longitudinal muscle changed from very regular oscillations at the beginning of intoxication to irregular contractions after more than one hour of exposure to BoNT/A. (C) Electrically evoked muscle contractions (arrow indicating electrical pulse) was noticeable at time zero but much reduced after 1 hour of intoxication and insignificant later. (D) Carbachol (20  $\mu$ m, arrow) was able to induce contraction of BoNT/A-treated ileal segment, indicating that ACh receptors were still functional.

**Figure 2.** Binding of BoNT/A Hc to frozen sections of the mouse upper small intestine. (A) Sections were overlaid with Alexa488-BoNT/A Hc and were counterstained with TRITC-Phalloidin. BoNT/A Hc staining was observed in intestinal crypts, small cells in intestinal villi beneath the enterocytes and filaments in the submucosa. (B) Counterstaining with TRITC-UEA1 and labeling of Paneth cells in intestinal crypts and small cells in intestinal villi. (C) Counterstaining with anti-neurofilament (NF) antibodies and co-labelling of neurofilaments in the submucosa with BoNT/A Hc (arrow head). (scale bar = 50  $\mu$ m).

**Figure 3.** Visualization of BoNT/A Hc in the mouse intestine following inoculation in the intestinal lumen. Detection of BoNT/A Hc in the lumen of intestinal crypts (arrow head) (A), inside intestinal crypt cells and neurofilament in the submucosa (B). Higher resolution of intestinal crypts showing that BoNT/A Hc stained only certain intestinal crypt cells. (D) Co-staining with anti-neurofilament antibodies in the submucosa 30 min after incubation with BoNT/A Hc which labeled only certain neurons stained with neurofilament antibodies. (E) BoNT/A Hc labeling of neurofilaments in the musculosa 90 min after 90 min incubation. (scale bar = 20  $\mu$ m).

**Figure 4.** Neuronal cell types recognized by BoNT/A Hc in the intestinal submucosa after inoculation in the intestinal lumen (30 min incubation). (A) Co-staining with ChAT. Some but not all ChAT immunoreactive neurons were labeled with BoNT/A-HC. Note that large cells stained with ChAT (glial cells) were not recognized by BoNT/A Hc. (B) Co-staining with anti-VIP antibodies showing no colocalisation with BoNT/A- HC. Co-staining with anti-glutamate (C) or anti-serotonin (D) antibodies. Only few neurons stained with anti-glutamate or anti-serotonin antibodies colocalized with BoNT/A Hc. (scale bar = 20  $\mu$ m).

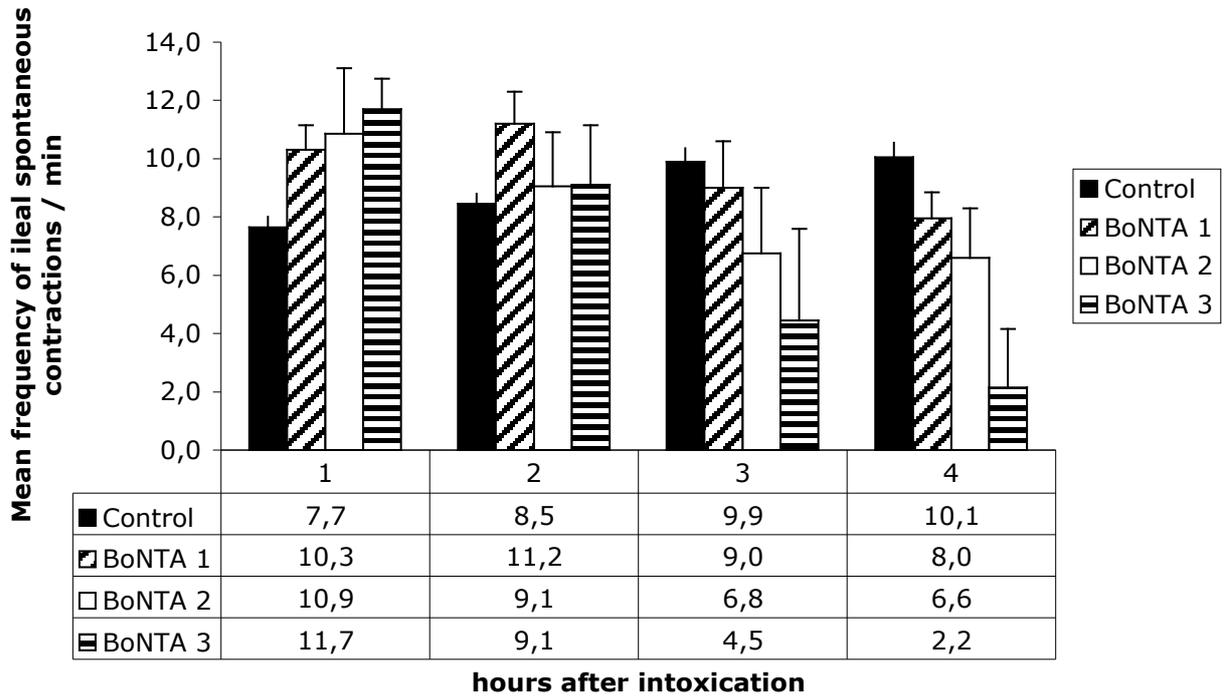
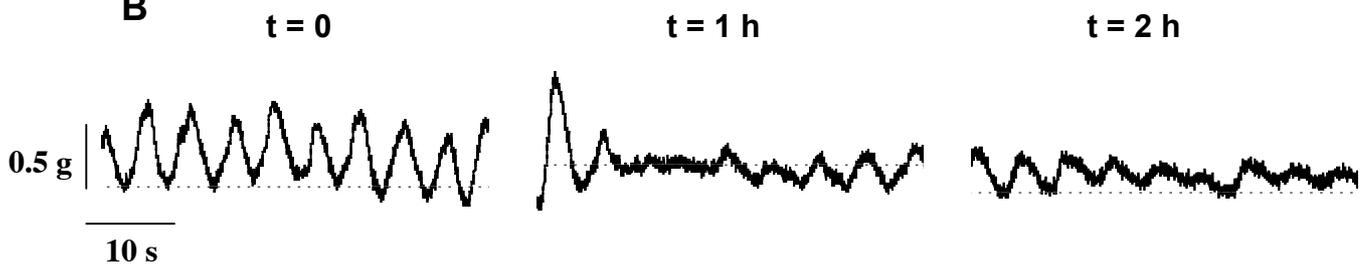
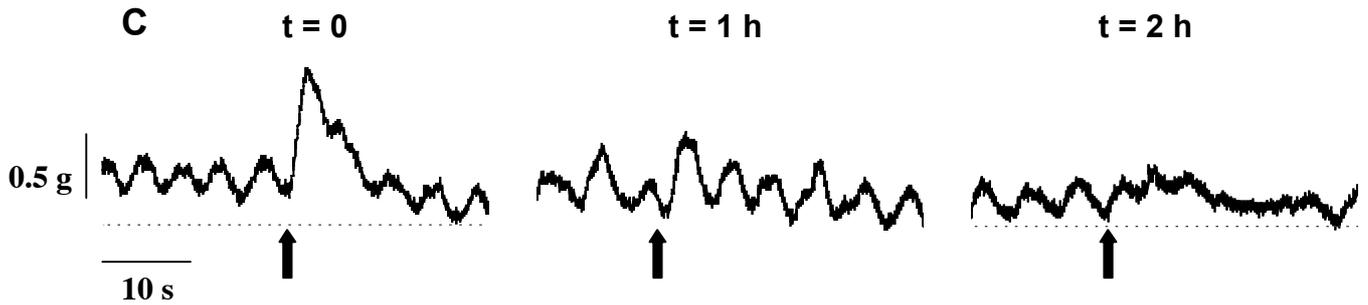
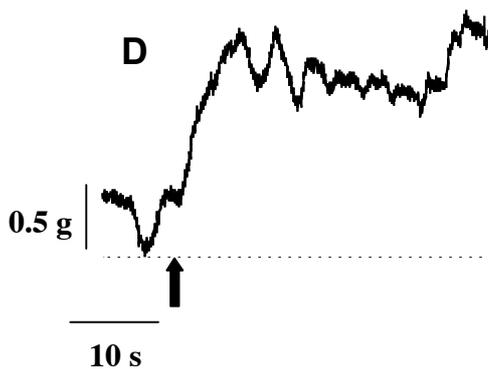
**Figure 5.** BoNT/A Hc labeled cholinergic neurons in the musculosa after 90 min exposure in the intestinal lumen. Co-staining with anti-ChAT and/or anti-neurofilament antibodies. Note that BoNT/A Hc preferentially stained neuronal cell extensions and to a lower extent cell bodies. (scale bar = 20  $\mu$ m).

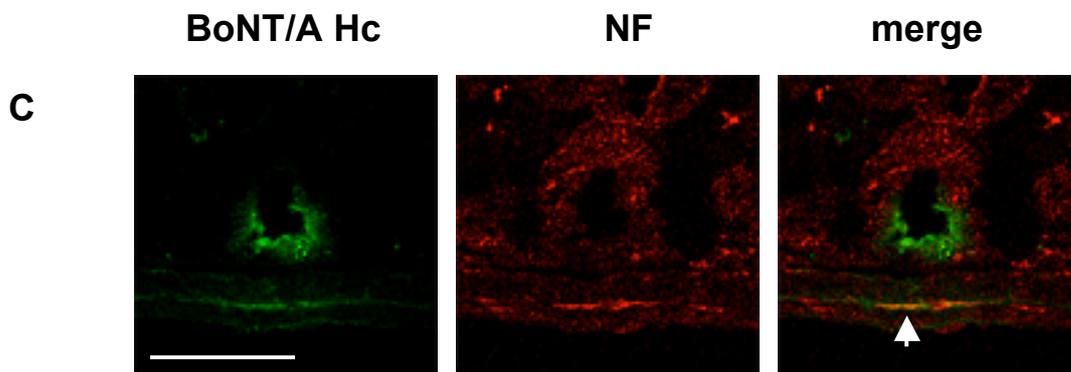
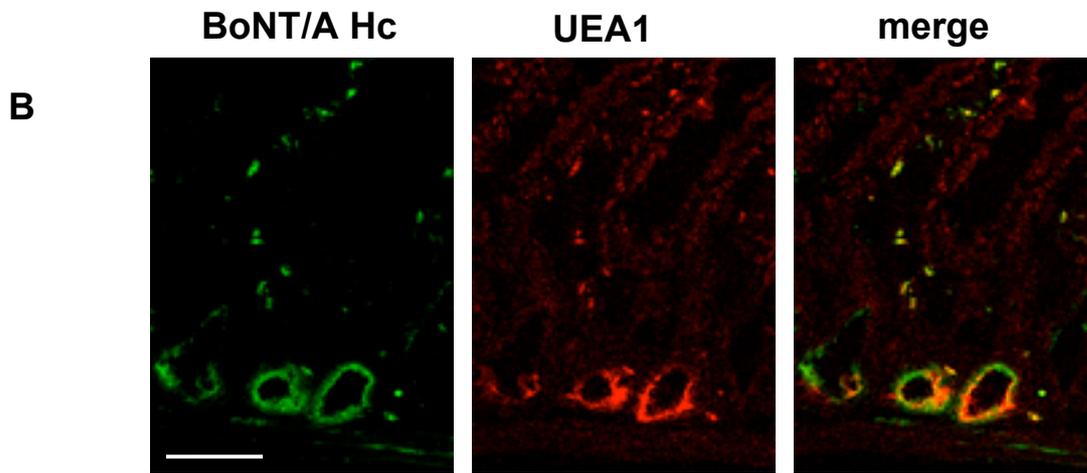
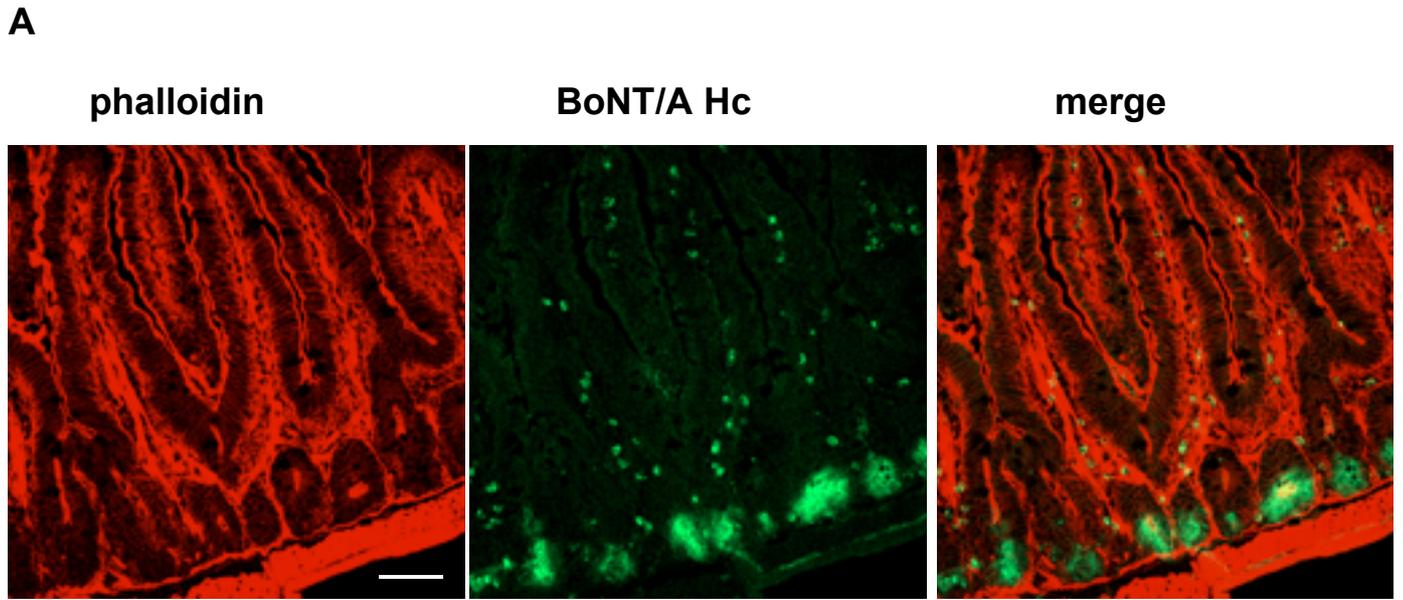
**Figure 6.** Neuronal cells bearing SV2 protein are targeted by BoNT/A Hc after 60 min exposure in the intestinal lumen. (A) anti-SV2C and anti-neurofilament antibodies stained neurons and thin neuronal extensions in the submucosa. BoNT/A Hc labeled only certain extremities of neuronal extensions. Note that some SV2C-immunoreactive large cells with thicker extensions were neither stained with anti-neurofilament antibodies nor with BoNT/A-Hc. (B) A network of thin cell extensions around microvessels were stained with anti-SV2C, and faintly with anti-neurofilament antibodies. (C) Thin neuronal extensions around the microvessels were not labeled with BoNT/A Hc. (D) Glial cells in the submucosa were stained with anti-GFAP and anti-SV2C but not BoNT/A Hc. (scale bar = 10  $\mu$ m).

**Figure 7.** Quantification of colocalization between BoNT/A Hc and neurotransmitter markers in mouse intestinal submucosa. Results are expressed as colocalization index for which 1 represent 100% of colocalization between BoNT/A Hc and a neuronal marker. Colocalization index represents the ratio of the number of BoNT/A Hc positive terminal endings colocalized with one neurotransmitter marker to the total number of terminal endings labeled with BoNT/A Hc. Results represent averages +/- standard deviations of accounts of at least 50 cells in three different experiments.

## Supplementary data

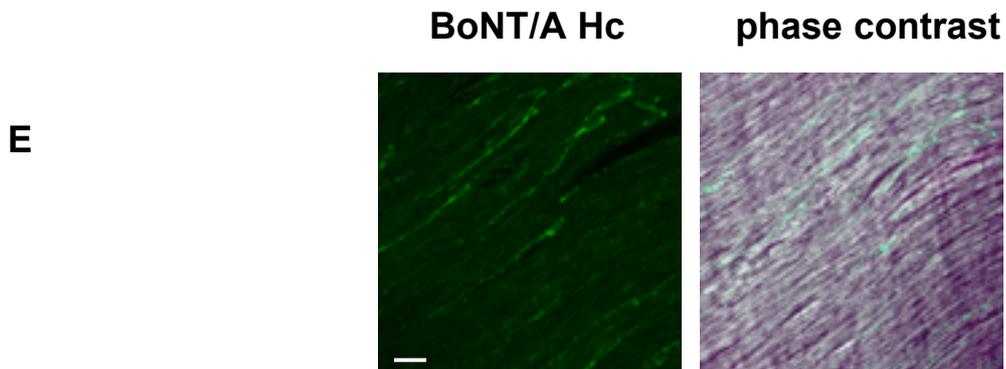
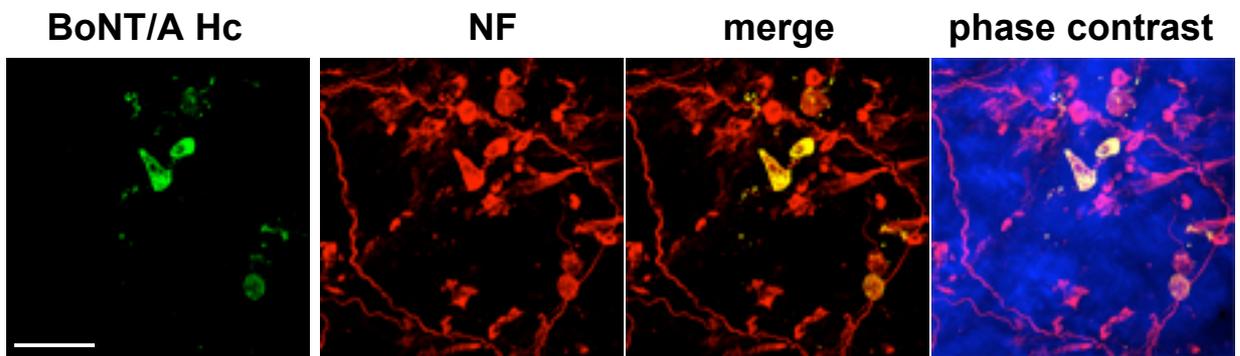
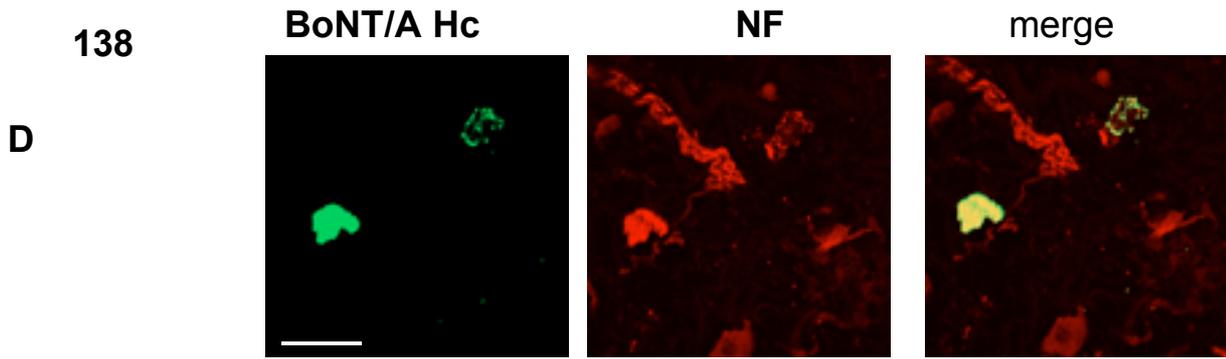
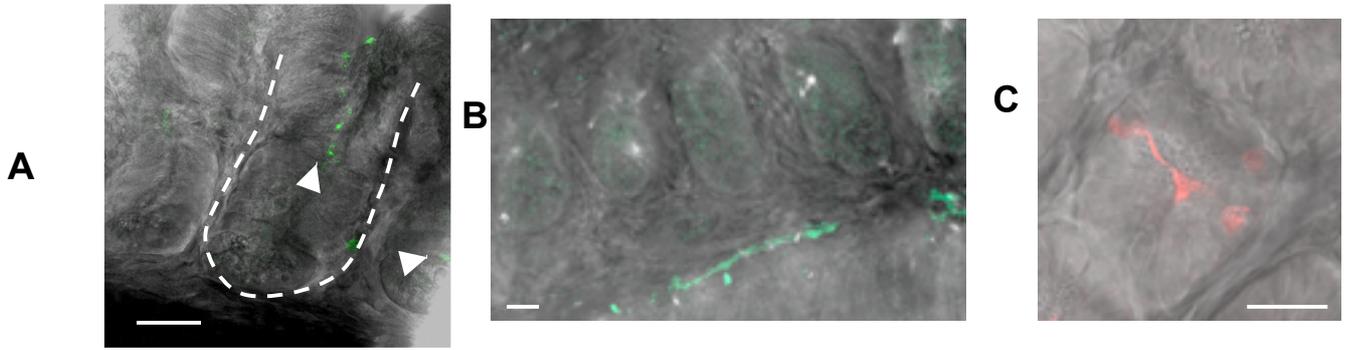
**Figure S1.** Visualization of BoNT/A after intraluminal injection into ligatured ileal segment and incubation for 3 h at RT by indirect detection with anti-BoNT/A Hc. (A) Colocalization of BoNT/A (green) and ChAT (red) in filaments weakly labeled with anti-neurofilament (blue) in the myenteric plexus. (B) Detection of BoNT/A (green) in the cell body of neurons (blue) in the submucous plexus. (C) Only a weak colocalization was observed between neurons (blue) containing BoNT/A (green) and SV2C labeling (red) in the submucous plexus. (scale bar = 20  $\mu\text{m}$ ).

**A****B****C****D****Figure 1**



**Figure 2**

**BoNT/A Hc and phase contrast**



**Figure 3**

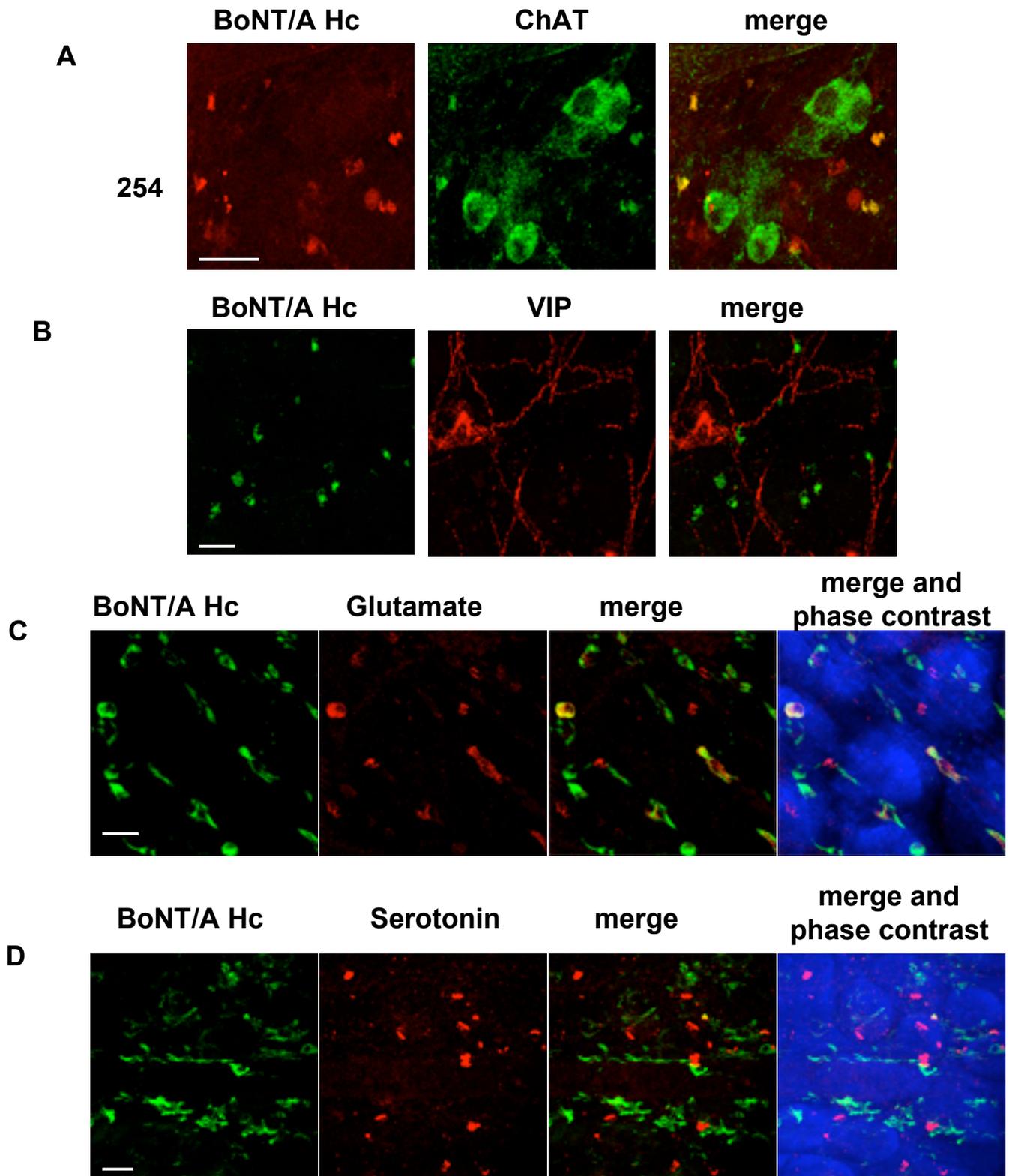
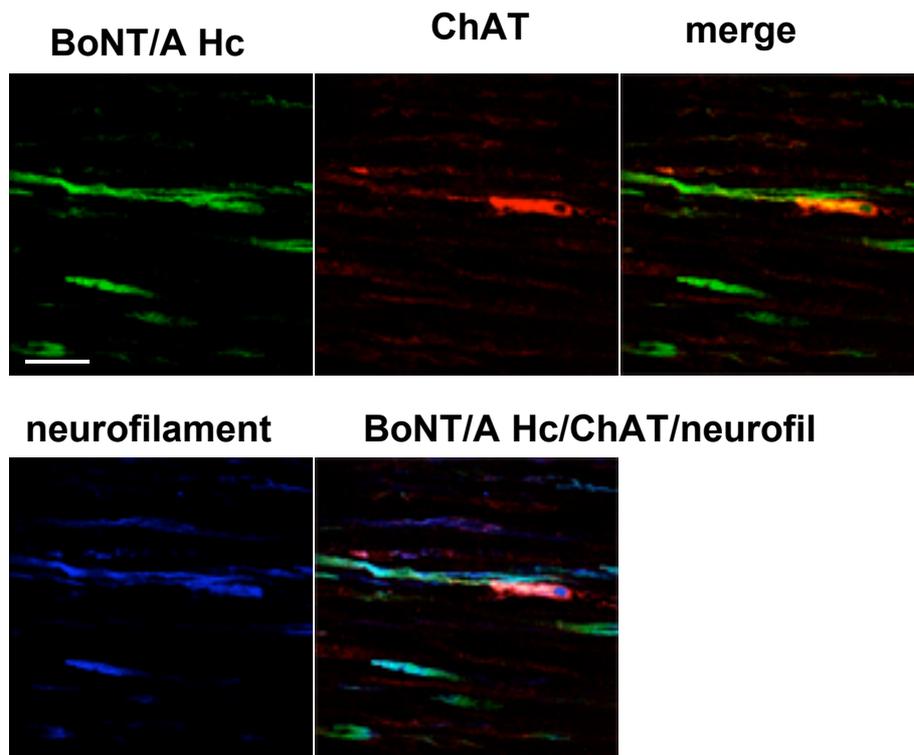


Figure 4

**Myenteric plexus**



**Figure 5**

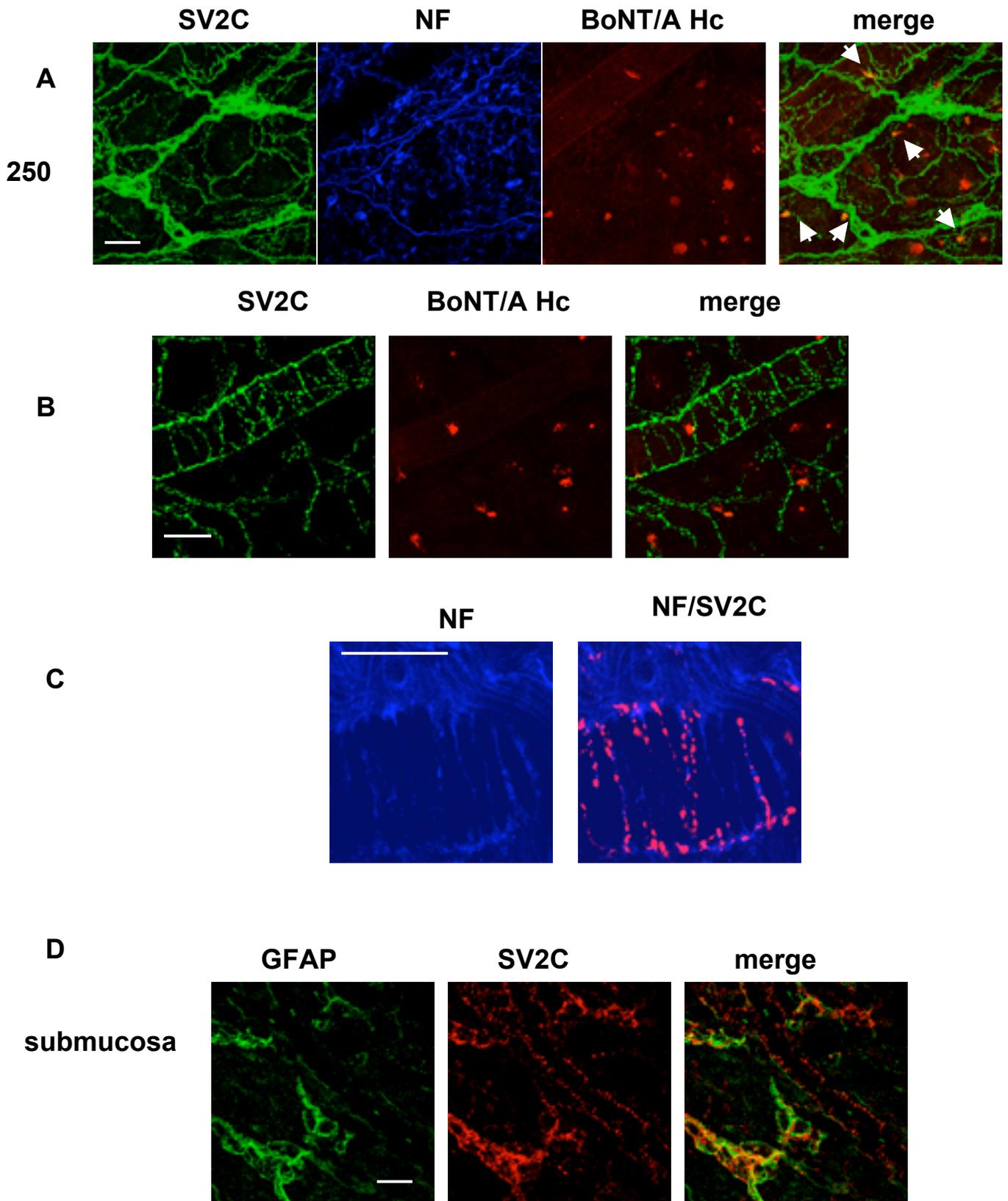
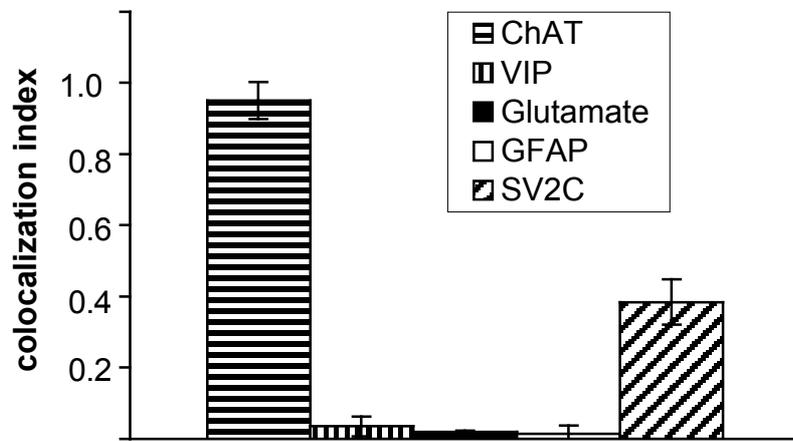
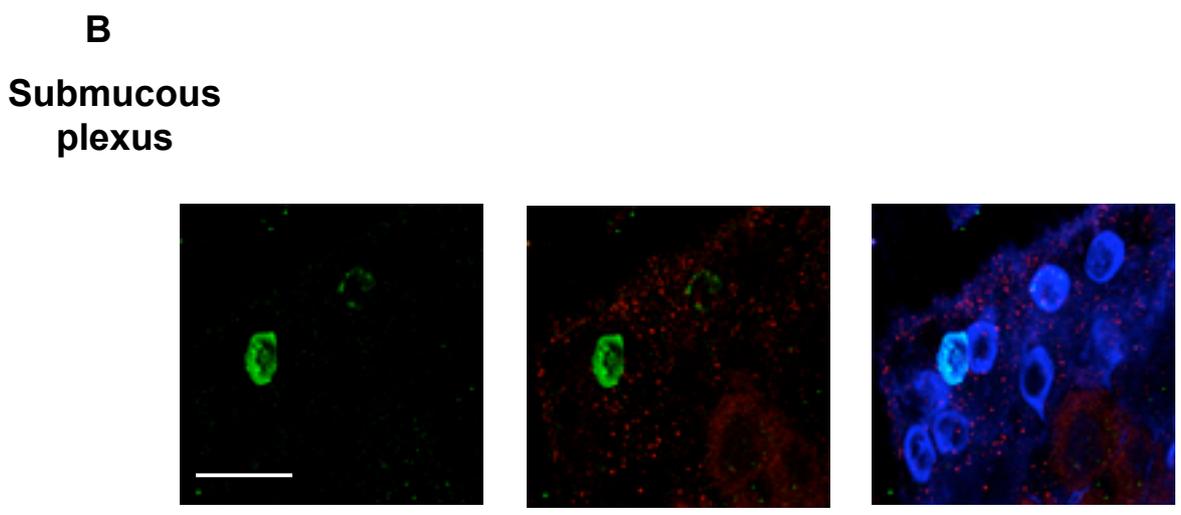
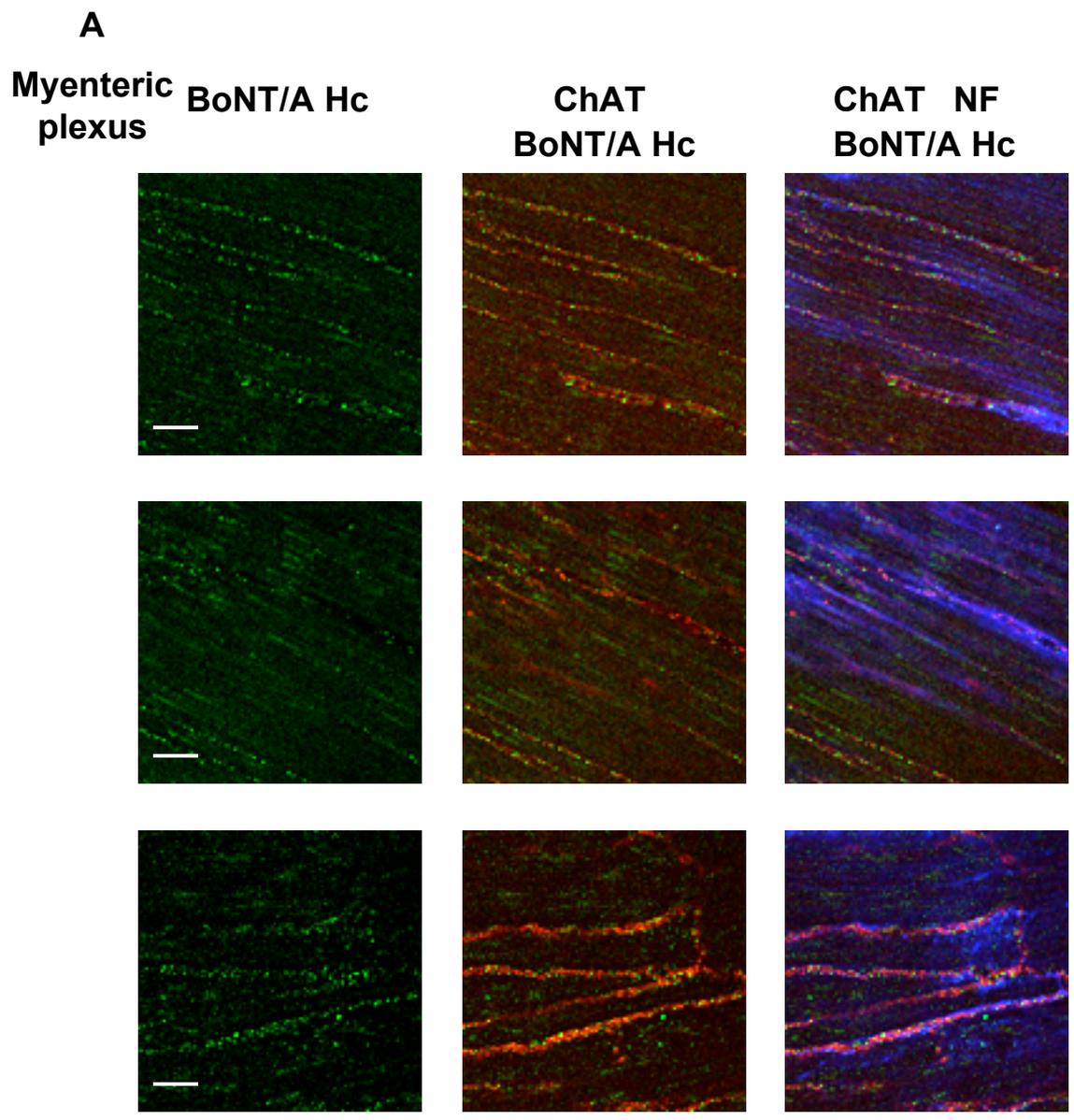


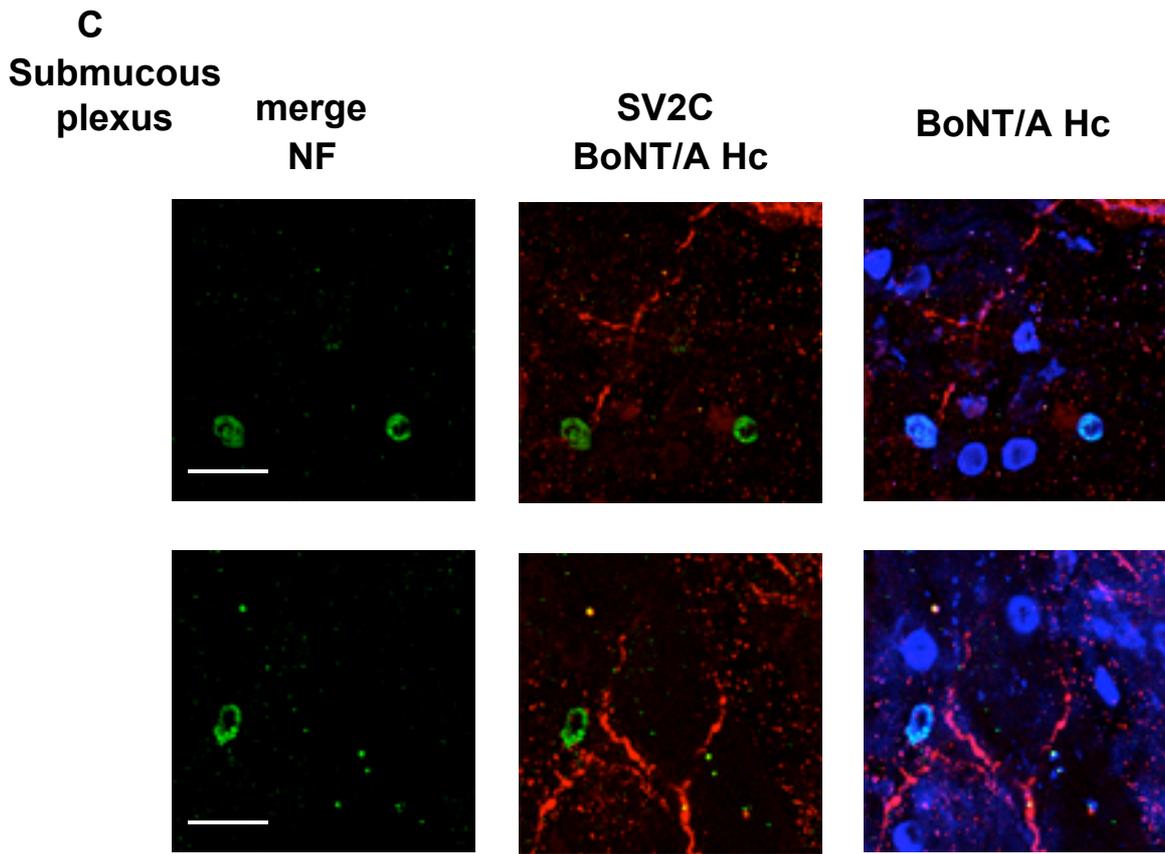
Figure 6



**Figure 7**



**Figure S1**



**Figure S1**

## **4.4 Article n°4 : La neurotoxine botulique A entre par des voies différentes dans les cellules neuronales et intestinales**

Article en préparation (Couesnon *et al.*).

### **4.4.1 Résumé**

Les neurotoxines botuliques (BoNTs) sont le plus souvent acquises à partir du tractus gastro-intestinal et cible spécifiquement les jonctions neuromusculaires où elles sont à l'origine d'une inhibition de la libération d'acétylcholine. Un mécanisme de transcytose a été mis en évidence dans les cellules intestinales qui internalisent BoNT/A au niveau apical et la libèrent du côté basolatéral dans la sous-muqueuse où elle pourrait diffuser vers les circulations sanguine et lymphatique. Par contre, les BoNTs entrent dans les motoneurones et suivent une voie intracellulaire permettant la translocation de la chaîne légère (L) dans le cytosol neuronal. Le domaine C-terminal de la chaîne lourde (H) de BoNT/A (Hc/A), impliqué dans la reconnaissance des récepteurs cellulaires, a été couplé à un fluorophore et utilisé pour suivre la liaison et les mécanismes d'entrée du Hc/A dans les cellules neuronales (NG108-15) et intestinales (Caco-2 et m-IC<sub>cl2</sub>). Les récepteurs au Hc/A, présents sur les deux types cellulaires, sont répartis dans des structures membranaires associés à des microdomaines enrichis en cholestérol, mais distincts des DRMs. Le Hc/A est internalisé dans des vésicules d'endocytose qui migrent progressivement de la membrane vers une région périnucléaire dans les NG108-15, ou qui sont plus dispersées dans les cellules intestinales. L'entrée dans les cellules neuronales et intestinales est dépendante de la dynamine et passe par le compartiment des endosomes précoces marqué par EEA1, puis diffère selon les types cellulaires. Dans les cellules neuronales, le Hc/A est internalisé majoritairement par un mécanisme dépendant de la clathrine, contrairement aux cellules intestinales où il suit une voie dépendante de Cdc42 et de l'intersectine.

### **4.4.2 Cinétique d'entrée de Hc/A dans les cellules neuronales (NG108-15) et dans les cellules intestinales (Caco-2 et m-IC<sub>cl2</sub>)**

Les cellules ont été incubées à 4°C en présence du Hc/A fluorescent avant d'être fixées, et la liaison a été observée en microscopie confocale. Pour l'étude de l'internalisation, les cellules intestinales ont été transférées à 37°C après incubation à 4°C puis fixées et observées. Par contre, une modification de la morphologie des NG108-15 étant observée lors du changement de température de 4 à 37°C, ces cellules ont été incubées 5 min à 37°C en présence de Hc/A, puis incubées dans le tampon seul à 37°C avant fixation. Les images obtenues ont mis en évidence un marquage de surface des cellules, des extensions dendritiques et du corps cellulaire des NG108-15, et des microvillosités apicales des cellules intestinales avec une intensité de fluorescence inférieure surtout pour les Caco-2 (cf. Fig. 1A). Après 5 min d'incubation à 37°C, des structures vésiculaires réparties dans le cytosol sous la membrane contenant le Hc/A ont été visualisées. A des temps plus tardifs, les vésicules contenant le Hc/A sont progressivement concentrées dans un compartiment périnucléaire dans les NG108-15, alors que dans les cellules intestinales les vésicules marquées sont réparties au-dessus du noyau puis entre le noyau et les faces latérales des cellules. La cinétique d'entrée est plus rapide dans les cellules NG108-15, que dans les cellules m-IC<sub>cl2</sub> et surtout Caco-2 qui ont une hauteur apico-basolatérale plus importante (cf. Fig. 1B).

#### 4.4.3 Caractéristiques de la liaison de Hc/A à la membrane cellulaire

La répartition hétérogène des lipides est à l'origine de l'organisation de la membrane plasmique cellulaire en microdomaines, enrichis en sphingolipides et en cholestérol. Afin de préciser la localisation membranaire de la liaison de BoNT/A aux récepteurs membranaires, la perflingolysine (PFO), qui reconnaît le cholestérol, fusionnée à la GFP (Green fluorescent protein) (PFO-GFP) a été utilisée comme sonde. Une colocalisation partielle entre la sonde PFO-GFP et le Hc/A fluorescent a été observée dans les cellules incubées à 4°C (cf. Fig. 2A). Après incubation à 37°C, le signal du Hc/A est majoritairement localisé dans des vésicules alors que la sonde PFO-GFP reste à la surface membranaire.

De plus, les expériences de compétition entre le Hc/A et PFO-GFP ont montré une inhibition de la liaison de Hc/A aux cellules neuronales et intestinales après incubation avec la sonde PFO-GFP et vice-versa (cf. Fig. 2B), suggérant une localisation des récepteurs de BoNT/A dans ou à proximité de microdomaines lipidiques.

Par ailleurs, l'effet d'une déplétion de la membrane par un traitement à la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine (M $\beta$ CD, 15 mM) sur la liaison du Hc/A fluorescent aux cellules a été quantifiée en cytométrie de flux. Une diminution de la liaison a été mesurée pour les cellules NG108-15 (40%), m-IC<sub>cl2</sub> (20%) et Caco-2 (50%), indiquant que les domaines comprenant les récepteurs de BoNT/A sont désorganisés directement ou indirectement par le traitement à la M $\beta$ CD (cf. Fig. 3A).

Cependant, un traitement des cellules avec une faible concentration en M $\beta$ CD (2 mM), qui suffit à inhiber l'endocytose par la voie GEEC (GPI-APs-enriched early endosomes compartment), n'a pas inhibé l'entrée du Hc/A dans les cellules intestinales (cf. Fig. 3B).

Après ultracentrifugation en gradient de saccharose des lysats cellulaires extraits à froid au triton X100, une minorité du Hc/A a été détectée dans les fractions insolubles des cellules NG108-15 ou Caco-2 (cf. Fig. 4).

Les GPI-APs, présents dans les radeaux lipidiques, constituent des récepteurs pour certaines toxines comme la neurotoxine tétanique TeNT. Un mutant inactif de la toxine alpha de *C. septicum*, qui se lie aux GPI-APs, fusionnée à la GFP, a été utilisé comme sonde des GPI-APs. Après incubation à 4°C, une faible colocalisation a été observée entre la toxine alpha-GFP et le Hc/A fluorescent sur les cellules neuronales et intestinales (cf. Fig. 5A). De même, l'expression d'une GPI-AP, DAF (Decay-accelerating factor), fusionnée à la GFP dans les cellules n'a pas mis en évidence de colocalisation entre le Hc/A et cette GPI-AP (cf. Fig. 5B).

#### 4.4.4 Voies d'entrée de Hc/A dans les cellules neuronales et intestinales

BoNT/A pourrait entrer par des voies différentes selon les types cellulaires et les conditions expérimentales.

La transferrine marquée par un fluorophore a été utilisée comme marqueur de la voie dépendante de clathrine. Après 5 min d'internalisation à 37°C, la colocalisation moyenne de la transferrine et du Hc/A a été estimée à 60% dans les NG108-15 (cf. Fig. 6A). L'entrée de la transferrine au niveau du pôle apical des cellules intestinales étant insuffisante, le marquage de la clathrine (chaîne lourde) a été utilisé pour quantifier la colocalisation avec le Hc/A, qui a été estimée à 15% et 10% dans les lignées m-IC<sub>cl2</sub> et Caco-2 respectivement (cf. Fig. 6B). L'implication de la clathrine dans l'entrée de Hc/A dans les NG108-15, mais pas dans les cellules intestinales, a été confirmée par l'inhibition de l'internalisation de Hc/A après la déstabilisation des puits couverts de clathrine par déplétion du K<sup>+</sup> (cf. Fig. 6C). Ceci montre

que le Hc/A entre en grande partie par une voie dépendante de la clathrine dans les cellules neuronales NG108-15, et dans une moindre mesure dans les cellules intestinales.

Les premières images de l'internalisation du Hc/A obtenues en microscopie électronique laissent supposer que les vésicules d'endocytose contenant le Hc/A sont couvertes d'un manteau, possiblement de clathrine, dans les NG108-15 (cf. Suppl. Fig. 3 à 6). Dans les m-IC<sub>cl2</sub>, peu de figures d'internalisation ont à ce jour été observées et on ne peut donc conclure sur le type de vésicules impliqué dans l'internalisation du Hc/A (cf. Suppl. Fig. 1 et 2).

De plus, dans les cellules NG108-15 et m-IC<sub>cl2</sub>, après 5 ou 10 min respectivement à 37°C, la moitié des vésicules contenant le Hc/A était immunoréactive pour le marqueur des endosomes précoces EEA1 (early endosomes antigen 1). Ceci indique que si le Hc/A est internalisé via des voies différentes dans les cellules neuronales et intestinales, il passe en partie par le compartiment des endosomes précoces de chaque type cellulaire.

#### ***4.4.4.1 Une voie d'entrée de Hc/A dans les cellules intestinales est dépendante de Cdc42***

Il a été montré que certaines Rho-GTPases sont d'importants régulateurs de diverses voies d'endocytose. L'influence de l'expression de mutants négatifs de certaines RhoGTPases, sur l'entrée de Hc/A dans les cellules a été testée.

L'expression du dominant négatif de Cdc42 (Cdc42 T17N), fusionné à la GFP, a inhibé l'internalisation de Hc/A dans les cellules intestinales, et a modifié la localisation des vésicules contenant le Hc dans les cellules NG108-15. (cf. Fig. 8).

L'expression du dominant négatif de Rac1 (Rac1 T17N), fusionné à la GFP, n'a pas eu d'effet significatif sur l'internalisation de Hc/A dans les cellules neuronales ou intestinales.

#### ***4.4.4.2 L'internalisation de Hc/A est dépendante de la dynamine***

La dynamine joue un rôle clé dans la fission des vésicules à partir de la membrane et est impliquée dans la voie dépendante de la clathrine et dans certaines voies indépendantes de la clathrine.

L'expression du dominant négatif de la dynamine 2 (Dyn2 K44A), fusionné à la GFP, a aboli l'entrée de Hc/A dans les cellules NG108-15 et les cellules intestinales Caco-2 et m-IC<sub>cl2</sub> (cf. Fig. 10), prouvant que la dynamine est impliquée dans l'internalisation de Hc/A dans les cellules neuronales et intestinales.

L'intersectine est une protéine contenant un domaine de type SH3 interagissant avec la dynamine et d'autres protéines impliquées dans l'endocytose dépendante de la clathrine. La surexpression du domaine SH3 fusionné à la GFP a bloqué partiellement l'entrée de Hc/A et a modifié la répartition des vésicules dans les cellules NG108-15, et a inhibé l'entrée dans les cellules intestinales (cf. Fig. 11).

*L'entrée du domaine Hc de BoNT/A (Hc/A) fluorescent a été caractérisée dans les cellules neuronales NG108-15 et intestinales Caco-2 et m-IC<sub>cl2</sub>. Les récepteurs du Hc/A sont localisés dans des structures membranaires associés à des microdomaines enrichis en cholestérol mais différents des DRMs. Le Hc/A est internalisé dans des vésicules qui migrent soit rapidement vers une région périnucléaire dans les NG108-15, soit plus lentement dans le cytosol autour du noyau des cellules intestinales vers le pôle basolatéral. La voie d'endocytose de Hc/A est principalement dépendante de la clathrine dans les cellules NG108-15, alors qu'elle est dépendante de Cdc42 et de l'intersectine dans les cellules intestinales Caco-2 et m-IC<sub>cl2</sub>. Les deux mécanismes d'entrée font aussi intervenir la dynamine.*



# **DIFFERENTIAL ENTRY OF BOTULINUM NEUROTOXIN A INTO NEURONAL AND INTESTINAL CELLS**

Aurélie COUESNON, Takeshi SHIMIZU, Michel R. POPOFF

Unité des Bactéries anaérobies et Toxines, Institut Pasteur, 28 rue du Dr Roux, 75724 Paris  
cedex France

Key words : *Clostridium botulinum*, neurotoxin, endocytosis, intestinal cell, neuronal cell,  
ganglioside, synaptic vesicle protein

## SUMMARY

Botulinum neurotoxins (BoNTs) are most often acquired from the digestive tract and specifically target neuromuscular junctions where they cause an inhibition of acetylcholine release. A transcytotic mechanism has been evidenced in epithelial intestinal cells which delivers whole BoNTs into the intestinal submucosa and then to lymph and blood circulation, whereas BoNTs enter into motor neurons through an intracellular pathway which permits the translocation of light chain into the cytosol. We used fluorescent BoNT/A C-terminal part of H chain (Hc) which mediates toxin binding to cell receptors, to monitor the entry process into NG108-15 neuronal cells as well as into Caco-2 and m-IC<sub>cl2</sub> intestinal cells. BoNT/A Hc receptors were found to be distributed in membrane structures closely associated to cholesterol-enriched microdomains but distinct from detergent-resistant microdomains in both cell types. BoNT/A Hc was trapped into endocytic vesicles, which progressively migrated to a perinuclear area in NG108-15 cells, and were distributed in a more scattered manner in intestinal cells. In both cell types, BoNT/A Hc entered through a dynamin-dependent pathway, reached an early endosomal compartment labeled with EEA1, then it was sorted into distinct routes according to cell type. In neuronal cells, BoNT/A Hc entered mainly via a clathrin-dependent pathway in contrast to intestinal cells where it followed a Cdc42- and intersectin-dependent pathway.

## INTRODUCTION

Botulinum neurotoxins (BoNTs) are responsible for a severe nervous disease (botulism) characterized by a flaccid paralysis and respiratory arrest, in man and animals, by inhibiting the release of acetylcholine at peripheral cholinergic nerve terminals. BoNTs are synthesized 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. BoNTs and tetanus toxin (TeNT), which are structurally related, exhibit an A-B toxin organization, with a binding domain and an intracellular active domain (L chain). The half C-terminal domain of H chain (Hc) is involved in binding to specific receptor on target neuronal cells, whereas the N-terminal part of H chain permits the translocation of the L chain into the cytosol. L chain catalyzes a zinc-dependent proteolysis of one of 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 and then efficiently blocks the evoked release of acetylcholine (Poulain *et al.*, 2006; Humeau *et al.*, 2000; Schiavo *et al.*, 2000; Herreros *et al.*, 1999).

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 neurotoxin *in situ* (Tacket and Rogawski, 1989). In either case, BoNT escapes the gastro-intestinal tract to reach the target cholinergic nerve endings, possibly through the blood and lymph circulation (Maksymowych *et al.*, 1999). Penetration of BoNT through an epithelial cell barrier and its subsequent migration to cholinergic nerve endings are the essential first steps of botulinum intoxication. In *in vitro* model, BoNTs have been found to bind to polarized epithelial cells and to undergo a receptor-mediated endocytosis and transcytosis from apical to basolateral sides (Couesnon *et al.*, 2007; Maksymowych and Simpson, 2004; Nishikawa *et al.*, 2004; Park and Simpson, 2003; Maksymowych and Simpson, 1998; Fujinaga *et al.*, 1997). BoNTs and TeNT recognize specific receptors on motorneuron endings forming the neuromuscular junctions. The highly specific binding of BoNTs and TeNT to the target nerve endings involves gangliosides of GD<sub>1b</sub> and GT<sub>1b</sub> series as well as protein receptors that localize at the neuronal plasma membrane (Montecucco *et al.*, 2004; Rummel *et al.*, 2004a; Kitamura *et al.*, 1999; Kozaki *et al.*, 1998a; Nishiki *et al.*, 1996). The protein receptor on neuronal cells has been identified as synaptic vesicle proteins such as synaptotagmin I and II for both BoNT/B and BoNT/G, and SV2 (isoforms A, B and C) for BoNT/A (Dong *et al.*, 2006; Mahrhold *et al.*, 2006; Rummel *et al.*, 2004b; Dong *et al.*, 2003; Nishiki *et al.*, 1996; Nishiki *et al.*, 1994). In contrast to BoNTs, TeNT Hc contains two ganglioside binding sites (Rummel *et al.*, 2004a; Rummel *et al.*, 2003), but the protein part of its receptor has not yet been clearly identified. TeNT binds to one or more glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins which are enriched in microdomains or lipid rafts (Herreros *et al.*, 2001; Munro *et al.*, 2001; Herreros *et al.*, 2000a). However, BoNTs remain at the neuromuscular junctions where they block the release of acetylcholine, whereas TeNT undergoes a retrograde transport along axon until motorneuron cell body in the central nervous system, it is released into the extracellular medium, and then enters inhibitory interneurons where it inhibits neurotransmitter secretion (Lalli *et al.*, 2003). Clostridial neurotoxin likely use different intracellular trafficking in cells supporting transcytosis of the whole toxin and in target neuronal cells where L chain is released into the cytosol permitting its subsequent intracellular activity. Thereby, passage through an acidic endosomal compartment is required for the translocation of L chain into the cytosol of target cells,

whereas TeNT retrograde transport is supported by neutral pH organelles (rev in (Bohnert *et al.*, 2006; Bohnert and Schiavo, 2005). TeNT Hc which binds to specific receptors, undergoes similar intracellular trafficking than the whole toxin molecule. Thus, the non-toxic Hc fragments of clostridial neurotoxins represent useful tools to dissect endocytic pathways.

Several pathways of endocytosis have been described, including the clathrin-mediated internalization, which is the best characterized, and also caveolin-dependent as well as clathrin- and caveolin-independent internalizations (Mayor and Pagano, 2007; Lamaze and Johannes, 2006). More recently, a Cdc42-dependent and clathrin-independent pinocytic pathway has been identified for the delivery of GPI-anchored proteins to recycling endosomes through a distinct compartment termed the GPI-anchored protein enriched early endosomal compartment (GEEC) (Sharma *et al.*, 2004; Sabharanjak *et al.*, 2002). VacA, a cytotoxin produced by *Helicobacter pylori*, is the first toxin described to enter through GEEC (Gauthier *et al.*, 2005). However, BoNT endocytic pathway has not yet been clearly defined. In neuronal cells, BoNT/A and E seem to mainly use the synaptic vesicle recycling (Verderio *et al.*, 2007). But, different endocytic pathways have been described for BoNT entry into intestinal cells. It has been reported that BoNT/A is transported from apical to basolateral surface of T84 cells in a clathrin-dependent manner and with a migration pathway close to the cell periphery (Ahsan *et al.*, 2005; Maksymowych and Simpson, 2004), whereas the whole progenitor type C neurotoxin enters HT-29 cells via both clathrin-coated pits and caveolae and migrates through the Golgi apparatus (Uotsu *et al.*, 2005).

In this study, we used fluorescent BoNT/A Hc to monitor toxin entry into neuronal and intestinal cells. We show that BoNT/A Hc preferentially enters NG108-15 neuronal cells through a clathrin-dependent pathway, whereas it uses a clathrin-independent, Cdc42- and intersectin-dependent route to enter Caco-2 and m-IC<sub>c12</sub> intestinal cells. BoNT/A Hc internalization into both cell types is dynamin-dependent .

## RESULTS

### *Kinetics of BoNT/A Hc entry into neuronal (NG108-15) and intestinal cells (Caco-2, m-IC<sub>c12</sub>)*

Cells were first incubated with fluorescent BoNT/A Hc at 4°C for 30 min and washed. As previously described (Verderio *et al.*, 2007), BoNT/A Hc decorated the periphery and cell extensions of NG108-15. Since temperature shift from 4°C to 37°C perturbs morphology of the neuronal cells NG108-15, the entry of BoNT/A Hc into cells was monitored by incubating cells for 5 min at 37°C with the fluorescent Hc probe, then washing and incubation at 37°C for various time periods. At 5 min incubation, BoNT/A Hc was observed at the membrane

and in endocytic organelles near the membrane periphery. After prolonged incubation at 37°C (10 and 20 min), BoNT/A Hc was preferentially localized in intracellular compartments in a more central position around the nucleus (Fig.1 A).

Caco-2 cells are an intestinal cell model which has been used to analyze the BoNT/A transcytosis (Maksymowych and Simpson, 2004; Maksymowych and Simpson, 1998). We have found that the mouse intestinal crypt cell line, m-IC<sub>cl2</sub>, transports more efficiently BoNT/A than the colon carcinoma Caco-2 and T84 cells (Coesnon *et al.*, 2007). Entry of fluorescent BoNT/A Hc was investigated in Caco-2 and m-IC<sub>cl2</sub> cells. After incubation at 4°C, BoNT/A Hc binding was mainly observed on the apical surface of polarized Caco-2 or m-IC<sub>cl2</sub> cells, but in a much lower intensity than on neuronal cells. As previously reported (Coesnon *et al.*, 2007), the binding of BoNT/A Hc was slightly more intense on m-IC<sub>cl2</sub> than on Caco-2 cells (Fig. 1A). After further incubation at 37°C, vesicular structures scattered through the cytosol were labeled with BoNT/A Hc. In contrast to neuronal cells, no preferential distribution of vesicles containing BoNT/A Hc was observed in the perinuclear region. In addition, the internalization kinetics was much slower in intestinal cell lines than in the neuronal cell line NG108-15, especially in Caco-2 cells which have a higher apico-basolateral distance than m-IC<sub>cl2</sub>. A progressive passage of BoNT/A Hc from the apical to basolateral side of Caco-2 cells was visualized within 60 min (Fig. 1B). This suggests a differential dynamics of BoNT/A Hc internalization in target neuronal cells and intestinal cells.

#### *Localization of BoNT/A Hc receptors on the cell membrane*

Gangliosides of the of GD<sub>1b</sub> and GT<sub>1b</sub> series have been determined as a receptor for BoNT/A, however the precise localization of BoNT/A receptor on cell membrane is not yet well understood. 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 and Rao, 2004). We used the C-terminal domain of *Clostridium perfringens* Perfringolysin (PFO), an extensively characterized cholesterol-binding cytolysin, (Ramachandran *et al.*, 2002), fused to GFP (GFP-PFO) as a fluorescent probe in colocalization with BoNT/A Hc. In NG108-15 cells incubated at 4°C, only a partial colocalization was observed between BoNT/A and Hc and PFO-GFP at the cell surface (Fig. 2A). After incubation at 37°C, a lower level of colocalization was observed. BoNT/A Hc was mainly found in intracellular vesicles, whereas PFO labeling was preferentially localized at the cell surface. Caco-2 and mIC<sub>cl2</sub> cells incubated at 4°C also showed a low level of colocalization between BoNT/A Hc and PFO-GFP (Fig. 2B and C).

To further analyze the distribution of BoNT/A Hc receptor in lipid microdomains, we performed a competition between PFO and BoNT/A Hc for binding to cell surface. Cells were first incubated with fluorescent PFO at 4°C for 5 min and then fluorescent BoNT/A Hc was added and incubation was prolonged for additional 20 min. In the reverse experiment, cells were incubated with BoNT/A Hc for 5 min and then for additional 20 min after addition of fluorescent PFO probe. When NG108-15 cells were first incubated with BoNT/A Hc, binding of PFO probe was significantly reduced compared to cells only incubated with PFO (Fig. 2D). But, cells incubated first with PFO probe, showed no BoNT/A Hc binding. The same results were obtained with Caco-2 cells (data not shown). This strongly suggests that either BoNT/A receptor is located on lipid microdomains enriched in cholesterol or PFO binding to cholesterol induces rearrangement of lipid microdomains and inhibits an efficient binding of BoNT/A Hc to its receptor (and vice versa).

In addition, BoNT/A Hc binding to cells was also monitored by FACS. BoNT/A Hc showed a strong binding to neuronal cells NG108-15, and associated with mIC<sub>cl2</sub> or Caco-2 cells to a lower extent (Couesnon *et al.*, 2007). Depletion of plasma membrane cholesterol by a high concentration of M $\beta$ CD (15 mM) only partially prevented BoNT/A Hc binding to NG108-15 as well as to intestinal m-IC<sub>cl2</sub>, by 40 and 20%, respectively. This decrease was more pronounced (50%) with Caco-2 cells. As control, PFO binding was more significantly inhibited (70 to 80%) in cells treated with M $\beta$ CD (Fig. 3A). These findings indicate that BoNT/A receptors are not strictly localized in lipid rafts, but are possibly localized in adjacent domains which may be non-specifically and partially disorganized by M $\beta$ CD treatment. The greater effect of M $\beta$ CD on BoNT/A Hc binding to Caco-2 cells may reflect a slightly different localization of BoNT/A receptors according to cell types or a different composition of lipid rafts in cell lines..

M $\beta$ CD at low concentration (2 mM) was found to inhibit endocytosis via GPI-anchored protein enriched early endosomal compartment (GEEC) pathway (see discussion) (Chadda *et al.*, 2007). As shown in Fig. 3B, M $\beta$ CD at 2 mM did not block the entry of BoNT/A Hc into Caco-2 or m-IC<sub>cl2</sub> cells.

Next, we investigated the association of BoNT/A Hc with lipid rafts using cell treatment with Triton X100 at 4°C, and gradient centrifugation. BoNT/A Hc was recovered in the soluble fractions of both NG108-15 and Caco-2 cells. Only a minor part was detected in the low density fractions containing detergent-insoluble components, as monitored by the cholera toxin subunit B (Fig. 4). This supports that BoNT/A Hc receptors are not or only

partially localized in detergent-resistant microdomains (DRMs) on NG108-15 and Caco-2 cell membrane.

Lipid rafts also contain glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins (GPI-APs), which are receptors for various toxins including TeNT (Mayor and Riezman, 2004; Herreros *et al.*, 2001; Munro *et al.*, 2001). We used an inactive mutant molecule of *C. septicum* alpha toxin which binds to GPI-APs receptor (Gordon *et al.*, 1999) fused to GFP (GFP-alpha toxin) as a marker of cell membrane GPI-APs. A low level of colocalization was observed between BoNT/A Hc and alpha toxin-GFP in NG108-15 and m-IC<sub>cl2</sub> cells (colocalization index 16 to 18%), and to a lower extent in Caco-2 cells (colocalization index 4%) incubated at 4°C (Fig. 5A). We also expressed in NG108-15 the GPI-AP, decay-accelerating factor (DAF), fused to GFP (DAF-GFP). No significant colocalization was observed between BoNT/A Hc incubated 5 min at 37°C with NG108-15 cells transfected with a plasmid encoding DAF-GFP (Fig. 5B).

#### *BoNT/A Hc entry pathway into NG108-15 and intestinal cells*

It has been reported that BoNT/A enters hippocampal neurons through synaptic vesicle recycling probably mediated by binding to SV2 receptor (Verderio *et al.*, 2007; Dong *et al.*, 2006). However, BoNT/A possibly uses a different entry pathway. Indeed, BoNT/A was also partially detected in endosomes containing transferrin receptor (Verderio *et al.*, 2007), and BoNT/C was found to enter both clathrin and caveolae pathway in HT29 cells (Uotsu *et al.*, 2005). Fluorescent BoNT/A Hc was observed in majority of vesicles containing transferrin (colocalization index 60%) in NG108-15. Since entry of transferrin into intestinal cells on the apical side could not be visualized (transferrin receptors are localized on the basolateral membrane), we used labeling of clathrin heavy chain. A low level of association of BoNT/A Hc with vesicles containing clathrin heavy chain (colocalization index 15% and 10% respectively) was evidence in m-IC<sub>cl2</sub> and Caco-2 (Fig. 6B). This suggests that BoNT/A Hc used preferentially a clathrin-dependent pathway in NG108-15 cells, and a non-clathrin entry into intestinal cells. Endocytosis of BoNT/A Hc into clathrin vesicles in NG108-15 is further supported by potassium depletion experiments. Potassium depletion followed by hypotonic shock was found to disrupt the formation of clathrin-coated vesicles and inhibit clathrin-mediated endocytosis (Carpentier *et al.*, 1989). BoNT/A Hc as well as transferrin were significantly inhibited in NG108-15 cells exposed to potassium depleted buffer and then to hypotonic shock. Fluorescent BoNT/A Hc or transferrin were significantly accumulated at the periphery of cells treated for potassium depletion and labeling of intracellular vesicles was

lower compared to control cells whereas the effect was much reduced in m-IC<sub>cl2</sub> and Caco-2 (Fig. 6C).

In NG108-15 and m-IC<sub>cl2</sub> cells, BoNT/A Hc was found in vesicles containing the Rab5 effector EEA1 (early endosome antigen 1) after incubation at 37°C for 5 and 10 min respectively (colocalization index 50%) (Fig. 7). After 15 min incubation of NG108-15 with BoNT/A Hc, colocalization with EEA1 was decreased, and vesicles labeled by both BoNT/A Hc and EEA1 localized in a more cell central area. This indicates that BoNT/A Hc entered early endosomes from a clathrin-dependent or clathrin-independent pathway in neuronal and intestinal cells, respectively.

#### *BoNT/A Hc enters intestinal cells through a Cdc42-dependent mechanism*

Rho-GTPases have been shown to be important regulators in various endocytic pathways (Etienne-Manneville and Hall, 2002). Notably, Cdc42 was found to control endocytosis of GPI-anchored proteins, phase fluid marker, and VacA toxin (Gauthier *et al.*, 2005; Sabharanjak *et al.*, 2002). We investigated Rho-GTPases in the internalization of BoNT/A Hc into cells. Transfection of dominant negative mutant Cdc42 N17 fused to GFP into Caco-2 or m-IC<sub>cl2</sub> cells efficiently inhibited the entry of BoNT/A Hc (Fig. 8A). No or few endocytic vesicles containing fluorescent BoNT/A Hc were observed in transfected cells versus untransfected cells. In some transfected cells, BoNT/A Hc was only localized at the cell periphery. This indicates that inhibition of Cdc42 did not affect the binding of BoNT/A Hc to cell surface. In contrast in NG108-15 cells transfected with Cdc42 N17, no significant or only a partial inhibition of BoNT/A Hc entry was observed. However, the distribution of endocytic vesicles containing BoNT/A Hc was slightly different in transfected cells compared with non-transfected cells. Endocytic vesicles labeled with BoNT/A Hc were preferentially localized close to the plasma membrane in transfected cells. This possibly resulted from a delay in the migration of endocytic vesicles due to actin cytoskeleton modification induced by dominant negative Cdc42. As control, transfection of Cdc42 wt in Caco-2 or mIC<sub>cl2</sub> cells did not impair the entry of BoNT/A Hc into endocytic vesicles (Fig. 8B). We next tested whether expression of the dominant-negative form of Rac1 (RacT17N) might inhibit BoNT/A Hc internalization. As shown in Fig. 9, transfection of NG108-15, m-IC<sub>cl2</sub> or Caco-2 with the dominant-negative form of Rac1 did not significantly impair the fluorescent pattern of BoNT/A Hc entry into endosomes.

### *BoNT/A Hc is internalized via a dynamin-dependent pathway*

The role of GTPase dynamin in trafficking was first described in clathrin-mediated endocytosis by showing that overexpression of a dominant-negative form (K44A mutation), unable to hydrolyze GTP, led to an accumulation of undetached coated pits at the plasma membrane (Damke *et al.*, 1994). Dynamin has a key role in fission of endocytic vesicles from the plasma membrane and it is involved in clathrin-dependent and some clathrin-independent pathways (Mayor and Pagano, 2007; Takei *et al.*, 2005; McNiven *et al.*, 2000; Schmid *et al.*, 1998). We examined the effects of the K44A variant of dynamin-2 on BoNT/A Hc internalization in NG108-15, Caco-2 and m-IC<sub>cl2</sub> cells. Expression of the dominant-negative form of dynamin 2 (Dyn2 K44A) fused to GFP induced a significant inhibition of BoNT/A Hc into NG108-15, Caco-2 and m-IC<sub>cl2</sub> cells (Fig. 10). In addition, transferrin endocytosis was efficiently blocked in NG108-15 transfected with Dyn2 K44A ( Fig. 10, and data not shown). This indicates that dynamin is involved in BoNT/A Hc endocytosis in neuronal and intestinal cells.

Intersectin is a protein containing a SH3 domain that interacts with dynamin and other proteins involved in clathrin-dependent endocytosis. Overexpression of the intersectin SH3A domain efficiently blocks vesicle construction at the plasma membrane, an early event in forming clathrin-coated pits (Simpson *et al.*, 1999). Overexpression of the intersectin SH3A domain in NG108-15 only partially blocked the internalization of BoNT/A Hc, whereas a stronger inhibition of BoNT/A Hc entry was observed in transfected Caco-2 or m-IC<sub>cl2</sub> cells (Fig. 11).

## **DISCUSSION**

BoNT/A is the most potent toxin known, and therefore it is considered as a potential biowarfare agent (Smith, 2006). But, BoNT/A is largely used for treatment of various affections characterized by cholinergic hyperfunction. Enzymatic activity of BoNT/A in neuronal cells leading to the neurotransmitter release has been intensively studied, whereas the internalization process of BoNT into cells is still poorly understood. In the natural disease, BoNTs transit through the digestive tract and pass across the intestinal epithelial cell barrier probably by a transcytotic mechanism (Couesnon *et al.*, 2007; Maksymowych and Simpson, 2004; Maksymowych and Simpson, 1998). BoNT might also partly pass via the paracellular route, since hemagglutinins (HAs) associated to BoNTs have been found to perturb tight and adherens intercellular junctions in intestinal cell monolayers (Matsumura *et al.*, 2007). Then,

BoNTs disseminate by blood and lymph circulation and gain access to the motor nerve endings.

In the target motor neurons, BoNT/A enters by an endocytic mechanism and delivers the L chain into the cytosol where it proteolytically cleaves SNAP25 and thus inhibits the acetylcholine release. Acidification of endocytic vesicles is a critical step which is required for BoNT/A intoxication of neuronal cells (Keller *et al.*, 2004; Matteoli *et al.*, 1996; Simpson *et al.*, 1994). Low pH is assumed to induce a conformational change of H and L chains permitting the insertion and pore formation of the H chain into the vesicle membrane and the translocation of the L chain into the cytosol (Bohnert *et al.*, 2006; Lalli *et al.*, 2003; Meunier *et al.*, 2002). Transcytotic pathway of the whole BoNT/A without dissociation of H and L chains through the intestinal epithelial cells suggests a different intracellular trafficking than that in motor neurons. Transcytotic transport is usually mediated by non-acidic vesicles. For instance, TeNT which undergoes a retrograde axonal transport in motor neurons to gain access to the target inhibitory interneurons within the central nervous system uses a neutral vesicle trafficking (Bohnert and Schiavo, 2005; Lalli *et al.*, 2003). Hc domain of clostridial neurotoxin which interacts with specific receptor, plays an essential role in the internalization process (Grumelli *et al.*, 2005). Toxin interaction with specific cell surface receptor is critical to drive a distinct intracellular trafficking. Here, we show a differential dynamics of BoNT/A Hc internalization in neuronal NG108-15 cells versus intestinal CaCo-2 or m-IC<sub>cl2</sub> cells. BoNT/A Hc entered endocytic vesicles into NG108-15 cells which progressively migrated in the perinuclear area, whereas endocytic vesicles containing BoNT/A Hc were more scattered in the cytoplasm of intestinal cells. Note that binding and internalization rate of BoNT/A Hc was lower in intestinal cells compared to NG108-15 cells (Couesnon *et al.*, 2007). This suggests a different intracellular trafficking between NG108-15 versus intestinal Caco-2 or m-IC<sub>cl2</sub> cells.

BoNT/A receptors have been identified as gangliosides of the GD<sub>1b</sub> and GT<sub>1b</sub> series and the synaptic vesicle protein SV2 in neuronal cells (Dong *et al.*, 2006; Mahrhold *et al.*, 2006; Kitamura *et al.*, 1999), and possibly also in intestinal cells (Couesnon *et al.*, 2007). This raises the questions which is the structural organization of BoNT/A receptor complex, where the functional receptor is localized on the cell membrane, and which is the intracellular trafficking pathway triggered by this receptor complex? Most of intracellularly active bacterial toxins hijack a physiological entry process to enter cells. For example, TeNT uses the retrograde axonal transport which is shared by the nerve growth factor (Lalli *et al.*, 2003). Thus, which are the physiological compounds which are involved in the BoNT/A receptor-

mediated entry pathway? Our results with PFO probe in colocalization and competition experiments show that BoNT/A Hc did not localize directly on cholesterol enriched microdomains but probably in a subset of microdomains closely connected to the cholesterol enriched microdomains. This is further supported by the fact that M $\beta$ CD only partially prevented BoNT/A Hc binding to cells as assayed by FACS, whereas M $\beta$ CD induced a greater binding inhibition of PFO (Fig. 3). In addition, BoNT/A Hc was found to essentially bind to soluble-detergent membrane fractions in NG108-15 and Caco-2 cells, although a part of BoNT/A Hc receptor consists in gangliosides. However, gangliosides are differently distributed on membrane microdomains. Indeed, cholera toxin binds to GM<sub>1</sub> localized on lipid rafts and is transported until the endoplasmic reticulum, whereas *E. coli* LTIIb, which is structurally and functional similar to cholera toxin, binds to GD<sub>1a</sub>, a ganglioside which was found to be not associated to lipid rafts. In contrast to cholera toxin, LTIIb is not routed to the endoplasmic reticulum (Fujinaga *et al.*, 2003). Lipid rafts seem not to be required for the BoNT/A intoxication process. Thereby, disruption of lipid rafts with M $\beta$ CD or filipin does not prevent, but on the contrary enhances BoNT/A activity on N2a cells (Petro *et al.*, 2006). BoNT/A has been found to bind with stronger affinity to GD<sub>1b</sub>, GT<sub>1b</sub>, and GQ<sub>1b</sub> among various gangliosides, but *in vitro* and at low ionic strength, which is a non-physiological condition (Kitamura *et al.*, 1999). In addition, BoNT binding was greatly decreased to cells deficient in ganglioside synthesis (Rummel *et al.*, 2007; Yowler *et al.*, 2002; Kozaki *et al.*, 1998b). However, 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 *et al.*, 2005). In contrast to BoNT/A, BoNT/C binds to gangliosides GD<sub>1b</sub> and GT<sub>1b</sub> independently of a protein receptor (Tsukamoto *et al.*, 2005). BoNT/C 16S complex has been reported to bind to membrane lipid rafts in HT29 cells, but only partially (Uotsu *et al.*, 2005). This suggests that BoNT receptors containing gangliosides GD<sub>1b</sub>/GT<sub>1b</sub> are not restricted to lipid rafts but have a wider distribution, possibly on distinct microdomain structures, within cell membrane. Interestingly, such localization heterogeneity on membrane is supported by the finding that a same glycosphingolipid, is distributed on discrete, contiguous membrane microdomains according to its concentration, low or high (Sharma *et al.*, 2003). Moreover, GPI-APs are known to localize in lipid rafts (Mayor and Riezman, 2004) and one or more GPI-anchored proteins have been identified as part of TeNT receptor (Munro *et al.*, 2001; Herreros *et al.*, 2000b). Our data of colocalization of BoNT/A Hc with probes which specifically target GPI-APs such as *C. septicum* alpha toxin or DAF,

indicates that BoNT/A did not interact with GPI-APs. Thus in contrast to TeNT, BoNT/A did not associate with lipid rafts, although it interacts with gangliosides GD<sub>1b</sub> and GT<sub>1b</sub>. This is in agreement with the fact that the protein part of BoNT/A receptor which has been identified as SV2 protein (Dong *et al.*, 2006; Mahrhold *et al.*, 2006), was shown to localize in detergent-soluble complexes (Bennett *et al.*, 1992).

BoNT/A seems to use the same surface receptors, gangliosides GD<sub>1b</sub>/GT<sub>1b</sub> and SV2 protein, in neuronal and intestinal cells (Couesnon *et al.*, 2007). The lower binding of BoNT/A Hc to intestinal cells compared to neuronal cells might result from a lower number of specific receptors or lower affinity receptors on intestinal cells. BoNTs seem to enter neuronal cells mostly via the synaptic vesicle recycling, since stimulation of neuronal cells increases BoNT uptake (Keller *et al.*, 2004). In addition, BoNT/A has also been found to enter the synaptic vesicle recycling by using fluorescent toxin, but not exclusively (Verderio *et al.*, 2007). Synaptic vesicle endocytosis uses a clathrin-dependent machinery involving sorting nexin 9, dynamin, as well as actin cytoskeleton and additional actin-binding proteins (Shin *et al.*, 2007; Granseth *et al.*, 2006). However, synaptic vesicle can rapidly release neurotransmitter by partial fusion (kiss and run) with the presynaptic membrane without using the slow clathrin-mediated recycling (Shin *et al.*, 2007; Jockush *et al.*, 2005). Our results show that BoNT/A Hc partially colocalized with transferrin (colocalization index 60%), a marker of the clathrin-dependent endocytosis in non-stimulated neuronal cells and in a much lower rate in Caco-2 (colocalization index 30%) and m-IC<sub>cl2</sub> cells (colocalization index 15%) (Fig. 6 and 10). In addition, potassium depletion, which prevents assembly of clathrin coated vesicles, significantly inhibited BoNT/A Hc uptake into NG108-15 cells. This is in agreement with the inhibition of BoNT/A activity in neuronal N2A cells depleted in potassium due to an impairment of clathrin-dependent toxin entry into cells (Petro *et al.*, 2006). This indicates that the clathrin-dependent pathway is a preferential entry route of BoNT/A Hc into neuronal cells and only an accessory entry pathway in intestinal cells.

A significant part of BoNT/A Hc was found in early endosomes, as evidenced by colocalization with EEA1 in neuronal and m-IC<sub>cl2</sub> cells (Fig. 7). Early endosomes labeled with EEA1 are a common compartment reached by clathrin-dependent and several clathrin-independent routes (Lamaze and Johannes, 2006). This indicates that BoNT/A is transported in a common early compartment in neuronal and intestinal cells. Then they are sorted in distinct pathways, since BoNT/A passes through an acidic compartment which facilitates the translocation of the L chain into the cytosol of target neurons, and is probably transcytosed in

a neutral compartment in intestinal cells as TeNT in retrograde transport along motor neurons (Lalli *et al.*, 2003).

GTPases from Rho family 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, *Helicobacter pylori* VacA toxin into the GPI-APs enriched early endosomal compartments (GEECs), whereas RhoA is involved in internalization of interleukin-2 receptor (Mayor and Pagano, 2007). Our results show that dominant-negative mutant of Cdc42 efficiently inhibited BoNT/A Hc entry into intestinal cells, but not into neuronal cells, whereas dominant-negative mutant of Rac1 or RhoGDI did not affect the entry pattern of BoNT/A Hc into both cell types (Fig. 8 and data not shown). Thus, BoNT/A enters neuronal and intestinal cells by two distinct regulated endocytosis mechanisms. BoNT/A Hc might follow a similar Cdc42-dependent endocytic route in intestinal cells than GPI-APs or VacA. However, the Cdc42-dependent pathway in intestinal cells probably delivers BoNT/A Hc in a different compartment than GEECs. Indeed, GEECs have been found to be devoid of transferrin and EEA1 markers (Gauthier *et al.*, 2005; Sabharanjak *et al.*, 2002), and BoNT/A Hc partially colocalize with transferrin and EEA1 (Fig. 6). In addition, cholesterol depletion with low concentration of M $\beta$ CD (2 mM) which has been found to prevent GPI-anchored protein uptake into GEECs did not impaired BoNT/A Hc entry (Chadda *et al.*, 2007).

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 (Roux *et al.*, 2006; Takei *et al.*, 2005). Dynamin has been first described to be part of the clathrin-dependent pathway, but it was recognized to also be involved in several clathrin-independent endocytosis such as those mediated by caveolae or RhoA (Mayor and Pagano, 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 the two cell types.

Intersectin is a major binding partner of dynamin and has been first involved in clathrin-dependent endocytosis (Simpson *et al.*, 1999). However, intersectin has also been found to regulate caveolae-mediated transcytosis in endothelial cells. Intersectin recruits dynamin through its SH3 domains to the caveolae neck (Predescu *et al.*, 2003). Our results show that overexpression of the intersectin SH3A domain efficiently inhibited BoNT/A Hc entry into intestinal cells, whereas only partial blockade of internalization was observed in

NG108-15 cells. The differential effects intersectin in BoNT/A Hc internalization in neuronal and intestinal cells might result from a different distribution of intersectin isoforms in cells. Indeed, intersectin isoform 1 is neuronal specific, whereas isoform 2 is widely distributed in the different tissues. Intersectin negatively regulates the recruitment of dynamin around the necks of clathrin-coated pits generating synaptic vesicles in central synapses. But, both intersectin and dynamin are required in the fission process of synaptic vesicles (Evergren *et al.*, 2007). In endothelial cells, intersectin 2 associates with dynamin and SNAP23 to induce fission of caveolae, endocytosis of which is coupled to exocytosis in the transcytotic process (Predescu *et al.*, 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 which interacts with N-WASP (Evergren *et al.*, 2007). Thus, we observed that BoNT/A Hc entry into intestinal cells is dynamin-, intersectin-, and Cdc42-dependent. 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-dependent, partially intersectin-dependent, and Cdc42-independent. This not rules out that several BoNT/A Hc entry pathways might coexist.

In summary, BoNT/A Hc recognizes on neuronal and intestinal cells receptors that showed non-conventional membrane distribution. They were found to be in membrane structures closely associated with lipid microdomains enriched in cholesterol, but they were not or only partially localized in DRMs or GEECs. Entry of fluorescent BoNT/A Hc was evidenced in intracellular organelles migrating from the membrane periphery to the perinuclear region within 15-20 min in NG108-15 cells, and in a more scattered manner in the cytosol of intestinal cells. BoNT/A Hc was found to mainly enter via the clathrin-dependent pathway in NG108-15 cells, on the basis of colocalization with transferrin and entry inhibition by K<sup>+</sup> depletion, and in contrast via a mainly clathrin-independent pathway in Caco-2 cells. In both neuronal and intestinal cells, BoNT/A Hc reached an early endocytic compartment labeled with EEA1, and then are sorted into distinct pathways, one leading to acidified endosomes thus permitting the translocation of L chain into the cytosol of neuronal cells, and a second mediating transcytosis of the whole toxin through intestinal cells. BoNT/A Hc entry was dynamin-dependent into both neuronal and intestinal cells, but in contrast to neuronal cells it was Cdc42- and intersectin-dependent in intestinal cells. This suggests that BoNT/A Hc transcytosis in intestinal cells requires a specific pool of actin filaments controlled by Cdc42, which in its turn might be activated by intersectin. BoNT/A Hc entry into neuronal

cells in non-stimulated conditions seems to follow the clathrin-dependent pathway used by the slow synaptic vesicle endocytic recycling.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Reagents.** Transferrin was loaded with ferric ammonium citrate, dialysed in PBS and labelled with Cy5 monoreactive dye (Amersham) according to manufacturer instructions. The antibodies used were : anti-early endosomes antigen-1 (EEA1; mouse, BD Biosciences), anti-clathrin heavy chain (mouse, BD Biosciences), anti-His probe (mouse, Roche). The secondary antibodies were Alexa488-labeled goat anti mouse IgG (Invitrogen). TRITC-labeled phalloïdin was from Sigma and Alexa647-labeled phalloïdin from Interchim. Methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD) was from Sigma-Aldrich.

**Labeled recombinant BoNT Hc fragment.** Recombinant His-tag Hc fragment of BoNT/A was produced and purified from pET28b vector containing DNA encoding for BoNT/A Hc cloned into *Bam*HI and *Sall* sites as previously described (Tavallaie *et al.*, 2004). A recombinant derivative plasmid encoding BoNT/A Hc with a N-terminal tag containing 4 cysteins as described for TeNT Hc (Lalli and Schiavo, 2002) was performed inserting the two complementary oligonucleotides P1132 (5'-TATGGCAGAGGCAGCAGCAGCAGAGGCTTGTTCGAGAGTGTTCGACGAG-3') and P1131 (5'-GATCCCTCGTGCACAACACTCTCGACAACAAGCCTCTCGTGCTGCTGC TGCCTCTGCCA-3') into *Nde*I and *Bam*HI sites of pET28b vector. BoNT/A Hc with 4 Cys tag was then labeled with either maleimide Alexa488 reagent (InVitrogen) or maleimide Cy3 (Amersham) according to the manufacturer's recommendations.

**Cell Culture.** Caco-2 and NG108-15 were obtained from the ATCC, and m-IC<sub>cl2</sub> were kindly provided by A. Vandewalle. They were cultured at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere and medium was changed every other day.

Caco-2 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Invitrogen). m-IC<sub>cl2</sub> were cultured as described previously (Bens *et al.*, 1996).

Undifferentiated NG108-15 were grown in DMEM supplemented with 5% FCS, HAT media supplement (Sigma Aldrich), 2 mM glutamine, and 3  $\mu$ M glycine. Two days before performing the experiments, the cells were differentiated by adding 0.5 mM dibutyl cyclic adenosine-monophosphate (Sigma-Aldrich) and reducing the serum concentration to 1%.

**Binding and internalization studies.** Cells ( $5 \times 10^4$ ) were plated on coverslips and incubated in HBSS / BSA 0.5% (HBSS/BSA) containing 5  $\mu\text{g/ml}$  of Cy3-labeled BoNT/A Hc. For binding experiments, cells were incubated at 4°C for 30 min, washed with cold HBSS and fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS for 20 min. For internalization experiments, cells were incubated at 37°C for 5 min, washed with HBSS, and either fixed with PFA or further incubated at 37°C in HBSS before fixation. After washing in PBS and quenching with 50mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in PBS, cells were permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS and incubated with Alexa647-labeled phalloidin (Interchim).

Caco-2 cells ( $2 \times 10^6$ ) were seeded on the upper chamber of Transwell Inserts (Corning) and allowed to differentiate for one week. Cells grown on inserts were cooled to 4°C and incubated for 30 min at 4°C in HBSS/BSA containing Cy3-labeled BoNT/A Hc, cells were rinsed with cold medium and transferred at 37°C. At different times of incubation, cells were rinsed and fixed with 4% PFA before phalloidin labeling.

For colocalization studies, fixed cells were incubated after permeabilization with primary antibody (1:200; anti-EEA1, BD Biosciences; anti-clathrin heavy chain, BD Biosciences; anti-His<sub>6</sub>, Roche) in HBSS/BSA for one hour at RT. After washing and incubation with Alexa488-labeled secondary antibody (1:200, Invitrogen), cells were mounted in Mowiol (Calbiochem), and observed by confocal fluorescent microscopy.

Co-localization with each marker was calculated by counting the number of vesicles labeled with BoNT/A Hc and the number of vesicles co-labeled with both BoNT/A Hc and the marker in ten images from three different experiments. Co-localization index is expressed as the ratio between the number of co-labeled vesicles and the total number of vesicles labeled with BoNT/A Hc. Methyl- $\beta$  Cyclodextrine (M $\beta$ CD, SIGMA) treatment (2 mM) was applied to cells grown on coverslips for 30 min at 37°C to disorganize lipid microdomains. Untreated and treated cells were washed with HBSS/BSA prior to incubation with Cy3-labeled BoNT/A Hc in HBSS/BSA for 5 min at 37°C. Cells were washed in HBSS and fixed with PFA. After permeabilization and phalloidin staining, they were mounted in Mowiol and analysed by confocal microscopy as described above.

**Cell transfections..** Eukaryotic plasmid vectors used in this work are as follows: GFP-Cdc42 T17N (C. Lamaze, Institut Curie, Paris, France), GFP-Rac T17N (C. Lamaze, Institut Curie, Paris, France) GFP-Dyn2 K44A ((Le Gall *et al.*, 2000), C. Lamaze, Institut Curie, Paris,

France), GFP-Src homology 3 (SH3) (Simpson *et al.*, 1999), His<sub>6</sub>-Rho Q63L (Dr. G. M. Bokoch, The Scripps Research Institute, USA).

Subconfluent cells in culture were collected and washed in medium.  $2 \cdot 10^5$  cells were electroporated with 5  $\mu$ g of plasmid using Gene Pulser Xcell (Biorad) and the pre-set Cos protocol. They were then grown overnight on coverslips to allow expression of proteins from plasmid-borne genes.

Cells were incubated in HBSS/BSA with Cy3-labeled BoNT/A Hc (5  $\mu$ g / ml) for 5 min at 37°C before PFA fixation.

**Transferrin uptake and disruption of clathrin-coated pits.** Cells were incubated in potassium depletion buffer (NaCl 140mM, CaCl<sub>2</sub> 1mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, Hepes 20mM, D-glucose 1g/l, pH 7.4) for 30 min at 37°C, followed by hypotonic shock (potassium depletion buffer / ddH<sub>2</sub>O 1:1) for 5 min at 37°C. Control cells were incubated in buffer containing potassium (NaCl 140mM, CaCl<sub>2</sub> 1mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, Hepes 20mM, D-glucose 1g/l, 10mM KCl pH 7.4). Cells were then incubated with Cy3-labeled BoNT/A Hc and Cy5-labeled transferrin for 5 min at 37°C in HBSS/BSA, washed and fixed as described previously.

**Flow cytometry assays.** Cells grown to confluence were detached from culture flasks by 0.5 mM EDTA in phosphate balanced solution (PBS). Cells ( $5 \times 10^5$  per tube) were incubated with 5  $\mu$ g/ml of either Alexa488-labeled BoNT/A Hc or GFP-PFO in HBSS / BSA for 30 min at 4°C. Cells were then washed with ice-cold HBSS/BSA and cell-associated fluorescence detected by a FACS Calibur (Becton Dickinson). Control samples were prepared using cells alone. Fluorescent values are representative of triplicate experiments and the peak signal (geometric from 20,000 cells on a histogram plot).

Methyl- $\beta$  Cyclodextrine (M $\beta$ CD, SIGMA) treatment (15 mM) was applied to cells for 60 min at 37°C to deplete membranes of cholesterol. Treated cells were washed twice with HBSS / BSA prior to incubation with labeled Hc for 30 min at 4°C and binding analysis by FACS.

**Isolation of detergent resistant membranes (DRMs) and sucrose gradient.** Caco-2 cells were grown to confluence and NG108-15 cells were differentiated for two days in cAMP-containing medium before experiment. Cells in a 10-cm petri dish were incubated at 4°C for

30 min with either BoNT/A Hc or Cholera Toxin B subunit (CTB) (5 µg/ml) in HBSS/BSA 0.5%, rinsed in cold HBSS. Cells were then lysed and homogenized using a Teflon glass homogenizer in 2 ml of MES-buffered saline (25 mM MES, 150 mM NaCl, pH 6.5) containing 1% Triton X-100 and protease cocktail inhibitor (one tablet/ 50 ml, Complete, Mini, Roche). The lysate was then incubated for 30 min at 4°C. The homogenate was adjusted to 40% sucrose (w/v) with 2 ml of 80% sucrose in MES-buffered saline, overlaid with 4 ml of 35% sucrose and 4 ml of 5% sucrose in MES-buffered saline, and was centrifuged at 38,000 rpm (250,000 X g) for 18 h at 4°C in a Beckman SW41 rotor. Samples were then fractionated from the top (1 ml each, fractions 1 to 12).

All the proteins of 10 µl of each fraction were separated by SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane, and detected using a rabbit polyclonal serum raised against either BoNT/A Hc or CTB, HRP conjugated protein A and an enhanced chemiluminescence system (ECL plus, Amersham).

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

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.

## REFERENCES

- Ahsan, C.R., Hajnoczky, G., Maksymowych, A.B. and Simpson, L.L. (2005) Visualization of binding and transcytosis of botulinum toxin by human intestinal epithelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **315**: 1028-1035.
- Bennett, M.K., Calakos, N., Kremer, T. and Scheller, R.H. (1992) Synaptic vesicle membrane proteins interact to form a multimeric complex. *J. Cell Biol.* **116**: 761-775.
- Bens, M., Bogdanova, A., Cluzeaud, F., Miquerol, L., Kerneis, S., Kraehenbuhl, J.P., *et al* (1996) Transimmortalized mouse intestinal cells (m-ICc12) that maintain a crypt phenotype. *Am J Physiol.* **270**: C1666-1674.
- Bohnert, S. and Schiavo, G. (2005) Tetanus toxin is transported in a novel neuronal compartment characterized by a specialized pH regulation.
- Bohnert, S., Deinhardt, K., Salinas, S. and Schiavo, G. (2006) Uptake and transport of clostridium neurotoxins. In *The Sourcebook of Comprehensive Bacterial Protein Toxins*. Alouf, J.E., and Popoff, M.R. (eds.) Amsterdam: Elsevier Academic Press, pp. 390-408.
- Carpentier, J.L., Sawano, F., Geiger, D., Gorden, P., Perrelet, A. and Orci, L. (1989) Potassium depletion and hypertonic medium reduce "non-coated" and clathrin-coated pit formation as well as endocytosis through these two gates. *J. Cell Physiol.* **138**: 519-526.
- Chadda, R., Howes, M.T., Plowman, S.J., Hancock, J.F., Parton, R.G. and Mayor, S. (2007) Cholesterol-sensitive Cdc42 activation regulates actin polymerization for endocytosis via the GEEC pathway. *Traffic.* **8**: 702-717.
- Couesnon, A., Pereira, Y. and Popoff, M.R. (2007) Receptor-mediated transcytosis of botulinum neurotoxin A through intestinal cell monolayers. *Cell. Microbiol.*
- Damke, H., Baba, T., Wamock, D.E. and Schmid, S.L. (1994) Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J. Cell Biol.* **127**: 915-934.
- Dong, M., Richards, D.A., Goodnough, M.C., Tepp, W.H., Johnson, E.A. and Chapman, E.R. (2003) Synaptotagmins I and II mediate entry of botulinum neurotoxin B into cells. *J. Cell Biol.* **162**: 1293-1303.
- Dong, M., Yeh, F., Tepp, W.H., Dean, C., Johnson, E.A., Janz, R. and Chapman, E.R. (2006) SV2 Is the Protein Receptor for Botulinum Neurotoxin A. *Science.* **312**: 592-596.
- Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature.* **420**: 629-635.
- Evergren, E., Gad, H., Walther, K., Sundborger, A., Tomilin, N. and Shupliakov, O. (2007) Intersectin is a negative regulator of dynamin recruitment to the synaptic endocytic zone in the central synapse. *J Neurosci.* **27**: 379-390.
- Fujinaga, Y., Inoue, K., Watanabe, S., Yokota, K., Hirai, Y., Nagamachi, E. and Oguma, K. (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.
- Fujinaga, Y., Wolf, A.A., Rodighiero, C., Wheeler, H.E., Tsai, B., Allen, L., *et al* (2003) Gangliosides that associate with lipid rafts mediate transport of cholera and related toxins from the plasma membrane to endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell.* **14**: 4783-4793.
- Gauthier, N.C., Monzo, P., Kaddai, V., Doye, A., Ricci, V. and Boquet, P. (2005) *Helicobacter pylori* VacA cytotoxin: a probe for a clathrin-independent and Cdc42-dependent pinocytic pathway routed to late endosomes. *Mol Biol Cell*: in press.

- Gordon, V.M., Nelson, K.L., Buckley, J.T., Stevens, V.L., Tweten, R.K., Elwood, P.C. and Leppia, S.H. (1999) *Clostridium septicum* alpha-toxin uses glycosylphosphatidylinositol-anchored protein receptors. *J. Biol. Chem.* **274**: 27274-27280.
- Granseth, B., Odermatt, B., Royle, S.J. and Lagnado, L. (2006) Clathrin-mediated endocytosis is the dominant mechanism of vesicle retrieval at hippocampal synapses. *Neuron.* **51**: 773-786.
- Grumelli, C., Verderio, C., Pozzi, D., Rossetto, O., Montecucco, C. and Matteoli, M. (2005) Internalization and mechanism of action of clostridial toxins in neurons. *Neuro. Toxicol.* **26**: 761-767.
- Herreros, J., Lalli, G. and Schiavo, G. (2000a) C-terminal half of tetanus toxin fragment C is sufficient for neuronal binding and interaction with a putative protein receptor. *Biochem. J.* **347**: 199-204.
- Herreros, J., Ng, T. and Schiavo, G. (2001) Lipid rafts act as specialized domains for tetanus toxin binding and internalization into neurons. *Mol. Biol. Cell.* **12**: 2947-2960.
- Herreros, J., Lalli, G., Montecucco, C. and Schiavo, G. (1999) Pathophysiological properties of clostridial neurotoxins. In *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*. Alouf, J.E., and Freer, J.H. (eds.) London: Academic Press, pp. 202-228.
- Herreros, J., Lalli, G., Montecucco, C. and Schiavo, G. (2000b) Tetanus toxin fragment C binds to a protein present in neuronal cell lines and motoneurons. *J. Neurosci.* **74**: 1941-1950.
- Humeau, Y., Doussau, F., Grant, N.J. and Poulain, B. (2000) How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter *Biochimie.* **82**: 427-446.
- Jockush, W.J., Praefcke, G.J., McMahon, H.T. and Lagnado, L. (2005) Clathrin-dependent and clathrin-independent retrieval of synaptic vesicles in retinal bipolar cells. *Neuron.* **46**: 869-878.
- Keller, J.E., Cai, F. and Neale, E.A. (2004) Uptake of botulinum neurotoxin into cultured neurons. *Biochem.* **43**: 526-532.
- Kitamura, M., Takamiya, K., Aizawa, S. and Furukawa, K. (1999) Gangliosides are the binding substances in neural cells for tetanus and botulinum toxins in mice. *Biochim. Biophys. Acta.* **1441**: 1-3.
- Kitamura, M., Igimi, S., Furukawa, K. and Furukawa, K. (2005) Different response of the knockout mice lacking b-series gangliosides against botulinum and tetanus toxins. *Biochim. Biophys. Acta.* **1741**: 1-3.
- Kozaki, S., Kamata, Y., Watarai, S., Nishiki, T. and Mochida, S. (1998a) Ganglioside GT1b as a complementary receptor component for *Clostridium botulinum* neurotoxins. *Microbiol. Pathol.* **25**: 91-99.
- Kozaki, S., Kamata, Y., Nishiki, T., Kakinuma, H., Maruyama, H., Takahashi, H., *et al* (1998b) Characterization of *Clostridium botulinum* type B neurotoxin associated with infant botulism in Japan. *Infect Immun.* **66**: 4811-4816.
- Lalli, G. and Schiavo, G. (2002) Analysis of retrograde transport in motor neurons reveals common endocytic carriers for tetanus toxin and neurotrophin receptor p75<sup>NTR</sup>. *J. Cell Biol.* **156**: 233-239.
- Lalli, G., Bohnert, S., Deinhardt, K., Verastegui, C. and Schiavo, G. (2003) The journey of tetanus and botulinum neurotoxins in neurons. *Trends Microbiol.* **11**: 431-437.
- Lamaze, C. and Johannes, L. (2006) Intracellular trafficking of bacterial and plant protein toxins. In *The Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*. Alouf, J.E., and Popoff, M.R. (eds.) Amsterdam: Elsevier Academic Press, pp. 135-153.

- Le Gall, S., Buseyne, F., Trocha, A., Walker, B.D., Heard, J.M. and Schwartz, O. (2000) Distinct trafficking pathways mediate Nef-induced and clathrin-dependent major histocompatibility complex class I down-regulation. *J. Virol.* **74**: 9256-9266.
- Mahrhold, S., Rummel, A., Bigalke, H., Davletov, B. and Binz, T. (2006) The synaptic vesicle protein 2C mediates the uptake of botulinum neurotoxin A into phrenic nerves. *FEBS Lett.* **580**: 2011-2014.
- Maksymowych, A.B. and Simpson, L.L. (1998) Binding and transcytosis of botulinum neurotoxin by polarized human carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **273**: 21950-21957.
- Maksymowych, A.B. and Simpson, L.I. (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.
- Maksymowych, A.B., Rienhard, M., Malizio, C.J., Goodnough, M.C., Johnson, E.A. and Simpson, L.L. (1999) Pure botulinum neurotoxin is absorbed from the stomach and small intestine and produces peripheral neuromuscular blockade. *Infect. Immun.* **67**: 4708-4712.
- Matsumura, T., Jin, Y., Kabumoto, Y., Takegahara, Y., Oguma, K., Lencer, W.I. and Fujinaga, Y. (2007) The HA proteins of botulinum toxin disrupt intestinal epithelial intercellular junctions to increase toxin absorption. *Cell Microbiol.*
- Matteoli, M., Verderio, C., Rossetto, O., Iezzi, N., Coco, S., Schiavo, G. and Montecucco, C. (1996) Synaptic vesicle endocytosis mediates the entry of tetanus neurotoxin into hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. **93**: 13310-13315.
- Mayor, S. and Riezman, H. (2004) Sorting GPI-anchored proteins. *Nat Rev. Mol. Cell Biol.* **5**: 110-120.
- Mayor, S. and Rao, M. (2004) Rafts: scale-dependent, active lipid organization at the cell surface. *Traffic.* **5**: 221-240.
- Mayor, S. and Pagano, R.E. (2007) Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **8**: 603-612.
- McNiven, M.A., Cao, H., Pitts, K.R. and Yoon, Y. (2000) The dynamin family of mechanoenzymes: pinching in new places. *Trends Biochem. Sci.* **25**: 115-120.
- Meunier, F.A., Herreros, J., Schiavo, G., Poulain, B. and Molgo, J. (2002) Molecular mechanism of action of botulinum neurotoxins and the synaptic remodeling they induce in vivo at the skeletal neuromuscular junction. In *Handbook of Neurotoxicology*. Massaro, J. (ed.) Totowa, NJ: Humana Press, pp. 305-347.
- Montecucco, C., Rossetto, O. and Schiavo, G. (2004) Presynaptic receptor arrays for clostridial neurotoxins. *Trends Microbiol.* **12**: 442-446.
- Munro, P., Kojima, H., Dupont, J.L., Bossu, J.L., Poulain, B. and Boquet, P. (2001) High sensitivity of mouse neuronal cells to tetanus toxin requires a GPI-anchored protein. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **289**: 623-629.
- Nishikawa, A., Uotsu, N., Arimitsu, H., Lee, J.C., Miura, Y., Fujinaga, 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.
- Nishiki, T., Kamata, Y., Nemoto, Y., Omori, A., Ito, T., Takahashi, M. and Kozaki, S. (1994) Identification of protein receptor for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin in rat brain synaptosomes. *J. Biol. Chem.* **269**: 10498-10503.
- Nishiki, T., Tokuyama, Y., Kamata, Y., Nemoto, Y., Yoshida, A., Sato, K., *et al* (1996) The high-affinity of *Clostridium botulinum* type B neurotoxin to synaptotagmin II associated with gangliosides G<sub>T1B</sub>/G<sub>D1a</sub>. *FEBS Lett.* **378**: 253-257.
- Park, J.B. and Simpson, L.L. (2003) Inhalation poisoning by botulinum toxin and inhalation vaccination with its heavy-chain component. *Infect. Immun.* **71**: 1147-1154.

- Petro, K.A., Dyer, M.A., Yowler, B.C. and Schengrund, C.L. (2006) Disruption of lipid rafts enhances activity of botulinum neurotoxin serotype A. *Toxicon*.
- Poulain, B., Stiles, B.G., Popoff, M.R. and Molgo, J. (2006) Attack of the nervous system by clostridial toxins: Physical findings, cellular and molecular actions. In *The Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*. Alouf, J.E., and Popoff, M.R. (eds.) Amsterdam: Elsevier, Academic Press, pp. 348-389.
- Predescu, S.A., Predescu, D.N., Timblin, B.K., Stan, R.V. and Malik, A.B. (2003) Intersectin regulates fission and internalization of caveolae in endothelial cells. *Mol Biol Cell*. **14**: 4997-5010.
- Ramachandran, R., Heuck, A.P., Tweten, R.K. and Johnson, A.E. (2002) Structural insights into the membrane-anchoring mechanism of a cholesterol-dependent cytolysin. *Nat. Struct. Biol.* **9**: 823-827.
- Roux, A., Uyhazi, K., Frost, A. and De Camilli, P. (2006) GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission. *Nature*. **441**: 528-531.
- Rummel, A., Mahrhold, S., Bigalke, H. and Binz, T. (2004a) The H<sub>cc</sub>-domain of botulinum neurotoxins A and B exhibits a singular ganglioside binding site displaying serotype specific carbohydrate interaction. *Mol. Microbiol.* **51**: 631-643.
- Rummel, A., Bade, S., Alves, J., Bigalke, H. and Binz, T. (2003) Two carbohydrate binding sites in the H<sub>cc</sub>-domain of tetanus neurotoxin are required for toxicity. *J. Mol. Biol.* **326**: 835-847.
- Rummel, A., Karnath, T., Henke, T., Bigalke, H. and Binz, T. (2004b) Synaptotagmins I and II act as nerve cell receptors for botulinum neurotoxin G. *J. Biol. Chem.* **279**: 30865-30870.
- Rummel, A., Eichner, T., Weil, T., Karnath, T., Gutcaits, A., Mahrhold, S., *et al* (2007) Identification of the protein receptor binding site of botulinum neurotoxins B and G proves the double-receptor concept. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **104**: 359-364.
- Sabharanjak, S., Sharma, P., Parton, R.G. and Mayor, S. (2002) GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytotic pathway. *Develop. Cell*. **2**: 411-423.
- Schiavo, G., Matteoli, M. and Montecucco, C. (2000) Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol. Rev.* **80**: 717-766.
- Schmid, S.L., McNiven, M.A. and de Camilli, P. (1998) Dynamin and its partners a progress report. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**: 504-512.
- Sharma, D.K., Choudhury, A., Singh, R.D., Wheatley, C.L., Marks, D.L. and Pagano, R.E. (2003) Glycosphingolipids internalized via caveolar-related endocytosis rapidly merge with the clathrin pathway in early endosomes and form microdomains for recycling. *J. Biol. Chem.* **278**: 7564-7572.
- Sharma, D.K., Varma, R., Sarasij, R.C., Ira, Gousset, K., Krishnamoorthy, G., *et al* (2004) Nanoscale organization of multiple GPI-anchored proteins in living cell membranes. *Cell*. **116**: 577-589.
- Shin, N., Lee, S., Ahn, N., Kim, S.A., Ahn, S.G., YongPark, Z. and Chang, S. (2007) Sorting nexin 9 interacts with dynamin 1 and N-WASP and coordinates synaptic vesicle endocytosis. *J Biol Chem.* **282**: 28939-28950.
- Simpson, F., Hussain, N.K., Qualman, B., Kelly, R.B., Kay, B.K., McPherson, P.S. and Schmid, S.L. (1999) SH3-domain-containing proteins function at distinct steps in clathrin-coated vesicle formation. *Nature Cell Biol.* **1**: 119-124.
- Simpson, L.L., Coffield, J.A. and Bakry, N. (1994) Inhibition of vacuolar adenosine triphosphatase antagonizes the effects of clostridial neurotoxins but not phospholipase A2 neurotoxins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **269**: 256-262.

- Smith, L.A. (2006) Bacterial protein toxins as biological weapons. In *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*. Alouf, J.E., and Popoff, M.R. (eds.) Amsterdam: Elsevier, Academic Press, pp. 1019-1030.
- Tacket, C.O. and Rogawski, M.A. (1989) Botulism. In *Botulinum neurotoxin and Tetanus toxin*. Simpson, L.L. (ed.) San Diego: Academic Press, pp. 351-378.
- Takei, K., Yoshida, Y. and Yamada, H. (2005) Regulatory mechanisms of dynamin-dependent endocytosis. *J Biochem (Tokyo)*. **137**: 243-247.
- Tavallaie, M., Chenal, A., Gillet, D., Pereira, Y., Manich, M., Gibert, 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.
- Tsukamoto, K., Kohda, T., Mukamoto, M., Takeuchi, K., Ihara, H., Saito, M. and Kozaki, S. (2005) Binding of *Clostridium botulinum* types C and D neurotoxins to ganglioside and phospholipid. *J. Biol. Chem.* **280**: 35164-35171.
- Uotsu, N., Nishikawa, A., Watanabe, T., Ohyama, T., Tonozuka, T., Sakano, Y. and Oguma, K. (2005) Cell internalization and traffic pathway of *Clostridium botulinum* type C neurotoxin in HT-29 cells. *Biochim Biophys Acta.* **1763**: 120-128.
- Verderio, C., Grumelli, C., Raiteri, L., Coco, S., Paluzzi, S., Caccin, P., *et al* (2007) Traffic of botulinum toxins A and E in excitatory and inhibitory neurons. *Traffic.* **8**: 142-153.
- Yowler, B.C., Kensinger, R.D. and Schengrund, C.L. (2002) Botulinum neurotoxin A activity is dependent upon the presence of specific gangliosides in neuroblastoma cells expressing synaptotagmin I. *J. Biol. Chem.* **277**: 32815-32819.

## LEGENDS TO FIGURES

**Figure 1.** Internalization kinetics of BoNT/A Hc into cells. (A) Cells grown on coverslips were incubated with Cy3-Hc (red) for 30 min at 4°C, then washed, and incubated in HBSS/BSA at 37°C for the indicated times. Then, cells were fixed and mounted for microscopy observation as described in Experimental Procedures. Entry kinetics into differentiated NG108-15 cells were performed by incubating cells with Cy3-Hc at 37°C for 5 min, then washing and incubating in HBSS/BSA at 37°C for the additional indicated times, since temperature shift from 4°C to 37°C perturbed neuronal cell morphology. (B) Kinetics of BoNT/A Hc entry into polarized Caco-2 cell monolayers grown on filter (Transwell). Cell monolayers were counterstained with phalloidin (blue) to visualize the actin cytoskeleton and were observed with confocal microscopy (12 optical sections of 0.8 μm) from apical to basolateral side). One section out of three is presented.

**Figure 2.** Localization of BoNT/A Hc receptors on cholesterol-enriched microdomains in cell membranes as tested with PFO. Cells were incubated with Cy3-Hc (red) and GFP-PFO (green) at 4°C (B and C), or for 5 min at 37°C then washed and incubated in HBSS/BSA at 37°C for the indicated times (A). Cells were then processed for confocal microscopy observation. (D) Binding competition between BoNT/A Hc and PFO. NG108-15 cells were incubated with Cy3-Hc at 4°C for 5 min, then GFP-PFO was added and cells were incubated for additional 20 min at 4°C, or cells were first incubated with GFP-PFO for 5 min at 4°C and then Cy3-Hc was added.

**Figure 3.** Effects of MβCD on BoNT/A Hc binding to cells. (A) Alexa488-Hc binding to NG108-15, Caco-2, and m-IC<sub>c12</sub> cells untreated or treated with 15 mM MβCD was monitored by FACS. GFP-PFO was used as positive control. MβCD treatment impaired the binding of the cholesterol-binding cytolysin PFO and at a lower extent that of Alexa488-Hc. (B) m-IC<sub>c12</sub> or Caco-2 cells were untreated or treated with 2 mM MβCD prior to incubation with Cy3-Hc. Low concentration of MβCD (2 mM), which has been found to impair GPI-anchored protein uptake into GEEC compartment, did not prevent Cy3-Hc (red) binding and internalization into intestinal cells.

**Figure 4.** BoNT/A Hc is only weakly distributed in DRMs from NG108-15 and Caco-2 cells. (A) NG108-15 and Caco-2 cells were incubated with BoNT/A Hc for 30 min at 4°C, or (B) cholera toxin B subunit (CTB), washed and processed for DRM analysis as described in Experimental Procedures. Identification of the proteins in each fraction was performed by immunoblots using either anti-BoNT/A Hc or anti-CTB antibodies.

**Figure 5.** BoNT/A Hc does not colocalize with GPI-anchored proteins. (A) NG108-15, m-IC<sub>cl2</sub>, or Caco-2 cells were incubated with Cy3-Hc (red) and GFP-alpha septicum toxin (green) which recognizes GPI-anchored proteins, for 30 min at 4°C and then processed for confocal microscopy. (B) NG108-15 cells were transfected with a vector encoding GFP-DAF (green) and were incubated with Cy3-Hc (red) at 4°C for 30 min.

**Figure 6.** BoNT/A Hc preferentially enters NG108-15 cells through a clathrin-dependent pathway, in contrast to Caco-2 and m-IC<sub>cl2</sub> cells. (A) NG108-15 cells were incubated with Cy3-Hc (red) and Cy5-transferrin (blue) for 5 min at 37°C. A high level of colocalization (60 %) between BoNT/A Hc and transferrin was observed in NG108-15 cells. (B) Since transferrin internalization was not efficiently visualized into intestinal cells, antibodies against clathrin heavy chain were used. m-IC<sub>cl2</sub> and Caco-2 were incubated with Cy3-Hc (red) for 30 min at 4°C, then washed and incubated in HBSS/BSA at 37°C for additional 5 min. Cells were fixed and incubated with antibodies against clathrin heavy chain (green) and alexa647-labeled phalloidin. (blue) (C) Potassium depletion, known to inhibit clathrin coat formation (Carpentier *et al.*, 1989), impairs BoNT/A Hc (red) entry into NG108-15 cells, but has a weak effect on internalization into m-IC<sub>cl2</sub> and Caco-2.

**Figure 7.** BoNT/A Hc traffics through an early endosomal compartment labeled with EEA1. NG108-15 cells were incubated with Cy3-Hc (red) for 5 min at 37°C, washed and then incubated in HBSS/BSA for an additional 5 or 15 min. m-IC<sub>cl2</sub> were incubated with Cy3-Hc for 30 min at 4°C, then washed and incubated in HBSS/BSA for additional 10 min at 37°C. Cells were fixed, permeabilized and stained with anti-EEA1 antibodies (green).

**Figure 8.** BoNT/A Hc entry into Caco-2 and m-IC<sub>cl2</sub> is Cdc42-dependent. Cells were transfected with plasmid encoding GFP-Cdc42T17N or GFP-Cdc42 wt (green). Cells were incubated with Cy3-Hc (red) as described in the legend of Fig. 7 and processed for confocal microscopy observation.

**Figure 9.** BoNT/A Hc entry into NG108-15, Caco-2 and m-IC<sub>cl2</sub> is Rac-independent. (A) Cells were transfected with a plasmid encoding GFP-Rac1 T17N (green) and were exposed to Cy3-Hc (red) as described in the legend of Fig. 7. (B) NG108-15 cells were transfected with a plasmid encoding His<sub>6</sub>-Rho Q63L (green) and exposed to Cy3-Hc (red) as described above. Cells were fixed, permeabilized and stained with anti-His antibodies.

**Figure 10.** BoNT/A Hc entry into NG108-15, m-IC<sub>cl2</sub>, and Caco-2 cells is dynamin-dependent. Cells were transfected with a plasmid encoding GFP-dynamin2 K44A (green) and were exposed to Cy3-Hc (red) as described in the legend of Fig. 7 and then processed for confocal microscopy. NG108-15 cells were also exposed to Cy5-transferrin (blue).

**Figure 11.** BoNT/A Hc entry into Caco-2 and m-IC<sub>cl2</sub> is intersectin-dependent, and to a lower extent into NG108-15. Cells were transfected with a plasmid encoding intersectin GFP-SH3 domain (green) and then exposed to Cy3-Hc (red) as described in the legend of Fig. 7.

## SUPPLEMENTARY DATA

**Suppl. Fig. 1.** BoNT/A Hc binding to m-IC<sub>cl2</sub>, seen by transmission electron microscopy of sectioned material, using anti-Hc and protein A conjugated to 10 nm gold. Specific labeling of plasma membrane of intestinal cell body and in particular microvilli (MV) decorated with BoNT/A Hc can be observed.

**Suppl. Fig. 2.** BoNT/A Hc internalization into m-IC<sub>cl2</sub>, seen by transmission electron microscopy of sectioned material, using anti-Hc and protein A conjugated to 5 nm gold. (A) Labeling of intestinal cell membrane with BoNT/A Hc, on microvilli (MV) and at the base of MV. (B) At higher magnification, BoNT/A Hc labelling is observed in an invaginated pit in with recruitment of electron-dense components, possibly clathrin (arrowhead).

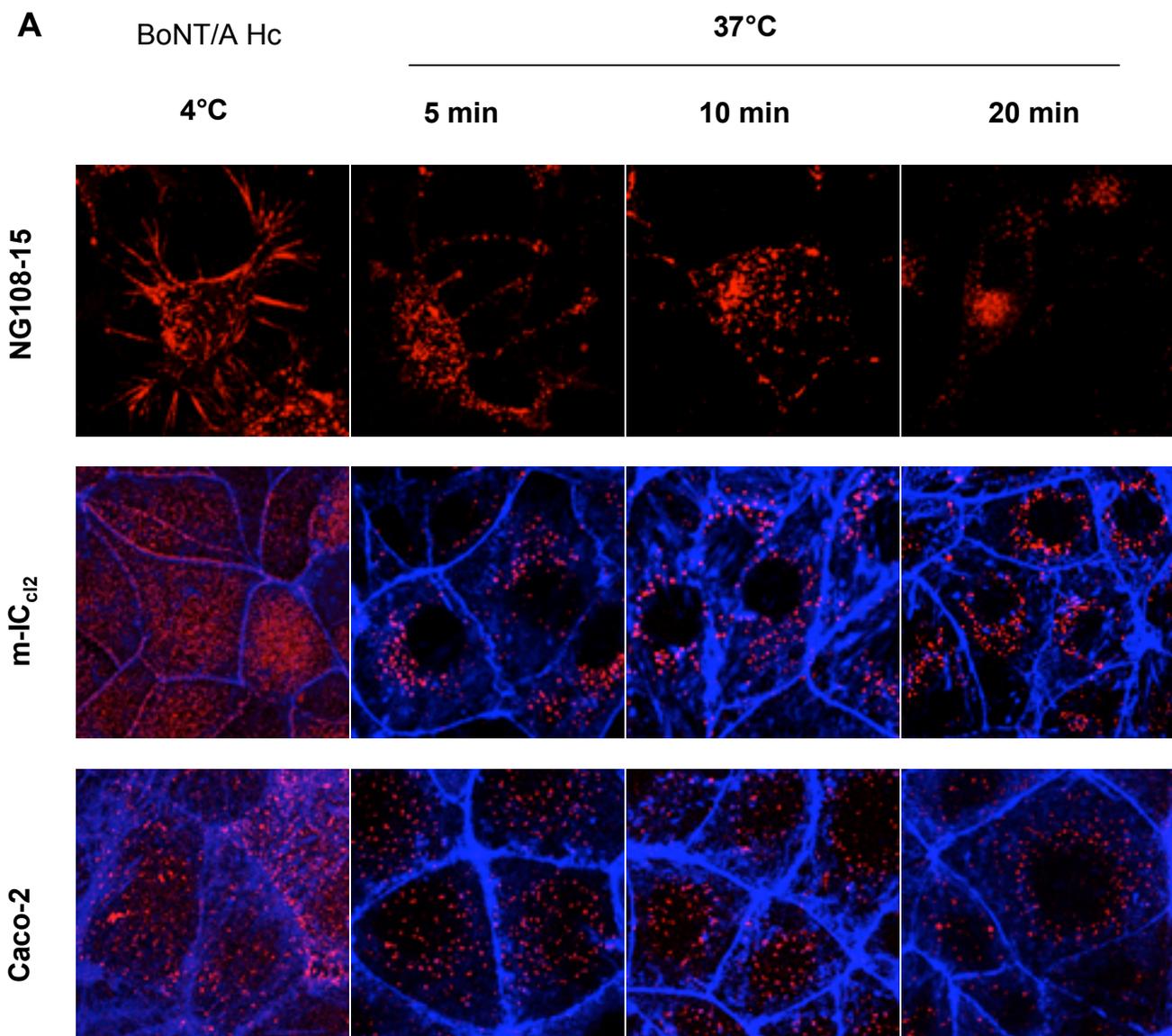
**Suppl. Fig. 3.** BoNT/A Hc binding to NG108-15, seen by transmission electron microscopy of sectioned material, using anti-Hc and protein A conjugated to 10 nm gold. (A) Labeling of neuronal cell membrane and neurites (n) with BoNT/A Hc. Note that the nucleus (N) with one

nuclear pore (NP) is close to cell membrane on this side of the cell. (B) View at higher magnification of the strong binding of BoNT/A Hc to membrane and small neurites.

**Suppl. Fig. 4** BoNT/A Hc in coated pits or vesicles in NG108-15 after 30 min incubation at 4°C. (A) BoNT/A Hc was detected in a constricted coated pit (omega shape, arrow) at the cell membrane next to neurite (n). Note the actin filaments (microfilaments) (AF) in the cytosol next to the nucleus and supporting a neurite. (B) et (C) BoNT/A Hc was seen in both invaginated clathrin-coated pit and clathrin-coated vesicle (arrowhead).

**Suppl. Fig. 5.** BoNT/A Hc internalization in NG108-15 seen by transmission electron microscopy of sectioned material, using anti-Hc and protein A conjugated to 5 nm gold. (A) Coated pit containing BoNT/A Hc at the bottom of a neurite (n). (B) and (C) View at higher magnification of membrane differentiation characterized by electron-dense components (arrowhead) in invaginated coated pits containing BoNT/A Hc.

**Suppl. Fig. 6.** Coated vesicles containing BoNT/A Hc migrate from the cell membrane towards internal compartments. (A) BoNT/A Hc was detected in several vesicles close to the cell periphery but also more centrally located (arrow). (B) Note again the coat covering the vesicles containing BoNT/A Hc seen at higher magnification.



**Figure 1A**

B

Caco-2

apical

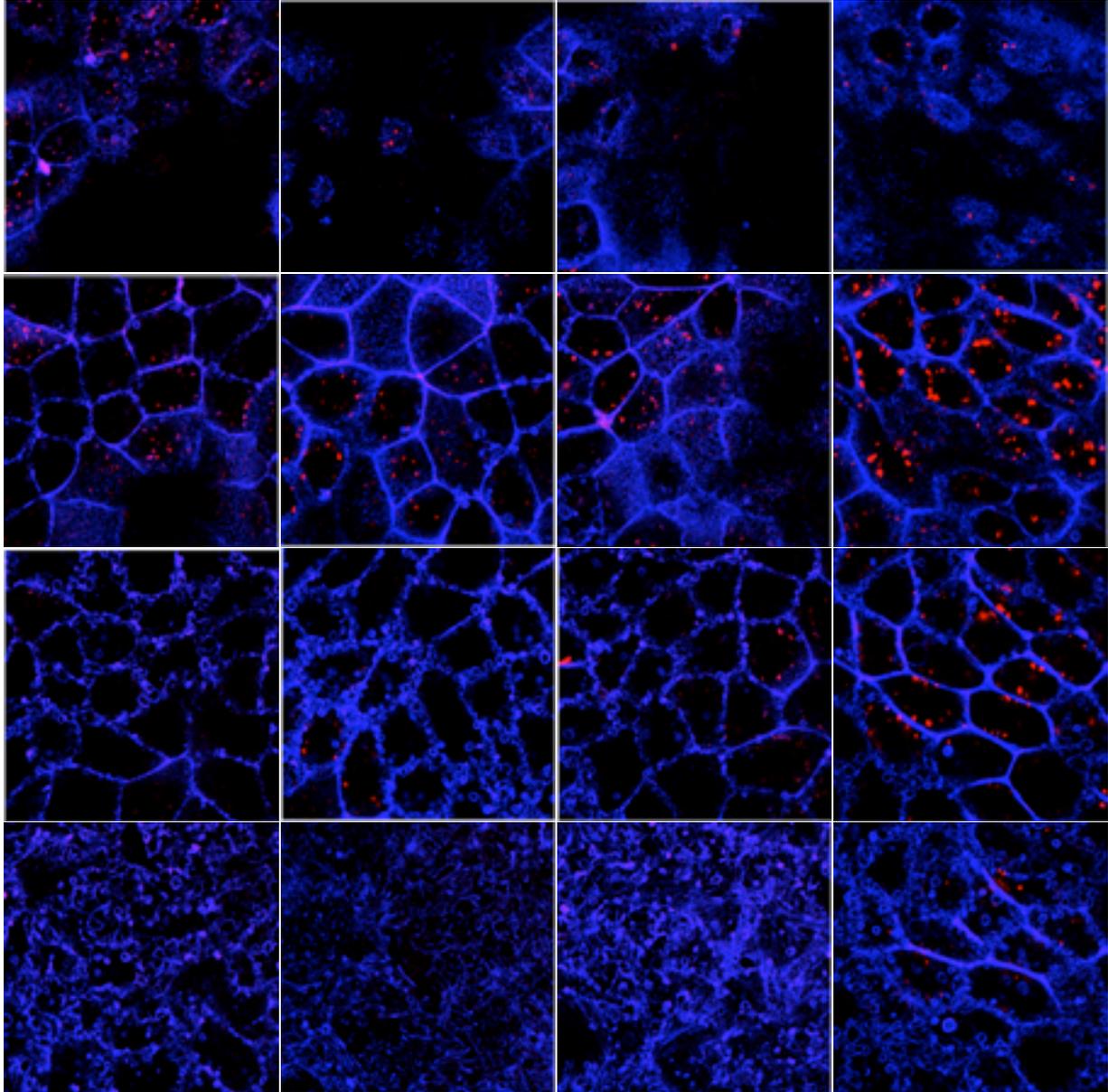
BoNT/A Hc

5 min

15 min

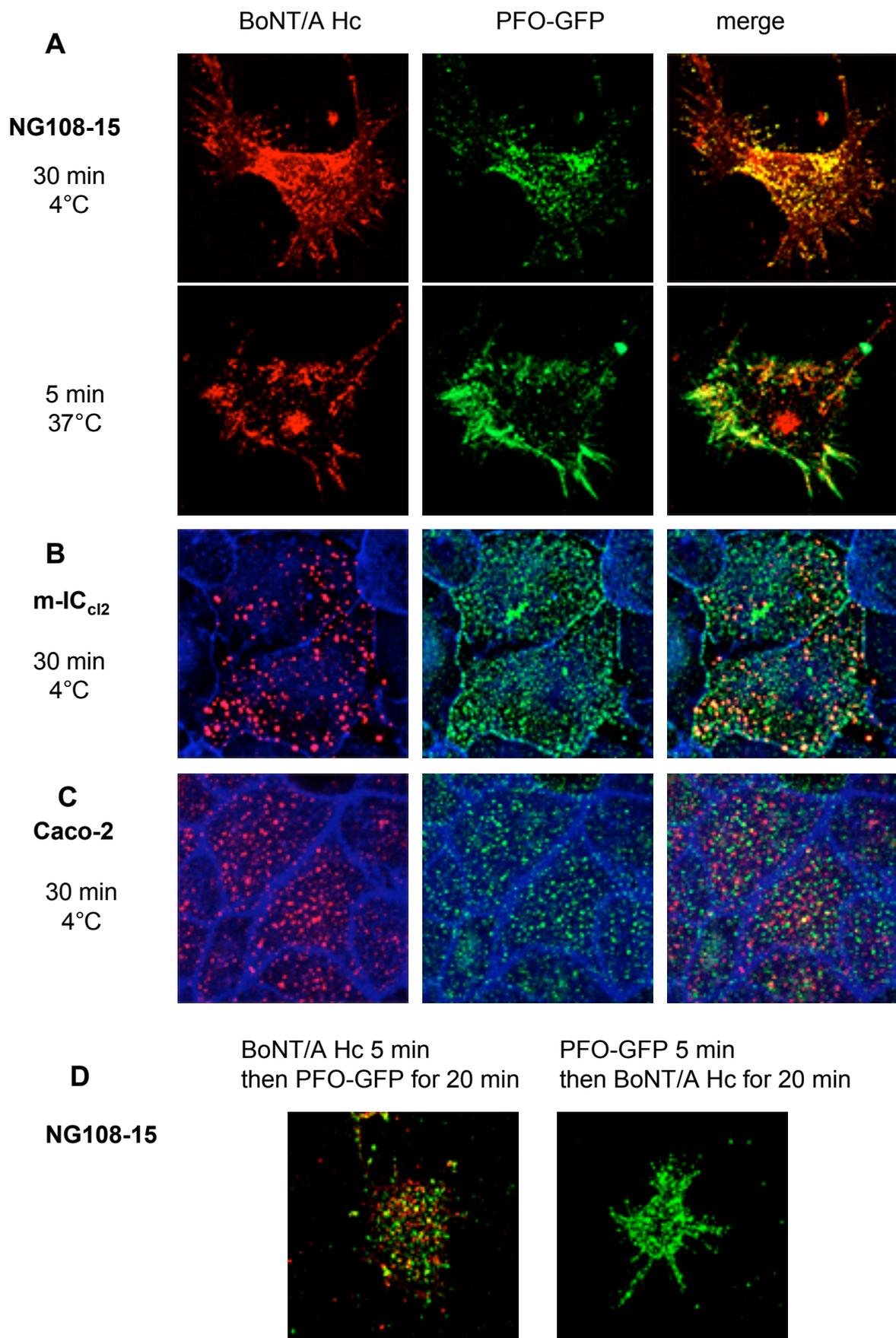
30 min

60 min

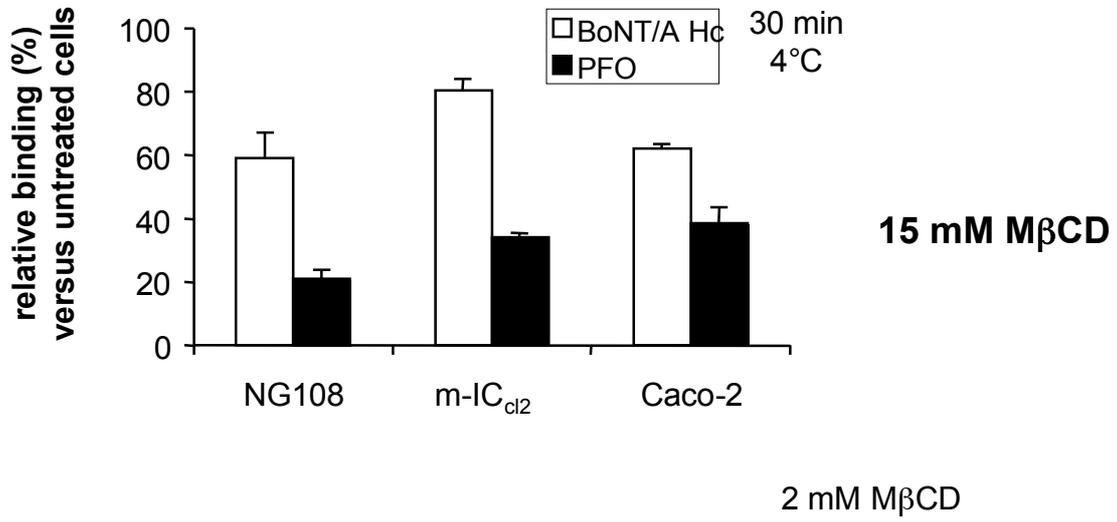
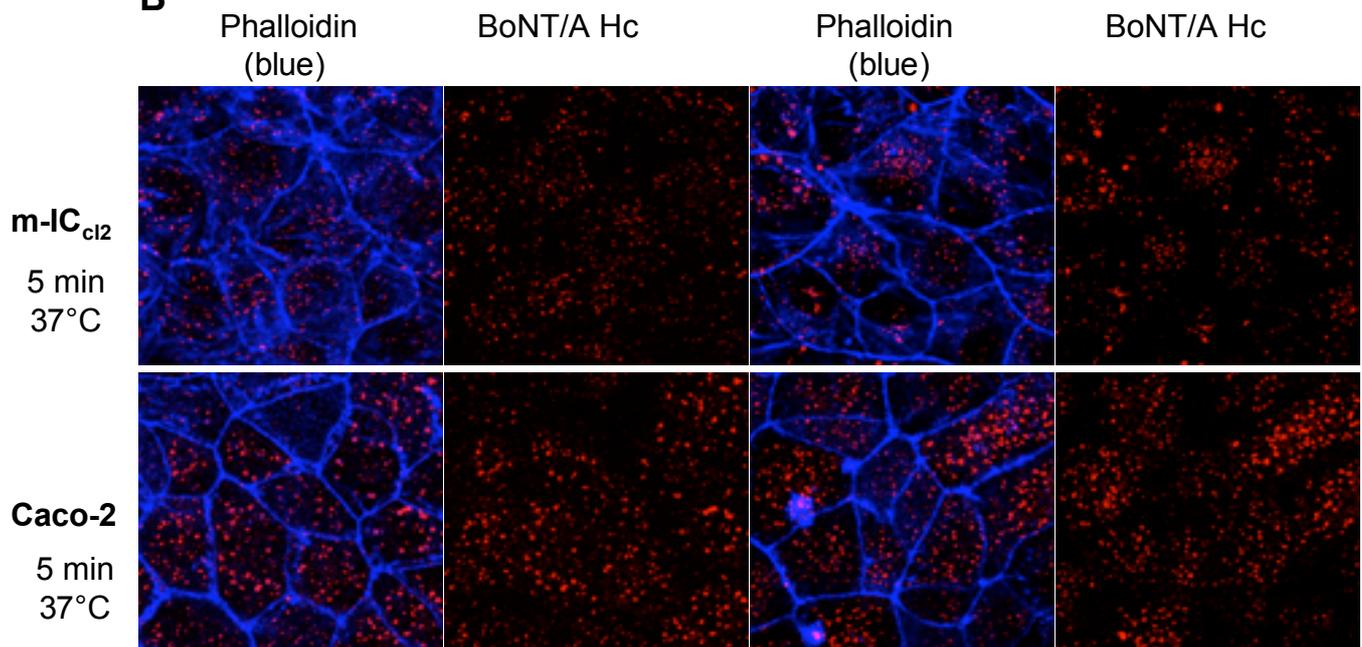


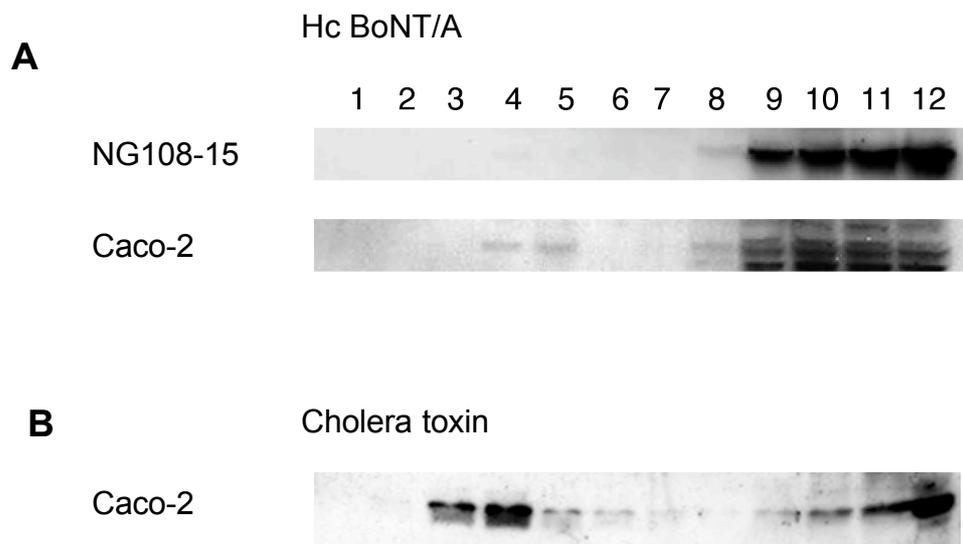
basolateral

Figure 1B

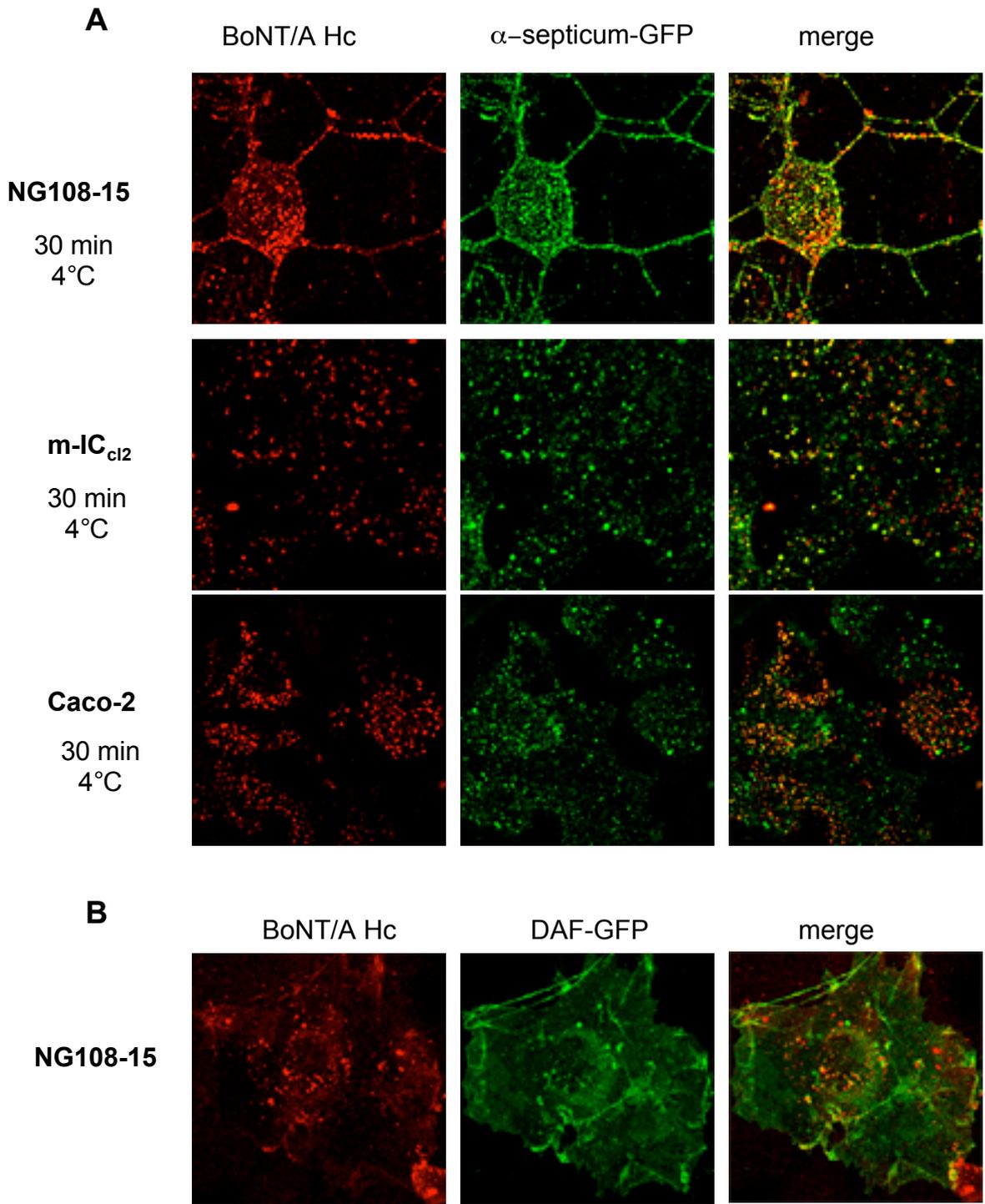


**Figure 2**

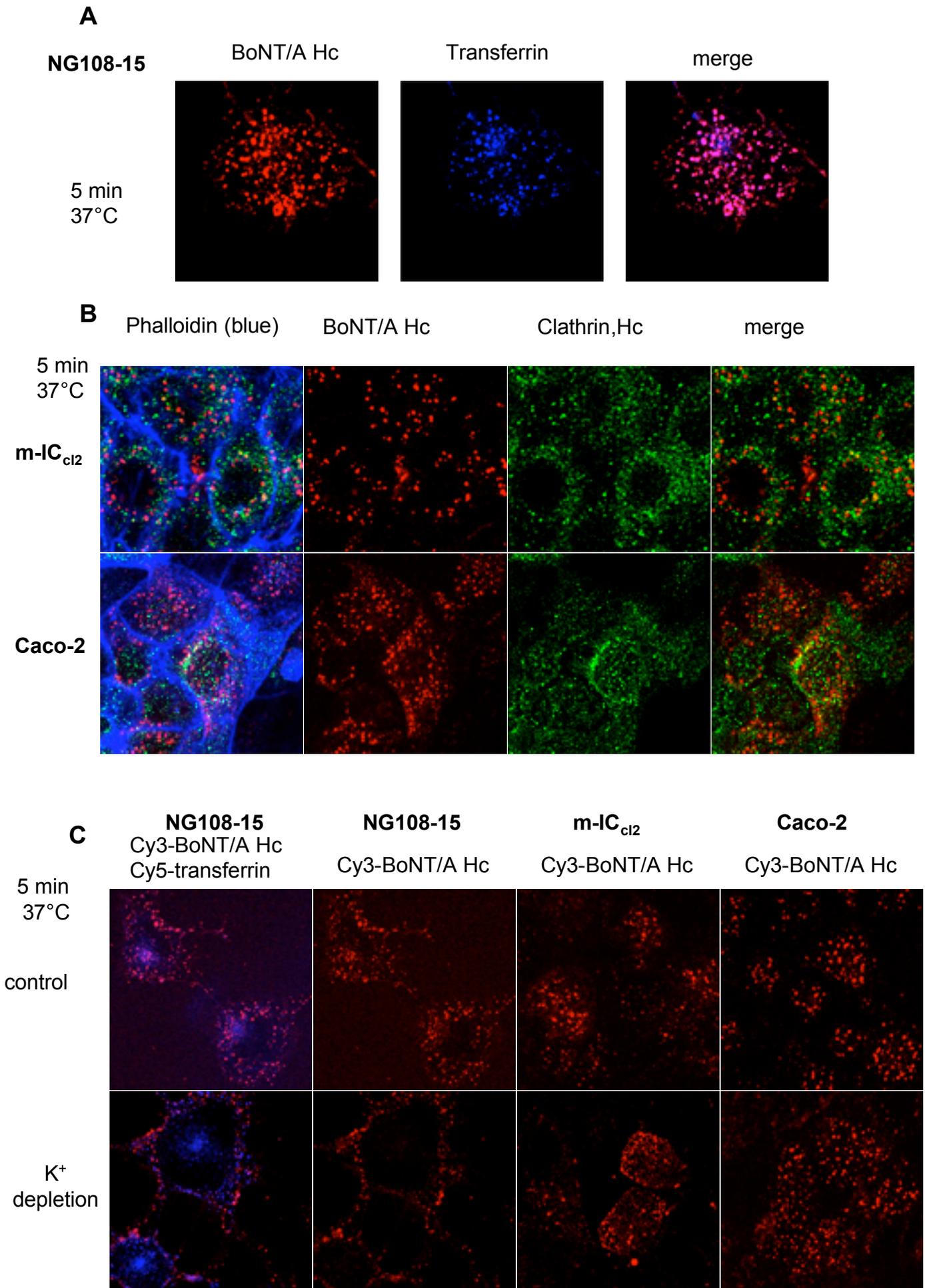
**A****B****Figure 3**



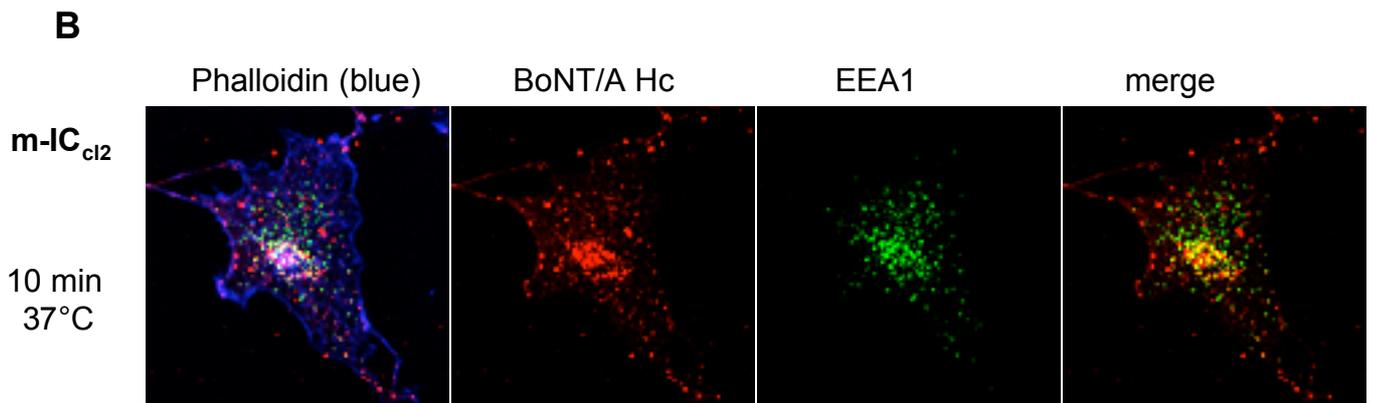
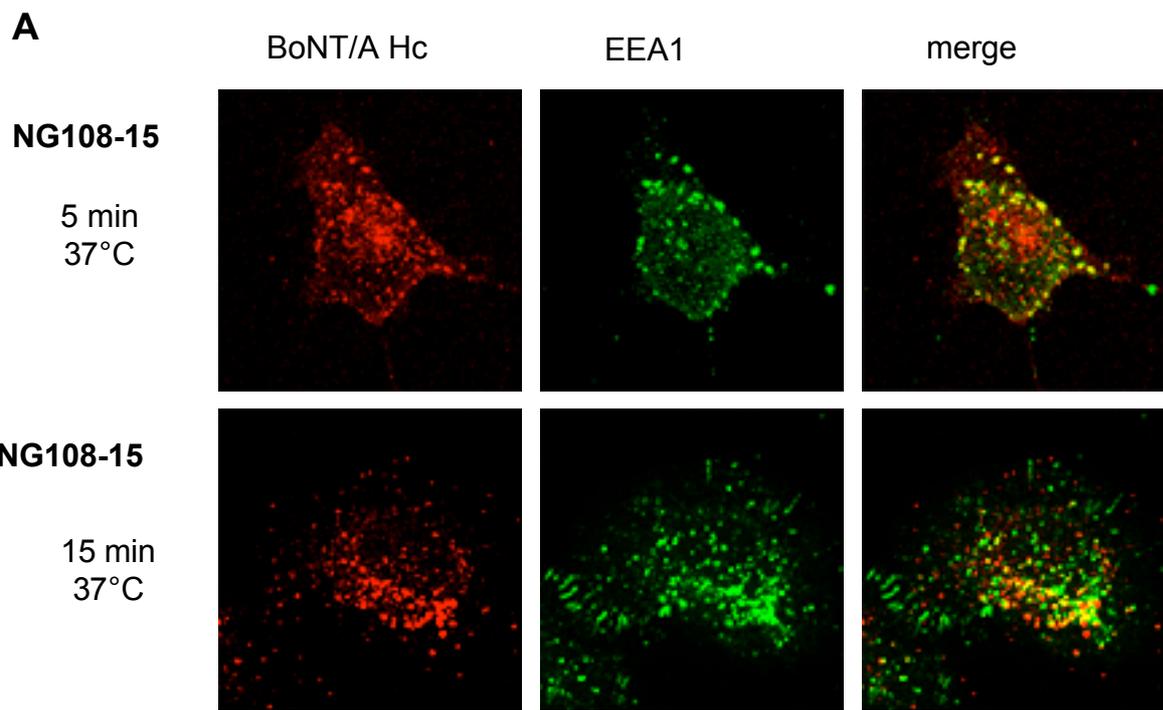
**Figure 4**



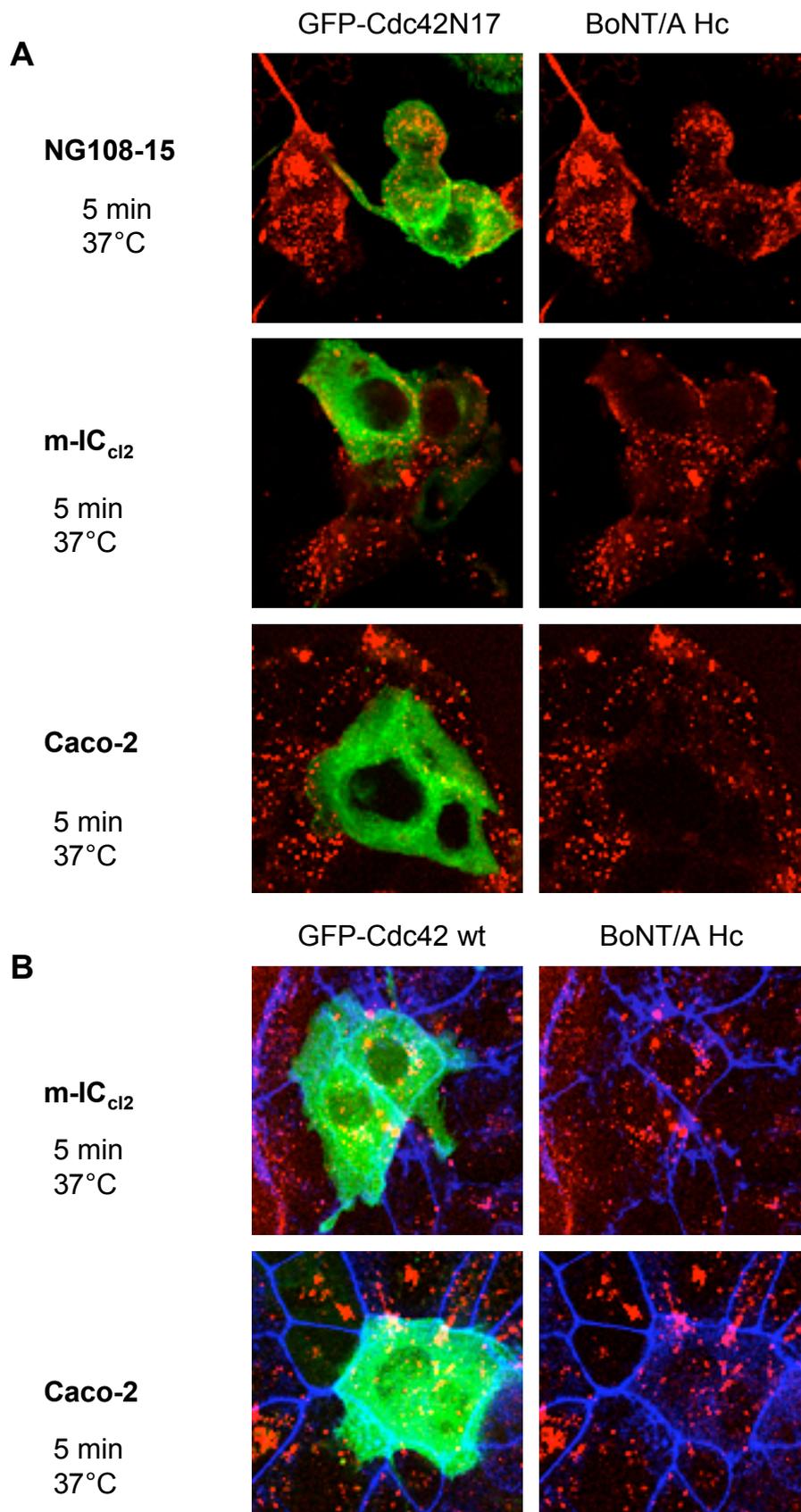
**Figure 5**



**Figure 6**

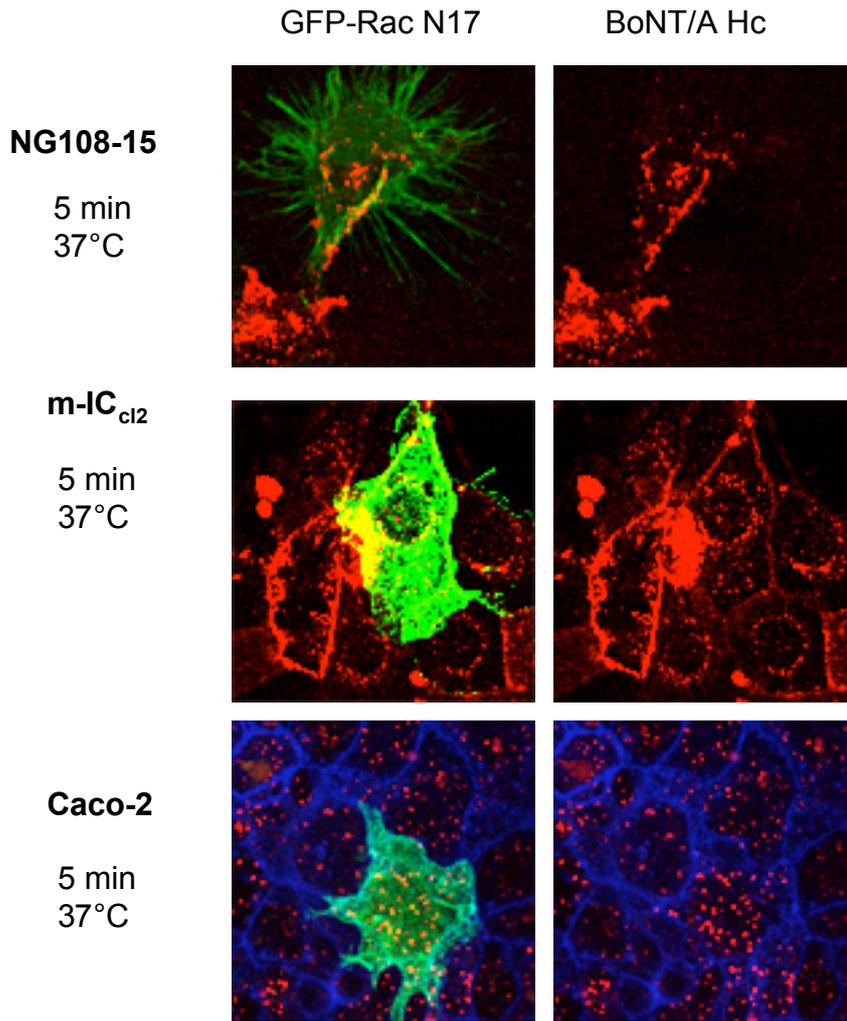


**Figure 7**

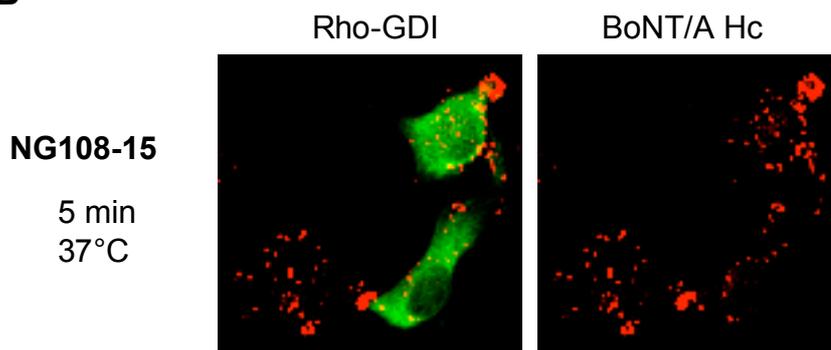


**Figure 8**

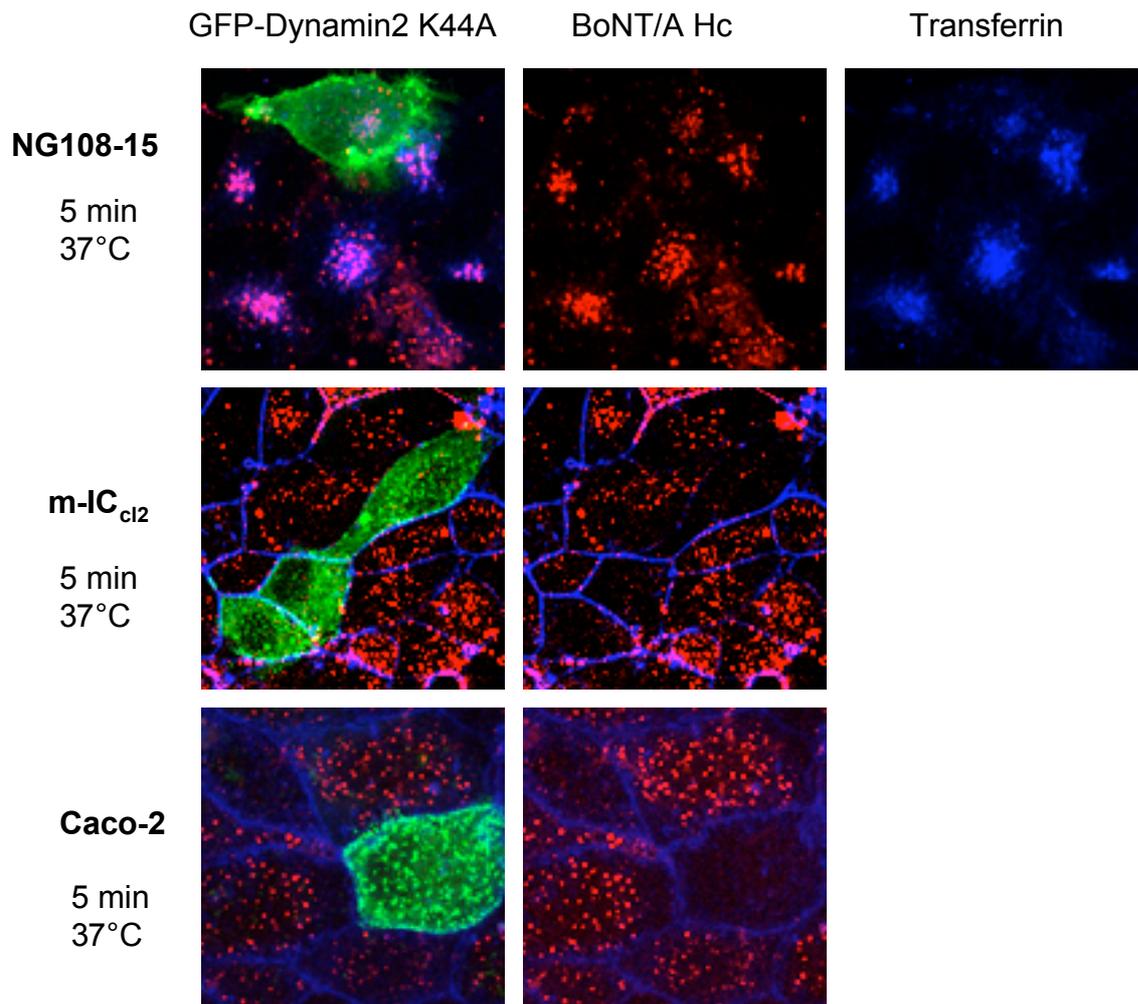
**A**



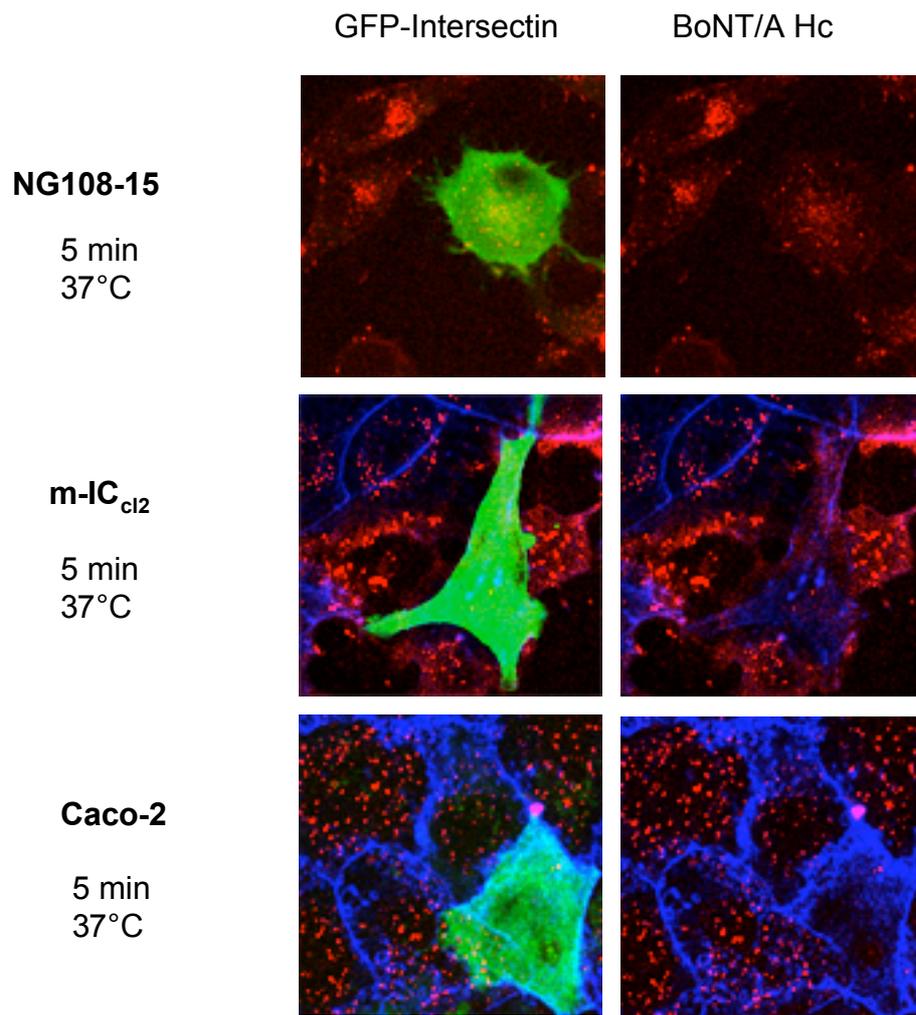
**B**



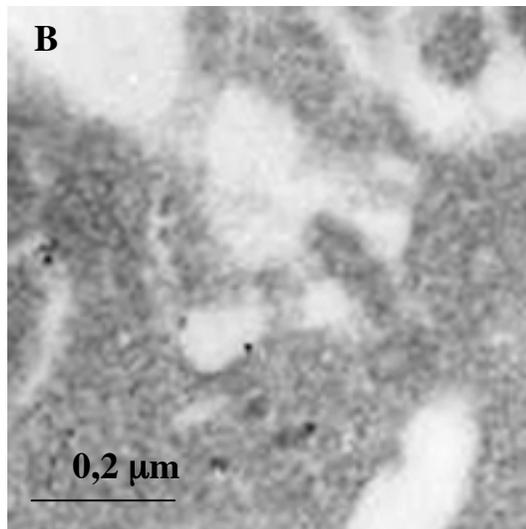
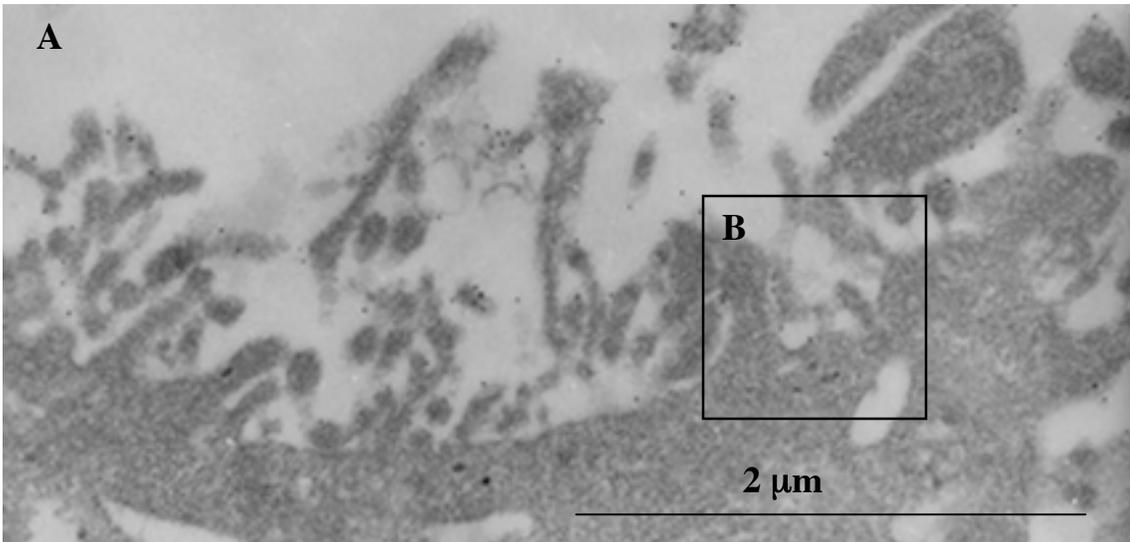
**Figure 9**



**Figure 10**



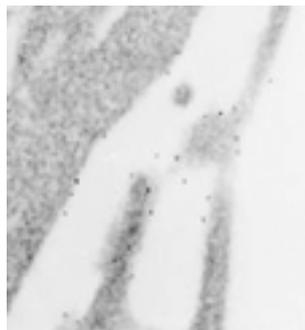
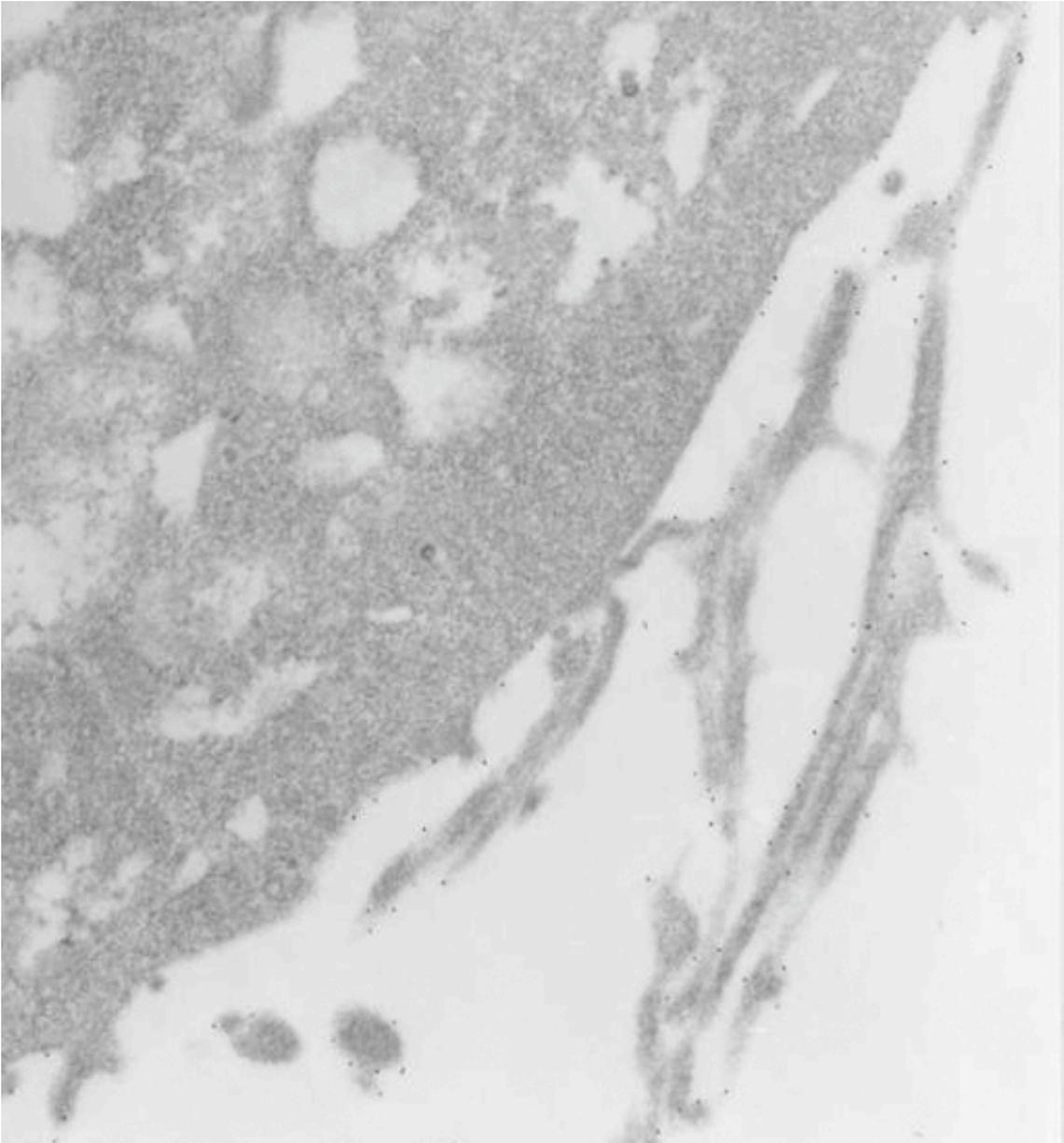
**Figure 11**



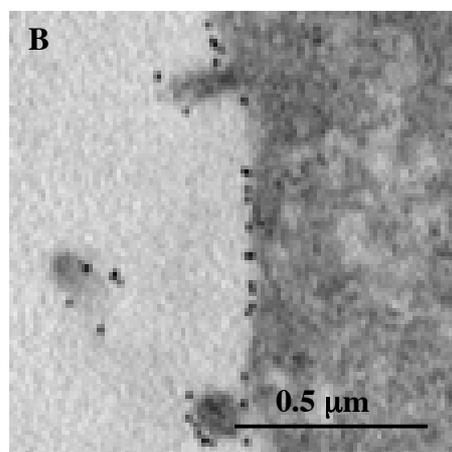
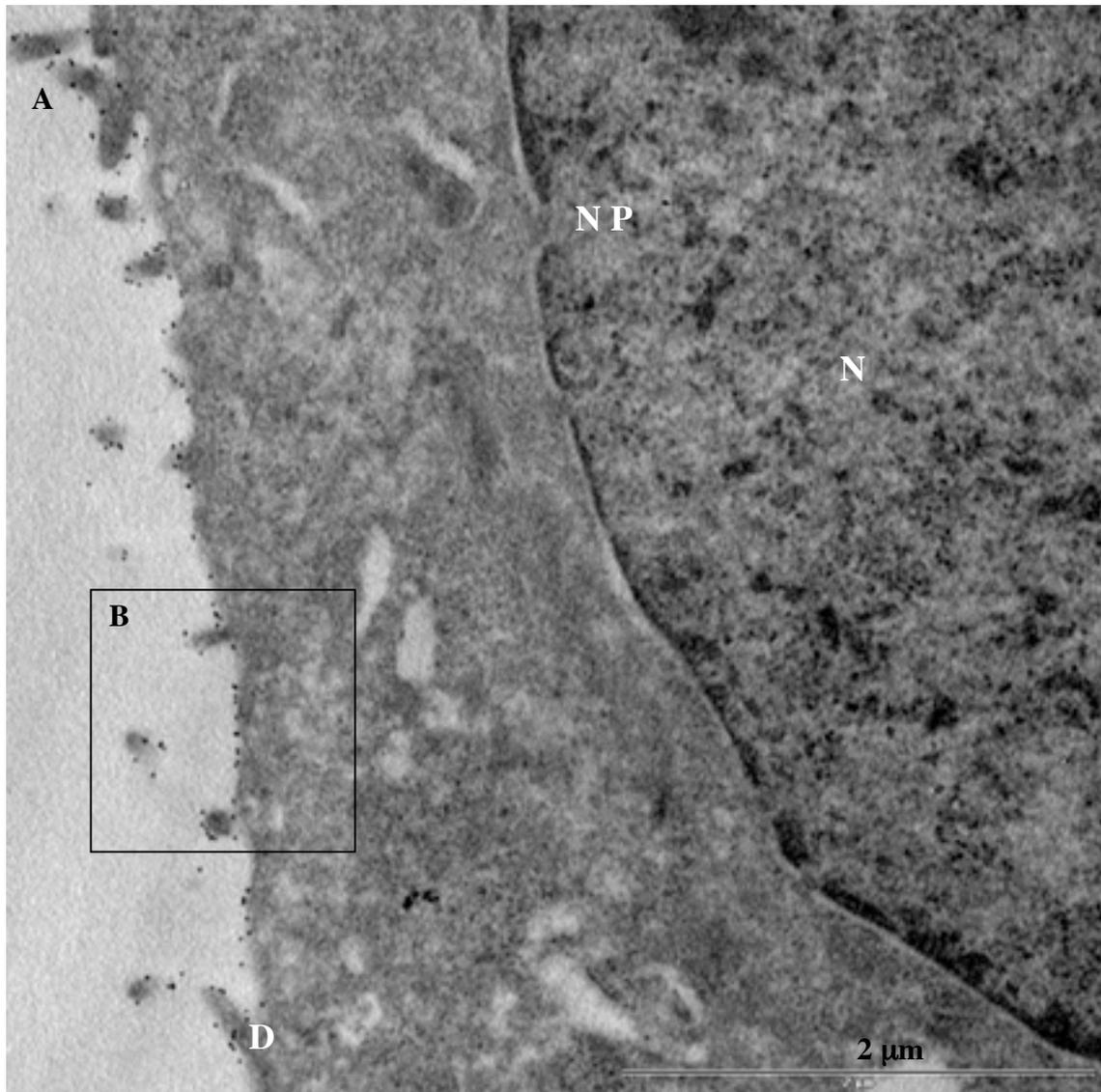
Suppl. Fig. 1

**m-IC<sub>d2Hc</sub> HcA 30 min / 4°C + gold 10 nm**

**Gif**

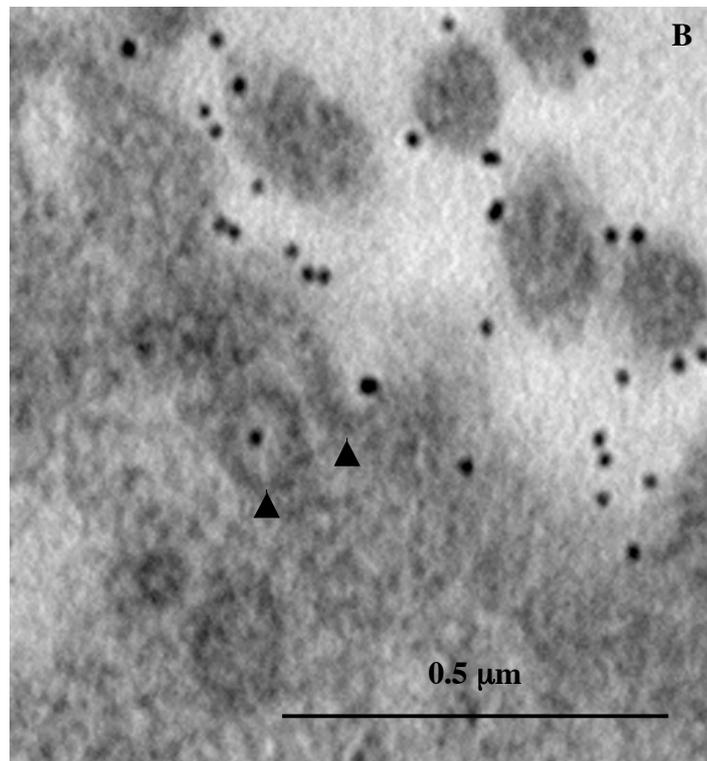
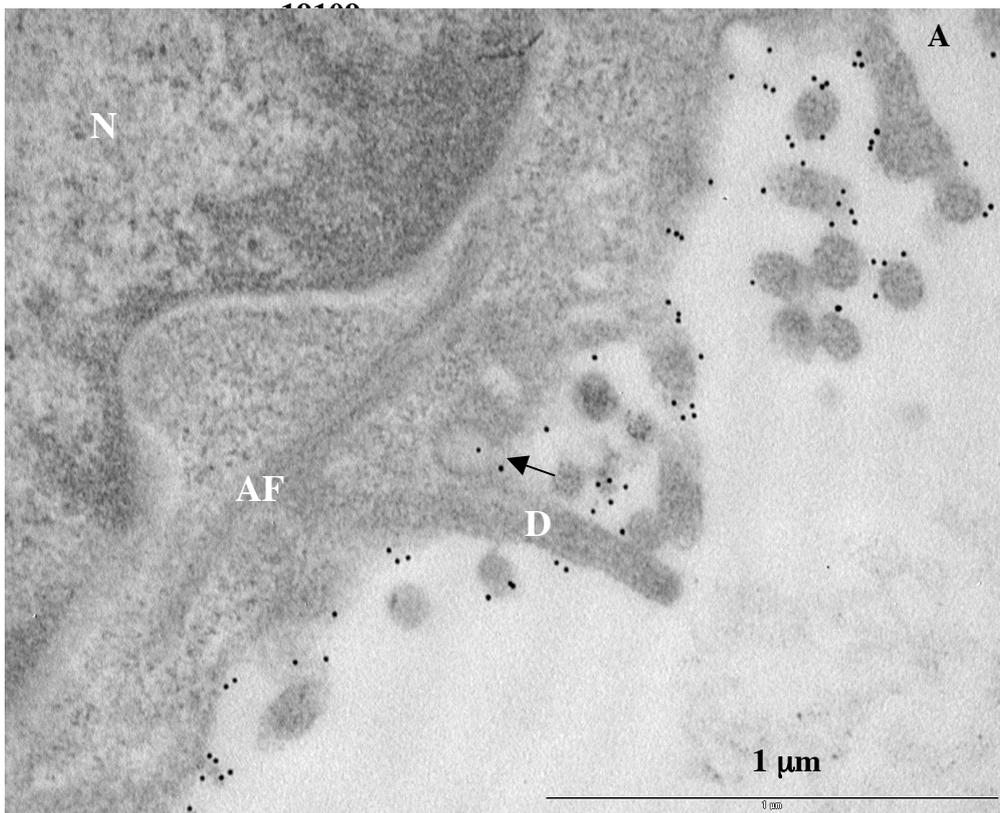


NG108-15 HcA 30 min / 4°C + gold 10 nm  
19114



Suppl. Fig. 2

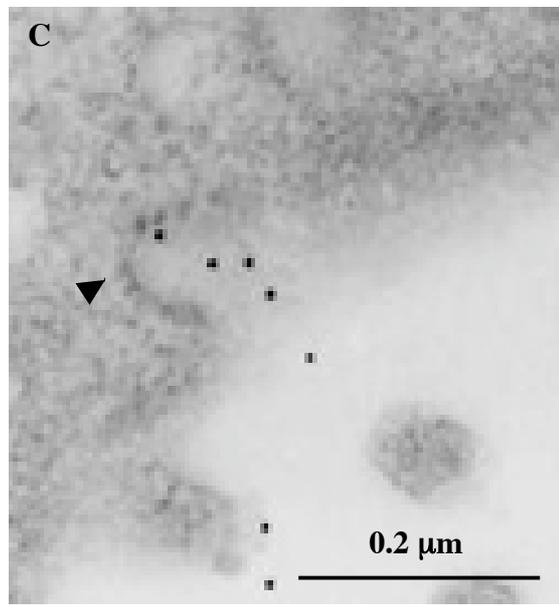
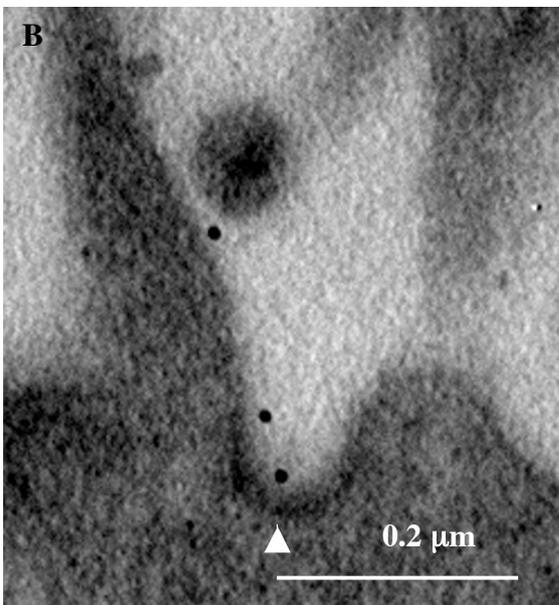
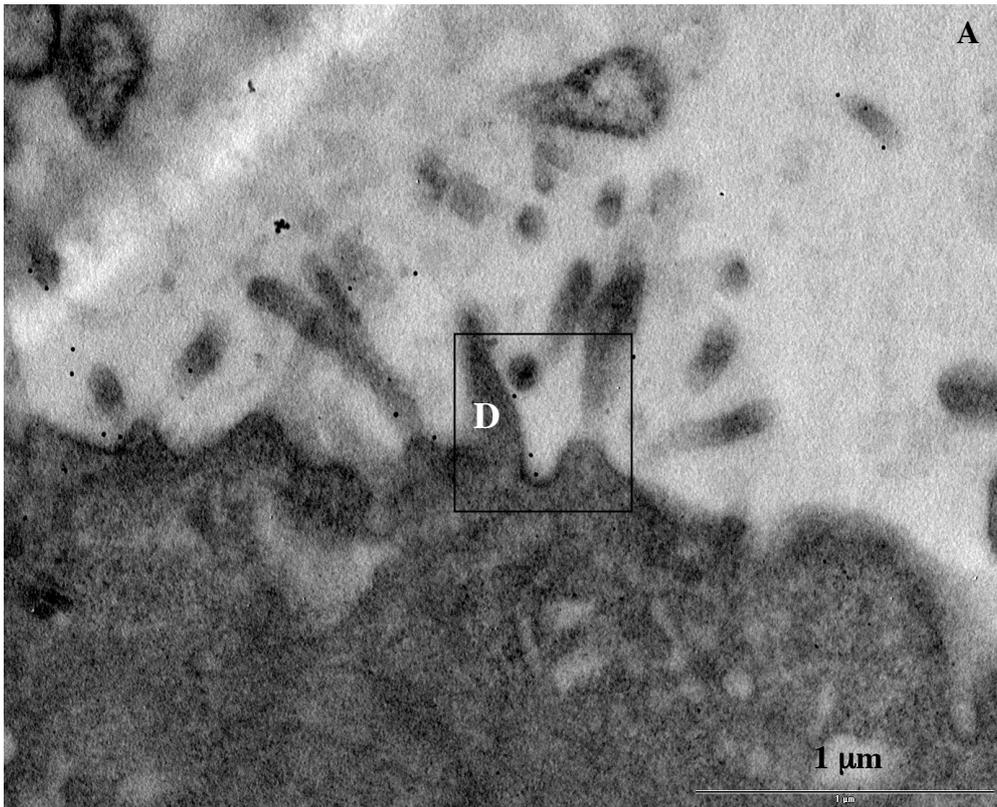
NG108-15 HcA 30 min / 4°C + gold 10 nm



Suppl. Fig. 3

NG108-15 HcA 10 min / 37°C + gold 5 nm

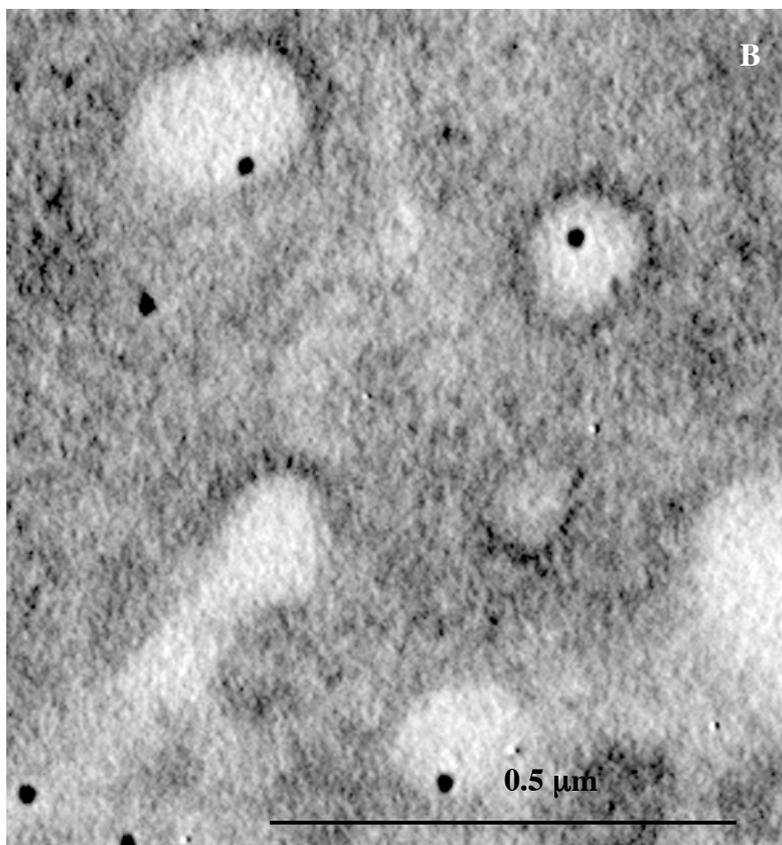
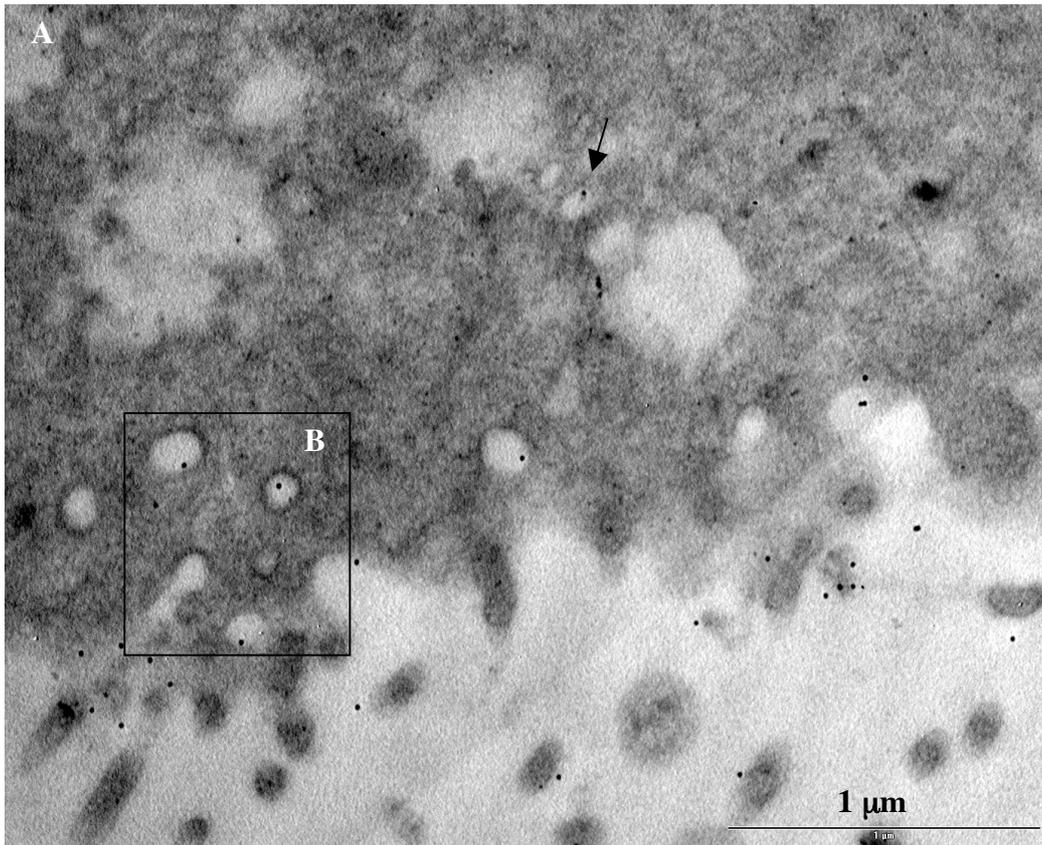
19028



Suppl. Fig. 4

NG108-15 HcA 10 min / 37°C + gold 5 nm

19038



Suppl. Fig. 5

## 5 Discussion et perspectives

Ce travail de thèse a permis d'aborder deux aspects importants et encore mal connus relatifs au botulisme et à la neurotoxine botulique, à savoir la régulation de la synthèse des complexes botuliques chez *C. botulinum* et le processus d'entrée de BoNT dans l'organisme par la voie intestinale. Une connaissance approfondie de ces deux thématiques contribuerait à mieux appréhender les physiopathologies de cette affection ainsi qu'à développer de nouvelles stratégies de prévention comme la maîtrise de la production des complexes botuliques dans les aliments ou le tractus intestinal, le blocage de l'entrée de BoNT au niveau de la barrière intestinale et l'optimisation de BoNT en tant qu'agent thérapeutique.

Malgré de nombreuses difficultés techniques rencontrées au cours de cette étude, des résultats significatifs ont été apportés quant à la cinétique d'expression des gènes de BoNT/A et des protéines associées, au passage de BoNT/A à travers la muqueuse intestinale et son processus d'entrée dans les cellules épithéliales (assurant son transport) et dans les cellules neuronales cibles. Une des difficultés majeures tient au fait que la neurotoxine botulique, la plus puissante des toxines, agit à de très faibles concentrations *in vivo*, incompatibles avec les techniques actuelles de détection, et que les modèles expérimentaux restent largement moins sensibles à BoNT. De plus, le marquage fluorescent du fragment recombinant de BoNT/A, à un niveau suffisant et sans altération de l'activité biologique, s'est révélé être particulièrement délicat. La maîtrise des conditions de marquage a permis d'explorer le trafic de la neurotoxine botulique dans des essais *ex vivo* et sur des cultures cellulaires.

### 5.1 Discussion

#### 5.1.1 L'expression synchrone des gènes de la neurotoxine botulique, des protéines associées et du régulateur BotR est finement régulée lors de la croissance bactérienne.

La régulation de la toxinogénèse est un point critique de la maîtrise des risques biologiques mais également de la mise au point de méthodes de production de toxines utilisables à des fins thérapeutiques. L'étude de ce phénomène est donc d'un intérêt certain pour les diverses applications utilisant BoNT.

Grâce à sa sensibilité, la méthode de PCR en temps réel a permis de détecter les bas niveaux d'expression du régulateur BotR et de quantifier précisément les niveaux d'expression des gènes de la neurotoxine botulique A et des protéines non-toxiques associées. Les résultats obtenus pour deux souches de *C. botulinum* A ont montré que l'expression de *bont/A* et des *antps* est synchrone et maximale lors de la transition entre la phase exponentielle de croissance et la phase stationnaire. La production de la neurotoxine botulique A et des complexes a été quantifiée en déterminant le titre en dose létale souris par ml de surnageant de culture, une des méthodes les plus sensibles de détection de la toxine. La toxicité du surnageant augmente progressivement au cours de la phase exponentielle pour atteindre son niveau maximal quelques heures après le pic d'expression des gènes des complexes botuliques. Le titre en toxine reste alors constant sur plusieurs jours (au moins 5 j).

Les niveaux d'expression de *botR* sont inférieurs à ceux des autres gènes du locus d'un facteur 100, ce qui est en accord avec la fonction régulatrice de la protéine. Les niveaux d'expression des gènes *bont/A* et *ntnh* d'une part, et des trois *has* d'autre part sont similaires, confortant les résultats montrant une organisation du locus botulique en un opéron bicistronique et un opéron tricistronique (Dineen *et al.*, 2004).

L'expression du régulateur BotR, qui n'avait jusqu'alors été que très faiblement détectée par des méthodes d'hybridation avec des sondes radiomarquées (Dineen *et al.*, 2004), a été pour la première fois quantifiée. L'allure de la cinétique d'expression du régulateur BotR et de la toxine peut être comparée à celle de l'expression d'autres régulateurs de la production de toxine chez *Clostridium*. C'est le cas notamment de TcdR, impliqué dans la régulation des toxines A et B chez *C. difficile*, qui est exprimé lors de l'entrée en phase stationnaire (Dupuy and Sonenshein, 1998). BotR et TcdR constitueraient, avec TetR régulant la production de la neurotoxine tétanique chez *C. tetani* et UviA contrôlant l'expression d'une bactériocine chez *C. perfringens*, une nouvelle sous-famille de facteurs sigma alternatifs (Dupuy *et al.*, 2006).

L'analyse de l'expression du gène *bont*, relativement à l'expression de l'ARNr 16S, a été réalisée dans des souches de type B (Lovenklev *et al.*, 2004; Sharkey *et al.*, 2004). Les plus hauts niveaux d'expression ont été observés en fin de phase exponentielle, avec une augmentation par rapport au début de phase exponentielle variant d'un facteur 3 à 10 selon les souches. Les niveaux restent alors constants en phase stationnaire, et augmentent environ 30 h après inoculation.

Une analyse similaire à celle réalisée dans notre laboratoire, mais portant uniquement sur le gène *bont/A*, a été effectuée sur 5 souches de *C. botulinum* de type A, dont la souche Hall (ATCC3502) (Shin *et al.*, 2006). Les résultats exposés sont en accord avec ceux que nous avons obtenus, à savoir un pic de l'expression (facteur 35) de *bont/A* lors de la transition entre les phases de croissance exponentielle et stationnaire. Les niveaux de toxine, détectés dans le surnageant par test ELISA, sont maximales en début de phase stationnaire et restent stables jusqu'à 50 h après inoculation.

De même, une étude récente a comparé l'expression et la libération de la neurotoxine de type A dans le surnageant de culture des souches Hall et NCTC2916, soit exactement le même matériel utilisé dans notre travail (Rao *et al.*, 2007). Les méthodes employées sont assez similaires, à part que la quantification de l'expression de *bont/A* n'est pas basée sur les résultats d'une PCR en temps réel après la transcription inverse mais d'une quantification des produits de PCR par coloration au BET. La production de toxine a été quantifiée par la détermination de la dose létale sur souris par injection en intraveineuse et par la technique de Western blot en utilisant des anti-BoNT/A. Les résultats de transcription exposés dans ce manuscrit montre une cinétique d'expression similaire à celle observée dans notre étude pour la souche Hall, à savoir un pic en fin de phase exponentielle de l'expression de *bont/A*. Cependant, pour la souche NCTC2916, un retard dans la cinétique d'expression est noté avec un pic d'expression décalé dans le temps par rapport à la souche Hall. Mais la cinétique de croissance de la souche Hall décrite dans l'article est différente de celle de la souche NCTC2916, et l'analyse de l'expression de *bont/A* à un point de cinétique compris entre 7 h et 13 h aurait peut-être pu permettre de détecter une valeur plus élevée. En effet, nous avons remarqué que le pic d'expression est assez transitoire en fin de phase de croissance exponentielle et l'analyse de plusieurs prélèvements est nécessaire dans cette fenêtre de cinétique pour détecter le maximum d'expression de *bont/A*. Par ailleurs, il faut noter que la souche NCTC2916 utilisée dans nos conditions expérimentales sporulait dès l'entrée en phase stationnaire contrairement à ce qui est décrit dans les résultats de Rao *et al.*. Ceci pourrait expliquer les niveaux d'expression élevés de *bont/A* mesurés au temps 24 h pour la souche NCTC2916 et le retard de la libération de la toxine dans le surnageant (détectée au temps 15 h) observée dans leur étude, contrairement aux résultats que nous avons obtenus pour la même souche à savoir une faible expression de *bont/A* en phase stationnaire et la détection de quantité importante neurotoxine dès 7 h de culture, la formation de spores favorisant la libération de la neurotoxine dans le surnageant. Par ailleurs, il est intéressant de noter qu'une

différence d'activité protéasique entre les souches Hall et NCT2916 a été mise en évidence, confortant notre hypothèse concernant la présence d'une ou de plusieurs protéase(s) particulièrement active(s) dans le surnageant de la souche Hall.

Enfin, une dernière étude portant les gènes de la toxine et des ANTPs de type D a comparé leurs niveaux d'expression entre trois points de cinétique de croissance, à savoir milieu de phase exponentielle (6,5 h), début de phase stationnaire (12 h) et phase stationnaire (24 h) (Kouguchi *et al.*, 2006). Il est à noter que la souche de *C. botulinum* D utilisée a la particularité de produire, en plus des complexes M (280 kDa) et L (650 kDa), des complexes intermédiaires de 410, 540 et 610 kDa. La quantification de l'expression des gènes par PCR en temps réel a montré que *bont/D* et *ntnh* sont exprimés à des niveaux comparables et égaux aux trois temps analysés, contrairement aux *has* dont les niveaux d'expression sont supérieurs et augment au cours du temps. Une différence d'expression est également observée entre *ha33* et les deux autres *has*, ce qui pourrait être une particularité de cette souche et expliquer la présence de complexes botuliques de taille inférieure au complexe L. L'analyse des transcrits par hybridation de sonde radiomarquée n'a révélé la présence que de deux transcrits, *bont/D-ntnh* et *ha33-ha17-ha70*, et n'a pas détecté de transcrit *ha17-ha70* expliquant les différences de niveaux d'expression observées entre les *has*. La détection des composants des complexes botuliques en Western blot a mis en évidence la présence de BoNT/D et des ANTPs dans les bactéries dès 6,5 h après inoculation et dans le surnageant seulement après 12 h de culture.

Il a été montré que la température (42 °C) est un facteur de régulation de la toxinogénèse chez *C. difficile*, agissant négativement sur le régulateur TcdR et donc sur la production des toxines A et B. Des expériences similaires ont donc été réalisées chez *C. botulinum* A en incubant la souche à 44°C au lieu de 37°C. Si les cinétiques de croissance et d'expression sont identiques entre les deux températures, une baisse significative de la toxicité détectée dans le surnageant a été mise en évidence dans les cultures incubées à 44°C à des temps ultérieurs à 12 h après inoculation. L'incubation à 44°C du surnageant d'une culture de la souche Hall incubée à 37°C a reproduit la baisse de titre en toxine, qui peut être corrélée à une dégradation de la BoNT/A et de NTNH, mais pas des HAs, visualisée en Western blot. L'action d'une métalloprotéase dépendante du Ca<sup>2+</sup> et activée à température élevée a été mise en cause dans la dégradation de la toxine à 44°C.

L'activité de cette protéase sur le surnageant d'une souche d'un type de *C. botulinum* non protéolytique, le type E, a été démontrée en le mélangeant à un surnageant de la souche Hall de type A et en incubant le mélange à 44°C. Alors que la toxine BoNT/E présente dans le surnageant pur n'est pas dégradée et que le titre en toxine reste constant à 44°C, la toxine BoNT/E présente dans le mélange des deux surnageants est dégradée et le titre en toxine BoNT/E diminue fortement après incubation à 44°C. BoNT/E qui n'est pas activée à 37°C par la protéase présente dans le surnageant de la souche Hall, est donc dégradée à 44°C comme BoNT/A.

Cette protéase présente toutes les propriétés de la protéase isolée du surnageant de culture de la souche Hall et caractérisée par M.L. Dekleva et B.R. DasGupta (Dekleva and DasGupta, 1990). Il a notamment été montré que BoNT/A est dégradée en plusieurs fragments suite à une heure d'exposition à cette protéase à pH 6,0-6,4, correspondant au pH approximatif d'un surnageant de culture d'une souche de type A 24 h après inoculation.

L'influence de la sporulation, qui est un phénomène hautement régulé comme la toxinogénèse, a été testée chez deux souches de *C. botulinum* A, l'une (NCTC2916) sporulant beaucoup plus efficacement que l'autre (Hall). La quantification de l'expression des gènes du locus botulique et des titres en toxine dans le surnageant de culture n'a montré aucune différence significative pour les deux souches selon les conditions de sporulation. Il ne semble

pas y avoir d'interférence entre ces deux phénomènes, même si les signaux déclenchant leur régulation pourraient être similaires puisque la sporulation et le pic d'expression des gènes interviennent au même moment de la cinétique de croissance, à savoir l'entrée en phase stationnaire. L'identité de ces signaux reste largement méconnue à l'heure actuelle, tout comme celle des acteurs de la cascade de sporulation qui ne seraient pas homologues à ceux intervenant chez *Bacillus* (Worner *et al.*, 2006; Sebahia *et al.*, 2007).

Par ailleurs, il a été montré que la présence de glucose et d'autres sucres rapidement métabolisables inhibe l'expression des toxines A et B de *C. difficile*, suggérant une forme de répression catabolique (Dupuy and Sonenshein, 1998). Il a été récemment montré que le régulateur global CodY, caractérisé chez *Bacillus subtilis* comme réprimant l'expression d'une centaine de gènes pendant la croissance rapide dans des conditions de richesse en nutriments, est un répresseur de l'expression des gènes des toxines chez *C. difficile*, en interagissant fortement avec la région promotrice de *tcdR* (Dineen *et al.*, 2007).

Contrairement à ce qui est observé chez *C. difficile*, la présence de glucose dans le milieu de culture n'inhibe pas la production de neurotoxine chez *C. botulinum* et le milieu généralement utilisé pour les cinétiques de croissance et la production de toxine contient 5 g/l de glucose.

Enfin, l'analyse de l'expression de *bont/E* et de *p47* a révélé une cinétique d'expression similaire à celle observée pour *bont/A*, en dépit du fait qu'aucun gène codant pour une protéine homologue à BotR n'ait été identifiée jusqu'à présent dans le locus botulique de type E ou ailleurs dans le génome. Les niveaux d'expression des gènes *bont/E* et de *p47* sont similaires, ce qui est en accord avec les données d'analyse des transcrits réalisée dans la souche Kyoto F de type A2 montrant un transcrite tricistronique *p47-ntnh-bont/A* (Dineen *et al.*, 2004). Lors du séquençage des gènes du locus botulique de 36 souches de *C. botulinum* E, un nouveau gène a été découvert, *orfx3*, de manière similaire à ce qui avait été publié pour les souches de type A2 (Chen *et al.*, 2007). Cependant, aucune séquence d'ADN caractéristique d'un promoteur n'a été mise en évidence en amont des gènes *orfx1*, *orfx2* et *orfx3*, et leur rôle dans la formation de complexe avec la neurotoxine reste à déterminer. Par ailleurs, l'absence d'éléments d'insertion laisserait supposer que les souches ayant les gènes des *orfxs* proviendraient d'un ancêtre commun dans l'évolution du locus botulique mais la variabilité du pourcentage (%) de GC entre ces gènes (*orfx1* montrant le % le plus faible et *orfx3* le % le plus élevé parmi les gènes du locus) vient contrecarrer cette hypothèse et tend à suggérer une émergence de ces gènes à partir d'une origine plus hétérogène. Le mécanisme de régulation intervenant chez *C. botulinum* E ainsi que la contribution des OrfX dans la formation des complexes botuliques restent à déterminer.

### 5.1.2 BoNT/A passe la muqueuse intestinale par un mécanisme de transcytose qui a lieu préférentiellement au niveau des cryptes intestinales.

Le botulisme se caractérise par une paralysie flasque descendante due à l'inhibition par la neurotoxine botulique de la neurotransmission au niveau des jonctions neuromusculaires. Trois modes d'acquisition de la maladie ont été décrites : le botulisme par blessure, l'ingestion d'aliments contaminés par BoNT ou la colonisation de l'intestin par des *Clostridium* neurotoxigènes. Dans les deux derniers cas le passage de BoNT au niveau de l'intestin a été suspecté depuis de nombreuses années, mais le mécanisme de transport de la toxine à travers la muqueuse vers le milieu intérieur et les terminaisons nerveuses des motoneurons est assez mal connu. Une caractérisation plus précise du transport de la toxine à travers la barrière intestinale, qui constitue la première étape de l'intoxication, permettrait de mieux comprendre comment la neurotoxine est capable d'atteindre sa cible.

Les sites potentiels de liaison de BoNT/A à l'intestin ont été révélés en incubant des cryocoupes d'intestin de souris avec le domaine de liaison Hc de BoNT/A (Hc/A) marqué par un fluorophore. Les images obtenues en microscopie confocale ont montré que le Hc/A se fixe principalement sur certaines cellules, notamment au niveau des cryptes intestinales et des plexus nerveux présents dans la sous-muqueuse et la musculature intestinales, mais très faiblement sur la bordure en brosse des entérocytes des villosités intestinales. Des expériences similaires réalisées par l'équipe de Fujinaga *et al.* ont montré un marquage des microvillosités intestinales par les complexes de type A et C ainsi que par les hémagglutinines HA34 et HA52, et non par la toxine seule, révélés par détection indirecte sur des coupes intestinales de cobaye (Fujinaga *et al.*, 2000; Fujinaga *et al.*, 2004). Seules l'extrémité des villosités est visible sur les photos présentées de coupes intestinales, ce qui ne permet pas d'observer un éventuel marquage des cryptes intestinales par la toxine seule ou en complexe, même si aucun élément allant dans ce sens n'est indiqué dans le texte des articles.

La reconnaissance de récepteurs potentiels au niveau des cellules intestinales de type crypte plutôt que celles de type entérocyte nous a orienté vers le choix d'une lignée de cellules épithéliales intestinales de chaque type, à savoir m-IC<sub>cl2</sub> et Caco-2 respectivement, pour l'étude du transport de BoNT/A à travers un modèle d'épithélium intestinal.

Le système de culture de cellules épithéliales intestinales en monocouche sur filtre a permis de caractériser le passage de BoNT/A d'un pôle à l'autre des cellules. La quantification de la toxine biologiquement active a été réalisée par détermination du titre en doses létales par injection intrapéritonéale chez la souris. Une transcytose apico-basolatérale de BoNT/A, bloquée à 4°C et dépendante de la liaison du domaine Hc de BoNT/A aux cellules a été mise en évidence, ce qui est en accord avec les résultats présentés par l'équipe de L. Simpson (Maksymowych and Simpson, 1998; Maksymowych and Simpson, 2004).

Aucune différence significative n'a été observée entre le passage de la neurotoxine botulique A purifiée et celui du complexe botulique de type A après incubation à 37°C pendant 3 h. De plus, aucune modification des jonctions serrées ou d'adhérence n'a été mise en évidence en imagerie ou par la mesure de la TER sur les cellules exposées à la toxine (purifiée ou en complexe) et incubées pendant 3 h. L'implication des hémagglutinines dans l'absorption des complexes botuliques de type B au niveau de l'intestin a récemment été documentée (Matsumura *et al.*, 2007). Suite à l'exposition des cellules intestinales cultivées sur filtre aux complexes botuliques de type B, une baisse de la TER due à l'action des HAs, sur plus de 48 h lorsque le pôle apical est exposé ou en quelques heures au niveau du pôle basolatéral, a été observée. En parallèle, une modification des jonctions serrées et d'adhérence a été visualisée sur des cellules exposées au complexe botulique de type B pendant 24 h. Il faut noter que les temps d'incubation continue en présence du complexe au pôle apical nécessaires pour observer un effet notoire sur les jonctions cellulaires sont largement supérieurs à ceux utilisés dans nos expériences de transcytose. De plus, les pôles apicaux des cellules ont été exposés au complexe à 4°C seulement avant d'être incubées dans le milieu seul pendant 3 h. Les données que nous avons obtenues n'excluent donc pas la possibilité d'un rôle accessoire des HAs facilitant le passage de BoNT dans des conditions d'exposition prolongée aux complexes botuliques. Cependant, le mécanisme d'action des HAs sur les jonctions reste largement méconnu et aucune activité notable des HAs sur l'occludine n'a pour l'instant été mise en évidence (Matsumura *et al.*, 2007). De plus, certaines souches de *C. botulinum*, notamment de type E et F, ont été impliquées dans des cas de botulisme dus à une intoxication alimentaire alors que les complexes botuliques produits ne comprennent pas d'hémagglutinines (Weber *et al.*, 1993; Harvey *et al.*, 2002).

L'efficacité de passage de BoNT/A s'est révélée être supérieure dans la lignée de type crypte (de l'ordre de 1%) que dans la lignée de type entérocyte (de l'ordre de 0,1%). Ces résultats ont été confirmés par les expériences de liaison de la protéine recombinante Hc/A fluorescente aux différentes lignes cellulaires. La quantification de la liaison en cytométrie de flux, utilisée pour l'étude de la liaison de la toxine iota de *C. perfringens* aux cellules (Stiles *et al.*, 2000), a montré que l'intensité de la liaison de Hc/A aux cellules neuronales est supérieure à celle détectée avec les cellules intestinales, la liaison à la lignée de type crypte m-IC<sub>cl2</sub> étant plus forte que la liaison à la lignée de type entérocyte Caco-2. La visualisation en microscopie confocale de la liaison du Hc/A aux cellules a conforté ces résultats. Le domaine Hc de la neurotoxine est donc capable de se fixer de manière spécifique aux cellules neuronales et intestinales, indépendamment de la présence des HAs contrairement aux résultats obtenus par l'équipe de Fujinaga (Fujinaga *et al.*, 2000).

Un certain nombre d'étude ont montré l'implication des gangliosides, notamment GT<sub>1b</sub> et GD<sub>1b</sub>, dans la liaison des BoNTs aux cellules. La préincubation de Hc/A avec un mélange de gangliosides enrichi en GT<sub>1b</sub> et GD<sub>1b</sub> a fortement diminué la liaison du Hc/A aux cellules neuronales et intestinales. De même, la préincubation de BoNTA avec ce mélange a partiellement inhibé la transcytose de la toxine à travers les cellules intestinales, montrant l'importance des gangliosides dans la liaison fonctionnelle de la toxine et son transport dans les cellules intestinales. De plus l'enrichissement des membranes en gangliosides exogènes augmente légèrement la liaison du Hc/A aux cellules intestinales, mais en moindre mesure par rapport aux cellules non-neuronales et non-intestinales, indiquant que les gangliosides ne suffisent pas à assurer une liaison de haute affinité de Hc/A aux cellules. Au contraire, l'enrichissement en gangliosides des lignées cellulaires non-neuronales augmente de manière importante la liaison du domaine Hc de la toxine tétanique qui présente deux sites de liaison aux gangliosides contrairement au Hc de BoNT/A et BoNT/B qui n'en présente qu'un seul (Rummel *et al.*, 2004b; Conway *et al.*, 2006). De plus, une différence de sensibilité aux diverses formes de gangliosides a été mise en évidence entre les toxines tétanique et botuliques. En effet, les souris transgéniques avec absence de gène fonctionnel codant pour la GM<sub>2</sub>/GD<sub>2</sub> synthase, c'est-à-dire incapable de synthétiser les gangliosides GM<sub>1</sub>, GD<sub>1a</sub>, GD<sub>1b</sub>, GT<sub>1b</sub> et GQ<sub>1b</sub>, sont moins sensibles aux neurotoxines tétanique et botuliques (A et B) par injection intraveineuse, mais les souris transgéniques avec absence de gène fonctionnel codant pour la GD<sub>3</sub> synthase, c'est-à-dire incapable de produire les gangliosides de la série b (GD<sub>2</sub>, GD<sub>3</sub>, GD<sub>1b</sub>, GT<sub>1b</sub> et GQ<sub>1b</sub>) sont aussi sensibles à BoNT/A et BoNT/B que les souris normales, alors qu'elles sont moins sensibles à TeNT (Kitamura *et al.*, 1999; Kitamura *et al.*, 2005).

Il est donc probable que les gangliosides ne soient pas les seuls récepteurs aux toxines clostridiennes et il est largement accepté que des protéines exposées à la surface cellulaire sont impliquées dans la liaison des neurotoxines clostridiennes aux cellules. Les expériences menées ces dernières années ont permis de mettre en évidence le rôle de certaines protéines des vésicules synaptiques, notamment les synaptotagmines I et II permettant l'entrée de BoNT/B et BoNT/G dans les cellules neuronales et les trois isoformes de SV2 reconnus par BoNT/A (Dong *et al.*, 2003; Rummel *et al.*, 2004a; Dong *et al.*, 2006; Mahrhold *et al.*, 2006). La protéine recombinante, correspondant au domaine de l'isoforme C de SV2 suffisant à la liaison de BoNT/A (SV2C-L4), a été produite. La préincubation de BoNT/A avec SV2C-L4 a partiellement inhibé la transcytose de la toxine à travers les cellules m-IC<sub>cl2</sub>, laissant supposer une compétition entre le site de reconnaissance sur BoNT/A d'un récepteur protéique putatif à la surface des cellules intestinales et celui impliqué dans la liaison à SV2C-L4. Une protéine ayant des homologies avec le domaine SV2C-L4 et présente à la surface des cellules intestinales pourrait être impliquée dans la liaison de BoNT/A. En effet, la protéine SV2

présente des homologies avec des transporteurs de glucose, et des protéines apparentées pourraient être localisées au niveau des cellules intestinales. Par ailleurs, certaines cellules intestinales sécrétrices, notamment les cellules neuroendocines, présentent une immunoréactivité à SV2 (Portela-Gomes *et al.*, 2000) et pourraient être préférentiellement reconnues par BoNT/A.

Une protéine apparentée à SV2, appelée SVOP, présente des homologues chez plusieurs espèces animales, notamment *Caenorhabditis elegans* et *Drosophila melanogaster*, suggérant que SVOP est ancienne dans l'évolution, alors qu'aucun orthologue de SV2 n'a été détecté chez les invertébrés (Janz *et al.*, 1998). Comme SV2, SVOP contient 12 domaines transmembranaires mais n'est pas glycosylée et surtout n'a pas la boucle intracellulaire contenant le domaine reconnu par BoNT/A, ce qui a été confirmé par l'échec de la co-précipitation d'un domaine de SVOP et de BoNT/A (Dong *et al.*, 2006). SVOP n'est donc pas reconnue par BoNT/A et les animaux dépourvus de SV2 (détectée chez de nombreuses espèces de vertébrés, y compris les poissons, les oiseaux et les mammifères (Buckley and Kelly, 1985)) devraient être moins sensibles à BoNT/A.

La caractérisation des récepteurs de nature protéique présents à la surface des cellules intestinales reste à compléter et ils pourraient être différents pour les divers types de toxines botuliques, expliquant en partie les différences de toxicité orales observées selon les types de toxines et les espèces animales intoxiquées.

### **5.1.3 BoNT/A, injectée dans la lumière intestinale, cible préférentiellement des terminaisons nerveuses cholinergiques dans la sous-muqueuse et la musculature intestinale.**

Une autre approche (*ex vivo*) de l'étude de l'interaction de Hc/A et BoNT/A avec les cellules intestinales et neuronales est l'utilisation de segments d'intestin de souris. L'injection de toxine dans des anses intestinales ligaturées a été une des premières expériences réalisées pour montrer un passage de la toxine botulique de la lumière de l'intestin vers la circulation générale, à savoir le sang et la lymphe (Heckly *et al.*, 1960; Sugii *et al.*, 1977b).

Les contractions spontanées de l'intestin sont dues essentiellement au contrôle nerveux intrinsèque qui innerve, via des cellules spécialisées appelées cellules interstitielles de Cajal, les fibres musculaires lisses enveloppant le tube digestif. Ainsi, un fragment d'intestin, placé dans un bain d'une solution physiologique oxygénée se contracte régulièrement pendant plusieurs heures (au moins 4 h dans nos conditions expérimentales). L'effet de BoNT/A, injectée dans la lumière d'un segment d'intestin prélevé et ligaturé, sur les contractions spontanées a été mesuré (dans le sens longitudinal). Au cours de l'intoxication, une baisse de la fréquence des contractions mécaniques longitudinales est observée à partir d'une heure et surtout après deux heures. Aux temps tardifs de l'intoxication, une irrégularité des contractions est notée, avec des périodes de l'ordre de 1 à 2 min sans aucune contraction. Cette inhibition de la contraction des muscles lisses est présynaptique, comme le montre la forte contraction induite par l'ajout de carbachol, un agoniste des récepteurs de l'ACh. De plus, les contractions stimulées électriquement sont également réduites suite à l'intoxication par injection intraluminale de BoNT/A.

La neurotoxine botulique A, injectée dans la lumière intestinale, a donc un effet paralysant sur l'activité motrice de l'intestin en inhibant la transmission nerveuse au niveau des muscles lisses de la paroi intestinale. Elle est donc passée à travers la muqueuse intestinale et a atteint des terminaisons nerveuses motrices, localisées dans la sous-muqueuse et / ou la musculature intestinale.

L'effet de BoNT/A a déjà été étudié sur certains muscles et sphincters du tractus digestif. Il a été notamment montré que BoNT/A diminue les contractions du pyllore stimulées

électriquement par inhibition de la libération d'ACh au niveau des nerfs cholinergiques à faible concentration et à concentration élevée par inhibition directe de la contraction des muscles (James *et al.*, 2003). L'injection par endoscopie de BoNT/A dans les sphincters de l'œsophage et d'Oddi (situé à l'extrémité du canal pancréatique et biliaire) entraîne une diminution de la tension mécanique de base de plus de la moitié (Pasricha *et al.*, 1993; Sand *et al.*, 1998). Enfin, l'effet sur les contractions stimulées électriquement de l'incubation d'un segment d'iléum de cobaye dans un bain contenant de la neurotoxine botulique A purifiée a été étudiée (MacKenzie *et al.*, 1982). Après 2 h d'exposition à 4,3 nM de BoNT/A ou 1 h à 8,4 nM de BoNT/A, une inhibition de 80% de l'amplitude de la réponse mécanique de l'iléum à la stimulation électrique transmurale a été mesurée. Ces études montrent que l'innervation cholinergique des muscles lisses du tractus gastro-intestinal peut être inhibée par une exposition directe à BoNT/A, mais l'étude que nous avons réalisé est la première, à notre connaissance, à montrer un effet de la toxine injectée dans la lumière intestinale sur la paroi musculaire intestinale. La paralysie des contractions spontanées des muscles lisses intestinaux, démontrée dans notre modèle d'intoxication, pourrait rendre compte des symptômes précoces de paralysie motrice intestinale, fréquemment observés dans les cas de botulisme par intoxication alimentaire ou toxi-infection, notamment décrit dans certains cas de botulisme infantile (Paton *et al.*, 1983) ou dans un cas sévère d'une fillette de 7 ans constipée pendant 425 jours (Kobayashi *et al.*, 2003).

Afin de visualiser le passage de la barrière intestinale de la toxine, une portion de la partie antérieure de l'iléum de souris a été prélevée et ligaturée avant d'injecter dans la lumière le fragment recombinant Hc/A fluorescent. L'analyse en microscopie confocale du tissu intestinal fixé *in toto* a révélé la localisation du signal du Hc/A fluorescent dans la zone des cryptes intestinales dans les temps précoces d'incubation (30 min), puis au niveau de certaines terminaisons nerveuses (colocalisées avec des anti-neurofilament) situées dans la sous-muqueuse après 60 min à température ambiante. Un faible marquage a été observé au niveau de terminaisons nerveuses dans la musculature à des temps tardifs d'incubation (90 min).

La colocalisation avec des marqueurs de différents types de neurones a montré que la grande majorité des terminaisons nerveuses marquées par le Hc/A fluorescent sont de type cholinergique, et moins fréquemment glutamatergiques ou sérotoninergiques. Le marquage de l'isoforme C de SV2 a révélé la présence de nombreuses structures immunoréactives dans les plexus sous-muqueux et myentérique, ainsi qu'autour des capillaires sanguins. Une colocalisation partielle du marquage de SV2 avec des structures neuronales (neurofilaments) et avec des structures gliales (révélées par des anti-GFAP) a été mise en évidence. Un comarquage d'une partie des terminaisons nerveuses marquées par le Hc/A avec SV2C a également été visualisée. Il faut noter que, malgré un marquage de SV2C le long de nombreuses extensions neuronales, le signal fluorescent du Hc/A est exclusivement détecté à l'extrémité des filets nerveux qui représentent probablement les zones où SV2C est accessible à la toxine. En comparaison, les cellules gliales présentant une immunoréactivité pour SV2C sont rarement marquées par le Hc/A. Le marquage par le Hc/A des filaments nerveux entourant les capillaires sanguins et fortement immunoréactifs pour SV2C n'a pas été observé.

Le domaine Hc de la neurotoxine est donc capable de passer la barrière intestinale, préférentiellement dans les cryptes au niveau de certaines cellules dont la caractérisation n'a pu être clairement établie par des colocalisations avec des marqueurs. Cependant, la morphologie des cellules épithéliales marquées par le Hc/A laisse supposer qu'elles pourraient être de type neuroendocrine. Mais des expériences complémentaires sont nécessaires pour décrire clairement cette étape, les contraintes étant une faible incidence du

marquage du Hc /A au niveau des cellules épithéliales associée à une forte autofluorescence de la muqueuse intestinale.

Le passage du fragment Hc/A de la lumière intestinal vers la muqueuse et la musculature a été visualisé et a montré que le Hc/A cible certaines cellules épithéliales et certaines terminaisons nerveuses intestinales, ce qui est en accord avec les données fonctionnelles décrites précédemment sur l'activité de BoNT/A au niveau de l'intestin. L'importance du ciblage de ces terminaisons nerveuses dans le déroulement de l'intoxication par BoNT/A n'est pas connu, mais dans le cas d'une toxi-infection, le ralentissement du transit intestinal tendrait à favoriser la colonisation par la souche de *Clostridium* neurotoxigènes. Par ailleurs, le mécanisme de passage de la toxine dans la circulation générale, notamment dans le sang reste à déterminer. Il pourrait s'agir, comme pour son transport dans les cellules épithéliales intestinales, d'une transcytose à travers l'endothélium des capillaires sanguins (cf. infer).

Cependant, la diffusion de BoNT/A par la circulation générale n'explique pas la paralysie descendante observée dans les cas de botulisme, quelque soit leur mode d'acquisition (par voie intestinale ou par blessure). Contrairement à la surface d'absorption intestinale potentielle remarquablement étendue, les terminaisons nerveuses motrices ciblées par BoNT/A représentent une infime partie du volume du corps humain accessible par la circulation générale. Existe-t-il une sensibilité à BoNT/A variable selon les terminaisons nerveuses ? Cette sensibilité est-elle exprimée au niveau de la liaison aux récepteurs membranaires ou au niveau de la présence de la cible intracellulaire (SNAP-25) ? Les gangliosides et la protéine SV2 sont largement exprimés dans les population de neurones et peuvent difficilement expliquer à eux seuls le ciblage spécifique des terminaisons cholinergiques, alors qu'il semble exister des différences quantitative et qualitative concernant SNAP-25 selon les neurones GABAergiques ou cholinergiques (Verderio *et al.*, 2007). S'il n'y a pas de différences d'affinité de BoNT/A pour tel ou tel type de terminaison et que la toxine est internalisée indifféremment, comment peut-elle être aussi puissante et agir à des quantités infinitésimales ? L'internalisation, et donc l'intoxication consécutive, des terminaisons nerveuses est-elle favorisée dans les terminaisons donc l'activité d'exo-endocytose est plus importante ? L'importance de l'inactivation de la cible par BoNT/A est-elle variable selon les terminaisons nerveuse ciblées, permettant d'expliquer la chronologie de la paralysie des différents muscles quelque soit le mode d'entrée de la toxine dans l'organisme ? On peut également se demander si les différents types de toxines, qui reconnaissent a priori différents récepteurs cellulaires et clive différents substrats, ont exactement les mêmes conséquences sur tous les types de neurones et sont à l'origine des mêmes symptômes. De plus, les isoformes des protéines SNAREs provenant des différentes espèces animales n'ont pas la même sensibilité à l'action enzymatique des neurotoxines. Ainsi, la protéine SNAP-25 de poulet ou du poisson Torpedo est résistante à l'action de BoNT/A, tout comme la protéine SNAP-23 humaine ou murine (Washbourne *et al.*, 1997; Vaidyanathan *et al.*, 1999).

La question de la spécificité d'espèce peut également être soulevée au niveau de l'absorption intestinale qui concerne les voies d'acquisition alimentaire du botulisme. En effet, il a été montré une corrélation entre la toxicité orale des complexes botuliques et leur stabilité qui est largement dépendante de la taille des complexes. Ainsi, plus la taille des complexes est importante, c'est-à-dire plus il y a d'ANTPs relativement à BoNT, plus la toxicité orale est élevée (Sugii *et al.*, 1977a; Ohishi and Sakaguchi, 1980). Cependant, des différences de stabilité existent entre les types de BoNTs. Ainsi, le complexe L de type B a la plus grande toxicité orale, qui est en partie due à une grande résistance au jus intestinal de rat, les complexes M et L de type C et D ayant une plus grande résistance aux jus gastriques de rat.

De plus, l'étude de la toxicité du complexe L de type C chez l'oie a montré que l'oie est moins sensible que la souris à BoNT/C, la dose létale minimale étant par voie intraveineuse (i.v.)  $10^3$  DL<sub>50</sub> (souris, en intrapéritonéale, i.p.), et par voie orale  $10^5$  DL<sub>50</sub> (souris, i.p.) (Ohishi *et al.*, 1981). Cependant, le ratio entre les doses minimales par voie orale vs par voie i.v. n'est que de 1 :100, alors que ce ratio est de 1 : 5000 chez la souris. Ces résultats suggèrent que l'absorption intestinale du complexe L de type C est plus efficace chez l'oie que chez la souris. De même, il a été montré que ce ratio chez le canard entre les doses minimales de complexe L de type C par voie orale vs par voie i.p. est d'environ 1 :300, le canard n'étant pas sensible aux complexes botuliques de type B ou E par voie orale (Notermans *et al.*, 1980a). Cette différence de sensibilité inter-espèce à une intoxication par voie orale pourrait être due à une action digestive variable sur les complexes botuliques. Cette hypothèse a été en partie réfutée dans une étude sur l'inactivation *in vitro* des complexes botuliques de type B, C et E par les jus digestifs de l'homme et du canard (Notermans *et al.*, 1980b). Les complexes M de type B et E perdent complètement leur toxicité dans les jus gastriques de l'homme et du canard alors que les complexes L de type B et C ne perdent que partiellement leur toxicité. De plus, les toxines ne sont pas inactivées par le fluide cécale de canard, montrant que les jus digestifs de l'homme et du canard ont des effets comparables sur l'inactivation des complexes botuliques.

Il pourrait donc y avoir une absorption différentielle des types de complexes botuliques selon les espèces animales. De plus, il faut garder en mémoire que la structure de l'intestin est différente et adaptée au régime alimentaire de l'animal. Ainsi, le modèle d'étude que nous avons choisi est la souris car elle est très sensible à la neurotoxine botulique, facile à utiliser et disponible en quantité suffisante. Mais l'organisation des plexus nerveux et la répartition des types de neurones entériques varie légèrement avec celle observée chez l'homme par exemple. Ainsi l'architecture des réseaux nerveux entérique apparaît être plus complexe chez les mammifères de grande taille, dont l'homme, que chez de petits animaux de laboratoire (Timmermans *et al.*, 2001). Il faut donc rester prudent dans l'extrapolation des résultats obtenus sur les modèles murins à l'homme par exemple.

#### **5.1.4 Les voies d'endocytose empruntées par le domaine Hc de BoNT/A diffèrent en partie dans les cellules neuronales et intestinales.**

La voie d'entrée de BoNT/A a été caractérisée sur les lignées cellulaires intestinales m-IC<sub>cl2</sub> et Caco-2, et neuronale NG108-15, en visualisant le trafic du Hc/A fluorescent en microscopie confocale.

Comme observé précédemment, la liaison de Hc/A est plus intense sur les cellules neuronales que sur les cellules intestinales (Couesnon *et al.*, 2007). De plus, l'internalisation est plus rapide dans les cellules neuronales et le Hc/A est dirigé vers un compartiment intracellulaire périnucléaire 10 min après exposition. Dans les monocouches de cellules intestinales, le Hc/A est internalisé au niveau du pôle apical dans des vésicules qui migrent progressivement autour du noyau vers le pôle basolatéral. Le même type d'expérience a été réalisée par l'équipe de Simpson sur les cellules T84 incubées avec de la toxine BoNT/A marquée par un fluorophore (Ahsan *et al.*, 2005). Un marquage diffus en halo a été visualisé dans une cellule ronde d'une monocouche de cellules intestinales, traduisant un passage de la toxine dans l'espace intracellulaire réduit entre le noyau volumineux et la membrane latérale de la cellule. Les cinétiques de transport dans les T84 sont plus rapides (environ deux fois) que celles que nous avons observé pour les Caco-2 et similaires à celles notées pour les m-IC<sub>cl2</sub>, ce qui est peut-être en partie dû à la différence de hauteur apico-basolatérale. L'internalisation du complexe botulique de type C dans les cellules HT-29 isolées a été visualisée de manière indirecte en périphérie des cellules rondes (Uotsu *et al.*, 2005). Dans cette même étude, il a été montré que

la M $\beta$ CD à haute concentration (10 mM) inhibe l'internalisation du complexe, mais pas sa liaison aux cellules intestinales HT-29. Nous avons observé que la M $\beta$ CD (15 mM) n'inhibait que partiellement la liaison du Hc/A fluorescent aux cellules neuronales et intestinales. De plus, une concentration plus faible de M $\beta$ CD (2 mM), qui suffirait à bloquer la voie d'internalisation par les GEECs (endosomes précoces des protéines ancrées aux GPI), n'a pas d'effet significatif sur l'internalisation du Hc/A dans les m-IC<sub>cl2</sub> et les Caco-2.

Par ailleurs, le Hc/A n'a pas été détecté dans les radeaux lipidiques après extraction au triton X100 des membranes des cellules NG108-15 et Caco-2 incubées à 4°C. Ceci est en accord avec les résultats obtenus sur les cellules neuronales N2a montrant une augmentation de l'activité de BoNTA après traitement à la M $\beta$ CD (Petro *et al.*, 2006). Dans cette étude, il a également été montré que la perturbation de la formation des puits couverts de clathrine par déplétion en K<sup>+</sup> inhibe l'entrée de BoNT/A dans les N2a. Le même traitement empêche l'internalisation du Hc/A fluorescent dans les NG108-15, mais a peu d'effet sur les cellules intestinales m-IC<sub>cl2</sub> et Caco-2. La voie dépendante de la clathrine joue donc un rôle dans l'internalisation du Hc/A dans les NG108-15, hypothèse confortée par la colocalisation observée entre le Hc/A et la transferrine. Une colocalisation entre le récepteur de la transferrine et BoNT/E a également été observée dans des vésicules localisées dans la région somatodendritique de neurones d'hippocampe en absence de dépolarisation (Verderio *et al.*, 2007).

La voie dépendante de la clathrine serait moins impliquée dans l'internalisation du Hc/A dans les cellules intestinales, comme en témoigne la plus faible colocalisation entre le Hc/A et la chaîne lourde de la clathrine dans ces cellules et l'absence d'effet de la déplétion en K<sup>+</sup> sur l'internalisation du Hc/A. Cependant, l'entrée du Hc/A dans les cellules neuronales et intestinales est dépendante de la dynamine 2, comme en témoigne l'effet de l'expression du dominant négatif K44A dans ces cellules. Cdc42, une RhoGTPase impliquée dans la régulation de certaines voies d'endocytose, semble jouer un rôle important dans l'internalisation du Hc/A, en particulier dans les cellules intestinales.

Par ailleurs, une forte colocalisation avec le marqueur des endosomes précoces EEA1 a été observée aux temps précoces d'internalisation de Hc/A dans les NG108-15, et dans une moindre mesure dans les m-IC<sub>cl2</sub>, ce qui avait également été observée dans les HT-29 avec le complexe botulique C (Uotsu *et al.*, 2005).

Contrairement à ce que les auteurs japonais ont montré, aucune colocalisation évidente n'a été notée entre le Hc/A et la cavéoline ni dans les cellules NG108-15, ni dans les cellules intestinales (résultats non montrés), en remarquant que la cavéoline est très peu détectée dans les lignées Caco-2 et m-IC<sub>cl2</sub> utilisées. Il est donc possible que la toxine botulique soit internalisée par des voies différentes selon les lignées cellulaires, en fonction des voies d'endocytose les plus représentées dans la cellule, comme cela a été décrit pour la toxine cholérique (Torgersen *et al.*, 2001; Hansen *et al.*, 2005). Ainsi, la voie des cavéoles pourrait être utilisée pour le transport de la neurotoxine botulique à travers l'endothélium vasculaire dans la circulation sanguine car cette voie est très représentée dans ce type cellulaire.

Le transport des neurotoxines botuliques à travers les barrières épithéliales et endothéliales est encore mal connu et la manière dont les BoNTs atteignent les terminaisons nerveuses de manière efficace reste énigmatique, le passage de la barrière intestinale étant la première, mais peut-être pas l'unique barrière rencontrée par la toxine au cours de l'intoxication botulique par voie alimentaire.

## 5.2 Perspectives

Du fait de leur grande spécificité et de leur haut potentiel actif, les neurotoxines botuliques sont utilisées dans la thérapie de plusieurs maladies humaines dues à une hyperactivité des terminaisons cholinergiques (Munchau and Bhatia, 2000). En 1981, un ophtalmologiste du nom d'Alan Scott fut le premier à utiliser ce « poison » pour traiter le strabisme et ouvrit la voie à la recherche clinique dans diverses spécialités, notamment les désordres du mouvement (dystonies) ou plus récemment les applications en cosmétologie.

La maîtrise de la production des BoNTs par les bactéries est donc intéressante pour la mise au point de méthodes reproductibles et optimisées dans l'optique d'une utilisation thérapeutique, mais également dans le cadre d'un meilleur contrôle de la sécurité alimentaire afin de limiter les cas de botulisme par intoxication alimentaire ou toxi-infection.

Il serait donc intéressant de poursuivre l'étude de la régulation de l'expression de la neurotoxine et des protéines non toxiques associées, notamment en caractérisant l'expression des *orfxs* dans les souches de type A2, E et F. Le rôle de ces protéines dans la formation des complexes et la stabilité de la toxine pourrait également être envisagée. Il serait intéressant de tester leur implication dans la liaison aux cellules intestinales et/ou le passage de la barrière épithéliale intestinale comme cela semble être le cas pour les HAs.

Une meilleure connaissance des signaux déclenchant la régulation de BotR serait un atout conséquent dans le contrôle de la toxinogénèse. L'identification d'autres types de régulateurs jouant directement ou indirectement sur l'expression des gènes du locus botulique, comme les systèmes à deux composants ou le « quorum-sensing », pourrait permettre de compléter le schéma de régulation de la toxinogénèse. Ainsi, le séquençage de la souche Hall a permis d'identifier 28 systèmes à deux composants et 2 paires de gènes, *agrB1/D1* et *agrB2/D2*, codant pour des homologues des composants du système de régulation des gènes accessoires *agr* de *Staphylococcus aureus* (Sebahia *et al.*, 2007).

L'analyse de l'interaction de CodY, récemment impliqué dans le contrôle de l'expression du régulateur TcdR de *C. difficile*, avec les promoteurs BotR et TetR complèterait la comparaison du mécanisme d'action de ces régulateurs qui appartiennent au même sous-groupe de facteurs sigma alternatifs (Dineen *et al.*, 2007).

L'étude de la protéase activant BoNT/A qui est produite par la souche Hall pourrait être utile dans l'amélioration des méthodes de purification de la toxine produite par la souche de référence pour le type A, connue pour son haut rendement de production de toxine active. La séquence codante de cette protéine a été identifiée (CB01920) et présente des homologies avec l' $\alpha$ -clostripaïne de *C. histolyticum* et une clostripaïne produite par *C. perfringens*, qui est codée par le gène CPE0846 positivement régulé par le système à deux composants VirR/VirS (Sebahia *et al.*, 2007). Il serait donc intéressant d'optimiser l'activation de BoNT/A, tout en évitant sa dégradation, en contrôlant l'expression de cette protéase et son activité enzymatique.

Concernant l'interaction de BoNT avec l'intestin, une action inhibitrice de la toxine purifiée injectée dans le lumen intestinal sur la contraction des muscles lisses a été mise en évidence. Il serait intéressant de comparer les effets observés dans le cas d'une injection de complexe botulique de type A dans un segment ligaturé d'iléum, et de mesurer si les symptômes apparaissent plus précocement grâce à l'action des HAs sur la stabilité de la toxine dans les anses, la liaison aux cellules ou la rupture des jonctions serrées.

Le même test sur des anses intestinales avec d'autres types de BoNTs permettraient également de déceler des différences de sensibilité chez la souris. Les résultats obtenus pour le type A chez la souris devraient également être confirmés avec des biopsies humaines (ou porcines) afin de détecter des différences potentielles entre les modèles animaux de laboratoire de petite taille et les mammifères de plus grande taille.

L'identification des cellules de transport de BoNT/A au niveau de l'épithélium intestinal devrait également être poursuivie afin de mettre au point des mesures de prévention de l'intoxication ou utiliser les toxines comme outils thérapeutiques capables de passer la barrière intestinale et de cibler très spécifiquement une catégorie de cellules. Les chaînes lourdes des BoNTs pourraient ainsi être utilisées pour délivrer des substances biologiquement actives dans les cellules nerveuses.

Dans cette optique, la détermination des récepteurs de chaque type de BoNT et de leur voie d'internalisation est primordiale et pourrait permettre la conception de neurotoxines hybrides ayant une spécificité neuronale pour une population particulière (neurones afférents nociceptifs impliqués dans la sensibilité à la douleur, terminaisons nerveuses autonomes,...). L'internalisation des ANTPs, suggérée par certains scientifiques (Uotso *et al.*, 2005; Uotsu *et al.*, 2005; Matsumura *et al.*, 2007), et leur rôle dans l'activité enzymatique des BoNTs (Sharma and Singh, 2004) devraient être considérés dans la mise au point des formulations cliniques de toxine botulique.



## 6 Bibliographie

- Ahsan, C.R., Hajnoczky, G., Maksymowych, A.B., and Simpson, L.L. (2005). Visualization of binding and transcytosis of botulinum toxin by human intestinal epithelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *315*, 1028-1035.
- Alber, G., Scheuber, P.H., Reck, B., Sailer-Kramer, B., Hartmann, A., and Hammer, D.K. (1989). Role of substance P in immediate-type skin reactions induced by staphylococcal enterotoxin B in unsensitized monkeys. *J Allergy Clin Immunol* *84*, 880-885.
- Alouf, J.E., and Jolivet-Reynaud, C. (1981). Purification and characterization of *Clostridium perfringens* delta-toxin. *Infect Immun* *31*, 536-546.
- Apodaca, G. (2001). Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton. *Traffic* *2*, 149-159.
- Bajjalieh, S.M., Frantz, G.D., Weimann, J.M., McConnell, S.K., and Scheller, R.H. (1994). Differential expression of synaptic vesicle protein 2 (SV2) isoforms. *J. Neurosci.* *14*, 5223-5235.
- Baldwin, M.R., and Barbieri, J.T. (2007). Association of botulinum neurotoxin serotypes a and B with synaptic vesicle protein complexes. *Biochemistry* *46*, 3200-3210.
- Balemba, O.B., Grondahl, M.L., Mbassa, G.K., Semuguruka, W.D., Hay-Smith, A., Skadhauge, E., and Dantzer, V. (1998). The organisation of the enteric nervous system in the submucous and mucous layers of the small intestine of the pig studied by VIP and neurofilament protein immunohistochemistry. *J Anat* *192 ( Pt 2)*, 257-267.
- Bandyopadhyay, S., Clark, A.W., DasGupta, B.R., and Sathyamoorthy, V. (1987). Role of the heavy and light chains of botulinum neurotoxin in neuromuscular paralysis. *J Biol Chem* *262*, 2660-2663.
- Barash, J.R., and 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.
- Beise, J., Hahnen, J., Andersen-Beckh, B., and Dreyer, F. (1994). Pore formation by tetanus toxin, its chain and fragments in neuronal membranes and evaluation of the underlying motifs in the structure of the toxin molecule. *Arch. Pharmacol.* *349*, 66-73.
- Bhandari, M., Campbell, K.D., Collins, M.D., and 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.
- Bielinski, D.F., Pyun, H.Y., Linko-Stentz, K., Macara, I.G., and Fine, R.E. (1993). Protein Ral and Rab3a are major GTP-binding proteins of axonal rapid transport and synaptic vesicles and do not redistribute following depolarization stimulated synaptosomal exocytosis. *Biochim. Biophys. Acta.* *1151*, 246-256.
- Bigalke, H., Muller, H., and Dreyer, F. (1986). Botulinum A neurotoxin unlike tetanus toxin acts via a neuraminidase sensitive structure. *Toxicon* *24*, 1065-1074.
- Bigalke, H., and Shoer, L.F. (2000). Clostridial neurotoxins. In: *Bacterial Protein Toxins*, eds. K. Aktories and I. Just, Berlin: Springer, 407-443.

Binz, T., Kurazono, H., Popoff, M.R., Eklund, M.W., Sakaguchi, G., Kozaki, S., Kriegelstein, K., Henschen, A., Gill, D.M., and Niemann, H. (1990a). Nucleotide sequence of the gene encoding *Clostridium botulinum* neurotoxin type D. *Nucleic Acid. Res.* *18*, 5556.

Binz, T., Kurazono, H., Wille, M., Frevert, J., Wernars, K., and Niemann, H. (1990b). The complete sequence of botulinum neurotoxin type A and comparison with other clostridial neurotoxins. *J. Biol. Chem.* *265*, 9153-9158.

Blasi, J., Chapman, E.R., Link, E., Binz, T., Yamasaki, S., De Camilli, P., Südhof, T.C., Niemann, H., and Jahn, R. (1993a). Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. *Nature (London)* *365*, 160-163.

Blasi, J., Chapman, E.R., Yamasaki, S., Binz, T., Niemann, H., and Jahn, R. (1993b). Botulinum neurotoxin C1 blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/syntaxin. *EMBO J.* *12*, 4821-4828.

Brefort, G., Magot, M., Ionesco, H., and Sebald, M. (1977). Characterization and transferability of *Clostridium perfringens* plasmids. *Plasmid* *1*, 52-66.

Bruneau, N., Nganga, A., Bendayan, M., and Lombardo, D. (2001). Transcytosis of pancreatic bile salt-dependent lipase through human Int407 intestinal cells. *Exp Cell Res* *271*, 94-108.

Buckley, K., and Kelly, R.B. (1985). Identification of a transmembrane glycoprotein specific for secretory vesicles of neuronal and endocrine cells. *J. Cell Biol.* *100*, 1284-1294.

Bullens, R.W., O'Hanlon, G.M., Wagner, E., Molenaar, P.C., Furukawa, K., Furukawa, K., Plomp, J.J., and Willison, H.J. (2002). Complex gangliosides at the neuromuscular junction are membrane receptors for autoantibodies and botulinum neurotoxin but redundant for normal synaptic function. *J Neurosci* *22*, 6876-6884.

Campbell, K., Collins, M.D., and East, A.K. (1993). Nucleotide sequence of the gene coding for *Clostridium botulinum* (*Clostridium argentinense*) type G neurotoxin: genealogical comparison with other clostridial neurotoxins. *Biochim. Biophys. Acta* *1216*, 487-493.

Chai, Q., Arndt, J.W., Dong, M., Tepp, W.H., Johnson, E.A., Chapman, E.R., and Stevens, R.C. (2006). Structural basis of cell surface receptor recognition by botulinum neurotoxin B. *Nature* *444*, 1096-1100.

Chamberlain, L.H., Burgoyne, R.D., and Gould, G.W. (2001). SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: implications for the spatial control of exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 5619-5624.

Chapman, E.R. (2002). Synaptotagmin: a Ca(2+) sensor that triggers exocytosis? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 498-508.

Chen, Y., Korkeala, H., Aarnikunnas, J., and Lindstrom, M. (2007). Sequencing the botulinum neurotoxin and related genes in *Clostridium botulinum* type E strains reveals orfx3 and a novel type E neurotoxin subtype. *J Bacteriol.*

Conway, M.C., Whittal, R.M., Baldwin, M.A., Burlingame, A.L., and Balhorn, R. (2006). Electrospray mass spectrometry of NeuAc oligomers associated with the C fragment of the tetanus toxin. *J Am Soc Mass Spectrom* *17*, 967-976.

Couesnon, A., Pereira, Y., and Popoff, M.R. (2007). Receptor-mediated transcytosis of botulinum neurotoxin A through intestinal cell monolayers. *Cell. Microbiol.*

Couesnon, A., Raffestin, S., and 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. *Microbiol.* 152, 759-770.

Curra, A., Trompetto, C., Abbruzzese, G., and Berardelli, A. (2004). Central effects of botulinum toxin type A: evidence and supposition. *Mov. Disord.* 19, S60-S64.

Danglot, L., and Galli, T. (2007). What is the function of neuronal AP-3? *Biol Cell* 99, 349-361.

DasGupta, B.R., and Boroff, D.A. (1968). Separation of toxin and hemagglutinin from crystalline toxin of *Clostridium botulinum* type A by anion exchange chromatography and determination of their dimensions by gel filtration. *J Biol Chem* 243, 1065-1072.

DasGupta, B.R., and Dekleva, M.L. (1990). Botulinum neurotoxin type A: sequence of amino acids at the N-terminus and around the nicking site. *Biochimie* 72, 661-664.

DasGupta, B.R., and Sugiyama, H. (1977). Comparative sizes of type A and B botulinum neurotoxins. *Toxicon* 15, 357-363.

de Paiva, A., and Dolly, J.O. (1990). Light chain of botulinum neurotoxin is active in mammalian motor nerve terminals when delivered via liposomes. *FEBS Lett* 277, 171-174.

de Paiva, A., Poulain, B., Lawrence, G.W., Shone, C.C., Tauc, L., and Dolly, J.O. (1993). A role for the interchain disulfide or its participating thiols in the internalization of botulinum neurotoxin A revealed by a toxin derivative that binds to ecto-acceptors and inhibits transmitter release intracellularly. *J. Biol. Chem.* 268, 20838-20844.

Debus, E., Flugge, G., Weber, K., and Osborn, M. (1982). A monoclonal antibody specific for the 200 K polypeptide of the neurofilament triplet. *Embo J* 1, 41-45.

Deinhardt, K., Berminghausen, O., Willison, H.J., Hopkins, C.R., and Schiavo, G. (2006). Tetanus toxin is internalized by a sequential clathrin-dependent mechanism initiated within lipid microdomains and independent of epsin1. *J. Cell Biol.* 174, 459-471.

Dekleva, M.L., and DasGupta, B.R. (1990). Purification and characterization of a protease from *Clostridium botulinum* type A that nicks single-chain type A botulinum neurotoxin into di-chain form. *J. Bacteriol.* 172, 2498-2503.

Dickinson, B.L., Badizadegan, K., Wu, Z., Ahouse, J.C., Zhu, X., Simister, N.E., Blumberg, R.S., and Lencer, W.I. (1999). Bidirectional FcRn-dependent IgG transport in a polarized human intestinal epithelial cell line. *J Clin Invest* 104, 903-911.

Dineen, S.S., Bradshaw, M., Karasek, C.E., and 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.

Dineen, S.S., Villapakkam, A.C., Nordman, J.T., and Sonenshein, A.L. (2007). Repression of *Clostridium difficile* toxin gene expression by CodY. *Mol Microbiol* 66, 206-219.

Dong, M., Richards, D.A., Goodnough, M.C., Tepp, W.H., Johnson, E.A., and Chapman, E.R. (2003). Synaptotagmins I and II mediate entry of botulinum neurotoxin B into cells. *J. Cell Biol.* 162, 1293-1303.

Dong, M., Yeh, F., Tepp, W.H., Dean, C., Johnson, E.A., Janz, R., and Chapman, E.R. (2006). SV2 Is the Protein Receptor for Botulinum Neurotoxin A. *Science* 312, 592-596.

- Dupuy, B., Raffestin, S., Matamouros, S., Mani, N., Popoff, M.R., and 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., and Sonenshein, A.L. (1998). Regulated transcription of *Clostridium difficile* toxin genes. *Mol. Microbiol.* 27, 107-120.
- East, A.K., Bhandari, M., Stacey, J.M., Campbell, K.D., and 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.
- East, A.K., Richardson, P.T., Allaway, D., Collins, M.D., Roberts, T.A., and E., T.D. (1992). Sequence of the gene encoding type F neurotoxin of *Clostridium botulinum*. *FEMS Microbiol. Let.* FEMS Microbiol. Let. 96, 225-230.
- Eisel, U., Jarausch, W., Goretzki, K., Henschen, A., Engels, J., Weller, U., Hudel, M., Habermann, E., and Niemann, H. (1986). Tetanus toxin: primary structure, expression in *E. coli*, and homology with botulinum toxins. *EMBO J.* 5, 2495-2502.
- Eklund, M.W., and Poysky, F.T. (1974). Interconversion of type C and D strains of *Clostridium botulinum* by specific bacteriophages. *Appl. Microbiol.* 27, 251-258.
- Eklund, M.W., Poysky, F.T., Meyers, J.A., and Pelroy, G.A. (1974). Interspecies conversion of *Clostridium botulinum* type C to *Clostridium novyi* type A by bacteriophage. *Science* 172, 480-482.
- Eklund, M.W., Poysky, F.T., Mseitif, L.M., and S., S.M. (1988). Evidence for plasmid-mediated toxin and bacteriocin production in *Clostridium botulinum* type G. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1405-1408.
- Eklund, M.W., Poysky, F.T., Reed, S.M., and Smith, C.A. (1971). Bacteriophage and the toxigenicity of *Clostridium botulinum* type C. *Science* 172, 480-482.
- Elmore, M.J., Hutson, R.A., Collins, M.D., Bodsworth, N.J., Whelan, S.M., and Minton, N.P. (1995). Nucleotide sequence of the gene coding for proteolytic ( group I) *Clostridium botulinum* type F neurotoxin: genealogical comparison with other clostridial neurotoxins. *Syst. Appl. Microbiol.* 18, 23-31.
- Fairweather, N.F., and Lyness, V.A. (1986). The complete nucleotide sequence of tetanus toxin. *Nucleic. Acids Res.* 14, 7809-7812.
- Feany, M.B., Lee, S., Edwards, R.H., and Buckley, K.M. (1992). The synaptic vesicle protein SV2 is a novel type of transmembrane transporter. *Cell* 70, 861-867.
- Finn, C.W., Silver, R.P., Habig, W.H., Hardegree, M.C., Zon, G., and Garon, C.F. (1984). The structural gene for tetanus neurotoxin is on a plasmid. *Science* 224, 881-884.
- Fischer, A., and Montal, M. (2007a). Crucial Role of the Disulfide Bridge between Botulinum Neurotoxin Light and Heavy Chains in Protease Translocation across Membranes. *J Biol Chem* 282, 29604-29611.
- Fischer, A., and Montal, M. (2007b). Single molecule detection of intermediates during botulinum neurotoxin translocation across membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 10447-10452.
- Fu, F.N., Sharma, S.K., and Singh, B.R. (1997). A protease-resistant novel hemagglutinin purified from type A *Clostridium botulinum*. *J. Prot. Chem.* 17, 53-60.

Fujimiya, M., Okumiya, K., Yamane, T., and Maeda, T. (1997). Distribution of serotonin-immunoreactive nerve cells and fibers in the rat gastrointestinal tract. *Histochem Cell Biol* 107, 105-114.

Fujinaga, Y., Inoue, K., Nomura, T., Sasaki, J., Marvaud, J.C., Popoff, M.R., Kozaki, S., and Oguma, K. (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., Nagamachi, E., and Oguma, K. (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.

Fujinaga, Y., Inoue, K., Watarai, S., Sakaguchi, G., Arimitsu, H., Lee, J.C., Jin, Y., Matsumura, T., Kabumoto, Y., Watanabe, T., Ohyama, T., Nishikawa, A., and Oguma, K. (2004). Molecular characterization of binding subcomponents of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin for intestinal epithelial cells and erythrocytes. *Microbiol.* 150, 1529-1538.

Fujinaga, Y., Takeshi, K., Inoue, K., Fujita, R., Ohyama, T., Moriishi, K., and Oguma, K. (1995). Type A and B neurotoxin genes in a *Clostridium botulinum* type AB strain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 213, 737-745.

Fujita, R., Fujinaga, Y., Inoue, K., Nakajima, H., Kumon, H., and Oguma, K. (1995). Molecular characterization of two forms of nontoxic-non hemagglutinin components of *Clostridium botulinum* type A progenitor toxins. *FEBS Lett.* 376, 41-44.

Furness, J.B., Jones, C.A., Nurgali, K., and Clerc, N. (2004). Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Prog. Neurobiol.* 72, 143-164.

Garabedian, E.M., Roberts, L.J., McNevin, M.S., and Gordon, J.I. (1997). Examining the role of Paneth cells in the small intestine by lineage ablation in transgenic mice. *J Biol Chem* 272, 23729-23740.

Griffiths, S.L., Finkelstein, R.A., and Critchley, D.R. (1986). Characterization of the receptor for cholera toxin and Escherichia coli heat-labile toxin in rabbit intestinal brush borders. *Biochem J* 238, 313-322.

Gueant, J.L., Gerard, A., Monin, B., Champigneulle, B., Gerard, H., and Nicolas, J.P. (1988). Radioautographic localisation of iodinated human intrinsic factor in the guinea pig ileum using electron microscopy. *Gut* 29, 1370-1378.

Gustafsson, B.I., Bakke, I., Tommeras, K., and Waldum, H.L. (2006). A new method for visualization of gut mucosal cells, describing the enterochromaffin cell in the rat gastrointestinal tract. *Scand J Gastroenterol* 41, 390-395.

Hansen, G.H., Dalskov, S.M., Rasmussen, C.R., Immerdal, L., Niels-Christiansen, L.L., and Danielsen, E.M. (2005). Cholera toxin entry into pig enterocytes occurs via a lipid raft- and clathrin-dependent mechanism. *Biochemistry* 44, 873-882.

Hansen, M.B. (2003a). Neurohumoral control of gastrointestinal motility. *Physiol Res* 52, 1-30.

Hansen, M.B. (2003b). The enteric nervous system I: organisation and classification. *Pharmacol Toxicol* 92, 105-113.

Hanson, M.A., and Stevens, R.C. (2000). Cocryystal structure of synaptobrevin-II bound to botulinum neurotoxin type B at 2.0 Å resolution. *Nature Struct. Biol.* 7, 687-692.

- Harvey, S.M., Sturgeon, J., and Dassey, D.E. (2002). Botulism due to *Clostridium baratii* type F toxin. *J Clin Microbiol* 40, 2260-2262.
- Hatheway, C.L. (1990). Toxigenic Clostridia. *Clin. Microbiol. Rev.* 3, 66-98.
- Hauser, D., Eklund, M.W., Boquet, P., and 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., Eklund, M.W., Kurazono, H., Binz, T., Niemann, H., Gill, D.M., Boquet, P., and Popoff, M.R. (1990). Nucleotide sequence of *Clostridium botulinum* C1 neurotoxin. *Nucleic Acid. Res.* 18, 4924.
- Hauser, D., Gibert, M., Marvaud, J.C., Eklund, M.W., and Popoff, M.R. (1995). Botulin neurotoxin C1 complex, Clostridial neurotoxin homology and genetic transfer in *Clostridium botulinum*. *Toxicon* 33, 515-526.
- Hecker, M., and Volker, U. (2001). General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Adv Microb Physiol* 44, 35-91.
- Heckly, R.J., Hildebrand, G.J., and Lamanna, C. (1960). On the size of the toxic particle passing the intestinal barrier in botulism. *J. Exp. Med.* 111, 745-759.
- Henderson, I., Davis, T., Elmore, M., and Minton, N. (1997). The genetic basis of toxin production in *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani*. In: *The Clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis*, ed. I. Rood, New York: Academic Press, 261-294.
- Henderson, I., Whelan, S.M., Davis, T.O., and Minton, N.P. (1996). Genetic characterization of the botulinum toxin complex of *Clostridium botulinum* strain NCTC2916. *FEMS Microbiol. Lett.* 140, 151-158.
- Hendry, J.H., and Potten, C.S. (1995). *Radiation and Gut*. Elsevier: Amsterdam.
- Hill, K.K., Smith, T.J., Helma, C.H., Ticknor, L.O., Foley, B.T., Svensson, R.T., Brown, J.L., Johnson, E.A., Smith, L.A., Okinaka, R.T., Jackson, P.J., and Marks, J.D. (2007). Genetic diversity among Botulinum Neurotoxin-producing clostridial strains. *J Bacteriol* 189, 818-832.
- Hoch, D.H., Romero-Mira, M., Ehrlich, B.E., Finkelstein, A., Dasgupta, B.R., and Simpson, L.L. (1985). Channels formed by botulinum, tetanus and diphtheria toxins in planar lipid bilayers: relevance to translocation of proteins across membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 82, 1692-1696.
- Hughson, E.J., and Hopkins, C.R. (1990). Endocytic pathways in polarized Caco-2 cells: identification of an endosomal compartment accessible from both apical and basolateral surfaces. *J Cell Biol* 110, 337-348.
- Humeau, Y., Doussau, F., Grant, N.J., and Poulain, B. (2000). How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter *Biochimie* 82, 427-446.
- Hutson, R.A., Collins, M.D., East, A.K., and Thompson, D.E. (1994). Nucleotide sequence of the gene coding for non-proteolytic *Clostridium botulinum* type B neurotoxin: comparison with other Clostridial neurotoxins. *Cur. Microbiol.* 28, 101-110.
- Iezzi, M., Theander, S., Janz, R., Loze, C., and Wollheim, C.B. (2005). SV2A and SV2C are not vesicular Ca<sup>2+</sup> transporters but control glucose-evoked granule recruitment. *J Cell Sci* 118, 5647-5660.

Inoue, K., Fujinaga, Y., Watanabe, T., Ohya, T., Takeshi, K., Moriishi, K., Nakajima, H., Inoue, K., and Oguma, K. (1996). Molecular composition of *Clostridium botulinum* type A progenitor toxins. *Infect. Immun.* *64*, 1589-1594.

Inoue, K., Fujinaga, Y., Honke, K., Arimitsu, H., Mahmut, N., Sakaguchi, G., Ohya, T., Watanabe, T., Inoue, K., and Oguma, K. (2001). *Clostridium botulinum* type A haemagglutinin positive progenitor toxin (HA<sup>+</sup>-PTX) binds to oligosaccharides containing Gal $\beta$ 1-4GlcNAc through one subcomponent of haemagglutinin (HA1). *Microbiol.* *147*, 811-819.

Jahn, R. (2006). Neuroscience. A neuronal receptor for botulinum toxin. *Science* *312*, 540-541.

James, A.N., Ryan, J.P., and Parkman, H.P. (2003). Inhibitory effects of botulinum toxin on pyloric and antral smooth muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* *285*, G291-297.

Janz, R., Hofmann, K., and Sudhof, T.C. (1998). SVOP, an evolutionarily conserved synaptic vesicle protein, suggests novel transport functions of synaptic vesicles. *J Neurosci* *18*, 9269-9281.

Janz, R., and Südhof, T.C. (1999). SV2C is a synaptic vesicle protein with an unusually restricted localization: anatomy of a synaptic vesicle protein family. *Neurosci.* *94*, 1279-1290.

Jin, R., Rummel, A., Binz, T., and Brunger, A.T. (2006). Botulinum neurotoxin B recognizes its protein receptor with high affinity and specificity. *Nature* *444*, 1092-1095.

Johannes, L., and Lamaze, C. (2002). Clathrin-dependent or not: is it still the question? *Traffic* *3*, 443-451.

Kamata, Y., Kozaki, S., Sakaguchi, G., Iwamori, M., and Nagai, Y. (1986). Evidence for direct binding of *Clostridium botulinum* type E derivative toxin and its fragments to gangliosides and free fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* *140*, 1015-1019.

Karlsson, S., Dupuy, B., Mukherjee, K., Norin, E., Burman, L.G., and 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.

Keller, J.E., Cai, F., and Neale, E.A. (2004). Uptake of botulinum neurotoxin into cultured neurons. *Biochem.* *43*, 526-532.

Kimura, K., Fujii, N., Tsuzuki, K., Murakami, T., Indoh, T., Yokosawa, N., Takeshi, K., Syuto, B., and Oguma, K. (1990). The complete nucleotide sequence of the gene coding for botulinum type C1 toxin in the C-St phage genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *171*, 1304-1311.

Kitamura, M., Igimi, S., Furukawa, K., and Furukawa, K. (2005). Different response of the knockout mice lacking b-series gangliosides against botulinum and tetanus toxins. *Biochim. Biophys. Acta* *1741*, 1-3.

Kitamura, M., Iwamori, M., and Nagai, Y. (1980). Interaction between *Clostridium botulinum* neurotoxin and gangliosides. *Biochim Biophys Acta* *628*, 328-335.

Kitamura, M., Sakaguchi, S., and Sakaguchi, G. (1969). Significance of 12S toxin of *Clostridium botulinum* type E. *J Bacteriol* *98*, 1173-1178.

Kitamura, M., Takamiya, K., Aizawa, S., and Furukawa, K. (1999). Gangliosides are the binding substances in neural cells for tetanus and botulinum toxins in mice. *Biochim. Biophys. Acta* *1441*, 1-3.

Kobayashi, H., Fujisawa, K., Saito, Y., Kamijo, M., Oshima, S., Kubo, M., Eto, Y., Monma, C., and Kitamura, M. (2003). A botulism case of a 12-year-old girl caused by intestinal colonization of *Clostridium botulinum* type Ab. *Jpn J Infect Dis* *56*, 73-74.

Koh, T.W., and Bellen, H.J. (2003). Synaptotagmin I, a Ca<sup>2+</sup> sensor for neurotransmitter release. *Trends Neurosci* *26*, 413-422.

Kojima, S., Eguchi, H., Ookawara, T., Fujiwara, N., Yasuda, J., Nakagawa, K., Yamamura, T., and Suzuki, K. (2005). *Clostridium botulinum* type A progenitor toxin binds to Intestine-407 cells via N-acetylglucosamine moiety. *Biochem Biophys Res Commun* *331*, 571-576.

Komuro, T. (2006). Structure and organization of interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract. *J Physiol* *576*, 653-658.

Kouguchi, H., Suzuki, T., Hasegawa, K., Mutoh, S., Watanabe, T., Niwa, K., Yoneyama, T., Katoh, Y., and Ohyama, T. (2006). Quantitative detection of gene expression and toxin complex produced by *Clostridium botulinum* serotype D strain 4947. *J Microbiol Methods* *67*, 416-423.

Lacy, D.B., and Stevens, R.C. (1999). Sequence homology and structural analysis of the clostridial neurotoxins. *J. Mol. Biol.* *291*, 1091-1104.

Lacy, D.B., Tepp, W., Cohen, A.C., Das Gupta, B.R., and Stevens, R.C. (1998). Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity. *Nature Struct. Biol.* *5*, 898-902.

Lalli, G., Bohnert, S., Deinhardt, K., Verastegui, C., and Schiavo, G. (2003). The journey of tetanus and botulinum neurotoxins in neurons. *Trends Microbiol.* *11*, 431-437.

Lalli, G., Herreros, J., Osborne, S., Montecucco, C., Rossetto, O., and Schiavo, G. (1999). Functional characterization of tetanus and botulinum neurotoxins binding domains. *J. Cell Sci.* *112*, 2715-2724.

Lamana, C. (1960). Toxicity of bacterial exotoxins by the oral route. *Science* *131-1101*, 1100.

Lamanna, C., and Lowenthal, J.P. (1951). The lack of identity between hemagglutinin and the toxin of type A botulin organism. *J Bacteriol* *61*, 751-752.

Lamaze, C., Dujeancourt, A., Baba, T., Lo, C.G., Benmerah, A., and Dautry-Varsat, A. (2001). Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol Cell* *7*, 661-671.

Lang, T., Bruns, D., Wenzel, D., Riedel, D., Holroyd, P., Thiele, C., and Jahn, R. (2001). SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *Embo J* *20*, 2202-2213.

Lazzell, D.R., Belizaire, R., Thakur, P., Sherry, D.M., and Janz, R. (2004). SV2B regulates synaptotagmin 1 by direct interaction. *J Biol Chem* *279*, 52124-52131.

Li, B., Qian, X., Sarkar, H.K., and 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.

- Lovenklev, M., Holst, E., Borch, E., and Radstrom, P. (2004). Relative neurotoxin gene expression in clostridium botulinum type B, determined using quantitative reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol* 70, 2919-2927.
- MacKenzie, I., Burnstock, G., and Dolly, J.O. (1982). The effects of purified botulinum neurotoxin type A on cholinergic, adrenergic and non-adrenergic, atropine-resistant autonomic neuromuscular transmission. *Neuroscience* 7, 997-1006.
- Mahrhold, S., Rummel, A., Bigalke, H., Davletov, B., and Binz, T. (2006). The synaptic vesicle protein 2C mediates the uptake of botulinum neurotoxin A into phrenic nerves. *FEBS Lett* 580, 2011-2014.
- Maksymowych, A.B., Rienhard, M., Malizio, C.J., Goodnough, M.C., Johnson, E.A., and Simpson, L.L. (1999). Pure botulinum neurotoxin is absorbed from the stomach and small intestine and produces peripheral neuromuscular blockade. *Infect. Immun.* 67, 4708-4712.
- Maksymowych, A.B., and Simpson, L.I. (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.
- Maksymowych, A.B., and Simpson, L.L. (1998). Binding and transcytosis of botulinum neurotoxin by polarized human carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 273, 21950-21957.
- Marshall, K.M., Bradshaw, M., Pellet, S., and 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., and 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., and 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.
- Marxen, P., Fuhrmann, U., and Bigalke, H. (1989). Gangliosides mediate inhibitory effects of tetanus and botulinum A neurotoxins on exocytosis in chromaffin cells. *Toxicon* 27, 849-859.
- Matsumura, T., Jin, Y., Kabumoto, Y., Takegahara, Y., Oguma, K., Lencer, W.I., and Fujinaga, Y. (2007). The HA proteins of botulinum toxin disrupt intestinal epithelial intercellular junctions to increase toxin absorption. *Cell Microbiol.*
- Matteoli, M., Takei, K., Perin, M.S., Sudhof, T.C., and De Camilli, P. (1992). Exo-endocytotic recycling of synaptic vesicles in developing processes of cultured hippocampal neurons. *J Cell Biol* 117, 849-861.
- Matteoli, M., Verderio, C., Rossetto, O., Iezzi, N., Coco, S., Schiavo, G., and Montecucco, C. (1996). Synaptic vesicle endocytosis mediates the entry of tetanus neurotoxin into hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 93, 13310-13315.
- Mayor, S., and Pagano, R.E. (2007). Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 603-612.
- Minton, N.P. (1995). Molecular genetics of clostridial neurotoxins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 195, 161-194.
- Moncrief, J.S., Barroso, L.A., and Wilkins, T.D. (1997). Positive regulation of *Clostridium difficile* toxins. *Infect. Immun.* 65, 1105-1108.

Montal, M.S., Blewitt, R., Tomich, J.M., and Montal, M. (1992). Identification of an ion channel-forming motif in the primary structure of tetanus and botulinum neurotoxins. *FEBS Let.* 313, 12-18.

Montecucco, C., Papini, E., and Schiavo, G. (1994). Bacterial protein toxins penetrate cells via a four-step mechanism. *FEBS Let.* 346, 92-98.

Moriishi, K., Koura, M., Aba, N., Fujii, N., Fujinaga, Y., Inoue, K., and Oguma, K. (1996). Mosaic structures of neurotoxins produced from *Clostridium botulinum* types C and D. *Biochem. Biophys. Acta* 1307, 123-126.

Munchau, A., and Bhatia, K.P. (2000). Uses of botulinum toxin injection in medicine today. *Bmj* 320, 161-165.

Niemann, H. (1991). Molecular biology of Clostridial neurotoxins. In: *Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, eds. J.E. Alouf and J. Freer, New York: Academic Press, 299-344.

Niemann, H., Blasi, J., and Jahn, R. (1994). Clostridial neurotoxins: new tools for dissecting exocytosis. *Trends Cell Biol.* 4, 179-185.

Nishikawa, A., Uotsu, N., Arimitsu, H., Lee, J.C., Miura, Y., Fujinaga, Y., Nakada, H., Watanabe, T., Ohyama, T., Sakano, Y., and Oguma, K. (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.

Nishiki, T., Tokuyama, Y., Kamata, Y., Nemoto, Y., Yoshida, A., Sato, K., Sekiguchi, M., Taakahashi, M., and Kozaki, S. (1996a). The high-affinity of *Clostridium botulinum* type B neurotoxin to synaptotagmin II associated with gangliosides G<sub>T1B</sub>/G<sub>D1a</sub>. *FEBS Lett.* 378, 253-257.

Nishiki, T., Tokuyama, Y., Kamata, Y., Nemoto, Y., Yoshida, A., Sekiguchi, M., Takahashi, M., and Kozaki, S. (1996b). Binding of botulinum type B neurotoxin to Chinese hamster ovary cells transfected with rat synaptotagmin II cDNA. *Neurosci Lett* 208, 105-108.

Niwa, K., Koyama, K., Inoue, S., Suzuki, T., Hasegawa, K., Watanabe, T., Ikeda, T., and Ohyama, T. (2007). Role of nontoxic components of serotype D botulinum toxin complex in permeation through a Caco-2 cell monolayer, a model for intestinal epithelium. *FEMS Immunol Med Microbiol* 49, 346-352.

Notermans, S., Dufrenne, J., and Kozaki, S. (1980a). Experimental botulism in Pekin ducks. *Avian Dis* 24, 658-664.

Notermans, S., Kozaki, S., Dufrenne, J., and van Schothorst, M. (1980b). In vitro inactivation of *Clostridium botulinum* toxins types B, C and E by digestive juices of man and ducks. *Jpn J Med Sci Biol* 33, 255-261.

Ohishi, I., Hayashi, K., Sakaguchi, G., and Tokuchi, M. (1981). Toxicities of *Clostridium botulinum* type C toxins of different molecular sizes in geese. *Infect Immun* 33, 623-624.

Ohishi, I., and Sakaguchi, G. (1980). Oral toxicities of *Clostridium botulinum* type C and D toxins of different molecular sizes. *Infect. Immun.* 28, 303-309.

Ohishi, I., Sugii, S., and Sakaguchi, G. (1977). Oral toxicities of *Clostridium botulinum* toxins in response to molecular size. *Infect. Immun.* 16, 107-109.

Parton, R.G., and Richards, A.A. (2003). Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic* 4, 724-738.

- Pasricha, P.J., Ravich, W.J., and Kalloo, A.N. (1993). Effects of intrasphincteric botulinum toxin on the lower esophageal sphincter in piglets. *Gastroenterology* 105, 1045-1049.
- Paton, J.C., Lawrence, A.J., and Steven, I.M. (1983). Quantities of *Clostridium botulinum* organisms and toxin in feces and presence of *Clostridium botulinum* toxin in the serum of an infant with botulism. *J Clin Microbiol* 17, 13-15.
- Patterson-Curtis, S.I., and 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.
- Pearce, L.B., First, E.R., MacCallum, R.D., and Gupta, A. (1997). Pharmacologic characterization of botulinum toxin for basic science and medicine. *Toxicon* 35, 1373-1412.
- Peck, M.W., Evans, R.I., Fairbairn, D.A., Hartley, M.G., and Russell, N.J. (1995). Effect of sporulation temperature on some properties of spores of non-proteolytic *Clostridium botulinum*. *Int J Food Microbiol* 28, 289-297.
- Petro, K.A., Dyer, M.A., Yowler, B.C., and Schengrund, C.L. (2006). Disruption of lipid rafts enhances activity of botulinum neurotoxin serotype A. *Toxicon*.
- Popoff, M.R. (1995). Ecology of neurotoxic strains of Clostridia. In: *Clostridial neurotoxins*, vol. 195, ed. C. Montecucco, Heidelberg: Springer-Verlag, 1-29.
- Portela-Gomes, G.M., Lukinius, A., and Grimelius, L. (2000). Synaptic vesicle protein 2, A new neuroendocrine cell marker. *Am J Pathol* 157, 1299-1309.
- Potten, C.S. (1998). Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353, 821-830.
- Poulain, B., Humeau, Y., Kojima, H., and Molgo, J. (2000). Les neurotoxines de *Clostridium*: des toxines agissent sur la transmission synaptique. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.*
- Poulain, B., Tauc, L., Maisey, E.A., Wadsworth, J.D., Mohan, P.M., and Dolly, J.O. (1988). Neurotransmitter release is blocked intracellularly by botulinum neurotoxin, and this requires uptake of both toxin polypeptides by a process mediated by the larger chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 4090-4094.
- Poulet, S., Hauser, D., Quanz, M., Niemann, H., and Popoff, M.R. (1992). Sequences of the botulinum neurotoxin E derived from *Clostridium botulinum* type E (strain Beluga) and *Clostridium butyricum* (strains ATCC43181 and ATCC43755). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 183, 107-113.
- Qualmann, B., and Mellor, H. (2003). Regulation of endocytic traffic by Rho GTPases. *Biochem J* 371, 233-241.
- Raffestin, S., Dupuy, B., Marvaud, J.C., and 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., and Lin, W.J. (2007). Variations in expression and release of botulinum neurotoxin in *Clostridium botulinum* type A strains. *Foodborne Pathog Dis* 4, 201-207.
- Rossetto, O., Morbiato, L., Caccin, P., Rigoni, M., and Montecucco, C. (2006). Presynaptic enzymatic neurotoxins. *J Neurochem* 97, 1534-1545.

- Rothman, J.E. (1994). Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* 372, 55-63.
- Ruhl, A. (2005). Glial cells in the gut. *Neurogastroenterol Motil* 17, 777-790.
- Rummel, A., Bade, S., Alves, J., Bigalke, H., and Binz, T. (2003). Two carbohydrate binding sites in the H<sub>cc</sub>-domain of tetanus neurotoxin are required for toxicity. *J. Mol. Biol.* 326, 835-847.
- Rummel, A., Eichner, T., Weil, T., Karnath, T., Gutcaits, A., Mahrhold, S., Sandhoff, K., Proia, R.L., Acharya, K.R., Bigalke, H., and Binz, T. (2007). Identification of the protein receptor binding site of botulinum neurotoxins B and G proves the double-receptor concept. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 359-364.
- Rummel, A., Karnath, T., Henke, T., Bigalke, H., and Binz, T. (2004a). Synaptotagmins I and II act as nerve cell receptors for botulinum neurotoxin G. *J. Biol. Chem.*, in press.
- Rummel, A., Mahrhold, S., Bigalke, H., and Binz, T. (2004b). The H<sub>cc</sub>-domain of botulinum neurotoxins A and B exhibits a singular ganglioside binding site displaying serotype specific carbohydrate interaction. *Mol. Microbiol.* 51, 631-643.
- Sakaguchi, Y., Hayashi, H., Kurokawa, K., Nakayama, K., Oshima, K., Fujinaga, Y., Ohnishi, M., Ohtsubo, E., Hattori, M., and Oguma, K. (2005). The genome sequence of *Clostridium botulinum* type C neurotoxin-converting phage and the molecular mechanisms of unstable lysogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 17472-17477.
- Sand, J., Nordback, I., Arvola, P., Porsti, I., Kalloo, A., and Pasricha, P. (1998). Effects of botulinum toxin A on the sphincter of Oddi: an in vivo and in vitro study. *Gut* 42, 507-510.
- Sanders, K.M. (1996). A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 111, 492-515.
- Schantz, E.J., and Johnson, E.A. (1992). Properties and use of botulinum toxin and other microbial neurotoxins in medicine. *Microbiol. Rev.* 56, 80-99.
- Schengrund, C.L., DasGupta, B.R., and Ringler, N.J. (1991). Binding of botulinum and tetanus neurotoxins to ganglioside GT1b and derivatives thereof. *J Neurochem* 57, 1024-1032.
- Schiavo, G., Benfenati, F., Poulain, B., Rossetto, O., Polverino de Laureto, P., DasGupta, B.R., and Montecucco, C. (1992a). Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature (London)* 359, 832-835.
- Schiavo, G., Matteoli, M., and Montecucco, C. (2000). Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol. Rev.* 80, 717-766.
- Schiavo, G., Rossetto, O., Santucci, A., DasGupta, B.R., and Montecucco, C. (1992b). Botulinum neurotoxins are zinc proteins. *J. Biol. Chem.* 267, 23479-23483.
- Schivell, A.E., Mochida, S., Kensel-Hammes, P., Custer, K.L., and Bajjalieh, S.M. (2005). SV2A and SV2C contain a unique synaptotagmin-binding site. *Mol Cell Neurosci* 29, 56-64.
- Sebahia, 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., Cerdeno-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., Rabbinowitsch, E., Sanders, M., Simmonds, M., White, B., Whithead, S., and 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.

Shapiro, R.E., Spech, C.D., Collins, B.E., Woods, A.S., Cotter, R.J., and Schnaar, R.L. (1997). Identification of a ganglioside recognition domain of tetanus toxin using a novel ganglioside photoaffinity ligand. *J. Biol. Chem.* 272, 30380-30386.

Sharkey, F.H., Markos, S.I., and Haylock, R.W. (2004). Quantification of toxin-encoding mRNA from *Clostridium botulinum* type E in media containing sorbic acid or sodium nitrite by competitive RT-PCR. *FEMS Microbiol Lett* 232, 139-144.

Sharma, S.K., and Singh, B.R. (2004). Enhancement of the endopeptidase activity of purified botulinum neurotoxins A and E by an isolated component of the native neurotoxin associated proteins. *Biochemistry* 43, 4791-4798.

Shimizu, T., Sato, T., Kawakami, S., Ohta, T., Noda, M., and Hamabata, T. (2007). Receptor affinity, stability and binding mode of Shiga toxins are determinants of toxicity. *Microb Pathog* 43, 88-95.

Shin, N.R., Shin, J.H., Chun, J.H., Yoon, S.Y., Kim, B.S., Oh, H.B., and Rhie, G.E. (2006). Determination of neurotoxin gene expression in *Clostridium botulinum* type A by quantitative RT-PCR. *Mol Cells* 22, 336-342.

Smith, L.D.S., and Sugiyama, H. (1977). Botulism. The organism, its toxins, the disease. Charles C. Thomas: Springfield, Ill.

Smith, T.J., Lou, J., Geren, N., Forsyth, M., Tsai, R., La Porte, S.L., Tepp, W.H., Bradshaw, M., Johnson, E.A., Smith, L.A., and Marks, J.D. (2005). Sequence variation within botulinum neurotoxin serotypes impacts antibody binding and neutralization. *Infect. Immun.* 73, 5450-5457.

Stecher, B., Weller, U., Habermann, E., Gratzl, M., and Ahnert-Hilger, G. (1989). The light chain but not the heavy chain of botulinum A toxin inhibits exocytosis from permeabilized adrenal chromaffin cells. *FEBS Lett* 255, 391-394.

Stiles, B.G., Hale, M.L., Marvaud, J.C., and Popoff, M.R. (2000). *Clostridium perfringens* iota toxin: binding studies and characterization of cell surface receptor by fluorescence-activated cytometry. *Infect Immun* 68, 3475-3484.

Sudhof, T.C. (2002). Synaptotagmins: why so many? *J Biol Chem* 277, 7629-7632.

Sugii, S., Ohishi, I., and Sakaguchi, G. (1977a). Correlation between oral toxicity and in vitro stability of *Clostridium botulinum* type A and B toxins of different molecular sizes. *Infect. Immun.* 16, 910-914.

Sugii, S., Ohishi, I., and Sakaguchi, G. (1977b). Intestinal absorption of botulinum toxins of different molecular sizes in rats. *Infect. Immun.* 17, 491-496.

Sugiyama, H. (1980). *Clostridium botulinum* neurotoxin. *Microbiol. Rev.* 44, 419-448.

Sugiyama, H., Das Gupta, R., and Yang, K.H. (1973). Disulfide-toxicity relationship of botulinum toxin types A, E, and F. *Proc Soc Exp Biol Med* 143, 589-591.

Swaminathan, S., and Eswaramoorthy, S. (2000). Structural analysis of the catalytic and binding sites of *Clostridium botulinum* neurotoxin B. *Nature Struct. Biol.* 7, 693-699.

Thompson, D.E., Brehm, J.K., Oultram, J.D., Swinfield, T.J., Shone, C.C., Atkinson, T., Melling, J., and Minton, N.P. (1990). The complete amino acid sequence of the *Clostridium botulinum* type A neurotoxin, deduced by nucleotide sequence analysis of the encoding gene. *Eur. J. Biochem.* *189*, 73-81.

Thompson, D.E., Hutson, R.A., Easy, A.K., Allaway, D., Collins, M.D., and Richardson, P.T. (1993). Nucleotide sequence of the gene coding for *Clostridium barati* type F neurotoxin: comparison with other clostridial neurotoxins. *FEMS Microbiol. Lett.* *108*, 175-182.

Timmermans, J.P., Hens, J., and Adriaensen, D. (2001). Outer submucous plexus: an intrinsic nerve network involved in both secretory and motility processes in the intestine of large mammals and humans. *Anat Rec* *262*, 71-78.

Torgersen, M.L., Skretting, G., van Deurs, B., and Sandvig, K. (2001). Internalization of cholera toxin by different endocytic mechanisms. *J Cell Sci* *114*, 3737-3747.

Tsukamoto, K., Kohda, T., Mukamoto, M., Takeuchi, K., Ihara, H., Saito, M., and Kozaki, S. (2005). Binding of *Clostridium botulinum* types C and D neurotoxins to ganglioside and phospholipid. *J. Biol. Chem.* *280*, 35164-35171.

Tu, Y., Salim, S., Bourgeois, J., Di Leo, V., Irvine, E.J., Marshall, J.K., and Perdue, M.H. (2005). CD23-mediated IgE transport across human intestinal epithelium: inhibition by blocking sites of translation or binding. *Gastroenterology* *129*, 928-940.

Tuma, P.L., and Hubbard, A.L. (2003). Transcytosis: crossing cellular barriers. *Physiol Rev* *83*, 871-932.

Uotso, N., Nishikawa, A., Watanabe, T., Ohyama, T., Tonozuka, T., Sakano, Y., and Oguma, K. (2005). Cell internalization and traffic pathway of *Clostridium botulinum* type C neurotoxin in HT-29 cells. *Biochim Biophys Acta*.

Uotsu, N., Nishikawa, A., Watanabe, T., Ohyama, T., Tonozuka, T., Sakano, Y., and Oguma, K. (2005). Cell internalization and traffic pathway of *Clostridium botulinum* type C neurotoxin in HT-29 cells. *Biochim Biophys Acta*.

Vaidyanathan, V.V., Yoshino, K., Jahnz, M., Dorries, C., Bade, S., Nauenburg, S., Niemann, H., and Binz, T. (1999). Proteolysis of SNAP-25 isoforms by botulinum neurotoxin types A, C, and E: domains and amino acid residues controlling the formation of enzyme-substrate complexes and cleavage. *J Neurochem* *72*, 327-337.

Verderio, C., Coco, S., Rossetto, O., Montecucco, C., and Matteoli, M. (1999). Internalization and proteolytic action of botulinum toxins in CNS neurons and astrocytes. *J Neurochem* *73*, 372-379.

Verderio, C., Grumelli, C., Raiteri, L., Coco, S., Paluzzi, S., Caccin, P., Rossetto, O., Bonanno, G., Montecucco, C., and Matteoli, M. (2007). Traffic of botulinum toxins A and E in excitatory and inhibitory neurons. *Traffic* *8*, 142-153.

Verderio, C., Pozzi, D., Pravettoni, E., Inverardi, F., Schenk, U., Coco, S., Proux-Gillardeaux, V., Galli, T., Rossetto, O., Frassoni, C., and Matteoli, M. (2004). SNAP-25 modulation of calcium dynamics underlies differences in GABAergic and glutamatergic responsiveness to depolarization. *Neuron* *41*, 599-610.

Washbourne, P., Pellizzari, R., Baldini, G., Wilson, M.C., and Montecucco, C. (1997). Botulinum neurotoxin types A and E require the SNARE motif in SNAP-25 for proteolysis. *FEBS Lett.* *418*, 1-5.

Weber, J.T., Hibbs, R.G., Jr., Darwish, A., Mishu, B., Corwin, A.L., Rakha, M., Hatheway, C.L., el Sharkawy, S., el-Rahim, S.A., al-Hamd, M.F., and et al. (1993). A massive outbreak of type E botulism associated with traditional salted fish in Cairo. *J Infect Dis* 167, 451-454.

Weinberg, M., Nativelle, R., and Prévot, A.R. (1937). *Les Microbes Anaérobies*. Masson et Cie: Paris.

Wellhöner, H.H. (1992). Tetanus and Botulinum Neurotoxins. In: *Selective Neurotoxicity*, vol. 102, eds. H. Herken and F. Hucho, Berlin: Springer-Verlag, 357-417.

Whelan, S.M., Elmore, M.J., Bodsworth, N.J., Atkinson, T., and N.P., M. (1992a). The complete amino acid-sequence of the *Clostridium botulinum* type-E neurotoxin derived by nucleotide sequence analysis of the encoding gene. *Eur. J. Biochem.* 204, 657-667.

Whelan, S.M., Elmore, M.J., Bodsworth, N.J., Brhem, J.K., Atkinson, T., and Minton, N.P. (1992b). Molecular cloning of the *Clostridium botulinum* structural gene encoding the type B neurotoxin and determination of its entire nucleotide sequence. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2345-2354.

Willems, A., East, A.K., Lawson, P.A., and Collins, M.D. (1993). Sequence of the gene coding for the neurotoxin of *Clostridium botulinum* type A associated with infant botulism: comparison with other clostridial neurotoxins. *Res. Microbiol.* 144, 547-556.

Worner, K., Szurmant, H., Chiang, C., and Hoch, J.A. (2006). Phosphorylation and functional analysis of the sporulation initiation factor Spo0A from *Clostridium botulinum*. *Mol Microbiol* 59, 1000-1012.

Yamakawa, K., Karasawa, T., Kakinuma, H., Maruyama, H., Takahashi, H., and Nakamura, S. (1997). Emergence of *Clostridium botulinum* typeB-like nontoxigenic organisms in a patient with type B infant botulism. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2163-2164.

Young, H.M. (1999). Embryological origin of interstitial cells of Cajal. *Microsc Res Tech* 47, 303-308.

Yowler, B.C., Kensinger, R.D., and Schengrund, C.L. (2002). Botulinum neurotoxin A activity is dependent upon the presence of specific gangliosides in neuroblastoma cells expressing synaptotagmin I. *J. Biol. Chem.* 277, 32815-32819.

Yowler, B.C., and Schengrund, C.L. (2004). Glycosphingolipids-sweets for botulinum neurotoxin. *Glycoconj J* 21, 287-293.

Zhang, L., Lin, W.J., Li, S., and Aoki, K.R. (2003). Complete DNA sequences of the botulinum neurotoxin complex of *Clostridium botulinum* type A-Hall (Allergan) strain. *Gene* 315, 21-32.

Zhou, Y., Foss, S., Lindo, P., Sarkar, H., and Singh, B.R. (2005). Hemagglutinin-33 of type A botulinum neurotoxin complex binds with synaptotagmin II. *Febs J* 272, 2717-2726.

Zhou, Y., Sugiyama, H., and Johnson, E.A. (1993). Transfer of neurotoxicity from *Clostridium butyricum* to a nontoxigenic *Clostridium botulinum* type E-like strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3825-3831.

## Passage de la neurotoxine botulique à travers la barrière intestinale

### Résumé

La neurotoxine botulique (BoNT), responsable du botulisme caractérisé par une paralysie flasque, est produite par des bactéries anaérobies du genre *Clostridium*. Les BoNTs, classifiées en 7 types (A à G), forment divers complexes avec des protéines non toxiques, dont le composant non toxique non hémagglutinant (NTNH) et les hémagglutinines (HAs). Les gènes sont organisés, au sein du locus botulique, selon deux opérons divergents, *ntnh-bont/A* et *ha34-ha17-ha70* pour le type A, dont l'expression est positivement régulée par le facteur sigma alternatif BotR. Un pic d'expression synchrone de tous les gènes du locus de type A est mesuré par RT-PCR en temps réel lors de la transition entre les phases exponentielle et stationnaire de croissance, en parallèle avec l'augmentation du titre en toxine du surnageant de culture. Dans un modèle d'épithélium intestinal, BoNT/A purifiée est transcytosée après liaison via le domaine Hc/A à des récepteurs apicaux comprenant des gangliosides et des protéines potentiellement apparentées à SV2. L'intensité de liaison et l'efficacité de transport de la toxine sont supérieures dans les cellules intestinales de type crypte plutôt qu'entérocyte. Injectés dans la lumière d'une anse iléale ligaturée, BoNT/A inhibe les contractions des muscles lisses et le domaine Hc/A fluorescent progresse de la muqueuse, via certaines cellules des cryptes, vers la sous-muqueuse et la musculature où il cible certaines terminaisons nerveuses, majoritairement cholinergiques. Hc/A entre par des voies distinctes dans les cellules neuronales (voie clathrine dépendante de la dynamine) et les cellules intestinales (voie non-clathrine, dépendante de Cdc42 et de la dynamine).

### Passage of botulinum neurotoxin across intestinal barrier

#### Abstract

Botulinum neurotoxin (BoNT), responsible for botulism which is characterized by flaccid paralysis, is produced by anaerobic bacteria of the *Clostridium* genus. BoNTs are classified into 7 types (A to G) and form different complexes by association with non-toxic proteins, including the non-toxic non-hemagglutinin component (NTNH) and hemagglutinins (HAs). Encoding genes are clustered in the botulinum locus and organized in two divergent operons, *ntnh-bont/A* and *ha34-ha17-ha70* for type A, whose expressions are positively regulated by the alternative sigma factor BotR. A synchronous expression peak of all the botulinum locus genes is measured by real-time RT-PCR at the transition between exponential and stationary growth phases, concomitantly to toxin accumulation in culture supernatant. In an intestinal epithelium model, purified BoNT/A is transcytosed after binding, via the Hc/A domain, to apical receptors including gangliosides and putative SV2-related proteins. Binding affinity and transport efficiency into intestinal cells are higher with crypt-type than with enterocyte-type cell lines. Injected into the lumen of ligatured mouse ileal loops, BoNT/A inhibits smooth muscle contractions and fluorescent Hc/A migrates across mucosa, through some crypt cells, to submucosa and musculosa where it targets certain nerve endings, mostly cholinergic. Hc/A is internalized via different pathways into neuronal cells (dynamine- and clathrin-dependent) and intestinal cells (dynamine- and Cdc42-dependent, and clathrin-independent).

**Mots clés :** *Clostridium botulinum*, Toxine, Régulation transcriptionnelle, Intestin, Récepteurs membranaires, Trafic intracellulaire.

**Key words :** *Clostridium botulinum*, Toxin, Transcriptional regulation, Intestine, Membrane receptors, Intracellular trafficking.