

# Rôle de la sécrétion de Type III dans la motilité cellulaire de *Shigella*

Romain Guérillot

Sandrine Heurtebise-Chrétien

Sous la direction de Guy Tran Van Nhieu.

## Publications:

Yiuka Leung, Shabeen Ally et Marcia B. Goldberg. Bacterial Actin Assembly Requires Toca-1 to Relieve N-WASP Autoinhibition. Janvier 2008, *Cell Host Microbe*. 17 ; 3(1) : 39–47.

Michinaga Ogawa, Yutaka Handa, Hiroshi Ashida, Masato Suzuki et Chihiro Sasakawa. The versatility of *Shigella* effectors. Janvier 2008. *Nature reviews microbiology*. Volume 6.

Sei Yoshida, Yutaka Handa, Toshihiko Suzuki, Michinaga Ogawa, Masato Suzuki, Asuka Tamai, Akio Abe, Eisaku Katayama, Chihiro Sasakawa. Microtubule-Severing Activity of *Shigella* Is Pivotal for Intercellular Spreading. 10 novembre 2006. *Science* vol. 314

Raymond Schuch, Robin C. Sandlin et Anthony T. Maurelli. A system for identifying post-invasion functions of invasion genes: requirements for the Mxi±Spa type III secretion pathway of *Shigella flexneri* in intercellular dissemination. 1999, *Molecular Microbiology*. 34(4), 675±689.

## Résumé

De nombreuses bactéries pathogènes ont la faculté d'envahir des cellules hôtes, et quelques bactéries telle que *Shigella flexneri*, sont capable d'induire la nucléation de l'actine a un pôle de la bactérie afin d'acquérir un moyen de propulsion nécessaire à leurs motilités au sein de la cellule hôte et vers les cellules voisines. A l'aide notamment de l'exemple de la protéine inductrice de la nucléation Toca-1, cette revue tente de discuter des moyens par lesquels *Shigella* peut ou pourrait par l'intermédiaire de son système de sécrétion de type III utiliser la machinerie de la cellule hôte afin de promouvoir son déplacement.

## Introduction

*Shigella flexneri* est un pathogène intracellulaire qui infecte l'épithélium intestinal. Grâce à l'envoi d'effecteurs par le système de sécrétion de type III (SST3), la bactérie va détourner la machinerie cellulaire provoquant notamment un réarrangement du cytosquelette d'actine. Des déformations de la membrane plasmique de la cellule hôte vont se former et permettre l'entrée de la bactérie par macropinocytose au niveau du pôle baso-latéral des cellules épithéliales. Après la lyse de la vacuole, la bactérie va se multiplier. Plusieurs pathogènes comme *Listeria monocytogènes*, *Rickettsia*, *Shigella flexneri* détournent la voie de polymérisation de l'actine pour se déplacer a l'intérieur des cellules. Le « treadmilling » résultant de la polymérisation à une extrémité du filament et de la dépolymérisation de l'autre extrémité, produit une force qui permet la propulsion des bactéries vers le cytoplasme des cellules voisines, favorisant ainsi leur diffusion. La nucléation de ces filaments d'actines fait intervenir le complexe Arp2/3. Ce complexe doit être activé par la protéine N-WASP elle-même activé par la protéine Cdc42 et/ou par une protéine plus récemment identifiée Toca-1. N-WASP est l'initiateur de l'assemblage de la queue nécessaire à la motilité cellulaire de *S. flexneri*. Il est maintenu sous une conformation autoinhibé inactive en complexe avec WASP-interacting protein (WIP). Son recrutement s'effectue à un seul pôle de *S. flexneri* par l'intermédiaire de sa protéine membranaire formant ainsi le complexe IcsA-N-WASP-Arp2/3, qui une fois actif, permet un déplacement orienté de la bactérie par polymérisation de l'actine. Dans cette revue, nous discuterons de l'action de Toca-1 et du système de sécrétion de type III (SST3) dans le cadre de la motilité cellulaire de *Shigella flexneri*.

## Discussion

### Rôle de Toca-1 dans la motilité cellulaire de *Shigella flexneri*

Yiuka & al. ont examiné la fonction physiologique et moléculaire de Toca 1 dans des cellules de mammifères infectés par *S. flexneri*. Ils ont montrés, à l'aide d'ARN interférant (short-hairspin interfering RNA) provoquant une déplétion de Toca-1, que l'initiation de la queue d'actine nécessaire à la motilité intracellulaire de *Shigella* était dépendante de Toca-1. Chez les cellules où Toca-1 a été fortement réprimé (plus de 95%), le nombre de bactéries étant capables de former des queues normales d'actine apparaît fortement diminué. En revanche, les rares queues d'actine assemblés à la surface de *S. flexneri* semblent avoir des tailles moyennes comparables. Suggérant ainsi que Toca-1 soit uniquement impliqué dans l'initiation de la polymérisation de l'actine et non pas dans l'allongement de la queue. De la même façon l'introduction d'un vecteur permettant la surexpression de Toca-1 dans la cellule hôte a permis de mettre en évidence une augmentation du nombre de queues d'actines bien formées mais de taille comparable à celles formées dans une cellule sauvage.

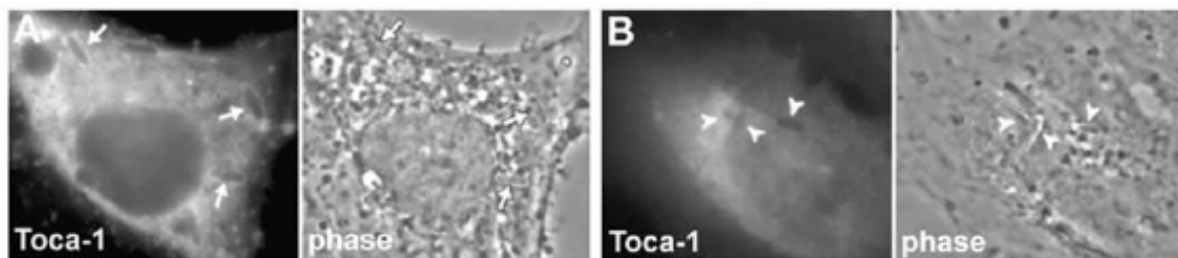
A l'aide d'un mutant de N-WASP dans le domaine SH3 ne pouvant pas interagir avec Toca-1 (Ho & al. 2004), Yiuka & al. ont mis en évidence la nécessité d'interaction de Toca-1 avec N-WASP pour la formation de la queue d'actine.

Antérieurement à l'étude de l'implication de Toca-1 dans la motilité de *S. flexneri* de Yiuka & al. , il avait été démontré par Ho & al que Toca-1 était indispensable à la nucléation des filaments d'actines par l'activation de N WASP in vitro. D'un point de vue critique, la motilité intracellulaire de *Shigella* étant dépendante de N WASP l'implication de Toca1 pour son activation n'est qu'une confirmation in vivo du travail de Ho & al dans le cas de l'initiation de la motilité intracellulaire de *S. flexneri*.

Ils ont aussi observé, par marquage à la GFP de Toca-1, que l'initiation des mouvements intracellulaires de *S. flexneri* étaient précédés par une colocalisation transitoire de Toca-1 autour de la bactérie. Tsujita K & al. ont découvert que Toca-1 pouvait également lier la Dynamin qui est une GTPase responsable l'endocytose des cellules eucaryotes. Elle est principalement impliquée dans la scission des vésicules nouvellement formées à partir de la membrane d'un compartiment et la fusion avec un autre compartiment, aussi bien à la surface de la cellule qu'avec l'appareil de Golgi. De ce fait Toca-1 pourrait également jouer un rôle lors du passage de *Shigella* de cellule à cellule.

## Implication du système de sécrétion de type III dans la motilité

Afin de montrer que le recrutement de Toca-1 était médié par le système de sécrétion de type III, Yiuka & al. ont utilisé le système de Schuch & al. afin de déréguler négativement l'expression du régulateur global du SST3 *virB* après l'entrée de *S. flexneri* dans le cytosol de la cellule (mécanismes dépendants du SST3). Par l'observation de l'absence de recrutement de Toca-1 lors de la répression de *virB* les auteurs concluent que le recrutement de Toca-1 est dépendant du SST3 (voir figure 1). Il est regrettable que lors de ces expériences cherchant à montrer l'implication du SST3 dans le recrutement de Toca-1 les auteurs n'aient testé que l'implication du seul mutant *virA* (effecteur du SST3).



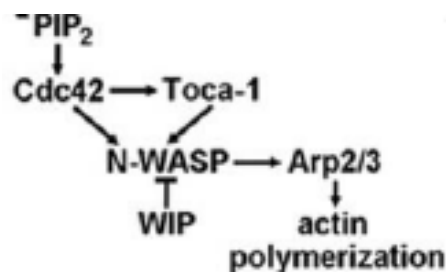
**Figure 1** : Recrutement de Toca-1 à la surface de *S. flexneri* exprimant *virB* (flèche A) le régulateur principal du SST3, mais pas à *S. flexneri* qui n'exprime *virB* (flèche B). Expression conditionnelle de *virB* sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'IPTG par addition ou absence d'IPTG (adapté de Yiuka & al. 2008)

Plusieurs modes d'actions pourraient expliquer cette dépendance du SST3 dans le recrutement de Toca-1. Le schéma le plus simple serait que la sécrétion d'un effecteur du SST3 ayant une affinité directe pour Toca-1 provoque le recrutement de Toca-1 à proximité de la bactérie. Ce recrutement pourrait aussi être médié par l'interaction directe de Toca-1 avec une protéine structurale du SST3. Il est aussi envisageable que la répression du régulateur *VirB* impacte l'expression de gènes nécessaires au recrutement de Toca-1 mais qui ne sont pas directement liés au SST3. L'absence de SST3 pourrait aussi être à l'origine d'une modification de la paroi de la bactérie affectant ce recrutement.

Enfin la mobilisation de Toca-1 à la surface *S. flexneri* pourrait résulter d'interactions indirectes complexes : Toca-1 comporte trois domaines fonctionnels (Heath and Insall 2008):

- un domaine F-BAR/EFC en position N-terminale interagissant avec la phosphatidylserine et le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>)
- un domaine HR1 au centre
- un domaine SH3 à l'extrémité C-terminale interagissant avec N-WASP et Cdc42

Parmi ces protéines, deux d'entre elles, PIP<sub>2</sub> et Cdc42 interagissent elle-même avec des protéines du SST3. Il est donc possible d'imaginer que une (ou plusieurs) interactions (ou complexe) du type [pSST3]-[PIP<sub>2</sub>/Cdc42]-[Toca-1] puissent être à l'origine du recrutement de Toca-1 par le SST3. Il est à noter que trois des molécules (PIP<sub>2</sub>, N-WASP et Cdc42) pouvant interagir avec Toca-1 sont des effecteurs de l'initiation de la polymérisation de l'actine (voir figure 2). Les protéines du SST3 pouvant être impliquées dans ce phénomène de recrutement indirect de Toca-1 sont IpgD et IpaC interagissant respectivement avec PIP<sub>2</sub> et Cdc42.



**Figure 2 :** Voie de signalisation de l'activation de N-WASP endogène (adapté de Ho et al 2004)

IpgD possède une activité PIP<sub>2</sub> phosphatase et catalyse l'hydrolyse du PIP<sub>2</sub> en phosphatidylinositol 5-monophosphate (PIP), ce qui provoque une polymérisation locale de l'actine. Cette activité pourrait aussi avoir un impacte mobilisateur sur Toca-1. En effet Toca-1 pouvant se lier fortement au PIP<sub>2</sub> membranaire une telle activité pourrait être responsable d'une augmentation de la concentration de Toca-1 cytosolique provoqué par son desancrage de la membrane plasmique. (Heath and Insall 2008; Takano, Toyooka et al. 2008) Ainsi l'initiation de la polymérisation de l'actine et la motilité de *Shigella* pourraient être favorisées.

Il a été montré (Yoshida, S & al, 2006) que le mouvement de *Shigella* à l'intérieur du cytoplasme de la cellule hôte était très altéré par les microtubules, mais qu'une bactérie motile était capable par l'action de VirA de détruire les microtubules l'entourant. VirA est aussi utilisé lors de l'entrée de la bactérie dans la cellule hôte. Il a donc un rôle à la fois dans les processus d'invasions et la motilité intracellulaire. Il constitue le seul effecteur du SST3 étant impliqué dans la motilité cellulaire de *S. flexneri* caractérisé.

De nombreux autres effecteurs du SST3 interagissent avec des protéines liées aux voies de signalisations impliquées dans le contrôle du cytosquelette d'actine parmi lesquels : IpgB1, IpgB2, IpaA, OspE2. Ces protéines, comme la plupart des effecteurs de SST3 ont été identifiés lors des phases précoces de l'infection. Mais il paraît probable que certains d'entre eux puissent également jouer un rôle dans la motilité intracellulaire de *S. flexneri*. Les voies de signalisations, parfois interconnectées, médiées par ces effecteurs inspirent un rôle de

contrôle de la motilité de *Shigella*. En outre, l'observation du déplacement de *S. flexneri* à l'intérieur de sa cellule hôte montre qu'elle est capable de changer rapidement de direction, de tourner sur elle-même ou même de s'arrêter. Ces observations laissent penser que de multiples effecteurs sécrétés pourraient agir en commun et permettraient dans une certaine mesure le contrôle de la motilité intracellulaire de *Shigella* grâce au détournement du cytosquelette d'actine.

## Références bibliographiques :

Thierry Vasselon, Joëlle Mounier Raymond Hellio, et Philippe J. Sansonetti. Movement along Actin Filaments of the Perijunctional Area and De Novo Polymerization of Cellular Actin Are Required for *Shigella flexneri* Colonization of Epithelial Caco-2 Cell Monolayers. *Mars* 1992 *Infection and immunity*, vol. 60, No. 3 p. 1031-1040

Edith Gouin, Matthew D Welch et Pascale Cossart. Actin-based motility of intracellular pathogens. 2005. *Current Opinion in Microbiology*. 8:35–45

Christophe Le Clainche et Marie-France Carlier. Regulation of Actin Assembly Associated With Protrusion and Adhesion in Cell Migration. 2008. *Physiol Rev* 88: 489–513

Egile, C., T. P. Loisel, et al. (1999). "Activation of the CDC42 effector N-WASP by the *Shigella flexneri* IcsA protein promotes actin nucleation by Arp2/3 complex and bacterial actin-based motility." *J Cell Biol* 146(6): 1319-32.

Frost, A., R. Perera, et al. (2008). "Structural basis of membrane invagination by F-BAR domains." *Cell* 132(5): 807-17.

Gouin, E., M. D. Welch, et al. (2005). "Actin-based motility of intracellular pathogens." *Curr Opin Microbiol* 8(1): 35-45.

Heath, R. J. and R. H. Insall (2008). "F-BAR domains: multifunctional regulators of membrane curvature." *J Cell Sci* 121(Pt 12): 1951-4.

Ho, H. Y., R. Rohatgi, et al. (2004). "Toca-1 mediates Cdc42-dependent actin nucleation by activating the N-WASP-WIP complex." *Cell* 118(2): 203-16.

Le Clainche, C. and M. F. Carlier (2008). "Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration." *Physiol Rev* 88(2): 489-513.

Niebuhr, K., S. Giuriato, et al. (2002). "Conversion of PtdIns(4,5)P(2) into PtdIns(5)P by the *S.flexneri* effector IpgD reorganizes host cell morphology." *EMBO J* 21(19): 5069-78.

Takano, K., K. Toyooka, et al. (2008). "EFC/F-BAR proteins and the N-WASP-WIP complex induce membrane curvature-dependent actin polymerization." *EMBO J* 27(21): 2817-28.