L'annuaire du Collège de France

Cours et travaux

112 | 2013

Annuaire du Collège de France 2011-2012

Communication intercellulaire et infections microbiennes

UMR 7241 /U 1050 (CIRB)

Guy Tran Van Nhieu

Édition électronique

URL : <https://journals.openedition.org/annuaire-cdf/1086>

DOI : 10.4000/annuaire-cdf.1086

ISBN : 978-2-7226-0325-7

ISSN : 2109-9227

Éditeur

Collège de France

Édition imprimée

Date de publication : 1 avril 2013

Pagination : 890-894

ISBN : 978-2-7226-0198-7

ISSN : 0069-5580

Référence électronique

Guy Tran Van Nhieu, « Communication intercellulaire et infections microbiennes », *L'annuaire du Collège de France* [En ligne], 112 | 2013, mis en ligne le 22 novembre 2013, consulté le 22 août 2022. URL : <http://journals.openedition.org/annuaire-cdf/1086> ; DOI : <https://doi.org/10.4000/annuaire-cdf.1086>

Tous droits réservés

the blood-brain barrier », *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 4 avril 2012 [doi: 10.1038/jcbfm].

Giaume C., Orellana J.A., Abudara V. et Sáez J.C., « Connexin-based channels in astrocytes: how to study their properties », *Methods in Molecular Biology*, 814, 2012, 283-303.

Koulakoff A., Mei X., Orellana J.A., Sáez J.C. et Giaume C., « Glial connexin expression and function in the context of Alzheimer's disease », *Biochimica Biophysica Acta*, 1818, 2012, 2048-2057.

Roux L., Benchenane K., Rothstein J.D., Bonvento G. et Giaume C., « Plasticity of astroglial networks in olfactory glomeruli », *Proceeding National Academy Sciences (USA)*, 108, 2011, 18442-18446.

Giaume C. et Liu X., « From a glial syncytium to a more restricted and specific glial networking », *Journal of Physiology (Paris)*, 106, 2012, 34-39.

Tencé M., Ezan P., Amigou E. et Giaume C., « Increased interaction of connexin43 with zonula occludens-1 during inhibition of gap junctions by G protein-coupled receptor agonists », *Cell Signaling*, 24, 2012, 86-98.

Pannasch U., Vargová L., Reingruber J., Ezan P., Holcman D., Giaume C., Syková E. et Rouach N., « Astroglial networks scale synaptic activity and plasticity », *Proceeding National Academy Sciences (USA)*, 108, 2011, 8467-8472.

Orellana J.A., Shoji K.F., Abudara V., Ezan P., Amigou E., Sáez P.J., Jiang J.X., Naus C.C., Sáez J.C. et Giaume C., « Amyloid β -induced death in neurons involves glial and neuronal hemichannels », *Journal of Neuroscience*, 31, 2011, 4962-4977.

Orellana J.A., Froger N., Ezan P., Jiang J.X., Bennett M.V., Naus C.C., Giaume C. et Sáez J.C., « ATP and glutamate released via astroglial connexin 43 hemichannels mediate neuronal death through activation of pannexin 1 hemichannels », *Journal of Neurochemistry*, 118, 2011, 826-840.

Communication intercellulaire et infections microbiennes UMR 7241 / U 1050 (CIRB)

Responsable : Guy TRAN VAN NHIEU

TRAVAUX EFFECTUÉS (2011-2012)

Les travaux de l'équipe visent à comprendre le mécanisme d'invasion des cellules épithéliales par *Shigella*, l'agent de la dysenterie bacillaire. Les sections développées ci-dessous ne concernent qu'une partie des activités de l'équipe. Nous avons plus récemment étendu notre champ d'étude au mécanisme de virulence des *Escherichia coli* enteropathogène (EPEC) en étudiant la régulation de l'activité de leur T3SS, ainsi qu'à celui du pneumocoque (*Streptococcus pneumoniae*), une bactérie pathogène responsable de maladies invasives dont des méningites.

Signalisation calcique et dépendante des hémicanaux durant l'invasion de l'épithélium par *Shigella*

(PUHAR *et al.*, soumis ; TRAN VAN NHIEU *et al.*, sous presse)

Nous avons précédemment montré que *Shigella* induisait des réponses calciques atypiques dans les cellules HeLa, sous forme de pics lents, sporadiques et isolés. L'invasion de *Shigella* dans les cellules exprimant la connexine 26 induit la libération d'ATP dans le milieu extracellulaire par les hémicanaux. L'ATP dans le milieu de culture et stimule à la fois l'invasion et la dissémination de *Shigella*. Nous avons montré que les cellules intestinales polarisées Caco2/TC7 exprimaient les Cx26, Cx32 et Cx43 mais que dans ces cellules, les Cx s'organisent de manière préférentielle en hémicanaux, présents majoritairement au niveau des membranes baso-latérales. En collaboration avec Philippe Sansonetti, nous avons montré que l'ouverture des hémicanaux était régulée négativement par l'activité phosphatidyl-inositol (4,5) bisphosphate – 4-phosphatase de l'effecteur de type III IpgD durant les étapes tardives de l'infection. De manière spectaculaire, l'infection par le mutant *ipgD* dans des expériences *in vivo* dans le modèle d'anse ligaturée de lapin montre une inflammation et une destruction tissulaire bien supérieure à celles induites par la souche sauvage de *Shigella*. Cette inflammation intense corrèle avec des quantités de produits de dégradation de l'ATP dans la lumière intestinale durant les étapes précoces de l'infection. Ces résultats montrent que l'ATP extracellulaire émis de manière précoce par les hémicanaux durant l'infection par *Shigella* agit comme signal de danger et que l'effecteur IpgD, injecté dans la cellule épithéliale (Puhar *et al.*, soumis).

En collaboration avec le Dr Laurent Combettes, nous avons montré que l'expression d'une inositol 1, 4, 5 triphosphate (IP3)-5 phosphatase qui prévient les augmentations d'IP3, conduit à une inhibition de l'invasion de *Shigella*. Le rôle de la signalisation dépendante de l'IP3 a également été confirmé en inhibant l'expression des récepteurs IP3 de type 1 et de type 3, correspondant aux récepteurs majoritaires de l'IP3 dans les cellules HeLa. Afin de préciser le rôle de l'IP3 durant l'invasion, nous avons mis au point un protocole basé sur l'incubation dans un milieu dépourvu de calcium combiné à un traitement avec la thapsigargine, un inhibiteur de la calcium-ATPase du réticulum endoplasmique, pour montrer que l'invasion des cellules par *Shigella* pouvait se produire en absence de réponse calcique globale. Ces résultats suggèrent que via l'IP3, des réponses calciques locales sont impliquées dans l'invasion des cellules par *Shigella* (Tran Van Nhieu *et al.*, sous presse). Nous avons pu visualiser que de telles réponses locales sont associées à l'invasion de *Shigella*. Alors que les réponses locales décrites par ailleurs montrent des durées de l'ordre de quelques centaines de millisecondes, les réponses induites par *Shigella* sont très atypiques puisqu'elles sont localisées au niveau du foyer d'entrée de la bactérie et peuvent durer jusqu'à dix secondes. En utilisant la technique de FRAP (fluorescence recovery after photobleaching), nous avons montré que ces réponses locales persistantes étaient liées à la restriction de la diffusion de l'InsP3 associée à la polymérisation de l'actine au niveau du foyer d'entrée, combinée à un enrichissement local de récepteurs à l'IP3 (Tran Van Nhieu *et al.*, soumis). Ces résultats impliquent que la bactérie peut créer un micro-environnement intracellulaire où les augmentations des concentrations calciques peuvent perdurer sans entraîner de cytotoxicité cellulaire. Le concept de réponse locale dont la durée est modulée par des remaniements du cytosquelette a des implications importantes dans la régulation des processus cellulaires locaux.

Caractérisation de filopodes impliqués dans la capture précoce des bactéries

(ROMERO *et al.*, 2011 ; ROMERO *et al.*, 2012)

Nous avons observé que durant les étapes initiales de l'infection, *Shigella* interagit principalement avec la cellule hôte par l'intermédiaire de filopodes. Le contact de la bactérie avec l'extrémité des filopodes, dépend des composants du complexe d'extrémité IpaB et d'IpaD. Ce contact induit la rétraction des filopodes vers le corps cellulaire. Une fois au niveau du corps cellulaire, la bactérie poursuit son entrée. La signalisation dépendante de l'ATP extracellulaire et des connexines stimule la capture des bactéries, et induit la phosphorylation de la MAP kinase Erk. Au cours des étapes précoces de l'invasion, *Shigella* active Erk et cette activation est amplifiée par la signalisation dépendante de l'ATP et des connexines. Nous avons montré que l'activité de Erk est nécessaire pour la rétraction des filopodes et l'invasion des cellules par *Shigella*. Nous avons observé des captures de bactéries par des filopodes émanant de foyers d'entrée à la face apicale de cellules épithéliales polarisées en culture. L'inhibition de Erk diminue le nombre de bactéries associées à un site d'entrée et réduit l'invasion de *Shigella*, suggérant que le processus de capture / rétraction des bactéries est une étape majeure lors de l'invasion des cellules intestinales épithéliales. L'ensemble de ces résultats démontre que le principal mode d'interaction de *Shigella* avec la cellule épithéliale se fait par l'intermédiaire des filopodes et que cette interaction conditionne l'invasion. Ainsi, le faible pouvoir d'adhérence de *Shigella* est compensé par l'efficacité de l'invasion observée après capture et rétraction des filopodes. Ce processus pourrait permettre à la bactérie d'être un germe exclusivement invasif et peu adhésif, limitant ainsi son exposition à la surface des cellules épithéliales et donc sa reconnaissance par la réponse innée de l'hôte. Une telle stratégie permettrait d'expliquer pourquoi bien que faiblement adhésive *in vitro*, un inoculum extrêmement faible de *Shigella* suffit à déclencher la maladie chez l'homme. Les filopodes sont des organelles de la cellule qui ont pour fonction de sentir l'environnement extracellulaire, et dont la formation dépend de la polymérisation de l'actine. Nous avons montré que la dynamique de l'actine contrôle également la rétraction de filopodes, ainsi que la mise en place et la stabilisation des interactions filopode-bactérie. Des expériences de FRAP ont montré que Erk, localisé à la base du filopode, régule l'assemblage de l'actine : en stimulant les cellules par l'ATP, la polymérisation de l'actine est accélérée non seulement dans les filopodes, mais aussi au cortex, provoquant transitoirement un allongement des filopodes et une extension de la membrane plasmique à leur base. Ces résultats suggèrent donc que Erk contrôle la rétraction du filopode en régulant la polymérisation de l'actine.

Les filopodes sont des structures extrêmement fines contenant un nombre de filaments d'actine limité, estimé tout au plus à quelques dizaines (Medalia *et al.*, 2007). De fait, ils peuvent être considérés comme des unités fonctionnelles minimales impliquant un nombre discret d'interactions induisant ou relayant la signalisation. Ces propriétés font de la mesure des forces mises en jeu lors de la rétraction du filopode une approche de choix pour comprendre les processus moléculaires impliqués. En collaboration avec l'équipe de Patricia Bassereau (Institut Curie), nous avons utilisé un microscope confocal équipé d'une pince optique pour mesurer la force de rétraction exercée par un filopode unique. Nous avons utilisé des billes ayant des propriétés de surface différentes, telles que des billes recouvertes d'invasine, un

ligand hautement spécifique des intégrines- $\beta 1$, des billes recouvertes de poly-lysine, de groupements COO^- , ou de membranes de *Shigella* contenant le SST3. Ces billes induisent systématiquement la rétraction des filopodes à leur contact. Ainsi, le mécanisme de rétraction des filopodes est un phénomène cellulaire général, basé sur certains types interactions et exploité par *Shigella* pour initier le contact avec les cellules épithéliales. La force de rétraction d'un filopode individuel dépend alors de la nature de l'interaction avec la bille et de la densité de ligands sur la bille : plus la densité est importante, plus la force exercée par le filopode augmente. De façon surprenante, un nombre discret de SST3 immobilisés sur des billes induit une force de rétraction supérieure à celle induite par une multitude de ligand des intégrines- $\beta 1$, ce qui suggère qu'un nombre discret de récepteurs regroupés est suffisant pour induire une haute force de rétraction du filopode. Ainsi, cette approche biophysique de la rétraction des filopodes a permis de révéler ce processus adaptatif de la force de rétraction du filopode, lié à la densité des différents récepteurs engagés dans des interactions à l'extrémité du filopode.

Contrôle de l'activité du T3SS des EPEC par la protéine EspC

(GUIGNOT *et al.*, en préparation)

EspC est une sérine protéase par les EPEC appartenant à la famille des SPATEs (Serine Protease Autotransporter of Enterobacteriaceae) sécrétée de manière indépendante du T3SS. Bien que l'expression d'EspC soit couplée à celle du T3SS (suggérant que cette toxine joue un rôle lors de l'infection des cellules), le rôle d'EspC dans la pathogénèse des EPEC reste à ce jour mal connu. L'exposition de cellules non polarisées à de fortes doses d'EspC semble associée à une activité cytotoxique qui résulterait d'un clivage de la fodrine [Navarro-Garcia, 2004 #243]. En collaboration avec le groupe de G. Frankel (Imperial College of London, Royaume-Uni), nous avons observé qu'en absence d'EspC des quantités plus importantes des éléments du translocon du T3SS des EPEC (EspD et EspA) étaient retrouvées dans le surnageant de culture. Nous avons montré que EspD et EspA sont des substrats de EspC *in vitro*. L'utilisation de PMSF (un inhibiteur des sérines protéases) et la construction d'une forme d'EspC mutée sur la sérine du site sérine-protéase, avait également permis de montrer que cette régulation était portée par le motif sérine-protéase décrit précédemment (GDSGSG) et commun à toutes les SPATEs. Nous avons montré que la protéolyse des éléments du translocon des EPEC était spécifique à EspC et que d'autres SPATEs (Sati exprimée par des souches d'*Escherichia coli* uropathogènes ou SepA exprimée par *Shigella* par exemple) n'étaient pas capable de protéolyser EspD et EspA, ou leurs orthologues respectifs. Par contre, nos résultats indiquent que le T3SS des *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) est également soumis à une régulation similaire par EspP, l'orthologue de EspC chez les EHEC.

Nous avons alors vérifié que la régulation de la quantité d'EspD par la protéase EspC était également observée du contact cellulaire par des expériences d'immunofluorescence sur des cellules infectées et analysées en microscopie confocale. Dans le cas de la souche sauvage, le marquage d'EspD apparaît sous une forme ponctiforme à la surface de la bactérie, généralement un point de marquage d'EspD localisé à un pôle de la bactérie. Au contraire, un mutant *espC* montre une dérégulation de la quantité d'EspD qui se caractérise par de larges structures,

incluant vraisemblablement des agrégats à la surface de la bactérie. Ces résultats ont également été vérifiés par une approche biochimique lors de tests de translocation. Finalement, nous avons observé que contrairement à la souche sauvage d'EPEC, la souche mutante *espC* induisait une incorporation importante de marqueur fluorescent dépendant du T3SS lors du contact avec la cellule épithéliale, un test que nous avons mis au point pour évaluer la formation du pore associé au translocon du T3SS. Les résultats obtenus démontrent clairement que l'activité protéolytique d'EspC sur EspD contrôle bien la formation du pore membranaire.

PUBLICATIONS 2011-2012

Tran Van Nhieu G., Liu B.K., Zhang J., Pierre F., Prigent S., Sansonetti P., Erneux C., Kim J.K., Suh P.-G., Dupont G., Combettes L., « Actin-based confinement of calcium responses during *Shigella* invasion », *Nature Communications*, sous presse.

Romero S., Quatela A., Bornschlöggl T., Guadagnini S., Bassereau P. et Tran Van Nhieu G. « Filopodium retraction is controlled by adhesion to its tip », *J. Cell Sci.*, 16, 2012.

Ehsani S., Santos J.C., Rodrigues C.D., Henriques R., Audry L., Zimmer C., Sansonetti P., Tran Van Nhieu G. et Enninga J., « Hierarchies of Host Factor Dynamics at the Entry Site of *Shigella flexneri* during Host Cell Invasion », *Infect. Immun.*, 80(7), 2012, 2548-2557; Epub 23 avril 2012.

Romero S., Grompone G., Carayol N., Mounier J., Guadagnini S., Prevost M.C., Sansonetti P.J. et Tran Van Nhieu G., « ATP-Mediated Erk1/2 Activation Stimulates Bacterial Capture by Filopodia, which Precedes *Shigella* Invasion of Epithelial Cells », *Cell Host & Microbe*, 9(6), 2011, 508-519.

Park H., Valencia-Gallardo C., Sharff A., Tran Van Nhieu G. et Izard T., « Novel Vinculin Binding Site of the IpaA Invasin of *Shigella*. », *J. Biol. Chem.*, 286(26), 2011, 23214-23221.

Circuits neuronaux et comportement. Analyse génétique de traitement olfactif et fonction (CIRB)

Responsable : Alexander FLEISCHMANN

RECHERCHE

Notre laboratoire s'intéresse aux circuits neuronaux qui sous-tendent la perception des odeurs. Nous utilisons une combinaison d'approches expérimentales chez la souris, incluant génétique moléculaire, imagerie *in vivo* et analyse du comportement, pour comprendre la logique du codage de l'information sensorielle par les différents relais olfactifs du cerveau.

La perception des odeurs repose d'une part sur la reconnaissance des divers composants odorifères en périphérie, et d'autre part sur des mécanismes généraux dans le cerveau qui permettent la discrimination des odeurs. Chez les souris, les