

Un modèle transgénique pour la listériose humaine : rôle de l'interaction entre l'internaline et la E-cadhérine dans la traversée de la barrière intestinale par *L. monocytogenes*

Listeria monocytogenes est la bactérie responsable de la listériose humaine, une infection d'origine alimentaire touchant préférentiellement les sujets aux âges extrêmes de la vie, les femmes enceintes, et les patients immunodéprimés [1]. La gravité de la listériose humaine tient à la capacité qu'a cette bactérie intracellulaire facultative d'atteindre le système nerveux central et l'unité foeto-placentaire. Au cours du processus infectieux, *L. monocytogenes* peut donc franchir trois barrières: la barrière intestinale, porte d'entrée dans l'organisme, la barrière hémato-encéphalique au cours des atteintes neuroméningées, et la barrière materno-foetale, au cours des infections foeto-placentaires. Jusqu'à ce jour, les déterminants moléculaires du franchissement de ces barrières n'étaient pas connus.

Le modèle animal le plus couramment utilisé pour étudier la listériose humaine est le modèle murin. Dans ce modèle, une infection par voie intraveineuse peut entraîner une létalité, et la dose létale tuant 50 % des animaux (DL 50) est d'environ 10⁵ bactéries. Ce modèle a été particulièrement utile aux immunologistes, puisqu'il a permis de découvrir les bases de l'immunité cellulaire [2]. Cependant, il a de longue date été remarqué que, dans cette espèce, l'infection par voie orale est très peu efficace, qu'elle n'entraîne pas de mortalité reproductible, et que la translocation de *L. monocytogenes* au travers de la barrière intestinale est particulièrement faible, non supérieure à celle de *L.*

innocua, une espèce de *Listeria* non invasive non pathogène. De plus, chez la souris, contrairement à ce qui est observé dans l'espèce humaine, *L. monocytogenes* ne semble pas présenter un tropisme électif pour le système nerveux central et l'unité foetoplacentaire.

L'entrée de *L. monocytogenes* dans les cellules en culture

Les mécanismes de l'infection cellulaire par *L. monocytogenes* ont été étudiés en détails, et la mise au point d'outils de mutagenèse a permis d'identifier les principaux effecteurs bactériens responsables des différentes étapes du processus infectieux (figure 1) [3]. Il a ainsi été démontré que l'internaline (InlA) et InlB,

deux protéines de surface de *L. monocytogenes*, sont chacune suffisante pour permettre l'internalisation de *L. monocytogenes* dans les cellules non phagocytaires [4-7]. L'internaline est nécessaire et suffisante pour permettre l'internalisation dans les cellules épithéliales humaines exprimant son récepteur la E-cadhérine, telles que les cellules Caco-2 [8]. InlB permet l'entrée dans un très grand nombre de cellules, qu'elles expriment ou non la E-cadhérine. InlB a deux récepteurs connus, dont l'expression est quasi ubiquitaire, le gC1q-R (récepteur de la partie globulaire du composé C1q de la cascade du complément) et c-Met (récepteur du facteur de croissance des hépatocytes ou HGF) [9, 10].

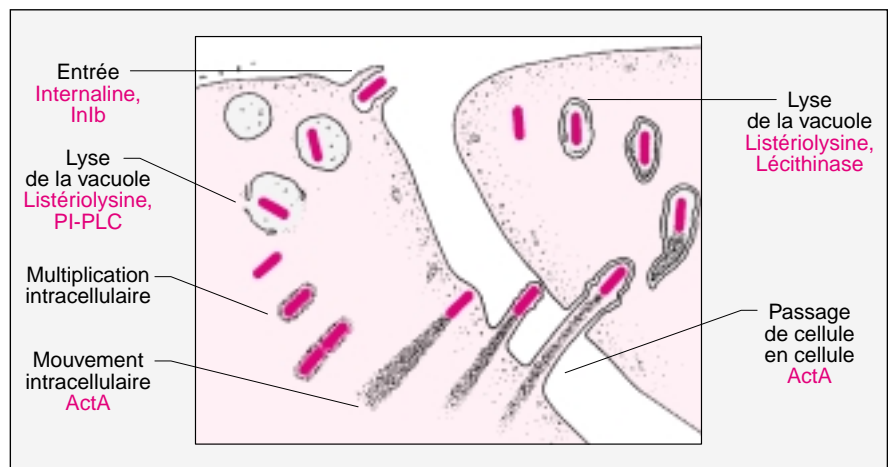


Figure 1. Les différentes phases de l'infection cellulaire par *Listeria monocytogenes*. Les effecteurs bactériens qui en sont responsables sont indiqués en rouge.

Spécificité de l'interaction de l'internaline avec son récepteur la E-cadhérine

L'interaction de l'internaline avec la E-cadhérine est très spécifique [11]. En effet, contrairement à la E-cadhérine humaine, la E-cadhérine murine n'est pas un récepteur pour l'internaline, malgré une identité de 85 % entre ces deux protéines. Pour élucider les bases moléculaires de cette spécificité, nous avons produit une série de protéines hybrides et avons ainsi pu démontrer que la région responsable de la spécificité était le premier des cinq domaines extra cellulaires de la E-cadhérine [11]. Par mutagenèse dirigée, nous avons ensuite pu démontrer que la spécificité tenait à la nature d'un seul acide aminé, le seizième, qui est un acide glutamique dans la E-cadhérine murine non reconnue par l'internaline, et une proline dans la E-cadhérine humaine reconnue par l'internaline [11]. Ces résultats expliquent qu'aucun rôle de l'internaline n'ait pu être mis en évidence dans le modèle murin, qui s'avère a posteriori inapproprié pour déterminer le rôle de cette interaction *in vivo*. En revanche, le cobaye, dont la E-cadhérine porte une proline en position 16 et est reconnue par l'internaline *in vitro*, semble constituer un modèle adéquat pour étudier le rôle de cette protéine [11].

Rôle de l'interaction entre l'internaline et la E-cadhérine *in vivo*

Nous avons donc étudié dans cette espèce animale le rôle de l'internaline. Contrairement à ce qui est observé chez la souris (ainsi que chez le rat, dont la E-cadhérine comporte aussi un acide glutamique en position 16 et n'est donc pas reconnu par l'internaline), il existe une mortalité dose-dépendante et internaline-dépendante après infection par voie orale chez le cobaye [12]. Dès 9 heures après l'administration de l'inoculum, *L. monocytogenes* peut être détectée dans les entérocytes de l'intestin grêle. Vingt-quatre heures après l'infection, des sites de réplication bactérienne entraînant un afflux

de polynucléaires et de monocytes sont présents dans la lamina propria des villosités intestinales. Les bactéries gagnent ensuite les ganglions mésentériques, le foie et la rate. Ainsi, dans ce modèle où l'interaction internaline-E-cadhérine peut avoir lieu, l'internaline permet la traversée de la barrière intestinale, et l'infection du tissu intestinal puis des organes profonds [12] (*figure 2*).

A ce stade, si nous avons démontré que l'internaline est un facteur de virulence de *L. monocytogenes* associé à une mortalité dose-dépendante, il restait à démontrer que l'effet de l'internaline était la conséquence de son interaction avec la E-cadhérine, et à déterminer la cellule cible exprimant la E-cadhérine reconnue par l'internaline *in vivo*. Ayant constaté la présence de *L. monocytogenes* intraentérocytaires chez le cobaye, notre première hypothèse était que l'internaline interagissait avec la E-cadhérine exprimée à la surface des entérocytes. Il était cependant possible que la présence de ces bactéries intraentérocytaires témoigne d'un passage des bactéries de cellule en cellule, plutôt que d'une infection directe des entérocytes (comme cela a notamment été décrit pour *Shigella*). En effet, la E-cadhérine est aussi exprimée dans d'autres cellules du tissu intestinal, comme les cellules M ou les cellules dendritiques des plaques de Peyer.

Pour démontrer le rôle de la E-cadhérine entérocytaire dans la listériose acquise par voie orale, nous avons construit, en collaboration avec l'équipe de Charles Babinet (Unité de biologie du Développement, Institut Pasteur, Paris) une lignée de souris transgénique exprimant la E-cadhérine humaine de façon restreinte aux entérocytes, en plaçant l'ADNc de la E-cadhérine humaine sous le contrôle du promoteur du gène *iFABP*, qui est exclusivement exprimé dans les entérocytes [12]. Dans ce modèle transgénique, *L. monocytogenes* acquiert la capacité de traverser la barrière intestinale pour atteindre les ganglions mésentériques, le foie et la rate, et provoquer une infection létale. Ces résultats démontrent formellement le rôle crucial de l'interaction internaline-E-cadhérine au niveau entérocy-

taire dans la traversée de la barrière intestinale et le développement d'une infection invasive après inoculation par voie orale [12] (*cf. figure 2*).

Conclusions et perspectives

L'interaction entre l'internaline de *L. monocytogenes* et la E-cadhérine entérocytaire est donc une étape clef de la listériose. Ces résultats apportent une explication moléculaire aux résultats d'études épidémiologiques récentes ayant démontré l'entéropathogénicité de *L. monocytogenes* chez l'homme [13, 14]. L'obtention de ce modèle transgénique de listériose acquise par voie orale permet d'envisager d'étudier de nouveaux aspects de la listériose, notamment d'identifier des facteurs de l'hôte impliqués dans la sensibilité ou la résistance à cette infection. Il est en effet possible de croiser notre lignée transgénique avec différentes autres lignées invalidées pour des gènes codant pour des effecteurs du système immunitaire et d'ainsi disposer d'un outil génétique pour étudier leur fonction au cours de la listériose acquise par voie orale. Les bases moléculaires de la traversée par *L. monocytogenes* des barrières hémato-encéphalique et materno-foetale au cours de la listériose humaine sont inconnues (*cf. figure 2*). Ces barrières comportent des cellules exprimant la E-cadhérine (cellules épithéliales des plexus choroïdes, cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux, cytotrophoblaste et cellules épithéliales amniotiques). Ces cellules pourraient donc constituer une cible pour *L. monocytogenes*. Nous étudions donc actuellement le rôle de l'interaction internaline-E-cadhérine dans la traversée de ces deux barrières.

Ces résultats illustrent combien une approche moléculaire *in vitro* apparemment initialement réductionniste peut contribuer à l'élaboration d'un modèle animal approprié pour étudier une maladie humaine. Ils illustrent la puissance de la transgénèse pour établir des modèles animaux de maladies humaines bactériennes, d'une façon comparable à ce qui a été précédemment décrit pour des maladies virales spécifiquement humaines [15, 16].

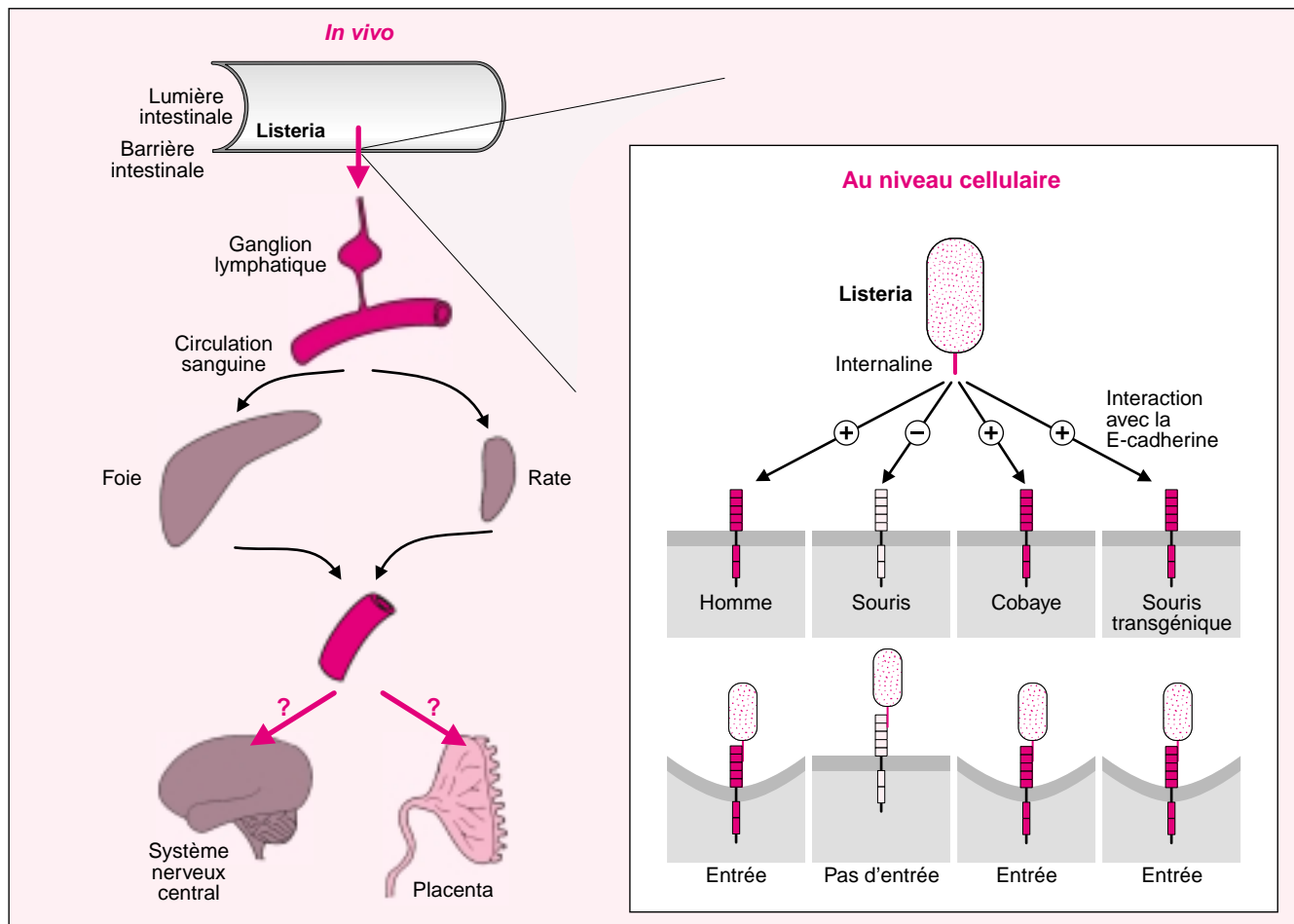


Figure 2. Conséquences *in vitro* et *in vivo* de la spécificité de l'interaction entre l'internaline et la E-cadhérine. À gauche: Différentes phases de l'infection *in vivo*. À droite: Conséquences sur l'entrée de *Listeria monocytogenes* dans les cellules de la spécificité de l'interaction entre l'internaline et la E-cadhérine.

1. Lorber B. Listeriosis. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 1-9.
2. Mackness GB. Cellular resistance to infection. *J Exp Med* 1962; 118: 381-406.
3. Cossart P, Lecuit M. Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. *EMBO J* 1998; 17: 3797-806.
4. Gaillard JL, Berche P, Frehel C, Gouin E, Cossart P. Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell* 1991; 65: 1127-41.
5. Dramsi S, Biswas I, Maguin E, Braun L, Mastroeni P, Cossart P. Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of InIB, a surface protein of the internalin multigene family. *Mol Microbiol* 1995; 16: 251-61.
6. Braun L, Ohayon H, Cossart P. The InIB protein of *Listeria monocytogenes* is sufficient to promote entry into mammalian cells. *Mol Microbiol* 1998; 27: 1077-87.
7. Lecuit M, Ohayon H, Braun L, Mengaud J, Cossart P. Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization. *Infect Immun* 1997; 65: 5309-19.
8. Mengaud J, Ohayon H, Gounon P, Mege RM, Cossart P. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* 1996; 84: 923-32.
9. Braun L, Ghebrehiwet B, Cossart P. gC1q-R/p32, a C1q-binding protein, is a receptor for the InIB invasion protein of *Listeria monocytogenes*. *EMBO J* 2000; 19: 1458-66.
10. Shen Y, Naujokas M, Park M, Ireton K. InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell* 2000; 103: 501-10.
11. Lecuit M, Dramsi S, Gottardi C, Fedor-Chaikin M, Gumbiner M, Cossart P. A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *EMBO J* 1999; 18: 3956-63.
12. Lecuit M, Vandormael-Pournin S, Lefort J, et al. A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science* 2001; 292: 1722-5.
13. Dalton CB, Austin CC, Sobel J, et al. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *N Engl J Med* 1997; 336: 100-5.
14. Aureli P, Fiorucci GC, Caroli D, et al. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *N Engl J Med* 2000; 342: 1236-41.
15. Ren RB, Costantini F, Gorgacz EJ, Lee JJ, Racaniello VR. Transgenic mice expressing a human poliovirus receptor: a new model for poliomyelitis. *Cell* 1990; 63: 353-62.
16. Oldstone MB, Lewicki H, Thomas D, et al. Measles virus infection in a transgenic model: virus-induced immunosuppression and central nervous system disease. *Cell* 1999; 98: 629-40.

Marc Lecuit
Pascale Cossart
Unité des Interactions, Bactéries-Cellules, Institut Pasteur, 28, rue du Docteur-Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.