



HAL
open science

Les entérotoxines bactériennes: structure, mode d'action

Franck Lucas, M Popoff, G Corthier

► To cite this version:

Franck Lucas, M Popoff, G Corthier. Les entérotoxines bactériennes: structure, mode d'action. Annales de Recherches Vétérinaires, 1991, 22 (2), pp.147-162. hal-00902016

HAL Id: hal-00902016

<https://hal.science/hal-00902016v1>

Submitted on 11 May 2020

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.

Article de synthèse

Les entérotoxines bactériennes: structure, mode d'action

F Lucas^{1*}, M Popoff², G Corthier¹

¹INRA, Laboratoire d'écologie et de physiologie du système digestif,
centre de recherches de Jouy-en-Josas, domaine de Vilvert, 78350 Jouy-en-Josas;
²Institut Pasteur, rue du Dr Roux Paris, France

(Reçu le 11 décembre 1990; accepté le 25 janvier 1991)

Résumé – Les entérotoxines sont des macroprotéines, produites par des bactéries pathogènes, et agissant dans l'intestin de l'homme ou des animaux. Elles sont le plus souvent responsables de diarrhées (associées ou non à des dommages tissulaires). Ces molécules diffèrent sensiblement au niveau de leur structure et de leur mode d'action. Certaines d'entre elles (toxine cholérique, LT de *Escherichia coli*), agissent en activant un système cyclasique (adénylate ou guanylate cyclase) dans l'entérocyte, et provoquent un flux d'eau et d'électrolytes dans la lumière intestinale. D'autres, par contre (entérotoxine de *Clostridium perfringens*, toxines A et B de *Clostridium difficile*, vérotoxine) provoquent par des mécanismes qui perturbent certaines fonctions cellulaires (synthèse protéique, perméabilité aux petites molécules), des dommages tissulaires dans l'intestin, associés à une réponse inflammatoire. La plupart de ces entérotoxines agissent par l'intermédiaire d'un récepteur membranaire, qu'elles reconnaissent spécifiquement à la surface de l'entérocyte.

entérotoxine / diarrhée / cytotoxique / cytotonique

Summary – **Bacterial enterotoxins: structure and mechanism of action.** *The enterotoxins are macro-proteins, produced by enterotoxic bacterial strains acting in the human or animal intestine during digestive infections. In most cases, they induce diarrhoea (associated or not with tissue damage). These molecules differ in their structure and mechanism of action. Some of them (cholera toxin, Escherichia coli LT) activate a cyclase system (adenylate or guanylate cyclase), inducing water and electrolyte flux in the gut. Conversely, others (toxins A and B, Clostridium difficile; Clostridium perfringens enterotoxin; verotoxin), provoke diarrhoea, intestinal damage associated with inflammatory response acting on cellular functions (protein synthesis, permeability to small molecules). Most enterotoxins act via membrane receptors which they specifically recognize on the surface of the enterocyte.*

enterotoxin / diarrhoea / cytotoxicity / cytotoxicity

* Correspondance et tirés à part

INTRODUCTION

Les infections intestinales et les entérotoxines bactériennes représentent un sujet très vaste et surtout très varié. Il serait ambitieux de vouloir en couvrir ici tous les aspects (cliniques, épidémiologiques, expérimentaux, biochimiques...). Les infections intestinales, et les diarrhées qui leur sont associées, représentent, notamment, dans les pays en voie de développement, une cause importante de la mortalité infantile. On estime actuellement, à près de 5 millions le nombre d'enfants de moins de 5 ans qui meurent chaque année de ces affections. Dans les pays industrialisés bien que la situation soit très différente de ce bilan dramatique, le poids économique de ces maladies est élevé, ne serait-ce que par le traitement social qu'elles nécessitent. D'autre part, il faut souligner l'incidence que ces affections ont au niveau de l'économie, principalement dans le domaine de l'élevage. Des infections digestives graves ont, en effet, été relevées chez le porc et le veau en particulier (Smith, 1967). Ces épidémies sont, pour la plupart, attribuées à des souches entérotogènes de *Escherichia coli*, qui produisent des entérotoxines thermolabiles (LT) ou thermostables (ST). Ces dernières sont notamment responsables de la pathologie observée chez le porcelet (Burgess *et al*, 1978; Greenburg et Guerrant, 1980). On comprend donc, même si les grandes épidémies humaines ont aujourd'hui disparu, que de nombreux progrès restent à faire, aussi bien en matière de prévention, de diagnostic, de traitement, et surtout d'hygiène, compte tenu du mode de transmission de ces

infections, souvent alimentaires, dont les agents bactériens sont d'origine fécale.

On estimait, il n'y a encore que 30 ans que les manifestations et les symptômes de ces infections, étaient dus à la présence dans l'intestin, de bactéries qualifiées de pathogènes, mais sans que l'on connaisse réellement leur mode d'action. Le caractère, parfois dysentérique de ces maladies, était alors attribué aux propriétés entéro-invasives des germes qui leur étaient associés (principalement les Salmonelles et les Shigelles). Il y a une vingtaine d'années, ces concepts ont été sensiblement bouleversés, lorsque l'on s'est rendu compte d'une part, que la majorité des bactéries incriminées dans les infections digestives, étaient capables de produire des toxines et d'autre part, que ces molécules étaient directement impliquées dans ces affections. Enfin, au cours des 10 dernières années, des progrès déterminants ont été faits dans la compréhension de ces maladies, après que l'on ait compris le mécanisme d'action de certaines de ces entérotoxines dans l'intestin, la toxine cholérique en particulier.

Les entérotoxines bactériennes, sont des protéines, produites au cours d'infections digestives, dues à des germes tels *Vibrio cholerae*, *Salmonella* sp, *Shigella dysenteriae*, *Yersinia enterocolitica*, et plus rarement à *Clostridium difficile* ou à *Clostridium perfringens*, ou libérées dans les aliments avant leur ingestion par *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* notamment. Ces molécules agissent principalement dans l'intestin, d'où le terme «entérotoxine» utilisé pour les définir. Leur structure et

de leurs modes d'action sont hétérogènes, et elles sont très souvent responsables de diarrhées, parfois associées à des dommages tissulaires. On a l'habitude de classer ces entérotoxines selon leurs caractéristiques biochimiques d'une part: poids moléculaire, nombre de sous-unités, sensibilité à la chaleur ou aux enzymes, et d'autre part, selon leurs modes d'action ou activités biologiques. Sur la base de cette dernière classification, ces molécules se déterminent en 2 groupes distincts: les entérotoxines dites cytotoniques, et les autres, qualifiées de cytotoxiques (Gemmel, 1984). Le caractère principal, qui permet d'établir cette distinction réside dans le pouvoir que ces molécules ont ou n'ont pas, d'induire une réponse sécrétoire (eau, électrolytes), en anse intestinale ligaturée chez l'animal. Cette réponse implique souvent l'activation d'un système cyclasique: adénylate ou guanylate cyclase. Le modèle du genre est représenté par la toxine cholérique. Les entérotoxines cytotoxiques, quant à elles, peu ou pas actives en anse ligaturée, agissent sur l'épithélium intestinal, en y provoquant des dommages histologiques importants, et sont fortement toxiques pour certaines lignées de cellules non intestinales. Leur mécanisme d'action est généralement mal connu, mais on invoque dans la plupart des cas une perturbation des grandes fonctions cellulaires: synthèse protéique, perméabilité aux ions, aux acides aminés ou au glucose. À la manière des toxines cytotoniques, elles reconnaissent souvent un récepteur fonctionnel sur l'entérocyte, et on teste leurs activités biologiques en évaluant leur cytotoxicité sur des lignées de cellules en culture (CHO,

Y₁, fibroblastes, lymphocytes). Ces tests sont, par ailleurs, utilisés avec les toxines cytotoniques pour déterminer certains paramètres de leurs activités biologiques (l'élévation du taux intracellulaire d'AMP cyclique par exemple).

Pour mettre en évidence les entérotoxines, on a développé, il y a une quarantaine d'années environ, le test de l'anse intestinale ligaturée, utilisé classiquement chez le lapin (Bergdoll, 1988). Cette technique consiste à isoler une portion de l'intestin grêle à l'aide de 2 ligatures, et à y injecter le surnageant d'une culture bactérienne, qu'on suspecte de contenir le facteur diarrhéogénique recherché. Après 24 h on mesure dans l'anse intestinale le volume du fluide accumulé, et on exprime le résultat obtenu par un rapport: volume/unité de longueur, qui peut atteindre ou dépasser 2 dans le cas de la toxine cholérique par exemple.

On évalue également l'activité biologique des entérotoxines par des tests de cytotoxicité sur de nombreuses lignées cellulaires en culture: CHO-K₁, cellules rénales Y₁ ou Vero, fibroblastes, lymphocytes, adipocytes (Keusch et Donta, 1975). Les effets des entérotoxines cytotoxiques sur ces cellules sont multiples: changement de leur conformation (élongation des CHO par exemple), modification de leur perméabilité, inhibition de la synthèse protéique. Ces phénomènes ne sont pas les caractéristiques propres des seules cytotoxines, et, dans une moindre mesure les entérotoxines cytotoniques peuvent exercer des effets cytotoxiques, notamment la toxine A de *C difficile* (Tucker *et al*, 1990). Par ailleurs, certaines molécules dites cy-

toxiques comme l'entérotoxine de *C perfringens*, induisent une réponse sécrétoire en anse ligaturée. La limite entre les 2 concepts que nous venons de définir n'est pas conséquente pas toujours bien définie, et il serait préférable de réserver le qualificatif cytotonique aux toxines dont les effets s'exercent dans l'intestin, par l'intermédiaire d'un système cyclasique (toxine cholérique ou LT de *E coli* par exemple).

Dans cette revue, nous décrivons les paramètres caractéristiques et les fonctions des entérotoxines les mieux connues, ou de celles qui revêtent un intérêt particulier en raison de leur mécanisme d'action, encore mal expliqué (la toxine A de *Clostridium difficile* par exemple).

LA TOXINE CHOLÉRIQUE

La toxine cholérique est produite, au cours d'infections intestinales dues à *Vibrio cholerae*, germe qui se développe chez l'homme dans l'intestin grêle. Elle est responsable de diarrhées très importantes. Cette maladie jadis tant redoutée n'est aujourd'hui mortelle que dans les zones du globe sous-médicalisées. Son traitement consiste principalement en une réhydratation pour compenser la perte hydroélectrique due à l'épisode diarrhéique. La toxine cholérique est aujourd'hui bien connue et caractérisée aussi bien au niveau de son mode d'action que de sa structure (Fishman et Antikkan, 1980; Fishman, 1982; Gemmel, 1984). Cette molécule de 84 kDa est constituée de 2 entités séparément non toxiques: l'une d'elles (le composant B) est constituée de 5 sous-unités

de 11,6 kDa chacune, et porte le site de fixation de la toxine sur son récepteur membranaire. L'autre (le composant A) comporte 2 sous-unités de 24 et 5,4 kDa (A₁ et A₂) reliés par un pont disulfure le composant A est responsable de l'activité toxique de la molécule.

La toxine cholérique exerce son activité toxique en se fixant, par l'intermédiaire de ses sous-unités B, sur un récepteur membranaire spécifique (le ganglioside GM₁), à la surface de l'entérocyte (Homgren *et al*, 1975; Griffiths *et al*, 1986), mais également sur de nombreuses autres lignées cellulaires (Cuatrecasas, 1973; Fishman, 1980). Cette fixation induit la translocation rapide de la sous-unité enzymatique A de la toxine à travers la membrane. La sous-unité A₁ catalyse l'hydrolyse du NAD et le transfert d'une partie de cette molécule (ADP-ribose) sur la sous-unité régulatrice Gs de l'adénylate cyclase qui est située à la face interne de la membrane plasmique. En résumant, l'ADP-ribosylation de cette protéine régulatrice conduit à l'activation permanente de l'adénylate cyclase, et à la conversion non contrôlée de l'ATP en AMP_c. L'augmentation du taux intracellulaire d'AMP_c provoque une sécrétion active de chlore, et inhibe la réabsorption conjointe de cet ion et du sodium par l'entérocyte. Ce mécanisme, non létal pour la cellule, conduit à une sortie passive d'eau, origine de la diarrhée.

Le mode d'action de cette toxine résume en fait son activité biologique. Cette molécule induit une importante réponse sécrétoire (eau et électrolytes) en anse intestinale ligaturée chez le lapin, sans provoquer de lésions hémorragiques (Berdgoll, 1988; Triadafilopoulos *et al*, 1989) à

ce titre, elle est proprement cytotoxique. De nombreuses études ont montré que cette molécule reconnaissait un récepteur spécifique unique (le GM₁), à la surface de nombreuses cellules, et y induisait une élévation du taux d'AMP_c en proportion du nombre de sites reconnus (Holmgren *et al*, 1975; Fishman et Atikkan, 1980). La cytotoxicité de la toxine cholérique sur des cellules HeLa en culture est par ailleurs extrêmement faible, lorsque par exemple, on la compare à celle d'entérotoxines proprement cytotoxiques comme la Verotoxine ou l'entérotoxine de *Clostridium perfringens* type A (Keusch et Donta, 1975).

TOXINES DE *ESCHERICHIA COLI*

E coli est responsable chez l'homme et l'animal, principalement chez le porc, d'infections intestinales parfois hémorragiques. On a, par ailleurs, caractérisé de nombreuses souches pathogènes de cette bactérie, entérotoxinogènes (ECET) ou entéro-invasives (ECEI, 0157:H7) (Riley, 1987). Les souches toxigènes produisent plusieurs types de toxines: une entérotoxine LT (thermo-labile), et des toxines thermostables (STa, STb), dont les mécanismes d'action sont proches mais les structures totalement différentes.

Toxine LT

La toxine LT est produite par certaines souches toxigènes de *E coli* au cours d'infections intestinales, analogues à celles engendrées par *Vibrio cholerae*. Cette molécule est, à tous les niveaux, très proche de la

toxine cholérique, avec qui elle possède notamment une forte parenté antigénique. Sa structure, encore mal connue il y a 10 ans est aujourd'hui bien établie (Dallas et Falkow, 1979; Gill *et al*, 1981). Cette toxine de 85 kDa est constituée de 2 composants. L'une d'elles comporte 5 sous-unités B de 11,5 kDa chacune, l'autre est un peptide de 25,5 kDa constitué de 2 entités: A₁ (21-23,5 kDa) et A₂ (11-13 kDa).

Le mode d'action de la LT de *E coli*, est analogue à celui de la toxine cholérique. Comme cette dernière, c'est une entérotoxine cytotonique, elle reconnaît le ganglioside GM₁ sur l'entérocyte par l'intermédiaire de ses sous-unités B, active l'adénylate cyclase dans ces cellules par son peptide toxique A, et conduit ainsi aux mêmes effets sécrétoires dans l'intestin (Holmgren *et al*, 1982; Berdgoll, 1988; Zemelman *et al*, 1989). Cette toxine fixerait par ailleurs d'autres récepteurs membranaires (glycoprotéiques) sur la bordure en brosse intestinale; ces sites non reconnus par la toxine cholérique seraient également fonctionnels pour la LT de *E coli* (Zemelman *et al*, 1989).

Comme la toxine cholérique, la toxine LT induit une importante réponse sécrétoire en anse intestinale ligaturée sans provoquer de lésions hémorragiques (Berdgoll, 1988). Par contre, cette réponse n'est pas inhibée par la sous-unité B (non toxique) de la toxine cholérique, en raison de la présence souvent en grand nombre, de récepteurs fonctionnels, uniquement reconnus par la LT de *E coli*. La toxine LT se fixe par ailleurs sur les cellules qui expriment le ganglioside GM₁ à leur surface (notamment les HeLa), et dont elle augmente le taux d'AMP. Par contre, et à l'instar

de la toxine cholérique, elle est très peu cytotoxique (Keusch et Donta, 1975).

Toxines ST

Les toxines ST (thermostables) sont produites par certaines souches de *E coli* mais également par d'autres bactéries telles: *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* et certaines souches de *Salmonella*. Elles sont constituées d'une seule chaîne polypeptidique de 2,5-10 kDa.

Les toxines ST produites par *E coli* appartiennent à 2 catégories (STa et STb). Elles comportent à l'état mature 18 et 48 acides aminés respectivement et leur poids moléculaire oscille entre 2,5 et 5 kDa (Greenburg et Guerrant, 1980; Ronnberg *et al*, 1983). Les toxines ST produites par des souches différentes de *E coli*, d'origine animale ou humaine sont par ailleurs très proches structuralement. Elles comportent notamment 6 cystéines reliées par 3 ponts disulfures qui leur confèrent une grande résistance à la chaleur.

Les toxines ST de *E coli* induisent une réponse sécrétoire en anse intestinale ligaturée, de même nature que celle provoquée par la toxine cholérique ou la LT de *E coli*, elles sont donc cytotoniques (Gemmell, 1984); Cependant la STb ne paraît active que chez le porc, où son mécanisme d'action est inconnu. La toxine STa agit rapidement sur l'entérocyte, et il est probable qu'elle ne soit pas internalisée par cette cellule. La fixation de la STa sur son récepteur cellulaire induit l'activation de la guanylate cyclase intestinale et il s'ensuit une augmentation du taux intracellulaire de GMP_c à l'origine

probable de la fuite électrolytique (Guerrant *et al*, 1980; Berdgoll 1988). Il a été montré qu'elle reconnaît un récepteur spécifique à la surface de l'entérocyte (Gianella *et al*, 1983). Ce récepteur est de nature protéique mais n'a pas encore été caractérisé. À l'inverse de la toxine cholérique ou de la LT, la STa de *E coli* est spécifique de l'épithélium intestinal, et n'exerce son activité toxique que sur l'entérocyte.

ENTÉROTOXINE DE SALMONELLA

Les salmonelles sont responsables chez l'homme d'infections intestinales d'origine alimentaire, caractérisées par des diarrhées, des fièvres modérées, des vomissements. Ces symptômes apparaissent généralement après un temps d'incubation de 24-48 h. Certaines souches sont entéro-invasives.

Curieusement, on constate que malgré la fréquence de ces affections, notamment dans les pays industrialisés, bien peu d'efforts ont été entrepris pour comprendre le mécanisme de ces infections et la nature des toxines produites par les bactéries du genre *Salmonella*.

Il est clair cependant, que le caractère entéro-invasif des salmonelles est en partie responsable des pathologies qu'elles induisent, et notamment des diarrhées, qui résultent sans doute des lésions épithéliales provoquées par ces germes et par les facteurs toxiques qu'ils produisent (Sedlock *et al*, 1978; Peterson et Sandefur, 1979). Par ailleurs on a caractérisé au moins 2 facteurs toxiques produits par les salmonelles, proches de la toxine cholérique au

niveau de leur activité biologique (Sandefur et Peterson, 1976). Certaines de ces molécules sont thermostables, leur poids moléculaire serait assez élevé (proche de 90 kDa), et la plupart d'entre elles paraissent étroitement associées à la paroi bactérienne. Cette dernière propriété explique notamment que ces toxines soient difficiles à isoler et que leur structure soit mal connue.

On a récemment pu cloner le gène d'une entérotoxine produite par une souche de *Salmonella typhimurium*. Cette protéine serait codée par une séquence de 6,3 kb similaire à celle du gène de la toxine cholérique ou de la LT de *E coli*. Elle serait constituée de plusieurs sous-unités de 45, 26, et 12 kDa (Chopra *et al*, 1987).

Certaines souches de *Salmonella* produisent une entérotoxine thermolabile, dont l'activité biologique est très proche de celle de la toxine cholérique (Molina et Peterson, 1980). Comme cette dernière, elle induit une sécrétion électrolytique en anse intestinale ligaturée, provoque l'élongation de cellules CHO ou Y₁ *in vitro*, qui par ailleurs serait inhibée par le ganglioside GM₁ ou par un sérum anti-toxine cholérique (Sandefur et Peterson, 1977; Chopra *et al*, 1987; Murray *et al*, 1989). Son effet activateur sur l'adénylate cyclase a été également suggéré (Peterson *et al*, 1984).

À la lumière de ces résultats, il paraît probable que les symptômes diarrhéiques observés au cours des salmonelloses soient en partie attribuables à l'activité cytotonique de cette entérotoxine. D'autre part, son mécanisme d'action dans l'intestin pourrait être très proche, sinon identique à celui de la toxine cholérique

et en particulier médié par le même récepteur membranaire.

ENTEROTOXINE DE *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

On distingue 5 classes de *C perfringens* (types A et E). Cette classification est basée sur la capacité de ces bactéries à produire différentes toxines ou facteurs toxiques.

C perfringens est responsable de toxi-infections chez l'homme, caractérisées par des diarrhées et des crampes abdominales, qui débutent 10-12 h après l'ingestion des aliments contaminés. L'entérotoxine produite par les souches A, D ou C, est associée à la sporulation du *Clostridium*. Cette molécule est constituée d'une seule chaîne polypeptidique de 34 kDa (Hanna *et al*, 1989). Elle est thermolabile, son pouvoir toxique est notamment détruit par un chauffage de 10 min à 60°C.

Expérimentalement l'entérotoxine de *C perfringens*, est capable d'induire une réponse sécrétoire modérée dans l'intestin, cette action étant par ailleurs accompagnée de sérieuses lésions épithéliales constatées chez le rat ou le lapin (McDonel *et al*, 1978, McDonel, 1979). Cette toxine est active sur de nombreux types de cellules (entérocytes, hépatocytes, cellules Vero), à la surface desquelles elle reconnaît un récepteur protéique, et dont elle altère certaines fonctions métaboliques. À ce titre, son action est principalement cytotoxique. Le mécanisme d'action de cette molécule n'est pas déterminé avec précision. Cependant, il paraît probable qu'elle agisse principalement en modifiant la per-

méabilité membranaire des cellules au petites molécules: acides aminés, ions, eau et glucose, provoquant ainsi des changements morphologiques, une inhibition de la synthèse protéique et par conséquent une diminution de leur viabilité (McDonel, 1979; Granum, 1982; Hulkover *et al*, 1989).

ENTEROTOXINE DE SHIGELLA DYSENTERIAE

Shigella dysenteriae type 1 est impliquée chez l'homme dans certaines diarrhées à caractère parfois dysentérique, en raison du caractère entéro-invasif de cette bactérie. Elle produit une entérotoxine majeure dans l'intestin qualifiée de shiga-toxine ou encore vérotoxine, de part l'effet toxique qu'exerce cette molécule sur les cellules Vero. Cette toxine de 70 kDa est constituée de 2 composants. La sous-unité A est un polypeptide de 30,5 kDa portant l'activité toxique de la protéine clivable en 2 sous-unités A₁ et A₂, de 27,5 et 3 kDa, respectivement. Le deuxième composant de cette toxine est constitué de 4-5 sous-unités B, de 7-11 kDa chacune (Olsnes *et al*, 1981; Keusch *et al*, 1988; Ryd *et al*, 1989). Cette structure est analogue à celles de la toxine cholérique ou de la LT de *E coli*, bien que, la vérotoxine ne présente pas de parenté antigénique avec ces dernières. Par contre, on a montré que certaines souches de *E coli* produisaient une toxine très proche de cette molécule (Giraldi *et al*, 1990).

La vérotoxine induit une réponse sécrétoire en anse intestinale ligaturée chez le lapin (Donowitz *et al*, 1975; Bergdoll, 1988), probablement

liée à son effet diarrhéogénique chez l'homme et l'animal. Cette molécule posséderait par ailleurs plusieurs effets distincts. On lui attribue en effet un pouvoir cytotonique, cytotoxique, et enfin neurotoxique (Eiklid et Olsnes, 1983). La toxine de *Shigella dysenteriae* type 1 est cytotoxique pour un nombre limité de lignées cellulaires (HeLa et Vero) sur lesquelles, elle reconnaît un récepteur spécifique (Eiklid et Olsnes, 1980), mais n'aurait par contre pas d'action sur d'autres cellules (Y₁, CHO).

Le mécanisme d'action de cette toxine a été partiellement élucidé au cours de ces 10 dernières années. Cependant, son activité sécrétoire dans l'intestin est encore aujourd'hui mal comprise. Bien que cet effet soit lié dans certains cas au caractère invasif de la bactérie, il apparaîtrait aussi que certaines souches non invasives mais toxigènes induisent une réponse sécrétoire et entéronécrosante dans l'intestin. La vérotoxine pourrait par ailleurs, augmenter le taux d'AMP_c dans l'épithélium intestinal, mais à des doses nettement supérieures à celles employées avec la toxine cholérique ou la LT de *E coli*. À ce titre, l'effet diarrhéogénique de cette molécule ne semble pas directement induit par l'activation de l'adénylate cyclase.

En revanche, l'effet cytotoxique de cette protéine est aujourd'hui bien expliqué (O'Brien et Holmes, 1987). La vérotoxine se fixe aux membranes cellulaires sur un récepteur spécifique. Cette molécule est ensuite internalisée par voie endocytosique et les vésicules formées, contenant la toxine, fusionnent avec les lysosomes. La sous-unité A₁ issue du clivage du composant A (par réduction d'un pont disulfure) passe dans le cy-

tosol où elle se lie à la sous-unité 60S du ribosome, provoquant l'inactivation de cette dernière ce qui aboutit à l'inhibition de la synthèse protéique et à la mort de la cellule. Ce mécanisme rend compte de l'activité entéronécrosante de la vérotoxine. L'effet diarrhéogénique serait lié à la destruction des entérocytes impliqués dans l'absorption intestinale.

TOXINES DE *C DIFFICILE*

Au cours de l'infection, chez l'homme ou l'animal, *C difficile* produit généralement 2 toxines. L'entérotoxine ou toxine A, que l'on dose au moyen d'un test ELISA (Lyerly *et al*, 1983) exerce une action cytotonique en anse intestinale ligaturée (Triadafilopoulos *et al*, 1987; Triadafilopoulos *et al*, 1989) mais également cytotoxique dans une moindre mesure, lorsqu'on évalue son activité sur des cultures de cellules (Libby *et al*, 1982; Corthier *et al*, 1989). La cytotoxine ou toxine B est environ 1000 fois plus toxique que la toxine A pour certaines lignées cellulaires. Cette propriété permet de la doser en évaluant sa cytotoxicité sur des cellules en culture (Lyerly *et al*, 1982; Corthier *et al*, 1986).

Ces 2 toxines sont thermolabiles. La toxine A est inactivée en milieu acide (pH < 5,5), où elle précipite. Elles sont toutes les 2 sensibles aux protéases, notamment à l'action de la trypsine et de la chymotrypsine (Sullivan *et al*, 1982).

On a montré d'autre part que la toxine B possédait une forte parenté antigénique avec la toxine L de *Clostridium sordellii*, alors que la toxine

A était apparentée à la toxine H de ce *Clostridium*. Les 2 toxines de *C difficile* sont par ailleurs neutralisées par un antisérum dirigé contre un surnageant partiellement purifié, d'une culture de ce germe. La toxine A possède une forte affinité pour la thyroglobuline. Cette propriété permet de la purifier par chromatographie d'affinité sur une colonne de cette protéine immobilisée (Krivan *et al*, 1987).

La structure de ces 2 molécules étaient mal connue il y a encore quelques années. Notamment leur poids moléculaire variait sensiblement selon les études. En 1982, Sullivan estimait celui de la toxine A entre 440 et 550 kDa et celui de la toxine B entre 360 et 470 kDa (Sullivan *et al*, 1982). Aujourd'hui, grâce à la biologie moléculaire on a pu cloner et séquencer les gènes de ces 2 toxines, et mieux connaître leur structure. La toxine A serait une protéine de 308 kDa constituée de 2 710 acides aminés (Dove *et al*, 1990). Elle contiendrait par ailleurs 7 séquences répétitives de bases, codant pour les sites de fixation de la toxine sur son récepteur intestinal. La toxine B serait un polypeptide de 270 kDa, constitué de 2 366 acides aminés (Barroso *et al*, 1990).

Le mécanisme d'action des toxines A et B de *C difficile* n'est pas connu. Leurs activités biologiques testées *in vitro* et *in vivo* ont cependant permis d'émettre quelques hypothèses à ce niveau.

Les toxines A et B de *C difficile* sont toutes 2 cytotoxiques pour certaines lignées cellulaires et notamment pour les fibroblastes ou les cellules CHO-K₁ (Lyerly *et al*, 1982; Corthier *et al*, 1986). Elles induisent

en particulier sur ces cellules, les mêmes altérations morphologiques (arrondissement des CHO et des fibroblastes), mais à des degrés différents (Tucker *et al*, 1990). On a montré en particulier que la toxine B pouvait atteindre les titres supérieurs à 6 (correspondant au \log_{10} de la dernière dilution toxique pour des cellules CHO), dans un surnageant de culture de *C difficile* (Corthier *et al*, 1989), et voisins de 10^5 dans le contenu caecal de souris infectées par le *Clostridium* (Corthier *et al*, 1986). D'autre part, l'effet cytotoxique de la toxine A semble médié par un récepteur cellulaire. En effet, pour certaines cellules tumorales, possédant à leur surface un récepteur glucidique pour la toxine A, cette activité serait 100 fois plus importante, que pour les CHO-K₁, ne possédant pas ce site de fixation (Tucker *et al*, 1990). On a montré par ailleurs que les toxines A et B altéreraient les paramètres électrochimiques de la barrière caecale chez la souris en diminuant notamment le potentiel de membrane et en augmentant la perméabilité cellulaire aux macromolécules (Mitchell *et al*, 1987; Heyman *et al*, 1989). La toxine A quant à elle, augmenterait la perméabilité des entérocytes humains, probablement par un mécanisme qui affecterait leur cytosquelette et leurs jonctions serrées (Hugues *et al*, 1983; Hecht *et al*, 1988). La toxine B d'autre part, inhiberait la synthèse protéique des fibroblastes et des entérocytes, mécanisme probablement à l'origine de son activité biologique (Pothoulakis *et al*, 1986). Enfin, l'activité cytotoxique des 2 toxines invoquerait des modifications dans la structure du cytosquelette, principalement en provoquant la dissolution des filaments

d'actine (Shoshan *et al*, 1990; Hecht *et al*, 1988, Pothoulakis *et al*, 1986).

La toxine A, contrairement à la toxine B, provoque en anse ligaturée chez le lapin, une importante sécrétion hémorragique, dont le volume est à peu près identique à celui observé avec la toxine cholérique (Triadafilopoulos *et al*, 1989), et une augmentation de la perméabilité intestinale au mannitol (Triadafilopoulos *et al*, 1987). La nature de cette sécrétion est par ailleurs tout à fait différente de celle induite par la toxine cholérique, qui est essentiellement hydrosodée et n'est accompagnée d'aucune lésion (Triadafilopoulos *et al*, 1989). Elle contient notamment de nombreux débris cellulaires, de la fibrine, des cellules sanguines dont une majorité de leucocytes, témoins de l'importance de l'inflammation et des dommages causés à l'épithélium intestinal. Il a été suggéré d'autre part, que les lésions occasionnées au cours de l'infection seraient dues à la réponse inflammatoire de l'épithélium à la toxine A et à l'infiltration des polynucléaires neutrophiles (Triadafilopoulos *et al*, 1987). *In vitro* par contre la toxine A aurait peu d'effet sur l'épithélium intestinal.

On a montré par ailleurs, que la toxine A, ou un extrait brut de culture de *C difficile* contenant les 2 toxines, induisait sur l'intestin, en chambre de Ussing, une sécrétion luminale de sodium et de chlore en absence de toute lésion. Ces flux ioniques seraient, d'autre part, dépendants de la concentration sérique de calcium, et nuls en l'absence de cet ion (Hugues *et al*, 1983).

Les toxines A et B injectées par voie indradermique chez le lapin, provoquent des réactions érythéma-

teuses et une augmentation de la perméabilité vasculaire, plus forte cependant avec la toxine A (Lyerly *et al*, 1982).

La toxine A de *C difficile* agirait sur l'activité myoélectrique du muscle intestinal lisse, et provoquerait une dépolarisation membranaire et une augmentation de l'amplitude et de la fréquence des contractions intestinales (Gilbert *et al*, 1989a). L'action de la toxine B sur ce muscle serait différente: elle provoque aussi une dépolarisation membranaire, mais elle induirait une diminution de l'activité électromécanique, par inhibition du couplage excitation-contraction (Gilbert *et al*, 1989b). Par conséquent ces 2 molécules perturberaient la motricité intestinale.

Il y a plus de 50 ans, alors que les toxines de *C difficile* n'avaient pas été caractérisées, on a montré, qu'un surnageant de culture de ce germe, injecté par voie sous-cutanée était létal pour certaines espèces animales (Hall et O'Toole, 1935). Récemment, on a observé que la toxine A de *C difficile* était fortement toxique pour le hamster lorsqu'elle était donnée par voie intragastrique à cet animal (Lyerly *et al*, 1985). Par ailleurs, la sensibilité extrême du hamster à cette molécule est probablement en relation avec le nombre élevé de récepteurs à la toxine A présents sur les entérocytes de cet animal (Krivan *et al*, 1986)). Le rat et la souris semblent par contre nettement moins sensibles à l'action de cette toxine (Lyerly *et al*, 1985). La toxine A produit par voie orale chez ces animaux des lésions intestinales hémorragiques dont l'importance est en relation avec leur sensibilité à

cette molécule. Ces lésions sont comparables à celles observées au cours de l'infection à *C difficile*, mettant par conséquent en évidence le rôle direct de la toxine A dans la pathologie. À l'inverse, la toxine B de *C difficile* administrée par voie orale n'a pas d'effet pathogène chez l'animal, et en particulier ne crée pas de lésions intestinales (Lyerly *et al*, 1985; Triadafilopoulos *et al*, 1987). On a cependant observé qu'elle devenait létale chez le hamster lorsque le caecum ou le jéjunum de cet animal étaient préalablement endommagés (par pincement) avant l'administration de la toxine A. Ce résultat par conséquent, semble indiquer que la toxine B agit secondairement, après que la toxine A ait créé les premières lésions intestinales, et potentialise ainsi les effets de cette dernière.

En conclusion, les toxines produites au cours de l'infection intestinale à *C difficile*, paraissent avoir de multiples activités au niveau cellulaire ou tissulaire. Ces 2 molécules sont sensiblement différentes, notamment par leur mode d'action. La toxine A ou entérotoxine qualifiée de cytotonique parce qu'elle provoque une sécrétion intestinale (hémorragique), semble jouer, par son action directe sur l'épithélium, un rôle majeur dans la pathologie. Son activité cytotoxique sur les entérocytes, la réponse inflammatoire qu'elle induit dans l'intestin, seraient responsables de son effet diarrhéogénique. Le mécanisme d'action de cette toxine n'est cependant pas connu, il nécessiterait la reconnaissance d'un récepteur cellulaire, mais n'impliquerait pas l'activation d'un système cyclique à l'inverse de la toxine cholé-

rique ou de la LT de *E coli* (Hugues *et al*, 1983). À ce titre, et en relation avec son pouvoir cytotoxique, la toxine A semble avoir partiellement usurpé son qualificatif d'entérotoxine cytotonique.

La toxine B au contraire, est principalement cytotoxique, et n'induit pas de réponse intestinale sécrétoire. Par contre, elle est fortement toxique pour certaines lignées de cellules, et comme la toxine A, elle augmente la perméabilité cellulaire par des modifications du cytosquelette. Son rôle dans la pathologie n'est cependant pas très clair, et, bien que, seule, elle soit incapable de provoquer des lésions intestinales, elle agirait en synergie avec la toxine A et potentialiserait son action, après que cette dernière ait provoqué les premiers dommages tissulaires dans l'intestin.

CONCLUSION

La classification des entérotoxines est basée sur un ensemble de caractéristiques que nous avons résumées (tableau I). Bien entendu, la liste de ces molécules n'est pas exhaustive. Par ailleurs, et pour être plus complet, nous aurions pu parler des entérotoxines LT ou ST produites par certaines souches d'*Aeromonas*, de *Yersinia* ou de *Klebsiella*, germes responsables d'infections intestinales notamment chez le jeune enfant. La caractéristique commune de toutes les toxines que nous avons examinées dans ce chapitre réside dans leurs activités diarrhéogéniques. Cependant, l'effet sécrétoire de ces molécules ne résulte pas toujours du même mécanisme, ce qui permet ain-

si de les classer en 2 catégories distinctes. Pour nombre d'entre elles, il invoque l'activation d'un système cyclasique, et leur confère alors un véritable pouvoir cytotonique: de façon certaine pour la toxine cholérique et les toxines de *E coli*, et dans une certaine mesure pour les toxines de *Shigella* ou de *Salmonella* par exemple (tableau I), pour d'autres par contre, cette réponse sécrétoire résulte principalement de leur pouvoir cytotoxique, de la réponse inflammatoire et des lésions qu'elles induisent dans l'intestin (toxines A et B de *C difficile*, entérotoxines de *C perfringens* et vérotoxine de *Shigella*). L'adénylate cyclase est généralement stimulée par les toxines de haut poids moléculaire (70–90 kDa), alors que la guanylate cyclase semble activée par des protéines plus petites (2,5–10 kDa), et souvent par les toxines ST. En règle générale, on connaît assez mal le mécanisme d'action et la structure des toxines produites par les bactéries gram positif (toxine A de *C difficile*).

On notera enfin la structure binaire, caractéristique commune de certaines de ces entérotoxines (tableau I). Ces dernières sont en effet constituées de 2 composants: la sous-unité A porte leur activité biologique (toxique), et pénètre généralement dans la cellule, le composant B contient 4–5 sous-unités, qui constituent leurs sites de fixation sur leur(s) récepteur(s) membranaire(s). La liaison des entérotoxines sur ces derniers constitue en l'occurrence, l'étape initiale de la pathologie, et en conséquence, ces récepteurs jouent un rôle aussi important que les toxines elles-mêmes au niveau des infections intestinales.

Tableau I. Caractéristiques des entérotoxines

Bactéries	Caractéristiques des toxines produites				
	Toxine	Poids moléculaire (kDa)	Structure	Activité	Mode d'action
<i>Clostridium difficile</i>	toxine A	308	...	cytotonique et cytotoxique	dissolution de l'actine cellulaire augmentation de la perméabilité
<i>Clostridium difficile</i>	toxine B	270	...	cytotoxique	dissolution de l'actine cellulaire
<i>Clostridium perfringens</i> A, C ou D	entérotoxine	34	chaîne simple	cytotonique et cytotoxique	inhibition du transport du glucose, des acides aminés et de la synthèse protéique
<i>Vibrio cholerae</i>	toxine cholérique	84	1 sous-unité A 5 sous-unités B	cytotonique	activation de l'adénylate cyclase
<i>Escherichia coli</i>	toxine LT	85	1 sous-unité A 5 sous-unités B	cytotonique	activation de l'adénylate cyclase
<i>Escherichia coli</i>	toxine ST	2,5	chaîne simple	cytotonique	activation de la guanylate cyclase
<i>Shigella dysenteriae</i>	Véro-toxine	70	1 sous-unité A 4-6 sous-unités B	cytotonique cytotoxique neurotoxique	inhibition de la synthèse protéique
<i>Salmonella</i>	entérotoxine	90	≥ 2 sous-unités	cytotonique	activation de l'adénylate cyclase?

RÉFÉRENCES

- Barroso LA, Wang SZ, Phelps CJ, Wilkins TD (1990) Nucleotide sequence of *Clostridium difficile* toxin B gene. *Nucleic Acids Res* 18, 4004
- Bergdoll MS (1988) Ileal loop fluid accumulation test for diarrheal toxins. *Methods Enzymol* 165, 306-323
- Burgess MN, Bywater RJ, Cowley CM, Mullan NA, Wewsome PM (1978) Biological evaluation of a methanol soluble, heat-stable *E coli* enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits, and calves. *Infect Immun* 21, 526-531
- Chopra AK, Houston CW, Peterson JW, Prasad R, Mekalanos JJ (1987) Cloning and expression of the *Salmonella* enterotoxin gene. *J Bacteriol* 169, 5095-5100
- Corthier G, Dubos F, Raibaud P (1986) Ability of two *Clostridium difficile* strains from man and hare to produce cytotoxin *in vitro* and in gnotobiotic rodent intestines. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 137B, 113-121
- Corthier G, Muller MC, Elmer GW, Lucas F, Dubos-Ramaré F (1989) Interrelationships between digestive proteolytic activities and production and quantitation of toxins in pseudomembranous colitis induced by *Clostridium difficile* in gnotobiotic mice. *Infect Immun* 57, 3922-3927
- Cuatrecasas P (1973) Interaction of *Vibrio Cholerae* enterotoxin with cell membranes. *Biochemistry* 12, 3547-3558
- Dallas WS, Falkow S (1979) The molecular nature of heat-labile enterotoxin (LT) of *Escherichia coli*. *Nature* 277, 406-407
- Donowitz M, Keusch GT, Binder HJ (1975) Effect of *Shigella* enterotoxin on electrolyte transport in rabbit ileum. *Gastroenterology* 69, 1230-1237
- Dove CH, Wang S-Z, Price SB, Phelps CJ, Lyerly DM, Wilkins TD, Johnson JL (1990) Molecular characterization of the *Clostridium difficile* toxin A gene. *Infect Immun* 58, 480-488
- Eiklid K, Olsnes S (1980) Interaction of *Shigella* cytotoxin with receptors on sensitive and insensitive cells. *J Recept Res* 1, 199-213
- Eiklid K, Olsnes S (1983) Animal toxicity of *Shigella dysenteriae* cytotoxin: evidence that the neurotoxic, enterotoxic, and cytotoxic activities are due to one toxin. *J Immunol* 130, 380-385
- Fishman PH (1982) Role of membrane gangliosides in the binding and action of bacterial toxins. *J Membr Biol* 69, 85-97
- Fishman PH, Atikkan EE (1980) Mechanism of action of cholera toxin: effect of receptor density and multivalent binding on activation of adenylate cyclase. *J Membr Biol* 54, 51-60
- Gemmell CG (1984) Comparative study of the nature and biological activities of bacterial enterotoxins. *J Med Microbiol* 17, 217-235
- Giannella RA, Luttrell M, Thompson M (1983) Binding of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin to receptors on rat intestinal cells. *Am J Physiol* 245: G492-G498
- Gilbert RJ, Pothoulakis C, LaMont JT (1989a) Effect of purified *Clostridium difficile* toxins on intestinal smooth muscle. I. Toxin A. *Am J Physiol* 256, G759-G766
- Gilbert RJ, Pothoulakis C, LaMont JT (1989b) Effect of purified *Clostridium difficile* toxins on intestinal smooth muscle. II. Toxin B. *Am J Physiol* 256, G767-G772
- Gill DM, Clements JD, Robertson DC, Finkelstein RA (1981) Subunit number and arrangement in *Escherichia coli* heat labile enterotoxin. *Infect Immun* 33, 677-682
- Giraldi R, Guth Beatriz EC, Trabulsi LR (1990) Production of Shiga-like toxin among *Escherichia coli* strains and other bacteria isolated from diarrhea in Sao Paulo, Brazil. *J Clin Microbiol* 28, 1460-62
- Granum PE (1982) Inhibition of protein synthesis by a tryptic polypeptide of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *Biochim Biophys Acta* 708, 6-11
- Greenburg RN, Guerrant RL (1980) *E coli* heat-stable enterotoxin. *Pharmacol Ther* 11, 507-531
- Griffiths SL, Finkelstein RA, Critchley DR (1986) Characterization of the receptor for cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile toxin in rabbit intestinal

- brush borders. *Biochem J* 238, 313-322
- Guerrant RL, Hugues JM, Chang B, Robertson DC, Murad F (1980) Activation of intestinal guanylate cyclase by heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: studies of tissues specificity, potential receptors, and intermediates. *J Infect Dis* 142, 220-228
- Hall IC, O'Tool E (1935) Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. *Am J Dis Child* 49, 390-402
- Hanna PC, Wnek AP, McClane BA (1989) Molecular cloning of the 3' half of the *Clostridium perfringens* enterotoxin gene and demonstration that this region encodes receptor-binding activity. *J Bacteriol* 171, 6815-6820
- Hecht G, Pothoulakis C, LaMont JT, Madara JL (1988) *Clostridium difficile* toxin A affects intestinal epithelial tight junction permeability and cytoskeletal structure. *Gastroenterology* 94, 178A (abstract)
- Heyman M, Corthier G, Lucas F, Meslin JC, Desjeux JF (1989) Evolution of the caecal epithelial barrier during *Clostridium difficile* infection in mouse. *Gut* 30, 1087-1093
- Holmgren J, Lönnroth I, Månsson JE, Svennerholm L (1975) Interaction of cholera toxin and membrane GM1 ganglioside of small intestine. *Biochemistry* 72, 2520-2524
- Holmgren J, Fredman P, Lindblad M, Svennerholm A-M, Svennerholm L (1982) Rabbit intestinal receptor for *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin lacking affinity for cholera toxin. *Infect Immun* 38, 424-433
- Hugues S, Warhurst G, Turnberg LA, Higgs NB, Gliugliano LG, Drasar BS (1983) *Clostridium difficile* toxin-induced intestinal secretion in rabbit ileum in Ussing chambers. *Gut* 24, 94-98
- Hulkower KI, Wnek AP, McClane BA (1989) Evidence that alteration in small molecule permeability are involved in the *Clostridium perfringens* type A enterotoxin-induced inhibition of macromolecular synthesis in Vero cells. *J Cell Physiol* 140, 498-504
- Keusch GT, Donta ST (1975) Classification of enterotoxins on the basis of activity in cell culture. *J Infect Dis* 131, 58-63
- Keusch GT, Donohue-Rolfe A, Jacewicz M, Kane AV (1988) Shiga toxin: production and purification. *Methods enzymol* 165, 152-162
- Krivan HC, Wilkins TD (1987) Purification of *Clostridium difficile* toxin A by affinity chromatography on immobilized thyroglobulin. *Infect Immun* 55, 1873-1877
- Krivan HC, Clark GF, Smith DF, Wilkins TD (1986) Cell surface binding site for *Clostridium difficile* enterotoxin: evidence for a glycoconjugate containing the sequence Gal 1-3Gal β 1-4GlcNAc. *Infect Immun* 53, 573-581
- Libby JM, Jortner BS, Wilkins TD (1982) Effects of the two toxins of *Clostridium difficile* in antibiotic-associated cecitis in hamsters. *Infect Immun* 36: 822-829
- Lyerly DM, Lockwood DE, Richardson SH, Wilkins TD (1982) Biological activities of toxins A and B of *Clostridium difficile*. *Infect Immun* 35, 1147-1150
- Lyerly DM, Sullivan NM, Wilkins TD (1983) Enzyme-linked immunosorbent assay for *Clostridium difficile* toxin A. *Am J Clin Microbiol* 17, 72-78
- Lyerly DM, Saum KE, McDonald DK, Wilkins TD (1985) Effect of *Clostridium difficile* toxins given intragastrically to animals. *Infect Immun* 47, 349-352
- McDonel JL (1979) The molecular mode of action of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Am J Clin Nutr* 32, 210-218
- McDonel JL, MacClane BA (1979) Binding versus biological activity of *Clostridium perfringens*. *Biochem Biophys Res Comm* 87, 497-504
- McDonel JL, Chang LW, Pouds JG, Duncan CL (1978) The effects of *Clostridium perfringens* enterotoxin on rat and rabbit ileum an electron microscopic study. *Lab Invest* 39, 210-218
- Mitchell TJ, Ketley JM, Brudon DW, Candy DCA, Stephen J (1987) The effects of *Clostridium difficile* crude toxins and purified toxin A stripped rabbit ileal mucosa in Ussing chambers. *J Med Microbiol* 23, 199-204
- Molina NC, Peterson JW (1980) Cholera-like toxin released by *Salmonella* species in the presence of mitomycin C. *Infect Immun* 30, 224-230

- Murray MJ, Doran RE, Pfeiffer CJ, Tyler DE, Moore JN, Sriranganathan N (1989) Comparative effects of Cholera toxin, *Salmonella typhimurium* culture lysate, and viable *Salmonella typhimurium* in isolated colon segments in ponies. *Am J Vet Res* 50, 22-28
- O'Brien AD, Holmes RK (1987) Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol Rev* 51, 206-220
- Olsnes S, Reisbig R, Eiklid K (1981) Subunit structure of *Shigella* cytotoxin. *J Biol Chem* 256, 8732-8738
- Peterson JW, Sandefur PD (1979) Evidence of a role for permeability factors in the pathogenesis of salmonellosis. *Am J Clin Nutr* 32, 197-200
- Peterson JW, Molina NC, Houston CW, Fader RC (1984) Elevated cAMP in intestinal epithelial cells during experimental cholera and salmonellosis. *Toxicon* 21, 761-775
- Pothoulakis C, Triadafilopoulos G, Clark M, Franzblau C, LaMont JT (1986) *Clostridium difficile* cytotoxin inhibits protein synthesis in fibroblast and intestinal mucosa. *Gastroenterology* 91, 1147-1153
- Riley LW (1987) The epidemiologic, clinical, and microbiologic features of hemorrhagic colitis. *Annu Rev Microbiol* 41, 383-407
- Ronnberg B, Wadstrom T, Jornvall H (1983) Structure of a heat-stable enterotoxin produced by a human strain of *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 155, 183-185
- Ryd M, Alfredsson H, Blomberg L, Andersson A, Lindberg AA (1989) Purification of Shiga toxin by -D-galactose-(1-4)- β -D-galactose-(1-4)- β -D-glucose-(1-) receptor ligand-based chromatography; *FEBS Lett* 258, 320-322
- Sandefur PD, Peterson JW (1976) Isolation of skin permeability factors from culture filtrates of *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 14, 671-679
- Sandefur PD, Peterson JW (1977) Neutralization of *Salmonella* induced elongation of Chinese hamster ovary cells by cholera antitoxin. *Infect Immun* 15, 988-992
- Sedlock DM, Koupal LR, Deibel RH (1978) Production and partial purification of *Salmonella* enterotoxin. *Infect Immun* 20, 375-380
- Shoshan CM, Aman P, Florin I, Thelestam M (1990) Cellular intoxication with *Clostridium difficile* toxin B. *Atla-Altern Lab Anim* 17, 191-194
- Smith HW (1967) Studies on *Escherichia coli* enterotoxin. *J Pathol Bacteriol* 93, 531-543
- Sullivan NM, Pellett S, Wilkins TD (1982) Purification and characterization of toxin A and B of *Clostridium difficile*. *Infect Immun* 35, 1032-1040
- Triadafilopoulos G, Pothoulakis C, O'Brien MJ, LaMont JT (1987) Differential effects of *Clostridium difficile* toxins A and B on rabbit ileum. *Gastroenterology* 93, 273-279
- Triadafilopoulos G, Pothoulakis C, Weiss R, Giampaolo C, LaMont JT (1989) Comparative study of *Clostridium difficile* toxin A and Cholera toxin in rabbit ileum. *Gastroenterology* 97, 1186-1192
- Tucker KD, Carrig PE, Wilkins TD (1990) Toxin A of *Clostridium difficile* is a potent cytotoxin. *J Clin Microbiol* 28, 869-871
- Zemelman BV, Chu S-HW, Walker WA (1989) Host response to *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin via two microvillus membrane receptors in the rat intestine. *Infect Immun* 57, 2947-52