Journal de la Société de Biologie, 197 (4), 375-378 (2003)

Le nématode *Caenorhabditis elegans*, un modèle d'étude pour les interactions hôte-bactéries pathogènes

par Jonathan Ewbank

Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, INSERM/CNRS/Université de la Méditerranée, Case 906, 13288 Marseille, France. ewbank@ciml.univ-mrs.fr

Reçu le 18 juin 2003

RÉSUMÉ

Certains pathogènes capables d'infecter un large éventail d'organismes produisent des facteurs de virulence universels nécessaires à la pathogénie quel que soit l'hôte. Ausubel *et al.* l'ont très clairement démontré pour *Pseudomonas aeruginosa*, une bactérie pathogène opportuniste. En conséquence, on peut utiliser des systèmes modèles non-mammifères, notamment celui du Nématode *Caenorhabditis elegans*, pour évaluer le rôle de facteurs bactériens dans la virulence. Un nombre significatif de bactéries infectieuses pour l'Homme sont aussi pathogènes pour *C. elegans*, par exemple la bactérie pathogène opportuniste *Serratia marcescens*. Après une introduction des avantages pratiques liés à l'utilisation de *C. elegans*, et un bref résumé des études antérieures, les résultats d'un crible pour identifier les facteurs de virulence de *S. marcescens* seront présentés.

SUMMARY The nematode *Caenorhabditis elegans* as a model for the study of host-pathogen interactions

For certain pathogens capable of infecting a broad range of organisms, there exist universal virulence factors, necessary for full pathogenicity regardless of the host. This has been most clearly demonstrated by Ausubel and colleagues for the human opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. As a consequence, one can use non-mammalian model systems, including the nematode worm *Caenorhabditis elegans*, to assay for such virulence factors. A significant number of pathogens of *C. elegans*, that provoke a range of diseases, are now known, including the opportunistic human pathogen *Serratia marcescens*. After explaining the practical advantages associated with the use of *C. elegans*, and briefly reviewing previous studies, the results of a screen for *S. marcescens* virulence factors will be presented.

Caenorhabditis elegans est un nématode libre vivant dans le sol. Il est étudié au laboratoire depuis plus d'un demi-siècle, d'abord par Dougherty *et al.* à Berkeley en Californie, puis par Nigon et Brun en France, avant d'être adopté par Brenner comme modèle pour l'étude du développement d'organismes multicellulaires (revue dans Ankeny, 2001). Le choix de Brenner était fondé essentiellement sur le programme de développement invariant du nématode. Un de ses premiers post-doctorants, Sulston, a décrit en détail l'ensemble des divisions cellulaires comprises entre la fécondation de l'œuf et les 959 cellules somatiques de l'adulte (Sulston & Horvitz, 1977 ; Sulston *et al.* 1983). Lors de ces études, Sulston a démontré qu'une centaine de cellules étaient programmées pour mourir lors du développement et a isolé le premier mutant affecté dans la mort cellulaire programmée, ou apoptose. Horvitz et ses collègues ont étendu ce travail et identifié les bases moléculaires des étapes fondamentales de l'apoptose. De façon remarquable, ils ont montré que ces mécanismes étaient conservés chez les eucaryotes supérieurs, incluant l'Homme (Hengartner & Horvitz, 1994). Le trio Brenner, Sulston et Horvitz a reçu le prix Nobel pour ces travaux en 2002.

La conservation des mécanismes moléculaires sous-jacents aux fonctions cellulaires et au développement de l'organisme est apparue de plus en plus nette au cours des dernières années. On peut citer des exemples allant du guidage axonal à la détermination sexuelle qui illustrent l'utilité du modèle *C. elegans* pour comprendre la biologie des organismes supérieurs (Riddle *et al.*, 1997). La validité du modèle est encore plus marquante parce qu'il présente des avantages techniques considérables. A ce jour, il y a plusieurs raisons de choisir cet helminthe en plus de son anatomie simple. Les adultes peuvent être cultivés au laboratoire sur un tapis bactérien dans une boîte de Petri. Comme leur taille finale est de

1 mm, plusieurs milliers d'individus peuvent être cultivés sur une même boîte. Ils sont transparents, ce qui rend les observations microscopiques sur les animaux entiers très faciles. Des rapporteurs fluorescents peuvent être utilisés pour l'étude des domaines d'expression cellulaire et sub-cellulaire de protéines chez des animaux vivants. Ceci est facilité par le fait que des helminthes transgéniques peuvent être obtenus très facilement, par injection dans la gonade d'ADN autologue ou hétérologue sous la forme de plasmide, cosmide, YAC, BAC, phage, ou même de produit PCR. L'espèce a un cycle de vie très rapide : le développement d'un œuf en adulte prend 3 jours à 25° C. *C. elegans* est une espèce hermaphrodite autofécondante, ce qui simplifie énormément la maintenance des souches et la faisabilité des cribles génétiques. Mais la possibilité d'obtention de mâles, peu fréquents dans la nature, permet toutes les approches de génétique classique (Riddle *et al.*, 1997). Les individus peuvent être congelés, ce qui a permis de créer un centre de ressources le "*Caenorhabditis* Genetics Center" (biosci.umn.edu/CGC/CGChomepage.htm) qui maintient et distribue gratuitement une collection de plusieurs milliers de mutants. Les mutants ont été traditionnellement obtenus par mutagenèse chimique à l'EMS (Ethyl-Méthane-Sulfonate) ou par irradiation, mais un système récent de mutagenèse par transposition hétérologue est de plus en plus utilisé (Bessereau *et al.*, 2001). Parallèlement aux mutations stables, les gènes peuvent être inactivés de façon transitoire par inactivation par ARN, ou « RNAi » (Bosher & Labouesse, 2000 ; Bargmann, 2001 ; Pujol & Ewbank, 2001).

C. elegans a été le premier organisme multicellulaire séquencé. Le génome fait 100 Mb et contient environ 20 000 gènes. Près de 40 % des gènes prédits ont des homologues dans le génome humain, incluant un nombre important de gènes liés à une pathologie (Fraser *et al.*, 2000). La quasi-totalité des informations moléculaires, phénotypiques et bibliographiques concernant *C. elegans* est en accès libre dans la base de données communautaire Wormbase (www.wormbase.org).

Curieusement, en dépit des nombreux avantages pratiques de *C. elegans*, il n'a été utilisé que récemment pour l'étude des interactions hôtes-organismes pathogènes. Des études moléculaires des 10 dernières années ont révélé un parallélisme remarquable entre les défenses antibactériennes de la mouche *Drosophila melanogaster* et certains aspects de l'immunité innée chez les Vertébrés (Hoffmann & Reichhart, 2002). La première démonstration que l'helminthe a des défenses inductibles a été publiée récemment (Mallo *et al.*, 2002). Ces résultats et d'autres impliquant une voie MAPK dans son immunité innée (Kim *et al.*, 2002) sont décrits dans une revue récente (Kurz & Ewbank, 2003). Ces données sont en dehors du champ de cette présentation consacrée à l'utilisation de l'helminthe dans l'étude de la pathogenèse de l'infection bactérienne.

Ausubel *et al.* ont initié ces études sur la bactérie opportuniste humaine *Pseudomonas aeruginosa*. Suivant la souche ou les conditions de culture, cette bactérie est capable de tuer *C. elegans* par des mécanismes différents (revue dans Tan & Ausubel, 2000). La souche PA14 cultivée dans un milieu de faible osmolarité établit une infection intestinale conduisant à la mort des vers en quelques jours. Un crible a été exécuté pour identifier des mutants PA14 montrant une virulence réduite. Sur les 8 mutants isolés, seulement 3 correspondent à des gènes précédemment identifiés comme étant importants dans la virulence de *P. aeruginosa* (Tableau I). Mais de façon remarquable, la majorité des 5 autres mutants se sont avérés nécessaires pour la virulence complète de PA14 dans différents modèles d'infection (Tableau I (Mahajan-Miklos *et al.*, 2000)). En réalisant un crible dans le modèle simple et peu coûteux du ver, l'équipe d'Ausubel a identifié des facteurs de virulence universels, nécessaires pour l'infection par PA14 d'une large variété d'hôte. Le fait que la grande majorité des gènes isolés dans le crible contribue à la capacité d'infection de PA14 dans un modèle murin suggère que *C. elegans* peut être utilisé pour l'identification de gènes bactériens importants lors des infections chez l'Homme.

Dans les conditions de laboratoire standard, les vers se nourrissent d'une bactérie non-pathogène, la souche *E. coli* OP50. On peut donc facilement établir si une souche donnée est pathogène, simplement en remplaçant OP50 par une autre bactérie et en mesurant la durée de vie des vers. Certains pathogènes ne provoquent pas de signes évidents de maladie, mais réduisent la longévité des vers (Couillault & Ewbank, 2002). D'autres provoquent des lyses cellulaires ou rendent les vers stériles

TABLEAU I. – Facteurs de virulence universels de *Pseudomonas aeruginosa*[1]

Gène	Produit du gène	Atténuation de la virulence chez		
		Nématode	Insecte[2]	Souris[3]
gacA[4]	Régulateur d'un système à deux composants	Oui	Oui	Oui
gacS[4]	Régulateur d'un système à deux composants	Oui	?	Oui
lasR[4]	Régulateur d'un système de Quorum-sensing	Oui	Oui	Oui
aefA	Protéine de membrane	Oui	Non	Non
mtrR	Régulateur d'un transporteur d'antibiotiques	Oui	Non	Oui
ptsP	Régulateur des opérons RpoN-dépendant	Oui	Oui	Oui
X	inconnu	Oui	Oui	Oui
X	inconnu	Oui	Non	Non

[1] Adapté de (Tan & Ausubel, 2000) et (Jander *et al.*, 2000).
[2] *Galleria mellonella* ; considérée atténuée quand la LD_{50} était > 5X celle de PA14.
[3] Considérée atténuée quand la mortalité murine était < 60 % à celle observée avec PA14.
[4] Gènes précédemment identifiés comme étant importants dans la virulence.

TABLEAU II. – Liste non-exhaustive des pathogènes bactériens de *C. elegans*[1]

Espèces	Référence	Espèces	Référence
Aeromonas hydrophila	Couillault & Ewbank, 2002	*Photorhabdus luminescens*	Couillault & Ewbank, 2002
Agrobacterium tumefaciens	Couillault & Ewbank, 2002	*Pseudomonas aeruginosa*	Tan & Ausubel, 2000
Bacillus megaterium	Andrew & Nicholas, 1976	*Pseudomonas fluorescens*	Darby *et al.*, 1999
Bacillus thuringiensis	Leyns *et al.*, 1995 ; Marroquin *et al.*, 2000	*Salmonella typhimurium*	Aballay *et al.*, 2000 ; Labrousse *et al.*, 2000
Burkholderia cepacia	O'Quinn *et al.*, 2001	*Serratia marcescens*	Kurz & Ewbank, 2000 ; Pujol *et al.*, 2001
Burkholderia pseudomallei	O'Quinn *et al.*, 2001	*Shewanella massalia*	Couillault & Ewbank, 2002
Burkholderia thailandensi	O'Quinn *et al.*, 2001	*Shewanella frigidimarina*	Couillault & Ewbank, 2002
Erwinia christamthemi	Couillault & Ewbank, 2002	*Xenorhabdus nematophila*	Couillault & Ewbank, 2002
Erwinia carotovora caratovora	Couillault & Ewbank, 2002	*Yersinia* spp.	Darby *et al.*, 2002
Microbacterium nematophilum	Hodgkin *et al.*, 2000		

[1] Adapté de (Ewbank, 2002).

(revue dans (Ewbank, 2002)). Certaines bactéries sont capables d'adhérer spécifiquement à la cuticule du ver, comme *Xenorhabdus nematophilum* (Couillault & Ewbank, 2002) ou *Yersinia spp.* (Darby *et al.*, 2002) qui adhère au niveau de la tête du ver. Concernant *Y. pseudotuberculosis*, ou *Y. pestis*, une couche dense de bactéries se forme sur la bouche empêchant le ver de se nourrir, et il meurt de faim. Les bactéries s'attachent à la bouche en formant un biofilm adhésif. Cette formation dépend du locus *hmsHFRS* (Darby *et al.*, 2002) qui joue aussi un rôle dans le blocage du tractus digestif de la puce. Ces observations soulignent à nouveau la conservation au niveau moléculaire des interactions entre un pathogène et ses différents hôtes.

Plusieurs autres bactéries, à Gram négatif ou positif, ont été caractérisées comme pathogènes de *C. elegans* (Tableau II). Dans notre équipe, nous travaillons principalement sur les interactions entre le nématode et *Serratia marcescens*. Comme *P. aeruginosa*, cette bactérie est un pathogène humain opportuniste présentant un large tropisme d'hôte. Elle est capable d'établir une infection intestinale persistante qui conduit à la mort précoce des vers. Nous avons criblé une banque de 2 000 mutants de *S. marcescens*, générée par transposition, pour des mutants ayant une virulence réduite chez le ver (Kurz *et al.*, 2003). Une totale de 23 mutants contenant un seul transposon a été isolé. Près de la moitié de ces mutants sont aussi atténués lors de l'infection chez *Drosophila melanogaster*, ce qui suggère que les gènes touchés jouent un rôle dans l'infection indépendamment de l'hôte. Le site d'insertion du transposon a été identifié dans 21 de ces mutants. Le seul mutant correspondant à un locus déjà identifié chez *S. marcescens* contient une insertion dans l'opéron *shlBA* qui code une activité cytolytique nécessaire pour la virulence lors de l'infection urinaire chez le rat (Marre *et al.*, 1989). Notre mutant est également avirulent dans un modèle d'infection pulmonaire chez la souris (Kurz *et al.*, 2003). Ceci démontre clairement la relevance du couple *C. elegans*-*S. marcescens* pour l'identification des facteurs importants lors de l'infection des vertébrés. Il faut attendre les résultats des tests futurs pour savoir si les autres gènes identifiés dans ce crible sont des facteurs de virulence universels, nécessaires pour la pathogenèse quel que soit l'hôte.

En conclusion, le nématode *C. elegans* est un système modèle simple, bien adapté aux cribles à grande échelle, et il peut permettre d'identifier efficacement et rapidement de nouvelles cibles thérapeutiques pour le développement de nouveaux agents antimicrobiens (Ausubel *et al.*, 1998).

Remerciements. – Je remercie Nathalie Pujol et Elizabeth Pradel pour leur aide à la traduction en français de cet article.

BIBLIOGRAPHIE

Aballay A., Yorgey P.& Ausubel,F. M., *Salmonella typhimurium* proliferates and establishes a persistent infection in the intestine of *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.*, 2000, *10*, 1539-1542

Andrew P. A.& Nicholas W. L., Effect of bacteria on dispersal of *Caenorhabditis elegans* (Rhabditidae). *Nematologica*, 1976, *22*, 451-461

Ankeny R. A., The natural history of *Caenorhabditis elegans* research. *Nat. Rev. Genet.*, 2001, *2*, 474-479.

Ausubel F. M., Rahme L. G., Tan M. W., Ruvkin G. B., Mahajan-Miklos S., Broeks A., Plasterk R. H., Jander G. & Heard J., Methods of screening compounds useful for prevention of infection or pathogenicity. 1998. Patent WO 98/50080.

Bargmann C. I., High-throughput reverse genetics: RNAi screens in *Caenorhabditis elegans*. http://genomebiology.com/2001/2/2/reviews/1005.1

Bessereau J. L., Wright A., Williams D. C., Schuske K., Davis M. W. & Jorgensen E. M., Mobilization of a Drosophila transposon in the *Caenorhabditis elegans* germ line. *Nature,* 2001, *413*, 70-74.

Bosher J. M. & Labouesse M., RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. *Nat. Cell. Biol.,* 2000, *2*, E31-E36.

Couillault C. & Ewbank J. J., Diverse bacteria are pathogens of *Caenorhabditis elegans*. *Infect. Immun.,* 2002, *70*, 4705-4707.

Darby C., Cosma C. L., Thomas J. H. & Manoil C., Lethal paralysis of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 1999, *96*, 15202-15207.

Darby C., Hsu J. W., Ghori N. & Falkow S., *Caenorhabditis elegans*: plague bacteria biofilm blocks food intake. *Nature,* 2002, *417*, 243-244.

Ewbank J. J., Tackling both sides of the host-pathogen equation with *Caenorhabditis elegans*. *Microbes and Infection,* 2002, *4*, 247-256.

Fraser A. G., Kamath R. S., Zipperlen P., Martinez-Campos M., Sohrmann M. & Ahringer J., Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature,* 2000, *408*, 325-330.

Hengartner M. O. & Horvitz H. R., Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Opin. Genet. Dev.,* 1994, *4*, 581-586.

Hodgkin J., Kuwabara P. E. & Corneliussen B., A novel bacterial pathogen, *Microbacterium nematophilum*, induces morphological change in the nematode *C. elegans*. *Curr. Biol.,* 2000, *10*, 1615-1618.

Hoffmann J. A. & Reichhart J. M., *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat. Immunol.,* 2002, *3*, 121-126.

Jander G., Rahme L. G. & Ausubel F. M., Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *J. Bacteriol.,* 2000, *182*, 3843-3845.

Kim D. H., Feinbaum R., Alloing G., Emerson F. E., Garsin D. A., Inoue H., Tanaka-Hino M., Hisamoto N., Matsumoto K., Tan M. W. & Ausubel F. M., A conserved p38 MAP kinase pathway in *Caenorhabditis elegans* innate immunity. *Science,* 2002, *297*, 623-626.

Kurz C. L.& Ewbank J. J., *Caenorhabditis elegans* for the study of host-pathogen interactions. *Trends Microbiol.,* 2000, *8*, 142-144.

Kurz C. L., Chauvet S., Andres E., Aurouze M., Vallet I., Michel G. P., Uh M., Celli J., Filloux A., De Bentzmann S., Steinmetz I., Hoffmann J. A., Finlay B. B., Gorvel J. P., Ferrandon D. & Ewbank J. J., Virulence factors of the human opportunistic pathogen *Serratia marcescens* identified by *in vivo* screening. *Embo. J.,* 2003, *22*, 1451-1460.

Kurz C. L. & Ewbank J. J., *Caenorhabditis elegans*: an emerging genetic model for the study of innate immunity. *Nat. Rev. Genet.,* 2003, *4*, 380-390.

Labrousse A., Chauvet S., Couillault C., Kurz C. L. & Ewbank J. J., *Caenorhabditis elegans* is a model host for *Salmonella typhimurium*. *Curr. Biol.,* 2000, *10*, 1543-1545.

Leyns F., Borgonie G., Arnaut G. & De Waele D., Nematicidal activity of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Fundam. appl. Nematol.,* 1995, *18*, 211-218.

Mahajan-Miklos S., Rahme L. G. & Ausubel F. M., Elucidating the molecular mechanisms of bacterial virulence using non-mammalian hosts. *Mol. Microbiol.,* 2000, *37*, 981-988.

Mallo G. V., Kurz C. L., Couillault C., Pujol N., Granjeaud S., Kohara Y. & Ewbank J. J., Inducible antibacterial defence system in *C. elegans*. *Curr. Biol.,* 2002, *12*, 1209-1214.

Marre R., Hacker J. & Braun V., The cell-bound hemolysin of *Serratia marcescens* contributes to uropathogenicity. *Microb. Pathog.,* 1989, *7*, 153-156.

Marroquin L. D., Elyassnia D., Griffitts J. S., Feitelson J. S. & Aroian R. V., *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) toxin susceptibility and isolation of resistance mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics,* 2000, *155*, 1693-1699.

O'Quinn A. L., Wiegand E. M. & Jeddeloh J. A., *Burkholderia pseudomallei* kills the nematode *Caenorhabditis elegans* using an endotoxin-mediated paralysis. *Cell. Microbiol.,* 2001, *3*, 381-394.

Pujol N., Link E. M., Liu L. X., Kurz L. C., Alloing G., Tan M. W., Ray K. P., Solari R., Johnson C. D. & Ewbank J. J., A reverse genetic analysis of components of the Toll signalling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.,* 2001, *11*, 809-821.

Pujol N. & Ewbank J. J., *C. elegans*: du génome à l'invalidation systématique. *M/S médecine sciences,* 2001, *16*, 912-916.

Riddle D. L., Blumenthal T., Meyer B. J. & Priess J. R. (Eds.), 1997, *C. elegans* II. Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sulston J. E. & Horvitz H. R., Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.,* 1977, *56*, 110-156.

Sulston J. E., Schierenberg E., White J. G. & Thomson J. N., The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.,* 1983, *100*, 64-119.

Tan M. W. & Ausubel F. M., *Caenorhabditis elegans*: a model genetic host to study *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.,* 2000, *3*, 29-34.